

ELIZABETH BILEVICIUS

**Análise de Fatores Relacionados à Resistência ao
Tratamento com Drogas Anti-Epilépticas em Epilepsia
de Lobo Temporal Mesial**

CAMPINAS

2011

ELIZABETH BILEVICIUS

**Análise de Fatores Relacionados à Resistência ao
Tratamento com Drogas Anti-Epilépticas em Epilepsia
de Lobo Temporal Mesial**

Tese de Doutorado apresentada à Pós – Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Doutor em
Ciências, área de concentração em
Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Cendes

Co-orientadora: Profa. Dra. Íscia Lopes-Cendes

CAMPINAS

Unicamp

2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8º / 6652

B492a	Bilevicius, Elizabeth Análise de fatores relacionados à resistência ao tratamento com drogas anti-epilépticas em epilepsia de lobo temporal mesial / Elizabeth Bilevicius. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011. Orientadores : Fernando Cendes; Íscia Lopes-Cendes Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas. 1. Epilepsia do lombo temporal. 2. Neuroimagem. I. Cendes, Fernando. II. Lopes-Cendes, Íscia. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.
-------	---

Título em Inglês: Analysis of factors related to anti-epileptic drug resistance in mesial temporal lobe epilepsy

Keywords: • Temporal lobe epilepsy
• Neuroimage

Titulação: Doutor em Ciências
Área de Concentração: Neurociências

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fernando Cendes
Prof. Dr. Luiz Eduardo Gomes Garcia Betting
Prof. Dr. Marilisa Mantovani Guerreiro
Prof. Dr. Americo Ceiki Sakamoto
Prof. Dr. Veriano Alexandre Júnior

Data da defesa: 09.02.2011

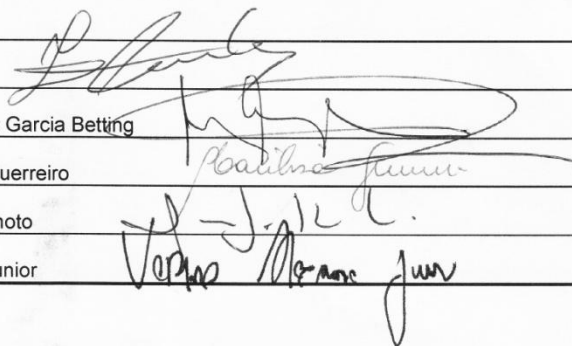
Banca examinadora da tese de Doutorado

Elizabeth Bilevicius

Orientador(a) : Prof(a). Dr(a). Fernando Cendes

Membros:

-
1. Prof(a). Dr(a). Fernando Cendes
 2. Prof(a). Dr(a). Luiz Eduardo Gomes Garcia Betting
 3. Prof(a). Dr(a). Marilisa Mantovani Guerreiro
 4. Prof(a). Dr(a). Américo Ceiki Sakamoto
 5. Prof(a). Dr(a). Veriano Alexandre Junior
-



Handwritten signatures of the five members of the examination board, corresponding to the list provided. The signatures are written in black ink and are somewhat stylized.

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 09/02/2011

DEDICATÓRIA

Aos pacientes, nossos verdadeiros mestres.

À minha avó Emília, por seu inabalável amor e fé em mim.

Aos meus pais Pedro e Rosely, por me ensinarem a perseverar sempre.

AGRADECIMENTOS:

Ao Dr Fernando Cendes, por acreditar neste projeto e na minha capacidade.

À Dra Mariana Saragiotto Silva, pelo apoio e grande auxílio na árdua tarefa de localizar pacientes.

À Secretaria de Saúde do município de Campinas, por ter permitido nossa busca na Policlínica III.

À Tatiane Pedro, por sua presteza em realizar as aquisições de imagens por tantos finais de semana.

Aos professores do departamento de neurologia, que me forneceram a base para chegar até aqui.

À Dra Anelyssa C.F. D’Abreu pelo apoio em vários momentos de dificuldade.

Aos colegas do Laboratório de Neuroimagem pelo auxílio nas diferentes etapas deste trabalho.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos, projeto 06/50626-0.

RESUMO

O objetivo foi realizar uma análise multifatorial dos aspectos clínicos e de ressonância magnética (quantitativos e qualitativos) relacionados à resistência ao tratamento com drogas anti-epilépticas (DAES) em pacientes com epilepsia de lobo temporal mesial e melhor caracterizar o grupo de resposta intermediário a DAES, aqui denominado remitante-recorrente.

Foram incluídos 165 pacientes e divididos em 3 grupos de acordo com a resposta medicamentosa: 50 respondedores (31 mulheres) , 87 não respondedores ao uso de DAES (53 mulheres) e 28 remitentes-recorrentes (17 mulheres) . Estes foram avaliados quanto à idade, frequência de crises e idade no início destas, presença de crises febris, presença e lateralidade da atrofia hipocampal à análise visual, fatores precipitantes e DAES utilizadas. A quantificação dos volumes hipocampais foi realizada através de volumetria manual pelo software DISPLAY e as comparações dos volumes médios de ambos os hipocampus foi realizada entre os 3 grupos e 30 controles sadios por ANOVA. As imagens de ressonância magnética também foram avaliadas através da técnica de Morfometria Baseada em Voxel (VBM) com o software SPM 5 (Statistical Parametric Mapping)/MATLAB 7.7.0, comparando os três grupos com 75 indivíduos normais e entre si através de Teste -T.

Observamos que idade de início das crises foi menor ($p=0,005$) e a frequência das crises ao início foi maior ($p=0,018$) em farmacorresistentes quando comparado aos outros 2 grupos. As DAES mais utilizadas foram a carbamazepina e o clobazam (em associação) em todos os grupos. As doses de carbamazepina utilizadas foram maiores em farmacorresistentes ($p<0,001$) e remitentes-recorrentes ($p=0,02$) em comparação aos

responsivos. Em relação ao clobazam, observamos dose significativamente maior somente nos farmacorresistentes em comparação aos outros dois grupos ($p=0,017$). A comparação da média dos volumes hipocâmpais entre os 3 grupos e controle evidenciou diferenças somente entre farmacorresistentes e controles bilateralmente (esquerda, $p = 0,004$; direita, $p=0,02$). A análise por VBM evidenciou atrofia de substância cinzenta em todos os grupos. No grupo farmacorresponsivo tal atrofia foi mais restrita a áreas ipsilaterais ao foco epileptogênico, ao passo que nos grupos farmacorresistente e remitante-recorrente esta atrofia apresentou-se mais difusa. A comparação entre os grupos evidenciou as seguintes áreas com maior redução de substância cinzenta nos grupos farmacorresistente e remitante-recorrente quando comparados aos farmacorresponsivos: frontal periorbital bilateral ($p<0,01$), cíngulo ($p<0,05$) e temporal contralateral ao foco epileptogênico ($p<0,05$).

Desta forma, observamos que embora as características clínicas demonstrassem mais similaridades entre os grupos respondedor e remitante-recorrente, a análise de VBM mostrou redução de substância cinzenta mais difusa em farmacorresistentes e remitentes-recorrentes.

Assim pudemos observar que as variáveis clínicas relacionadas ao pior prognóstico foram idade e frequência de início de crises. Em relação às variáveis estruturais, embora a atrofia de substância cinzenta (SC) se apresentasse mais difusamente em pacientes de pior resposta medicamentosa, também ocorre em áreas extra-hipocâmpais e mesmo extra-temporais em pacientes considerados farmacorresponsivos mesmo que ipsilateralmente ao foco epileptogênico. Por último, conseguimos caracterizar clínica e estruturalmente o grupo remitante-recorrente, observado na prática clínica, porém até então muito pouco reconhecido na literatura.

ABSTRACT

The objective of the present work was to investigate the relationship between brain MRI and clinical characteristics and patterns of antiepileptic drug (AED) response in patients with mesial temporal lobe epilepsy (MTLE). In order to do that, one hundred sixty five MTLE patients were divided into seizure-free with AED (50 AED-responders, 31 women), 87 pharmacoresistants (53 women), and 28 remitting-relapsing seizure control group (17 women). All groups were evaluated regarding age, frequency of seizures and age at epilepsy onset, duration of epilepsy, febrile seizures (FS), presence and side of hippocampal atrophy on visual inspection (HA), initial precipitating injuries (IPIs), type and quantity of AEDs used. The right and left hippocampi from 99 patients belonging to all three groups (43 pharmacoresistants, 31 pharmacoresponsive and 25 remitting-relapsing subjects). were submitted to manual morphometry by DISPLAY software (Brain Imaging Centre, Montreal, Canada) as well as hippocampi selected from 30 healthy controls. The calculated mean from those hippocampi were compared within subjects and with controls.

For gray matter (GM) MRI voxel-based morphometry (VBM) we selected only patients with unilateral HA on visual MRI analysis ($n=100$). Comparisons were made between all groups and 75 healthy controls.

Age at epilepsy onset was lower ($p=0,005$) and initial frequency of seizures was higher in pharmacoresistants compared with the other two groups ($p=0,018$). The most used AEDs were carbamazepine and clobazam (always in association). The highest carbamazepine dose was observed in pharmacoresistants ($p<0,001$) and remitting-

relapsing group ($p=0,02$). The highest dose of clobazam occurred only in pharmacoresistant group ($p=0,017$).

The comparison between the mean hippocampi volumes from three groups and controls showed differences only on the pharmacoresistants left ($p=0,004$) and right ($p=0,02$) hippocampus comparing to controls.

All groups showed GM atrophy compared to controls in ipsilateral hippocampus, bilateral parahippocampal gyri, frontal, occipital, parietal and cerebellar areas. In the AED-responders group such findings were more restricted to areas ipsilateral to the epileptic focus and more widespread in pharmacoresistants and remitting-relapsing groups. VBM pairwise comparisons showed areas with GM volume reduction in pharmacoresistants and remitting-relapsing compared with AED-responders in bilateral periorbital frontal ($p < 0,01$), cingulum ($p < 0,05$), and temporal lobe contralateral to the epileptic focus ($p < 0,05$). We may conclude that, pharmacoresistants and remitting-relapsing patients presented a similar pattern of GM atrophy which was more widespread compared with AED-responders on VBM. We could also observe that age at epilepsy onset was lower ($p=0,005$) and initial seizure frequency was higher in pharmacoresistants.

LISTA DE ABREVIATURAS

AH	Atrofia hipocampal
DAE	Droga antiepiléptica
ELTM	Epilepsia de Lobo Temporal Mesial
EMT	Esclerose Temporal Mesial
ILAE	International League Against Epilepsy
LCR	Líquido Céfalo-Raquiano
MDC	Malformação do Desenvolvimento Cortical
RM	Ressonância Magnética
SB	Substância Branca
SC	Substância Cinzenta
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Polimorfismo de Único Nucleotídeo
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
VBM	Morformetria Baseada em Voxel

SUMARIO:

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
1 – INTRODUÇÃO.....	4
1.1 Conceito e epidemiologia das epilepsias.....	5
1.2 Conceitos de resposta farmacológica em epilepsias.....	7
1.2.1 Hipótese de alvo.....	9
1.2.2 Hipótese do transportador de múltiplas drogas.....	12
1.2.3 Hipótese do gene variante.....	13
1.2.4 Hipótese de rede.....	15
1.3 Epilepsia de LoboTemporal.....	16
1.3.1 Epilepsia de lobo temporal mesial.....	17
1.3.1a Apresentação clínica.....	17
1.3.1b Achados de EEG e RM.....	19
1.3.1c Etiologia / teoria inflamatória da AH.....	20
1.3.1d Prognóstico e tratamento.....	21
1.4 Neuroimagem.....	23
1.4.1 Volumetria Manual.....	25
1.4.2 Morfometria baseada em Voxel.....	26
2 - JUSTIFICATIVA.....	28
3 - OBJETIVOS.....	30
4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 Identificação dos grupos de estudo.....	33
4.1.1 Critérios de inclusão.....	33
4.1.2 Critérios de exclusão.....	33
4.1.3 Características clínicas e eletrofisiológicas.....	33
4.2 Formação dos grupos de estudo.....	34
4.3 Controles.....	35
4.4 Aspectos éticos.....	35
4.5 Ressonância magnética.....	35
4.5.1 Segmentação Manual dos Hipocampus.....	37
4.5.2 VBM.....	38
4.5.2a Pré processamento dos dados.....	38
4.5.2b Análise estatística das imagens.....	41
4.6 Análises estatísticas dos dados clínicos.....	42
5 – RESULTADOS.....	43
Capítulo 1	45

Capítulo 2.....	79
6 – DISCUSSÃO.....	86
7 – CONCLUSÕES.....	94
8 – REFERÊNCIAS.....	96
9– ANEXO.....	109
9.1 Anexo.....	110
10 – APÊNDICES.....	143
9.1 Apêndice 1.....	144
9.2 Apêndice 2.....	148
9.3 Apêndice 3.....	154

INTRODUÇÃO

1.1 Conceito e epidemiologia das epilepsias:

A epilepsia, mais que uma doença ou síndrome, representa um conjunto de complexos sintomas que surgem a partir de um vasto número de disfunções cerebrais que, por sua vez, podem ser secundários a vários processos patológicos (1). A característica comum fundamental a este grupo é a presença de crises epiléticas recorrentes não provocadas (2).

A epilepsia é segunda condição neurológica mais comum, após a cefaléia. Acredita-se que afete cerca de 50 milhões de pessoas no mundo com taxa de prevalência ajustada para a idade de 0,2% a 4,1% ,dependendo da população estudada (3) dos quais 40 milhões não têm tratamento adequado. Mesmo entre aqueles que o recebem, cerca de 30% a 40% não apresentam controle considerado satisfatório de suas crises (4).

A incidência de epilepsia é maior na primeira infância e na faixa etária geriátrica e os principais fatores relacionados à maior incidência nestas populações são condições congênitas, de desenvolvimento e genéticas na infância (1) e nos idosos as doenças cerebrovasculares, condições degenerativas e doença de Alzheimer. Esse fato pode explicar o aumento dramático da incidência de epilepsias focais em idosos (6).

A incidência média de epilepsia em países desenvolvidos até os 60 anos é em torno de 20/100.000 - ano (7), crescendo para 76/100.000 entre 60 a 69 anos chegando até 159/100.000 na faixa acima de 80 anos (8).

Em países em desenvolvimento a incidência pode alcançar o dobro ou triplo da incidência observada nos países desenvolvidos (9,10), dado que nestes países a população é

mais exposta certas condições como endemias (p. ex. malária e neurocisticercose) e violência urbana (5).

De acordo com a nova classificação de crises e epilepsias realizada pela ILAE entende-se por crises epiléticas generalizadas aquelas que se originam em algum ponto entre os hemisférios cerebrais e que rapidamente espraia-se por redes neuronais distribuídas bilateralmente podendo incluir estruturas corticais e subcorticais mas não necessariamente todo o córtex, e as focais como um conjunto de crises não provocadas de origem em redes neuronais restritas a um hemisfério cerebral, podendo inclusive ter sua origem em regiões subcorticais (11).

Os tipos de crise mais prevalentes podem variar de acordo com a faixa etária e a população estudada. Alguns estudos observam maior prevalência de crises generalizadas na faixa etária pediátrica, outros como o de Berg e colaboradores (1999) (12) não observaram tal tendência. A provável explicação para esta disparidade encontra-se no fato de que possivelmente as crises focais nesta faixa etária tenham sido subrelatadas (13).

Apesar da mudança da nomenclatura e de alguns conceitos relacionados às epilepsias, as crises focais (parciais) permanecem sendo as mais frequentes na população adulta, sobretudo em países desenvolvidos. Estima-se que represente aproximadamente 50% a 70% de todos os tipos de crises epiléticas (14). Mesmo nos países em desenvolvimento, onde ainda se observa uma frequência maior de crises generalizadas, vem-se notando diminuição destas últimas e aumento na frequência de crises focais . Atribui-se a isso uma série de fatores tais como: melhorias na qualidade do atendimentos médicos, na qualidade da educação das comunidades e na expectativa de vida destes indivíduos, mesmo que de forma modesta (1,2).

O local de origem mais comum de crises focais é no lobo temporal. Conforme posteriormente discutido, este lobo é responsável por cerca de 50% de todas as crises focais em adultos. Merece destaque também o fato de apresentar grande refratariedade medicamentosa, na literatura os índices de remissão completa de crises em ELTM em tratamento com DAES variam de 5% (15) a 42% (16).

1.2 Conceitos de resposta farmacológica em epilepsias:

O conceito de resposta à terapêutica com DAES é complexo, uma vez que envolve múltiplos fatores tais como aqueles relacionados ao ambiente e ao próprio paciente. Estudos sobre o entendimento de como, quando e onde a resistência a drogas em epilepsia se desenvolve são limitados. Evidências sugerem, no entanto, que a resistência a drogas deva estar presente desde estágios precoces de doença, um conceito que é potencialmente benéfico aos pacientes. Um primeiro indício clínico de tal afirmação reside no fato de que apenas cerca de 10% dos pacientes que não apresentam boa resposta ao uso de uma primeira DAE podem alcançar controle de crises com a troca por uma segunda DAE, sendo este ,inclusive, considerado um forte fator preditivo de epilepsia refratária (17).

Assim como a epilepsia não apresenta uma única definição, variando de acordo com as diferentes síndromes com suas etiologias e prognósticos, também o conceito de farmacoresponsividade em epilepsia depende do tipo de crise, síndrome epiléptica e mesmo do propósito para o qual esta definição é utilizada (18). Tais definições levam em conta o número de DAES utilizadas, em mono e/ou politerapia, as doses e a frequência de crises por um determinado período de tempo. A mais aceita define como epilepsia refratária aquela onde o paciente não apresenta controle de crises, após período de observação de 12

meses com terapia envolvendo várias DAE isoladamente e/ou associadas, em doses máximas toleradas. (19, 20). Baseando-se neste conceito, as epilepsias consideradas refratárias correspondem à cerca de 30% dos casos nos EUA e Europa ocidental (21, 22). Este número pode ser maior levando-se em consideração somente as epilepsias focais onde se pode chegar a uma refratariedade da ordem de 60% (23, 24).

A resposta insatisfatória ao tratamento associa-se a uma série de co-morbidades tais como: perda de memória, baixa escolaridade, depressão, desempenho psicossocial prejudicado e risco aumentado de óbito (incluindo acidentes, suicídio e morte súbita relacionada à epilepsia) (25,26). Os mecanismos envolvidos na resistência à terapia farmacológica em pacientes com epilepsia, no entanto, ainda são pouco compreendidos (20). Ainda assim, a observação clínica permitiu a identificação de vários fatores de prognóstico ruim relacionados com o tipo de crises (23) tais como: presença de múltiplos tipos de crises, alta frequência destas sobretudo ao início (27,28), idade precoce de início (29), epilepsias sintomáticas, transtorno psicótico associado aos eventos e controle pobre em curto prazo (30).

Existem várias hipóteses que procuram explicar a resistência à DAES, no entanto nenhuma delas isoladamente é capaz de contemplar toda a base neurobiológica envolvida neste processo (28). Segundo Löscher (2008) (31), são quatro as principais hipóteses : (1) alterações adquiridas na estrutura e/ou funcionalidade dos canais iônicos alvo e receptores de neurotransmissores (hipótese de alvo); (2) penetração inadequada de DAES pela barreira hemato-encefálica (hipótese do transportador de múltiplas drogas); (3) deficiência inerente governada por variações genéticas de proteínas envolvidas na farmacocinética e

farmacodinâmica da ação das DAES (hipótese do gene variante); (4) alterações estruturais do cérebro e/ou de redes neuronais, por exemplo como ocorre na AH (hipótese de rede).

Todas estas hipóteses foram baseadas quase que exclusivamente em modelos animais e observação de peças cirúrgicas retiradas dos pacientes com epilepsia de lobo temporal farmacorresistente. Abaixo são discutidos os principais pontos de cada uma das hipóteses.

1.2.1 **Hipótese de alvo:**

Após conseguir penetrar no SNC, para exibir suas atividades anti-epilépticas, as drogas devem agir em uma ou mais moléculas alvo. Tais alvos incluem canais iônicos, receptores de neurotransmissores e transportadores ou enzimas envolvidas na liberação, captação e metabolização de neurotransmissores e DAES (18, 32, 33).

Didaticamente podemos dividir o modo de ação das drogas em: 1) modulação de canais iônicos voltagem dependentes (como canais de sódio e potássio); 2) aumento de inibição sináptica (como aumento da inibição mediada por GABA); 3) inibição de excitação sináptica (através do bloqueio de receptores de glutamato, por exemplo). É importante ressaltar que este modelo não contempla todas as diferenças clínicas e farmacológicas entre as DAES, pois se sabe que drogas com mesmo espectro de ação podem apresentar respostas clínicas diversas. O conhecimento destas diferenças tem sido pesquisado de forma crescente nestes últimos anos, no entanto muito ainda resta por ser compreendido.

Em ELTM, foram os estudos em células hipocâmpais, tanto *in vitro* como em modelos animais, que evidenciaram a importância do canal de sódio na resposta anti-

epiléptica de algumas drogas como a carbamazepina, fenitoína e lamotrigina. Sua ação dá-se através do bloqueio uso-dependente destes canais (31).

Os canais de sódio são constituídos por sub-unidade alfa e um número variável de sub-unidades beta (34). Os neurônios expressam várias isoformas de canais de sódio, sendo que sua maior densidade encontra-se ao longo do segmento inicial do axônio, local do início do potencial de ação (35). Possíveis alterações moleculares destes canais em sítios específicos no hipocampo e córtex entorrinal foram relacionadas à farmacoresistência. Vreugdenhil e colaboradores (1998) demonstraram que a modulação da inativação da corrente de sódio pela carbamazepina em neurônios CA1 hipocámpais de pacientes com ELTM correspondia à metade daquela encontrada em neurônios neocorticais dos mesmos pacientes (36). Já Remy e colaboradores (2003) mostraram que o bloqueio pela carbamazepina de canais de sódio voltagem e uso-dependentes de células granulares denteadas encontrava-se ausente tanto em pacientes não respondedores à terapia com esta droga como em modelos de indução de crise com pilocarpina (37,38). Este grupo também evidenciou que a recuperação da corrente rápida de sódio era lentificada em pacientes farmacoresponsivos, fenômeno que não ocorria com os pacientes refratários (37). Mais recentemente, foi observado também em modelos animais de ELT que os canais de sódio encontravam-se hiperexcitáveis nestes em comparação com os controles sadios na lâmina II do córtex entorrinal, levando ao aumento da condução do potencial excitatório no hipocampo (35).

Em relação a homeostase do cálcio, sabe-se ,através de modelos experimentais, que encontra-se alterada, desta forma sendo relacionada à epileptogênese (39) .

O cálcio é o segundo mensageiro mais importante no SNC e o mais implicado em modelos fisiológicos e patológicos de plasticidade neuronal. Vários estudos mostraram aumento do cálcio iônico intracitoplasmático após indução de estado de mal epilético em modelos animais, sendo que em muitos destes o aumento foi perene. Em pacientes com ELTM também foi observado expressão maior de receptores NMDA com destaque para a subunidade NR1 na amígdala, indicando que esta última pode estar envolvida em mecanismo de hiperexcitabilidade e com isso na epileptogênese. (18,40).

Além da sua ação nos canais iônicos, as DAES podem agir estimulando a captação de neurotransmissores inibitórios como no caso dos benzodiazepínicos, por exemplo, cuja ação também envolve a modulação alostérica do receptor GABA-A (41,42). Existem 7 famílias de subunidades de receptor GABA, incluindo mais de 20 genes. É interessante notar que os benzodiazepínicos dependem da presença da subunidade delta 2 e mutações de ponto neste gene mostraram alteração significativa na modulação mediada por benzodiazepínicos dos receptores GABA (43).

O receptor GABA-A apresenta diferenças tanto na sua expressão quanto na formação de suas subunidades em indivíduos farmacorresistentes. Estudos em ratos evidenciaram que os indivíduos não responsivos à DAE (fenobarbital) apresentavam expressão maior de subunidades $\alpha 4$ e δ , em detrimento às subunidades $\alpha 1$, $\beta 2/3$ e $\delta 2$ nas áreas CA1, CA2, CA3 hipocâmpais com isso reduzindo o efeito da droga no receptor (44). No giro denteado, esta expressão aumentada das subunidades $\alpha 4$ e δ levam ao aumento da mediação da inibição tônica deste giro. Como esta porção apresenta uma função de “guardião de portões”, e encontra-se tonicamente inibida, predispõe o circuito hipocámpal a crises (45).

Além do receptor GABA-A existe o GABA-B, formado de 2 subunidades chamados receptores 1 e 2 e codificado pelo gene GABBR1. Alterações neste último estão associadas a recorrência de crises em ratos, no entanto, em humanos, não foi confirmada associação entre mutações como SNP e refratariedade medicamentosa em epilepsia focal (46).

1.2.2 Hipótese do transportador de múltiplas drogas:

A hipótese de transportador de múltiplas drogas surgiu primeiramente a partir da observação que, geralmente, os pacientes são resistentes ao tratamento não só com uma, mas de uma vasta gama de DAES (25).

Apesar da descrição de ações antiepilépticas diversas, as DAES tendem a ter algumas características clínicas semelhantes como, por exemplo, o fato de que grande parte destas serem lipofílicas (47). Tal observação levou à hipótese de que devesse existir algum mecanismo comum de resistência.

A primeira identificação de mecanismos de farmacoresistência ocorreu em células cancerosas (48), com a descrição da P-glicoproteína (Pgp), uma proteína de membrana plasmática da família dos transportadores ABC (ATP Binding Cassette) codificada pelo gene MDR1 no cromossomo 7 em humanos que funciona como uma bomba de efluxo de drogas que depende de hidrólise de ATP, também conhecida como ABCB-1, seguida pela proteína associada a resistência de múltiplas drogas (MRP-1), outro membro desta família.

A superexpressão destas proteínas nestas células reduz o acúmulo de droga intracitoplasmática e, portanto, relaciona-se com pior prognóstico (49). No caso das

epilepsias, existem evidências também que outro membro desta família a MRP2 (ABCC2) esteja superexpressa em pacientes farmacorresistentes (50).

Tais proteínas também são expressas nas células endoteliais capilares cerebrais, sendo parte integrante da barreira hemato-encefálica, funcionando, conforme descrito anteriormente, como uma bomba de efluxo ATP-dependente de substâncias lipofílicas, e, em condições normais, retirando o “excesso” de DAES do SNC (52) . Acredita-se que, em pacientes farmacorresistentes, estas proteínas, da mesma forma que ocorre em células cancerosas, estão superexpressas tanto no endotélio quanto em astrócitos, e, em MDC, até em neurônios displásicos (25,52,53).

Aparentemente esta superexpressão ocorre transitoriamente após crises em modelos experimentais, e em peças cirúrgicas de tecido cerebral epileptogênico (54,55). Os substratos para a glicoproteína P e as MRPs, segundo estudo em ratos, incluem várias DAES entre elas: fenitoína, carbamazepina e lamotrigina (56-60).

1.2.3 Hipótese do gene variante:

Esta hipótese baseia-se no fato de que tanto a resposta quanto eventos adversos e dose alvo apresentam grandes variações individuais que, em parte, podem ser explicadas por variações genéticas por vezes de um único nucleotídeo, denominadas polimorfismos de único nucleotídeo ou SNP. Cada vez mais se atribui a estes polimorfismos papel importante na variabilidade da farmacocinética e farmacodinâmica das DAES (61).

Em termos de farmacorresistência, tanto o alvo das DAES como seu transporte e sua metabolização podem estar afetados por estas pequenas variações genéticas.

Mutações nos canais iônicos, principalmente nos canais de sódio, têm sido relacionadas a uma série de síndromes epiléticas generalizadas, com diferentes espectros de gravidade. Tais síndromes, conhecidas em conjunto como canalopatias, englobam desde as epilepsias generalizadas com crises febris *plus* (GEFS +) até a epilepsia mioclônica severa da infância, descrita por Dravet (1978) (62). É interessante ressaltar que, apesar do mesmo gene estar envolvido em ambas, o tipo de mutação é diverso, sendo que no primeiro caso as mutações são exclusivamente *missense* e no segundo são do tipo truncado, envolvendo “*nonsense*” e “*frameshift*” (63). Da mesma forma, aventou-se a possibilidade de polimorfismos no SCN-1A e 2A possam estar envolvidos nos mecanismos de refratariedade medicamentosa.

