

***MARIANA SARAGIOTTO DA SILVA***

***ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE  
NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPS) EM GENES CANDIDATOS E  
REFRATARIEDADE MEDICAMENTOSA EM PACIENTES  
COM EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL MESIAL***

***CAMPINAS***

**2010**

*MARIANA SARAGIOTTO DA SILVA*

Estudo de associação entre polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes  
candidatos e refratariedade medicamentosa em pacientes com 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 Fisiopatologia  
Médica, Área de Concentração Neurociências.

***ORIENTADOR: PROFA. DRA. ISCIA LOPES-CENDES***

***CO-ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO CENDES***

***CAMPINAS***

***Unicamp***

***2010***

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Si38e Silva, Mariana Saragiotto da  
Estudo de associação entre polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes candidatos e refratariedade medicamentos / Mariana Saragiotto da Silva. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientadores: Iscia Teresinha Lopes-Cendes, Fernando Cendes  
Tese ( Doutorado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Farmacogenética. I. Lopes-Cendes, Iscia Teresinha. II. Cendes, Fernando. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês : “Association study between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in candidate genes and drug refractoriness in patients with mesial temporal lobe epilepsy”**

**Keywords:** • Pharmacogenetic

**Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica**  
**Área de concentração: Neurociências**

**Banca examinadora:**

**Profa. Dra. Iscia Teresinha Lopes-Cendes**  
**Prof. Dr. Carlos Alberto Mantovani Guerreiro**  
**Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo**  
**Prof. Dr. Veriano Alexandre Junior**  
**Prof. Dr. Marino Muxfeldt Bianchin**

**Data da defesa: 28-07-2010**

---

## Banca examinadora da tese de Doutorado

Mariana Saragiotto da Silva

---

---

Orientador(a) : Prof(a). Dr(a). Iscia Teresinha Lopes Cendes

---

---

### Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Iscia Teresinha Lopes Cendes

2. Prof(a). Dr(a). Carlos Alberto Mantovani Guerreiro

3. Prof(a). Dr(a). Mônica Barbosa de Melo

4. Prof(a). Dr(a). Veriano Alexandre Junior

5. Prof(a). Dr(a). Marino Muxfeldt Bianchin

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

---

Data: 28/07/2010

---

## ***DEDICATÓRIA***

---

*Dedico este trabalho  
aos meus pais Edson e Stela,  
por toda a dedicação e incentivo,  
e ao meu noivo Anderson,  
por estar sempre ao meu lado.*

## ***AGRADECIMENTOS***

---

Primeiramente gostaria de agradecer à prof. Iscia Lopes Cendes, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, mesmo não sendo com RNA de interferência, motivo pelo qual eu vim fazer meu mestrado. Por outro lado, ela possibilitou a realização de um trabalho minucioso com SNPs em pacientes com epilepsia, que busca as causas da dificuldade de controle das crises, podendo futuramente, auxiliar na melhora do tratamento para esses pacientes

Agradeço também ao Dr. Fernando Cendes, co-orientador deste trabalho, pelas palavras de incentivo e direcionamento após a avaliação para ingresso no doutorado direto, que muito me auxiliaram no desenvolvimento deste projeto.

Agradeço, em especial, a todos os pacientes que fizeram parte deste trabalho. Muito obrigada pelo tempo gasto com as explicações sobre a pesquisa, me ouvindo falar que o trabalho é muito importante para uma busca por uma melhor resposta ao tratamento deles mesmos, pelas coletas, algumas vezes, quase sempre incômodas. Saibam que, sem vocês, este trabalho não existiria. Muito obrigada mesmo!

Agradeço a todo pessoal da policlínica III de Campinas, que permitiram a realização de entrevistas e coletas em pacientes atendidos por esta instituição, contribuindo para o enriquecimento deste trabalho.

Também gostaria de agradecer à profa. Glória e o prof. Lineu, ambos professores da Faculdade de Medicina da PUC de Campinas, pois também contribuíram com alguns pacientes estudados neste trabalho.

Agradeço à Beth, aluna de doutorado do Dr. Fernando que me auxiliou com a parte clínica dos pacientes. Obrigada pelas idas e vindas até a poli III, na busca incansável por pacientes, de preferência bem controlados.

Agradeço também a Marilza, funcionária de nosso laboratório, pois foi ela quem realizou as coletas de sangue dos pacientes que participaram deste trabalho. “Sempre pronta a ajudar, descia rapidinho no ambulatório nas segundas à tarde quando eu ligava e dizia: “Má tem um paciente aqui! Vc desce?? Ele já assinou o termo!!” Dali 5 minutinhos aparecia a Marilza com a maletinha de coleta. Má valeu mesmo!!!

Agradeço ao pessoal do DNA, Milena, Romênia, Fábio Rossi, Madá... que sempre me viam por ali... no Real-Time ou na salinha do SNPlex, mas sempre foram muito atenciosos comigo!! Agradeço em especial a Luciana pelos numerosos cafezinhos pós espaço Gourmet... e conversa vai...conversa vem.... tá na hora de trabalhar!!

A Claudia, não poderia faltar, pois foi ela quem me auxiliou neste trabalho desde o começo, sempre me auxiliando durante todo o percurso. Valeu Claudia por estar sempre pronta a me ajudar!!

Ao Zé, como poderia esquecer...companheiro fiel de bancada...me ajudou muito com os experimentos, principalmente na reta final pós Toronto, né Zé?! Muito obrigada!! É claro que tive que agüentar vários dos seus momentos de mau-humor, mas não tem problema, esse é o Zé!!! E você também me ouviu bastante, né?! Tá pago!! .

Também agradeço o Rodrigo por me ajudar nas análises estatísticas, tagSNP, Haploview, stepwise, desequilíbrio de ligação!!! Affff!!! Valeu Rô!!

Agradeço em especial ao Anderson, meu companheiro fiel, de todo dia, que depois de mim, mais vivenciou meu doutorado. Agradeço por estar sempre ao meu lado, me dando conselhos, me guiando nos momentos difíceis e me esperando no estacionamento da FCM, por horas, mesmo depois de eu ter falado que eram só 15 minutinhos. Valeu Dê!! Eu sei que não foi fácil!!

E também agradeço meu pai Edson, minha mãe Stela e ao meu irmão Mateus por ser minha família, e em especial minha vó Luiza por sempre ter uma palavra de carinho e incentivo. A meus pais por terem ajudado a construir tudo de bom que tenho em mim, por terem me ensinado a importância de ser uma família, e ainda por estarem sempre presentes nos momentos mais importantes de minha vida, inclusive, mais uma vez, nesta tese de doutorado.

Agradeço muito a Dori, minha cachorra, por ter surgido nesta fase delicada da minha vida e feito dela mais divertida. Muito obrigada também pela companhia, sempre ao meu lado, durante a redação desta tese.

Também não posso esquecer-me da minha amiga Valéria, que mesmo sem entender bem o que eu faço, sempre mostrou interesse e deu incentivos para que eu continuasse com a carreira científica.

Preciso agradecer o RNAi como um todo, desde o começo do meu mestrado/doutorado. Primeiro o Tiago C. Pereira, pois foi através dele que cheguei até o Laboratório de Interferência por RNA. E depois a Patty Aline (nome diferente, né?) que me recebeu no dia em que fui apenas conhecer o laboratório. E depois, no meu primeiro dia do mestrado no lab, aparece a Danny, e eu me pergunto: “quem é essa pessoa??”... pois é, era o primeiro dia dela também. Depois conheci o Vinícius, aluno de iniciação da Patty, nossa, quanto tempo, ele já defendeu o doutorado!! E depois veio o Fábio Conte, que só parece uma pessoa séria! E ainda não acabou... todos falavam de um tal de “Oni” que tinha feito iniciação no lab, era muito legal, e que iria voltar pra fazer pós. Mas quem era essa pessoa chamada Oni?? O tempo foi passando, os laços se estreitando, conheci o Oni. Vieram os agregados, não menos importantes. Xam, Ana, Aislan, André, João, e dali festas de casamentos e encontros até altas horas na casa da Dany. E assim deu-se início ao RNAi que tenho em mente.... e vai ficar pra sempre. Patty e Dany, valeu pela amizade conquistada nesse tempo. Fábio, profissional exemplar, muito obrigada pelas discussões de trabalho, ajudas na bancada, e pelas conversas e desabafos. Valeu garoto!! Vini tb por ter toda a paciência do mundo com todos, sempre! Ao Oni por ser sempre brincalhão e divertido, e também por ter me convencido a pegar um cachorro..... mesmo você não estando convencido disso!!!! À todos do RNAi muito obrigada por terem me acolhido!!!

Agradeço, em especial a Patty, sempre prestativa e atenciosa, e a Dany, agora mãe da Lia, sempre com o seu humor incrível e contagiante, agradeço pelas infinitas conversas, várias risadas, momentos de descontração durante os inúmeros almoços no RA, enfim, por todos os momentos que vivenciamos juntas e guardaremos na memória! Valeu meninas!!!

Para finalizar agradeço a oportunidade de poder ter conhecido inúmeras pessoas nesta minha trajetória, muitas não citadas aqui, mas que, com certeza, contribuíram para minha formação pessoal e acadêmica, em especial aos professores, Ivan de Godoy Maia e Prof. Lucia Maria Paleari (Unesp-Botucatu) e Prof. Maria Imaculada Zucchi (IAC, Campinas). A todos, muito obrigada!!

À FAPESP pela concessão da bolsa e reserva técnica, inicialmente de mestrado, e depois de doutorado direto, que foram fundamentais para a execução deste trabalho.



*Recolho do que em mim observo e escuto  
muda lição, que ninguém mais entende.  
O que sou vale mais do que o meu canto.*

*Cecília Meirelles*

---

	<b>página</b>
<b>RESUMO</b>	<b>39</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>43</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>47</b>
1.1 Farmacogenética	48
1.2 Polimorfismos de base única (SNPs)	50
1.3 Desequilíbrio de Ligação	52
1.4 Estrutura Genética de Populações	54
1.5 Consórcio Internacional de Mapa de Haplótipos – HapMap	56
1.6 Controle Genômico	58
1.7 Epilepsia de Lobo Temporal Mesial e a Refratariedade Medicamentosa	59
1.8 Tratamento com drogas antiepiléticas (DAEs)	62
1.9 Mecanismo de ação das DAEs	63
1.10 Metabolização das DAEs	66
1.11 Perspectivas no desenvolvimento de novas DAEs	68
1.12 Farmacoresistência em epilepsia	68
1.13 Papel dos SNPs na farmacoresistência em epilepsia	73
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>81</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>85</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>89</b>
4.1 Pacientes	91
4.2 Genotipagem	92
4.3 Critérios de escolha dos SNPs	93
4.4 Genotipagem de SNPs utilizando a técnica de PCR em Tempo Real	94
4.5 Genotipagem de SNPs utilizando a técnica SNPlex™	97
4.6 Análise estatística	102
4.7 Análise de expressão nos hipocampus	106
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>113</b>
<b>Capítulo 1: SNPs em genes metabolizadores (<i>CYP450</i>) e transportadores de drogas (<i>ABC-family</i>) estão associados com a farmacoresistência em pacientes com epilepsia de lobo temporal mesial (artigo)</b>	<b>117</b>
<b>Capítulo 2: Falta de associação do gene <i>RLIP76</i>, transportador não-ABC, com a farmacoresistência em pacientes com epilepsia de lobo temporal mesial (short communication)</b>	<b>163</b>

<b>Capítulo 3: Resultados complementares</b>	<b>177</b>
<b>6 DISCUSSÃO GERAL</b>	<b>183</b>
<b>7 CONCLUSÕES FINAIS</b>	<b>191</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>195</b>
<b>9 ANEXOS</b>	<b>215</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

18S	subunidade ribossomal 18S
ABC	ATP-binding cassette (família)
ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1
ABCC2	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2
ABCC4	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4
ABCC5	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5
AH	atrofia hipocampal
AMOVA	análise de variância molecular
ANOVA	análise de variância
ASW	African ancestry in Southwest USA
BBB	blood-brain barrier
BCRP	= ABCG2, ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2
BHE	barreira hematoencefálica
CBZ	carbamazepina
cDNA	DNA complementar
CEU	Utah residents with Northern and Western European ancestry from the CEPH collection
CG	controle genômico
CHB	Han Chinese in Beijing, China
CHD	Chinese in Metropolitan Denver, Colorado
<i>CHRNA4</i>	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 4
<i>CHRN2</i>	cholinergic receptor, nicotinic, beta 2
Ct	Threshold Cycle: Ciclo do limiar de detecção
CYP1A1	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1
CYP1A2	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2

CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1
CYP2C19	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19
CYP2C9	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9
CYP2D6	cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6
CYP2E1	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1
CYP3A4	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4
CYP3A5	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5
CYP450	cytochrome P450
DAEs	drogas anti-epilépticas
DL	desequilíbrio de ligação
DNA	ácido desoxiribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DTT	ditiotreitol
EEG	eletroencefalograma
EHW	equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>
ELTM	epilepsia lobo temporal mesial
EMT	esclerose mesial temporal
Fst	índice de fixação
G(g)	grama
GIH	Gujarati Indians in Houston, Texas
HapMap	Projeto Internacional de Mapa de Haplótipos
ILAE	International League Against Epilepsy
JPT	Japanese in Tokyo, Japan
Kb	quilobase
KDa	quilodalton
L	Litro
LLC cells	Lewis lung carcinoma
LWK	Luhya in Webuye, Kenya

MAF	minor allele frequency
MDCK cells	Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) epithelial cell line
MDR1	multidrug resistance protein 1
MEX	Mexican ancestry in Los Angeles, California
miRNA/miR	microRNA
MKK	Maasai in Kinyawa, Kenya
MRP2	multidrug resistance-associated protein 2
NCBI	National Center for Biotechnology Information (USA)
nt	nucleotídeo
°C	grau Celsius
pb	pares de bases
PBS	tampão fosfato salino
PCR	reação em cadeia da polimerase
PgP	glicoproteína P
RNA	ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RQ	quantificação relativa
RQmax	quantificação relativa máxima
RQmin	quantificação relativa mínima
RT	transcrição reversa
SCN1A	sodium channel, voltage-gated, type I, alpha subunit
SDS	dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida para eletroforese com dodecilsulfato de sódio
SNC	sistema nervoso central
SNP	single nucleotide polymorphism
SNPlex	SNPlex® Genotyping System
SV2A	synaptic vesicle glycoprotein 2A
TA	temperatura ambiente
TBS	tampão salino Tris-HCl
TSI	Toscans in Italy

UTR	untranslated region
YRI	Yoruba in Ibadan, Nigeria
$\mu$	Micro

**INTRODUÇÃO GERAL/MATERIAL E MÉTODOS**

**Tabela 1:** Transporte ativo das drogas antiepilépticas por proteínas transportadoras de múltiplas drogas no cérebro.....72

**Tabela 2:** Volume de reagentes utilizados para a reação de PCR em Tempo Real.....95

**CAPÍTULO 1**

**Tabela 1:** Analysis of molecular variance (AMOVA).....127

**Tabela 2:** Data of ELTM patients for both groups analysed.....127

**Tabela 3:** Significant results of regression logistic for genotypic and allelic associations.....131

**Tabela 4:** Significant results for SNP interactions.....131

**Tabela 1 (Supplemental Data):** SNPs selected in each chromosome for genomic control containing interest gene for associations studies.....143

**Tabela 2 (Supplemental Data):** Values of MAF and EHW for all SNPs genotyped for each groups and both together.....145

**Tabela 3 (Supplemental Data):** Genotypic and allele frequencies for SNPs with MAF >0.05 and in *Hardy-Weinberg* equilibrium ( $p>0.05$ ).....148

**Tabela 4 (Supplemental Data):** Results of regression logistic for SNP genotype between two groups: AED-responders and AED-pharmacoresistants.....152

**Tabela 5 (Supplemental Data):** Results of regression logistic for SNP allele between two groups: AED-responders and AED-pharmacoresistants.....157

**Tabela 6 (Supplemental Data):** Results of logistic regression for SNP interaction.....160



## CAPÍTULO 2

<b>Tabela 1:</b> Analysis of molecular variance (AMOVA).....	170
<b>Tabela 2:</b> Data of ELTM patients for both groups analyzed.....	171
<b>Tabela 3:</b> Values of MAF and EHW for all SNPs genotyped for each groups and both together.....	171
<b>Tabela 4:</b> Genotypic and allele frequencies for SNPs with MAF >0.05 and in <i>Hardy-Weinberg</i> equilibrium ( $p>0.05$ ).....	172
<b>Tabela 5:</b> Results of regression logistic for SNP genotype between two groups: AED-responders and AED-pharmacoresistants.....	172
<b>Tabela 6:</b> Results of regression logistic for SNP alleles between two groups: AED-responders and AED-pharmacoresistants.....	173

## CAPÍTULO 3

<b>Tabela 1:</b> Valores de MAF e EHW para o SNP rs2289771 do gene <i>SCN1A</i> em cada grupo separadamente e em ambos.....	178
<b>Tabela 2:</b> Frequências genotípicas e alélicas para o SNP rs2289771 com MAF>0.05 e em equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> ( $p>0.05$ ).....	179
<b>Tabela 3:</b> Resultados da diferença nas frequências genotípicas e alélicas através do cálculo de regressão logística entre os dois grupos analisados no estudo: DAE-respondedores e DAE-farmacoresistentes.....	179

**INTRODUÇÃO GERAL/MATERIAL E MÉTODOS**

**Figura 1:** Cortes histológicos de hipocampo. Em destaque regiões CA1, CA2 e CA3. (A): corte de hipocampo normal. (B): corte histológico de hipocampo com esclerose.....60

**Figura 2:** Imagens de ressonância magnética. (A): aquisição em T1- diminuição do volume do hipocampo e alteração de sua forma; (B): aquisição em T2 – aumento de sinal que reforça a presença de atrofia.....61




**Figura 3:** Representação esquemática da BHE. Em destaque uma proteína transportadora de droga que atua como uma bomba de efluxo de droga, impedindo a passagem da droga para o tecido alvo.....69

**Figura 4:** Localização de proteínas transportadoras de drogas nas células endoteliais dos capilares sanguíneos cerebrais. Somente os transportadores que estão localizados na superfície apical (luminal) da célula poderiam restringir a entrada de xenobióticos no cérebro.....70

**Figura 5:** Tecido cerebral epileptogênico onde transportadores de múltiplas drogas estão superexpressos nas células endoteliais dos capilares sanguíneos cerebrais. Astrócitos e células da glia em torno dos capilares também contribuem no mecanismo de “defesa”, devido à expressão desses transportadores nessas células.....71

**Figura 6:** Sistema de detecção de polimorfismos. O sistema de discriminação alélica é ativado pelo anelamento de sondas específicas *TaqMan<sup>TM</sup>* MGB ([www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)).....94

**Figura 7:** Gráfico alelo X x aleloY representativo dos três possíveis genótipos para determinado SNP. De acordo com a legenda do gráfico, os indivíduos XX, YY e XY estão

representados por e ,  e  respectivamente; NTC (No Template Control) e X (genótipo indeterminado).....96

**Figura 8:** Curvas de emissão de fluorescência através dos fluoróforos VIC e FAM. Representando os genótipos XX(fig.A), YY (fig.B) e XY (fig.C) de um SNP.....96

**Figura 9:** Representação dos passos necessários para a implantação da técnica SNPLEX. ....99

**Figura 10:** Representação da escada alélica mostrando todos os possíveis alelos a serem genotipados.....100

**Figura 11:** Representação de uma amostra genotipada.....101

**Figura 12:** Gráfico de clusterização mostrando os genótipos das amostras. Em vermelho estão os indivíduos A1A1, em verde A1A2 e em azul A2A2. Os eixos dos gráficos indicam a intensidade de fluorescência para cada um dos alelos (Alelo 1 x Alelo 2).....101

**Figura 13:** Representação do eletroferograma mostrando três diferentes amostras genotipadas para um mesmo SNP (rs17861094). **A.** Indivíduo heterozigoto AG. **B.** Indivíduo homozigoto GG. Indivíduo homozigoto AA.....102

**Figura 14:** Curva padrão para validação das reações de PCR em tempo real. Tela do aplicativo “7500 System SDS Software” mostrando a curva padrão gerada a partir do *log* da concentração das amostras (eixo x) e os Cts (eixo y). Notar quadro destacando o valor de *slope* (inclinação da reta) que é utilizado no cálculo da eficiência da amplificação.....109

## CAPÍTULO 1

**Figura 1:** Distribution of 119 SNPs of genomic control in six chromosomes containing all target genes.....126

**Figura 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.....128

**Figura 3:** Quantification of *ABCC2* gene in hippocampus of pharmaco-resistant patients, from surgeries, and healthy controls from autopsy.....130

**Figura 4:** Contribution of the genetic and environmental factors studied.....132

## CAPÍTULO 2

**Figura 1.** Distribution of 119 SNPs of genomic control in six chromosomes.....170

## CAPÍTULO 3

**Figura 1.** Resultado da expressão do gene *ABCC2* em hipocampo de 11 pacientes refratários à medicação antiepiléptica e em 6 amostras de indivíduos saudáveis provenientes de autópsia. Os valores no eixo Y são referentes aos valores de RQ (relative quantification).....180

**Figura 2:** Membrana de gel obtido através da técnica de *western blot*. Foi utilizado método colorimétrico de coloração, com fosfatase alcalina. O marcador utilizado foi o Kaleidoscópio (Bio-Rad). Os números identificam o tamanho das bandas em quilo-daltons (KDa). MRP2 (1:200);  $\beta$ -actina (1:1000).....181

## RESUMO

A Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM) representa a mais freqüente síndrome de epilepsia focal, sendo comumente associada à chamada esclerose mesial temporal (EMT). A ELTM tem grande importância clínica devido à alta frequência de pacientes refratários ao tratamento com drogas antiepilépticas (DAEs). Vários fatores genéticos e ambientais têm sido atribuídos à refratariedade medicamentosa nesses pacientes. Dentre as causas genéticas, acredita-se que variações alélicas, dadas por polimorfismos, em genes metabolizadores e transportadores de drogas podem ser responsáveis pela atuação e metabolização ineficientes das drogas, levando à refratariedade medicamentosa. Deste modo, o objetivo principal deste trabalho é avaliar se polimorfismos em alguns genes candidatos podem estar relacionados com a refratariedade medicamentosa na ELTM. Para tanto, foram selecionados polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês *single nucleotide polymorphisms* - SNPs) em duas categorias funcionais de genes candidatos: **i) genes transportadores de drogas**: 43 SNPs selecionados em 3 genes, *ABCB1*, *ABCC2*, e *RLIP76(RALBP1)* e **ii) genes metabolizadores de drogas** pertencentes ao sistema do citocromo P450: 95 SNPs em nove genes, *CYP1B1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2E1*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2D6*. Foram genotipados dois grupos de pacientes não relacionados, com ELTM, sendo 78 pacientes responsivos ao tratamento com DAEs (responsivos às DAEs) e 164 farmacoresistentes (resistentes às DAEs). Para assegurar que ambos os grupos poderiam ser comparáveis do ponto de vista de estrutura genética, todos os pacientes foram genotipados para 119 SNPs adicionais não relacionados aos genes candidatos de interesse. Os cálculos de AMOVA e *Fst* entre os grupos, mostram que não há estruturação populacional, portanto, ambos os grupos selecionados podem ser comparados entre si em estudos de associação. Após cálculo das frequências gênicas para os 141SNPs genotipados nos genes candidatos, 75 SNPs tiveram que ser descartados pois não se encontravam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e apresentaram MAF (do inglês, *minor allele frequency*) menor que 5%. No grupo dos genes transportadores nossos resultados mostraram associação com um SNP sinônimo rs3740066 (Ile1324Ile), presente no exon 28 do gene *ABCC2*, onde o alelo C é mais freqüente no grupo de pacientes resistentes às DAE. Além disso, experimentos adicionais mostraram que

a expressão do gene *ABCC2* em hipocampo de pacientes resistentes às DAEs está aumentada em relação ao hipocampo de indivíduos sem ELTM, provenientes de autópsia. Para os genes do CYP450, foram encontradas associações em SNPs intrônicos presentes nos genes *CYP1B1* e *CYP1A2*, para as variantes genótípicas rs2551188-TT e rs12904742GG, respectivamente, além de duas variantes associadas no gene *CYP2C9*: rs2153628AA e rs4086116CT, sendo que todas as variantes citadas acima são mais freqüentes nos pacientes resistentes às DAEs. Também foi encontrada associação para variantes alélicas nos genes *CYP2C9*: rs4086116T, *CYP1A2*: rs12904742G e *CYP2C9*: rs1934963C. Do mesmo modo, estes alelos são mais freqüentes em pacientes resistentes às DAEs. Há diferença estatisticamente significativa quanto à presença de atrofia hipocampal entre os grupos, sendo esta mais freqüente no grupo de farmacoresistentes ( $p=0,0000068$ ), sendo que, através do cálculo de regressão passo a passo, a presença de atrofia hipocampal contribui com 9% de influência na refratariedade medicamentosa no grupo de pacientes analisados. Já os fatores genéticos associados à farmacoresistência analisados neste trabalho contribuem com 12% para o fenótipo da farmacoresistência nestes pacientes. Portanto, pode-se concluir que os 79% restantes de influência na refratariedade medicamentosa em pacientes com ELTM pode ser atribuído a outros fatores ainda não identificados. Finalmente, pode-se afirmar que nosso trabalho fornece fortes evidências indicando que a refratariedade medicamentosa em pacientes com ELTM é de causa poligênica e multifatorial, já que comprovamos a evidente influência genética e ambiental.