Os canais de cálcio voltagem- dependentes começam a ser estudados ($\alpha 1$ g , $\alpha 1$ H, $\alpha 1$ I, $\alpha 2$, beta, gama) pois podem estar envolvidos nos mecanismos de epileptogênese e refratariedade medicamentosa através dos polimorfismos de único nucleotídeo (SNP) dos genes que o codificam, principalmente os genes CACNA e CACNB (42,64). Até o momento, no entanto, não está claro a correlação entre estes canais e refratariedade medicamentosa.

Em relação ao transporte de DAES, a simples troca (por exemplo, C por T) de base na posição 3435 do gene constitui uma mutação inócu, ou seja, não acarreta em mudança do aminoácido, porém pode acarretar em alteração funcional importante, sugerindo que este SNP exista em desequilíbrio de *linkage* com alguma causa variante ainda não identificada. Siddiqui e colaboradores (2003) (65) e Dombrowski e colaboradores (2001) (66) sugeriram que haveria uma associação entre farmacoresistência e o polimorfismo C3435T no ABCB-1 com predominância dos genótipos CC e TT em uma população predominantemente

caucasiana, ao passo que Tan e colaboradores (2004) não conseguiram reproduzir tal achado, considerando os achados do primeiro estudo simples coincidência (67) ; conclusão esta corroborada por outros autores (68, 69). Poliformismos no gene ABCC2 foram recentemente reportados e associados a superexpressão de P-glicoproteínas em pacientes refratários às DAES quando comparados a população caucasiana saudável (70,71). No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos na expressão de todos os transportadores de drogas ainda não são suficientemente conhecidos, tampouco seu papel é suficientemente claro na epilepsia refratária.

Por último, em relação à metabolização da DAES, os polimorfismos em genes codificadores das enzimas do sistema mono-oxigenase do citocromo P450 têm sido reconhecidos como fatores importantes (72).

O citocromo P450 merece destaque pois é um dos principais mecanismos enzimáticos responsável pela biotransformação de drogas, tendo já sido identificadas cerca de 12 famílias do gene responsável por sua codificação. Dentro destas destacam-se CYP1, CYP2 e CYP3. Estes genes também possuem uma série de polimorfismos que podem estar associados a alterações individuais em relação à resposta de drogas (73).

Assim como em relação a outros polimorfismos aqui também nenhum estudo conclusivo sobre sua relação com a resistência ao tratamento medicamentoso foi realizado até o momento.

1.2.4 Hipótese de rede:

A esclerose hipocampal é frequente em pacientes com ELTM refratária e sua presença é muitas vezes relacionada com mecanismo de refratariedade medicamentosa

(50). Mesmo em outros tipos de epilepsia focal, alterações de sinal ponderado T2 em RM foram observadas nesta localização (74).

Na formação hipocampal, o giro denteado exerce função de filtro de alta resistência prevenindo a propagação da atividade sincronizada do córtex entorrinal para o hipocampo (75). Nos pacientes com ELTM este filtro é comprometido uma vez que ocorre o crescimento axonal de células granulares denteadas, normalmente pouco frequentes no giro denteado, formando uma extensa rede sináptica interconectada associada com a perda de interneurônios hilares GABAérgicos.

De fato, a perda dos neurônios no hilo do giro denteado associada com a desinibição secundária ao crescimento axonal das células granulares denteadas e consequente hiperexcitação foi proposta como mecanismo patológico comum e defeito de rede primário responsável pela geração do foco de crises hipocâmpais (75). Este tipo de alteração excitatória pode estar presente não somente nesta localização, mas também espalhada por áreas do neocórtex (76).

Estudos em modelos animais comparando ratos com e sem resposta à terapêutica com fenobarbital, demonstraram que em farmacorresistentes existia perda neuronal de cerca de 90% nas áreas CA1/ CA3c/ CA4 e no hilo denteado, ao passo que em 90% dos respondedores estas alterações não foram evidenciadas, comparando-se ao tecido dos controles saudáveis (45).

1.3 Epilepsia de lobo temporal:

As epilepsias de lobo temporal compreendem um grupo heterogêneo de transtornos com diferentes etiologias, idade de início das crises, prognósticos, respostas

medicamentosas e tratamentos cirúrgicos, cuja característica comum é a localização inicial de suas crises focais em lobo temporal. Esta localização é responsável pela origem de metade de todas as crises focais (77). Didaticamente, podemos dividi-las entre aquelas que se originam de sua porção lateral e as de origem no lobo temporal mesial, sendo estas últimas as mais frequentes.

1.3.1 Epilepsia de lobo temporal mesial:

Dentro deste grupo de epilepsias de lobo temporal, a ELTM é a mais comum e corresponde a 2/3 de todos os casos com destaque para a epilepsia hipocampal cuja principal causa, a esclerose hipocampal, representa cerca de 65% dos substratos patológicos relacionadas à ELTM. Dentre as demais causas relacionadas destacam-se: tumores (astrocitomas, tumor neuroepitelial desembrioplástico, gangliogliomas), malformações do desenvolvimento cortical e lesões vasculares como angioma cavernoso e malformações artério-venosas. O quadro clínico e eletroencefalográfico destas outras causas muitas vezes é indistinto do observado em casos secundários a esclerose hipocampal (78).

1.3.1a Apresentação clínica

A epilepsia relacionada a AH apresenta perfil clínico bem definido. A primeira crise ocorre ao final da infância ou início da adolescência, sendo que na maior parte trata-se de crise tônico-clônica generalizada. Após este evento inicial percebem-se as crises focais com e sem prejuízo de consciência. Este período latente referido por Penfield e Jasper como período de “amadurecimento da cicatriz” (79) é bem caracterizado tanto em estudos

clínicos como em modelos animais e por si só este evento agudo não é suficiente para causar crises cronicamente (80).

As crises focais sem prejuízo de consciência são descritas como sensação de mal-estar epigástrico e ascendente, por vezes associadas a sintomas autonômicos e/ou psíquicos como palidez, sudorese, medo e piloereção. Sensação de familiaridade com o meio (“déjà vu”) ou estranheza (“jamais vu”) ocorrem de forma frequente, assim como situações onde o paciente vivencia um “flash back” geralmente de forma estereotipada de situações previamente vividas, Estima-se que as crises focais sem prejuízo de consciência ocorram como parte de semiologia dos eventos de 20% a 90 % dos pacientes (81, 82, 83).

As crises focais com prejuízo da consciência iniciam-se com olhar fixo e parada de atividade, perda de contato com o meio e automatismos oromastigatórios e manuais com duração média em torno de 1 a 2 minutos (84,85). Em alguns pacientes é possível observar movimento distônico em um dos membros, o que auxilia na lateralização do evento ictal. Este movimento corresponde a um aumento de perfusão sanguínea no gânglios da base contralateralmente à distonia observada (86). A preservação da linguagem durante e após a crise sugerem envolvimento de hemisfério não dominante.

Após a instituição do tratamento medicamentoso, as crises tônico-clônicas tornam-se raras e alguns pacientes podem nunca apresentar tal evento (87).

As queixas de piora da memória são frequentes e, de fato, os pacientes apresentam piora progressiva deste parâmetro evidenciada através das avaliações neuropsicológicas. Tal progressão pode ser interrompida e mesmo apresentar recuperação parcial com o controle das crises (88, 89).

1.3.1b Achados de EEG e RM.

A investigação diagnóstica inclui, além da anamnese e exame físico, exames complementares para a confirmação diagnóstica. O EEG ainda hoje é fundamental neste processo. Cabe ressaltar que, como se trata de propedêutica dependente de interpretação, recomenda-se que esta seja realizada por especialista. Diagnósticos errôneos são comuns quando a leitura do exame é realizado por profissional não familiarizado (90).

As alterações interictais mais características observadas nos EEGs de rotina são atividades epileptiformes uni ou bilaterais em regiões temporais anteriores médio-basais, mais facilmente observadas em eletrodos zigomáticos e esfenoidais (91). A presença de bilateralidade destes achados ocorre em frequências que variam de 20% até 50%. (92).

Os registros ictais revelam início como atividade rítmica de 5 a 7 Hz máximas em eletrodos zigomáticos ou esfenoidais, sendo que pode ocorrer imediatamente após o icto ou até 30 segundos após as primeiras manifestações clínicas. Outros padrões ictais podem ser observados (78).

Em relação aos achados de RM indicativos de ELTM, estes são melhor visualizáveis através da aquisição de imagens coronais oblíquas obtidas em plano perpendicular ao longo eixo do hipocampo. Tais sinais incluem: diminuição do volume hipocampal sobretudo em sua porção anterior, alteração no formato e estrutura interna e hipersinal em T2. Estas condições podem estar presentes uni ou bilateralmente, e pode ocorrer também atrofia de todo o lobo temporal e da amígdala (93).

Em alguns casos duvidosos é possível associar outras técnicas de neuroimagem como a volumetria manual conforme protocolos especificados, aumentando assim a

sensibilidade da análise qualitativa. Várias outras técnicas também podem ser empregadas conforme descrito no item 1.4 (neuroimagem).

1.3.1c Etiologia / teoria inflamatória da AH.

A ELTM é caracterizada pela AH secundária a esclerose desta região associada a um grau variável de gliose e perda neuronal na amígdala, uncus e giro parahipocampal. À microscopia, o padrão mais frequentemente observado é a redução da densidade neuronal predominantemente envolvendo as regiões CA4, CA1, CA3 e giro denteado, com relativa preservação do setor CA2. Existem também casos onde existe redução das áreas CA1 a CA4 e perdas restritas à região CA4, estas duas últimas mais raras (94).

A lesão mais frequente observada em hipocampos retirados de pacientes com ELTM evidencia esclerose secundária a possível processo inflamatório crônico nas regiões previamente citadas. Algumas evidências indiretas provenientes de estudos anátomo-patológicos de processos infecciosos que levam a crises de origem em região temporal mesial, como infecção pelo vírus herpes simplex, demonstram alterações semelhantes às observadas em ELTM e com isso corroboram para a existência de mecanismo inflamatório facilitado nesta localização. O motivo que leva a isto, no entanto, é pouco conhecido (95).

A associação elevada entre neurocisticercose e ELTM, com relatos de até 37% em estudo de coorte transversal proveniente de população de área endêmica (96) suscita entre as possíveis hipóteses, um processo inflamatório iniciado pelo cisticerco e que se perpetua mesmo após sua calcificação. Esta hipótese é apoiada por alguns indícios clínicos como a maior frequência em mulheres, maior bilateralidade de atividade epileptiforme temporal e, em pacientes com AH unilateral esta ser concordante com a lateralização do cisticerco.

Outras hipóteses aventadas incluem: crises repetidas levando a alterações na rede neuronal, status epilepticus secundário à neurocisticercose, fatores relacionados ao gênero e outros fatores moleculares. Acredita-se que todas estas possibilidades possam agir de forma independente ou combinadas levando a AH (97). Outros estudos já haviam atentado para esta associação, no entanto baseados em relatos de caso ou de poucos pacientes. (98, 99).

Embora ainda controverso, evidências surgem de estudos com pacientes que evoluem com ELTM após crises febris que demonstram relação entre polimorfismos de gene de interleucina (IL) -1 beta e o risco de desenvolvimento de AH, outros estudos demonstram haver produção aumentada de mediadores inflamatórios em cérebros de pacientes na presença de crises febris, além de quebra de barreira hemato-encefálica (100).

Ravizza e colaboradores (2008) demonstraram em ratos que ocorre expressão de IL -1 beta 4 horas após a indução de status epilepticus tanto em astrócitos como em micróglia, porém é em astrócitos que esta expressão está associada a mecanismos de neurodegeneração e quebra de barreira hemato-encefálica. Demonstraram também que tanto em modelos animais como em humanos, ocorre expressão aumentada não somente de IL-1 beta como de receptor de IL tipo 1 em astrócitos, micróglia e neurônios além da presença de monócitos e macrófagos em modelos de epilepsia crônica e em hipocampus de pacientes com ELTM. Isto evidencia que vias inflamatórias estão cronicamente ativadas, contribuindo para a epileptogênese (101).

1.3.1d Prognóstico e tratamento:

O prognóstico de controle medicamentoso da ELTM varia conforme o conceito de controle de crises utilizada, entre número tão díspares quanto 11% a 42% (23,102). Mesmo

assim, é notório que boa parte dos paciente não vai alcançar controle satisfatório de suas crises. O próprio fato de se tratar de um exemplo de epilepsia sintomática constitui fator de piora no prognóstico como já observado por vários autores (27,30).

Outros fatores de pior prognóstico em ELTM já observados na literatura incluem: presença de crises febris, fatores precipitantes iniciais, frequência de crises iniciais e idade de início de crises (27,103).

A introdução das chamadas DAES de segunda geração nos últimos 15 anos, apesar de ter apresentado vantagens em relação à farmacocinética, tolerabilidade e interações medicamentosas, pouco impacto causou em termos de controle medicamentoso uma vez que apenas cerca de 15% a 20% dos pacientes não respondedores à terapêutica com as antigas DAES alcançaram controle completo de suas crises (104). Novas drogas estão em teste neste momento, a expectativa de incremento no controle das crises, no entanto, ainda é modesta.

O tratamento cirúrgico para epilepsia tem registros desde a antiguidade embora nem sempre restrito ao crânio ou ao cérebro. A trepanação com o objetivo de alívio das crises apresenta registros desde a antiguidade e na América, desde período pré-Colombiano (105). Após o século 18, as crises epiléticas passaram a ser associadas a orgasmos ou irritações genitais e propostas cirurgias de castração em homens e mulheres como método extremo de controle de crises (106). Somente no quarto final do século 19 as primeiras cirurgias intracranianas visando a retirada do foco epileptogênico começaram a ser realizadas, baseadas ainda somente no sintomas clínicos dos pacientes (107). Já no século 20, Penfield foi o primeiro neurocirurgião a realizar cirurgias para controle de epilepsia com

investigação prévia, baseada não somente na clínica dos pacientes mas também em registros eletrencefalográficos, graças à preciosa colaboração de Jasper (108).

O substrato patológico associado à ELTM denominado esclerose mesial temporal é conhecido desde o século 19, baseados em estudos pós *mortem*. No entanto o reconhecimento da atrofia hipocampal como alteração associada à refratariedade medicamentosa e com isso a proposição de cirurgias que visassem a retirada da porção mesial do lobo temporal ocorreu somente apartir do período interguerras no século 20

Atribui-se a Bailey e Gibbs a publicação da primeira série significativa de ressecções temporais para o tratamento de epilepsia refratária, guiadas no pré e intraoperatório por EEG (109). Rapidamente centros por todo o mundo iniciaram seus programas de cirurgia de epilepsia. Hoje a cirurgia para controle da ELTM refratária é consagrada como escolha terapêutica em pacientes refratários à terapia medicamentosa (110).

Apesar do sucesso cirúrgico no controle de crises ser elevado para pacientes selecionados, com porcentagens em torno de 60% a 80% (111, 112) , nem todos os pacientes são elegíveis.

1.4 Neuroimagem:

O avanço no surgimento de novas técnicas de neuroimagem revolucionou o conhecimento em epilepsias focais na medida em que identificou vários processos estruturais a elas relacionados (113,114). Cerca de 74% dos portadores destas epilepsias acompanhados em centros terciários apresentam alterações na RM (115). Devido à frequência elevada de achados na RM , a comissão de neuroimagem da International

League Against Epilepsy (ILAE) recomenda a realização deste exame em quase todos os pacientes com epilepsia, à exceção daqueles com diagnóstico eletroclínico definido de epilepsia generalizada idiopática ou epilepsia benigna da infância com espículas centro-temporais (116, 117). As anormalidades mais comuns são: AH associada a esclerose mesial temporal (EMT), malformações do desenvolvimento cortical (MDC), gliose cortical, atrofia e infarto, neoplasias primárias e malformações artério-venosas (MAV) (118).

Conforme já descrito previamente, a ELTM ocupa um lugar de destaque uma vez que é muito freqüente, observada em cerca de 32% das epilepsias. Estudos anátomo-patológicos demonstraram que a EMT está presente em 50% a 70% dos pacientes com ELT (94), sendo que as técnicas usuais de RM conseguem demonstrar à análise visual e de forma não invasiva os achados característicos desta patologia (a AH associada a hipersinal em T2) na maioria destes casos (119).

As MDC, grande grupo de alterações associadas com epilepsia, também se destacam em relação ao seu perfil de resistência à terapia medicamentosa, apresentando controle em torno de 25%, sendo a segunda causa mais freqüente de epilepsia refratária em adultos (23, 115). É importante ressaltar que nesta última, a RM não consegue identificar todas as formas e, em muitos casos detectados, não evidencia toda a sua extensão (53).

Cerca de 20% a 30% dos pacientes com epilepsias focais têm RM normais às técnicas habituais, sendo no grupo das MDC o maior índice de negatividade neste exame (102). A integração de várias modalidades de neuroimagem, incluindo melhora da análise qualitativa com a RM de 3T(120), FDG – PET, SPECT e as várias formas de análise quantitativa como a morfometria baseada em voxel (VBM – MRI) (121,122,123), volumetria, relaxometria T2 (74, 124) e técnicas mais recentes como a relaxometria

baseada em voxel (VBR – MRI) (125), RM funcional (fMRI), EEG- fMRI, tractografia, DTI (“Diffusion Tension Imaging”) permitem uma melhor avaliação não invasiva deste grupo. Com a utilização de técnicas conhecidas, o incremento diagnóstico é variado (10% a 65%) (115,120,123).

1.4.1 Volumetria manual:

A volumetria manual, através da medida objetiva das estruturas mesiais temporais, permite a detecção da redução volumétrica com sensibilidade muito superior do que a simples análise visual das RM, além de demonstrar grande acurácia (126,127). Estudos demonstraram também existir boa correlação entre esta medida e a presença de EMT na histopatologia dos hipocampus ressecados cirurgicamente (128,129).

A maior dificuldade da técnica encontra-se nos limites anatômicos imprecisos das estruturas temporais a serem segmentadas. Tal problema pode ser superado através da realização de RM de alta resolução combinada ao pós-processamento das imagens de forma a permitir a visualização simultânea e multiplanar dos cortes (130).

Dentre os programas disponíveis, o DISPLAY® desenvolvido por David McDonald no Brain Imaging Centre do Montreal Neurological Institute é bastante utilizado dado o fato de ser disponibilizado gratuitamente e permitir a visualização dos cortes finos de RM em três incidências simultaneamente (coronal, sagital e axial), facilitando assim a segmentação das estruturas. Além disso, este programa também calcula automaticamente o volume das estruturas segmentadas (131,132).

Vale ressaltar que a volumetria manual permite a mensuração de quaisquer áreas de interesse (130,133). No caso das estruturas mesiais temporais, a análise individual destas

estruturas, aliadas aos demais componentes da investigação pré- operatória tais como avaliação clínica e eletroencefalográfica, aumenta a precisão diagnóstica dos pacientes com ELTM (126).

1.4.2 Morfometria baseada em Voxel:

A técnica também conhecida como VBM (do inglês Voxel-Based Morphometry) foi originalmente desenvolvido por Friston e Ashburner (2000) (121) para detectar diferenças na morfologia cerebral entre 2 ou mais grupos. É um método de análise de imagens de RM totalmente automatizado, desta forma diminuindo muito a interferência do operador. Além disso, esta técnica permite também a análise de várias regiões cerebrais ao mesmo tempo, sem a necessidade de escolher uma região de interesse. Assim, é possível analisar grupos maiores, com resultados mais robustos (134). Devido a estes fatores, vários estudos neuropatológicos utilizando VBM surgiram na literatura, objetivando estudar alterações cerebrais relacionadas às mais diversas condições neurológicas tais como Doença de Alzheimer e Esquizofrenia. Em epilepsia esta técnica também foi empregada, destaque para a ELT. (74, 133, 134, 135).

A técnica de VBM permite identificar diferenças sutis na composição local de volume de tecido cerebral em imagens, baseada em comparações realizadas voxel a voxel.

Previamente a realização destas comparações, cada imagem deve ser espacialmente preparada de forma a permitir que estas sejam realizadas, uma vez que cada indivíduo apresenta diferenças em seus volumes cerebrais não relacionadas com processos patológicos. Sem a correção destas alterações individuais se tornaria impossível uma análise fidedigna intergrupos (124, 136).

Ela apresenta duas etapas essenciais: inicialmente as imagens passam por uma série de transformações espaciais, em que são realizados processos de normalização espacial, segmentação, modulação e suavização, e após todo o processamento é possível realizar comparações entre grupos através de modelos estatísticos.

JUSTIFICATIVA

A Epilepsia de Lobo Temporal Mesial (ELTM) ocupa lugar de destaque por ser a mais prevalente das epilepsias focais e também resistente à terapêutica medicamentosa, além de estar associada a uma série de comorbidades. A própria classificação destes pacientes em relação à resposta farmacológica ainda é motivo de intenso debate, uma vez que existem aqueles que não se enquadram como completamente responsivos ou refratários à terapia com drogas anti-epilépticas (DAES).

Individualmente vários estudos relacionam a resposta farmacológica incompleta a uma série de fatores que incluem alterações estruturais, variantes clínicas e mesmo genéticas. Estudos no entanto, que integrem estas variantes são escassos e, mesmo os existentes contemplam poucas variáveis. Desta forma, um estudo mais amplo faz-se necessário uma vez que é consenso na literatura a resposta farmacológica ser multifatorial.

A análise destas variáveis também torna-se importante no estudo e melhor caracterização não somente de pacientes considerados farmacoresponsivos ou refratários mas também do grupo de resposta intermediária ainda muito pouco explorado, aqui denominado remitante-recorrente.

OBJETIVOS

O presente estudo tem por objetivos principais caracterizar três diferentes tipos de resposta farmacológica observadas clinicamente: farmacorresponsivos, refratários e remitentes-recorrentes e realizar uma análise multifatorial dos aspectos relacionados às diferentes respostas ao tratamento clínico em pacientes com ELTM.

Objetivos específicos:

- (1) Características clínicas e eletrofisiológicas: avaliar características clínicas destas três populações por meio de questionário estruturado e eletrofisiológicas por meio de eletroencefalografia.
- (2) Neuroimagem: identificar a presença de AH no três grupos de pacientes (farmacorresponsivo, refratário e remitente-recorrente) em RM primeiramente através de análise visual e, em um segundo momento por análise quantitativa da imagem através da volumetria manual dos hipocampus e pelo VBM .
- (3) Após avaliar estas variáveis separadamente, interrelacioná-las de forma a melhor caracterizar os três grupos e os fatores relacionados à resposta a terapia com DAES destes.
- (4) Foi realizada paralelamente, análise farmacogenômica dos grupos refratário e responsivo em âmbito de projeto de pesquisa específico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionados pacientes com ELTM em acompanhamento no ambulatório de epilepsia do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas e provenientes de ambulatório de especialidade (Policlínica III) da prefeitura do município de Campinas durante o período entre 2006 e 2008. Todos os pacientes selecionados foram clinicamente avaliados através de formulário estruturado (apêndice 3) e seguidos até dezembro de 2009.

4.1 Identificação dos grupos de estudo:

4.1.1 Critérios de inclusão:

- Pacientes adultos (idade maior ou igual a 18 anos);
- Capacidade de compreender e assinar TCLE;
- Diagnóstico clínico e eletroencefalográfico de ELTM;
- Realização de RM neste serviço;
- Exame neurológico normal.

4.1.2 Critérios de exclusão:

- Doença neurológica progressiva;
- Gravidez;
- Não adesão ao tratamento;
- Evidência de patologia dupla, lesões expansivas ou presença de outras lesões que não AH na RM;
- Pacientes que não tiveram terapia com DAES por pelo menos 12 meses e acompanhamento clínico por pelo menos 24 meses.

4.1.3 Características clínicas e eletrofisiológicas:

Conforme previamente descrito, todos os pacientes foram entrevistados utilizando formulário estruturado em anexo (apêndice 3). As variáveis analisadas foram:

- Idade de início das crises recorrentes;
- Presença de crises febris;
- Insulto precipitante inicial;
- Tempo total de evolução das crises até a entrevista;
- Frequência inicial das crises;
- DAES em uso e dose diária;
- Eventos adversos;
- Padrão evolutivo das crises (farmacorresponsivo, farmacorresistente, remitente-recorrente);
- Antecedentes familiares.

A estimativa da frequência de crises atuais foi baseada em diário de crises preenchido pelo próprio paciente e/ou acompanhante. Foram realizadas, no mínimo 3 visitas de acompanhamento destes pacientes com intervalo médio de 2 meses entre estas.

Os dados eletrofisiológicos foram obtidos através da realização de EEGS intercríticos em aparelho digital de 32 canais (Nihon Kodan, Japan) no sistema internacional 10-20.

4.2 **Formação dos grupos de estudo:**

Após estas etapas, os pacientes foram divididos em três grupos de acordo com seu padrão evolutivo de crises:

- Farmacorresponsivos (“benignos”): Controle total de crises por período maior que um ano sem recaídas.
- Farmacorresistentes (“refratários”): manutenção das crises apesar de terapêutica adequada por um ano. (18,19).
- Remitentes – Recorrentes: dois períodos de um ano livre de crises com DAES , intercalados com igual período de recorrência (152,153). O período latente característico que ocorre quando os pacientes com ELTM apresentam remissão espontânea de suas crises após os primeiros eventos na infância ou mesmo na fase adulta jovem não foram considerados como período livre de crises.

4.3 **Controles:**

O grupo controle foi constituído por voluntários sadios não relacionados aos pacientes que previamente assinaram TCLE. Todas as imagens foram adquiridas entre 2003 e 2008. Todas as imagens foram analisadas e excluídas todas aquelas que apresentaram algum tipo de artefato ou achado incidental.

4.4 **Aspectos Éticos:**

Todos os participantes desta pesquisa assinaram TCLE aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (Apêndices 1 e 2).

4.5 **Ressonância Magnética:**

As imagens de RM foram adquiridas utilizando-se o mesmo protocolo 3D para pacientes e controle em aparelho de 2 Tesla (Elscent Prestige, Haifa, Israel) de acordo com os seguintes parâmetros:

(1) *sagital* T1 spin echo; 6 mm espessura; flip angle, 180°; Tempo de repetição (TR), 400; tempo de eco (TE), 12; matriz, 320X320; e “field of view” (FOV), 25X25cm;

(2) *imagens coronais*, perpendicular ao eixo longo do hipocampo, definido a partir da imagem sagital : (a) imagem ponderada em T2 e densidade de prótons “fast spin echo”; 3mm de espessura; “flip angle”, 160°; TR, 4600; TE, 108/18; matrix, 256X256; FOV, 22X22 cm; (b) Imagem do tipo “inversion recovery” ponderadas em T: 3mm de espessura; “flip angle”, 180°; TR 2700; TE, 14; tempo de inversão, 860; matriz, 155X256; e FOV 18X18 cm;

(3) *imagens axiais* paralelas ao eixo longo do hipocampo: (a) imagem ponderada em T1 e gradiente eco; 3mm de espessura; “flip angle”, 70°; TR, 200; TE, 5.27; matriz, 230X230; e FOV, 22X22 cm; (b) FLAIR (fluid 45 attenuation inversion recovery); 5 mm de espessura; “flip angle”, 110°; TR, 10099; TE, 90; matriz, 250x250; e FOV, 24X24 cm;

(4) *Imagem volumétrica ponderadas em T1*: imagem ponderada em T1 e gradiente eco com voxels isotrópicos de 1mm, adquiridos no plano sagital (1mm de espessura; flip angle, 35°; TR, 22; TE, 9; matriz, 256x220; e FOV, 25x22cm).

4.5.1 Segmentação Manual do Hipocampus:

A segmentação manual das imagens de RM foi realizada com o software interativo DISPLAY® (Montreal Neurological Institute, Montreal, Canadá). Este programa permite a visualização simultânea das imagens de RM nos planos coronal, sagital e axial (11,12). A delimitação dos limites anatômicos das estruturas é facilitada pelo ajuste de contraste entre a substância cinzenta e a branca, assim como é possível navegar por voxels isotrópicos de 1mm em diferentes orientações com a mesma resolução. O volume resultante das estruturas delimitadas é calculado automaticamente pelo software. O mesmo protocolo foi utilizado para pacientes e controles. Foram segmentados os hipocampus de pacientes e controles de acordo com protocolo proposto por Bonilha e colaboradores (2004) (131).

Etapas da segmentação:

- Conversão para o formato eletrônico MINC, com o programa DICOM to MINC (<http://www.bic.mni.mcgill.ca/software/minc/minc.html>);
- Registro das imagens para o espaço estereotático de TALAIRACH através de uma transformação linear automática a fim minimizar a interferência de diferenças de volume cerebral entre os diferentes indivíduos e permitir comparações entre eles. Além disso, este procedimento minimiza também a variabilidade na orientação das imagens (13).
- Correção da falta de homogeneidade de campo com o software N3: “Nonparametric Non-uniform intensity Normalization” (14).

Após a etapa das segmentações manuais, foram obtidos dados volumétricos dos hipocampus à direita e esquerda e calculado o índice de assimetria (IA) destes. O IA é resultado da divisão entre o menor (numerador) e o maior (denominador) hipocampo.

4.5.2 VBM:

4.5.2 a. Pré processamento dos dados:

Para a realização da análise estatística pelo VBM, há a necessidade de pré-processamento das imagens conforme se segue abaixo:

As imagens de RM são adquiridas em formato DICOM. Para ser possível a análise de VBM todas as imagens devem ser transformadas para formato ANALYZE e a comissura anterior encontrada e marcada. As imagens que apresentam atrofia hipocampal à direita são invertidas (“flipadas”) de modo a evitar que ocorram cancelamentos pela comparação direita –esquerda durante a análise estatística. Todas estas etapas são realizadas através do software MRICro (www.mricro.com) , isto permite o realinhamento espacial para processamento posterior (19).

As etapas finais de pré-processamento e análise estatística das imagens são realizadas através do software SPM 5 (Wellcome Trust Centre for Neuroimaging, London, UK; www.fil.ion.ucl.ac.uk) na plataforma MATLAB 7.7.0 (MathWorks, Natick, MA). O pré-processamento é composto pelas seguintes etapas:

- (1) Segmentação utilizando os padrões para a opção de espaço nativo assim criando mapas de probabilidade de tecido (SB, SC, LCR) através da teoria do campo aleatório de Markov. Esta teoria incorpora a dependência espacial dos voxels de uma imagem, representando no modelo da imagem as características contidas nos elementos vizinhos. Para a sua utilização, é preciso que se tenha uma classificação preliminar para iniciar a avaliação, isso se dá a partir de imagens de sujeitos

normais e de um modelo de análise que identifica a distribuição da intensidade dos voxels dos tipos de tecidos de uma imagem em particular.

(2) Normalização espacial dos segmentos de SC de cada imagem. Esta etapa tem por objetivo aproximar as imagens dos sujeitos de estudo a um *template* (plataforma) que neste caso é formado pela média de um conjunto de cérebros de indivíduos sem patologias, previamente alinhado. O *template* utilizado é o do “International Consortium for Brain Mapping” (Instituto de Neurologia de Montreal) composto por 152 indivíduos. São estimados parâmetros de transformação lineares tais como rotação, translação, *zooms* e *shears* além de não-lineares (transformada de cossenos discreta), baseada no quadrado da diferença de intensidade de voxels entre as imagens processadas e o *template*. Com isso é realizada uma transformação afim de 12 parâmetros para as correções globais de forma (21).

(3) Modulação, que representa as correções das mudanças de volume induzidas pela normalização espacial. Os voxels são multiplicados pelo valor de deformidade de campo obtidos durante o processo de normalização tanto do volume intracraniano total como do volume de SC, a fim de se compensar as deformidades decorrentes durante a transformação não-linear e preservar o volume de SC. Isto permite a análise não somente de concentrações como também de volume de SC.

Após as etapas acima descritas, é gerado um gráfico contendo informações sobre as médias de homogeneidade para cada imagem. Assim é possível reanalisar as imagens que se encontram fora do desvio-padrão e excluí-las, caso o desvio seja atribuído a artefato (figura 1).

4.5.2 b. Análise estatística das imagens:

A análise de voxels do cérebro inteiro foi corrigida para comparações múltiplas através de índice de falsos positivos ou “false discovery rate” (FDR) com limiar estatístico de 5% (74) , com extensão deste limiar para inclusão de ao menos 32 voxels consecutivos. As coordenadas estereotáxicas geradas pelo SPM foram primeiramente confirmadas por análise visual e convertidas aos nomes anatômicos através das coordenadas de Tailarach, contido no próprio SPM (para o algoritmo acesse http://www.ihp.Sbp.ru/~pet_lab/MSU/MSUMain.html) (75), desta forma já se torna possível análise preliminar das áreas afetadas. Para a localização precisa das regiões de interesse gerada pelas comparações, foi utilizado o software MARSBAR (<http://marsbar.sourceforge.net>) também através da plataforma comum MATLAB.

Para a análise voxel a voxel de SC de cérebro inteiro, utilizamos teste –t para comparar cada grupo de pacientes aos controles e em seguida o mesmo teste foi realizado para a comparação dos grupos de pacientes entre si (farmacorresponsivo *versus* farmacorresistentes; farmacorresponsivos *versus* remitentes – recorrentes; farmacorresistentes *versus* remitentes – recorrentes). Todas estas análises foram realizadas através do SPM 5.

Os contrastes nos teste–t foram definidos para evidenciar áreas de aumento/diminuição de SC nas comparações acima descritas. As análises incluíram máscara de limiar proporcional de 0.8 e máscara implícita.

O resultado de cada comparação gerou um mapa paramétrico estatístico (SPM t) que foi transformado em mapa de distribuição normal (SPM z). Todos estes resultados foram representados em um “template” de cérebro inteiro baseado na média de 152 cérebros sadios do Instituto de Neurologia de Montreal (MNI) com suas barras de escore z correspondentes para cada mapa.

4.6 **Análise estatística dos dados clínicos:**

As variáveis clínicas dos pacientes e controles foram analisadas através de software estatístico SYSTAT 9 (San Jose, California, Systat Software Inc. [SSI]). Foram realizados testes $-t$ com correção de Bonferroni para a comparação de dados contínuos. Para as variáveis categóricas foram utilizados teste exato de Fischer e Pearson X^2 . Foram também utilizados ANOVA com teste post hoc de Tukey quando apropriado.

RESULTADOS

Foram incluídos ao todo 165 pacientes divididos de acordo com o padrão de resposta farmacológica às DAES em: 50 farmacoresponsivos (31 mulheres, idade média de $47,03 \pm 10,97$), 87 farmacorresistentes (53 mulheres, idade média $41,68 \pm 9,11$) e 28 remitentes-recorrentes (17 mulheres, idade média $46 \pm 11,50$).

Os resultados das análises de dados clínicos dos pacientes acima referidos no que tange a idade de início das crises, duração da epilepsia, história prévia de crises febris, presença e lateralidade da atrofia hipocampal à análise visual e fatores precipitantes iniciais assim como os resultados oriundos da análise por VBM dos pacientes com AH unilateral estão explicitados através do artigo “Antiepileptic drug response in temporal lobe epilepsy: A clinical and MRI morphometry study” contido no capítulo 1.

Os resultados referentes à análise das DAES utilizadas e quantidades nos 165 pacientes divididos nos três grupos de estudo, bem como das volumetrias manuais de hipocampus provenientes de 99 pacientes estão contidas no capítulo 2.

O artigo anexo 1 versa sobre dados complementares provenientes da análise farmacogenômica de pacientes pertencentes aos grupos farmacoresponsivo e farmacorresistente já incluídos em âmbito de projetos de doutorado da aluna Mariana Saragiotto da Silva. Tal trabalho foi aqui citado e anexado dada a importância deste na complementação da análise dos dados e discussão dos resultados provenientes desta tese específica.

Antiepileptic drug response in temporal lobe epilepsy: A clinical and MRI morphometry study

Title character count (including spaces and punctuation): 91

Abstract word count: 247

Paper word count: 2819

References: 40

Tables: 2

Figures: 2

Authors

E. Bilevicius, MD¹ (beth.bilevicius@gmail.com).

C.L. Yasuda, MD, PhD¹ (clarissa.yasuda@gmail.com).

M.S. Silva, BS² (msaragiotto@yahoo.com.br).

C.A.M. Guerreiro, MD, PhD³ (guerreiro@fcm.unicamp.br).

I. Lopes-Cendes, MD, PhD² (icendes@unicamp.br).

F. Cendes, MD, PhD^{1,3} (fcendes@unicamp.br).

Institutional Affiliations

¹ Neuroimaging Laboratory - UNICAMP (University of Campinas) - Campinas – SP, Brazil

² Department of Genetics - UNICAMP (University of Campinas) – Campinas – SP, Brazil

³ Department of Neurology– UNICAMP (University of Campinas) – Campinas – SP, Brazil

Supplemental Data

Supplemental appendix: appendix e-1

Supplemental tables: electronic tables e-1 to e-5

Statistical analysis was conducted by Dr. E. Bilevicius, MD and Dr. F. Cendes, MD, PhD.

Search Terms: volumetric MRI use in epilepsy [75], antiepileptic drugs [61], hippocampal sclerosis [68].

Correspondence to:

Dr. Fernando Cendes, Department of Neurology, University of Campinas, Cidade Universitaria PO Box 6111, Campinas – SP – Brazil, 13083-970. E-mail address: fcendes@unicamp.br.

Study Funding: supported by FAPESP (“Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo”) grants 05/56578-4 and 06/50626-0.

Disclosures

Dr. Bilevicius reports no disclosures

Dr. Yasuda reports no disclosures

M.S. Silva reports no disclosures

Dr. Guerreiro reports no disclosures

Dr. Lopes-Cendes reports no disclosures

Dr. Cendes reports no disclosures

Abstract

Objective: to investigate the relationship between brain MRI and clinical characteristics and patterns of antiepileptic drug (AED) response in patients with mesial temporal lobe epilepsy (MTLE). **Design/Methods:** One hundred sixty five MTLE patients divided into seizure-free with AED (AED-responders, $n=50$), pharmacoresistants ($n=87$), and remitting-relapsing seizure control group ($n=28$). All groups were evaluated regarding age, frequency of seizures and age at epilepsy onset, duration of epilepsy, febrile seizures (FS), presence and side of hippocampal atrophy (HA) and initial precipitating injuries (IPIs). For gray matter (GM) MRI voxel-based morphometry (VBM) we selected only patients with unilateral HA on visual MRI analysis ($n=100$). Comparisons were made between all groups and 75 healthy controls. **Results:** Age at epilepsy onset was lower ($p=0.005$) and initial frequency of seizures was higher in pharmacoresistants compared with the other two groups ($p=0.018$). All groups showed GM atrophy compared to controls in ipsilateral hippocampus, bilateral parahippocampal gyri, frontal, occipital, parietal and cerebellar areas. In the AED-responders group such findings were more restricted to areas ipsilateral to the epileptic focus and more widespread in pharmacoresistants and remitting-relapsing groups. VBM pairwise comparisons showed areas with GM volume reduction in pharmacoresistants and remitting-relapsing compared with AED-responders in bilateral periorbital frontal ($p < 0.01$), cingulum ($p < 0.05$), and temporal lobe contralateral to the epileptic focus ($p < 0.05$). **Conclusions:** pharmacoresistants and remitting-relapsing patients presented a similar pattern of GM atrophy which was more widespread compared with AED-responders. Conversely, age at epilepsy onset was lower ($p=0.005$) and initial seizure frequency was higher in pharmacoresistants.

Introduction

The definition of AED resistance is still a matter of debate in the literature³. The most accepted criteria states that pharmacoresistant patients are those who do not achieve control of seizures after two AEDs trials in maximum tolerated doses^{4,5}. However, previous works have already attempted to describe an intermediary pattern of drug response, not restricted to total pharmacoresponse or pharmacoresistance⁶. One study showed that after a 40-year median follow-up, 93% of patients with childhood-onset seizures had entered one or more one-year remissions, although this proportion is much lower in the partial epilepsies group, mainly in MTLE⁷. Descriptions of prognostic factors for different types of AED response in MTLE patients have also been investigated⁸⁻¹¹. The commonest pathologic finding associated with poor prognosis in MTLE is hippocampal sclerosis (HS) on histology¹² whose most common MRI signs are hippocampal atrophy and increased T2 signal^{1,13}. Volumetric MRI analyses such as manual morphometry and voxel-based morphometry (VBM) have demonstrated that atrophy in patients with MTLE goes beyond hippocampus and involves also the surrounding extra-hippocampal and extra-temporal structures, mainly in pharmacoresistant subjects^{14,15}. Only recently studies on quantitative MRI in AED responders have emerged¹⁶, and there is still a lack of these studies in MTLE “remitting-relapsing” patients. The purpose of the present study was to examine the clinical and VBM differences among three patterns of AED response in unilateral MTLE patients with visual MRI evidence of HS: responders, pharmacoresistant and remitting-relapsing in order to characterize them better.

Materials and Methods

Patients

We enrolled 165 patients with MTLE from the outpatient epilepsy clinics of the University of Campinas Hospital and in a community clinic in Campinas, Brazil, where they were diagnosed after detailed neurological evaluation from 2006 to 2008. The determination of epilepsy syndrome was based on ILAE criteria ¹⁷. All patients were submitted to an extensive investigation based on clinical history, comprehensive neurological examination, interictal EEG and routine visual MRI analysis protocol including T1 and T2 sequences in axial, coronal and sagittal planes. All subjects were interviewed by one of the investigators using a structured questionnaire gathering information regarding age and frequency of seizures at epilepsy onset, febrile seizures (FS), time of epilepsy, presence of initial precipitating injuries (IPIs), and number of AED. The treatment options were similar between both institutions for all three groups. Information about presence and average number of seizures per month was also collected by means of a diary filled in by the patient or caregiver. On the basis of these items, the subjects were divided into three patterns of AED response: 50 AED responders (31 women) corresponding to all subjects who became seizure-free after the institution of appropriate AED (AED-responders), 87 pharmacoresistants (53 women) for all those who met the criteria of lack of seizure control besides adequate therapy with at least two AED until maximum tolerated doses (pharmacoresistants), and 28 remitting-relapsing patients (17 women). To be considered remitting-relapsing, the patient had to experience at least two periods of at least one year without seizures, intercalated with a similar period of time with uncontrolled seizures despite adequate AED regimen. The characteristic latent period when MTLE patients experience spontaneous remission of their seizures after the first events during childhood or

even early adulthood was not considered as a seizure-free period. The MRIs were analyzed and we selected for VBM analysis only MRIs from those who presented unilateral HA on visual inspection, in order to have better homogeneity between groups (table 2). MRIs with homogeneity outside the standard deviation on VBM pre-processing analysis were also discarded. Following this criterion, we selected 29 subjects from the AED-responders' group (19 women, mean age 42.8 ± 9.2 years), 50 from the pharmacoresistants (33 women, mean age 41.9 ± 10.9) and 21 from remitting-relapsing group (14 women, mean age 44.9 ± 10.2). The proportion of right/left HA was 16/13 for AED-responders; 26/24 for pharmacoresistants; and 13/8 for remitting-relapsing group.

Controls

The control group included 75 healthy volunteers age and sex matched (35 women, mean age 38.7 ± 12.2), not related to MTLE patients, who signed the written informed consent form. All images were acquired between 2003 and 2008. MRIs from this group were analyzed by two of the investigators and images with artifacts or incidental findings were not included.

Standard Protocol Approvals, Registrations, and Patient Consents

All subjects signed a written informed consent form approved by the ethics committee of our institution in accordance with the principles stated in the 1964 Declaration of Helsinki.

MRI acquisition

MRIs were acquired in a 2T scanner (Elscent Prestige, Haifa, Israel) with the following parameters: (1) *sagittal*-T₁ spin echo; (2) *coronal images*: (a) T₂-weighted and proton

density fast spin echo, (b) T_1 -weighted inversion recovery; (3) *axial images*: (a) T_1 -weighted gradient echo, (b) FLAIR (fluid attenuated inversion recovery); (4) T_1 -weighted 3-dimensional gradient echo with 1mm isotropic voxels ^{12,18} (**details in appendix e-1**).

Pre-processing of data

MRIs were acquired in DICOM format. In order to undergo the VBM analysis all images were transformed into ANALYZE® format and anterior commissure was found and marked with MRIcro software (www.mricro.com) for spatial alignment ¹⁹. The VBM analysis was performed with SPM5 software (Wellcome Trust Centre for Neuroimaging, London, UK; www.fil.ion.ucl.ac.uk) on MATLAB 7.7.0 platform (MathWorks, Natick, MA). The pre-processing done by this software included the following steps: (1) segmentation using the defaults for the native space option creating tissue probability maps (white matter, gray matter [GM] and cerebrospinal fluid) using Hidden Markov Random Field Theory; (2) spatial normalization of GM segments to each image to the International Consortium for Brain Mapping (ICBM) 152 template (Montreal Neurological Institute) by estimation of 12-parameter affine transformation to correct for global shape differences ^{20,21}; (3) corrections for volume changes induced by spatial normalization (modulation). The modulation step was performed to scale each voxel value according to the subject's total intracranial volume (TIV), as well as the regional gray matter volume (GMV) expansion/contraction that occurs during nonlinear transformation. The “calculate raw volumes” feature of VBM 5 gave information about TIV and global GMV. After the first steps of segmentation, normalization and modulation a graph with information about the homogeneity means from each image was generated. This step is important since the images whose homogeneity is outside the standard deviation can be better re-accessed and

excluded in cases where this deviation is attributed to artifact. After that , GM image segments were smoothed with an isotropic Gaussian kernel of 12 mm full-width half-maximum (FWHM) in order to fit individual differences in sulcal and gyral anatomy and to meet the distributional assumptions of the general linear models necessary for statistical analysis.

Statistical Analysis of Images

The whole-brain voxel analysis was corrected for multiple comparisons through false discovery rate (FDR) statistical threshold of 5% ²², with an extent threshold looking for clusters with at least 32 contiguous voxels. This statistical method controls the rate of false positive voxels during multiple comparisons.

The stereotaxic coordinates provided in SPM output were confirmed by visual analysis and converted to anatomical names by MNI space Utility and Tailarach space Utility running on SPM (for algorithms see http://www.ihp.Sbp.ru/~pet_lab/MSU/MSUMain.html ²³). To locate GM regions of interest (ROI) generated by the comparisons MARSBAR software (<http://marsbar.sourceforge.net>) was used.

For voxel-wise analysis, we used two-sample t-tests to compare patients and controls. After that, the two-sample t-test was used to make comparisons between groups of patients (AED responders *versus* non-responders; AED responders *versus* remitting-relapsing; non-responders *versus* remitting-relapsing). All tests were performed on SPM 5.

The contrasts in two-sample t-tests were defined to reveal areas of GM increase/decrease in the comparisons described above. The analysis included proportional threshold masking (set to 0.8) and implicit masking.

The output for each comparison was a statistical parametric map of the t statistic (SPM t), which was transformed to a normal distribution map (SPM z). All results were plotted into whole-brain MNI templates with corresponding z-score bars for each map (figure 1).

Statistical Analysis of Clinical Data

The clinical variables from patients and controls were analyzed with SYSTAT9 software (San Jose, California, Systat Software Inc. [SSI]). We used t-tests with Bonferroni's correction to compare continuous data between patients and controls. For categorical variables we used Pearson X^2 and Fisher's exact tests. We used ANOVA with Tukey's post hoc pairwise comparisons when appropriate.

Results

The comparisons regarding duration of epilepsy, FS, time of epilepsy and IPIs revealed no difference among groups (table 1). Mean ages at the time of MRI scanning and age at epilepsy onset were significantly lower in pharmacoresistants compared with AED-responders and remitting-relapsing groups. The number of AEDs used was lower in AED-responders and remitting-relapsing groups. The remitting-relapsing group showed the lowest initial frequency of seizures and pharmacoresistants the highest. Family history of

seizures was more frequent in remitting-relapsing and in AED-responders than in pharmacoresistants ($p=0.019$) (table 1).

VBM findings

*Comparisons between patient groups and controls (see **Supplemental tables E1-E3**)*

All groups showed a more intense GMV reduction in the following locations compared with healthy controls: ipsilateral hippocampus, bilateral parahippocampal gyri, frontal, occipital and parietal areas and some cerebellar areas.

AED-responders showed more intense reduction in GMV within the ipsilateral temporal lobe and bilateral insula compared with controls. We also observed such reduction contralaterally although it was less pronounced (figure 1A). The same pattern was observed in pharmacoresistants whereas in the remitting-relapsing group temporal GMV reduction was bilateral (figures 1B and 1C). In frontal lobes, GMV reduction was observed within bilateral inferior and middle frontal gyri, mainly the ipsilateral frontoopercular area in AED-responders. On the other hand, pharmacoresistants showed more widespread reductions of GMV mainly in bilateral inferior and middle frontal gyri. Remitting-relapsing patients presented widespread GMV reduction on frontal lobes, even in superior gyri; however, it was more intense in periorbital regions. The reduction was more intense in bilateral middle and posterior cingulum in AED-responders and anterior cingulum in pharmacoresistants and remitting-relapsing groups. Parietal lobes showed bilateral GMV reduction in AED-responders and more restricted to inferior parietal areas in pharmacoresistants and remitting-relapsing groups.

Thalami volume reduction was observed in pharmacoresistants (bilateral) and the remitting-relapsing group (ipsilateral). No thalamic reduction was observed in AED-responders. All three groups had areas of GMV reduction in cerebellum.

*Intergroup comparisons (see **Supplemental tables E4-E5**)*

VBM pairwise comparisons showed areas with GMV reduction in pharmacoresistants and remitting-relapsing groups compared with AED-responders in bilateral periorbital frontal ($p < 0.01$), anterior cingulum ($p < 0.05$) middle and inferior temporal bilaterally, more intensely contralaterally to the epileptic focus in ($p < 0.05$), as well as in caudate GM bilaterally ($p = 0.002$).

There were no significant differences in whole-brain GMV between pharmacoresistants and remitting-relapsing groups (figure 2). However, when compared to controls, we observed that the voxel cluster size involved was larger in pharmacoresistants than in remitting-relapsing group (**supplemental tables E2 and E3**).

Discussion

Although an intermediate pattern of AED response is commonly seen in patients with MTLE, it has been recognized only recently. In the present work, we tried to identify clinical and VBM characteristics in different patterns of AED response including the relapsing-remitting MTLE patients.

The proportion of patients with different periods in and out of AED response is quite variable, depending on seizure type, medical regimen and other factors. The figure varies

from 5.4%²⁴ to 15 or 20%²⁵. In our series, those patients corresponded to 16.96% (28/165).

Factors such as family history of epilepsy, febrile seizures, IPIs like head trauma and psychiatric comorbidities were largely associated with AED response²⁶. Based on these observations an integrative hypothesis has been proposed, whereby some common neurobiological processes could be involved in the continuum in inherent severity of the disease, which determines its relative response to medication³⁰. It is based on the fact that transporter and drug target hypotheses do not explain all the mechanisms involved in the development of AED failure²⁷. This new model, which tries to explain pharmacoresistance by assessing differences in inherent epilepsy severity based on the frequency of seizures in the early phase of epilepsy, is supported by several long-term prospective follow-up studies^{26, 27-29}.

Initial frequency of seizures is perhaps the most important prognostic factor regarding AED response. It is widely known that an elevated number of seizures in the early phase predict a poorer outcome, independent of the seizure etiology^{25, 28, 31}. The group with the worst outcome in our study showed the highest initial frequency of seizures, confirming such findings⁷. The association between high initial seizure frequency and poorer outcome suggests that common neurobiological factors may underlie both epilepsy severity and drug refractoriness. This model, however, presents some limitations.

The first limitation relies on the fact that it could not explain the “atypical” evolution of some patients with intercalating periods of seizure control and AED resistance, as seen in our series. In the present study, the remitting-relapsing group showed the lowest initial

frequency of seizures ($p=0.018$). Another limitation is the lack of molecular genetic studies to compare patterns of drug response and initial seizure frequency³².

We studied some other possible determinants previously described on literature, such as age at epilepsy onset, that was significantly lower in pharmacoresistant subjects, and initial seizure frequency, that was different among all three groups.

We could also observe an earlier age of seizure onset in the pharmacoresistant group, as in previous studies⁶, although it does not represent a consensus³³. Another discordant point is the duration of epilepsy, which did not show any difference among groups in our study.

After the qualitative MRI analysis, we proceeded to quantitative study using VBM. Our results corroborated the previous observation that pharmacoresistance is probably linked to several determinants.

Although the clinical characteristics observed revealed more similarities between AED-responders and remitting-relapsing groups, VBM analysis showed similar widespread reductions of GMV in pharmacoresistants and remitting-relapsing groups. The less intense GMV reduction in AED-responders shown by intergroup comparisons was not found in another study¹⁶. This difference could be explained by a different criterion used in the present work to classify AED response and the fact that we included remitting-relapsing patients in a separate group. On the other hand, our study showed extensive GMV reduction in all three groups, corroborating the hypothesis that MTLE is not confined to the hippocampus or even to the temporal lobe, as previously demonstrated^{14, 34, 35}.

The three groups presented GMV reduction compared with controls in cerebellar, occipital, frontal (mainly inferior orbitofrontal), cingulum, thalamus, parietal and somatosensitive areas. Earlier VBM studies have already shown these areas of GMV reductions, mainly on left-sided MTLE ^{15,37-38}. Although in the present study we have not made such left-right side differentiation, which could represent a limitation, since images from patients with right HA were flipped to the left, we found similar results in our pharmacoresistant MTLE patients. The diverse results from the other two groups could not be attributed to differences in HA lateralization since the left/right side ratio of HA was similar among groups.

In our work, the HA is the common feature that links all three groups analyzed. The presence of HA in this context is important, since it could overcome the limitation of VBM in detecting subtle GMV reductions previously described in MTLE patients without HA ³⁷; it also makes the comparisons between groups more reliable owing to better homogeneity.

The GMV reduction found in all three groups could be explained by neural network damages that were already observed in pharmacoresistant MTLE patients ³⁵. Our findings for AED-responders and remitting-relapsing patients, however, are new. We hypothesize that AED-responders present more restricted network damage, as supported by a recent proton MRS study ³⁸. In remitting-relapsing patients this damage is similar to that in pharmacoresistants. The explanation for such difference in drug response could lie in a combination of clinical and genetic factors previously discussed.

The deafferentation of those brain regions connected to the hippocampus and the spread of epileptic activity could explain the GMV reduction seen in areas away from the mesial

temporal lobe, even in AED-responders^{35, 37}. Those two mechanisms, however, seem to have different weights according to AED response. In AED-responders GMV reduction was more prominent ipsilaterally to seizure focus in limbic, neocortical, and subcortical brain regions. Subcortical, cerebellar, and neocortical structures, however, were more affected bilaterally in pharmacoresistant and remitting-relapsing groups. This observation could corroborate that the two mechanisms act proportionally together in all groups, since some extra-temporal and contralateral areas do not have any direct connection with the hippocampus, although they are involved in seizure spread (e.g. contralateral thalamus, cingulum and contralateral temporal cortex)³⁹.

We found GMV reduction in the cerebellum in all three groups; it could be explained by the chronic use of AED, but also by network deafferentation, since there are neural pathways between the hippocampus and cerebellum⁴⁰.