## ABSTRACT

Mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) is the most frequent syndrome of focal epilepsy and it is often associated with mesial temporal sclerosis (MTS). MTLE has great clinical importance because it is associated with a significant proportion of patients who do not respond to treatment with antiepileptic drugs (AEDs). Several genetic and environmental factors have been attributed to failure in response to AEDs in these patients. Among the genetic causes, it is believed that allelic variations in drug-transporter and metabolizing genes may be responsible for inefficient performance and metabolism of drugs, leading to failure in drug response. Thus, the main objective of this study is to verify whether polymorphisms in candidate genes may be related to drug refractory MTLE. To accomplish this objective we selected single nucleotide polymorphisms (SNPs) in two functional categories of candidate genes: **i) drug-transporter genes**: 43 SNPs in three selected genes, *ABCB1*, *ABCC2*, and *RLIP76 (RALBP1)* and **ii) drug-metabolizing genes** belonging to the cytochrome P450 system: 95 SNPs in nine genes, *CYP1B1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2E1*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2D6*. Were genotyped two groups of unrelated patients with MTLE, 78 patients who responded to treatment with antiepileptic drugs (AED-responsive) and 164 pharmacoresistant patients (AED-pharmacoresistant), classified according to previously determined clinical criteria. Moreover, to ensure that both groups could be comparable in terms of genetic structure, all patients were genotyped for 119 additional SNPs not related to the candidate genes. Using the AMOVA and Fst calculation we showed that there is no population structure in both groups (AED-responsive and AED-pharmacoresistant); therefore, they can be compared in association studies. After calculation of gene frequencies of the 141 SNPs selected and genotyped in candidate genes, 75 SNPs were eliminated because there were not in *Hardy-Weinberg* equilibrium ( $p < 0.05$ ) and showed minor allele frequency (MAF) lower than 5%. In the group of transporter genes our results showed an association with a synonymous SNP rs3740066 (Ile1324Ile), present in exon 28 of *ABCC2* gene, where the C allele is more frequent in the group of refractory patients. In addition, further experiments showed that expression of the *ABCC2* gene in the hippocampus of pharmacoresistant patients is increased when compared to the hippocampus of individuals without MTLE, from autopsy.

For drug metabolizing CYP450 genes, association was found with intronic SNPs present at genes *CYP1A2* (rs2551188-TT) and *CYP1B1* (rs12904742GG), as well as with 2 additional SNPs at gene *CYP2C9* gene: rs2153628AA and rs4086116CT. All variants mentioned above are more frequent in pharmacoresistant patients. In addition, we found association for allelic variants at *CYP2C9*: rs4086116T, *CYP1A2*: rs12904742G and *CYP2C9*: rs1934963C, likewise, the alleles described are more frequent in pharmacoresistant patients. There is a statistically significant difference regarding the presence of hippocampal atrophy between the groups, being more frequent in group farmacoresistentes ( $p = 0.0000068$ ). The stepwise regression analysis shows that the presence of hippocampal atrophy contributes with 9% of the total variability influencing pharmacoresistance in these MTLE patients. When analyzing the combined effect of the genetic factors which were found to be associated with pharmacoresistance in this study we conclude that their overall contribution to pharmacoresistance was 12%. Therefore, we can conclude that the remaining 79% of variability influencing pharmacoresistance in our group of patients with MTLE can be attributed to other factors not yet identified. Finally, our results show strong evidence indicating that pharmacoresistance in patients with MTLE is polygenic and multifactorial, since it shows clear genetic and environmental influences.



# INTRODUÇÃO GERAL

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Farmacogenética

A farmacogenética refere-se ao estudo das variações genéticas individuais que levam à obtenção de diferentes respostas à ação dos medicamentos. Esta ciência estuda genes que codificam proteínas envolvidas de alguma forma no mecanismo de ação, transporte e/ou metabolização das drogas em níveis celular, tecidual, individual ou populacional (Pirazzoli & Recchia, 2004). O termo “farmacogenética” foi utilizado pela primeira vez na década de 50 pelo geneticista alemão Friedrich Vogel, após a verificação da existência de diferentes respostas obtidas a partir de uma mesma droga ministrada em doses equivalentes, e do fato de que algumas dessas respostas apresentavam um padrão de herança mendeliana simples (Shields et al., 1994). Alguns estudos que precederam essa fase, foram fundamentais na área da farmacologia e da genética para a compreensão da diferença de resposta ao tratamento, como por exemplo, o entendimento de que o desenvolvimento de neuropatias a partir da administração da droga *isoniazida*, utilizada no tratamento da tuberculose, foram resultantes de variações genéticas na enzima N-acetiltransferase (Kallow, 2001a; Kallow, 2001b). Atualmente, o foco dos estudos está voltado para um ou mais genes específicos que, devido às variações alélicas entre indivíduos, alteram a resposta ao tratamento medicamentoso.

De acordo com Jonhson (2003), os resultados do tratamento medicamentoso podem variar dentro de uma mesma população. Embora alguns indivíduos obtenham os efeitos desejados, outros podem obter uma resposta diminuída ou mesmo não alcançar nenhuma resposta ao tratamento com medicamentos. Além do mais, certos indivíduos podem vir a apresentar efeitos adversos levando a uma diminuição da qualidade de vida do paciente.

Vários fatores podem contribuir para a variedade na resposta às drogas como: idade, raça, sexo, interações com outras drogas, doenças concomitantes, função hepática e renal comprometidas (Jonhson, 2003). Entretanto, nos últimos anos, aumentaram as evidências de que as diferenças genéticas entre indivíduos podem ser importantes fatores que levam às variadas respostas às drogas. Embora a farmacogenética seja uma área bem definida, maiores estudos são necessários para o entendimento de como a genética do indivíduo pode

“comandar” e influenciar a resposta aos medicamentos. Com isso, a aplicabilidade na clínica é fundamental para a escolha do melhor medicamento e conseqüentemente da dosagem para determinado paciente ou grupo de pacientes, ou seja, um medicamento que gere uma resposta satisfatória por parte do indivíduo sem desencadear efeitos adversos.

Na farmacologia podemos entender o mecanismo de ação das drogas sob duas perspectivas: a partir da farmacodinâmica e da farmacocinética das drogas. A farmacodinâmica descreve os efeitos da droga no corpo, e a farmacocinética explica desde a absorção da droga, passando pela distribuição, até a metabolização e eliminação da mesma (Rang et al., 2007). De modo geral, pode-se dizer que a farmacodinâmica explica o que a droga faz para o corpo e a farmacocinética traduz o que o corpo faz com a droga. Frequentemente, as enzimas metabolizadoras e transportadoras de drogas contribuem para a farmacocinética do indivíduo e, proteínas responsáveis pelo efeito da droga no organismo do paciente, como as proteínas que atuam como alvos das drogas estão envolvidas nos processos de farmacodinâmica. Sendo assim, qualquer uma destas proteínas envolvidas nas vias de farmacodinâmica e farmacocinética podem contribuir para a variabilidade entre pacientes na eficácia da droga e toxicidade, podendo ser genes candidatos em estudos de farmacogenética (Jonhson, 2003).

A resposta do indivíduo às drogas é determinada não apenas por um único parâmetro, ou mais precisamente, um único gene responsável pelas respostas variadas aos medicamentos, mas, é caracterizado por um fenótipo complexo, resultado da ação de fatores ambientais e genéticos agindo em conjunto com efeitos aditivos ou sinérgicos (Lander & Schork, 1994; Risch & Merikangas, 1996; Botstein & Risch, 2003).

Os estudos de farmacogenética são realizados a partir de associação genética, que busca identificar diferenças nas frequências alélicas em genes candidatos em uma amostra populacional constituída por dois grupos, um com a característica de interesse (grupo caso) e outra sem a característica de interesse (grupo controle), a fim de comparação (Kruglyak, 1997; Burton et al., 2005; Barret et al., 2005;). Em farmacogenética, os estudos de associação são conduzidos, na maioria das vezes, pelo método de análise indireta baseado na teoria de que variáveis genéticas comuns causam susceptibilidade ao desenvolvimento do

fenótipo comum (Kruglyak, 1999; Cardon & Bell, 2001; Stephens et al., 2001; Lohmueller et al., 2006).

A análise indireta evita a necessidade de catalogar todos os potenciais loci de susceptibilidade em regiões codificadoras e regulatórias em genes candidatos, como é proposto na análise direta. A análise indireta aposta na associação entre a característica de interesse e polimorfismos localizados próximos a um alelo de risco (Kruglyak, 1999). Essas associações são definidas pela análise de desequilíbrio de ligação (DL) entre o loco de risco e os polimorfismos próximos. Os polimorfismos de base única são marcadores utilizados extensivamente nestes estudos devido à alta frequência, baixas taxas de mutação e à existência de variadas técnicas de genotipagem (Burton et al., 2005; Barrett et al., 2005).

Segundo Hiratsuka et al. (2006), polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são capazes de produzir alterações na resposta a fármacos, transformando-se em alvo de pesquisa em farmacogenômica. Vários polimorfismos em genes que codificam enzimas metabolizadoras, transportadores e receptores para diversos medicamentos já foram descritos, indicando uma estreita associação entre a farmacogenética e a eficácia das drogas (Löscher et al., 2009).

## 1.2 Polimorfismos de base única (SNPs)

No início dos anos 2000, com a modernização das técnicas de sequenciamento e, com o estabelecimento de consórcios entre laboratórios e centros de pesquisa de vários países, tornou-se possível o sequenciamento do genoma de diversos organismos incluindo, numa primeira tentativa, o sequenciamento do genoma humano (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001), que atualmente é considerado completo (Collins et al., 2003). Antes do sequenciamento, era esperado que a espécie *Homo sapiens* fosse detentora de aproximadamente 100 mil genes, mas após o sequenciamento viu-se que o genoma da espécie humana é composto por cerca de 30 mil genes, menos que a espécie vegetal *Arabidopsis thaliana*, planta modelo em estudos moleculares. Talvez a resposta para a complexidade da espécie humana esteja não no número de genes, mas na regulação da expressão destes genes. Em contrapartida, no decorrer do processo de sequenciamento, foram identificados milhões de polimorfismos de base única (SNPs, do inglês Single

Nucleotide Polimorphisms) (Sachidanandan et al., 2001 ). A identificação de SNPs no genoma humano tem contribuído de forma significativa para os estudos moleculares, principalmente aqueles ligados ao mapeamento genético (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/snps.html>).

Sendo assim, o grande desafio para a medicina genômica está na compreensão de como a variabilidade alélica e a funcionabilidade dos polimorfismos de DNA estão relacionados com a predisposição para desenvolvimento de doenças complexas e mecanismos variados de resposta às drogas (Peltonem & Mckusick, 2001; Nebert et al., 2008).

Os polimorfismos de base única (SNPs) são encontrados no genoma humano aproximadamente a cada 500 pares de base, sendo mais frequentes em regiões intrônicas e menos frequentes em regiões codificantes, ou seja, sua ocorrência não é totalmente aleatória, mas depende da região do gene. Deste modo, os SNPs representam as variações mais comuns no genoma humano.

Os SNPs são geralmente de natureza polimórfica do tipo bialélica, podendo ocorrer em menor frequência polimorfismos do tipo tri ou tetralélica (Brown, 2002). A maior frequência de polimorfismos do tipo bialélico pode ser devido ao fato de que o SNP é originário de uma mutação pontual no genoma. Essas mutações são originadas através de erros na replicação do DNA, como por exemplo falhas da enzima DNA polimerase. Essas mutações geradas podem ser do tipo transições (purina - purina ou pirimidina - pirimidina), mais frequentes, ou do tipo transversões, mais raras (purina - pirimidina ou pirimidina - purina). As transversões são, geralmente, causadas por alterações químicas (metilação, desaminação oxidativa, tautomeria) de origem espontânea ou induzida (Brown, 2002). Para que ocorra a fixação das mutações, forças evolutivas como seleção natural, deriva gênica e fluxo gênico devem atuar na população modulando as variações. Para que um terceiro alelo ocorra, é necessário uma segunda mutação em outro indivíduo, distinta da primeira na mesma posição no genoma, levando à geração de um SNP trialélico na população. A fixação desses alelos ocorrerá se as mutações forem transmitida para as gerações futuras e se mantiverem em frequência na população (Brown, 2002).

A primeira estimativa do possível número de SNPs no genoma humano foi de 1.42 milhão de SNPs por Sachidanandan et al. (2001). Atualmente, o banco de dados de SNPs

do Centro Nacional para Informação Biotecnológica dos EUA (do inglês, NCBI, *National Center for Biotechnology Information*), têm depositados mais de 23 milhões de polimorfismos do tipo SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). Com base na análise funcional de SNPs presentes em regiões codificantes e devido à degeneração do código genético, que resulta em SNPs sinônimos (altera nucleotídeo, altera códon, mas não altera aminoácido), menos de 1% dos SNPs exerce impacto direto na estrutura e função da proteína (Venter et al., 2001). Portanto, a grande maioria dos SNPs está presente em regiões não codificantes ou representam alterações silenciosas. Mas, há evidências de que polimorfismos em regiões não codificantes podem estar envolvidos em processos de regulação de expressão gênica, como alteração de sítio de “*splicing*” e produção de microRNAs (miRNA) (Prokunina & Alarcón-Riquelme, 2004; Weber, 2005). Em eucariotos, os níveis de RNAm e proteína são controlados frequentemente por elementos regulatórios na região não codificante 3'UTR (do inglês, *untranslated region*), e polimorfismos nessa região podem atuar na regulação da expressão gênica (Mazunder, 2003). Já os miRNAs promovem a poliadenilação dos RNAm, provavelmente devido à interação com elementos de poliadenilação citoplasmática ou complexos protéicos que se ligam às regiões 3'UTR (Jing et al., 2005; Standart & Jackson, 2007).

Sendo assim, o mapeamento de SNPs torna-se uma ferramenta muito eficaz em estudo de associação em populações (caso-controle) (Risch & Merikangas 1996; Kruglyak, 1997, 1999; Wang et al., 1998).

### **1.3 Desequilíbrio de Ligação**

Estudos de associação genética indireta utilizando polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), são possíveis porque, ao menos em parte, estes estudos são dependentes da existência do desequilíbrio de ligação (DL) entre marcadores genéticos e o locus da doença (Clark, 2003). DL é um conceito de correlação estatística entre alelos que segregam juntos em dois ou mais loci, já o equilíbrio de ligação refere-se ao estado em que os alelos em seus respectivos loci são independentemente distribuídos em relação à outro alelo em locus alternativo (Schrodi et al., 2007). Uma variedade de processos pode acarretar o DL em um conjunto de cromossomos, entre eles: seleção natural, miscigenação e novas mutações (Otha & Kimura, 1971; Ewens, 1979; Hudson, 1983). Nesse contexto, a combinação

particular de alelos em desequilíbrio de ligação ao longo de um segmento cromossômico de baixa recombinação, herdado de forma independente, é denominado haplótipo (*The International HapMap Consortium*, 2005).

Como o DL é uma medida estatística, o seu cálculo é baseado em medir o quanto um alelo está associado ao outro. Os métodos estatísticos mais utilizados são baseados nas frequências alélicas dos loci estudados, onde é verificada a diferença entre a frequência de haplótipo observada e esperada através do parâmetro de desequilíbrio de ligação ( $D'$ ) (Lewontin, 1964). Assim, as estatísticas de DL variam no modo em que empregam essa diferença. O primeiro modelo é o desequilíbrio gamético simples ou  $D'$ . Essa estatística estabelece que os alelos dos loci sejam idênticos por estado (Daly et al., 2001). O desequilíbrio gamético simples é baseado nas frequências alélicas observadas (Lewontin, 1995). Já o segundo modelo para cálculo de DL é conhecido como  $r^2$ . Este modelo é baseado na probabilidade de que dado dois alelos em determinado locus sejam idênticos por descendência, então dois alelos em um segundo locus também serão idênticos pelo mesmo modo (Sved, 1971).

Ao longo dos cromossomos encontra-se uma variação no padrão de DL formando os blocos haplotípicos. Esta variação é formada por segmentos com tamanhos variados com alto DL e segmentos com baixo DL que possuem altas taxas de recombinação (Gabriel et al., 2002; Cardon & Abecasis, 2003; *International HapMap Consortium*, 2005). A estrutura dos blocos haplotípicos varia entre grupos populacionais. Em europeus, por exemplo, as regiões com alto DL variam em média entre 20 e 40Kb, enquanto que em africanos, este valor não passa de 10kb (Reich et al., 2001; Gabriel et al., 2002).

O estudo de SNPs em DL é uma estratégia para identificar genes de susceptibilidade em doenças complexas (Schrodi et al., 2007). O sucesso deste tipo de estudo depende unicamente do DL entre SNPs funcionais e SNPs comuns, tido como marcadores ao redor do SNP causal. Nas regiões de alto DL podem haver SNPs comuns que indiquem associação por estarem em DL com o SNP causal. Os SNPs que possuem essa característica são chamados de tagSNPs, pois representam outros com grande eficiência estatística em regiões com alto desequilíbrio de ligação (Gabriel et al., 2002). As chances de se detectar uma associação genotipando parte dos polimorfismos nessas regiões podem ser as mesmas do que quando se genotipa todos os SNPs (Gabriel et al., 2002). Ao contrário, em regiões

de baixo desequilíbrio de ligação, faz-se necessário, a fim de encontrar loci associados com doença, a genotipagem de todos os polimorfismos existentes, pois há baixa correlação entre eles, o que torna dispendioso os estudos de associação genética (Gabriel et al., 2002; Cardon & Abecasis, 2003; *International HapMap Consortium*, 2005).

Portanto, o uso de blocos haplotípicos em estudos de associação por DL tem grande importância na associação de genes candidatos em doenças complexas. Avanços nas tecnologias mais simples permitem que os estudos sejam feitos tanto em regiões gênicas de pequenas extensões em estudos de associação indireta como em estudos de associação em genoma completo (Stranger et al., 2005; Sladek et al., 2007). Sendo assim, o entendimento da relação entre estrutura genética das populações e padrões de DL são cada vez mais fundamentais nos estudos de associação.

#### 1.4 Estrutura Genética de Populações

A estruturação genética de populações é um termo muito utilizado em genética de populações para designar diferenças nas frequências alélicas e genotípicas entre populações (Futuyma, 2002). A estrutura genética das populações varia de acordo com a influência de forças evolutivas, tais como: fluxo gênico, seleção natural, deriva gênica, mutação e recombinação. Outros fatores também podem alterar a estruturação genética das subpopulações como, endogamia, tamanho efetivo populacional, migração, efeito fundador e efeito *bottleneck* (Futuyma, 2002). Todos esses eventos alteram as frequências alélicas e genotípicas modificando a estrutura genética da população em questão.

Para conhecer a população a ser estudada, é necessário verificar a variação dos polimorfismos genéticos dos indivíduos juntamente com métodos estatísticos para medir esta variação entre e dentro das populações (Hartl & Clark, 1997). O conceito de variação genética fez com que o matemático inglês Godfrey Hardy (Hardy, 1908) e o médico alemão Wilhelm Weinberg (Weinberg, 1908) desenvolvessem independentemente um princípio matemático que é conhecido como equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW). Esta lei indica que após uma geração de acasalamentos aleatórios, as frequências genotípicas em um único locus atingirá o equilíbrio, tornando-se fixa. Representa também as frequências de equilíbrio, que podem ser representadas por uma função simples das frequências alélicas neste locus, ou seja, o equilíbrio é a consequência direta da segregação dos alelos na meiose



dos heterozigotos (Hardy, 1908, Hartl & Clark, 1997). As frequências genotípicas seguem a equação do EHW, representada por:  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$  (sendo  $p$  = frequência do alelo A e  $q$  = frequência do alelo B). O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* representa uma população no seu equilíbrio genético, mas este princípio refere-se somente a populações mendelianas em equilíbrio, onde cruzamentos ocorrem ao acaso (panmixia) e com ausência de forças evolutivas (Hardy, 1908, Hartl & Clark, 1997).

Os conceitos de estrutura populacional em genética foram desenvolvidos por Sewall Wright para quantificar as diferenças genéticas entre subgrupos a partir dos níveis de heterozigose média e sua relação entre e dentro das populações. Essas relações foram matematicamente categorizadas e são conhecidas por estatísticas F de Wright ou por índice de fixação (Wright, 1965). As estatísticas F em genética são utilizadas para estabelecer uma relação do nível de heterozigose em uma população e as causas de sua redução quando comparadas ao esperado, segundo o EHW. Essas mudanças podem ser causadas por eventos como deriva genética, endogamia, seleção natural e mutação.

A estratificação populacional pode ocorrer em grupos que possuem frequências alélicas diferentes entre e dentro de subgrupos populacionais ou entre populações miscigenadas com diferentes ancestralidades. A maior parte da variabilidade genética entre humanos ocorre dentro das populações (80-90%), enquanto a menor parte da variação ocorre entre as populações, sugerindo que não ocorre estruturação populacional na espécie humana (Pritchard & Rosenberg, 1999; Rosenberg et al., 2002). Isso faz com que a maioria das populações tenha alelos em comum para qualquer locus, ou seja, a presença de alelos muito frequentes pode ser observada em diversas populações. Por outro lado, mesmo a pequena parte que é distinta entre uma população e outra possibilita identificar a diferença entre grupos continentais (Bastos-Rodrigues, 2006; Pimenta et al., 2006).

Segundo Rosenberg e colaboradores (2002), existem 5 grandes populações humanas mundiais: África sub-Saariana, Ásia Oriental, Oceania, Américas (índios nativos) e um maior grupo que engloba Europa, norte da África e Ásia Ocidental (Rosenberg et al., 2002). No entanto, algumas populações, como principalmente a Européia, ainda podem ser divididas (nórdicas e mediterrâneas) (Tian et al., 2006), indicando que na pequena porção que diferencia uma população da outra existem loci com frequência alélicas e genotípicas que diferem, podendo detectar pequena estruturação populacional.

Em muitos estudos observa-se que o desequilíbrio de ligação varia entre populações e também entre e dentro dos loci numa mesma população (Reich et al., 2001; Gabriel et al., 2002). Portanto a estruturação de populações é um fator que deve ser considerado em um estudo de associação genética, pois se houver estruturação da amostra (populações em estudo), os resultados de variação das frequências alélicas e genotípicas entre as populações estudadas (caso-controle) podem ser devido à estruturação genética e não devido à característica de interesse, doença por exemplo. Com base neste fato, instituições públicas e privadas se associaram para efetuar um mapa de haplótipos de algumas populações mundiais, esta iniciativa teve início em 2002 e denomina-se projeto HapMap.

### **1.5 Consórcio Internacional de Mapa de Haplótipos – HapMap**

O projeto HapMap (Weiss & Clark, 2002) é um projeto criado a partir do Projeto Genoma Humano, cujo objetivo foi fazer um mapa de haplótipos em quatro populações mundiais e organizar um banco de dados público para os polimorfismos (SNPs) mais comuns do genoma humano, a fim de facilitar e guiar estudos de associação genética em doenças complexas (*International HapMap Consortium, 2005*).

Este projeto tornou-se possível pelos seguintes fatores: (a) disponibilidade da sequência completa do genoma humano; (b) bancos de dados de SNPs comuns que facilitam o desenvolvimento de ensaios de genotipagem; (c) informações sobre DL em humanos; (d) desenvolvimento de tecnologias de genotipagem mais acessíveis financeiramente; (e) ferramentas da *web* (internet) para armazenar e compartilhar dados; (f) direcionamento de tópicos para as questões étnicas e culturais (*International HapMap Consortium, 2005*).

Para construir e disponibilizar na internet um mapa de haplótipos baseado em um banco de genótipos de SNPs ao longo de todo o genoma humano, o Consórcio utilizou quatro populações humanas distintas, englobando os três grupos populacionais definidos por Rosenberg e colaboradores (2002), sendo este composto por 90 indivíduos (30 trios – pai, mãe e filho) da população de Yoruba em Ibadan, Nigéria (YRI); 45 japoneses não relacionados de Tóquio, Japão (JPT); 45 chineses não relacionados de Beijing, China (CHB) e 90 indivíduos (30 trios) norte-americanos residentes de Utah com ancestralidade na Europa nórdica e ocidental (CEU) (*International HapMap Consortium, 2005*). Após três

anos de pesquisa, o projeto HapMap conseguiu atingir a meta de aproximadamente um milhão de SNPs genotipados nas quatro populações e depositados no banco de SNPs do ncbi ([www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP)). A partir dos dados de frequências alélicas e genotípicas e, utilizando métodos estatísticos computacionais, foi possível identificar haplótipos para cada grupo populacional (*International HapMap Consortium*, 2005).

Em 2007 foi publicado a fase II do projeto HapMap (*International HapMap Consortium*, 2007) com a genotipagem de 3.1 milhões de SNPs nas populações de CEU, YRI, CHB, JPT. Em 2008, deu-se início à fase III do projeto com a inclusão de mais sete populações humanas: 83 indivíduos norte-americanos do sudeste dos EUA com descendência africana (ASW); 86 indivíduos não relacionados norte-americanos descendentes de chineses da região metropolitana de Denver, Colorado (CHD); 88 índios Gufarati não relacionados de Houston, Texas (GIH); 90 africanos não relacionados da região de Luhya em Webuye, Kênia (LWK); 77 norte-americanos com descendência mexicana residentes em Los-Angeles, Califórnia (MEX); 171 africanos da região de Massai em Kinyawa, Kênia (MKK); 88 italianos da região da Toscana (TSI). Foram incluídos mais 84 indivíduos na população de CEU; mais 41 indivíduos na população de CHD; 44 indivíduos na população de JPT; e 86 indivíduos na população de YRI.

O projeto HapMap baseia-se no princípio de que o padrão de desequilíbrio de ligação é baseado nas taxas de recombinação e atua de maneira similar em todas as populações. Porém, efeitos demográficos como efeito fundador, miscigenação e estratificação da amostra também possuem importante papel na determinação do padrão de DL nas populações (Cardon & Abecasis, 2003; Philliphs et al., 2003; Crawford et al., 2004). Estudos mostram que a transferabilidade dos tagsSNPs nas populações estudadas no HapMap para outras populações é eficiente se as populações forem etnicamente similares, podendo não ser tão informativa em populações miscigenadas ou em populações diferentes do HapMap (De Bakker et al., 2006; Gu et al., 2007), uma vez que podem apresentar diferentes padrões de DL. Nesse sentido, a transposição de dados de populações do HapMap para populações brasileiras torna-se difícil, devido ao alto grau de miscigenação e heterogeneidade genética, mesmo se forem usados dados da população africana (YRI) e/ou CEU (européia) que contribuíram geneticamente para a formação da população brasileira. Sendo assim, em estudos de associação, principalmente em populações miscigenadas, faz

necessário o uso de um controle genômico como ferramenta para verificar se há estruturação dos grupos estudados.

### **1.6 Controle Genômico**

Uma ferramenta para encontrar loci em doenças complexas é o mapa de associação, sendo que o mais simples e efetivo método é o estudo de associação caso-controle. De acordo com Shmulewitz et al., (2004) o modelo de estudo caso-controle identifica marcadores com diferentes frequências alélicas em casos (indivíduos com o fenótipo de interesse) e controles (sem o fenótipo). Uma associação estatisticamente significativa entre o alelo e a doença sugere que o locus influencia na causa da doença e que o alelo marcador (causal) é identificado ou está em desequilíbrio de ligação com a variante causal. Entretanto, um resultado positivo de um estudo de associação pode ser devido à estratificação da amostra mais que o desequilíbrio de ligação. A estratificação da amostra (população) estudada pode existir quando a população do estudo não é homogênea, podendo ser dividida em subpopulações com variações na prevalência da doença (fenótipo) e diferenças na frequência alélica do marcador (Shmulewitz et al., 2004).

Sendo assim, qualquer alelo marcador com uma frequência maior em subpopulações pertencentes à amostra estudada mostrará associação com a doença, mesmo se não houver relação posicional ou causal entre ambos. Isso aumenta a razão de falsos positivos esperada (FPR), sendo o resultado “positivo” devido à estratificação da amostra (Li, 1972). Em um estudo de associação é difícil determinar se a amostra é proveniente de uma população estratificada, por isso, pesquisadores têm utilizados estudos com base em famílias (Falk & Rubinstein, 1987). No entanto, segundo Shmulewitz (2004), o estudo de associação caso-controle tem vantagens sobre aqueles familiares, como a coleta e genotipagens de um número maior de amostras. Ainda em relação ao autor, coletar famílias pode implicar em um custo maior, dispender mais tempo e gerar dificuldade em casos de doenças com estigma social ou doenças que tenham idade de início tardia. Portanto, o uso do controle genômico em estudos de associação, faz com que os estudos caso-controle sejam o método mais adequado de escolha para testar associações genéticas.

O método do controle genômico (CG) utiliza-se de marcadores randômicos para eliminar associações devido à estratificação (Devlin & Roeder, 1999). Como no trabalho de

Kwan et al. (2007), um estudo multicêntrico feito com chineses Han, onde foram selecionados oito polimorfismos do HapMap em 8 diferentes cromossomos (1 por cromossomo), sendo que nenhum foi relacionado com a característica de interesse, no caso, resposta às DAEs. O estudo de Siddiqui et al., (2003), que encontrou pela primeira vez a associação com o polimorfismo C3435T (*ABCB1*) em pacientes ingleses, também fez uso do controle genômico em sua amostra, utilizando um conjunto de nove inserções Alu, distribuídas pelo genoma e não ligadas ao gene de interesse.

A população brasileira é uma população altamente heterogênea, tendo contribuições das populações européias, africana e indígena. Segundo Estrela et al., (2008), a identificação das raças na população brasileira de acordo com as categorias raciais baseadas em cor de pele, como propõe o Censo Brasileiro, é insuficiente para ser utilizado como controle da estratificação em estudos farmacogenômicos do gene *ABCB1*, sendo necessário fazer o controle genômico em amostras provenientes da população brasileira.

### **1.7 Epilepsia de Lobo Temporal Mesial e a Refratariedade Medicamentosa**

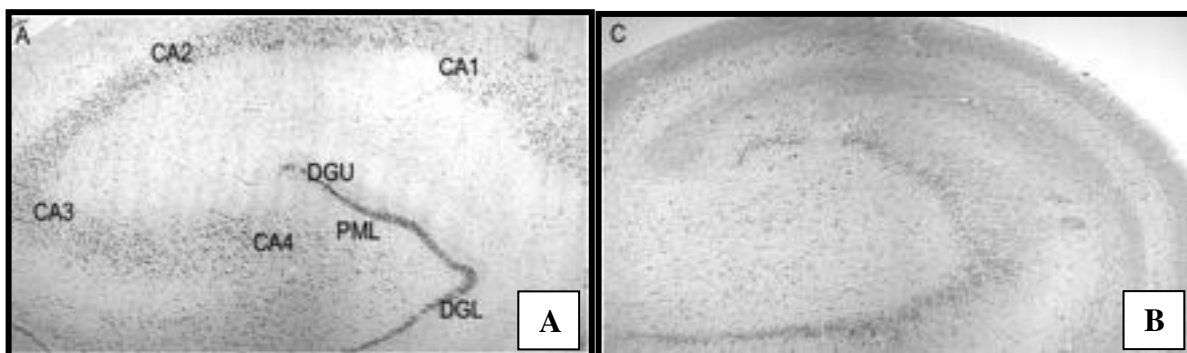
A epilepsia não é considerada uma doença única, mas que engloba várias síndromes, com diversas etiologias e prognósticos. No entanto, possuem como característica comum, as crises epiléticas recorrentes. A crise epilética é um estado transitório de sinais e/ou sintomas devido a uma atividade excessiva anormal ou sincronia neuronal no cérebro (Fisher et al, 2005). A epilepsia atinge cerca de 1% da população mundial (Binder & Sternhäuser, 2006), aproximadamente 50 milhões de pessoas, sendo que destes, cerca de 40 milhões não recebem tratamento apropriado (Ndoye et al., 2005).

Segundo a *International League Against Epilepsy* (ILAE, 1989), as epilepsias podem ser divididas em síndromes generalizadas quando as descargas epiléticas envolvem o córtex cerebral em ambos os hemisférios, e em síndromes focais quando inicialmente são acometidas regiões corticais restritas (ILAE,1989).

Dentre as várias epilepsias, a Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM) é a mais freqüente síndrome epilética focal (Sutula, 1990; Engel et al., 1999). Esta síndrome é caracterizada por crises parciais complexas e seus principais sintomas estão associados ao comprometimento de estruturas mesiais do lobo temporal, onde a principal estrutura

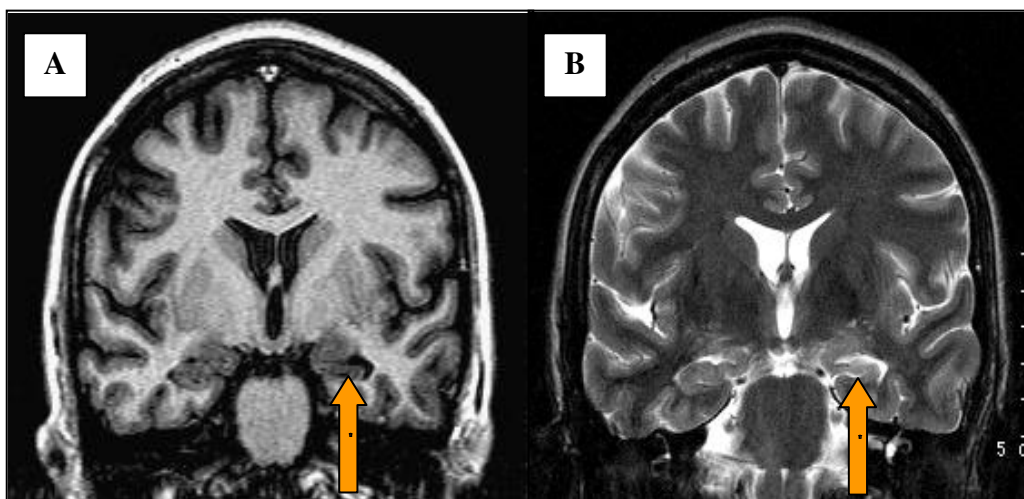
acometida é o hipocampo (Sutula, 1990; Mathern et al., 1995a; Coan et al., 2003). A associação entre esclerose mesial temporal (EMT) e ELTM é amplamente conhecida, e a principal evidência *in vivo* é a atrofia hipocampal vista nos exames de ressonância magnética (RM) (Fisher et al., 1998; De Lanerolle et al., 2003).

Histologicamente, o comprometimento do hipocampo na esclerose mesial temporal é caracterizado pela redução do número de neurônios principalmente nos setores CA1 e CA3 do hipocampo podendo atingir também a região hilar, acompanhada de gliose em diferentes graus. Já na região CA2, a perda neuronal tem-se mostrado mais resistente (Babb & Brown, 1987; Blumcke et al., 1999; Lee et al., 2004). Os cortes histológicos de hipocampos, com e sem EMT, são mostrados na figura 1 (Proper et al., 2000).



**Figura 1:** Cortes histológicos de hipocampo. Em destaque regiões CA1, CA2, CA3 e CA4. (A): corte de hipocampo normal. (B): corte histológico de hipocampo com esclerose. DGU: camada superior do giro denteado; DGL: camada inferior do giro denteado; PML: camada polimórfica do giro denteado.

Como mencionado anteriormente a atrofia hipocampal pode ser caracterizada *in vivo* por meio de imagens de RM, nas quais se pode observar uma diminuição no volume e alteração da estrutura interna do hipocampo nas aquisições em T1 (Figura 2A) e a presença de hipersinal nas aquisições em T2 (Figura 2B), indicando a atrofia das estruturas mesiais. (Jackson et al., 1993; Van Paesschen et al., 1995).



**Figura 2.** Imagens de ressonância magnética. (A): aquisição em T1- diminuição do volume do hipocampo e alteração de sua forma; (B): aquisição em T2 – aumento de sinal que reforça a presença de atrofia.

A EMT é reconhecidamente a neuropatologia mais comumente encontrada em pacientes com refratariedade medicamentosa (Margerison et al., 1966; Falconer et al., 1988; Babb & Brown, 1987; Binder & Steinhäuser, 2006). Estudos mostram que de 10 a 40% dos pacientes com ELTM associada à esclerose hipocampal conseguem um controle eficaz das crises por meio do uso de drogas antiepiléticas (DAEs) durante o tratamento (Coan et al., 2003), sendo que a porcentagem de indivíduos farmacoresistentes entre os pacientes com ELTM pode chegar aos 75% (Holmes, 2004). Portanto, em uma porcentagem que pode variar entre 65% e 75% dos pacientes com ELTM associada à EMT existe a indicação ao tratamento cirúrgico como uma alternativa terapêutica para o controle das crises (Babb & Brown, 1987). Desse modo, já tem sido reconhecida a associação entre EMT e seus marcadores *in vivo* (tais como atrofia hipocampal na RM) como um fator possivelmente associado à refratariedade medicamentosa (Stephen et al., 2001). Além da atrofia hipocampal (RM), a presença de hipersinal apresenta uma forte correlação com os achados histopatológicos da esclerose mesial temporal (Cendes et al., 1993a:b) permitindo que a presença da AH seja considerada um marcador *in vivo* da EMT.

Avanços recentes na medicina molecular indicam que diferenças individuais na resposta a drogas de variadas classes farmacológicas são resultantes de uma combinação de fatores genéticos e ambientais (Sisodiya, 2003; Ferraro & Buono, 2005). Nesse sentido, a

refratariedade medicamentosa pode ser causada por fatores relacionados à fisiopatologia da doença, como a reorganização de neurônios, e também por diferenças farmacogenéticas que ocorrem independentemente dos mecanismos fisiopatológicos da doença. Essas alterações individuais resultam em variações nos mecanismos de ação das DAEs e, acredita-se que elas sejam fundamentais para a refratariedade medicamentosa em pacientes com epilepsia focal.

No grupo dos fatores relacionados à farmacogenética, três hipóteses tentam explicar a refratariedade medicamentosa: a) a hipótese do transportador de múltiplas drogas (Schmidt & Löscher, 2005); b) hipótese do alvo de DAEs (Schmidt & Löscher, 2005; Remy & Beck, 2006); c) hipótese de polimorfismos em genes do citocromo P450 envolvidos na metabolização de drogas (Nebert et al., 1996; Krynetski & Evans, 2000; Pirmohamed & Park, 2001).

O papel dos SNPs na farmacogenética tem sido estudado e empregado com sucesso em minisequenciamentos de polimorfismos nos genes envolvidos na farmacocinética e farmacodinâmica das DAEs para uma melhor compreensão da resposta individual às DAEs. No entanto, há na literatura muitos resultados controversos sobre a influência desses polimorfismos na resposta ao tratamento medicamentoso na ELTM (Shintani et al., 2001; Soga et al., 2004; Kim et al., 2009).

### **1.8 Tratamento com Drogas Antiepilépticas (DAEs)**

O termo drogas antiepilépticas, uma alternativa para drogas “anticonvulsivantes”, abrange medicamentos que têm a capacidade de controle das crises e prevenção contra a recorrência de crises epilépticas sem alterar o funcionamento normal do sistema nervoso (Rogawski & Löscher, 2004). Atualmente, há uma grande variedade de DAEs no mercado, no entanto, como dito anteriormente, cerca de 10 a 40% dos pacientes não conseguem obter uma resposta eficaz ao tratamento com DAEs (Herman & Pedley, 1999; Löscher & Schmidt, 2002). Desse percentual, pode-se dizer que cerca de 40% desses pacientes apresentam-se farmacoresistentes, o que define a diminuída eficácia dos medicamentos disponíveis no mercado atual (Regest & Tanganelli, 1999). Os mecanismos desencadeadores da farmacoresistência são pouco compreendidos e necessitam de maiores



estudos (Jeub et al., 2002). Nas duas últimas décadas, com o surgimento das DAEs de segunda geração e de terceira geração, o tratamento das epilepsias tem apresentado muitos avanços, mas o percentual de pacientes que não apresentam um controle satisfatório ainda continua expressivo (Löscher & Schimidt, 2002).

Estudos atuais buscam o desenvolvimento de novas DAEs com alto potencial de bloqueio das crises epiléticas e que apresentem baixa toxicidade (Löscher, 1998). Entretanto, pesquisas recentes procuram estudar drogas que atuem sobre a própria epileptogênese inibindo o desenvolvimento e a progressão da epilepsia, e não apenas combatendo as crises que são conseqüências do processo de epileptogênese (Brodie, 2001; Porto et al., 2007).

### **1.9 Mecanismo de ação das DAEs**

As DAEs atuam em diversos alvos moleculares com o objetivo de modificar seletivamente a excitabilidade dos neurônios bloqueando o disparo inicial que origina a crise sem modificar a atividade neuronal (Rogawski & Löscher, 2004). É conveniente categorizar as DAEs em três grupos de acordo com seu mecanismo de ação: i) modulação dos canais iônicos voltagem-dependentes (incluindo canais de sódio, potássio e cálcio); ii) aumento da inibição sináptica; iii) inibição da excitação sináptica (Rogawski & Löscher, 2004). De maneira geral, a maioria das drogas utilizadas para o controle das crises epiléticas atua através de uma série de mecanismos que basicamente reduzem os potenciais de ação repetitivos gerados por um maior influxo de sódio, aumentam a atividade GABAérgica e atuam interferindo na neurotransmissão de aminoácidos excitatórios, como o glutamato e o aspartato. (Olsen et al., 1990; Mc Donald & Kelly, 1995; Meldrun, 1996; Rogawski & Löscher, 2004).

Os canais de sódio são os principais responsáveis pela geração de descarga (despolarização) durante as crises epiléticas. Esses canais iônicos são formados por proteínas transmembranas compostas por uma subunidade  $\alpha$  e duas subunidades auxiliares  $\beta$ . Nove diferentes subunidades foram identificadas, sendo que cinco delas estão presentes no cérebro (Rogawski & Löscher, 2004). Quando os neurônios estão despolarizados as proteínas do canal de sódio, em poucos microssegundos, passam por uma alteração conformacional que converte o canal de sódio da fase de repouso (estado não-condutório)

para a fase ativa (estado condutório) permitindo o influxo de sódio no neurônio. Os canais de sódio cerebrais podem rapidamente alternar entre os estados de repouso, ativação e inativação, permitindo que os neurônios passem por sucessivos potenciais de ação, necessários para o funcionamento de um cérebro normal, mas também para a expressão da atividade epiléptica (Rogawski & Löscher, 2004). As DAEs atuantes nos canais de sódio exercem função de proteção contra crises generalizadas tônico-clônicas e crises parciais. As drogas atuantes são: *fenitoína*, *lamotrigina*, *carbamazepina*, e *oxcarbamazepina* (Schmutz et al., 1994; Ambrosio et al., 2001) e *zonisamida* (Schauf et al., 1987) e possivelmente *felbamato* (Tagliatela et al., 1996), *topiramato* (Taverna et al., 1999) e *valproato* (Van den Berg et al., 1993; Albus & Williamson, 1998; Taverna et al., 1998; Xie et al., 2001; Remy et al., 2003).

Essas drogas bloqueiam a alta frequência repetitiva de disparos (*spike-firing*), que ocorrem durante a crise, sem afetar a atividade neuronal normal. O processo predominante de inativação do canal de sódio é dado pela oclusão da abertura intracelular do canal por um pequeno *loop* de aminoácidos entre os domínios III e IV da subunidade  $\alpha$  do canal de sódio. Posteriormente pode ocorrer um processo adicional de inativação lenta, cujo mecanismo molecular é desconhecido, mas sabe-se que é diferente do processo de inativação rápida. (Rogawski & Löscher, 2004).

Os canais de cálcio voltagem-dependentes, assim como os canais de sódio, são complexos protéicos formados por várias subunidades que permitem o influxo de íon quando abertos devido à despolarização da membrana (Rogawski & Löscher, 2004). As primeiras evidências da importância dos canais de  $\text{Ca}^{+2}$  voltagem-dependentes nas epilepsias deram-se a partir da verificação de que a diminuição da concentração extracelular desse íon poderia levar à atividade epiléptica em tecidos cerebrais como o giro denteado e outras estruturas hipocâmpais (Traub & Llinas, 1979; Jefferys & Haas, 1982; Yaari et al., 1983). Sabe-se que o aumento do influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  é necessário para manutenção da hiperexcitabilidade que ocorre nos processos convulsivos (McNamara, 1999).

Atualmente, são descritos seis subtipos de canais de  $\text{Ca}^{+2}$  dependentes de voltagem *L*, *N*, *P*, *Q*, *R* e *T*, sendo que pelo menos três desses subtipos (*N*, *P* e *Q*) foram relacionados ao controle da liberação de neurotransmissores nas sinapses, como acetilcolina e serotonina. Sabe-se que a entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  no neurônio pré-sináptico associa-se à liberação

desses neurotransmissores e a entrada dos neurotransmissores em neurônio pós-sináptico está envolvido com a despolarização sustentada do neurônio. Estudo importante realizado por Magloczky et al. (1997), mostrou que a depleção da proteína calbidina D-28K provoca excitabilidade na região hipocampal do giro denteado, provocando a hiperestimulação dos canais de  $\text{Ca}^{+2}$  voltagem-dependente, permitindo a recorrência de crises epiléticas. Portanto, o bloqueio dos canais de  $\text{Ca}^{+2}$  pode produzir vários efeitos no funcionamento neuronal: (a) bloqueio dos canais tipo *T* está associado ao tratamento das crises de ausência; (b) bloqueio dos canais tipo *L* relaciona-se ao controle de crises parciais); (c) o bloqueio de canais de  $\text{Ca}^{+2}$  pode prevenir a liberação de neurotransmissores excitatórios como o glutamato e (d) o bloqueio desses canais diminuem a concentração dos íons  $\text{Ca}^{+2}$  no citoplasma neuronal, reduzindo a possibilidade de dano celular excitotóxico (Porto et al., 2007).

Outra família de canais iônicos dependentes de voltagem que tem sua importância nos processos epiléticos são os canais de  $\text{K}^{+}$ . Os canais de  $\text{K}^{+}$  dependentes de voltagem participam dos processos de repolarização e hiperpolarização da membrana, com posterior despolarização, evitando a repetição do potencial de ação. Mutações nos genes responsáveis pela formação dos canais de potássio provocam diminuição da repolarização, gerando uma hiperexcitabilidade. Um exemplo é o envolvimento dos canais voltagem-dependentes de potássio KCNQ2 e KCNQ3, que quando alterados no domínio C-terminal levam à uma redução da corrente de potássio de 30% a 60% do fluxo normal. A alteração desses canais está relacionada com a fisiopatologia da Síndrome da Epilepsia Autosômica Dominante Benigna Familiar (Heron et al., 2007). Os canais KNCQ são responsáveis pelas correntes do tipo M25 que recebem este nome porque é inibida pela estimulação de receptores muscarínicos da acetilcolina. Essas correntes estão envolvidas na regulação da excitabilidade sublimiar dos neurônios e sua responsividade aos sinais de entrada (*inputs*) sinápticos. Esta regulação da excitabilidade neuronal provavelmente explica por que uma pequena perda de correntes M é suficiente para causar epilepsia (Hubner & Jentsch, 2002). Estudo realizado com um derivado da *benzotriptamina*, com propriedade anticonvulsivante em roedores, mostrou o envolvimento de canais de  $\text{K}^{+}$  do tipo *Maxi-K*, em células GH3, e que sua ativação pode contribuir com a redução da excitabilidade neuronal e reduzir a capacidade epileptogênica (Araújo et al., 2003).

Quanto aos receptores dos principais neurotransmissores inibitórios, o GABA e a glicina, que exercem seu rápido efeito inibitório através de canais de  $\text{Cl}^-$ , foram descobertos recentemente apenas dois genes afetados relacionados à epilepsia (Wallace, 2002). Mutações da subunidade  $\gamma^2$  do receptor GABAA (*GABRG2*) foram identificadas na epilepsia com crises de ausência na infância e convulsões febris generalizadas (Wallace, 2002).