It is possible that more subtle morphometric differences among groups may have not been detected due to relatively small numbers in each group. Replication of such findings with a larger population should be performed

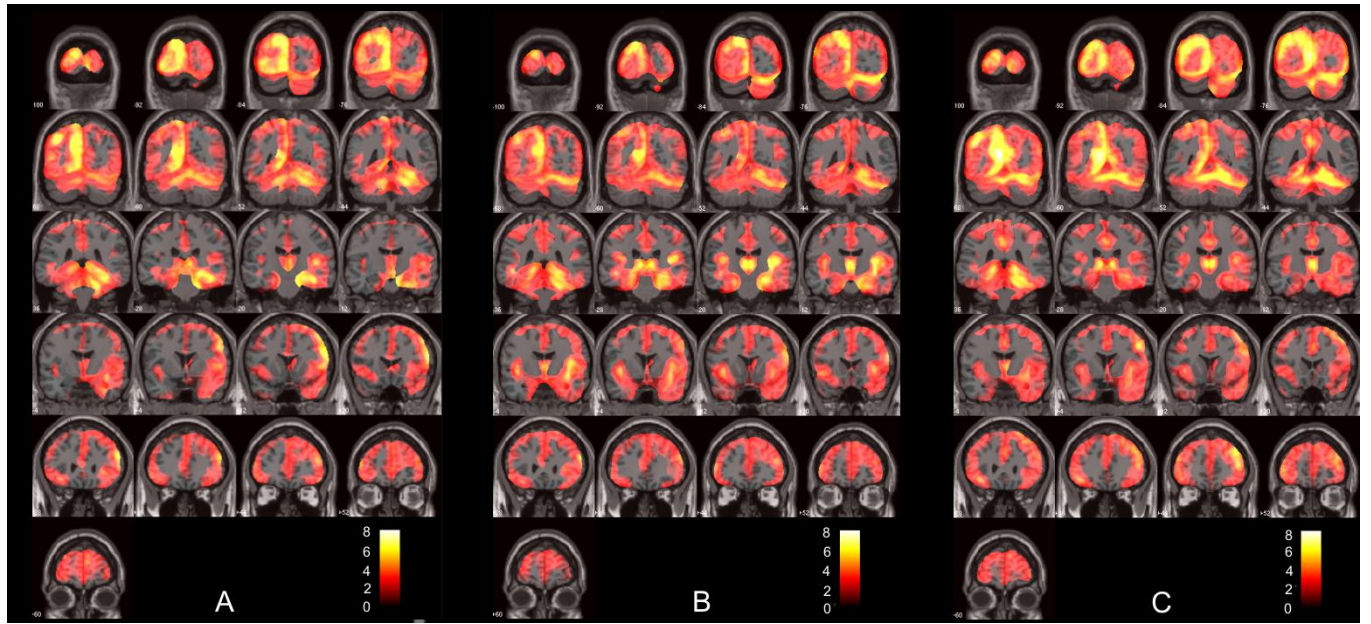


Figure 1. VBM result comparison between MTLE AED responders (group I) and healthy controls [A]; pharmacoresistants (group II) and healthy control [B]; remitting-relapsing (group III) and healthy control [C]. All groups showed bilateral atrophic areas although it was more intense on groups II and III. Statistical maps are overlaid on a multislice display of coronal images of a smoothed T1 template. The respective T-value bar is shown in red.

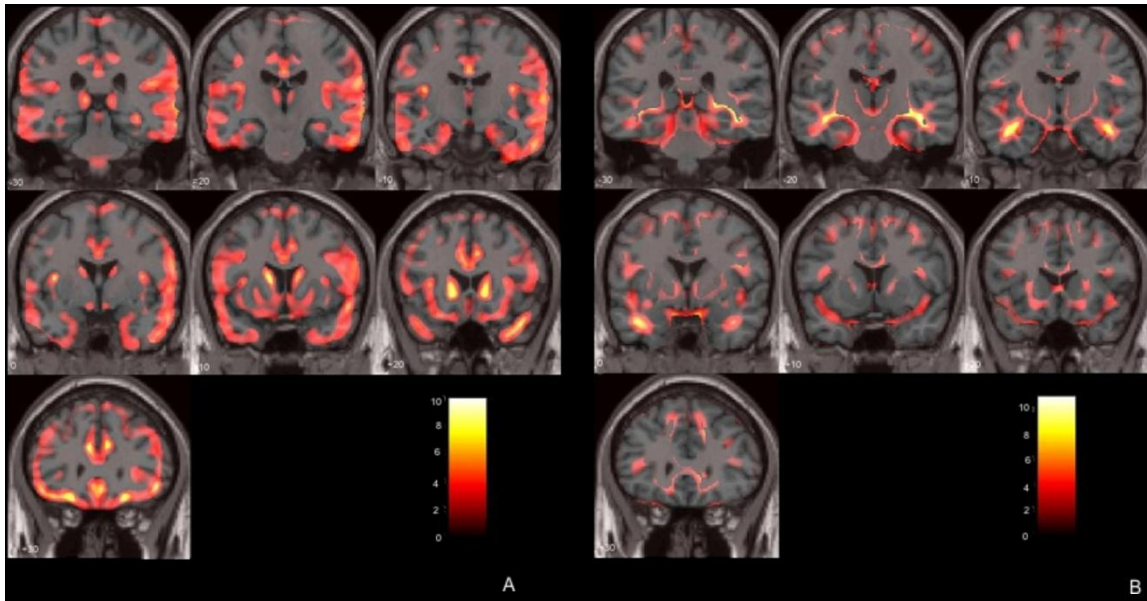


Figure 2. VBM result comparison between pharmacoresistants and AED-responders [A]; remitting-relapsing and AED-responders [B]. Statistical maps are overlaid on a multislice display of coronal images of a smoothed T1 template. The respective T-value bar is shown in red. There were no significant differences in whole brain GMV between pharmacoresistants and remitting-relapsing groups.

References

- (1) Semah F, Lamy C, Demeret S. Hippocampal sclerosis and other hippocampal abnormalities in the early identification of candidates for epilepsy surgery. *Arch. Neurol.* 2002; 59(6):1042-1043.
- (2) Stephen LJ, Kwan P, Brodie MJ. Does the cause of localization-related epilepsy influence the response to antiepileptic drug treatment? *Epilepsia* 2001; 42(3):357-362.
- (3) Arzimanoglou A, Ryvlin P. Towards a clinically meaningful definition of drug-resistance. In: Kahane P, Berg A, Löscher W, Nordli D, Perucca E, editors. *Progress in Epileptic Disorders vol.7: Drug-Resistant Epilepsies*. John Libbey Eurotext, Mountrouge, France, 2008:1-6.
- (4) Perucca E. Pharmacoresistance in epilepsy: how should it be defined? *CNS Drugs* 1998; 10: 171-179.
- (5) Berg AT. Postsurgical treatment of epilepsy. *Epilepsy Curr* 2004; 4(4):127-130.
- (6) Varoglu AO, Saygi S, Acemoglu H, Ciger A. Prognosis of patients with mesial temporal lobe epilepsy due to hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res* 2009; 85(2-3):206-211.
- (7) Sillanpää M, Schmidt D. Early seizure frequency and etiology predict long-term medical outcome in childhood-onset epilepsy. *Brain* 2009; 132:989-998.
- (8) Kim WJ, Park SC, Lee SJ, et al. The prognosis of seizures with medications in patients with MRI evidence for mesial temporal sclerosis. *Epilepsia* 1999; 40:290-293.
- (9) Sander, JWAS. Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review. *Epilepsia* 1993; 34:1007-1016.
- (10) Tobias E, Brodie AF, Brodie MJ. An outcome audit at the epilepsy clinic: results from 1000 consecutive referrals. *Seizure* 1994; 3:37-43.

- (11) Mattson RH, Cramer JA, Collins JF. Prognosis for total control of complex partial and secondarily generalized tonic clonic seizures. *Neurology* 1996; 47:68-76.
- (12) Bonilha L, Rorden C, Halford JJ, et al. Asymmetrical extra-hippocampal grey matter loss related to hippocampal atrophy in patients with medial temporal lobe epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78:286-294.
- (13) Cendes F, Andermann F, Gloor P, et al. Atrophy of mesial structures in patients with temporal lobe epilepsy: cause or consequence of repeated seizures? *Ann Neurol* 2003; 34:795-801.
- (14) Bernasconi N, Duchesne S, Janke A, et al . Whole-brain voxel-based statistical analysis of gray matter and white matter in temporal lobe epilepsy. *NeuroImage* 2004; 23:717-723.
- (15) Bonilha L, Rorden C, Castellano G, et al. Voxel-based morphometry reveals gray matter network atrophy in refractory medial temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol* 2004; 61:1379-1384.
- (16) Labate A, Cerasa A, Aguglia U, et al. Voxel-based morphometry of sporadic epileptic patients with mesiotemporal sclerosis. *Epilepsia*. 2010 Apr; 51(4): 506-510
- (17) Commission on classification and terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* 1989; 30:389-399.
- (18) Yasuda CL, Valise C, Saúde AV, et al. Dynamic changes in white and gray matter volume are associated with outcome of surgical treatment in temporal lobe epilepsy. *Neuroimage* 2010 ;49(1):71-79.

- (19) Rorden C, Brett M. Stereotaxic display of brain lesions. *Behav. Neurol.* 2000; 12: 191-200.
- (20) Ashburner J, Friston KJ. Unified segmentation. *Neuroimage* 2005; 26(3): 839-851.
- (21) França Jr MC, D'Abreu A, Yasuda C, et al. A combined voxel-based morphometry and H-MRS study in patients with Friedreich's ataxia. *J Neurol.* 2009 Jul;256(7):1114-1120
- (22) Genovese CR, Lazar NA, Nichols T. Thresholding of statistical maps in functional neuroimaging using false discovery rate. *Neuroimage* 2002; 15:870-878.
- (23) Korotkov A, Radovanovic S, Ljubisavljevic M, et al. Comparison of brain activation after sustained non-fatiguing and fatiguing muscle contraction: a positron emission tomography study. *Exp. Brain Res.* 2005; 163:65-74.
- (24) Brodie MJ. Response to drug therapy: winners and losers. *Epilepsia* 2005 ;46(suppl 10):31-32.
- (25) Sillanpää M, Schmidt D. Natural history of treated childhood onset epilepsy: prospective, long term population based study. *Brain* 2006; 129:617-624.
- (26) Hitiris N, Mohanraj R, Norrie J, Sills GJ, Brodie MJ. Predictors of pharmaco-resistant epilepsy. *Epilepsy Res* 2007; 75:192-196.
- (27) Rogawski MA, Johnson MR. Intrinsic severity as a determinant of antiepileptic drug refractoriness. *Epilepsy Curr* 2008; 8(5):127-130.
- (28) MacDonald BK, Johnson AL, Goodridge DM, Cockerell OC, Sander JW, Shorvon SD. Factors predicting prognosis of epilepsy after presentation with seizures. *Ann Neurol* 2000; 48:833-841.
- (29) Sillanpää M, Schmidt D. Seizure clustering during drug treatment affects seizure outcome and mortality of childhood-onset epilepsy. *Brain* 2008; 131:938-944.

- (30) Schmidt D, Löscher W. New developments in antiepileptic drug resistance: an integrative view. *Epilepsy Curr* 2009; 9(2):47-52.
- (31) Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med* 2000; 33:314-319.
- (32) Spooner CG, Berkovic SF, Mitchell LA, Wrennall JA, Harvey AS. New-onset temporal lobe epilepsy in children: lesion on MRI predicts poor seizure outcome. *Neurology* 2006; 67:2117-2118.
- (33) Kumlien E, Doss RC, Gates JR. Treatment outcome in patients with mesial temporal sclerosis. *Seizure* 2002; 11:413-417.
- (34) Wieser, HG. ILAE Commission on neurosurgery of epilepsy. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia* 2004; 45(6):695-714.
- (35) Riederer F, Lanzenberger R, Kaya M, et al. Network atrophy in temporal lobe epilepsy: a voxel-based morphometry study. *Neurology* 2008 ;71(6):419-425.
- (36) Keller SS, Wilke M, Wieshmann UC, et al. Comparison of standard and optimized voxel-based morphometry for analysis of brain changes associated with temporal lobe epilepsy. *Neuroimage* 2004; 23:860-868.
- (37) Mueller SG, Laxer KD, Cashdollar N, et al. Voxel-based Optimized Morphometry (VBM) of gray and white matter in Temporal Lobe Epilepsy (TLE) with and without mesial temporal sclerosis. *Epilepsia* 2006; 47(5):900-907.
- (38) Campos BA, Yasuda CL, Castellano G, Bilevicius E, Li LM, Cendes F. Proton MRS may predict AED response in patients with TLE. *Epilepsia*. 2010 May; 51(5): 783-788.

- (39) Van Paesschen W, Dupont P, Van Driel H, et al. SPECT perfusion changes during complex partial seizures in patients with hippocampal sclerosis. *Brain* 2003, 126:1103–1111.
- (40) Bertashius KM. Propagation of human complex-partial seizures: a correlation analysis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1991; 78:333-340.

Table 1. Basic statistics of three MTLE groups

	Age $\pm$ SD	DE $\pm$ SD	FS	IPI	AEO $\pm$ SD	AED	IFS $\pm$ SD	FH
	(y)	(y)	(N)	(N)	(y)	(n)	(events/mo)	(N)
AED-responders	47.03 $\pm$ 10.97	26.14 $\pm$ 14.96	11	7	16.89 $\pm$ 12.58	0.95 $\pm$ 0.70	10.57 $\pm$ 18.65	26
Pharmacoresistants	41.68 $\pm$ 9.11	29.91 $\pm$ 11.94	20	10	11.70 $\pm$ 8.67	1.82 $\pm$ 0.65	16.68 $\pm$ 26.95	32
Remitting-relapsing	46 $\pm$ 11.50	27.56 $\pm$ 13.51	2	0	15.88 $\pm$ 9.4	1.28 $\pm$ 0.73	2.59 $\pm$ 3.24	17
P	0.005	0.24	0.27	0.15	0.005	<0.005	0.018	0.019

SD: Standard deviation; DE: duration of epilepsy; AEO: Age at epilepsy onset; FS: Febrile seizure; IPI: Initial precipitating injury; IFS: Initial frequency of seizures; FH: Family history of seizures; y: years; N: number of patients; n: number of AEDs; mo: month. Age, IFS and EO: ANOVA; FS, IPI, AED, FH: qui-square; TE: ANOVA.

Table 2. Distribution of hippocampal atrophy (HA) among groups

	Bilateral	Right	Left	None	Total
AED-responders	11 (22%)	16 (32%)	13 (26%)	10 (20%)	50 (100%)
Pharmacoresistants	16 (18.3%)	31 (35.6%)	31(35.6%)	9 (10.3%)	87 (100%)
Remitting-relapsing	3 (10.7%)	13 (46.4%)	8 (28.6%)	4 (14.3%)	28 (100%)
Total	30	60	52	23	165

Table e-1: Results from VBM group analysis (AED responders x controls).

Voxel Wise		Spatial Coordinates			Anatomical Location		
Cluster Size	T	Equiv Z	X	Y	Z	Side	Location
3877	6.26	5.72	-32	-45	10	left	hippocampus
2409	5.76	5.33	-27	-78	7	left	middle occipital gyrus
2167	5.10	4.79	24	31	4	right	inferior frontoorbital gyrus
1738	5.01	4.72	23	-23	33	right	cingulate gyrus
922	4.62	4.38	18	45	25	right	superior frontal gyrus
1575	4.59	4.35	-17	38	1	left	anterior cingulate
387	4.58	4.34	46	-14	-25	right	fusiform gyrus
184	4.24	4.05	55	-12	1	right	superior temporal gyrus (area 39)
465	4.19	4.01	17	39	-9	right	anterior cingulate
137	4.08	3.91	10	4	0	right	lentiform nucleus
267	4.05	3.88	-18	25	-16	left	middle frontal gyrus
862	2.62	2.57	40	-52	28	right	superior temporal gyrus (area 22)
529	2.22	2.19	-44	-64	1	left	inferior temporal gyrus

FDR < 0.05; clusters > 32; Height Threshold T = 2.01

Table e-2: Results from VBM group analysis (AED refractory x controls)

Voxel Wise			Spatial Coordinates			Anatomical Location	
Cluster Size	T	Equiv Z	X	Y	Z	Side	Location
110493	18.41	Inf	-36	-29	-3	Left	mesial temporal lobe (caudate)
	18.33	Inf	41	-12	-18	Right	mesial temporal lobe (caudate)
1332	8.66	7.45	41	-90	16	Right	middle occipital gyrus
409	8.31	7.22	17	-32	56	Right	frontal postcentral gyrus
309	8.08	7.06	-29	-18	13	Left	lentiform nucleus
828	8.04	7.04	-23	29	-27	Left	fronto-orbital gyrus
833	7.37	6.57	27	-70	19	Right	occipital
476	6.74	6.10	-50	-82	21	Left	middle temporal gyrus
299	6.32	5.78	-38	-6	37	Left	frontal precentral gyrus
153	6.22	5.70	-48	-44	-6	Left	temporal lobe (sub-gyral)
631	6.04	5.56	-36	11	-20	Left	superior temporal gyrus
77	5.93	5.47	0	-14	23	Left	cingulate
153	5.27	4.93	15	5	58	Right	medial frontal gyrus
76	5.07	4.77	48	25	-20	Right	superior temporal gyrus
70	5.02	4.73	-44	-47	32	Left	parietal supramarginal gyrus
37	4.95	4.66	-31	-15	53	Left	frontal precentral gyrus
129	4.94	4.66	47	-29	35	Right	parietal postcentral gyrus
44	4.63	4.39	36	-97	4	Right	middle occipital gyrus

40	4.53	4.31	-33	-27	43	Left	parietal postcentral gyrus
40	4.48	4.27	-42	-5	29	Left	frontal precentral gyrus
56	4.36	4.16	30	-47	-40	Right	cerebellar tonsil
41	3.88	3.74	-30	-47	-40	Left	cerebellar tonsil
37	3.80	3.66	-32	32	21	Left	middle frontal gyrus
48	3.71	3.58	-31	26	29	Left	middle frontal gyrus
321	2.69	2.64	43	-59	56	Right	superior parietal lobule
573	2.54	2.50	39	-52	28	Right	middle temporal gyrus

Table e-3: Results from VBM group analysis (AED remitting – relapsing x controls).

Voxel Wise			Spatial Coordinates			Anatomical Location	
Cluster Size	T	Equiv Z	X	Y	Z	Side	Location
10916	14.88	Inf	-36	-29	-3	Left	temporal (caudate)
	14.03	Inf	-27	-27	-4	Left	hippocampus
	10.84	Inf	-41	-17	-14	Left	temporal
13787	14.65	Inf	37	-25	-4	Right	temporal (caudate)
	14.65	Inf	41	-14	-17	Right	temporal
	12.05	Inf	29	-26	-4	Right	hippocampus
881	10.41	Inf	-8	0	-22	Left	parahippocampal gyrus
1474	10.12	Inf	9	1	-22	Right	parahippocampal gyrus
2970	9.49	7.82	16	53	15	Right	medial frontal gyrus
4323	8.70	7.36	49	-5	19	Right	frontal precentral gyrus
	7.61	6.65	38	10	17	Right	insula
759	8.03	6.92	-42	-6	21	Left	frontal precentral gyrus
278	7.96	6.88	-13	-48	11	Left	posterior cingulate
868	7.85	6.81	33	44	-4	Right	frontal lobe (sub-gyral)
596	7.63	6.66	-34	39	-4	Left	middle frontal gyrus
773	7.35	6.46	-16	21	-14	Left	inferior frontal gyrus
	7.13	6.31	4	23	0	Right	anterior cingulate
1240	7.23	6.38	-39	10	16	Left	insula
389	6.84	6.10	10	-20	33	Right	posterior cingulate
1128	6.02	5.49	-17	51	-6	Left	medial frontal gyrus
126	5.81	5.33	10	16	23	Right	cingulate gyrus
137	5.74	5.27	41	-90	16	Right	middle occipital gyrus

179	5.72	5.26	20	22	-13	Right	inferior frontal gyrus
101	5.72	5.26	23	30	-27	Right	frontal orbital gyrus
201	5.70	5.24	31	-13	8	Right	lentiform nucleus
98	5.49	5.07	17	-43	8	Right	parahippocampal gyrus
62	5.44	5.03	-8	9	28	Left	cingulate gyrus
37	5.39	4.99	3	14	19	Right	anterior cingulate
538	5.12	4.77	-16	-54	48	Left	parietal precuneus
59	5.00	4.67	27	19	5	Right	claustrum
70	4.90	4.59	-8	-26	32	Left	cingulate gyrus
156	4.79	4.50	-36	11	-20	Left	superior temporal gyrus
40	4.69	4.42	-48	-44	-6	Left	temporal lobe (sub-gyral)
51	4.68	4.41	-16	-34	56	Left	frontal paracentral
38	4.15	3.95	24	-74	18	Right	occipital precuneus
477	2.69	2.63	-18	4	-42	Left	uncus

FDR < 0.05; clusters > 32; Height Threshold T = 1.95

Table e-4: Results from VBM group analysis (AED refractory x AED responders)

Voxel Wise		Spatial Coordinates			Anatomical Location		
Cluster Size	T	Equiv Z	X	Y	Z	Side	Location
56133	10.00	7.43	-26	38	-14	left	middle frontal gyrus
	9.12	7.02	24	35	-16	right	middle frontal gyrus
	7.26	6.01	8	28	27	right	anterior cingulate
4556	8.47	6.68	-13	19	-1	left	caudate(sub lobar)
3077	7.74	6.29	14	20	-1	right	caudate(sub lobar)
	3.49	3.29	15	-3	21	right	caudate(sub lobar)
24042	7.36	6.07	51	15	-18	right	superior temporal gyrus
	5.60	4.93	61	-52	-10	right	inferior temporal gyrus
	5.40	4.79	63	-9	7	right	superior temporal gyrus
2801	6.63	5.62	-37	-3	13	left	insula
	5.80	5.07	-32	25	0	left	inferior temporal gyrus
1772	5.81	5.08	-47	16	-23	left	superior temporal gyrus
757	5.73	5.02	32	-34	-6	right	hippocampus
483	5.45	4.82	-39	-17	36	left	frontal lobe(precentral gyrus)
497	5.17	4.63	-10	-30	6	left	thalamus
166	4.99	4.49	-31	-7	-45	left	inferior temporal gyrus
1417	4.81	4.35	-38	7	29	left	inferior frontal gyrus
1595	4.58	4.18	-47	-73	-12	left	fusiform gyrus
387	4.39	4.03	-55	-11	-30	left	inferior temporal gyrus
214	4.32	3.97	12	-30	5	right	thalamus
440	4.18	3.86	-51	16	5	left	inferior frontal gyrus
151	4.18	3.36	-8	-51	33	left	parietal lobe(precuneus)
154	4.15	3.84	-40	36	30	left	superior frontal gyrus
98	4.04	3.75	18	-8	-21	right	parahippocampal gyrus

933	4.03	3.74	-64	-28	-6	left	middle temporal gyrus
58	3.99	3.71	-18	-8	-22	left	parahippocampal gyrus
159	3.97	3.70	44	-79	5	right	middle occipital gyrus

FDR < 0.05; clusters > 32; Height Threshold T = 3.07

Table e-5: Results from VBM group analysis (AED Remitting – Relapsing x AED Responders)

Voxel Wise		Spatial Coordinates			Anatomical Location		
Cluster Size	T	Equiv Z	X	Y	Z	Side	Location
8204	11.03	7.39	37	-26	-3	Right	Caudate Tail
	10.23	7.09	40	-21	-9	Right	Insula
	10.06	7.02	29	-25	-4	Right	Hippocampus
4964	8.49	6.35	-41	-6	-24	Left	Temporal Fusiform Gyrus
	7.80	6.02	-31	-23	-6	Left	Hippocampus
	7.58	5.91	-38	-11	-18	Left	Temporal Brodmann 20
308	7.27	5.74	9	-2	-20	Right	Parahippocampal Gyrus
	4.61	4.09	10	-9	-26	Right	Uncus
1794	6.83	5.51	-16	50	17	Left	Superior Frontal Gyrus
	5.07	4.42	-16	37	29	Left	Superior Frontal Gyrus
259	6.72	5.45	-8	-1	-21	Left	Parahippocampal Gyrus
608	6.63	5.39	1	-28	3	Right	Thalamus
	6.44	5.28	-7	-38	-5	Left	Parahippocampal Gyrus
38	6.23	5.16	29	-71	0	Right	Occipital Lingual Gyrus
299	5.96	5.00	-31	44	-3	Left	Middle Frontal Gyrus
289	5.96	4.99	22	-23	-31	Right	Parahippocampal Gyrus
	4.44	3.97	17	-15	-33	Right	Uncus
583	5.89	4.95	7	26	0	Right	Anterior Cingulate
	5.78	4.89	-7	26	1	Left	Anterior Cingulate
893	5.76	4.87	16	34	30	Right	Medial Frontal Gyrus
154	5.61	4.77	46	-5	21	Right	Frontal Precentral Gyrus
	4.37	3.92	47	-12	25	Right	Frontal Precentral Gyrus
93	5.55	4.74	40	14	15	Right	Insula
138	5.50	4.70	50	-77	32	Right	Middle Frontal Gyrus

	5.01	4.38	56	-71	27	Right	Middle Frontal Gyrus
364	5.45	4.67	11	15	22	Right	Cingulate Gyrus
83	5.40	4.64	1	-54	4	Right	Posterior Cingulate
34	5.36	4.61	60	-69	6	Right	Middle Occipital Gyrus
230	5.32	4.59	-15	27	-12	Left	Inferior Frontal Gyrus
100	5.31	4.58	20	24	-10	Right	Middle Frontal Gyrus
70	5.28	4.56	-16	51	-8	Left	Medial Frontal Gyrus
118	5.08	4.42	35	-44	-1	Right	Parahippocampal Gyrus
75	4.73	4.18	25	-82	-1	Right	Middle Occipital Gyrus
57	4.69	4.15	-39	11	15	Left	Insula
38	4.68	4.14	-16	54	1	Left	Medial Frontal Gyrus
45	4.66	4.13	23	24	4	Right	Clastrum
52	4.49	4.00	1	-23	15	Right	Thalamus

FDR< 0.05; clusters>32; Height Threshold T = 3.15

Capítulo 2

Dos 165 pacientes incluídos nesta tese, noventa e nove tiveram ambos os hipocampus segmentados manualmente segundo a técnica descrita previamente. Deste total 43 pacientes pertenciam ao grupo farmacorresistente (16 homens, idade média $42,9 \pm 8,74$); 31 ao grupo farmacorresponsivo (11 homens, idade média $47,19 \pm 11,01$) e 25 ao grupo remitante-recorrente (8 homens, idade média $44,28 \pm 11,91$). Além dos sujeitos de estudo foram segmentados hipocampus de 30 voluntários sadios (10 homens, idade média $41,10 \pm 11,94$). Todos os grupos apresentaram distribuição normal em relação à idade, e não houve diferenças significativas na distribuição de idade e sexo entre os grupos. Após a segmentação foram calculados os volumes dos hipocampus bilateralmente assim como seus índices de assimetria e considerados atroficos os hipocampus cujos volumes estivessem 2 desvios-padrões abaixo da média dos controles.

Abaixo as tabelas 1,2 e 3 evidenciam os volumes médios dos hipocampus assim como os índices de assimetria calculados para os 3 grupos de estudo.

Tabela 1. Idade, volumes máximo, mínimo e média de hipocampo esquerdo, direito e índice de assimetria do grupo farmacorresistente

	IDADE	VOL HE	VOL HD	IA
Pacientes	43	43	43	43
Minimo	24	2133	1804	0.469
Maximo	65	5433	5821	0.983
Média	42.90	3810.93	3954.69	0.767
Desvio Padrão	8.74	819.37	974.10	0.150

VOL HE: Volume Hipocampo Esquerdo; VOL HD: Volume Hipocampo Direito; IA: Indice de Assimetria

Tabela 2. Idade, volumes máximo, mínimo e média de hipocampo esquerdo, direito e índice de assimetria do grupo farmacorresponsivo

	IDADE	VOL HE	VOL HD	IA
Pacientes	31	31	31	31
Minimo	18	1644	2711	0.548
Maximo	65	5776	6392	0.990
Média	47.19	3965	4072.64	0.824
Desvio Padrão	11.01	990.90	793.02	0.138

VOL HE: Volume Hipocampo Esquerdo; VOL HD: Volume Hipocampo Direito; IA: Índice de Assimetria

Tabela 3. Idade, volumes máximo, mínimo e média de hipocampo esquerdo, direito e índice de assimetria do grupo remitente-recorrente

	IDADE	VOL HE	VOL HD	IA
Pacientes	25	25	25	25
Minimo	19	2970	2440	0.599
Maximo	70	5712	5827	0.979
Média	44.28	4209.52	3971.28	0.840
Desvio Padrão	11.91	762.10	924.45	0.120

VOL HE: Volume Hipocampo Esquerdo; VOL HD: Volume Hipocampo Direito; IA: Índice de Assimetria

A tabela 4 abaixo demonstra os resultados obtidos a partir da segmentação e cálculo de volume do grupo controle.

Tabela 4. Idade, volumes máximo, mínimo e média de hipocampo esquerdo, direito e índice de assimetria do grupo controle.

	IDADE	VOL HE	VOL HD	IA
Controles	30	30	30	30
Minimo	23	3517	3357	0.872
Maximo	67	5557	5850	0.999
Média	41.10	4481.5	4533.36	0.952
Desvio Padrão	11.94	591.91	606.14	0.036

VOL HE: Volume Hipocampo Esquerdo; VOL HD: Volume Hipocampo Direito; IA: Índice de Assimetria

A comparação por ANOVA entre os grupos evidenciou que a média dos volumes de hipocampo esquerdo dos pacientes farmacorresistentes foi menor em comparação aos controles ($p = 0,003$). Tal diferença não foi observada na comparação dos outros grupos de pacientes e controles.