O desenvolvimento de novos fármacos que são antagonistas dos receptores ionotrópicos glutamérgicos, NMDA e AMPA, como o *felbamato* e o *topiramato*, respectivamente, têm mostrado resultados promissores em atenuar a epileptogênese apesar de apresentar efeitos adversos desagradáveis que dificultam suas indicações clínicas (Löscher & Schimidt, 2002). Os receptores NMDA são altamente permeáveis ao  $\text{Ca}^{+2}$  e contribuem com um componente lento para o potencial de ação excitatório (Löscher, 1998). Essa dependência em relação ao  $\text{Ca}^{+2}$  para a liberação das vesículas sinápticas de glutamato proporcionaram a descoberta de novos alvos para as DAEs, como a *gabapentina* e o *leviracetam*. Estudos identificaram a proteína que se liga à *gabapentina*, é a subunidade  $\alpha 2^- \delta$  do canal de  $\text{Ca}^{+2}$ . Um outro alvo possível é a proteína SV2A, ambas envolvidas na liberação de vesículas sinápticas de glutamato (Löscher & Schimidt, 2006).

Já os receptores nicotínicos de acetilcolina parecem estar relacionados com a Epilepsia do Lobo Frontal Autossômica Dominante Noturna. Mutações nos genes *CHRNA4* e *CHRNB2*, cujo efeito altera os aminoácidos dos receptores transmembrana, diminuem a resposta a acetilcolina dependente do cálcio e esse efeito promove a excitabilidade durante o sono, o que pode gerar crises epiléticas (Heron et al., 2007).

### 1.10 Metabolização das DAEs

Como foi visto anteriormente, as DAEs atuam no sistema nervoso central (SNC) e em geral são altamente solúveis em lipídios, pois precisam atravessar a barreira hematoencefálica para exercer sua função. As DAEs devem ser vistas como xenobióticos, ou seja substâncias estranhas ao organismo. A eliminação de xenobióticos é feita por depuração renal sob a forma inalterada ou por metabolismo hepático seguido de depuração renal de seus metabólitos (Rang et al, 2007). Por serem substâncias altamente lipossolúveis a maioria das DAEs não pode ser eliminada sob forma inalterada direto pelos rins, pois se

difundem de volta ao plasma em passagem pelos túbulos renais. Sendo assim, faz-se necessária a conversão, pelo fígado, de metabólitos solúveis em água para possibilitar a excreção urinária, ou seja, as DAEs, substâncias não-polares, lipossolúveis, precisam ser transformadas em substâncias polares, hidrossolúveis possibilitando a excreção pelos rins, fenômeno denominado biotransformação (Perucca & Richens, 1995).

A biotransformação é feita por enzimas hepáticas localizadas no retículo endoplasmático liso dos hepatócitos (sistema microssomal), no citoplasma e em organelas celulares (não-microssomais). Várias DAEs são metabolizadas no sistema microssomal hepático, denominado citocromo P450, assim chamado por apresentar absorção máxima de luz na faixa de 450nm. As proteínas do citocromo P450 formam uma família de proteínas heme, semelhantes à hemoglobina. Nesse sistema as substâncias podem ser endógenas, como esteróides e ácidos graxos, ou exógenas, como drogas e aditivos alimentares, que serão metabolizadas por enzimas específicas. Existem quatro principais vias metabólicas: oxidação, redução, hidrólise e conjugação (Rang et al., 2007). As três primeiras são conhecidas como reação de fase I, e consistem na ligação de grupos – OH, – COOH e – NH<sub>2</sub> na molécula da droga visando a formação de metabólitos mais polares, enquanto a conjugação, conhecida como reação de fase II, compreende a ligação de substratos endógenos, como ácido glicurônico, ácido acético ou o sulfato inorgânico, facilitando a excreção da droga pelos rins, por se tornarem substâncias mais solúveis em água.

O sistema microssomal P450 apresenta uma série de enzimas denominadas *oxidases*, referidas como CYP (CY, de citocromo e P representando a primeira letra de P450), seguidas pelo algarismo arábico da família específica, de uma letra maiúscula que especifica a subfamília e de um segundo algarismo arábico que designa o polipeptídeo, como por exemplo, o gene *CYP2C19*. Foram identificadas 12 famílias de genes do CYP450 nos seres humanos. O sistema de classificação padrão da família multigênica do CYP450 baseia-se na semelhança na sequência de proteínas. Os membros de uma família de genes possuem mais de 40% de aminoácidos semelhantes, já nas subfamílias, a semelhança é superior a 55%. As famílias 1, 2 e 3 (*CYP1*, *CYP2* e *CYP3*) codificam as enzimas que participam da maioria das reações de biotransformação de fármacos, enquanto as famílias restantes são importantes no metabolismo de compostos endógenos como esteróides e ácidos graxos (Vallada & Barbosa, 2004).

O gene *CYP3A*, por exemplo, metaboliza drogas como *carbamazepina* (CBZ), benzodiazepínicos e bloqueadores de canais de cálcio entre outros. A *fenitoína* é metabolizada pelo gene *CYP2C9* e parcialmente pelo gene *CYP2C19*. Este último gene também atua na metabolização de *diazepam*, ácido valpróico e *fenobarbital* (Klotz, 2007).

As formas alélicas dos genes são variáveis de indivíduo para indivíduo, portanto, sujeitas a importantes diferenças entre etnias. Diferentes indivíduos podem apresentar taxas distintas de metabolismo de uma determinada droga em decorrência das características genéticas de seus citocromos. Essa variação, dada em grande parte pelos SNPs, fazem com que alguns indivíduos sejam capazes de metabolizar uma droga de forma adequada, o que promove a elevação de seus níveis no sangue e conseqüentemente o efeito terapêutico ou, devido à variação alélica, produzirem proteínas não ativas, truncadas, tendo uma metabolização ineficiente da droga e como conseqüência, baixas doses podem levar à toxicidade no paciente, ou ainda, ao aumento da expressão do gene que leve a uma maior produção de proteína e conseqüente metabolização rápida do princípio ativo. Esses pacientes necessitariam de doses maiores do medicamento para conseguir efeito satisfatório.

### **1.11 Perspectivas no desenvolvimento de novas DAEs**

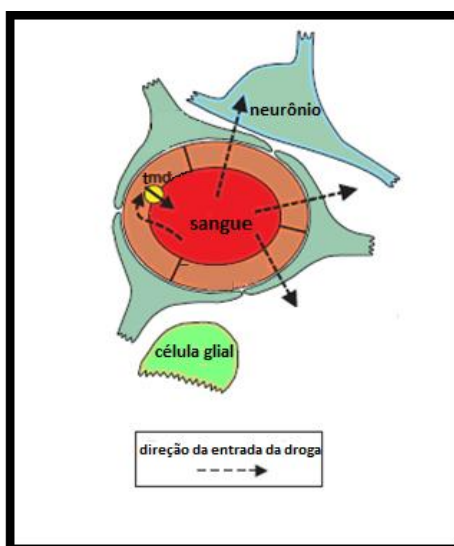
A pesquisa de novas DAEs tem se concentrado na busca de fármacos mais eficazes em bloquear as crises epiléticas, com amplos espectros e baixa toxicidade (Löscher & Schimidt, 2002). Drogas que atenuam a neurotransmissão excitatória, tais como bloqueadores dos receptores glutamatérgicos têm sido propostos (Kwan et al., 2001). Apesar das limitações e dos efeitos adversos das DAEs atuais, esses fármacos representam avanços importantes no tratamento dos pacientes epiléticos, mas a busca por substâncias mais eficazes e menos tóxicas, e a possibilidade de um tratamento individualizado de acordo com as características genéticas do paciente, é uma das novas perspectivas na busca por uma DAE ideal.

### **1.12 Farmacoresistência em epilepsia**

*Hipótese do transportador de múltiplas drogas*

Entendemos, até o presente, que a epilepsia é uma doença crônica, mas que pode ser controlada com DAEs. Vimos qual o mecanismo de ação das principais drogas epiléticas e conseqüente metabolização das DAEs, e também que o grande problema é a refratariedade medicamentosa. Existem hipóteses que tentam explicar a refratariedade medicamentosa em epilepsia, como a hipótese dos transportadores de múltiplas de drogas.

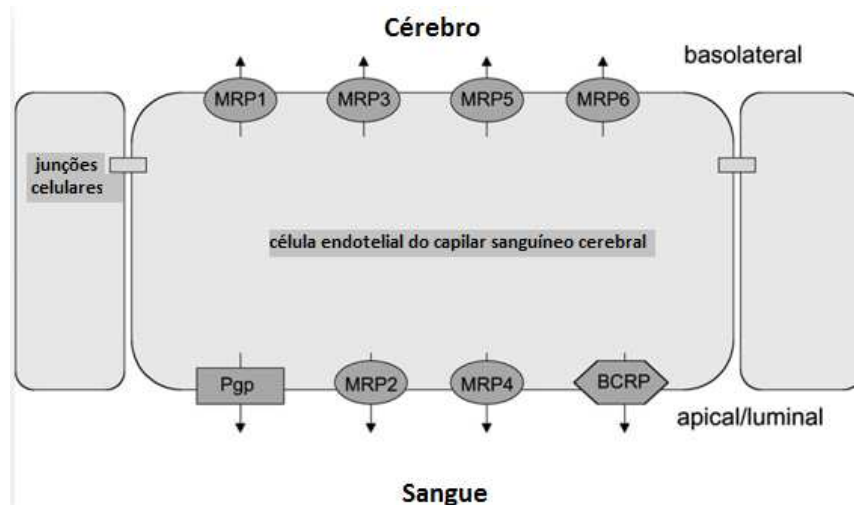
A barreira hemato-encefálica (BHE), composta pelas células endoteliais dos vasos sanguíneos cerebrais forma uma barreira efetiva contra a livre difusão de muitos compostos hidrofílicos e drogas polares para dentro do cérebro (Schimidt & Löscher, 2005), permitindo somente a passagem direta de substâncias lipofílicas. Portanto, a maioria das DAEs são lipofílicas, facilitando a chegada da droga ao tecido alvo. Nas células endoteliais dos capilares sanguíneos cerebrais (BHE) existem proteínas transmembrana que atuam no transporte de xenobióticos, incluindo medicamentos. Elas atuam como uma bomba de efluxo de drogas, retirando a droga do tecido alvo, no caso o tecido cerebral, retornando-a para o sangue. A figura 3 retirada de Schmidt & Löscher (2005), mostra uma representação esquemática das células endoteliais dos capilares sanguíneos cerebrais que formam a BHE e o papel das proteínas transportadoras de drogas através da BHE.



(adaptado de Schmidt e Löscher, 2005)

**Figura 3.** Representação esquemática da BHE. Em destaque uma proteína transportadora de droga (tmd – transportadora de múltiplas drogas) que atua como uma bomba de efluxo de droga, impedindo a passagem da droga para o tecido alvo.

Essas proteínas fazem parte da família dos transportadores ABC (*ATP-binding cassette family*) pois fazem uso da energia liberada da hidrólise do ATP para translocar solutos através de membranas celulares em todas as espécies de mamíferos (Löscher & Potschka, 2005a). Entretanto, a família dos transportadores ABC em mamíferos é muito extensa apresentando alta divergência de funções entre elas. A proteína mais estudada é a PgP, conhecida também como MDR1, codificada pelo gene *ABCB1*. É a principal representante da subfamília ABC-B. Inicialmente descoberta em 1970 como indicador de resistência à quimioterápicos (Schinkel & Jonker, 2003), a PgP também foi o primeiro transportador ABC detectado em células endoteliais da BHE humana em 1989 (Ling, 1997; Fromm, 2004). Tem-se ainda a subfamília ABC-C, composta pelas MRPs (do inglês, *multidrug resistance protein*), dentre as quais as MRPs 1-6 são expressas na barreira hematoencefálica, além da PgP, pertencente à subfamília ABC-B. A figura 4 retirada de Löscher & Potscha (2005b) mostra a localização destas proteínas na BHE, mas somente os transportadores que estão localizados no lado apical (luminal) do capilar cerebral poderia restringir o fluxo de xenobióticos no cérebro.



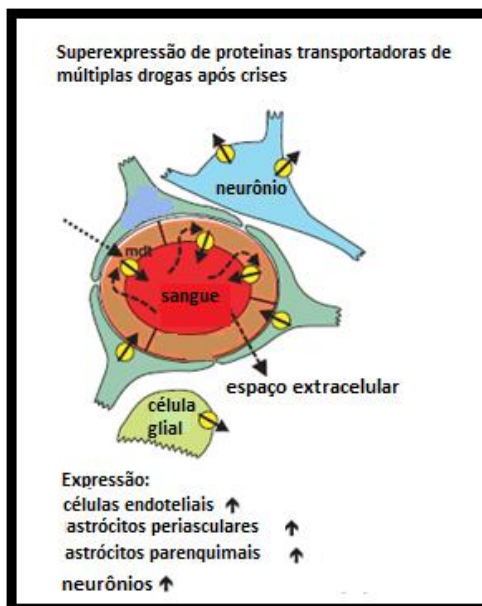
(adaptado de Löscher e Potschka, 2005b)

**Figura 4.** Localização de proteínas transportadoras de drogas nas células endoteliais dos capilares sanguíneos cerebrais. Somente os transportadores que estão localizados na superfície apical (luminal) da célula poderiam restringir a entrada de xenobióticos no cérebro.



Alguns trabalhos mostram que as proteínas transportadoras de drogas estão superexpressas nas células endoteliais dos vasos sanguíneos cerebrais de pacientes farmacoresistentes, como em trabalho realizado por Dombrowski et al., (2001) onde foi observado aumento da expressão do gene *ABCB1* e das proteínas MDR1, MRP2 e MRP5 em células endoteliais isoladas de vasos do lobo temporal de pacientes refratários à medicação antiepiléptica. Em 2003, Sisodiya & Thom observaram que, além de aumento de expressão no tecido epiléptico humano das MRPs, houve ainda expressão dos transportadores nas células da glia do tecido não afetado, mostrando que as crises epilépticas e/ou o tratamento com DAEs podem alterar a expressão dessas proteínas em tecido normal (Sisodiya & Thom, 2003, Kubota et al., 2006). No entanto, Marchi & colaboradores (2004), observaram que a PgP estava superexpressa em astrócitos e neurônios em cérebro de pacientes farmacoresistentes, além de expressão aumentada nos capilares sanguíneos cerebrais. Warren et al. (2009), confirmaram a expressão de vários membros da família ABC no cérebro de pacientes epilépticos refratários, como *ABCB1*(PgP), *ABCG2*(BCRP), *ABCC1*(MRP1), *ABCC4*(MRP4) e *ABCC5*(MRP5).

Na figura 5 retirada de Schmidt & Löscher (2005) pode ser observado um esquema mostrando a hipótese dos transportadores de drogas na epilepsia refratária.



(adaptado de Schmidt e Löscher, 2005)

**Figura 5.** Tecido cerebral epileptogênico onde transportadores de múltiplas drogas estão superexpressos nas células endoteliais dos capilares sanguíneos cerebrais. Astrócitos e células da glia em torno dos capilares também contribuem no mecanismo de “defesa”, devido à expressão desses transportadores nessas células.

A superexpressão desses transportadores diminui a concentração da droga no tecido alvo, como foi observado por Potschka e colaboradores em 2003b, onde após a administração de *probenecida*, inibidor de MRP2 em ratos, houve aumento de fenitoína no córtex cerebral. E no mesmo grupo, estudos com ratos TR- (não produzem a MRP2) houve aumento de fenitoína no tecido cerebral em relação aos ratos normais. Ainda, foi observado um aumento de expressão de MRP1 e MRP2 após indução de *status epilepticus* em roedores, e conseqüente diminuição da concentração de fenitoína do tecido cerebral, sendo reversa após tratamento com inibidor de MRPs (VanVliet et al., 2005). A tabela 1, mostra um resumo de resultados de estudos que investigaram o transporte de DAEs pelas proteínas transportadoras de drogas pertencentes à família ABC.

**Tabela 1.** Transporte ativo das DAEs por proteínas transportadoras de múltiplas drogas no cérebro.

Transportadores de drogas no cérebro humano			
Drogas antiepilépticas	PgP	MRPs	Referências
Fenitoína	+	+	Potschka & Löscher (2001a, 2001b); Rizzi et al., 2002; Potschka et al 2003a
Carbamazepina	+	+	Potschka et al., 2001; Rizzi et al., 2002; Sills et al., 2002
Valproato	?	+	Frey & Löscher, 1978; Huai-Yun et al., 1998; Gibbs et al., 2004;
Fenobarbital	+	-	Potschka et al., 2002 ;Potschka et al., 2003a
Felbamato	+	-	Potschka et al., 2002; Potschka et al., 2003b
Lamotrigina	+	-	Potschka et al., 2002; Potschka et al., 2003b
Gabapentina	+	?	Luer et al., 1999; Sills et al., 2002
Topiramato	+	?	Sills et al., 2002
Levetiracetam	-	-	Potschka et al., 2004

MRP: *multidrug resistance protein*; PgP: glicoproteína P

Os resultados dos trabalhos listados da tabela 1 mostram que a PgP participa do transporte da maioria das DAEs, enquanto as MRPs, de acordo com a literatura, participam do transporte somente de *fenitoína*, *valproato* e *carbamazepina*. Estudos posteriores confirmam esses resultados, como o de Luna-Tortós e colaboradores (2009), através de estudo *in vitro*, com linhagem de células de fígado (LLC, MDCK) transfectadas com os transportadores de drogas PgP, MRP1, MRP2 e MRP5 com o objetivo de avaliar se o *topiramato* é substrato desses transportadores. Como resultado, o PgP atuou no efluxo do *topiramato*, mas não foi observado aumento da concentração da droga nas células LLC para qualquer uma das MRPs. Em estudo posterior do mesmo grupo (Luna-Tortós et al., 2010) avaliou a função das MRPs 1, 2 e 5 no transporte das principais DAEs *in vitro* (*fenitoína*, *valproato* e *carbamazepina*, *lamotrigina*, *fenobarbital* e *levetiracetam*), concluindo que assim como o *topiramato*, as demais DAEs analisadas neste estudo não são substratos das MRPs 1, 2 e 5 no modelo *in vitro* analisado.

### 1.13 Papel dos SNPs na farmacoresistência em epilepsia

#### *Transportadores de drogas- Gene ABCB1/ABCC2/RALBP1*

O gene *ABCB1* em humanos está localizado no cromossomo 7 e tem 28 exons (Fromm, 2004). É altamente polimórfico, apresentando cerca de 1.500 SNPs em sua sequência ([www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/GeneGt.cgi?geneID=5243](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/GeneGt.cgi?geneID=5243)). O gene *ABCB1* codifica a proteína MDR1 ou PgP, com peso molecular de aproximadamente 170 kDa (Dicato et al., 1997; Kwan & Brodie, 2005). O polimorfismo sinônimo C3435T (rs1045642) (Ile/Ile) presente no exon 27 deste gene, vem sendo extensivamente estudado. Três estudos investigaram a associação desse SNP C3435T e a farmacoresistência em epilepsia. Em um primeiro estudo, Siddiqui et al. (2003) genotiparam esse polimorfismo em 200 pacientes com epilepsias focais e generalizadas, formando um grupo único, a não ser pela diferença de resposta ao tratamento medicamentoso. Foram genotipados 115 responsivos ao tratamento (livre de crises por 1 ano) e 200 farmacoresistentes (acima de quatro crises por ano). Os autores encontraram que o genótipo CC foi significativamente mais freqüente em pacientes farmacoresistentes, quando comparado com os farmacoresponsivos. Na tentativa de replicar o estudo, exatamente utilizando os mesmos critérios para a escolha da casuística, Tan et al. (2004) genotiparam a mesma variante em

uma amostra de 401 pacientes farmacoresistentes e 208 pacientes farmacoresponsivos com epilepsia. Não foi encontrada associação com o SNP C3435T e a farmacoresistência em epilepsia. Em um terceiro estudo, Zimprich et al. (2004) amplificaram 3 variantes exônicas no gene *ABCB1*, sendo C1236T no exon 12, G2677T no exon 21 e novamente, C3435T no exon 26 em 210 pacientes com epilepsia de lobo temporal refratária, sendo 123 com esclerose hipocampal e 87 pacientes sem lesão. Esse grupo foi dividido em três de acordo com a frequência de crises mensais ( $\leq 2$ ;  $>2 < 6$ ;  $\geq 6$ ), além da comparação com 228 controles sadios. Não houve diferenças significativas nas frequências alélicas e genótípicas entre o grupo sadio e o grupo com epilepsia, e ainda entre pacientes com ELTM e ELT. Foi observado uma maior frequência do genótipo CC no grupo de pacientes com maior frequência de crises mensais ( $\geq 6$ ) quando comparado com o de menor frequência ( $\leq 2$ ).

Como estes 3 SNPs estavam em desequilíbrio de ligação na população, verificou-se que o haplótipo CGC (C1236T/G2677T/C3435T, respectivamente) foi mais freqüente no grupo farmacoresistente com maior frequência de crises. Entretanto este estudo não representa a replicação do estudo de Siddiqui et al. (2003) dada as duas classificações diferentes de fenótipos utilizadas. Posteriormente, outros estudos mostraram associação do gene *ABCB1* (C3435T) na farmacoresistência em epilepsia (Soranzo et al., 2004; Hung et al., 2005; Seo et al., 2006; Kwan et al., 2007), mas em contrapartida, outros estudos não encontraram associação para o mesmo polimorfismo (Sills et al., 2005, Leschziner *et. al.*, 2007a; Shahwan *et. al.*, 2006; Kim et al., 2006a; Kim et al., 2006b; Chen et al., 2007; Dericioglu et al., 2008; Kim et al., 2009; Vahab et al., 2009). Portanto, podemos concluir que a associação do gene *ABCB1* e farmacoresistência em ELTM é ainda controversa.

A maioria dos trabalhos em farmacogenética associam somente o SNP, e não o gene, como responsável pela característica de interesse. Um exemplo é o SNP rs2235039(A/G), do gene *ABCB1*, que é uma mutação “missense” e leva à troca de uma valina por uma metionina na posição 801 da proteína. Esta mutação ocorre em um dos domínios transmembrana da PgP, onde acredita-se que o sítio de ligação a drogas esteja localizado (Sharom et al, 2005; Lugo & Sharom, 2005). No entanto, como ambos os aminoácidos apresentam grupos alifáticos não-polares, a troca pode não ser suficiente para levar as alterações significativas na atuação da PgP. O SNP rs9282564(A/G), também referido na literatura como 61A>G, é uma mutação missense que leva à alteração de uma

asparagina para um aspartato (mutação chamada de N21D na literatura) (Hoffmeyer et al, 2000; Kim et al., 2001; Kerb, 2006). O referido SNP também foi observado em todas as etnias e esta mutação é uma das variantes mais comuns da PgP (Pauli-Magnus & Kroetz, 2004; Kerb, 2006). Como a mutação leva à troca de um aminoácido não carregado, mas polar, por outro aminoácido ácido, espera-se que ocorra uma alteração significativa na proteína. Porém observa-se que não há alteração de domínios importantes para a atuação da PgP devido à região da proteína em que esta mutação ocorre. A troca de aminoácidos acontece em um domínio citoplasmático que não está envolvido com o transporte de drogas e, portanto este único SNP, pode não ser essencial para a atividade da PgP (Pauli-Magnus & Kroetz, 2004; Kerb, 2006).

Nesse contexto, o SNP rs3213619(T/C), conhecido como -129T>C na literatura, leva à alteração de nucleotídeos na região 5' não traduzida (Hoffmeyer et al., 2000; Kerb, 2006). Acredita-se que alterações nesta região possam afetar a tradução do RNA mensageiro, levando às alterações na expressão da proteína. Há evidências de que pacientes com o genótipo TT apresentem níveis elevados de PgP quando comparado com o genótipo CT (Tanabe et al., 2001; Kerb, 2006). No entanto, até o momento, não foi observada correlação entre este SNP e a resposta a DAEs. Talvez a alteração dos níveis de PgP causada por esse SNP não seja elevada o bastante para interferir na resposta a DAEs e levar à refratariedade. O SNP rs2235048 está presente em uma região conservada do intron 27. Embora este SNP não leve diretamente à alteração de aminoácidos na proteína é importante estudá-lo, pois SNPs em íntrons podem afetar a regulação gênica e processamento do RNAm (Wang & Sadée, 2006) e ainda serem indicativos de regiões em desequilíbrio de ligação com uma possível variante causal (Soranzo et al., 2005).