Entre os pacientes, existiu apenas uma tendência do grupo refratário a apresentar volume hipocampal esquerdo menor em relação ao farmacorresponsivo ($p= 0,06$). Não houve diferença entre remitentes-recorrentes em relação a nenhum grupo.

Em relação ao hipocampo direito, resultados semelhantes foram observados na comparação entre farmacorresistentes e controles, mesmo que em menor grau ($p=0,029$). Na comparação entre os grupos de portadores de ELTM não foram observadas diferenças.

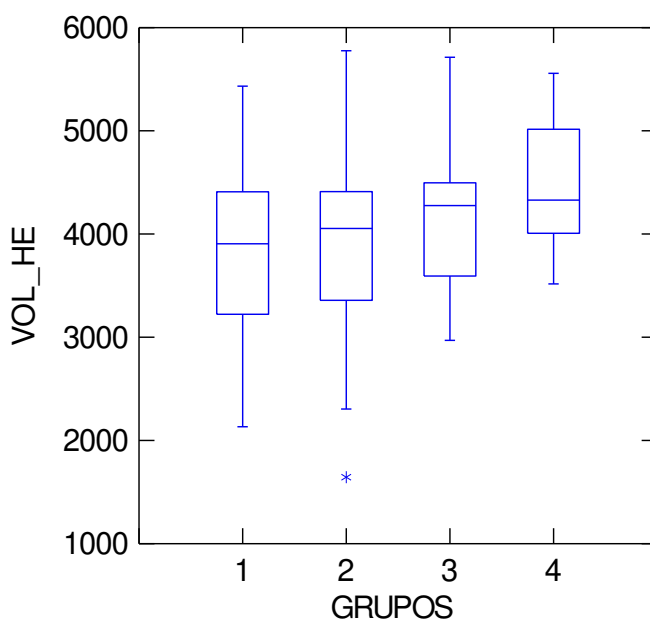


Figura 1. Volume do hipocampo esquerdo em mm^3 . 1= farmacorresistente; 2= farmacorresponsivo; 3= remitente-recorrente; 4=grupo controle.

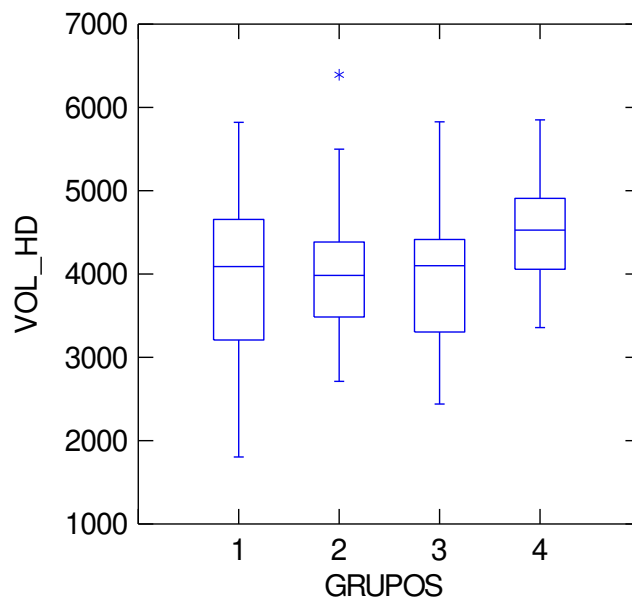


Figura 2. Volume do hipocampo direito em mm³. 1= farmacorresistente; 2= farmacorresponsivo; 3= remitante-recorrente; 4= controle.

Realizamos comparação entre os índices de assimetria (IA) entre os três grupos e os controles por ANOVA e observamos diferenças somente entre os três grupos de sujeitos e os controles após correção por Tukey conforme evidencia a figura 3 ($p < 0,005$). Os grupos entre si não apresentaram diferenças significativas.

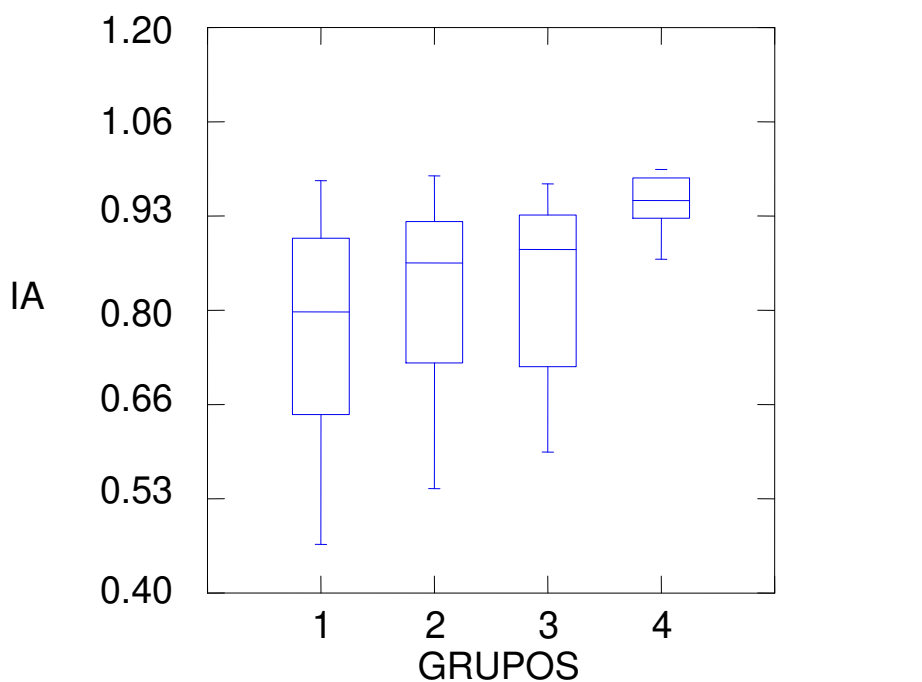


Figura 3. Índices de assimetria (IA). 1= farmacorresistente; 2= farmacoresponsivo; 3= remitente-recorrente; 4= controle.

A comparação dos volumes hipocâmpais entre os três grupos de estudo através da análise por ANCOVA tendo como covariável o tempo desde o início da epilepsia, não demonstrou alterações significativas, da mesma forma, não observamos diferença tendo como covariável a idade de início de crises.

As DAES mais utilizadas pelos pacientes foram carbamazepina e clobazam (como droga adjuvante). As demais drogas utilizadas em menor frequência: fenitoína (7 refratários, dose média $200 \pm 81,65$; 4 controlados, dose média $187,5 \pm 103,07$; 3 remitentes recorrentes, dose média $266,66 \pm 57,73$), fenobarbital (9 pacientes refratários, dose média $111,11 \pm 22,04$; 3 responsivos, dose média $175 \pm 198,43$; 5 remitentes-recorrentes, dose média $110 \pm 54,77$), lamotrigina (11

refratários , dose média $218,18 \pm 60,30$; 1 paciente remitente recorrente dose de 325 mg; nenhum paciente farmacorresponsivo), o ácido valpróico foi utilizado por 5 pacientes farmacorresistentes (dose média $750 \pm 288,67$) e apenas 1 paciente remitente-recorrente, nenhum paciente responsivo utilizou o ácido valpróico. O topiramato foi utilizado somente por pacientes refratários (7 pacientes, dose média $214,28 \pm 89,97$).

Em relação à carbamazepina, no grupo farmacorresistente 69/87 dos pacientes utilizavam esta droga, no grupo respondedor 28/50 e no grupo remitente-recorrente 14/28. As doses médias foram respectivamente $1062,12 \pm 274,43$ (refratários); $742,85 \pm 287,29$ (benignos); $1016,66 \pm 345,97$ (remitentes-recorrentes). A comparação por ANOVA evidenciou diferenças significativas entre os grupos refratário e responsivo ($p < 0,001$) e entre remitentes-recorrentes e farmacorresponsivos ($p=0,02$). Não foram observadas diferenças entre os refratários e os remitentes-recorrentes.

O Clobazam foi utilizado por 39/87 dos pacientes farmacorresistentes, como droga adjuvante à carbamazepina em 36/39 (92,30%), com dose média de $25 \pm 11,01$. Em remitentes-recorrentes 7/28 utilizaram-no, sendo que todos o fizeram como adjuvante à carbamazepina (dose média $14,16 \pm 13,11$). Já nos farmacorresponsivos, observamos o uso em apenas 13 pacientes sendo que em 12 a associação foi com carbamazepina (dose média $13,46 \pm 13,75$).

Neste presente trabalho pudemos identificar características clínicas e de imagem por RM através da análise visual e quantitativa por duas técnicas diversas (volumetria manual e VBM) de diferentes grupos de resposta farmacológica, incluindo grupo de resposta intermediária à DAE (remitente-recorrente).

Em nossa casuística, a proporção de pacientes farmacorresistentes representou a maior parcela dos casos com 87/165 (52,72%). Os farmacorresponsivos, por sua vez representaram 30,30% (50/165). Esta proporção maior de refratários pode ser explicada pelo fato da maior parte dos pacientes incluídos serem oriundos de serviço de referência para cirurgia de epilepsia. Mesmo que tal frequência possa ser resultado de viés de seleção, Semah e colaboradores (1998) em estudo populacional observaram refratariedade medicamentosa em ELTM em 70% a 80% dos casos (23), corroborando para o fato de esta condição ser altamente refratária à terapêutica medicamentosa.

A proporção de pacientes com resposta variável às DAES depende, assim como em relação aos outros padrões de resposta, a uma série de variáveis entre as quais: tipos de crises, regimes terapêuticos, além de outros fatores. Com isso, as cifras variam de 5,4% (145) até 15% a 20% (146). Neste grupo, os remitentes-recorrentes representaram 16,96% (28/165).

Vários fatores já foram relacionados à resposta a DAES como antecedente familiar de epilepsia, presença de crises febris, fatores precipitantes e comorbidades psiquiátricas. Dentre todas as variáveis clínicas, a frequência inicial de crises provavelmente represente o fator prognóstico mais importante no que se refere à resposta às DAES. Independente da etiologia da epilepsia, um elevado número de crises em fase precoce é descrito como fator

de pior prognóstico (22,27,146). Neste estudo, o grupo de pior resposta farmacológica apresentou a maior frequência de crises iniciais, de acordo com literatura. Mesmo com o aumento do número de pacientes para a análise farmacogenômica realizada em âmbito de projeto paralelo, tal achado manteve-se (anexo 1). No entanto, em relação ao grupo remitente-recorrente o número de crises iniciais foi significativamente menor em relação aos outros dois grupos ($p=0,018$).

A associação entre elevada frequência de crises no início e pior prognóstico sugere que processos fisiopatológicos comuns possam estar envolvidos tanto na severidade da epilepsia como na refratariedade medicamentosa (28,147). Este modelo, no entanto apresenta limitações. A primeira consiste no fato que não contempla as evoluções “atípicas” como nos casos remitentes-recorrentes que aqui apresentaram a menor frequência de crises. Outra limitação consiste no fato da falta de estudos genética molecular que contemplem esta comparação (147). Mesmo aqui, a comparação de grupos de resposta medicamentosa excluiu os remitentes-recorrentes, devido ao seu pequeno número (anexo1).

Estudamos outros fatores previamente relacionados ao prognóstico em ELTM descritos na literatura como idade ao início das crises, duração da epilepsia, presença de crises febris e fatores precipitantes. Encontramos diferenças significativas entre os grupos somente em relação à idade de início das crises. O grupo farmacorresistente apresentou menor idade em relação aos outros 2 grupos. Este parâmetro, no entanto, não representa consenso entre os diferentes estudos (148). Nesta mesma população, quando excluimos os remitentes-recorrentes e aumentamos o número da amostra, a diferença entre os dois grupos remanescentes não se manteve (anexo 1). Outro ponto de discussão é a duração da epilepsia que aqui não demonstrou diferenças entre os grupos tampouco.

Baseada nestas observações clínicas, sobretudo no que tange a elevada frequência de crises iniciais e pior prognóstico clínico foi proposta uma hipótese integrativa, onde alguns processos neurobiológicos comuns podem estar envolvidos em um mecanismo de severidade adquirida contínua, paralela a outras hipóteses previamente discutidas aqui porém que, isoladamente não contemplam todos os mecanismos envolvidos na resposta medicamentosa, dentre elas a hipótese de alvo e de transportador de múltiplas drogas (147). Apesar do processo fisiopatológico envolvido ainda não ser conhecido, esta hipótese é corroborada por vários estudos prospectivos de longo prazo (28,149).

Realizamos também análise quantitativa de imagens através de volumetria manual e VBM. Novamente nossos resultados corroboram com as observações prévias que os mecanismos de resposta farmacológica estejam ligados a vários fatores. Neste aspecto exploramos agora a hipótese de rede.

As volumetrias manuais evidenciaram volumes hipocampais menores em pacientes farmacorresistentes bilateralmente, porém de forma mais acentuada à esquerda, em relação aos demais grupos e controles. A relação entre atrofia hipocampal e farmacorresistência também já é conhecida na literatura e nossos dados confirmam tal relação (126, 129). A razão pelo qual a AH se desenvolve de forma mais acentuada no grupo de pior resposta farmacológica é ainda motivo de debates. Conforme descrito previamente, possíveis mecanismos inflamatórios crônicos devem estar envolvidos neste contexto e de forma mais intensa em refratários à terapia com DAES, independente do tempo de evolução da ELTM desde a primeira crise. Dados provenientes da análise por espectroscopia realizada por Campos e colaboradores (2010) em hipocampus de respondedores e não respondedores à DAE em subgrupo de pacientes incluídos nesta tese demonstraram redução na relação N-

acetil aspartato (NAA) / Creatina (Cr) de forma significativa no grupo farmacorresistente, indicando acentuada disfunção neuronal/axonal deste grupo (referência). A causa deste dano pode ser explicada por estresse oxidativo mitocondrial que, em última análise pode se secundário a uma intensa liberação de mediadores inflamatórios. Esta conclusão, no entanto, ainda é preliminar e estudos específicos devem ser realizados para confirmação desta hipótese.

Embora as características clínicas observadas apresentassem mais semelhanças entre remitentes-recorrentes e respondedores, a análise de VBM demonstrou atrofia difusa de SC de forma mais semelhante entre refratários e remitentes-recorrentes. O grupo respondedor mostrou atrofia de SC de forma menos intensa, revelada pela comparação entre os grupos. Esta diferença não havia sido previamente observada por outros autores (150). Possíveis explicações consistem no fato de que, neste trabalho, utilizamos critério de classificação mais restrito em relação à resposta farmacológica e incluímos os remitentes-recorrentes como um grupo separado.

Apesar de termos observado diferenças entre os grupos, todos apresentaram redução de SC em áreas extra-hipocâmpais e mesmo extra-temporais, corroborando com a hipótese de que a ELTM não é confinada somente ao hipocampo ou ao lobo temporal, como previamente demonstrado (135, 151,152).

Áreas como cerebelo, região occipital, frontal (principalmente orbitofrontal), parietal, cíngulo, tálamo e áreas somatossensitivas apresentaram redução nos três grupos. Estudos prévios utilizando VBM já atentaram para a redução de SC nestas áreas, sobretudo em ELTM esquerda (135,153). Embora, neste trabalho especificamente não tenhamos

realizado tal diferenciação entre ELTM direita e esquerda, uma vez que invertemos as imagens dos pacientes com AH direita para a esquerda, o que poderia representar uma limitação, obtivemos resultados semelhantes no grupo farmacorresistente. Da mesma forma, os resultados provenientes da análise dos outros dois grupos não devem ser atribuídos a diferenças na lateralização da AH, uma vez que a razão esquerda/direita desta mostrou ser similar entre os grupos.

É importante ressaltar que para a análise de VBM somente pacientes com atrofia unilateral foram utilizados. A razão para esta seleção encontra-se na melhor homogeneização entre os grupos além de ser uma tentativa de suplantir uma limitação do método em detectar reduções mais sutis de volume de SC, já descrito em pacientes com ELTM sem atrofia (153).

Uma possível explicação para as reduções de SC observadas de forma difusa nos três grupos consiste em danos na rede neuronal, já observados em estudos provenientes de pacientes com ELTM refratária (152). Os achados provenientes dos outros dois grupos, no entanto, são novos. Acreditamos que no grupo de pacientes farmacorresponsivos, o dano de redes neuronais seja mais restrito, dado este corroborado por recente estudo de espectroscopia por RM realizado pelo nosso grupo (referência).

Em relação ao acometimento de SC em remitentes-recorrentes e sua similaridade com o grupo farmacorresistente, a explicação pode consistir em uma combinação de fatores clínicos, ambientais e genéticos, como previamente discutido.

A deafferentação de regiões cerebrais conectadas com o hipocampo e o espalhamento da atividade epileptiforme podem explicar a redução de SC em áreas distantes do lobo

temporal mesial, mesmo em pacientes farmacorresponsivos (152, 153). Estes dois mecanismos parecem apresentar diferentes pesos de acordo com a resposta a DAES. Em responsivos, a redução de SC foi observada de forma mais intensa ipsilateralmente ao foco epileptogênico, sobretudo em regiões límbica, neocortical e subcortical. Estruturas subcorticais, cerebelares e neocorticais apresentaram redução bilateral nos grupos remitente-recorrente e refratário. Estas observações podem corroborar para a hipótese de que estes dois mecanismos interajam de forma proporcional em todos os grupos, já que algumas áreas extra-temporais e contra-laterais não apresentam conexão direta com o hipocampo, embora estejam envolvidas com o espraio da crise (por exemplo, tálamo contralateral, cíngulo e córtex temporal contralaterais) (154).

As reduções em regiões cerebelares podem ser explicadas não somente por efeito direto das DAES, mas também pela deafferentação de conexões entre hipocampo e cerebelo (155).

A análise farmacogenômica realizada paralelamente ao estudo das variáveis clínicas e de imagem mostrou associações entre SNP com maior frequência de alelos C do gene ABCC2 em farmacorresistentes. É interessante observar que a associação significativa ocorreu com polimorfismo sinônimo, ou seja, não interfere na formação do aminoácido não resultando, portanto em alteração estrutural ou funcional da proteína. Por outro lado, em responsivos o genótipo TT foi significativamente mais frequente. Este genótipo leva a formação de códon raro (AUU), o que altera o processo de translação levando a diminuição na função de transporte da proteína relacionada à bomba de efluxo de drogas (Pgp). A consequência é o aumento de concentração de DAES no tecido alvo.

A expressão do ABCC2 em hipocampus provenientes de pacientes também foi maior em comparação aos tecidos provenientes de controles.

Em relação aos polimorfismos relacionados ao citocromo P450, este estudo evidenciou SNP em três regiões intrônicas do CYP2C9 de forma mais frequente em farmacorresistentes. Outros polimorfismos intrônicos nos genes CYP1A2 e CYP1B1 também foram identificados, sendo rs12904742G e rs2551188TT mais frequentes em refratários a DAES. Apesar das regiões intrônicas apresentarem grande variabilidade, existem regiões altamente conservadas como os sites 5' e 3' Splice. Alterações destas regiões podem ser responsáveis por alterações essenciais em função e regulação do gene (156).

CONCLUSÕES

Neste estudo caracterizamos três diferentes tipos de resposta farmacológica em seus aspectos clínicos e de imagem por RM qualitativa e quantitativa, esta última por técnica de volumetria manual e VBM. Interrelacionamos também estas variáveis.

Além destas, foi realizada análise farmacogenômica dos grupos responsivo e refratário à terapêutica com DAES e de espectroscopia por RM de subgrupo destes em âmbito de projetos específicos.

Todos estes dados foram utilizados para a análise ampla de fatores relacionados à resposta medicamentosa em ELTM.

Identificamos que a frequência de crises ao início foi a variável clínica mais relacionada a pior prognóstico. Observamos também que o grupo farmacorresistente apresenta maior AH evidenciada por volumetria manual, além de diminuição volumétrica mais difusa em áreas distantes ao hipocampo conforme observado pelo VBM. Apesar de não apresentar AH significativa, o grupo remitante-recorrente também apresentou atrofia de SC difusa, de forma semelhante aos refratários.

A análise farmacogenômica identificou presença de alguns SNPs de forma mais frequente em refratários nos genes ABCC2 e em alguns genes relacionados aos complexo citocromo P450. Um SNP do gene ABCC2 foi mais frequente em farmacorresponsivos e relacionado como fator boa resposta farmacológica.

REFERÊNCIAS

- (1) Sander JW. The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr Opin Neurol* 2003 Apr;16(2):165-170.
- (2) Commission on Epidemiology and Prognosis, International League against Epilepsy. Guidelines for epidemiologic studies on epilepsy. *Epilepsia* 1993; 34:592 -596.
- (3) World Health Organization. World Health Organization. Atlas: Epilepsy Care in the World. Geneva: World Health Organization 2005: 91.
- (4) Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy . *N Engl J Med* 2000; 342:314 – 319.
- (6) Treiman DM. Management of refractory complex partial seizures: current state of the art. *Neuropsychiatric Dis Treat* 2010;6: 297-308.
- (7) Olafsson E, Ludvigsson P, Gudmundsson G, Hesdorffer D, Kjatanesson O, Hauser WA. Incidence of unprovoked seizures and epilepsy in Iceland and assessment of the eepilepsy syndrome classification. *Lancet Neurol* 2005; 4: 627 – 634.
- (8) Tallis R, Hall G, Craig I, Dean A. How common are epileptic seizures in old age? *Age Aging* 1991; 20: 442 – 448.
- (9) Lavados J, Germain L, Morales A, Campero M, Lavados P. A descriptive study of epilepsy in the district of El Salvador, Chile, 1984-1988. *Acta Neurol Scand* 1992 Apr; 85(4): 249 - 256.
- (10) Rwiza HT, Kilonzo GP, Haule J, Matuja WB, Mteza I, Mbeni P, et al. Prevalence and incidence of epilepsy in Ulanga, a rural Tanzanian district: a community-based study. *Epilepsia* 1992 Nov; 33(6): 1051 – 1056.
- (11) Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE commission on classification and terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 2010; 51(4): 676-685.
- (12) Berg AT, Shinnar S, Levy SR et al. Newly diagnosed epilepsy in children: presentation and diagnosis. *Epilepsia* 1999; 40: 445-452.
- (13) Kotsopoulos IAW, van Merode T, Kessels FGH et al. *Epilepsia* 2002; 43(11): 1402-1409.
- (14) Wiebe S. Epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Can J Neurol Sci* 2000; 27 Supp 1: S6- S10.

- (15) Semah F, Lamy C, Demeret S. Hippocampal sclerosis and other hippocampal abnormalities in early identification of candidates for epilepsy surgery. *Arch Neurol* 2002; 59(6): 1042-1043.
- (16) Stephen LJ, Kwan P, Brodie MJ. Does the cause of localization related epilepsy influence the response to antiepileptic drug treatment? *Epilepsia* 2001; 43: 357-362.
- (17) French JA. Refractory epilepsy: clinical overview. *Epilepsia* 2007; 48(Suppl 1): 3-7.
- (18) Schmidt D, Löscher W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia* 2005; 46(6): 858-877.
- (19) Perucca E. Pharmacoresistance in epilepsy: how should it be defined? *CNS Drugs* 1998; 10:171-179.
- (20) Berg AT, Langfitt J, Shinnar J, et al. How long does it take for partial epilepsy to become intractable? *Neurology* 2003; 60: 186-190.
- (21) Regesta G, Tanganelli P. Clinical aspects and biological bases of drug resistant epilepsies. *Epil Res* 1999; 34: 109-122.
- (22) Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med* 2000;342:314 – 319.
- (23) Semah S, Picot MC, Adam C, Broglin D, et al. Is the underlying cause of epilepsy a major cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology* 1998 Nov; 51(5): 1256-1262.
- (24) Pedley TA, Hirano M. Is refractory epilepsy due to genetically determined resistance to antiepileptic drugs? *N Engl J Med* 2003; 348: 1480-1482.
- (25) Löscher W, Potschka H. Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301: 7-14.
- (26) Sillampaa M, Jalava M, Kaliva O, Shimar J. Long term prognosis of seizures with onset in childhood. *N Engl J Med* 1998;338: 1715-1722.
- (27) MacDonald BK, Johnson AL, Goodridge DM, et al. Factors predicting prognosis of epilepsy after presentation with seizures. *Ann Neurol*. 2000 Dec;48(6):833-41.
- (28) Rogawski MA, Johnson MR. Intrinsic severity as a determinant of antiepileptic drug refractoriness. *Epilepsy Currents* 2008; 8: 127-130.
- (29) Kim WJ, Park SC, Lee SJ, *et al.* The prognosis for control of seizures with medication in patients with MRI evidence of mesial temporal sclerosis. *Epilepsia* 1999; 40(3): 290-293.

- (30) Patsalos PN. Antiepileptic drug pharmacogenetics. *Ther Drug Monit.* 2000 Feb;22(1):127-30.
- (31) Löscher W. Current knowledge on basic mechanisms of drug resistance. In: Kahane P, Berg A, Löscher W, Nordli D, Perucca E, editors. *Progress in Epileptic Disorders vol.7: Drug-Resistant Epilepsies*. John Libbey Eurotext, Mountrouge, France, 2008: 47-61.
- (32) Ferraro TN e Buono RJ. The relationship between the pharmacology of antiepileptic drugs and human gene variation : an overview. *Epil Behav* 2005; 7:18-36
- (33) Sisodiya SM, Lin WR, Harding BW ,et al. Drug resistance in epilepsy : expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy. *Brain* 2002; 125: 22-31.
- (34) Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000; 26: 13-25.
- (35) Hargus NJ, Merrick EC, Nigam A et al. Temporal lobe epilepsy induces intrinsic alterations in NA channel gating in layer II medial entorhinal cortex neurons. *Neurobiol Dis* 2010 Oct 11 [Epub ahead of print].
- (36) Vreugdenhil M, Vanveelen CWM, Vanrijen PC, Da Silva FHL, Wadman WJ. Effect of valproic acid on sodium currents in cortical neurons from patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 1998; 32: 309-320.
- (37) Remy S, Gabriel S, Urban BW, et al. A novel mechanism underlying drug resistance in chronic epilepsy. *Ann Neurol* 2003; 53: 469-479
- (38) Remy S, Urban BW, Elger CE, Beck H. Anticonvulsant pharmacology of voltage-gated Na⁺ channels in hippocampal neurons of control and chronically epileptic rats. *Eur J Neurosci* 2003; 17: 2648-2658.
- (39) Richards MW, Butcher AJ, Dolphin AC. Calcium channel beta subunits : structural insights aid our understanding. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 626-32.
- (40) de Moura JC, Tirapeli DPC, Neder L, et al. Amygdala gene expression of NMDA and GABA_A receptors in patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 2010 Sep 16 [Epub ahead of print].
- (41) Pole P. Electrophysiology of benzodiazepine receptor ligands: multiple mechanisms and sites of action. *Prog Neurobiol* 1988;31:349-423.
- (42) Mulley JC, Scheffer IE, Harkin LA, et al. Susceptibility genes for complex epilepsy. *Hum Mol Gen* 2005; 14: R243- R249.

- (43) Volk HA, Arabadzisz D, Fritschy JM, *et al.* Anti epileptic drug- resistant rats differ from drug responsive rats in hippocampal neurodegeneration and GABA(A) receptor ligand binding in a model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis.* 2006 Mar;21(3):633-46.
- (44) Rogawski MA, Löscher W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci* 2004;5:553-564.
- (45) Bethmann K, Fritschy JM, Brandt C, Löscher W. Antiepileptic drug resistant rats differ from drug responsive rats in GABA-A receptor subunit expression in a model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 2008; 31: 169-87.
- (46) Tan NCK, Heron SE, Scheffer IE, *et al.* Is variation in the GABA(B) receptor 1 gene associated with temporal lobe epilepsy? *Epilepsia* 2005; 46(5) : 778-780.
- (47) Sisodiya SM, Lin WR, Harding BW ,*et al.* Drug resistance in epilepsy : expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy. *Brain* 2002; 125: 22-31.
- (48) Elger CE. Pharmacoresistance : modern concept and basic data derived from human brain tissue . *Epilepsia* 2003;44(suppl 5): 9-15.
- (49) Efferth T, Volm M. Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. *Pharm Ther* 2005; 107:155:176.
- (50) Schmidt D. e Löscher W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiology and clinical mechanisms. *Epilepsia.* 2005;46(6): 858-877.
- (51) Cordon- Cardo C, O'Brian JP, Casals D, *et al.* Multidrug resistance gene(P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:695-698.
- (52) Seegers V, Potschka H, Löscher W. Transient increase of P-glycoprotein expression in endothelium and parenchyma of limbic brain regions in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Epil Res* 2002; 51:257-268
- (53) Sisodiya SM . Malformations of cortical development :burdens and insights from important causes of human epilepsy. *Lancet Neurol* 2004; 3:29-38.
- (54) Seegers V, Potschka H, Löscher W. Transient increase of P-glycoprotein expression in endothelium and parenchyma of limbic brain regions in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Epil Res* 2002; 51:257-268.
- (55) Tischler DM, Weinberg K, Hinton DR ,*et al.* MDR1 gene expression in brain of patient with medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 1995; 36:1-6.