O gene *ABCC2*, também pertencente à família dos transportadores ABC (*ATP Binding Cassete*) está localizado no cromossomo 10q24, possui 32 exons, sendo 31 exons codificantes altamente polimórficos. Codifica uma proteína conhecida como cMOAT (*canalicular multiespecific organic anion transporter*) ou MRP2 (*multidrug resistance protein 2*). Esta proteína é composta por 1545 aminoácidos, com peso molecular variando entre 190-200KDa (Wada, 2006). Devido à grande quantidade de polimorfismos, o gene *ABCC2* torna-se candidato à alteração farmacocinética da proteína MRP2 e conseqüente disponibilidade da droga no cérebro (Ito et al., 2001; Saito et al., 2002; Susuki &

Sugiyama, 2002), embora a relação do gene *ABCC2* com a farmacoresistência em epilepsia seja muito pouco estudado, se compararmos com o gene *ABCB1*. O principal polimorfismo estudado no gene *ABCC2* é o -24C>T (rs717620), localizado na porção 5'UTR do gene. Ufer e colaboradores (2009) selecionaram 221 pacientes jovens com variadas síndromes epiléticas: sintomática, idiopática, febril, criptogênica e não-classificáveis, sendo 103 pacientes respondedores à medicação antiepilética e 118 não respondedores para a primeira geração de DAEs. Resultados mostraram que a variante T deste SNP era mais freqüente no grupo de não respondedores às DAEs. Enquanto que estudo feito com coreanos portadores de epilepsias focais, sendo 193 respondedores (sem crises anuais utilizando 1 ou 2 DAEs) e 198 não respondedores à medicação antiepilética (pacientes com no mínimo 4 crises anuais com tentativa de controle com no mínimo 3 DAEs), os resultados mostraram não haver diferença significativa nas freqüências alélicas e genotípicas entre os grupos para o SNP -24C>T (rs717620) (Kim et al., 2009). Portanto, os estudos com *ABCC2* e farmacoresistência são poucos, inconclusivos e muito limitados na cobertura genômica que oferecem do gene candidato, ou seja, genotipam poucos SNPs ao longo do gene.

Outro gene candidato da classe dos transportadores de droga, é o gene *RLIP76*, também conhecido como *RALBP1*, um transportador não-ABC, multiespecífico, que confere resistência a alguns compostos como conjugados de glutationa (Awasthi et al., 2002). O gene está presente em humanos no cromossomo 18p11.3, contendo 11 exons e 9 introns. A proteína *RLIP76* tem 76kDa, mas variantes de *splicing* incluem um peptídeo de 67kDa e um maior com 80 ou 102 kDa (Awasthi et al., 2005). O gene *RLIP76* foi clonado como *Ral-binding protein* e supostamente está envolvido na regulação de plasticidade de membrana, movimento e endocitose (Jullien-Flores et al., 1995; Sharma et al., 2001; Rosse et al., 2003;). Recentemente, um estudo observou que a proteína *RLIP76* é expressa em tecido cerebral, preferencialmente na superfície luminal das membranas das células endoteliais, sendo mais expressivo no foco epilético. O transporte contra o gradiente e conseqüente dependência de energia foi observado *in vitro* para *fenitoína* e *carbamazepina*, e em ratos *knockout* para *RLIP76*, no qual exibiram toxicidade após administração de *fenitoína* devido à diminuição de mecanismos de extrusão da barreira hemato-encefálica. Com isso, concluiu-se que o gene *RLIP76* é um transportador de DAEs presente na BHE e

que deve estar envolvido com mecanismos de resistência às DAEs (Awasthi et al., 2005). Em estudo de associação posterior conduzido por Soranzo et al. (2007) foram genotipados 262 pacientes com epilepsia responsiva e 107 com epilepsia refratária às DAEs. Os critérios de resposta às DAEs foram os mesmos utilizados por Siddiqui e colaboradores em 2003 (gene *ABCB1*). Foram selecionados 19 SNPs do gene *RALBP1* abrangendo uma região de 89.5Kb. De acordo com o valor de  $r^2$  entre os SNPs, foram selecionados os tagsSNPs ( $r^2 > 0.8$ ) - rs1979368, rs1561998; rs2028960, rs1813100, rs329007 e rs167867- para a análise de associação. Não foram encontradas diferenças significativas nas frequências genóticas entre os grupos pacientes farmacoresponsivo e resistente às DAEs. Leschziner et al. (2007b), em estudo de coorte, 503 pacientes com epilepsia foram divididos quanto ao uso de DAEs: pacientes que faziam uso das novas DAEs foram comparados com pacientes que utilizavam drogas padrão. Foram genotipados 23 polimorfismos do gene *RLIP76* e também nenhuma associação foi encontrada com a resposta ao tratamento. Para o gene *RALBP1*, o empenho em selecionar variados SNPs candidatos, abrangendo por completo todo o gene, parece ser maior se comparado com trabalhos feitos para os genes *ABCB1* e *ABCC2*, mas ainda são necessários inúmeros estudos, incluindo estudos funcionais, para descobrir o papel dos polimorfismos do gene *RALBP1* na refratariedade em epilepsia.

#### *Estudos de associação genótipo/fenótipo*

Atualmente, existem poucas informações disponíveis sobre a contribuição dos SNPs no fenótipo de refratariedade em epilepsia. Existem, separadamente, estudos funcionais que analisam a expressão de proteína e mRNA *in vivo* e *in vitro*, e estudos de associação que investigam se há variação nas frequências alélicas e genóticas entre grupos de pacientes farmacoresistentes e responsivos às DAEs. Nos últimos anos, no entanto, houve um aumento significativo nos estudos de relação genótipo/fenótipo na tentativa de elucidar o papel dos polimorfismos na refratariedade medicamentosa em epilepsia. Basic e colaboradores (2008) analisaram o efeito de dois polimorfismos C3435T (rs1045642) e G2677T/A (rs2032582) do gene *ABCB1* nas concentrações de *fenobarbital* no líquido e plasma de 60 pacientes com epilepsia idiopática. O genótipo 3435CC foi associado com baixa concentração de *fenobarbital* no plasma e no líquido, e conseqüente aumento da

freqüência de crises nesses pacientes. Já o polimorfismo G2677T/A não foi relacionado com efeito funcional nesses pacientes.

Em outro estudo realizado por Mosyagin et al. (2008), pesquisadores analisaram em 23 amostras de tecido cerebral epileptogênico obtido após cirurgia de pacientes refratários, o efeito dos polimorfismos C3435T e G2677T na expressão de mRNA e da proteína do gene *ABCB1*. Não foi encontrada diferença de expressão, entre os diferentes perfis de genótipos. Entretanto, Hung et al. (2008), realizaram estudo de associação genótipo/fenótipo com os polimorfismos C1236T, C3435T e G2677T/A. O efeito destes polimorfismos foram testados na ausência e presença de inibidores de PgP (verapamil e ciclosporina A) e substratos (DAEs: *fenitoína*, *carbamazepina*, *fenobarbital*, *lamotrigina* e *ácido valpróico*). Os polimorfismos silenciosos 1236T e 3435T e o haplótipo 1236T-2677A/T-3435T resultaram em menor inibição efetiva contra substratos do gene *ABCB1* com significativa diminuição das concentrações de DAEs intracelular.

Laechelt et al., (2010), em um estudo *in vitro* com haplótipos do gene *ABCC2*, investigaram as propriedades de ligação DNA-proteína, estrutura secundária, estabilidade do mRNA, expressão da proteína e atividade de transporte *in vitro*. Os autores observaram que o polimorfismo -24C>T (rs717620) não exerce influência sobre a ligação DNA-proteína e que a estabilidade do mRNA não se altera significativamente na presença da variante T. Já em células transfectadas, os haplótipos CGT, TGC e TGT dos SNPs -24C>T (rs717620), 1249G>A (rs2273697) e 3972C>T (rs3740066) respectivamente, levam à menor expressão da proteína MRP2 em relação ao haplótipo selvagem CGC (Laechelt et al., 2010). No mesmo contexto, Ufer e colaboradores (2009), em estudo com 103 respondedores e 118 não respondedores às DAEs de primeira geração, associaram o genótipo -24T, mais freqüente em não respondedores, com alteração no aumento de expressão do gene *ABCB1* em hipocampo de pacientes refratários e não com aumento de expressão no gene *ABCC2*. Os autores concluem que o aumento de risco de falha no tratamento com DAEs para os pacientes que carregam o alelo -24T deve-se à maior expressão compensatória do gene *ABCB1* em pacientes com epilepsia. Como foi observado na literatura, ainda é difícil afirmar com maior segurança o papel dos polimorfismos dos genes *ABCB1* e *ABCC2* na refratariedade medicamentosa em epilepsia.



### *Metabolizadores de drogas - Genes do Citocromo P450*

Os genes do citocromo P450 possuem um grande número de polimorfismos, que podem acarretar em susceptibilidade aos fatores cinéticos das drogas (Mann & Pons, 2007). Particularmente, o gene *CYP2D6*, pertencente à família CYP2, possui mais de 70 variações alélicas e isso têm sido relacionado às diferenças no metabolismo das drogas, que podem ter sua taxa metabólica alterada em mais de 100 vezes (Pirmohamed & Park, 2001). O gene *CYP2C19*, da família CYP2C é altamente polimórfico com variações na expressão do mRNA e enzimas devido às diferenças na seqüência do gene em região codificante (Guengerich, 2003). Polimorfismos no gene *CYP2C9* também contribuem para a alteração da resposta individual ao tratamento medicamentoso (Schwarzs, 2003). Acredita-se que o gene *CYP2C9* seja responsável por mais de 90% da inativação da fenitoína (Tate et al., 2005). Informações de estudos *in vitro* demonstram que os alelos \*2 (rs1799853) e \*3 (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles>) resultam em diminuição significativa do metabolismo de vários substratos de *CYP2C9* (Rettie et al., 1999), sendo que indivíduos saudáveis que carregam essas variantes têm aumento na concentração de *fenitoína* no soro depois de uma única dose (Aynacioglu et al., 1999).

Em estudo realizado por Tate e colaboradores (2005), foi verificado que o polimorfismo *CYP2C9*\*3 está altamente associado com a dose máxima de *fenitoína* em pacientes com epilepsia, embora os autores reconheçam que a aplicação clínica deste estudo ainda não deve ser considerada antes de ser replicado em outros grupos. Entretanto, é possível que mais de um gene esteja envolvido em todo o processo de resposta às DAEs, como sugerem outros autores (Nebert et al., 1996; Pirmohamed & Park, 2001; Krynetski & Evans, 2003). No entanto, nenhum estudo sobre o papel desses polimorfismos na resistência ao tratamento medicamentoso de pacientes com ELTM foi realizado até o momento.

### *Alvo de DAEs - gene SCN1A*

Como visto anteriormente, a inibição dos canais de sódio voltagem-dependente é o principal mecanismo de ação da maioria das DAEs. Mutações no gene *SCN1A* têm sido associadas com diferentes tipos de epilepsias (Armijo et al., 2005), mas poucos são os

estudos que relacionam a função destes polimorfismos na resposta às DAEs. O polimorfismo SCN1A\_IVS5N+5G>A (rs3812718, intron 5) tem sido associado com o máximo de dose tolerada de *fenitoína* e *carbamazepina* (Rettie et al., 1999; Tate et al., 2005; Tate et al., 2006).

Tate e colaboradores (2005) relacionaram que a dose de DAEs era menor em pacientes com genótipo GG, ou seja, os pacientes que tinham o genótipo GA precisam de doses intermediárias e pacientes que carregavam o genótipo AA necessitavam de altas doses de antiepilépticos. Em outro estudo Tate et al. (2006), replicaram o estudo em pacientes com ancestralidade chinesa, e encontraram a mesma relação entre dosagem de *fenitoína* e genótipos para o SNP IVS5N\_5 G>A (rs3812718, intron 4). De mesmo modo, Abe e colaboradores (2008), observaram que a frequência para o genótipo AA (IVS5N\_5 G>A) foi significativamente maior em pacientes resistentes à *carbamazepina*, embora outro grupo tenha genotipado os polimorfismos SCN1A\_3166A>G (rs2298771, exon 16) e SCN1A\_IVS5N+5G>A em pacientes resistentes às DAEs com variados tipos de epilepsia (sintomática, criptogênica e idiopática) e não tenha encontrado associação (Sánchez et al., 2010).

# JUSTIFICATIVA

## **2. JUSTIFICATIVA**

A ELTM é reconhecidamente uma síndrome de grande importância clínica por sua alta incidência e por ser refratária ao tratamento medicamentoso em uma grande proporção de pacientes.

Apesar de existirem várias hipóteses para explicar a refratariedade medicamentosa nas epilepsias e já existirem na literatura vários estudos procurando investigar o papel de polimorfismos em genes candidatos para explicar essa refratariedade, **i)** Poucos são os estudos de associação enfocando somente pacientes com ELTM, pois em geral os pacientes não são classificados pelo tipo de epilepsia nesse estudos, sendo que na maioria dos estudos não existe informação clínica adequada. **ii)** São raros os estudos que investigam mais de um gene candidato, limitando assim a visão global da contribuição de diferentes fatores genéticos para o fenótipo de refratariedade medicamentosa. **iii)** Não encontramos estudos prévios que incluíssem uma análise multivariada levando em consideração fatores outros que não a contribuição dos genes candidatos, o que também limita a compreensão do tamanho da influência real dos diferentes fatores dentro do modelo multifatorial (genético+ambiental) de herança. **iv)** Não encontramos estudos prévios que tivessem tido o cuidado de realizar um controle genômico amplo para garantir a ausência de estratificação da amostra. Portanto, os fatores citados acima justificam a realização do presente estudo.

# OBJETIVOS

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

- Avaliar se polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes transportadores de drogas e em genes metabolizadores de drogas, pertencentes ao complexo do citocromo P450 (CYP450) podem estar relacionados com a refratariedade medicamentosa na epilepsia de lobo temporal mesial.

#### 3.2 Objetivos Específicos

1). Genotipar 138 SNPs, sendo 43 em genes transportadores de drogas (*ABCB1*, *ABCC2* e *RLIP76*), e 95 em genes que compõem o complexo do citocromo P450 (*CYP1B1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2E1*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2D6*),

2) Verificar se existem associações entre os SNPs genotipados e farmacoresistência em pacientes com epilepsia de lobo temporal mesial;

3). Verificar se existem interações entre os SNPs significativamente associados com a farmacoresistência nos pacientes com epilepsia de lobo temporal mesial,

4). Identificar se há contribuição adicional de outros fatores não genéticos para o fenótipo de farmacoresistência, através de análise multivariada;

5). Genotipar 119 SNPs adicionais, não relacionados aos genes candidatos (controle genômico), em ambos os grupos estudados (respondedores às DAEs e resistentes às DAEs) a fim de verificar se estes podem ser comparados em estudos de associação.

# MATERIAL E MÉTODOS

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Pacientes**

O grupo de estudo do presente trabalho foi formado por pacientes refratários as DAEs, assim classificados devido ao tratamento com DAEs não ser totalmente eficaz no controle das crises. O paciente foi considerado refratário após a permanência de crises parciais simples e/ou complexas em frequência maior ou igual a 2 crises/ano após tratamento com 2 esquemas de DAEs em mono- ou politerapia, em doses adequadas e bem toleradas, sem efeitos tóxicos por um período de pelo menos 2 anos. O grupo controle foi formado por pacientes respondedores às DAEs, isto é, indivíduos que conseguem um bom controle de crises a partir do tratamento com DAEs. O critério adotado para considerar um paciente bem controlado foi a ausência de crises epiléticas, sendo estas simples ou complexas, por um período mínimo de 1 (um) ano. Esses pacientes, portadores de ELTM, foram previamente diagnosticados segundo os critérios estabelecidos pela Classificação das Epilepsias e Síndromes Epiléticas, proposto pela ILAE (1989) durante o seu acompanhamento nos ambulatórios de Epilepsia e Epilepsia de Difícil Controle do HC-UNICAMP, na Policlínica III da Prefeitura Municipal de Campinas e no ambulatório de Neurologia da PUCCAMP. Todos os pacientes foram submetidos à tomada da história clínica, história neurológica detalhada, que incluía diário de crises e entrevista com familiares e testemunhas das crises. Um protocolo clínico estruturado foi utilizado em todas as entrevistas que foram realizadas por neurologista com treinamento específico em epilepsia (MD. Elisabeth Bilevicius). As fichas clínicas foram todas revistas por um segundo neurologista com grande experiência no cuidado de pacientes com epilepsia (Dr. Fernando Cendes) que confirmou o diagnóstico e classificação dos grupos dos pacientes. O questionário clínico (Anexo I) incluía perguntas a respeito dos antecedentes familiares (história familiar de epilepsia). As características clínicas detalhadas dos pacientes analisados no presente estudo são parte da Tese de Doutorado da MD. Elisabeth Bilevicius. Sendo assim, todos os pacientes participantes do presente estudo foram submetidos também à avaliação por ressonância magnética (RM) de crânio como parte da investigação complementar.



As amostras de sangue periférico dos pacientes foram coletadas após concordância dos pacientes e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II) Este projeto teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa de nossa instituição, processo nº510/2005 (Anexo III).

## 4.2 Genotipagem

### *Extração de DNA*

Para a extração do DNA genômico das amostras de sangue foi utilizado o método de extração por fenol-clorofórmio (Sambrook 1989), como descrito a seguir: 20 a 30mL de sangue venoso foram colhidos de cada indivíduo recrutado para o estudo. As amostras foram centrifugadas a 1900 rpm por 10 minutos e a parte intermediária onde se localizam os leucócitos foi transferida para um tubo de fundo cônico de polipropileno. Em seguida, foram adicionadas as soluções de RSB (Reaction Stop Buffer) 1× (até completar um volume de 11mL) e 60µL de Nonidet®. Esta solução foi centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. 3mL de solução SDS 10% e 60µL de proteinase K (100 mg/ mL) foram adicionados e a amostra incubada a 37<sup>o</sup>.C por 24 h. Após a incubação foram acrescentados 3mL de fenol, seguido de centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos e descarte da parte orgânica da solução. Esse processo foi repetido com 1,5mL de fenol e 1,5mL de uma solução de álcool isoamílico e clorofórmio (1:24), seguido de 3mL de uma solução de álcool isoamílico e clorofórmio (1:24). O DNA genômico foi então precipitado com 6mL de etanol absoluto. Esse método propicia a extração de aproximadamente 700µg de DNA genômico a partir de 20 mL de sangue venoso, garantindo a quantidade de DNA requerida para a genotipagem de um grande número de marcadores nos projetos de pesquisa genômica. Além da considerável quantidade de DNA genômico obtida, este protocolo de extração de DNA possui outra vantagem que é o baixo custo.

### *Quantificação das amostras de DNA*

A concentração de DNA das amostras extraídas foi verificada em espectrofotômetro de massa, modelo *GeneQuant* (Amersham Biosciences) em volume final de 70 µL, diluição 1:69. Para avaliar a qualidade das amostras quanto à presença de proteínas foi obtida a

razão entre a concentração de DNA (260nm) por concentração de proteína (280nm), tendo como referência de boa qualidade amostras com razão maior que 1.7. Foi verificado ainda o índice de absorvância para o comprimento de onda de 260nm, pois somente são confiáveis leituras com valor de absorvância maior que 0.05.

### 4.3 Critérios para escolha dos SNPs

#### *SNPs para estudo de associação*

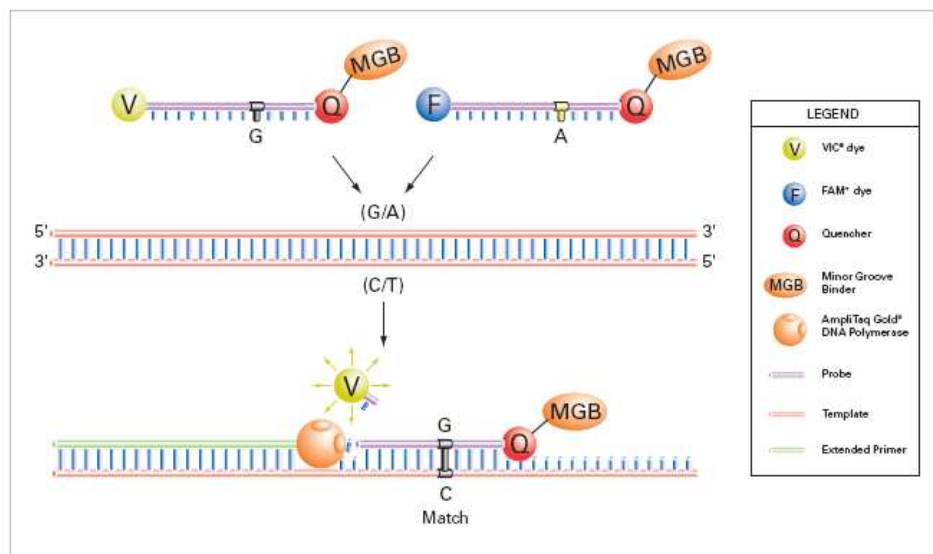
Os SNPs foram selecionados utilizando o software SNPbrowser<sup>TM</sup> versão 4.0 (Isaac & De La Vega, 2003), disponível gratuitamente no site [www.allsnps.com](http://www.allsnps.com). Este programa, ilustra um painel de cromossomos humanos representando a localização de mais de 150.000 SNPs validados nos blocos haplotípicos e respectivos *SNPtags* para cada população avaliada no Projeto HapMap (*International HapMap Consortium*, 2005), além de priorizar a seleção de SNPs baseados nos modelos de desequilíbrio de ligação, como observado por De La Vega et al., 2005. Os critérios utilizados para a seleção dos marcadores foram a presença do marcador nas quatro populações do HapMap fase II, a frequência do menor alelo (MAF em inglês – *minor allele frequency*) maior que 5%, e a presença de pelo menos um marcador em cada bloco haplotípico dos genes. Para os SNPs que não foram genotipados nas populações do HapMap, fez-se uma validação *in silico*, através do BLAST. Foi feito um BLASTn contra genoma total e ESTs (humanos) para verificar se haviam sequências idênticas (provenientes de grupos de pesquisa e tecidos diferentes) que continham os dois alelos que caracterizam o SNP. Se fossem encontrados os 2 alelos nas condições acima, o SNP estava validado. Os 139 SNPs selecionados estão descritos no Anexo IV, incluindo o SNP rs2298771, gene *SCNIA* (resultados complementares).

#### *SNPs para controle genômico*

Para esses marcadores, um critério adicional adotado foi a escolha de SNPs com uma distância mínima de 0,3 cM (300 kb), de acordo com Myers et al. (2005), nos cromossomos contendo os genes de interesse. Os 119 SNPs selecionados para o controle genômico estão representados na tabela 1 dos dados suplementares do capítulo 1.

#### 4.4 Genotipagem de SNPs utilizando a técnica de PCR em Tempo Real

A metodologia empregada em uma parcela dos SNPs analisados foi a genotipagem de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) pela técnica de PCR em Tempo Real. Essa tecnologia permite a detecção não ambígua da seqüência alvo levando a uma análise confiável dos SNPs. (Gibson, 2006). Nesta técnica, as reações de PCR são realizadas utilizando o sistema *TaqMan*<sup>TM</sup> (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.). Este sistema é constituído por um par de *primers* e duas sondas marcadas com fluoróforos diferentes (VIC e FAM). A seqüência das sondas varia em um único nucleotídeo correspondente a cada alelo do gene. O sinal de amplificação é captado quando o fluoróforo for liberado após a destruição da sonda pela enzima *Ampli Taq Gold DNA Polimerase*. Como os fluoróforos são diferentes para cada alelo, o sinal emitido será correspondente à cor do fluoróforo, discriminando assim, alelos diferentes no caso de indivíduos heterozigotos ou homozigotos para um ou outro alelo. A sonda ainda possui um *Quencher* não-fluorescente (NFQ) e uma molécula denominada MGB (*Minor Groove Binder*) na extremidade 3'. A MGB possibilita a ligação da sonda no alelo antes da amplificação pela enzima e a molécula *Quencher* é um inibidor de emissão de fluorescência, como mostrado na figura 6.



**Figura 6.** Sistema de detecção de polimorfismos. O sistema de discriminação alélica é ativado pelo anelamento de sondas específicas *TaqMan*<sup>TM</sup> MGB ([www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)).

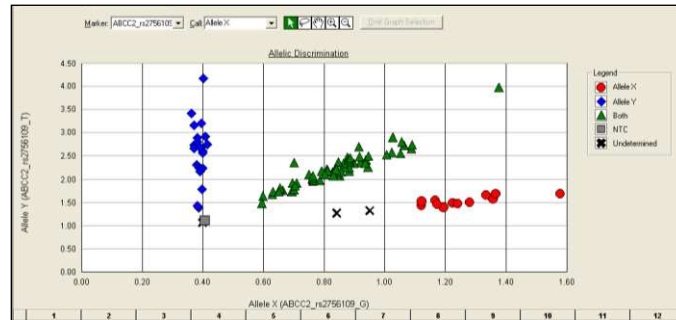
A reação foi conduzida em um aparelho *ABI*, modelo 7500. Primeiramente é realizada uma corrida inicial com única amostra para testar diferentes concentrações de DNA para cada SNP. As concentrações adotadas variam de 5 a 20ng dependendo do SNP a ser genotipado. A reação foi otimizada para volume final de 5µL. Foram adicionados à reação 2.5µL de *PCR Master Mix (2X)* (conteúdo: dNTPs, enzima *Ampli Taq Gold DNA Polimerase*, enzima *UNG* e tampão para enzimas), 0.125µL de *assay* (40x) específico para cada SNP (solução contendo um par de primers e 2 sondas específicas), e 2.375 µL restantes são divididos entre amostra e água, dependendo da concentração de DNA utilizada na reação. Os *assays* inventoriados, ou seja, aqueles que já foram testados pela *Applied Biosystems* possuem concentração de 20X, necessitando do dobro de *assay* em relação aos *assays-by-design* ou *on-demand*. Esses valores estão apresentados em detalhe na tabela 2.