- (56) Löscher W, Potschka H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci.* 2005a;6(8): 591-602.
- (57) Löscher W, Potschka H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog Neurobiol.* 2005b; 76(1): 22-76.
- (58) Baltes S, Gastens AM, Fedrowitz M, Potschka H, Kaever V, Löscher W. Differences in the transport of the antiepileptic drugs phenytoin, levetiracetam and carbamazepine by human and mouse P-glycoprotein. *Neuropharmacology.* 2007; 52(2): 333-46.
- (59) Robey RW, Lazarowski A, Bates SE. P-glycoprotein e a clinical target in drug-refractory epilepsy? *Mol. Pharmacol.* 2008; 73: 1343-1346.
- (60) Schmidt D, Löscher W. New developments in antiepileptic drug resistance: an integrative view. *Epilepsy Curr.* 2009; 9(2): 47-52
- (61) Tate SK, Sisodiya SM. Multidrug resistance in epilepsy: a pharmacogenomic update. *Expert Opin Pharmacother* 2007; 8:1441-1449.
- (62) Mulley JC, Scheffer IE, Harkin LA, et al. Susceptibility genes for complex epilepsy. *Hum Mol Gen* 2005; 14: R243- R249.
- (63) Sugawara T, Tsurubuchi Y, Fujiwara T, Mazaki-Miyazaki E, et al. Nav1.1 channels with mutations of severe myoclonic epilepsy in infancy display attenuated currents. *Epilepsy Res.* 2003 May;54(2-3):201-7.
- (64) Launova L, Klugbauer N. Modulation of gating currents of the Ca(v) 3.1 calcium channel by alpha 2 delta 2 and gama 5 subunits .*Arch Biochem Biophys* 2004;425:207-213.
- (65) Siddiqui A, Kerb R, Weale ME ,et al. Association of multidrug resistance in epilepsy with polymorphism in the drug transporter gene ABCB1. *N Engl J Med* 2003; 348: 1442-1448.
- (66) Dombrowski SM, Desai SY, Marroni M, et al. Overexpression of multiple resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy. *Epilepsia* 2001;42(12): 1501-1506.
- (67) Tan NC, Heron SE, Scheffer IE., et al. Failure to confirm association of a polymorphism in ABCB1 multidrug resistant epilepsy. *Neurology* 2004; 63:1090-1092.
- (68) Sills GJ, Molanraj R, Butler E, et al. Lack of association between the C3435T polymorphism in the human multidrug resistance (MDR1) gene and response to antiepileptic drug treatment. *Epilepsia* 2005;46(5): 643-647.

- (69) Bournissen FG, Moretti ME, Juurlink DN, Koren G, et al. Polymorphism of the MDR1/ABCB1 C3435T drug-transporter and resistance to anticonvulsant drugs: A meta-analysis. *Epilepsia*, 2009; 50(4): 898–903.
- (70) Ufer M, Mosyagin I, Muhle H, Jacobsen T, Haenisch S, Häslér R, et al. Non-response to antiepileptic pharmacotherapy is associated with the ABCC2 – 24C > T polymorphism in young and adult patients with epilepsy. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2009; 19(5): 353-62.
- (71) Laechelt S, Turrini E, Ruehmkorf A, Siegmund W, Cascorbi I, Haenisch S. Impact of ABCC2 haplotypes on transcriptional and posttranscriptional gene regulation and function. *Pharmacogenomics Journal*. 2010; 1-10.
- (72) Tate SK, Depondt C, Sisodiya SM, Cavalleri GL, et al. Genetic predictors of the maximum doses patients receive during clinical use of the anti-epileptic drugs carbamazepine and phenytoin. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102(15): 5507-12.
- (73) Vallada Jr Hp , Barbosa NR. Farmacogenética : implicações no tratamento com drogas antiepilépticas e interações medicamentosas. In Tratamento medicamentoso das epilepsias cap.3 Ed. Lemos 2ª. Edição.
- (74) Briellmann RS, Jackson GD, Pell GS et al. Structural abnormalities remote from the seizure focus: a study using T2 relaxometry at 3T. *Neurology* 2004; 63(12): 2303-2308.
- (75) Nadler JV. The recurrent mossy fiber pathway of the epileptic brain. *Neurochem Res*. 2003; 28: 1649-1658.
- (76) Sutula T, Cascino G, Cavazos J et al. Mossy fiber synaptic organization in epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol* 1989; 26: 321 – 330.
- (77) Wiebe S. Epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Can J Neurol Sci*. 2000; 27(Suppl 1): S6–10.
- (78) Cendes F, Kobayashi E. Epilepsia de lobo temporal. In: Guerreiro CAM, Guerreiro MM, Cendes F, Lopes-Cendes I, editors. *Epilepsia*. Lemos Editorial, São Paulo, Brasil, 2000: 201 – 213.
- (79) Penfield W, Jasper H. *Epilepsy and fuctional anatomy of the human brain*. Boston: Little, Brown, 1954.
- (80) Cendes F. The use of proton MR spectroscopic imaging and MRI volumetric measurements in the clinical evaluation of partial epilepsies [Tese – Doutorado]. Motreal, Quebec, Canada: Department of Neurology and Neurosurgery, McGill University; 1996.

- (81) Victor M, Ropper AH. Epilepsy and other seizure disorders. In: Victor M, Ropper AH, eds. *Adams and Victor's Principles of Neurology*, 7th ed. McGraw-Hill, 2001; 16: 331 – 365.
- (82) Gloor P, Olivier A, Quesney LF. The role of the limbic system in experimental phenomena of temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 1982; 12: 129 – 144.
- (83) Gupta AK, Jeavons PM, Hughes RC, Covanis A. Aura in temporal lobe epilepsy: clinical and electroencephalographic correlation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1983; 46: 1079 – 1083.
- (84) Bancaud J. Clinical presentation of temporal epileptic seizures. *Rev Neurol Paris* 1987; 143: 392 – 400.
- (85) French JA, Williamson PD, Thadani VM, Darcey TM, Mattson RH, Spencer SS, Spencer DD. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. results of history and physical examination. *Ann Neurol* 1993; 34: 774 – 780.
- (86) Joo EY, Hong SB, Lee EK, Tae WS, Kim JH, Seo DW et al. Regional cerebral hyperperfusion with ictal dystonic posturing: ictal-interictal SPECT subtraction. *Epilepsia*. 2004 Jun;45(6):686-9.
- (87) Abou-Khalil B, Andermann E, Andermann F, Olivier A, Quesney LF. Temporal lobe epilepsy after prolonged febrile convulsions: excellent outcome after surgical treatment. *Epilepsia* 1993; 34: 878 – 883.
- (88) Ogden-Epker M, Cullum CM. Quantitative and qualitative interpretation of neuropsychological data and assessment of temporal lobectomy candidates. *Clin Neuropsychol* 2001; 15(2): 183 – 195.
- (89) Giovagnoli AR, Avanzini G. Quality of life and memory performance in patients with temporal lobe epilepsy. *Acta Neurol Scand* 2000; 101(5): 295 – 300.
- (90) Cascino GD. Use of routine and video electroencephalography. *Neurol Clin* 2001; 19: 271 – 287.
- (91) Gloor P, Olivier A, Quesney LF. The role of the limbic system in experimental phenomena of temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 1982; 12: 129 – 144.
- (92) Quesney LF. Clinical and EEG features of complex partial seizures of temporal origin. *Epilepsia* 1986; 27: S27 – S45.
- (93) Trescher WH, Lesser RP. The epilepsies. In: Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM, Jancovic J, eds. *Neurology in Clinical Practice*, 4th ed. Philadelphia: Elsevier, 2004; 17: 1953 – 1992.

- (94) Margerison JH, Corsellis JAN. Epilepsy and temporal lobes: a clinical, electrographic and neuropathological study of the brain in epilepsy , with particular reference to temporal lobes. *Brain* 1966; 89: 430 – 499.
- (95) Engel J, Jr., Williamson PD, Wieser HG. Mesial Temporal Lobe Epilepsy with Hippocampal Sclerosis. In: Engel J, Jr., Pedley TA, eds. *EPILEPSY – A Comprehensive Textbook*, second ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 2008: 2479-2494.
- (96) Velasco TR, Zanello PA, Dalmagro CL, Araújo D jr, Santos AC, Bianchin MM et al. Calcified cysticercotic lesions and intractable epilepsy: a cross sectional study of 512 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77: 485 – 488.
- (97) Bianchin MM, Velasco TR, Wichert-Ana L, Takayanagui OM, Leite JP, Sakamoto AC. How frequent is the association of neurocysticercosis and mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis? *Epilepsia*. 2010 Nov;51(11):2359-60.
- (98) Kobayashi E, Guerreiro CAM, Cendes F. Late onset temporal lobe epilepsy with MRI evidence of mesial temporal sclerosis following acute neurocysticercosis. *Arq Neuropsiquiatr* 2001; 59(2-A): 255 – 258.
- (99) Singla M, Singh P, Kaushal S, Bansal R, Singh G. Hippocampal sclerosis in association qith neurocysticercosis. *Epiletic Disord* 2007; 9(3): 292 – 299.
- (100) Vezzani A, Peltola J, Janigro D. Inflammation. In: *Epilepsy, a Comprehensive Textbook*, 2nd ed. Engel J Jr, Pedley TA, eds. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins 2008; 25: 570 – 592.
- (101) Ravizza T, Gagliardi B, Noé F, Boer K, Aronica E, Vezzani A. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*. 2008 Jan;29(1):142-60.
- (102) Stephen LJ, Kwan P, Brodie MJ. Does the cause of localization-related epilepsy influence the response to antiepileptic drug treatment? *Epilepsia* 2001 Mar; 42(3): 357-362.
- (103) Sillanpaa M. Remission of seizures and predictors of intractability in long term follow-up. *Epilepsia* 1993; 34: 930 – 936.
- (104) Perucca E, French J, Bialer M. Development of new antiepileptic drugs: challenges, incentives, and recent advances. *Lancet Neurol* 2007; 6: 793-804.
- (105) Culebras A. Trephination of the skull in pre-Columbian culture. *J Hist Neurosci* 1993; 3: 11-12.
- (106) Bacon F. Report of BMA meeting, Cambridge 1880. *J Ment Sci* 1881; 26: 470.
- (107) Boca P. Sur la topographie cranio-cerebrale. *Rev d'Anthropol* 1876: 244-248.

- (108) Falconer MAF. Clinical manifestations of temporal lobe epilepsy and their recognition to surgical treatment. *BMJ* 1954; 2: 939 – 944.
- (109) Bailey P, Gibbs FA. The surgical treatment of psychomotor epilepsy. *JAMA* 1951; 145: 365 – 370.
- (110) Spencer SS. When should temporal-lobe epilepsy be treated surgically? *Lancet Neurol* 2002; 1: 375 – 382.
- (111) Engel J, Jr. Surgery for seizures. *N Engl J Med* 1996 Mar 7; 334(10): 647 – 652
- (112) Engel J, Jr. Wiebe S, French J, Sperling M, Williamson P, Spencer D et al. Practice parameter : temporal lobe and localized neocortical resections for epilepsy. *Epilepsia* 2003; 44(6): 741 – 751.
- (113) Li ML, Fish DR, Sisodiya SM, et al. High resolution magnetic resonance imaging in adults with partial or secondary generalized epilepsy attending a tertiary referral unit. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995; 59(4): 384-387.
- (114) Duncan JS, Sander JW, Sisodiya SM, Walker MC. Adult epilepsy. *Lancet*. 2006;367(9516): 1087-100.
- (115) Koepp MJ, Woermann FG. Imaging structure and function in refractory focal epilepsy. *Lancet Neurol* 2005; 4:42-53.
- (116) Commission on Neuroimaging of the International League Against Epilepsy. Guidelines for neuroimaging evaluation of patients with uncontrolled epilepsy considered for surgery. *Epilepsia* 1998; 39: 1375 – 1376.
- (117) Commission on Neuroimaging of the International League Against Epilepsy. Recommendations for neuroimaging of patients with epilepsy. *Epilepsia* 1997; 38: 1255 – 1256.
- (118) Stephen LJ, Kwan P, Brodie MJ. Does the cause of localization- related epilepsy influence the response to antiepileptic drug treatment? *Epilepsia* 2001; 42(3):357-362.
- (119) Coan AC, Kobayashi E, Li ML, Cendes F. Quantification of hippocampal signal intensity in patients with mesial temporal lobe epilepsy . *Journal Neuroimag* 2003; 13: 228-233.
- (120) Knake S, Triantafyllou C, Wald LL, et al. 3T Phased array MRI improves the presurgical evaluation in focal epilepsies. *Neurology* 2005; 65: 1026-1031.
- (121) Ashburner J, Friston KJ. Voxel-based morphometry—the methods. *Neuroimage* 2000, 11:805–821.

- (122) Wiest R, Kassubek J, Schindler K, et al. Comparing voxel-based 3-D MRI analysis and subtraction ictal SPECT coregistered to MRI in focal epilepsy. *Epil Res* 2005;65:125-133.
- (123) Santos SLM, Ghizoni E, Li LM, Cendes F. Dynamic assessment of high-resolution MRI with multiplanar reconstruction increases the yield of lesion detection in patients with partial epilepsy. *J Epilepsy Clin Neurophysiol* 2005; 11(3): 111-116.
- (124) Woermann FG, Free SL, Koepp MJ, Ashburner J, Duncan JS. Voxel-by-voxel comparison of automatically segmented cerebral gray matter--A rate independent comparison of structural MRI in patients with epilepsy. *Neuroimage* 1999 Oct;10(4):373-384.
- (125) Pell GS, Briellmann RS, Waites AB, et al. Voxel-based relaxometry : a new approach for analysis of T2 relaxometry changes in epilepsy. *Neuroimage* 2004; 21:707-713.
- (126) Cendes F, Leproux F, Melanson D, Ethier R, Evans A, Peters T, Andermann F. MRI of amygdala and hippocampus in temporal lobe epilepsy. *J Comp Assisted Tomography* 1993; 17: 206 – 210.
- (127) Jack CR, Sharbrough FW, Twomey CK, Cascino GD, Hirschorn KA, Marsh WR, Zinsmeister AR, Scheithauer B. Temporal lobe seizures: lateralization with MR volume measurements of the hippocampal formation. *Radiology* 1990; 175: 423 – 429.
- (128) Cascino GD, Jack CR, Parisi JE, Sharbrough FW, Hirschorn KA, Meyer FB, Marsh WR, O'Brien PC. Magnetic resonance imaging-based volume studies in temporal lobe epilepsy: pathological correlations. *Ann Neurol*. 1991; 30(1):31-6.
- (129) Lencz T, McCarthy G, Bronen R, Inserni J, Kim JH, Spencer DD. Hippocampus in temporal lobe epilepsy: correlation of presurgical MRI volumetrics with postsurgical cell counts. *Epilepsia* 1990; 31: 667 – 668.
- (130) Pruessner JC, Li LM, Serles W, Pruessner M, Collins DL, Kabani N, et al. Volumetry of hippocampus and amygdala with high resolution MRI and three-dimensional analysis software: minimizing the discrepancies between laboratories. *Cereb Cortex* 2000; 10: 433 – 442.
- (131) Bonilha L, Kobayashi E, Cendes F, Min LL. Protocol for volumetric segmentation of medial temporal structures using high-resolution 3-D magnetic resonance imaging. *Hum Brain Mapp* 2004 Jun;22(2):145-154.
- (132) Pruessner JC, Li LM, Serles W, Pruessner M, Collins DL, Kabani N, et al. Volumetry of hippocampus and amygdala with high-resolution MRI and three-dimensional analysis software: minimizing the discrepancies between laboratories. *Cereb Cortex* 2000 Apr;10(4):433-442.

- (133) Salmenperä TM, Symms MR, Rugg-Gunn FJ, Boulby PA, Free SL, Barker GJ, et al. Evaluation of quantitative magnetic resonance imaging contrast in MRI-negative refractory focal epilepsy. *Epilepsia* 2007; 48(2): 229 - 237.
- (134) Keller SS, Roberts N. Voxel-based morphometry of Temporal Lobe Epilepsy: an introduction and review of literature. *Epilepsia* 2008, 49(5):741–757.
- (135) Bernasconi N, Duchesne S, Janke A, et al . Whole-brain voxel-based statistical analysis of gray matter and white matter in temporal lobe epilepsy. *NeuroImage* 2004; 23:717-723.
- (136) Good CD, Johnsrude IS, Ashburner J, Henson RN, Friston KJ, Frackowiak RS. A voxel-based morphometric study of ageing in 465 normal adult human brains. *Neuroimage* 2001 Jul;14(1 Pt 1):21-36.
- (151) Keller SS, Wieshmann UC, Mackay CE, Denby CE, Webb J, Roberts N. Voxel based morphometry of grey matter abnormalities in patients with medically intractable temporal lobe epilepsy: effects of side of seizure onset and epilepsy duration.
- (137) Varoglu AO, Saygi S, Acemoglu H, Ciger A. Prognosis of patients with mesial temporal lobe epilepsy due to hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res* 2009; 85(2 - 3): 206 - 211.
- (138) Sillanpää M, Schmidt D. Delayed time to first remission identifies poor long-term drug response of child hood-onset epilepsy: a prospective population-based study. *Epilepsy Behav* 2009; 16(3): 507 - 511.
- (139) Collins DL, Neelin P, Peters TM, Evans AC. Automatic 3D intersubject registration of MR volumetric data in standardized Talairach space. *J Comput Assist Tomogr* 1994 Mar;18(2):192-205.
- (140) Sled JG, Zijdenbos AP, Evans AC. A nonparametric method for automatic correction of intensity nonuniformity in MRI data. *IEEE Trans Med Imaging* 1998 Feb;17(1):87-97.
- (141) Rorden C, Brett M. Stereotaxic display of brain lesions. *Behav. Neurol.* 2000; 12: 191-200.
- (142) Ashburner J, Friston KJ. Unified segmentation. *Neuroimage* 2005; 26(3): 839-851.
- (143) Genovese CR, Lazar NA, Nichols T. Thresholding of statistical maps in functional neuroimaging using false discovery rate. *Neuroimage* 2002; 15:870-878.

- (144) Korotkov A, Radovanovic S, Ljubisavljevic M, et al. Comparison of brain activation after sustained non-fatiguing and fatiguing muscle contraction: a positron emission tomography study. *Exp. Brain Res.* 2005; 163:65-74.
- (145) Brodie MJ. Response to drug therapy: winners and losers. *Epilepsia* 2005 ;46(suppl 10):31-32.
- (146) Sillanpää M, Schmidt D. Natural history of treated childhood onset epilepsy: prospective, long term population based study. *Brain* 2006; 129:617-624.
- (147) Schmidt D, Löscher W. New developments in antiepileptic drug resistance: an integrative view. *Epilepsy Curr* 2009; 9(2):47-52.
- (148) Kumlien E, Doss RC, Gates JR. Treatment outcome in patients with mesial temporal sclerosis. *Seizure* 2002; 11:413-417.
- (149) Hitiris N, Mohanraj R, Norrie J, Sills GJ, Brodie MJ. Predictors of pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsy Res* 2007; 75:192-196.
- (150) Labate A, Cerasa A, Aguglia U, et al. Voxel-based morphometry of sporadic epileptic patients with mesiotemporal sclerosis. *Epilepsia.* 2010 Apr; 51(4): 506-510.
- (151) Wieser, HG. ILAE Commission on neurosurgery of epilepsy. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia* 2004; 45(6):695-714.
- (152) Riederer F, Lanzenberger R, Kaya M, et al. Network atrophy in temporal lobe epilepsy: a voxel-based morphometry study. *Neurology* 2008 ;71(6):419-425.
- (153) Mueller SG, Laxer KD, Cashdollar N, et al. Voxel-based Optimized Morphometry (VBM) of gray and white matter in Temporal Lobe Epilepsy (TLE) with and without mesial temporal sclerosis. *Epilepsia* 2006; 47(5):900-907.
- (154) Van Paesschen W, Dupont P, Van Driel H, et al. SPECT perfusion changes during complex partial seizures in patients with hippocampal sclerosis. *Brain* 2003, 126:1103–1111.
- (155) Bertashius KM. Propagation of human complex-partial seizures: a correlation analysis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1991; 78:333-340.
- (156) Lomelin D, Jorgenson E, Risch N. Human genetic variation recognizes functional elements in noncoding sequence. *Genome Res.* 2010; 20(3): 311-9.

.

ANEXOS:

Anexo. Artigo submetido à publicação como parte da tese de doutorado da aluna Mariana Saragiotto Silva.

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in drug-metabolism and drug transporter genes associated with susceptibility to pharmacoresistance in mesial temporal lobe epilepsy.

Mariana S. Silva¹, Rodrigo Secolin¹, Elizabeth Bilevicius², Renato O. Santos¹,
Claudia Maurer-Morelli¹, Fernando Cendes², Iscia Lopes-Cendes¹

1. Department of Medical Genetics; 2. Department of Neurology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

Correspondence to: Iscia Lopes-Cendes, M.D, Ph.D
Department of Medical Genetics
Tessália Vieira de Camargo, 126.
Cidade Universitária Zeferino Vaz
Distrito de Barão Geraldo, Campinas, SP
BRAZIL- 13084-971
[Tel:+55](tel:+551935218909) 19 3521 8909
FAX: +55 19 3289 1818
Email:icendes@unicamp.br

ABSTRACT

Mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) is associated with a significant proportion of patients who do not respond to treatment with antiepileptic drugs (AEDs). One hypothesis to explain individual differences in drug response is the presence of allelic variations in candidate genes which could be responsible for decreased efficacy of antiepileptic drugs. The purpose of this study was to investigate whether single nucleotide polymorphisms (SNPs) on drug-transporter and drug-metabolism genes could be associated with pharmacoresistance in a large group of patients with MTLE. We genotyped 35 dbSNPs within 2 different drug-transporter genes (*ABCB1*, *ABCC2*) and 95 dbSNPs within 9 drug-metabolism genes (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*). We ascertained 164 drug-resistant and 78 drug-responsive patients, who were seizure free on AEDs. The significance of allelic and genotypic association was assessed using logistic regression (*logistf* function in R environment). P-values were corrected by Bonferroni. As a genomic control we genotyped an additional 119 SNPs. Fst and AMOVA (*Arlequin* v.3.11) were performed in order to analyze the genetic structure of both groups. In addition, we quantified the expression of *ABCC2* transcripts (using Real-Time PCR, ABI7500, *TaqMan system*TM) in hippocampal tissue collected during epilepsy surgery in 11 patients with refractory MTLE. We found a significant association for allele rs3740066C (Ile1324Ile) in the *ABCC2* gene, which was more frequent in the pharmacoresistant group (p=0.04). In addition, we found that expression of *ABCC2* was higher in patients with refractory MTLE when compared to autopsy controls (ANOVA, p=0.0170). In addition, we found significant associations with 4 intronic SNPs in 3 drug

metabolism genes: *CYP1B1*: rs2551188TT (p=0.02); *CYP2C9*: rs4086116CT (p=0.005) and rs2153628AA (p=0.02), and *CYP1A2*: rs12904742GG (p=0.005). We calculated that the overall contribution of the 4 associated genes to the phenotype of pharmacoresistance was around 12%. In addition we found that hippocampal atrophy is significantly more frequent in the AED-pharmacoresistant group and that its contribution towards pharmacoresistance was about 9%. We found evidence that multiple genetic factors are involved in determining pharmacoresistance in patients with MTLE, thus confirming the polygenic and multifactorial nature of the trait.

BACKGROUND

Epilepsy is one of the most common neurological diseases affecting about 50 million people in the world (Duncan *et al.*, 2006). Mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) is the more frequent form of partial epilepsy, and it is associated with a high proportion of patients who do not respond to clinical treatment with antiepileptic drugs (AEDs) (Sillanpää & Schmidt, 2006). In addition, these patients often present a high frequency of adverse effects and a large variation in the therapeutic doses AEDs used. Several causative factors have been related to drug refractoriness, including genetic and environmental influences. Among the genetic causes are polymorphisms in genes encoding proteins involved in transport and metabolism of drugs. Allelic variations in these genes may be responsible for acting and inefficient drug metabolism, leading to refractoriness in drug treatment. There are evidences that single nucleotide polymorphisms (SNPs) may be important in this process, because they may be responsible for changes in amino acid sequence of the encoded protein, or affect gene regulation, processing and translation of messenger RNA, thus altering the expression and / or activity of proteins encoded by their genes (Wang and Sadée, 2006). It was seen that drug efflux transporters of the adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC) family, such as the drug transporter P-glycoprotein (P-gp ou ABCB1) and MRP2 (*ABCC2*) are overexpressed in refractory patients (Schmidt & Löscher, 2005). These proteins are located in the apical (luminal) membrane of brain capillary endothelial cells, constituents of the BBB (blood-brain barrier), and it is function to export drugs back into the blood (Begley, 2004). And, studies using rat model, indicate that AEDs, including phenytoin (PHT), carbamazepine (CBZ) and lamotrigine, are

substrates for P-gp and/or MRPs in the BBB (Löscher & Potschka, 2005a,; Löscher & Potschka, 2005b, Baltes, 2007, Robey *et al.*, 2008; Schmidt & Löscher, 2009). In this context, the overexpression of these proteins lead to a reduced local bioavailability of AES at their target tissue, contributing to the pharmacoresistance in refractory patients (Sisodiya, 2003). One of the genetic hypothesis is the association between the synonymous SNP 3435C>T (rs1045642) in *ABCB1* gene and drug-resistant phenotype (Soranzo *et al.*, 2004; Zimprich 2004). The homozygous refractory patients for allele C believed to be associated with higher expression and activity of P-gp (Cascorbi, 2006), although recent studies explain that the polymorphism 3435C>T slows the translational processing and protein folding without affecting P-gp expression levels (Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2007; Hung *et al.*, 2008). However, there are many controversial results in literature that reported a lack of association between polymorphisms in *ABCB1* gene and the response to AEDs (Kim *et al.*, 2006a; Tan *et al.*, 2004, Bournissen *et al.*, 2009). Besides P-gp (MDR1), the MRPs also could be related to pharmacoresistance in patients with refractory epilepsy, because studies have showed an increase in expression in epileptogenic brain tissue of refractory patients (Kwan and Brodie, 2005; Löscher and Potschka, 2005b; Dallas *et al.*, 2006, Lazarowski *et al.*, 2007). The MRP family (ABC family C) contains 13 members, of which 9 have capacity for drug transport, including MRP2 (Dallas *et al.*, 2006). Furthermore, results of association study with polymorphisms in *ABCC2* gene reported that the polymorphism -24C>T (rs717620) is significantly associated with pharmacoresistance in epilepsy (Ufer *et al.*, 2009). In this context, Laechelt *et al.*, (2010) show an association with *ABCC2* haplotype (CAC) of the SNPs -24C>T (rs717620), 1249G>A (rs2273697) and 3972C>T (rs3740066),

respectively and significantly increased of protein expression compared with wild type CGC, in healthy Caucasian volunteers.

Polymorphisms of CYP450 complex genes may also result in changes in the metabolism of antiepileptic drugs, leading to treatment resistance or adverse effects (Tanaka, 1999). Others studies showed that *CYP2C9* variant allele carriers require lower doses of phenytoin and have increased risk of intoxications (Van der Weide *et al.*, 2001; Ninomiya *et al.*, 2000).

The MTLE is a recognized clinical syndrome of major importance for its high incidence and to be refractory to medical treatment in a large proportion of patients. Although there are several theories for the drug refractory in MTLE, and that genetic factors may determine susceptibility to drug treatment, there are many conflicting results in the literature on the relationship between drug refractory MTLE and genes responsible for transport, metabolism and targets of AEDs. Accordingly, they have great importance in biologic processes such as the permanency of drug in the brain, mechanism of action and biotransformation of AEDs. Thus, any alterations in the genes coding for proteins/enzymes involved in this process can have a direct relationship with the individual response to drug treatment.

In this way, in the present study we have compared the frequency of 35 SNPs on drug-transporter genes (*ABCB1*, *ABCC2*) and 95 SNPs in drug-metabolism genes (*CYP450*: *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *CYP3A4* and *CYP3A5*) between two groups of ELTM patients: drug-responsive and non-responsive to AEDs. And, through association study was verified if SNPs in candidate genes could be associated with pharmacoresistance in this group of patients.

Patients analyzed in this study belonging to a Brazilian population, which is a highly admixed population, with Amerindian, European and African ancestral roots. The interethnic admixture is a source of population structure that may lead to spurious results in the association studies, and the use of ethnicity for to choose the patients is insufficient to properly control for population stratification (Estrela et al., 2008). To avoid false-positives results, it is necessary to genotype unlinked genetic markers for to know the structure of the both groups studied. Then, we genotyped 119 polymorphisms in both populations (AED-responders and AED-pharmacoresistants) of ELTM patients for to verify the occurrence of non-structuration in these population, to test the hypothesis that the two artificial groups of MTLE patients represent a panmictic population.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

All patients included in this study had the diagnosis of MTLE performed according to the International League Against Epilepsy diagnostic and electroencephalographic criteria (ILAE 1989). The project was approved by local Institutional Ethics Committee from the Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Brazil. The patients were collected in the Epilepsy ambulatory from Clinical Hospital at UNICAMP. All patients were submitted to an extensive investigation based on clinical history, comprehensive neurological examination, interictal EEG and routine visual MRI analysis protocol including T1 and T2 sequences in axial, coronal and sagittal planes. The subjects were interviewed by one of the investigators, who subjected all of them to

semi-structured questionnaire gathering information regarding age and frequency of seizures at epilepsy onset, febrile seizures (FS), time of epilepsy, presence of initial precipitating injuries (IPIs), and number of AED. All patients use antiepileptics drugs of first generation, such as carbamazepine, phenytoin, valproic acid, among others).

Information about presence and average number of seizures per month was also collected by means of a diary filled in by the patient or caregiver.

On the basis of these items the subjects were divided into two patterns of AED-response: 96 AED-responders (47 women) corresponding to all subjects who became seizure-free after the institution of appropriate AED (AED-responders), 164 pharmacoresistants (89 women) for all those who met the criteria of lack of seizure control besides adequate therapy with at least two AED until maximum tolerated doses. But through continuous monitoring of these patients, 18 patients who followed the criteria of AED-responders patients during the study, they have a higher frequency of seizures after blood collection, even with medication, and were excluded from the analysis. Therefore, for the association study were used 164 AED-pharmacoresistants and 78 AED-responders MTLE patients.

All subjects signed a written informed consent form approved by the ethics committee of our institution in accordance with the principles stated in the 1964 Declaration of Helsinki.

SNP selection

For association study

The criteria used for SNP selection were the presence of the marker in the four populations of the Phase II HapMap (CEU, YRI, JPT, CHB) (*International HapMap Consortium*, 2005); had a MAF (minor allele frequency) higher than 5% in HapMap populations; were likely to be functional polymorphisms, preferentially located in exonic regions; were located in different haplotype blocks according to HapMap. On the contrary, if the interest SNP had not been genotyped in HapMap populations, it is necessary to do a SNP validation *in silico*, thus we made BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool Against nucleotide sequences) with the sequence containing the SNP against ESTs and genome in total (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) to confirming the actual existence of both SNP alleles. The SNP is validated when in BLAST results appear sequences containing both alleles, which from different tissues and groups.

For Genomic Control

As the sampling of individuals genotyped, including both groups (AED-responders/AED-pharmacoresistants) belonging to a admixture population (Brazilian population), it is necessary to verify the population structure for both groups in order to verify if the two groups selected for this study, form together, one structured population, allowing comparison between groups, and decreasing the chances of finding false positives in association studies. For this, it was done a genomic control in both groups of this study. We performed genotyping of SNPs present in regions outside of genes of interest, preferably on the same chromosome (Choudhry *et al.*, 2006). For these markers, an additional criterion used was the choice of SNPs with a minimum

distance of 0.3 cM (300 kb), according to Myers S, *et al.*, 2005. To assist in the selection of SNPs was used SNPBrowserTM software, version 4.0 (De La Vega *et al.*, 2006), available at www.allsnps.com.

Genotyping

DNA was isolated from venous blood samples through phenolchlorophorm method (Sambrook, 1989). Part of SNPs (108) were genotyped using Applied Biosystem SNPLEXTM Technology and the others SNPs (22) were carried out using Real Time Genotyping TaqMan systemTM, ABI7500 (Applied Biosystems, Foster City, California, United States). The SNPLEXTM Technology is based on the Oligonucleotide Ligation Assay (OLA) combined with multiplex PCR (De La Vega, *et al*, 2005). This technology allows multiplex genotyping for 48 SNPs simultaneously in a unique sample. The allelic discrimination is performed through capillary electrophoresis analysis using an ABI3730xl DNA Analyser and the data analyzed in GeneMapper 4.0 Software. In Real Time Genotyping TaqMan systemTM is performed the genotyping one SNP for sample.

ABCC2 mRNA quantification

For quantification of the expression of the ABCC2 transcript, brain tissue samples from hippocampus were collected (n=11) from refractory patients who underwent epilepsy surgery. As the control group, were collected 6 hippocampus tissues of healthy individuals through autopsies. Each sample was frozen in liquid nitrogen immediately after neurosurgical resection. Total mRNA was isolated from each specimen using

TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The relative expression of ABCC2 gene was determined by quantitative real-time PCR (Applied Biosystems 7500 real-time PCR system, Foster City, CA, USA) using TaqMan assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). *ABCC2* mRNA expression levels were normalized to 18S rRNA expression and relative expression of ABCC2 gene was calculated by comparative threshold cycle method (Livak and Schmittgen, 2001).

Statistical analysis

We analyzed sex, febrile seizures and hippocampal atrophy distribution between responders and non-responders patients using Fisher's exact test. Onset age distribution between the two groups was evaluated by Students't-test. Both analyses were performed in R environment (R Development Core Team, 2010).

Minor allele frequency (MAF; threshold = 0.05), *Hardy-Weinberg* equilibrium (p value threshold = 0.05) and linkage disequilibrium ($r^2 > 0.8$) were checked using Haploview software (Barret *et al.*, 2005), as SNP quality control (QC). Genotype, allele and genotype interaction association with non-responder phenotype were evaluated by binary logistic regression model using function *logistf* (Heinze and Schemper, 2002) in R environment (R Development Core Team, 2010). All the analyses were adjusted by Bonferroni correction for multiple testing, according the number of SNPs of each gene which pass QC parameters. In addition, a forward stepwise regression analysis was used for estimating the best model fit between the phenotype and SNPs and the other covariates.

In order to evaluate possible differences in genetic variability between the two groups, due to population stratification, we perform a genomic control study using analyze of molecular variance (AMOVA) from ARLEQUIN software (Excoffier & Schneider, 2005). Since approximately 65 to 100 SNPs could be used stratification population studies (Turakulov and Easteal, 2003).

For statistical analyzes of *ABCC2* gene expression, was used the non-parametric test, Mann-Whitney test, p-unilateral. The p value was considered significance at α of 5%. Statistical analysis for quantification was carried out with BioEstat 3.0 program (Ayres *et al.* 2003).

RESULTS

The population study consisted of 164 AED-pharmacoresistants and 78 AED-responders ELTM patients, in total of 242 unrelated ELTM patients. The results of SNP selection for genomic control are in Supplemental Data, Table1. And the Figure 1 represents the SNP localization on each chromosome containing all target genes.

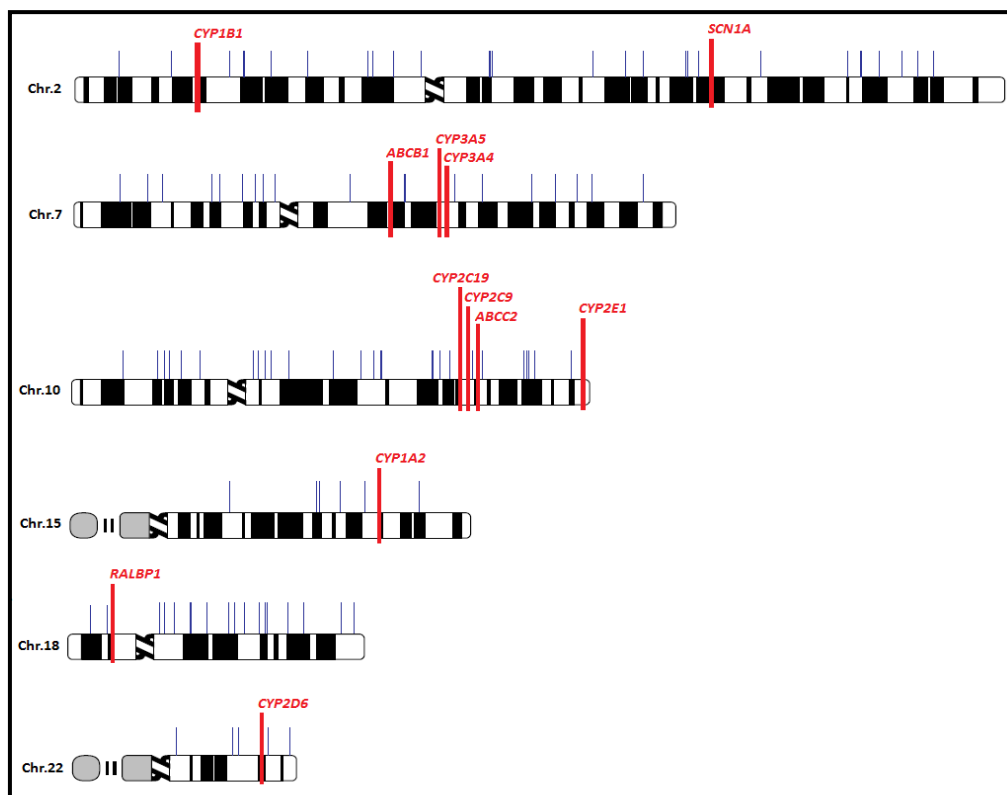


Figure 1. Distribution of 119 SNPs of genomic control in six chromosomes containing all target genes.

The results of genomic control showed an average F_{st} of 0.00555 for all SNPs. The AMOVA test showed that the genetic variability between the groups was 0.56% and consequent variability within each study group is 99.44%, which indicates high variability in each population, but little difference between them (data are shown in Table 1). Thus, the evidence is that the populations studied in this work are not admixture populations and can be compared in an association study.

Table 1. Analysis of molecular variance (AMOVA).

Source of variation	SDD	CDV	Genetic variability (%)
Between populations	31,604	0,12028	0,56
Within populations	7583,94	21,5476	99,44
Total	7615,55	21,6679	100

SDD = sum of squared deviations ; CDV = components of variance.

The comparisons regarding duration of epilepsy, FS and time of epilepsy revealed no difference among groups (Table 2). Mean age was significantly lower in pharmacoresistants compared with AED-responders. The number of AEDs used was lower in AED-responders. The AED-responders group showed the lowest initial frequency of seizures and pharmacoresistants the highest. Among the AED-pharmacoresistants the incidence of hippocampal atrophy was significantly higher (Table 2).

Table 2. Data of ELTM patients for both groups analysed.

patients	Hippocampal Atrophy	Sex (women)	Age $\pm$ SD (y)	DE $\pm$ SD (y)	FS (N)	AEO $\pm$ SD (y)	AED (n)	IFS $\pm$ SD (events/mo)
responders	52 (66.67%)	47(60.20%)	47.03 $\pm$ 10.97	26.14 $\pm$ 14.96	14	14.04 $\pm$ 10.26	0.95 $\pm$ 0.70	10.57 $\pm$ 18.65
resistants	149 (90.85%)	89(54.27%)	41.68 $\pm$ 9.11	29.91 $\pm$ 11.94	24	12.05 $\pm$ 8.35	1.82 $\pm$ 0.65	16.68 $\pm$ 26.95
p	6,80E-06	0,4079	0.005	0.24	0,99	0,14	<0.005	0.02

SD: Standard deviation; DE: duration of epilepsy; AEO: Age at epilepsy onset; FS:

Febrile seizure; IFS: Initial frequency of seizures; y: years; N: number of patients; n:

number of AEDs; mo: month. Age and IFS: ANOVA; AED: qui-square; DE: ANOVA; Sex, FS, hippocampal atrophy: Fisher's exact test; AEO: Students't-test.

SNP average genotype call rate was 92% and average genotyping success rate of sample patients was 93%. A total of 121 SNPs were genotyped, of this, 53 SNPs (121:53), were not in de *Hardy-Weinberg* equilibrium and/or had a MAF less than 5%, being *ABCB1* (9:5), *ABCC2* (26:11), *CYP1A1* (8:3), *CYP1A2* (6:4), *CYP1B1* (10:4), *CYP2C9* (17:7), *CYP2C19* (16:9), *CYP2D6* (2:1), *CYP2E1* (12:2), *CYP3A4* (8:3) and *CYP3A5* (7:4). Beyond 53 SNPs, 8 SNPs were excluded due to present $r^2 > 0.8$, indicating linkage disequilibrium (see Supplemental Data, Table 2). A total of 60 SNPs were remained for further analysis. The data of allelic and genotypic frequencies for each SNP included are in Supplemental Data, Table 3.

The linkage disequilibrium (LD) structure of this population for each loci studied is shown in Figure 2. The LD matrix showed high pairwise LD all SNPs used for association studies are in linkage equilibrium ($r^2 < 0.8$) (Figure 2).

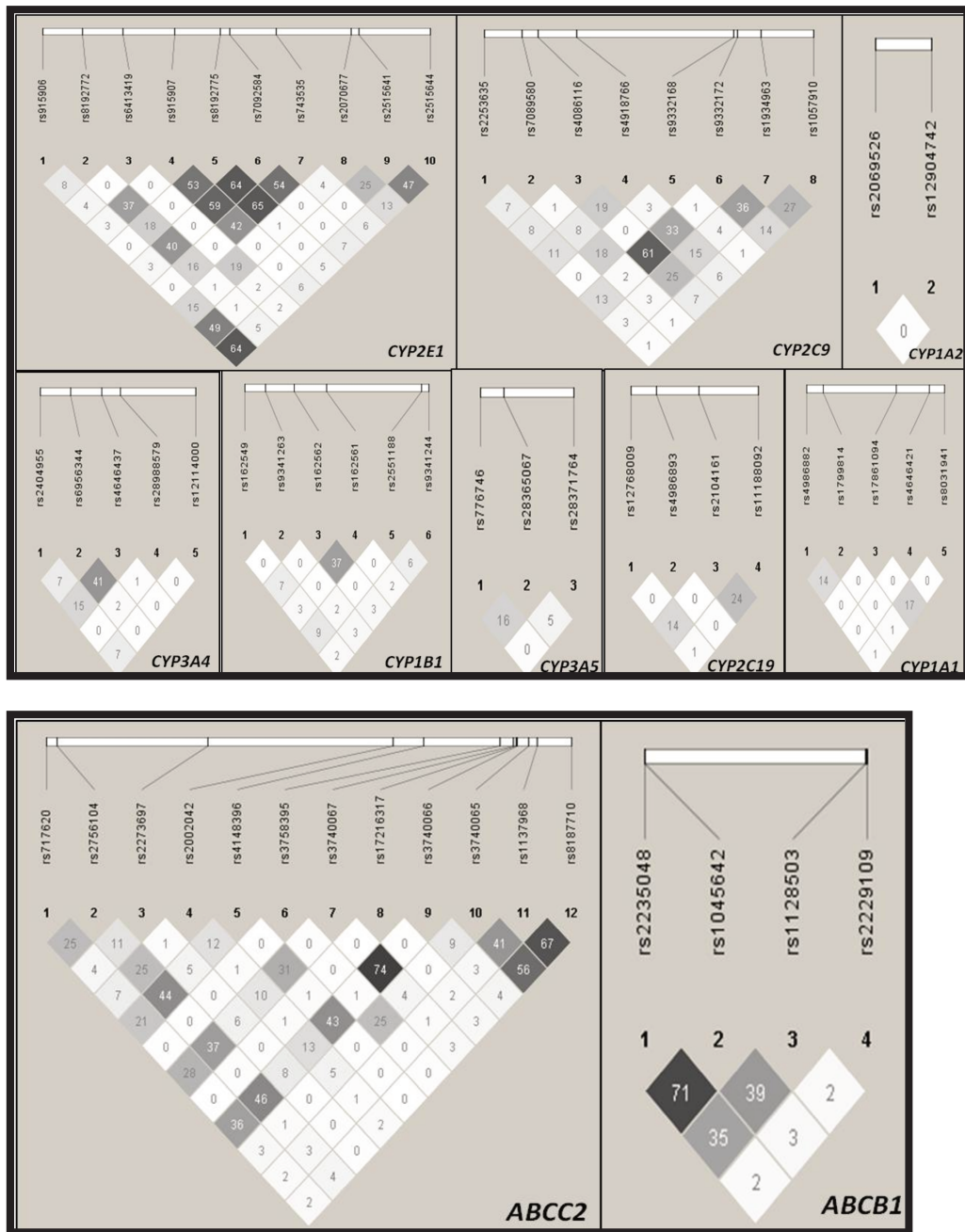


Figure 2. Examination of the pattern of haplotype blocks per gene in the population studied

- The number in square indicates the value of r^2 between SNPs. The colors of squares follow the numbers, being the darkest with r^2 value higher than the more clear.

The frequency of *ABCB1* rs1245642 (3435C>T) genotypes and alleles did not significantly differ between AED-responders and AED-pharmacoresistant, as well as for the other SNPs genotyped in this gene (all data of logistic regression for genotype are in Supplemental Data, Table 4, and logistic regression for alleles are in Supplemental Data, Table 5).

For the *ABCC2* gene, the allele C (rs3740066) was more frequent in AED-pharmacoresistant patients group [$p=0.04$;OR 3.22 (1.44:7.20)] and homozygous carriers of the rs3740066-TT variant genotypic was significantly overrepresented [$p=0.04$;OR 0.31 (0.14:0.69)] among the group of AED-responders patients. And the *ABCC2* mRNA level in surgical tissues of the hippocampus from AED-pharmacoresistants patients (n=11) was significantly higher ($p=0.0352$) if compared with autopsies control (n=6), as shown in Figure 3.

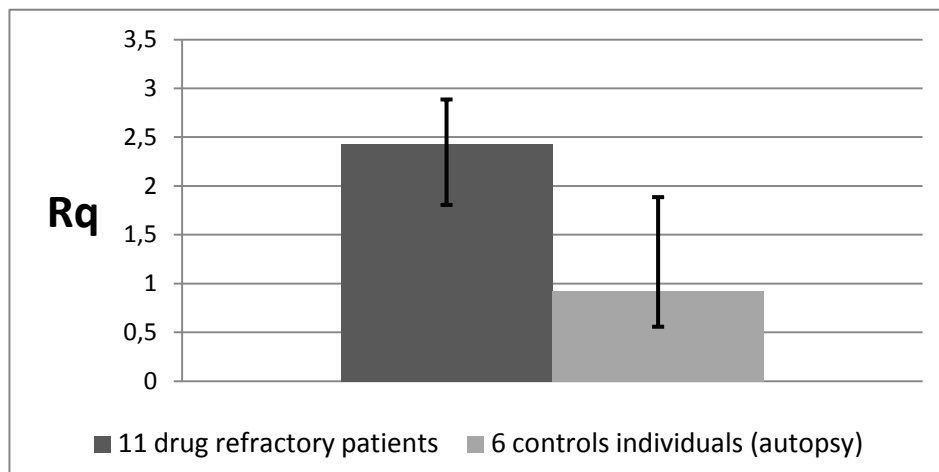


Figure 3. Quantification of *ABCC2* gene in hippocampus of pharmacoresistants patients, from surgeries, and healthy controls from autopsy.

Among CYPgenes, there were significantly associations with the genes: *CYP1B1*, *CYP2C9*, and *CYP1A2* between both patients groups. For the gene *CYP1B1*, the variant genotypic rs2551188-TT was overrepresented in AED-pharmacoresistant patients group [p=0.023; OR 3.81 (1.34:10.82)]. On the other hand, the variant allele C of this same SNP [p=0.023; OR 0.26 (0.09:0.75)] was more frequent in AED-responders. The *CYP1B1/CYP2C9*- rs2551188CC/rs1934963TT haplotype [p=0.03; OR0.32 (0.17:0.59)] was also significantly overrepresented among AED-responders patients, and the *CYP1B1/CYP2C9* - rs2551188CT/rs4086116CT haplotype [p=0.04; OR22.86 (1.26:416.07)] was more frequent among pharmacoresistants patients. The significant results for SNP and interaction associations are showed in Tables 3 and 4 respectively. The results of all interactions were shown in Supplemental Data, Table 6.

Table 3. Significant results of regression logistic for genotypic and allelic associations.

Gene	SNP	Genotypes/ Alleles	AED- responders	AED- pharmacoresistant	β	se(β)	Pvalue		Effect estimation		
			frequency (%)	frequency (%)			nominal	corrected	OR	low 95% IC	High 95% IC
CYP1B1	rs2551188	TT	5,13	15,24	1,3379	0,5325	0,003831	0,02299	3,81	1,34	10,82
		C	3,29	4,65	-1,3379	0,5325	0,00383	0,02299	0,26	0,09	0,75
CYP2C9	rs4086116	CC	84,62	67,07	-1,2098	0,4050	0,000990	0,00891	0,30	0,13	0,66
		CT	7,69	23,17	1,3532	0,4507	0,000673	0,00605	3,87	1,60	9,36
		T	4,93	7,06	1,2098	0,4050	0,00099	0,00891	3,35	1,52	7,42
	rs2153628	AA	50,00	68,90	0,8473	0,2833	0,002589	0,02330	2,33	1,34	4,07
		G	32,05	21,01	-0,8473	0,2833	0,00259	0,02330	0,43	0,25	0,75
CYP2C9	rs1934963	TT	73,08	51,22	-0,9352	0,2982	0,001171	0,01054	0,39	0,22	0,70
		C	46,84	15,62	0,9352	0,2982	0,00117	0,01054	2,55	1,42	4,57
ABCC2	rs3740066	TT	19,23	7,32	-1,1696	0,4102	0,003669	0,04402	0,31	0,14	0,69
		C	12,33	2,23	1,1696	0,4102	0,00367	0,04402	3,22	1,44	7,20
CYP1A2	rs12904742	AG	23,08	9,15	-1,0816	0,3814	0,004119	0,00824	0,34	0,16	0,72
		GG	65,38	84,15	0,9701	0,3214	0,002450	0,00490	2,64	1,40	4,95
		G	41,91	25,65	1,0816	0,3814	0,00412	0,00824	2,95	1,40	6,23

β : regression coefficient; se(β): standard error of regression coefficient ;OR:odds ratio.

The painted cells represent the significative results ($p_{\text{corrected}} < 0.05$).

Table 4. Significant results for SNP interactions.

Genes	SNP interaction	β	se(β)	Pvalue		Effect estimation		
				nominal	corrected	OR	low 95% IC	High 95% IC
CYP1B1:CYP2C9	rs2551188CC : rs1934963TT	-1,1471	0,3164	0,00024	0,03384	0,32	0,17	0,59
CYP1B1:CYP2C9	rs2551188CT : rs4086116CT	3,1293	1,4804	0,00029	0,04082	22,86	1,26	416,07
CYP2C9:CYP1A2	rs2153628AA:rs12904742GG	1,4618	0,4924	0,00033	0,04774	4,31	1,64	11,32

β : regression coefficient; se(β): standard error of regression coefficient ;OR:odds ratio. .

The painted cells represent the significative results ($p_{\text{corrected}} < 0.05$).

The genotypic variants *CYP2C9* – rs2153628AA [p=0.023; OR2.33 (1.34:4.07)] and rs4086116CT [p=0.006; OR3.87 (1.60:9.36)], *CYP1A2* – rs12904742GG [p=0.005; OR2.64 (1.40:4.95)], and allelic variants *CYP2C9* – rs4086116T [p=0.009; OR3.35 (1.52:7.42)], *CYP1A2* – rs12904742G [p=0.008; OR2.95 (1.40:6.23)], *CYP2C9* – rs1934963C [p=0.01; OR2.55 (1.42:4.57)] were also overrepresented in AED-pharmacoresistant patients (Table 3), as the *CYP2C9/CYP1A2* rs2153628AA/rs12904742GG haplotype [p=0.04; OR4.31 (1.64:11.32)] (Table 4). However, the genotypic variants *CYP2C9* – rs4086116CC [p=0.009; OR0.30 (0.13:0.66)] and rs1934963TT [p=0.01; OR0.39 (0.22:0.70)], *CYP1A2* – rs12904742AG [p=0.008; OR0.34 (0.16:0.72)], and allelic variant *CYP2C9* – rs2153628G [p=0.02; OR0.43 (0.25:0.75)], were overrepresented in AED-responders ELTM patients group (Table 3).

The estimate of the best model fit between the phenotype, SNPs and the others covariates were seen that only the atrophy in ELTM patients contribute with 9% for pharmacoresistance in these patients. Others factors such as febrile seizures and age at epilepsy onset showed no association with pharmacoresistance in ELTM patients. The genetic contribution to pharmacoresistance was attributed to *CYP2C9* - rs2153628AA in 5%, 4% to *CYP1B1* - rs2551188TT, *CYP1A2* - rs12904742GG in 1%. Allelic variants how rs4086116T(*CYP2C9*) and rs3740066(*ABCC2*) contribute with 1% each to pharmacoresistance phenotype. So, the atrophy associated with genes AA/TT/GG (*CYP2C9/CYP1B1/CYP1A2/ABCC2*) contributed with 21% for pharmacoresistance in ELTM patients. This data were illustrated in Figure 4.

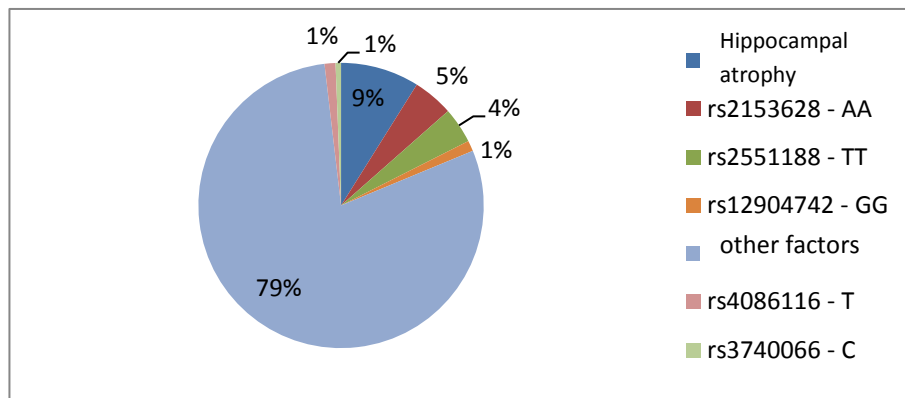


Figure 4. Contribution of the genetic and environmental factors studied to pharmacoresistance in ELTM patients.

DISCUSSION

According to Siddiqui *et al.*, 2003, MDR1 (*ABCB1*) is a potential mechanism of resistance to anticonvulsivant drugs, because MDR1 operates as a multidrug efflux pump, transporting drugs and xenobiotics across biologic membranes, such blood-brain-barrier, as the MRPs proteins, as MRP2 (*ABCC2*). In addition, ABC transporters have many substrates in common. Carbamazepine and phenytoin are suggested acting as substrates de PgP e MRP2, and valproic acid is suggested as a substrate of the MRP2 (Potschka *et al.*, 2003a,b).