**Tabela 2.** Volume de reagentes utilizados para a reação de PCR em Tempo Real.

Reagentes	Concentração <i>assay</i>	Volume <i>assay</i> (µL)	MasterMix (2X) (µL)	DNA+água (µL)	Volume Final (µL)
<i>assay inventariado</i> <sup>1</sup>	20X	0.25	2.5	2.25	5
<i>assay-on-demand</i> <sup>2</sup>	40X	0.125	2.5	2.375	5
<i>assay-by-design</i> <sup>3</sup>	40X	0.125	2.5	2.375	5

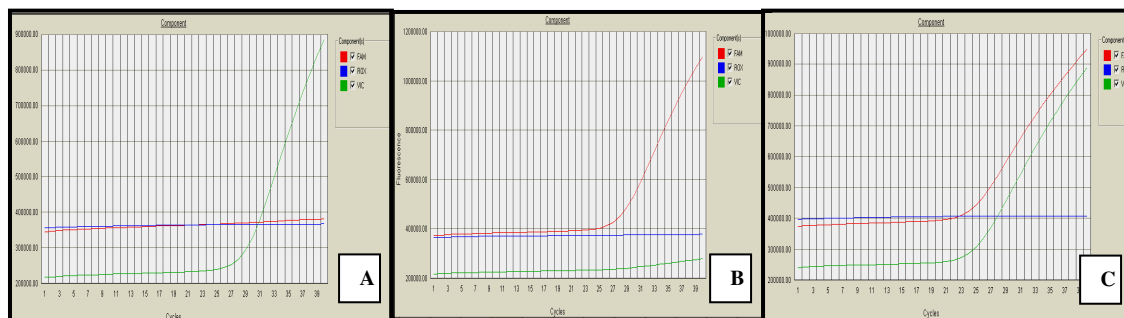
1. *assays* já confeccionados pela *Applied Biosystems*, pelo menos uma única vez, portanto já testados. 2. *assays* validados, mas até o momento nunca pedidos, portanto, nunca confeccionados pela *Applied Biosystems*. 3. *assays* não fornecidos pela *Applied Biosystems*. Necessita do envio de sequência para confecção de primers e sondas.

O resultado da genotipagem foi visualizado pelo *software* de análise na forma de um gráfico “alelo X x alelo Y” como exemplificado na figura 2. O eixo X representa os valores de emissão de fluorescência VIC, e o eixo Y representa os valores de emissão de fluorescência FAM durante a amplificação. Com isso, os três possíveis genótipos se posicionam em regiões diferentes no gráfico, dependendo da emissão de fluorescência dada em cada amostra. Na figura 7, cada ponto do gráfico *Allelic Discrimination* representa uma única amostra.



**Figura 7.** Gráfico aleloX x aleloY representativo dos três possíveis genótipos para determinado SNP. De acordo com a legenda do gráfico, os indivíduos XX, YY e XY estão representados por e ,  e  respectivamente; NTC (No Template Control) e X (genótipo indeterminado).

Para confirmar o genótipo obtido são observados três critérios: curva de amplificação,  $\Delta Rn$  (diferença entre fluorescência emitida pelo fluoróforo e sinal de referência passiva-ROX) e curva de emissão de fluorescência pelo fluoróforo representativo de cada alelo. A figura 8 (A-C) exemplifica as possibilidades de curvas de emissão de fluorescência dadas pelo *software* do aparelho em questão, possibilitando a distinção entre os três genótipos possíveis através da detecção de fluorescência emitida pelos fluoróforos VIC e FAM e captada pelos filtros presente no equipamento.



**Figura 8.** Curvas de emissão de fluorescência através dos fluoróforos VIC e FAM. Representando os genótipos XX(fig.A), YY (fig.B) e XY (fig.C) de um SNP.

O resultado dos genótipos foi visualizado após a comparação do gráfico da *Allelic Discrimination* com as curvas de emissão de fluorescência para cada genótipo.

#### 4.5 Genotipagem de SNPs utilizando a técnica SNPlex™

Outra metodologia utilizada foi a técnica denominada de *SNPlex™ Genotyping System (Applied Biosystems)*. Esta técnica baseia-se em uma reação de ligação de um oligonucleotídeo específico ao SNP, combinada com uma PCR multiplex para amplificação e discriminação dos alelos. Com esta tecnologia podemos genotipar simultaneamente até 48 SNPs de uma mesma amostra biológica. E, além da rapidez na obtenção dos resultados, esta metodologia possibilita maior flexibilidade e especificidade para o estudo, uma vez que os reagentes utilizados são universais e independem do *pool* de SNPs selecionados para o estudo.

Basicamente, esta técnica consiste de oito etapas (Figura 9): (1) Fosforilação das sondas e ligantes; (2) Reação de OLA (*oligonucleotide ligation assay*); (3) Purificação da reação de OLA por digestão do excesso de sondas e ligantes; (4) Reação de PCR universal para amplificação dos produtos de ligação; (5) Captura dos produtos de PCR marcados com biotina em placas cobertas com estreptavidina; (6) Ligação das sondas ZipChute™ nos produtos de PCR em fita simples; (7) Eluição das sondas ZipChute™ hibridizadas; e (8) Detecção por eletroforese em capilar.

Os passos iniciais (1 e 2) são realizados durante a reação de OLA. Nesta reação ocorre a ligação das sondas específicas para o *pool* de SNPs selecionados (*assay*) com os linkers universais. Para cada SNP selecionado têm-se duas sondas alelo-específicas (ASOs) e cada uma delas contém uma sequência diferente (ZipCode) que identifica cada alelo. Há ainda uma terceira sonda para cada SNP, denominada *locus-specific oligonucleotide* (LSO) cuja sequência é comum para ambos os alelos de um determinado locus e contém um sítio de ligação de PCR-primer universal. Para a reação de OLA são necessários 2µL de DNAg (37ng/µL) fragmentado, 2,5µL OLA *Master Mix*, 0,1µL *Ligation Probes SNPlex System*, 0,05µL dATP (100X) e 0,05µL de Universal Linkers, 48-plex. A reação de ligação e hibridização do DNAg é feita em termociclador ABI 9700 (Applied Biosystems, USA), em ciclos de 48°C/30min, 90°C/20min, (94°C/15seg - 60°C/30seg - 51°C/30seg, 2% rampa) 25 ciclos, 99°C/10min. Após a ligação de linkers/sonda e hibridização do DNAg, é feita a reação de purificação da reação de OLA (passo três). Para esta etapa são utilizadas as enzimas Exonuclease I (0,1µL) e Lambda Exonuclease (0,2µL) e ainda 0,5µL de Exonuclease Buffer (10X).

O quarto passo consiste na amplificação simultânea (PCR multiplex) e incorporação de uma molécula de biotina, utilizando-se para isso um par de primers universais, sendo um deles (o reverso) ligado a uma molécula de biotina. São utilizados 5,0µL de *Amplification Master Mix* (2X), 0,5µL de primers (20X). Esta etapa é feita em termociclador ABI 9700 (*Applied Biosystems*, USA), em ciclos de 95°C/10min, (95°C/15seg - 63°C/60seg) 30 ciclos. No passo cinco os *amplicons* biotinilados são ligados à placa com moléculas de estreptavidina ancoradas e em seguida tratados com hidróxido de sódio para desnaturação, ficando ancorada uma única fita. A seguir (passo seis) ocorre hibridização de uma sonda específica (*ZipChutes probes*) nas sequências *ZipCode* complementares presente nos amplicons. Cada *ZipChute probe* contém um número diferente de modificadores de mobilidade, os quais são separados por tamanho durante a eletroforese capilar, além de marcadores fluorescentes que permitem a detecção das *ZipChutes* no leitor óptico do sequenciador. São utilizados 0,05 µL de *ZipChute Mix*, 11,25µL *Denaturant*, 13,7µL *ZipChute Dilution Buffer*. As placas são incubadas por 60min a 37°C em *shaker* de placa (Thermo Scientific, Finlândia).

No passo sete realizamos a eluição das *ZipChutes* e as preparamos para a leitura em sequenciador ABI 3730xl com 16 capilares (passo 8). As *ZipChutes probes* são organizadas em pares, cada par representa ambos os alelos do SNP. Os picos de cada par observados depois da separação eletroforética, com o auxílio do software GeneMapper<sup>®</sup> versão 4.0, são utilizados para identificar os alelos do SNP correspondente. Os diferentes alelos dos marcadores são separados por tamanho e fluorescência.

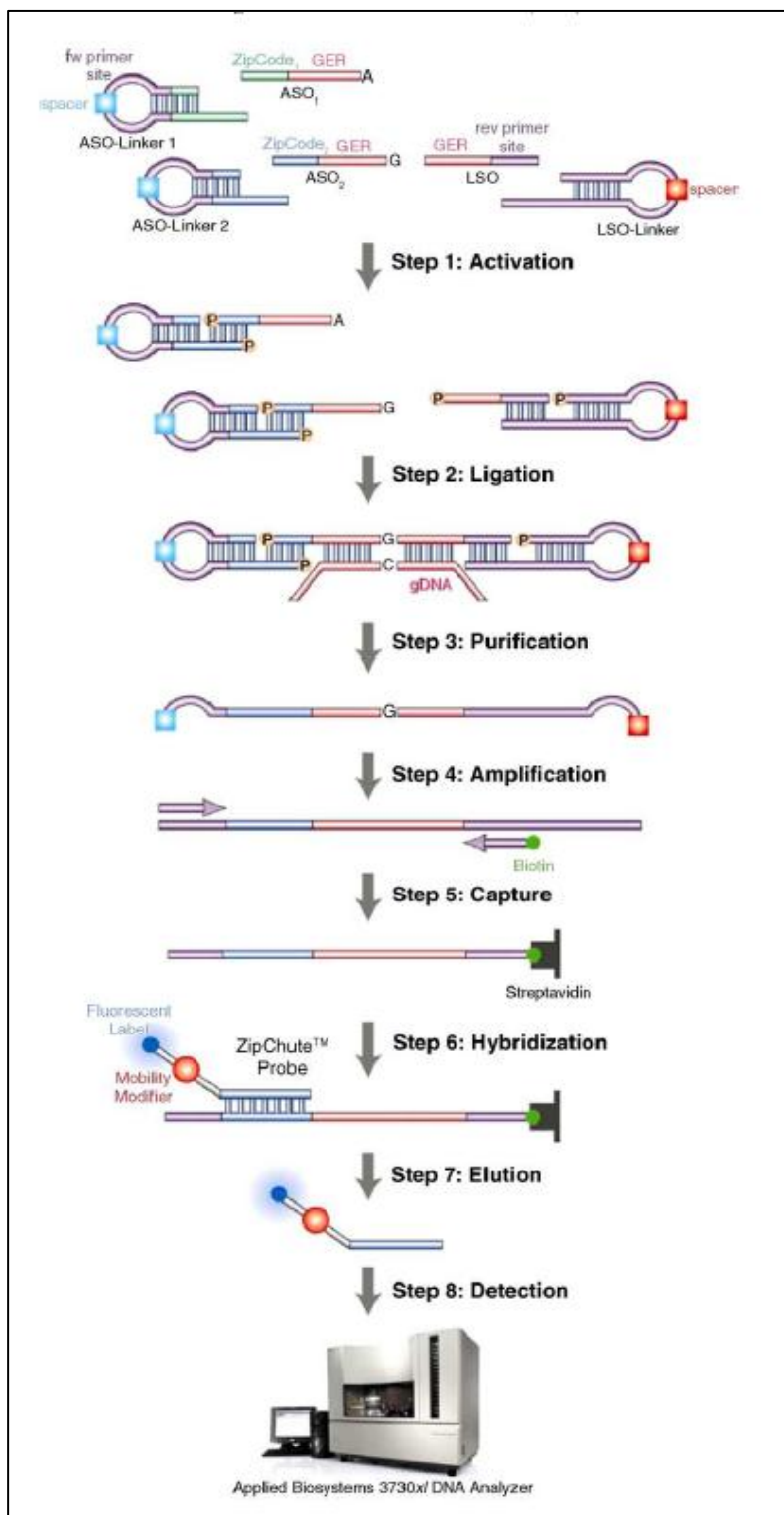
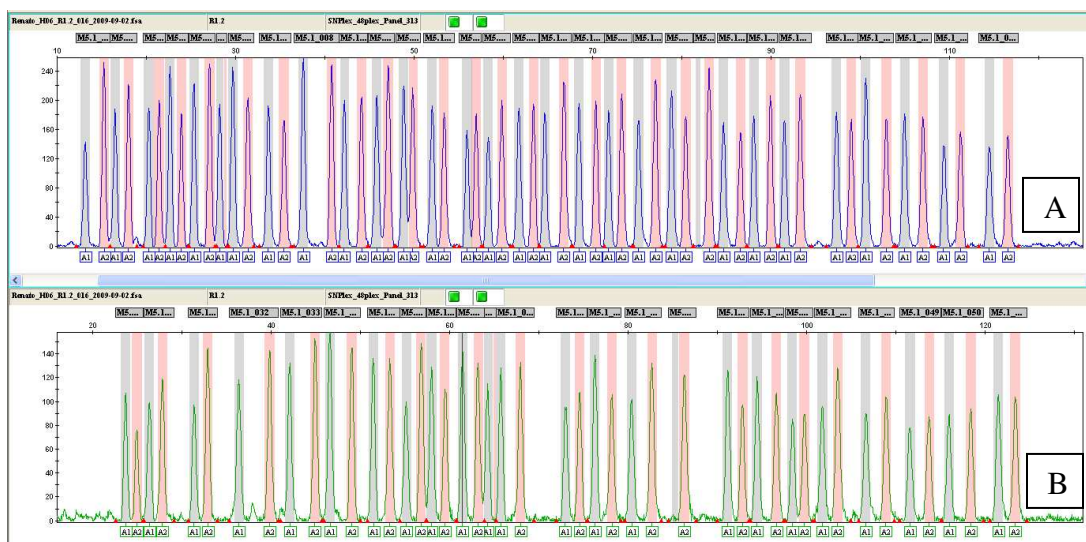


Figura 9. Representação dos passos necessários para a implantação da técnica SNPlex.

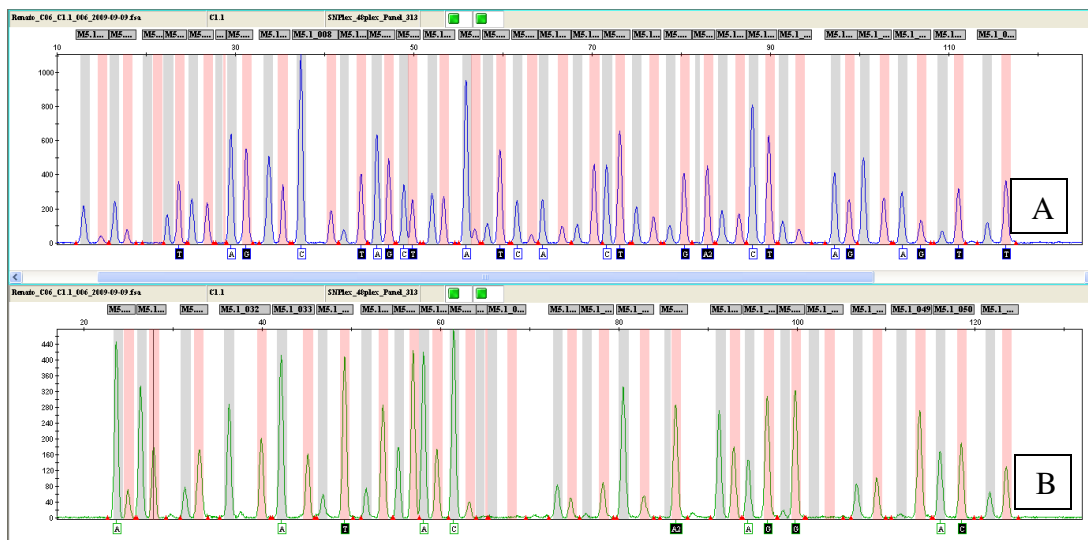


### Análise dos resultados – software GeneMapper 4.0

O programa utiliza diversos parâmetros de qualidade que visam garantir um padrão nas análises das amostras. Os principais parâmetros que o software fornece são a qualidade do *size standard* (SQ – *sizing quality*), que é o padrão de tamanho da eletroforese de capilar, e a qualidade da amostra (WELLQ – *well quality*). Quando o parâmetro SQ não atinge o valor mínimo definido pelo *software* não é possível analisar a amostra. A cada injeção no sequenciador coloca-se um padrão denominado escada alélica (Figura 10), fornecido pela empresa fabricante do *kit*. Este padrão consiste em um conjunto de todos os possíveis alelos dos SNPs genotipados. O *software* realiza uma comparação das amostras com esse padrão e juntamente com os outros parâmetros utilizados indicam a qualidade da genotipagem (Figura 11).

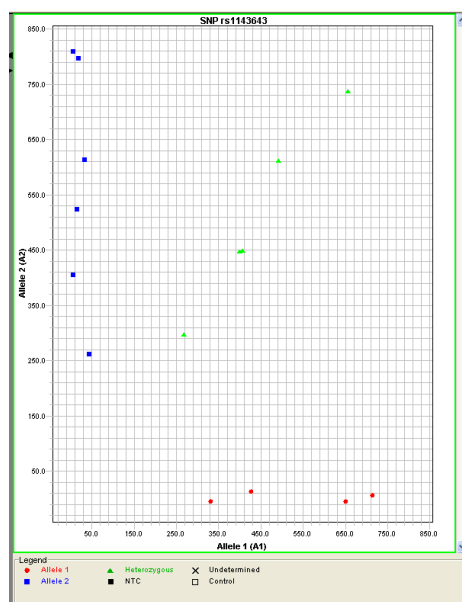


**Figura 10.** Representação da escada alélica ilustrando a posição para todos os possíveis alelos a serem genotipados, de acordo com a mobilidade das ZipChutes. **A.** Conjunto de ZipChutes marcadas com fluoróforo X. **B.** Mesmo conjunto de ZipChutes marcadas com fluoróforo Y. Ambos os conjuntos (A e B) totalizam 96 possíveis alelos.



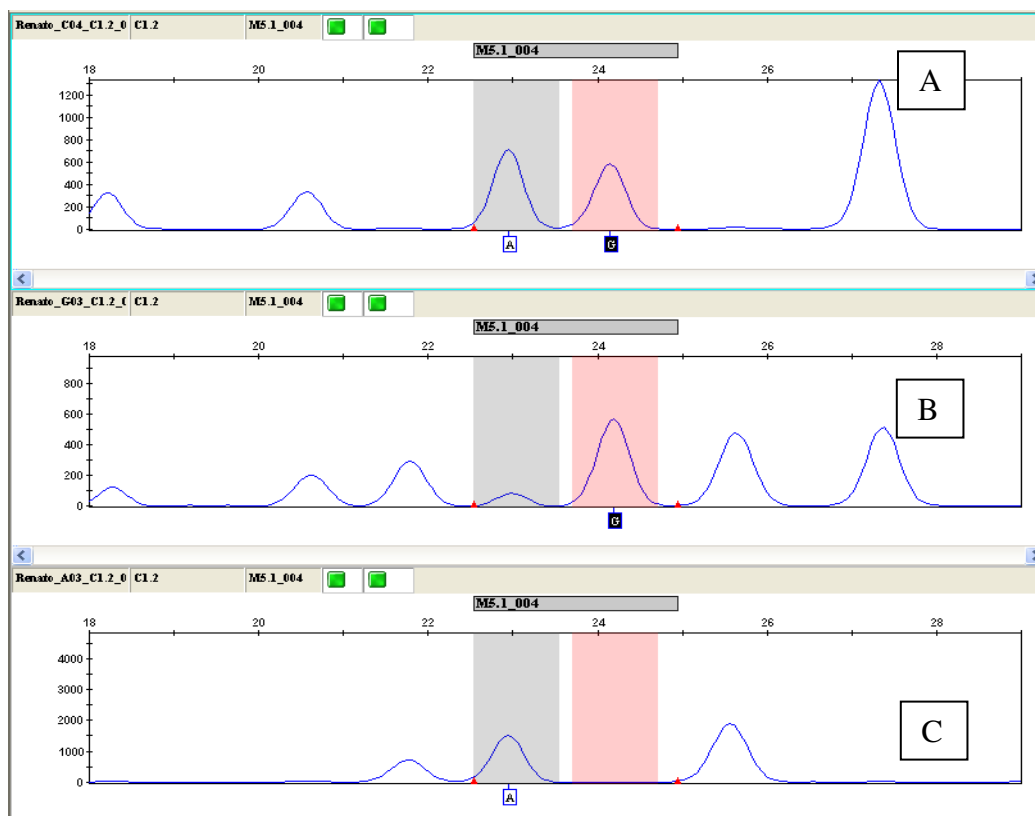
**Figura 11.** Representação de uma amostra genotipada para diferentes SNPs. Cada pico, tanto da figura A como da figura B, identifica um alelo, representado pela ZipChute marcada com diferentes fluoróforos.

Os dados obtidos foram fornecidos em forma de tabelas utilizadas para os cálculos estatísticos, ou através de gráficos de clusterização (Figura 12) no qual estão indicados os genótipos das amostras para cada um dos SNPs analisados.



**Figura 12.** Gráfico de clusterização mostrando os genótipos das amostras. Em vermelho estão os indivíduos A1A1, em verde A1A2 e em azul A2A2. Os eixos dos gráficos indicam a intensidade de fluorescência para cada um dos alelos (Alelo 1 x Alelo 2).

Ao selecionar qualquer uma das amostras evidenciadas no gráfico acima, podem ser observados os *bins* (espaço em pares de base) no qual esperamos encontrar a presença de alelos referentes ao SNP em questão (Figura 13). Dessa forma é possível realizar uma análise manual dos perfis de genotipagem obtidos quando o software não consegue analisar os dados.



**Figura 13.** Representação do eletroferograma mostrando três diferentes amostras genotipadas para um mesmo SNP (rs17861094). **A.** Indivíduo heterozigoto AG. **B.** Indivíduo homozigoto GG. Indivíduo homozigoto AA.

#### 4.6 Análise estatística

##### *Verificação do padrão de qualidade dos SNPs genotipados*

Para um SNP ser considerado um polimorfismo informativo dentro da população que está sendo estudada é necessário que este SNP esteja em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW), possua MAF (do inglês, *minor allele frequency*) maior que 5% e

seja um tagSNP, sendo representante de um bloco haplotípico dentro de cada gene estudado.

O EHW foi calculado para cada SNP, separadamente para cada população: grupo caso (pacientes não-respondedores) e o grupo controle (indivíduos respondedores à medicação). Para valores de  $p$  maiores que 0,05, aceita-se a hipótese nula ( $H_0$ ) de que a população estudada encontra-se em EHW. Para valores menores que 0,05, rejeita-se a  $H_0$  e aceita-se a hipótese alternativa  $H_1$  que diz que a população não se encontra em EHW.

O MAF é obtido a partir do cálculo das frequências alélicas de cada alelo do SNP. Para um SNP bialélico, a soma das frequências de ambos os alelos é igual a 1. Se a frequência de cada alelo for igual a 0,5, pode significar que na população estudada, 100% dos indivíduos genotipados são heterozigotos. Consequentemente, este SNP nesta população não está em Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, pois as frequências genotípicas esperadas não seguem a equação do EHW, representada por:  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$  (sendo  $p$  = frequência do alelo A e  $q$  = frequência do alelo B). Portanto SNPs em *desequilíbrio de Hardy-Weinberg* ou frequência do menor alelo – MAF (do inglês, minor allele frequency) menor que 5% serão excluídos da análise.