The function of MDR1 can be influenced by polymorphisms and a common SNP of *ABCB1* is the synonymous SNP rs1045642, 3435C>T of exon 26. It is suggested that individuals with the TT genotype have a lower expression of *ABCB1* in relation to the homozygous CC and heterozygous CT (Sills *et al.*, 2005), thus having a protective effect. In our study group, as well as other works (Tan *et al.*, 2004; Sills *et al.*, 2005;

Kim *et al.*, 2006a; Kim *et al.*, 2006b; Shahwan *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009), it was not found association of the polymorphism 3435C> T and difficulty in treatment with AEDs. In our group the frequency of TT genotype is lower in the group of AED-responders as the group of AED-pharmacoresistants, with no statistically significant difference between the ELTM patients groups. For the other SNPs analyzed in *ABCB1* gene in this study (rs1128503, rs2235048, rs2229109) also did not differ between the two groups (Table 3). The lack of effect of the *ABCB1* has been reported in relation to the response to other P-glycoprotein substrate drugs, such as indinavir (Solas *et al.*, 2007) and digoxin (Chowbay *et al.*, 2005). Although the role of PgP has been most extensively studied in patients with refractory epilepsy, others ABC transporters, such as MRP2 (*ABCC2*) may have a role in modulating the brain penetration of AEDs. The most studied polymorphisms of the *ABCC2* gene are -24T (rs717620) and 1249G> A (rs2273697). Some studies suggest an association of the polymorphism -24T (rs717620) in vitro, with decreased activity of protein MRP2 (Haenisch *et al.*, 2007). In contrast, this same variant T was associated with a higher antiepileptic risk of failure in *ABCC2* -24T allele carriers due to the compensatory effect of upregulation of *ABCB1* in this patients, leading to a difficult to respond to antiepileptic therapy (Ufer *et al.*, 2009). For the SNP 1249G> A (rs2273697), there was no significant difference between drug responders and non responders patients (Kim *et al.*, 2009). In present study, no significant difference between groups of AED-responders and AED-pharmacoresistants for both SNP-24T (rs717620) and 1249G> A (rs2273697) was observed. However, we report a significant association with synonymous polymorphism rs3740066 (*ABCC2*), which the TT genotype is significantly more frequent in AED-responsive patients and

the C allele is significantly more frequent in AED-pharmacoresistants patients (Table 3). Hence, it was observed an increased expression in hippocampus of AED-pharmacoresistantes MTLE patients compared to control tissue from autopsies (Figure 2). Overexpression may be the consequence of seizures itself (Sisodiya and Tom, 2003), exposure to certain anticonvulsivants such as carbamazepine (Giessmann *et al.*, 2004) or genetic factors (Soranzo *et al.*, 2005). Synonymous SNPs not change aminoacid and consequently not resulting in structural and functional changes of the protein, but for the C3435T SNP (*ABCB1*), it is reported that the change of the base and the consequent formation of a rare codon, affects the timing of cotranslational folding and insertion of PGP into the membrane, decreasing its performance (Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2007). Based on this work, a hypothesis that may explain the association with rs3740066 synonymous SNP is the AED-pharmacoresistants patients with a higher frequency of C allele have the most frequent codon AUC (22.8) (<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/codonbycds.cgi>) which not altering the process of translation and consequent protein function, while patients AED-responders, the presence of the more frequent allele T would lead to the formation of rare codon AUU (14.2), which would result in alteration of the translation process, reducing the transport of Pgp and thus higher concentration of the drug in target tissue, than in AED-pharmacoresistants patients, decreasing the risks of drug-resistance in patients rs3740066TT. Elimination of drugs, including AEDs is through the metabolism hepatic and/or renal excretion, and the oxidative reactions are catalysed by various cytochrome P450 enzymes. Within the most important CYP450 polymorphic enzymes are *CYP2C9*, involved in phenytoin and valproic acid elimination, *CYP2C19* also involved in phenytoin and phenobarbital

metabolism and *CYP3A4* that are responsible for carbamazepine elimination. Some polymorphisms are associated with individual response of antiepileptic therapy, such as the polymorphism *CYP2C9**3 (rs4986893) which carriers of one *3 allele (14.5%) or of two *3 alleles (0.4%) needed a 13% and 30% lower dosage, respectively. Overall, the polymorphisms could explain only 6.5% of the total variation (Tate *et al.*, 2005). But for the polymorphisms of the *CYP2C* there are still many controversial results, as the association of heterozygous *CYP2C8**4 and *CYP2C9**3 variant allele only after excluding patients with febrile convulsions that were rarely treated with *CYP2C* substrates (Ufer *et al.*, 2009). In our study, we found the genotypes of three intronic polymorphisms of *CYP2C9* gene more frequent in AED-pharmacoresistant patients: rs4086116T, rs2153628AA and rs1934963C (Table 3). And, others intronic polymorphisms in *CYP1A2* and *CYP1B1* genes, which are rs12904742G and rs2551188TT, significantly more frequent in AED-pharmacoresistant ELTM patients (Table 3). These SNPs could be in linkage disequilibrium with the functional variant or still, they could be located in specific regions within introns. Introns are regions with high genetic variability within genes, but with regions highly conserved such as 5' and 3' splice sites, a polypyrimidine tract and branch site (Lomelin *et al.*, 2009), or still, coding for microRNAs. Alterations in these regions could be essential for gene function and regulation. With this, many genome-wide association studies (GWA) have now found associations between intronic variants and diseases, such as diabetes and cancer (Scott *et al.*, 2007).

The analysis of interaction between the SNPs showed that haplotypes are also associated with pharmacoresistance in MTLE patients, as it was occurred with the

interactions between genotypes of SNPs rs2551188CT:rs4086116CT, rs2153628AA:rs12904742GG, more frequent in groups of AED-pharmacoresistant (Table 4). The association genotype/phenotype showed that the contribution of genetic factors studied in this work is responsible for 12% for the phenotype of pharmacoresistance in ELTM patients. Apart from genetic factors, environmental factors such as hippocampal atrophy, more frequent in the group of pharmacoresistant patients ($p=0.0000068$, Table 2), contribute with 9% to the phenotype of refractory epilepsy (Figure 3).

Although the patients studied in this work are from the Brazilian population, the results obtained from the genomic control showed no genetic variability between the two groups, thus forming a single structured population, allowing compare them and decreasing the chances of finding false-positives due to sample stratification.

In this paper, the intention was to investigate some aspects of genetics and environmental factors that could be related with the pharmacoresistance in ELTM patients. And it can be affirm that the difficulty in response to treatment with AED is multifactorial, involving genetic and environmental factors, and even polygenic, complex character. However, the genetic variation involving genotypes of drug-metabolizing, such as CYP enzymes, and drug-transporters, such as MDR1 (*ABCB1*) and MRP2 (*ABCC2*) has still limited clinical impact on the treatment of epilepsy.

REFERENCES

Ayres M., Ayres M.Jr, Ayres, DL, *et. al.* BioEstat 3.0 Aplicações Estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas. Belém, PA, 2003.

Baltes S, Gastens AM, Fedrowitz M, Potschka H, Kaever V, Löscher W. [Differences in the transport of the antiepileptic drugs phenytoin, levetiracetam and carbamazepine by human and mouse P-glycoprotein.](#) Neuropharmacology. 2007;52(2): 333-46.

Barrett, JC, Fry, B, Maller, J, Daly, MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. Bioinformatics. 2005;21: 263-265.

Begley, D.J. ABC transporters and the blood brain barrier. Curr. Pharm. Des. 2004;10: 1295-1312.

Bournissen FG, Moretti ME, Juurlink DN, Koren G, Walker M, Finkelstein Y. Polymorphism of the MDR1/ABCB1 C3435T drug-transporter and resistance to anticonvulsant drugs: A meta-analysis. Epilepsia, 2009; 50(4): 898–903.

Cascorbi I. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. Pharmacol Ther. 2006; 112: 457–473.

Choudhry S, Coyle NE, Tang H, Salari K, Lind D, Clark SL, et al. Population stratification confounds genetic association studies among Latinos. Hum Genet. 2006; 118: 652-664.

Chowbay B, Li H, David M, Cheung YB, Lee EJ. Meta-analysis of the influence of MDR1 C3435T polymorphism on digoxin pharmacokinetics and MDR1 gene expression. Br J Clin Pharmacol. 2005; 60: 159–171.

Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Epilepsia. 1989; 30(4): 389-99.

De La Vega FM, Isaac HI, Scafe CR. A tool for selecting SNPs for association studies based on observed linkage disequilibrium patterns. [Pac Symp Biocomput.](#) 2006; 487-98.

De la Vega FM, Lazaruk KD, Rhodes MD, Wenz MH. Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan SNP Genotyping Assays and the SNPLEX Genotyping System. *Mutat Res.* 2005;573: 111-35.

Duncan JS, Sander JW, Sisodiya SM, Walker MC. Adult epilepsy. *Lancet.* 2006;367(9516): 1087-100.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online.* 2005;1: 47-50.

Estrela RC, Iberia FS, Carvalho RS, Gregório SP, Dias-Neto E, Struchiner CJ, Suarez-Kurtz G. Distribution of ABCB1 polymorphisms among Brazilians: impact of population admixture. *Pharmacogenomics.* 2008;9(3): 267-76.

Gauderman WJ, Morrison JM. QUANTO 1.1: A computer program for power and sample size calculations for genetic-epidemiology studies. <http://hydra.usc.edu/gxe>. 2006.

Giessmann T, May K, Modess C, Wegner D, Hecker U, Zschiesche M, *et al.* Carbamazepine regulates intestinal P-glycoprotein and multidrug resistance protein MRP2 and influences disposition of talinolol in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 2004;76: 192–200.

Haenisch S, Zimmermann U, Dazert E, Wruck CJ, Dazert P, Siegmund S, *et al.* Influence of polymorphisms of ABCB1 and ABCC2 on mRNA and protein expression in normal and cancerous kidney cortex. *Pharmacogenomics J.* 2007;7: 56–65.

Heinze G, Schemper M. A solution to the problem of separation in logistic regression. *Statistics in Medicine.* 2002; 21(16): 2409–2419.

Hung CC, Chen CC, Lin CJ, Liou HH. Functional evaluation of polymorphisms in the human ABCB1 gene and the impact on clinical responses of antiepileptic drugs. *Pharmacogenet Genomics*. 2008; 18: 390–402.

Kim DW, Kim M, Lee SK, Kang R, Lee SY. Lack of association between C3435T nucleotide MDR1 genetic polymorphism and multidrug-resistant epilepsy. *Seizure*. 2006a;15: 344–347.

Kim YO, Kim MK, Woo YJ, Lee MC, Kim JH, Park KW, Kim EY, Roh YI, Kim CJ. Single nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance 1 gene in Korean epileptics. *Seizure*. 2006b;15: 67–72.

Kim DW, Lee SK, Chu K, Jang IJ, Yu KS, Cho JY, Kim SJ. [Lack of association between ABCB1, ABCG2, and ABCC2 genetic polymorphisms and multidrug resistance in partial epilepsy.](#) *Epilepsy Res*. 2009; 84(1): 86-90.

Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesmann MM. A silent polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*. 2007;315: 525–528.

Kwan P, Brodie MJ. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. *Epilepsia*. 2005;46(2): 224-35.

Laechelt S, Turrini E, Ruehmke A, Siegmund W, Cascorbi I, Haenisch S. Impact of ABCC2 haplotypes on transcriptional and posttranscriptional gene regulation and function. *Pharmacogenomics Journal*. 2010; 1-10.

Lazarowski A, Czornyj L, Lubienieki F, Girardi E, Vazquez S, D’Giano. C. ABC Transporters during Epilepsy and Mechanisms Underlying Multidrug Resistance in Refractory Epilepsy. *Epilepsia*, 2007; 48(5):140–49.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$. Methods. 2001;25(4): 402–408.

Lomelin D, Jorgenson E, Risch N. Human genetic variation recognizes functional elements in noncoding sequence. Genome Res. 2010; 20(3): 311-9.

Löscher W, Potschka H. [Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters](#). Nat Rev Neurosci. 2005a;6(8): 591-602.

Löscher W, Potschka H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. Prog Neurobiol. 2005b;76(1): 22-76.

Myers S, Bottolo L, Freeman C, McVean G, Donnelly P. A fine-scale map of recombination rates and hotspots across the human genome. Science. 2005 Oct; 310(5746): 321-4.

Ninomiya H, Mamiya K, Matsuo S, Ieiri I, Higuchi S, Tashiro N. Genetic polymorphism of the CYP2C subfamily and excessive serum phenytoin concentration with central nervous system intoxication. Ther Drug Monit. 2000; 22: 230–232.

Potschka H, Fedrowitz M, Löscher W. Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity. J. Pharmacol. Exp. 2003a; 306: 124-131.

Potschka H, Fedrowitz M, Löscher W. Brain access and anticonvulsant efficacy of carbamazepine, lamotrigine, and felbamate in ABCC2/MRP2-deficient TR-rats. Epilepsia. 2003b; 44: 1479-1486.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org>. 2010.

Robey RW, Lazarowski A, Bates SE. P-glycoprotein e a clinical target in drug-refractory epilepsy? Mol. Pharmacol. 2008;73: 1343-1346.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (Eds). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989; pp. E3-E4.

Schmidt D, Löscher W. [New developments in antiepileptic drug resistance: an integrative view.](#) Epilepsy Curr. 2009;9(2): 47-52

Schmidt D. e Löscher W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiology and clinical mechanisms. Epilepsia. 2005;46(6): 858-877.

Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, Erdos MR, *et al.* A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. Science. 2007;1:(316):1341-5.

Secolin R, Maurer-Morelli C, Cendes F, Lopes-Cendes I. Segregation analysis in mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal atrophy. Epilepsia. 2010; 51(1): 47-50.

Shahwan A, Murphy K, Doherty C, Cavalleri GL, Muckian C, Dicker P, McCarthy M, Kinirons P, Goldstein D, Delanty N. [The controversial association of ABCB1 polymorphisms in refractory epilepsy: an analysis of multiple SNPs in an Irish population.](#) Epilepsy Res. 2006; 73(2): 192-8.

Shannon D, Miller DS, Bendayan R. Multidrug Resistance-Associated Proteins: Expression and Function in the Central Nervous System. Pharmacol Re. 2006;58: 140–161.

Siddiqui A, Kerb R, Weale ME, Brinkmann U, Smith A, Goldstein DB, Wood NW, Sisodiya SM. Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1. N Engl J Med. 2003;348: 1442–1448.

Sillanpää M, Schmidt D. Natural history of treated childhood-onset epilepsy: prospective, long-term population-based study. *Brain*. 2006;129(3): 617-24.

Sills GJ, Mohanraj R, Butler E, McCrindle S, Collier L, Wilson EA, *et al*. Lack of association between the C3435T polymorphism in the human multidrug resistance (MDR1) gene and response to antiepileptic drug treatment. *Epilepsia*. 2005;46: 643-7.

Sisodiya SM, Thom M. Widespread upregulation of drug-resistance proteins in fatal human status epilepticus. *Epilepsia*. 2003;44: 261–264.

Sisodiya SM. Mechanisms of antiepileptic drug resistance. *Curr Opin Neurol*. 2003;16: 197-201.

Solas C, Simon N, Drogoul MP, Quaranta S, Frixon-Marin V, Bourgarel-Rey V, Brunet C, *et al*. Minimal effect of MDR1 and CYP3A5 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of indinavir in HIV-infected patients. *Br J Clin Pharmacol*. 2007;64: 353–362.

Soranzo N, Cavalleri GL, Weale ME, Wood NW, Depondt C, Marguerie R, *et al*. Identifying candidate causal variants responsible for altered activity of the ABCB1 multidrug resistance gene. *Genome Res*. 2004;14: 1333–1344.

Soranzo N, Goldstein DB, Sisodiya SM. The role of common variation in drug transporter genes in refractory epilepsy. *Expert Opin Pharmacother*. 2005; 6:1305–1312.

Tan NC, Heron SE, Scheffer IE, Pelekanos JT, McMahon JM, Vears DF, *et al*. Failure to confirm association of a polymorphism in ABCB1 with multidrug-resistant epilepsy. *Neurology*. 2004; 63: 1090–1092.

Tanaka E. Clinically significant pharmacokinetic drug interactions between antiepileptic drugs. *J Clin Pharm Ther.* 1999;24: 87–92.

Tate SK, Depondt C, Sisodiya SM, Cavalleri GL, Schorge S, Soranzo N, Thom M, *et al.* Genetic predictors of the maximum doses patients receive during clinical use of the anti-epileptic drugs carbamazepine and phenytoin. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102(15): 5507-12.

The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature.* 2005;437(27): 1299-320.

Turakulov R, Easteal S. Number of SNPS loci needed to detect population structure. *Human heredity* 2003;55(1): 37-45.

Ufer M, Mosyagin I, Muhle H, Jacobsen T, Haenisch S, Häslér R, *et al.* Non-response to antiepileptic pharmacotherapy is associated with the ABCC2 – 24C > T polymorphism in young and adult patients with epilepsy. *Pharmacogenetics and Genomics.* 2009; 19(5): 353-62.

Van der Weide J, Steijns LS, van Weelden MJ, De Haan K. The effect of genetic polymorphism of cytochrome P450 CYP2C9 on phenytoin dose requirement. *Pharmacogenetics.* 2001;11: 287–291.

Wang D, Sadée W. Searching for Polymorphisms That Affect Gene Expression and mRNA Processing: Example ABCB1 (MDR1). *AAPS Journal.* 2006;8(3): 515-520.

Zimprich F, Sunder-Plassmann R, Stogmann E, Gleiss A, Dal Bianco A, Zimprich A, *et al.* Association of an ABCB1 gene haplotype with pharmacoresistance in temporal lobe epilepsy. *Neurology.* 2004; 63: 1087–1089.

APÊNDICES:

APÊNDICE 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

CEP, 11/05/06.
(Grupo III)

PARECER PROJETO: Nº 061/2006 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0040.0.146.000-06

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ANÁLISES DE FATORES RELACIONADOS À RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO COM DROGAS ANTI-EPILÉTICAS EM EPILEPSIAS PARCIAIS”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Elizabeth Bilevicius

INSTITUIÇÃO: Ambulatório de Epilepsia do Hospital de Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/02/2005

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 28/03/07 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Realizar uma análise satisfatória multifatorial dos aspectos relacionados à resistência ao tratamento clínico em pacientes com epilepsias parciais. Serão realizados estudos de neuroimagem por RMN, avaliar características clínicas e eletrofisiológicas e estudos de polimorfismos genéticos tanto em pacientes com boa resposta ao tratamento bem como naqueles considerados refratários ao tratamento.

III - SUMÁRIO

Serão recrutados pacientes com epilepsia parcial com o intuito de uma melhor compreensão dos mecanismos relacionados à farmacoresistência, permitindo novas estratégias farmacêuticas para os mesmos. Serão incluídos pacientes adultos com diagnóstico clínico e eletroencefalográfico de epilepsia parcial. A adequação da metodologia bem como das condições estão coerentes com o projeto proposto.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto está bem redigido. Os riscos a que o paciente será submetido são decorrentes da punção venosa. Os benefícios não terão um efeito imediato, contudo os resultados poderão contribuir para outros indivíduos. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi reapresentado, estando de acordo com o modelo do CEP/FCM.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e

atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na III Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de março de 2006.


Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 27/03/07.

(**PARECER PROJETO:** N° 061/2006)

PARECER

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ANÁLISES DE FATORES RELACIONADOS À RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO COM DROGAS ANTI-EPILEPTICAS EM EPILEPSIAS PARCIAIS”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Elizabeth Bilevicius

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP aprovou o Relatório Parcial, apresentado em janeiro fevereiro de 2007, do protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

Recomendação: quando da publicação enviar cópia ao CEP/FCM.

Homologado na III Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de março de 2007.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa – UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6114
13084-971 Campinas – SP

FONE (019) 3788-8936
FAX (019) 3788-7187
cep@fcm.unicamp.br

APÊNDICE 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Título do projeto: **Análise de fatores relacionados à resistência ao tratamento com drogas anti epilépticas em epilepsias parciais**

Investigadores principais: Dra. Elizabeth Bilevicius, Dr. Fernando Cendes e Dra. Iscia Lopes Cendes

JUSTIFICATIVA:

As epilepsias parciais, ou seja, aquelas crises (ou “ataques”) que começam em uma área específica do cérebro, também conhecida como “foco”, são as mais freqüentes dentro das epilepsias e também as mais resistentes ao tratamento com medicação. Por isso, este tipo de epilepsia está relacionado a uma série de complicações como ferimentos, queimaduras, perda de emprego, depressão, etc, uma vez que as crises não estão completamente controladas. Os fatores relacionados à resistência, no entanto, são pouco compreendidos, principalmente na população composta por adultos jovens.

Individualmente, vários estudos relacionam este controle ruim com remédios a uma série de fatores que incluem alterações estruturais, ou seja, vistas através de Tomografia e/ou Ressonância Magnética e diversas alterações genéticas sendo estas últimas pesquisadas por um novo ramo da medicina denominada “farmacogenômica”. Estudos, no entanto, que analisem estes componentes juntos são poucos e, mesmo os existentes levam em conta poucos componentes. Desta forma, um estudo mais amplo é necessário levando em conta a união de componentes estruturais, clínicos e genéticos, uma vez que a resposta para alcançar o controle de crises deve estar na análise destes fatores juntos.

Este estudo será importante para a melhor compreensão dos mecanismos relacionados à baixa resposta medicamentosa em relação ao controle de crises, permitindo novas estratégias de tratamento para as epilepsias parciais.

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidado (a) a participar em um projeto de pesquisa envolvendo pacientes com epilepsia parcial com bom controle e com controle insatisfatório de crises. O objetivo geral do estudo é investigar fatores genéticos, ambientais e de imagem possivelmente envolvidos na falha do controle de crises em pacientes usando medicação antiepiléptica, ou seja, para evitar crises. A identificação desses fatores pode eventualmente contribuir para um melhor tratamento da epilepsia. O sigilo será mantido em toda a pesquisa através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e familiares. Eu serei submetido a um exame físico neurológico para estabelecer meu estado clínico. Além disso, poderei ser submetido a um eletroencefalograma (EEG) e talvez uma tomografia



FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 2 de 5

Título do projeto: **Análise de fatores relacionados à resistência ao tratamento com drogas anti epiléticas em epilepsias parciais**

Investigadores principais: Dra. Elizabeth Bilevicius, Dr. Fernando Cendes e Dra. Iscia Lopes Cendes

computadorizada ou uma ressonância magnética de crânio. Uma amostra de sangue venoso será colhida (20 a 30 ml, o equivalente a duas colheres de sopa). Hospitalização não será necessária. Os procedimentos mencionados acima, com exceção da coleta da amostra de sangue, fazem parte dos cuidados médicos de rotina para um paciente com epilepsia. Os procedimentos mencionados acima serão realizados dentro dos primeiros 6 meses após o meu consentimento em participar no estudo, porém a pesquisa laboratorial utilizando as amostras de sangue poderão ser feitas durante um período máximo de 10 anos após a coleta, sendo que eu poderei concordar ou não com o armazenamento do meu sangue por este período. Caso não concorde, após este estudo, todo o material será destruído. As células que por ventura forem isoladas do meu sangue serão preservadas para utilização durante todo o estudo e depois que ele se completar serão destruídas.

Se o material for armazenado pelo período máximo de 10 anos, este poderá ser utilizado em outras pesquisas, porém **sempre com a necessidade de aprovação prévia do Comitê de Ética em Pesquisa deste centro.**

RISCO E DESCONFORTO:

Uma coleta de 20 a 30 ml de sangue venoso será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizada por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação nesse estudo e que o meu diagnóstico e o meu tratamento provavelmente não serão modificados. Contudo, os resultados desse estudo podem, em longo prazo, oferecer vantagens para os indivíduos com epilepsia e suas famílias, possibilitando um tratamento mais adequado.

SIGILO:

O sigilo será mantido em toda a pesquisa através da utilização de um número de código, que substituirá o nome, para a identificação dos indivíduos participantes. Toda informação médica será parte do meu prontuário médico que é submetido aos regulamentos do HC- UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica. Os resultados dos testes



FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 3 de 5

Título do projeto: **Análise de fatores relacionados à resistência ao tratamento com drogas anti epilépticas em epilepsias parciais**

Investigadores principais: Dra. Elizabeth Bilevicius, Dr. Fernando Cendes e Dra. Iscia Lopes Cendes

genéticos não serão incluídos no prontuário, estarão acessíveis apenas aos pesquisadores e não serão disponibilizados a terceiros.

Todos os dados que forem obtidos para esse estudo, tanto o resultado dos testes genéticos como as informações médicas a meu respeito e de minha família, poderão ser compartilhadas com outros pesquisadores que trabalham com epilepsia. Portanto essas informações poderão ser utilizadas eventualmente para outras pesquisas sobre a doença, sempre com a **necessidade da aprovação do Comitê de Ética**. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Eu entendo que posso requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. Os Drs. Elizabeth Bilevicius (tel.: 19-3233-9619), Fernando Cendes (tel.: 19-3788-7372) e Iscia Lopes Cendes (tel.: 19-3788-8908) estarão disponíveis para responder minhas questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contactar a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas(FCM)-UNICAMP, tel. (19) 3788-8936 ou fax (19) 3788-7187.

Se eu desejar obter orientação e aconselhamento genético, posso solicitar atendimento no ambulatório de neurogenética do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), tel. (19) 3788-8908 que oferece um atendimento multidisciplinar sob orientação e supervisão de geneticista clínico.

Quanto aos resultados desta pesquisa, se os pesquisadores descobrirem algum dado novo nas pesquisas genéticas que possa favorecer de algum modo meu tratamento ou acompanhamento médico, gostaria de

- () ser comunicado do resultado
() NÃO ser comunicado do resultado

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue) sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC- UNICAMP. Eu reconheço também que os Drs. Elizabeth Bilevicius, Fernando Cendes e Iscia Lopes Cendes podem interromper a minha participação nesse estudo a qualquer momento que julgar apropriado.



Universidade Estadual de Campinas
Departamentos de Neurologia e Genética Médica

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 4 de 5

Título do projeto: **Análise de fatores relacionados à resistência ao tratamento com drogas anti epilépticas em epilepsias parciais**

Investigadores principais: Dra. Elizabeth Bilevicius, Dr. Fernando Cendes e Dra. Iscia Lopes Cendes

Eu confirmo que o(a) Dr(a). _____ me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos, desconforto e possíveis vantagens vindas desse projeto de pesquisa. Eu li e compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

Nome do participante ou responsável

Assinatura do participante ou responsável

data

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado

data



FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 5 de 5

Título do projeto: **Análise de fatores relacionados à resistência ao tratamento com drogas anti epilépticas em epilepsias parciais**

Investigadores principais: Dra. Elizabeth Bilevicius, Dr. Fernando Cendes e Dra. Iscia Lopes Cendes

Eu, _____ concordo em ter a amostra de meu sangue coletada na presente data, armazenada por um período máximo de 10 anos, conforme já explicado pelo(a) Dr(a). _____

Para fim único de pesquisa, sendo que, para cada vez que for ser utilizado o material, este **deverá ser aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM- UNICAMP**. Qualquer resultado proveniente da amostra do meu sangue será mantido em absoluto sigilo, conforme já descrito anteriormente.

Entendo também que poderei retirar este consentimento a qualquer momento sem prejuízo em relação aos cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC – UNICAMP.

Assinatura do participante ou responsável

data

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

data

APÊNDICE 3: Questionário



Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Neurologia

NOME: _____

IDADE: ____ anos

SEXO: M ☐ F ☐

CIDADE: _____ **TELEFONE:** (____) _____

PESO: _____ kg

ALTURA: _____ m

IDADE DE INÍCIO DAS CRISES: ____ anos

OCORRÊNCIA DE CRISES FEBRIS NA INFÂNCIA: sim ☐ não ☐

FREQUÊNCIA DA CRISE ATUAL: _____

FREQUÊNCIA DE CRISES INICIAIS: _____

PADRÃO EVOLUTIVO DE CRISES: _____

EXAME NEUROLÓGICO: _____

EEG: _____

RM: _____

INSULTO PRECIPITANTE INICIAL: _____

MEDICAÇÃO EM USO (DAEs): _____

DOSE DIÁRIA: _____ **POSOLOGIA:** _____

OUTRAS MEDICAÇÕES: _____

_____ **DOSE DIÁRIA:** _____

ADERÊNCIA: _____

MEDICAÇÃO PRÉVIA (DAEs): _____

HISTÓRIA FAMILIAR : _____