Para verificar quais polimorfismos avaliados comportam-se como tagsSNP é necessário fazer o cálculo do *desequilíbrio de ligação* ( $r^2$ ) entre eles. Obtendo os valores de *desequilíbrio de ligação* entre os SNPs tem-se um padrão por gene de como os SNPs estão segregando nas populações estudadas. Se existe um grupo de SNPs em *desequilíbrio de ligação* ( $r^2 > 0.8$ ) significa que estes polimorfismos segregam juntos na *meiose (crossing-over)* formando um bloco haplotípico. Um tagSNP é o polimorfismo que identifica cada bloco haplotípico na região estudada. Conhecer o padrão de *desequilíbrio de ligação* entre os SNPs nas populações estudadas no presente estudo permitirá identificar os tagsSNPs, e descartar demais SNPs, diminuindo as chances de encontrar associações espúrias. Os cálculos de EHW, MAF e tagSNP foram obtidos a partir do programa *Haploview* (Barret et al., 2005).

#### *Verificação da diferença estatística entre os grupos de pacientes estudados*

Para observar se há diferença entre os grupos quanto à sexo, presença de crise febril e atrofia hipocampal foi utilizado o teste exato de *Fisher*. Para a idade de início das crises

foi utilizado o test t de Student. As análises foram feitas utilizando ambiente R (R Development Core Team, 2010).

#### *Cálculo da Regressão Logística Múltipla e odds ratio*

As análises de associação alélica e genotípica e de interação entre genótipos foram feitas utilizando regressão logística binária, função *logistf* (Heinze and Schemper, 2002) em ambiente (R Development Core Team, 2010). Todos os valores de p obtidos foram ajustadas pela correção de múltiplos testes (correção de Bonferroni) de acordo com os SNPs de cada gene após exclusão dos SNPs que não estavam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ( $p < 0.05$ ), apresentaram MAF menor que 5% e/ou  $r^2$  maior que 0.08, indicando desequilíbrio de ligação.

E ainda, a regressão passo a passo (*stepwise*) foi utilizada para estimar qual a contribuição de cada fator genético e não-genético estudado para a farmacoresistência em pacientes com ELTM.

#### *Verificação do padrão de estruturação populacional nos grupos estudados*

Para avaliar possíveis diferenças na variabilidade genética entre os dois grupos estudados, devido a uma possível estratificação populacional, foram calculados, a partir das frequências genotípicas dos SNPs do controle genômico, os índices de  $F_{st}$  e AMOVA.

O índice de  $F_{st}$  (Wright, 1965) identifica a endogamia devido à subdivisão populacional. A partir do cálculo de  $F_{st}$ , pode-se estimar a ocorrência de fluxo gênico entre as populações através do cálculo da relação entre alelos de indivíduos entre todas as populações.

Para o cálculo da variação das frequências alélicas entre diferentes populações é utilizado o  $F_{ST}$ , que é a variância na frequência alélica ( $Vq$ ) estandardizada pela média ( $q$ ):

$$F_{ST} = Vq / [q(1-q)]$$

Os valores de  $F_{ST}$  (endogamia) são considerados baixos se estiverem entre 0 e 0,05, médio até 0,15 e alto de 0,15 a 0,20 e super-alto sendo acima de 0,21 até o máximo de 1,0.

A partir destes valores estima-se a ocorrência de fluxo gênico entre as populações, sendo quanto menor a endogamia maior a taxa de fluxo gênico.

Para conhecimento da variação molecular entre e dentro dos grupos estudados (responsivos e não responsivos), foi feita a Análise de Variância Molecular – AMOVA, do inglês, *Analysis of Molecular Variance*. Este é um método que estima a diferenciação de populações a partir de dados moleculares e testa hipóteses geradas dessa diferenciação. AMOVA considera qualquer tipo de dado molecular bruto. Esse marcador pode ser um SNP, uma seqüência, um fragmento restrito ou um evento de mutação (Excoffier, et al. 1992). Para o cálculo do  $F_{ST}$  e AMOVA foi utilizado o programa Arlequin, v.3.11 (Excoffier & Schneider, 2005).

## Metodologia Complementar

### 4.7 Análise de expressão nos hipocampos

#### *Pacientes*

Os indivíduos selecionados foram pacientes do Ambulatório de Epilepsia refratária do Hospital de Clínicas (HC)-UNICAMP com o diagnóstico clínico e eletrencefalográfico de ELTM nas formas familiar e esporádica segundo criteriosa avaliação clínica, EEG e ressonância magnética, que apresentavam refratariedade medicamentosa e que possuíam indicação cirúrgica como forma de tratamento. O termo de consentimento livre e esclarecido encontra-se no anexo V. Os hipocampos controle, que foram usados para o propósito de comparação com os hipocampos de pacientes foram obtidos por autópsia. Os indivíduos doadores nas autópsias eram pacientes adultos com idade entre 21-60 anos, falecidos no HC da UNICAMP e que tiveram indicação clínica e autorização familiar do falecido para a realização de autópsia como meio para se determinar a causa *mortis*. Como as autópsias são realizadas em um período de 6 horas *post mortem*, a nossa coleta ocorreu em um período máximo de 10 horas *post mortem*. Foram critérios de exclusão: crianças, idosos e indivíduos com suspeita de morte por acometimentos cerebral de qualquer natureza. Ressaltamos que a história pregressa de cada doador foi investigada para assegurar que o mesmo não tenha sido portador de nenhuma doença degenerativa ou cerebrovascular significativa. Este projeto teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa na nossa instituição (processo 470/03) (Anexo VI).

#### *Processamento tecidual*

Os espécimes cirúrgicos dos pacientes e dos doadores controle foram, após a ressecção, imediatamente imersos em nitrogênio líquido e guardados em freezer -80°C, até seu processamento.

A extração do RNA total de todas as amostras foi realizada pelo método TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA) segundo o protocolo recomendado pelo fabricante (1ml do reagente para cada 100mg de tecido). A concentração do RNA total extraído de cada amostra foi medida por densidade óptica através da espectroscopia em equipamento

NanoVue (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) e a qualidade do RNA checada por gel de eletroforese.

### *PCR em Tempo Real*

O padrão de expressão do gene *ABCC2* foi verificado por PCR em tempo real, utilizando hipocampo de 11 pacientes refratários à medicação antiepiléptica que foram submetidos à cirurgia. Para comparação, foram utilizados 6 hipocampos de indivíduos saudáveis proveniente de autópsia.

A síntese de cDNA necessária para os experimentos de PCR em tempo real foi realizada utilizando-se a enzima SuperScript III<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase (Invitrogen). Dois microgramas de RNA total foram incubados com 250ng de oligos randômicos (Invitrogen), 1µL de dNTP mix (10mM) e água para um volume de 14µL, a 65°C por 5 minutos, e então resfriado em gelo. A seguir foram adicionadas à reação: 4µL de 5x First-Strand Buffer, 1µL de DTT (0,1M) e 200U da enzima Superscript III RT, sendo a amostra incubada a 25°C por 5 minutos, 50°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento ABI 7500 (Applied Biosystems 7500 Real Time PCR system), utilizando-se o sistema TaqMan<sup>®</sup> (Applied Biosystems), que é constituído por um par de iniciadores e uma sonda marcada com fluoróforo. Foi utilizado um ensaio otimizado e validado (*inventoried* - Applied Biosystems) para o gene de interesse (Hs00166123\_m1), sendo que a empresa apenas fornece a seqüência da sonda (5' CACCTCCAACAGGTGGCTTGCAATT), mantendo em sigilo as dos iniciadores. Essa sonda é marcada com o fluoróforo FAM e está localizada no final do exon 24 e início do exon 26, (NM\_000392.3) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). O gene escolhido como controle endógeno da reação de PCR quantitativo foi o gene humano de RNA ribossomal 18S (*Pre-developed TaqMan<sup>®</sup> assay*), marcado com VIC.

Decidiu-se fazer os experimentos de expressão gênica utilizando o sistema TaqMan<sup>®</sup> devido a sua grande especificidade ao gene de interesse e também à grande reprodutibilidade dos resultados. Outra vantagem do sistema é reduzir as chances de competição por reagentes devido à contaminação da reação com DNA, uma vez que a sonda é desenhada no limite de dois exons. A escolha por ensaios já otimizados nos reduziu



tempo e reagentes gastos com padronizações de experimentos.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicatas, a partir de: 6,25µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2x, 0,625µL da solução de iniciadores e sonda, 1,625µL de água e 4,0µL de cDNA; com volume final de 12,5µl. As reações para o gene alvo e para o controle endógeno foram realizadas separadamente, na mesma placa (*singleplex*). Os reagentes, com exceção do cDNA, foram todos pipetados dentro de um fluxo laminar (livre de ácidos nucleicos), a fim de proteger os reagentes de contaminação de cDNA de experimentos anteriores. Para todas as corridas e para cada par de iniciadores foi feito um “branco” (reação com todos os reagentes e água substituindo o cDNA). As condições de ciclagem para amplificação utilizadas foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, ocorrendo a leitura da fluorescência neste último passo.

As análises de quantificação relativa de *ABCC2* foram calculadas pelo método de Ct comparativo ( $\Delta\Delta Ct$ ). “Ct” da sigla em inglês *threshold cycle* e significa, ciclo em que cada curva de amplificação atravessa *threshold*, sendo esta uma linha de referência estabelecida pelo usuário. Essa linha de referência (*threshold*) deve ser posicionada na região de amplificação exponencial da reação, servindo como base para comparação entre amostras.

O método de Ct comparativo é determinado pela equação dada por Livak & Schmittgen (2001):

$$RQ = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

A média dos Cts de cada amostra é calculada, tanto para o gene alvo, como para o controle endógeno e, então, é determinado o valor de  $\Delta Ct$  ( $\bar{X} Ct_{\text{alvo}} - \bar{X} Ct_{\text{endog}}$ ). O  $\Delta\Delta Ct$  é calculado, subtraindo-se o  $\Delta Ct$  do calibrador pelo  $\Delta Ct$  da amostra. O calibrador é a amostra escolhida pelo usuário como referência, que terá o valor de  $RQ = 1$  (Livak e Schmittgen, 2001). O valor de RQ (*Relative Quantification*) expressa quantas vezes a amostra em questão está mais expressa em relação ao calibrador.

Os cálculos de RQ, para a análise da expressão, foram realizados pelo aplicativo 7500 System SDS Software (*Applied Biosystems*). As barras verticais presentes nos

gráficos resultantes dessas análises representam os valores máximos e mínimos obtidos.

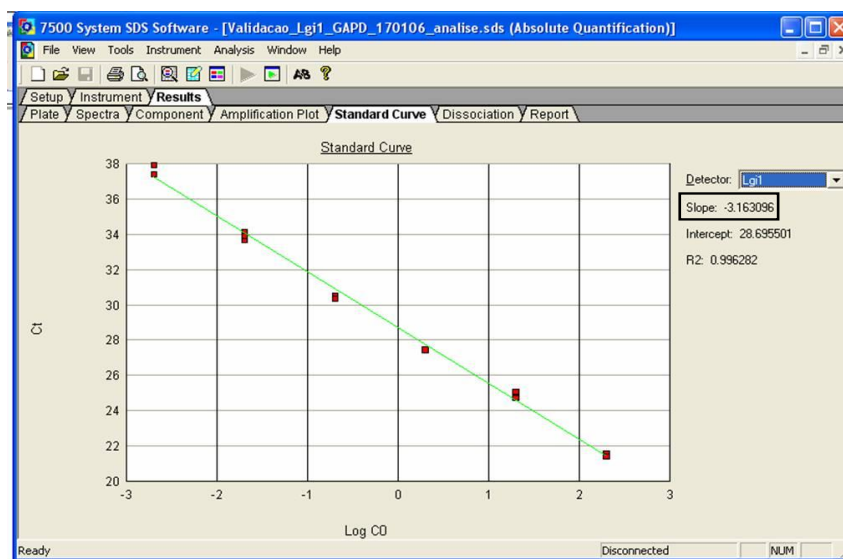
### Validação dos ensaios

Para se iniciar os experimentos de PCR em tempo real foi necessário primeiramente fazer a validação dos ensaios utilizados, demonstrando que as eficiências de amplificação dos iniciadores para o gene de interesse e para o controle endógeno eram semelhantes.

A eficiência é calculada através da fórmula:

$$E = 10^{(-1/slope)} - 1,$$

onde *slope* é a inclinação da curva padrão gerada pelos dados: *log* da concentração das amostras x Ct (Figura 14). O valor da eficiência deve ser  $1 \pm 0,1$ , ou seja próxima a 100% e deve ser semelhante entre controle endógeno e gene alvo. O valor de  $R^2$  também gerado a partir da curva padrão indica o quanto as réplicas estão parecidas, ou seja, indica o grau de confiabilidade dos dados. Este valor deve ser maior que 0,95, o que indica mais de 95% de confiabilidade.



**Figura 14:** Curva padrão para validação das reações de PCR em tempo real. Tela do aplicativo “7500 System SDS Software” mostrando a curva padrão gerada a partir do *log* da concentração das amostras (eixo x) e os Cts (eixo y). Notar quadro destacando o valor de *slope* (inclinação da reta) que é utilizado no cálculo da eficiência da amplificação.

Para a validação dos 2 ensaios, *ABCC2* e *18S*, foram feitas triplicatas de 7 concentrações diferentes (diluições seriadas de 2 vezes) de uma amostra escolhida aleatoriamente. Essa grande variação de concentrações nos permite conhecer se posteriormente poderemos trabalhar com segurança com possíveis amostras que tenham a expressão muito baixa, por exemplo. Após o cálculo das eficiências de amplificação dos genes alvo e endógeno, foi construída uma curva, como indicado pelo protocolo, fora do aplicativo do “7500 System SDS Software”, utilizando no eixo x os mesmos valores de *log* da concentração das amostras e no eixo y a diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e dos Cts do gene de interesse. O valor da inclinação da curva deve ser menor que 0,1.

Desta forma, a validação é importante para dar confiabilidade para os resultados: primeiro, garantindo que o controle endógeno escolhido tenha uma eficiência parecida ao do gene alvo e, portanto, podem ser utilizados juntos; segundo, validando a faixa de valores de Ct confiáveis, tanto para endógeno como para alvo, para se aceitar os resultados de RQ gerados.

Após validação dos ensaios endógenos/alvo foi feita a quantificação relativa em 11 amostras de pacientes e em 6 controles. Os valores obtidos de RQ (relative quantification) estão mostrados no capítulo 3. Como a amostragem não segue uma curva paramétrica, decidimos utilizar o teste não paramétrico de Mann-Whitney ( $p_{unilateral}$ ) para verificar se há diferença significativa de expressão do gene *ABCC2* entre os grupos. O valor de p foi considerado significativo com valor de  $\alpha$  maior que 0.05. As análises foram feitas em programa BioEstat 3.0 (Ayres et al. 2003). O resultado encontra-se no capítulo 1 e 3.

### *Western blot*

A análise semiquantitativa da proteína MRP2 foi realizada por *western blot*, utilizando extratos protéicos de hipocampus provenientes de pacientes refratários e hipocampus provenientes de indivíduos saudáveis provenientes de autópsias.

A extração de proteínas do tecido foi realizada conforme descrito por Deshane e colaboradores (2004), com pequenas modificações. Foram colocados 200mg de tecido para 1,2mL de tampão de lise (uréia 7M, tiouréia 2M, [(3-colamidopropil) dimetilamônio,]-1-propanossulfonato (CHAPS) 4%, DTT 70mM e amidossulfobetaina-14 (ASB-14) 2%,

suplementado com coquetel de inibidores de proteases 1%). O tecido foi homogeneizado no tampão de lise, com o auxílio do aparelho Politron (*Fischer Scientific*). Após centrifugação a 14000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi coletado e a concentração das proteínas foi obtida pelo método de Bradford.

Nos experimentos de *western blot* foi utilizado o anticorpo monoclonal contra MRP2: M2I-4-ab3372 (*Abcam, Cambridge, UK*), sendo que 100ug de extrato protéico total foi separado em gel de SDS-PAGE 10% (Sambrook et al., 1989) a 120V por 1 hora e 30 minutos e transferido para uma membrana de nitrocelulose Hybond C (*GE Healthcare*) usando o aparelho de eletroblot Multiphor II (*GE Healthcare*) a 3500V por 2 horas. O bloqueio foi realizado em solução de TBS 1X contendo 5% de leite em pó desnatado por 2 horas e lavado duas vezes com TBS 1X. Em seguida, a membrana foi incubada por 16 horas com os anticorpos primários, em diferentes concentrações, contra a proteína MRP2 (1:200) e contra  $\beta$ -actina (1:1000), utilizada como controle. No dia seguinte, a membrana foi lavada duas vezes com TBS 1X e incubada com os anticorpos secundários anti-IgG de coelho para  $\beta$ -actina e anti-IgG de camundongo para MRP2, ambos diluídos 1:20000) conjugado com fosfatase alcalina (*Sigma-Aldrich*). As bandas foram detectadas pela incubação da membrana com tampão de revelação acrescido de BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-fosfatase) e NBT (NitroBlue Tetrazólico) (ambos da *Sigma-Aldrich*). O resultado encontra-se no capítulo 3.

# RESULTADOS

## 5. RESULTADOS

Os resultados obtidos estão apresentados na forma de capítulos, sendo que o primeiro capítulo contém os resultados obtidos a partir das genotipagens dos SNPs presentes nos genes transportadores de drogas *ABCB1* e *ABCC2*, e nos 9 genes do CYP450. O capítulo 2 contém os resultados obtidos através da genotipagem de SNPs do gene transportador de drogas, não-ABC, *RLIP76*. Os capítulos 1 e 2 estão apresentados na forma de artigo. O capítulo 3 contém a descrição dos resultados de experimentos complementares, como a genotipagem do SNP exônico rs2298771 do gene *SCN1A*, além de resultados de expressão do gene *ABCC2* (PCR em tempo real), e da proteína MRP2 (*western blot*) em hipocampo de pacientes com ELTM refratários à medicação antiepiléptica.

# **CAPÍTULO 1**

**SNPs em genes metabolizadores (*CYP450*) e transportadores de drogas (*ABC-family*) estão associados com a farmacoresistência em pacientes com epilepsia de lobo temporal mesial**

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

Mariana S. Silva<sup>1</sup>, Rodrigo Secolin<sup>1</sup>, Elisabeth Bilevicius<sup>2</sup>, Renato O. Santos<sup>1</sup>,  
Claudia Maurer-Morelli<sup>1</sup>, Fernando Cendes<sup>2</sup>, Iscia Lopes-Cendes<sup>1</sup>

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 19 3521 8909](tel:+551935218909)  
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*<sup>TM</sup>) 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 this 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 SNPBrowser<sup>TM</sup> software, version 4.0 (De La Vega *et. al.*, 2006), available at [www.allsnps.com](http://www.allsnps.com).

### **Genotyping**

DNA was isolated from venous blood samples through phenolchloroform method (Sambrook, 1989). Part of SNPs (108) were genotyped using Applied Biosystem SNPlex<sup>TM</sup> Technology and the others SNPs (22) were carried out using Real Time Genotyping TaqMan system<sup>TM</sup>, ABI7500 (Applied Biosystems, Foster City, California, United States). The SNPlex<sup>TM</sup> 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 system<sup>TM</sup> 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).

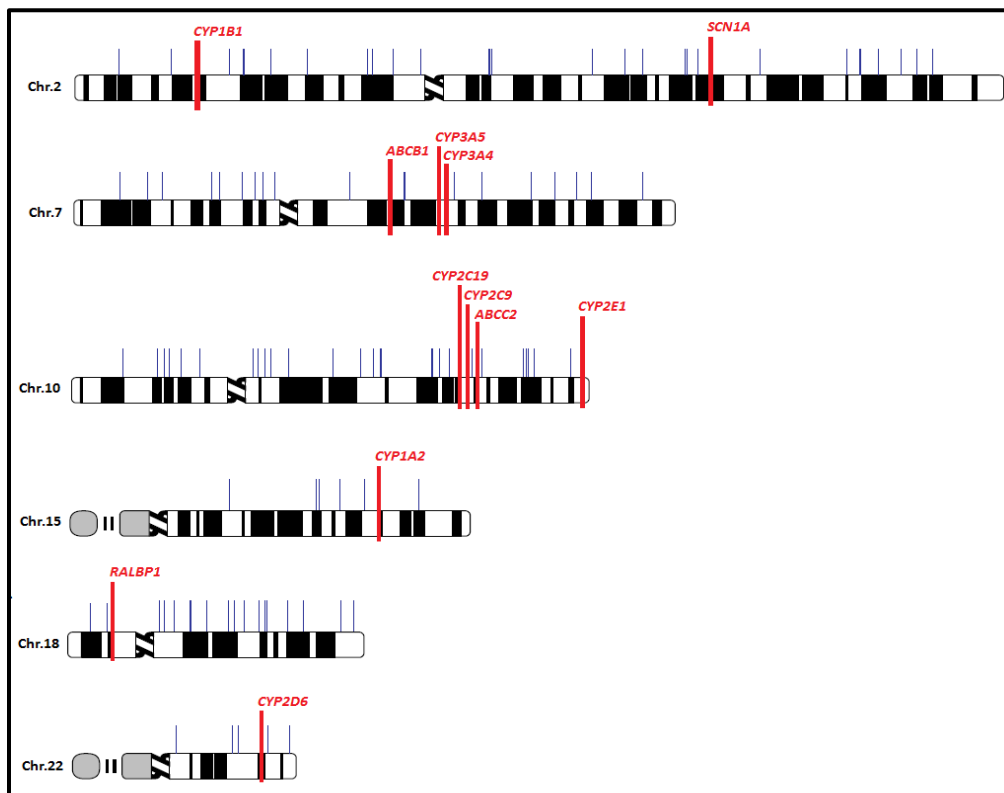
Minor allele frequency (MAF; threshold = 0.05), *Hardy-Weinberg* equilibrium (p value threshold = 0.05) and linkage disequilibrium ( $r^2 > 0.8$ ) were checked using Haploview software (Barret *et al.*, 2005), as SNP quality control (QC). Genotype, allele and genotype interaction association with non-responder 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  $\alpha$  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.

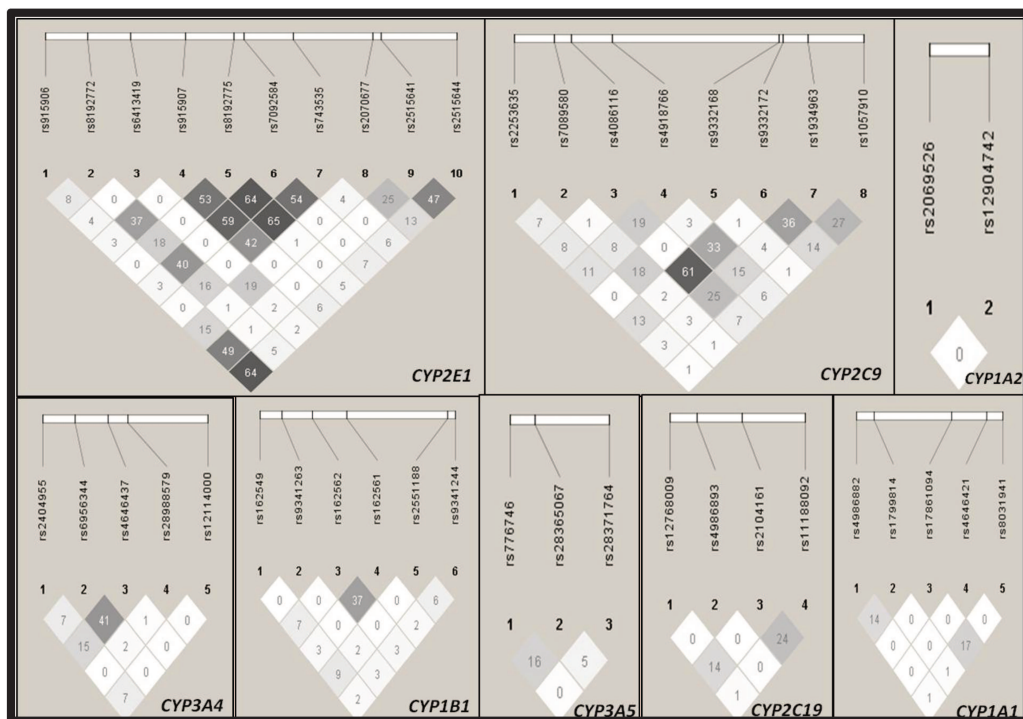
patients	Hippocampal Atrophy	Sex (women)	Age $\pm$ SD (y)	DE $\pm$ SD (y)	FS (N)	AEO $\pm$ SD (y)	AED (n)	IFS $\pm$ SD (events/mo)
responders	52 (66.67%)	47(60.20%)	47.03 $\pm$ 10.97	26.14 $\pm$ 14.96	14	14.04 $\pm$ 10.26	0.95 $\pm$ 0.70	10.57 $\pm$ 18.65
resistants	149 (90.85%)	89(54.27%)	41.68 $\pm$ 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

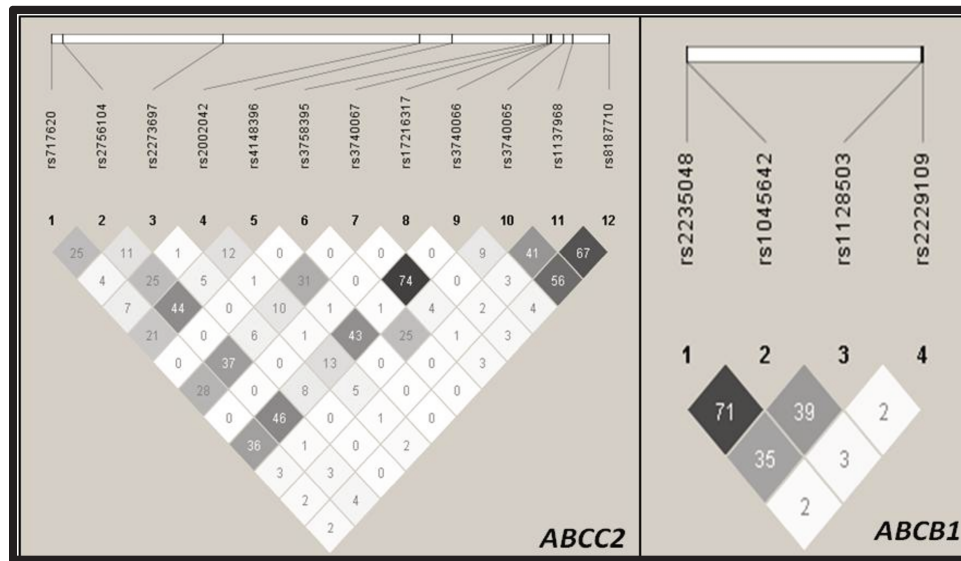
SD: Standard deviation; DE: duration of epilepsy; AEO: Age at epilepsy onset; FS: Febrile seizure; IFS: Initial frequency of seizures; y: years; N: number of patients; n: number of AEDs; mo: month. Age and IFS: ANOVA; AED: qui-square; DE: ANOVA; Sex, FS, hippocampal atrophy: Fisher's exact test; AEO: 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).

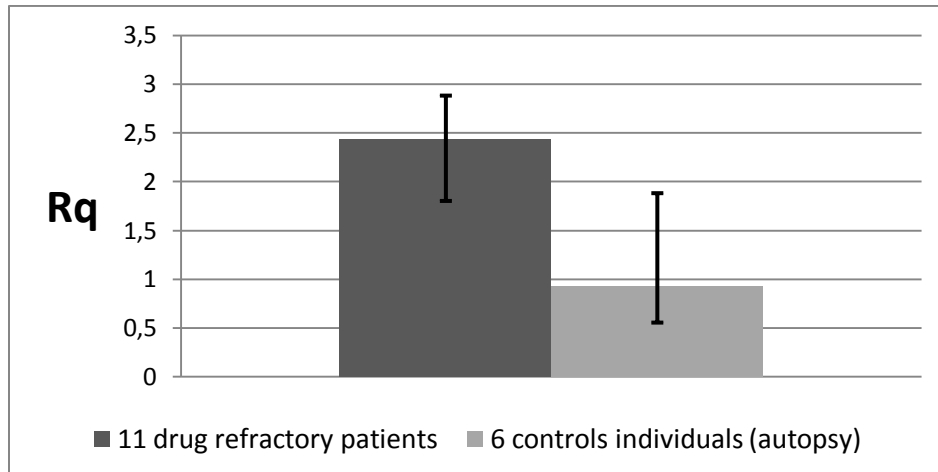




**Figure 2.** Examination of the pattern of haplotype blocks per gene in the population studied - The number in square indicates the value of  $r^2$  between SNPs. The colors of squares follow the numbers, being the darkest with  $r^2$  value higher than the more clear.

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 pharmacoresistant 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 pharmacoresistant 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 frequency (%)	AED- pharmacoresistant frequency (%)	$\beta$	se( $\beta$ )	Pvalue		Effect estimation		
							nominal	corrected	OR	low 95% IC	High 95% IC
<i>CYP1B1</i>	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
	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
<i>CYP2C9</i>	rs2153628	T	4,93	7,06	1,2098	0,4050	0,00099	0,00891	3,35	1,52	7,42
		AA	50,00	68,90	0,8473	0,2833	0,002589	0,02330	2,33	1,34	4,07
	rs1934963	G	32,05	21,01	-0,8473	0,2833	0,00259	0,02330	0,43	0,25	0,75
		TT	73,08	51,22	-0,9352	0,2982	0,001171	0,01054	0,39	0,22	0,70
<i>ABCC2</i>	rs3740066	C	46,84	15,62	0,9352	0,2982	0,00117	0,01054	2,55	1,42	4,57
		TT	19,23	7,32	-1,1696	0,4102	0,003669	0,04402	0,31	0,14	0,69
	rs3740066	C	12,33	2,23	1,1696	0,4102	0,00367	0,04402	3,22	1,44	7,20
		AG	23,08	9,15	-1,0816	0,3814	0,004119	0,00824	0,34	0,16	0,72
<i>CYP1A2</i>	rs12904742	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

$\beta$ : regression coefficient; se( $\beta$ ): standard error of regression coefficient ;OR:odds ratio. The painted cells represent the significant results ( $p_{\text{corrected}} < 0.05$ ).

**Table 4.** Significant results for SNP interactions.

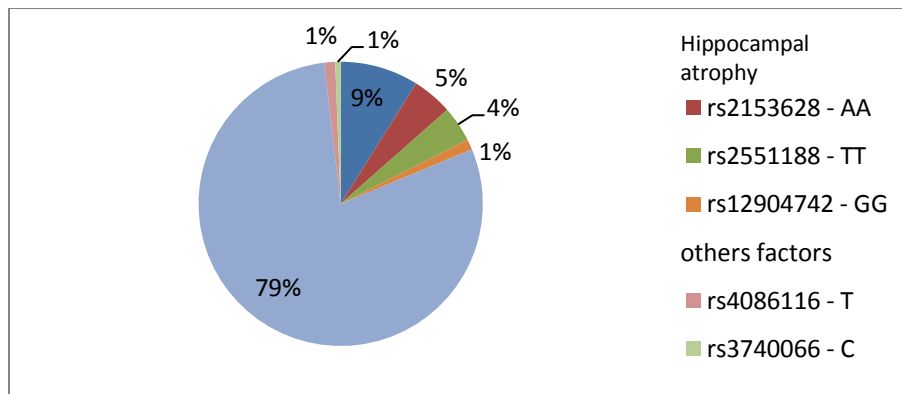
Genes	SNP interaction	$\beta$	se( $\beta$ )	Pvalue		Effect estimation		
				nominal	corrected	OR	low 95% IC	High 95% IC
<i>CYP1B1</i> : <i>CYP2C9</i>	rs2551188CC : rs1934963TT	-1,1471	0,3164	0,00024	0,03384	0,32	0,17	0,59
<i>CYP1B1</i> : <i>CYP2C9</i>	rs2551188CT : rs4086116CT	3,1293	1,4804	0,00029	0,04082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

$\beta$ : regression coefficient; se( $\beta$ ): standard error of regression coefficient ;OR:odds ratio. . The painted cells represent the significant 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 ilustrated 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-pharmacoresistant 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 anticonvulsants 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-pharmacoresistant 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-pharmacoresistant 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, Kaefer 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, Ruehmkoef 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 is 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*, 2<sup>nd</sup> 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.

# **Supplemental Data**

## **(Capítulo 1)**



**Table 1.** SNPs selected in each chromosome for genomic control containing interest gene for associations studies.

SNP	Chr.	position	Function				
				rs6970237	7	61779325	Intron
rs4854183	2	3369049	Intron	rs1468163	7	71740458	Intron
rs13033651	2	17977750	Intron	rs10269564	7	78213223	Intron
rs312966	2	21360583	Intron	rs10953607	7	109052359	Intron
rs4670075	2	34386193	Intron	rs6966622	7	111469572	Intron
rs7568053	2	38646846	Intron	rs805803	7	123055555	Intron
rs11675509	2	46196570	Intron	rs13245505	7	129698762	Intron
rs7576924	2	56501821	Intron	rs975789	7	135925039	Intron
rs7609407	2	73500128	Intron	rs6962710	7	140147902	Intron
rs6707475	2	74710491	Missense	rs1390720	7	146910565	Intron
rs412079	2	80467493	Intron	rs453534	7	154772949	Intron
rs6547762	2	88515762	Intron	rs10235911	7	158038989	Intron
rs12615074	2	107578007	Intron	rs7088472	10	10239498	Intron
rs6713136	2	107880580	Intron	rs2493624	10	19062256	Intron
rs6716554	2	108540987	Intron	rs10764125	10	19964863	Intron
rs7425100	2	136967791	Intron	rs7076249	10	21780670	Intron
rs2195114	2	145463764	Intron	rs7073142	10	23372022	Intron
rs6727767	2	151016041	Intron	rs4019731	10	23673298	Intron
rs2909450	2	162867791	Intron	rs867354	10	26695750	Intron
rs6432729	2	163473015	Intron	rs10826926	10	31534357	Intron
rs6432838	2	166511783	Intron	rs12264577	10	42407506	Intron
rs840706	2	177692572	Intron	rs2742236	10	43620551	Intron
rs13008910	2	184060669	Intron	rs2247981	10	43923616	Intron
rs17202235	2	208220191	Intron	rs2185311	10	45731683	Intron
rs10209471	2	212159787	Intron	rs10796322	10	47559903	Intron
rs1829611	2	212461291	Intron	rs4636605	10	52404195	Intron
rs284552	2	217313044	Intron	rs7914287	10	69350563	Intron
rs6749903	2	223653986	Intron	rs7094342	10	74792166	Intron
rs2070735	2	228176901	UTR-3	rs11001309	10	76919273	Intron
rs10179086	2	232744209	Intron	rs7904646	10	78140834	Intron
rs10250100	7	6720341	Intron	rs1949737	10	79952134	Intron
rs6956840	7	14592662	Intron	rs7074960	10	80259796	Intron
rs801758	7	18564562	Intron	rs7074356	10	82191334	Intron
rs11980796	7	32201042	Intron	rs9325460	10	82492323	Intron
rs1597557	7	32502105	Intron	rs265518	10	83099241	Intron
rs7808534	7	34930230	Intron	rs3814205	10	86131059	Missense
rs343085	7	35572626	Intron	rs2817656	10	98905223	Intron
rs379768	7	41318467	Intron	rs4331020	10	104102331	Intron
rs11972012	7	44985669	Intron	rs7894703	10	108053365	Intron
rs11761505	7	47103211	Intron	rs17125571	10	110779693	Intron
rs10274403	7	50424631	Intron	rs1900505	10	118371941	Intron
				rs2420673	10	122001324	Intron
				rs978854	10	122302038	Intron

rs2420936	10	123208881	Intron
rs1696839	10	123509687	Intron
rs1767103	10	125322297	Intron
rs7903331	10	126225823	Intron
rs8023613	15	32952193	Intron
rs12901781	15	51462281	Intron
rs4774602	15	52065471	Intron
rs11631645	15	56317789	Intron
rs12901782	15	61544834	Intron
rs11072380	15	72974647	Intron
rs2712767	18	1825170	Intron
rs264203	18	10882121	Intron
rs9957932	18	19461917	Intron
rs9963407	18	20377177	Intron
rs2588567	18	21900448	Intron
rs1905057	18	22205559	Intron
rs17665082	18	25223303	Intron
rs11083238	18	25523490	Intron
rs9952863	18	28554127	Intron
rs16958816	18	32815683	Intron
rs10468843	18	33995541	Intron
rs12607992	18	34020394	Intron
rs11082059	18	35813598	Intron
rs9946676	18	38861949	Intron
rs391883	18	54099885	Intron
rs8097646	18	55008906	Intron
rs1968274	18	55314211	UTR-3
rs11152327	18	59708465	Intron
rs1981374	18	62604425	Intron
rs11151737	18	69930369	Intron
rs4919098	18	99205731	Sinônimo
rs5748869	22	16855274	Intron
rs5753991	22	32738182	Intron
rs13057617	22	34247064	Intron
rs873724	22	45109027	nearGene-5
rs9615812	22	48617648	Intron

**Table 2:** Values of MAF and EHW for all SNPs genotyped for each groups and both together.

GENE	SNP	AED-pharmacoresistants n=164		AED-responders n= 78		BOTH n=242		SNPtags
		MAF (>0.05)	EHW (P>0.05)	MAF (>0.05)	HWE (P>0.05)	MAF (>0.05)	HWE (P>0.05)	
CYP1B1	rs162549	0.268	1.0	0.235	1.0	0.257	1.0	rs162549
	rs9341263	0.185	1.0	0.261	0.2008	0.211	0.3549	rs9341263
	rs2855658	0.427	0.0010	0.433	1.0	0.429	0.0048	
	rs162562	0.213	0.337	0.268	0.7842	0.231	0.2678	rs162562
	rs1800440	0.312	4,20E-03	0.222	0.9529	0.282	2.63-05	
	rs1056836	0.428	0.0168	0.452	0.5404	0.436	0.0142	
	rs162561	0.163	0.9254	0.203	0.997	0.176	0.7794	rs162561
	rs9341249	0.152	0.0012	0.097	1.0	0.133	0.0016	
	rs2551188	0.405	0.4473	0.267	0.7293	0.357	0.58	rs2551188
rs9341244	0.082	0.7478	0.05	1.0	0.07	0.667	rs9341244	
ABCB1	rs2235048	0.369	0.8166	0.36	0.2891	0.366	0.3402	rs2235048
	rs1045642	0.38	0.565	0.355	1.0	0.372	0.5256	rs1045642
	rs2032582	0.459	8,69E-28	0.457	8,60E-10	0.459	1,50E-41	
	rs2235039	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	1.0	
	rs1128503	0.354	0.3763	0.344	1.0	0.351	0.446	rs1128503
	rs2032586	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	1.0	
	rs2229109	0.046	0.5694	0.058	1.0	0.05	0.9048	rs2229109
	rs9282564	0.052	0.7151	0.048	0.01	0.051	0.0308	
rs3213619	0.024	1.0	0.039	0.1922	0.029	0.3531		
CYP3A4	rs12333983	0.128	6,12E-01	0.217	0.788	0.157	5,0E-4	
	rs6956344	0.117	0.7534	0.173	1.0	0.136	0.7794	rs6956344
	rs4646437	0.241	0.4733	0.275	0.8673	0.252	0.4131	rs4646437
	rs28988579	0.059	0.7884	0.056	1.0	0.058	1.0	rs28988579
	rs2687111	0.0070	1.0	0.029	3,0E-4	0.015	5,0E-4	
	rs2405184	0.021	1.0	0.014	1.0	0.018	1.0	
	rs12114000	0.034	1.0	0.056	0.376	0.041	0.615	rs12114000
rs2404955	0.219	0.1365	0.243	1.0	0.227	0.2273	rs2404955	
CYP3A5	rs28365083	0.014	1.0	0.015	1.0	0.014	1.0	
	rs28365087	0.065	0.8889	0.035	1.0	0.055	0.9387	
	rs10264272	0.029	0.1953	0.022	1.0	0.027	0.2549	
	rs776746	0.19	0.7823	0.218	0.5966	0.2	1.0	rs776746
	rs28365067	0.057	1.0	0.121	0.1043	0.078	0.2525	rs28365067
	rs28371764	0.092	1.0	0.056	1.0	0.08	1.0	rs28371764
rs4646457	0.067	1,16E-06	0.169	1.0	0.101	4,47E-02		
CYP2C19	rs11568732	0.105	0.4205	0.095	0.0253	0.101	0.0317	
	rs12773342	0.222	0.7524	0.373	9,0E-4	0.272	0.1415	
	rs12768009	0.138	1.0	0.123	1.0	0.133	1.0	rs12768009
	rs12778026	0.172	0.0258	0.171	0.055	0.172	0.0022	rs4986893
	rs4986893	0.088	0.6456	0.096	0.9948	0.091	0.5357	
	rs4304697	0.013	1.0	0.021	1.0	0.016	1.0	
	rs2104161	0.276	0.1568	0.379	1.0	0.309	0.2128	rs2104161
	rs1322179	0.134	1.0	0.148	0.9226	0.138	1.0	
rs12253253	0.157	0.2695	0.25	0.2219	0.187	0.0504		

	rs11188092	0.167	0.1473	0.247	0.4557	0.193	0.0653	rs11188092
	rs3758580	0.136	0.5983	0.116	0.6978	0.13	1.0	
	rs3758581	0.22	5,18E-02	0.219	0.9261	0.22	7,36E-01	
	rs11597626	0.167	0.0347	0.209	0.2205	0.18	0.0094	
	rs4917623	0.345	8,26E-02	0.329	0.8903	0.34	6.0E-4	
	rs4617515	0.416	0.0972	0.466	0.2968	0.432	0.0368	
	rs12268020	0.164	0.1087	0.294	0.3111	0.206	0.0221	
	rs9332104	0.145	0.1174	0.236	0.2987	0.175	0.03	
	rs2253635	0.367	0.5872	0.396	0.8641	0.376	0.8235	rs2253635
	rs7089580	0.162	0.0776	0.275	0.8673	0.2	0.0776	rs7089580
	rs4086116	0.16	0.6293	0.068	0.055	0.129	0.1087	rs4086116
	rs2256871	0.033	1.0	0.027	1.0	0.031	1.0	
	rs4918766	0.443	0.2597	0.357	0.4953	0.416	0.6137	rs4918766
	rs7897079	0.113	0.1396	0.269	0.6207	0.164	0.0462	
	rs2153628	0.143	0.6345	0.286	0.5917	0.19	0.2037	
	rs4917639	0.354	0.0056	0.261	0.2342	0.323	0.0014	
CYP2C9	rs9332168	0.137	0.5038	0.269	0.6207	0.179	0.1857	rs9332168
	rs9332172	0.22	1.0	0.148	0.3265	0.197	0.6489	rs9332172
	rs9332174	0.173	0.0371	0.257	0.5318	0.202	0.0254	
	rs1856908	0.112	4.0E-4	0.257	0.0112	0.159	1,51E-03	
	rs1934963	0.261	0.39	0.121	0.6628	0.215	0.4511	rs1934963
	rs1057910	0.064	1.0	0.051	1.0	0.06	0.929	rs1057910
	rs4918797	0.259	0.3131	0.077	1.0	0.201	0.1501	
	rs1505	0.5	8,32E-04	0.397	0.0027	0.466	2,66E-06	
	rs1885301	0.424	0.136	0.486	0.865	0.452	0.3647	
	rs17222646	0.01	1.0	0.0070	1.0	0.0090	1.0	
	rs717620	0.17	0.8284	0.203	1.0	0.182	0.8714	rs717620
	rs2756104	0.392	0.3654	0.48	0.781	0.433	0.8077	rs2756104
	rs 2073336	0.49	2,98E-36	0.493	1,75E-14	0.491	5,19E-55	
	rs2756109	0.497	0.0304	0.399	0.0417	0.464	0.0033	
	rs17216198	0.019	0.0961	0.0	1.0	0.013	0.0652	
	rs2273697	0.189	0.9727	0.153	0.9216	0.177	1.0	rs2273697
	rs17222589	0.0060	1.0	0.0	1.0	0.0040	1.0	
	rs17216233	0.0060	1.0	0.0	1.0	0.0040	1.0	
	rs17222632	0.0030	1.0	0.0	1.0	0.0020	1.0	
	rs2002042	0.255	0.8146	0.233	0.3323	0.248	0.349	rs2002042
ABCC2	rs17222547	0.0060	1.0	0.0070	1.0	0.0070	1.0	
	rs4148396	0.298	0.7905	0.428	0.137	0.34	0.1428	rs4148396
	rs17216345	0.029	8,32E-01	0.0	1.0	0.019	2,59E-01	
	rs17222723	0.09	0.6247	0.067	1.0	0.082	0.8635	
	rs3758395	0.042	0.4587	0.056	0.376	0.046	0.1433	rs3758395
	rs3740067	0.343	0.5394	0.46	0.7247	0.381	1.0	rs3740067
	rs17216317	0.063	0.0302	0.104	0.8875	0.076	0.2564	rs17216317
	rs3740066	0.328	0.1169	0.447	1.0	0.366	0.318	rs3740066
	rs17216275	0.025	1.0	0.0	1.0	0.017	1.0	
	rs3740065	0.149	0.6066	0.12	1.0	0.14	0.6426	rs3740065
	rs1137968	0.09	0.7033	0.062	1.0	0.081	0.8843	rs1137968
	rs8187707	0.084	0.5664	0.05	1.0	0.072	0.6525	
	rs8187710	0.109	0.5235	0.083	1.0	0.101	0.8069	rs8187710

	rs12251995	0.0060	1.0	0.014	1.0	0.0090	1.0	
CYP2E1	rs2070673	0.062	0.8644	0.014	0.0146	0.047	0.1334	
	rs915906	0.248	0.5935	0.235	0.9328	0.244	0.4643	rs915906
	rs8192772	0.084	0.5384	0.11	1.0	0.093	0.5597	rs8192772
	rs6413419	0.061	0.1718	0.09	0.8958	0.07	0.1554	rs6413419
	rs915907	0.216	0.3758	0.199	0.3362	0.21	1.0	rs915907
	rs8192775	0.124	0.0911	0.139	0.432	0.129	0.5411	rs8192775
	rs7092584	0.17	0.0615	0.144	1.0	0.161	0.1637	rs7092584
	rs743535	0.097	0.2536	0.11	0.8411	0.101	0.7176	rs743535
	rs2070677	0.286	0.2674	0.197	0.3777	0.257	0.6258	rs2070677
	rs2515641	0.21	0.0567	0.204	0.3078	0.208	0.4066	rs2515641
	rs2249694	0.333	0.0663	0.287	0.2313	0.318	0.0179	
	rs2515644	0.304	0.2975	0.293	0.8301	0.3	0.2348	rs2515644
CYP1A1	rs4986882	0.066	1.0	0.072	1.0	0.068	0.7196	rs4986882
	rs28399429	0.051	0.0735	0.035	1.0	0.046	0.1152	
	rs1799814	0.127	0.7028	0.169	0.4997	0.141	0.335	rs1799814
	rs4986879	0.046	0.506	0.028	1.0	0.04	0.57	
	rs17861094	0.126	0.2914	0.153	0.3973	0.135	0.1215	rs17861094
	rs8031941	0.077	0.0708	0.051	1.0	0.068	0.1198	rs8031941
	rs4646421	0.235	0.8042	0.222	1.0	0.231	1.0	rs4646421
	rs2856844	0.239	0.0301	0.042	1.0	0.173	0.1733	
CYP1A2	rs2069526	0.083	0.709	0.096	0.9376	0.087	1.0	rs2069526
	rs762551	0.313	0.083	0.37	0.0053	0.331	0.0014	
	rs28399419	0.033	0.2817	0.057	0.0214	0.04	0.0057	
	rs2472306	0.153	1.0	0.257	0.0369	0.187	0.1473	
	rs12904742	0.05	1.0	0.13	0.5593	0.074	0.5536	rs12904742
	rs2470890	0.212	0.0016	0.201	0.6012	0.209	0.0022	
CYP2D6	rs1080985	0.271	0.0023	0.3	0.7019	0.281	0.0418	
	rs28360521	0.167	0.7559	0.158	0.4745	0.164	1.0	rs28360521

MAF: minor allele frequency; HWE: *Hardy-Weinberg* equilibrium. In red are the values that are not in *Hardy-Weinberg* equilibrium and MAF minor than five per cent each population.

**Table 3:** Genotypic and allele frequencies for SNPs with MAF >0.05 and in *Hardy-Weinberg* equilibrium ( $p > 0.05$ ).

GENE	SNP	GENOTYPIC FREQUENCY				ALLELIC FREQUENCY				
		AED-RESPONDERS		AED-PHARMACORESISTANTS		AED-RESPONDERS		AED-PHARMACORESISTANTS		
		n = 78	%	n = 164	%					
CYP1B1	rs162549	AA	41	52,56	76	46,34	A	T	A	T
		AT	24	30,77	54	32,93	106	32	206	74
		TT	4	5,13	10	6,10	67,95	20,51	62,80	22,56
CYP1B1	rs9341263	AA	38	48,72	97	59,15	A	G	A	G
		AG	32	41,03	45	27,44	108	36	239	53
		GG	2	2,56	4	2,44	69,23	23,08	72,87	16,16
CYP1B1	rs162562	AA	37	47,44	89	54,27	A	C	A	C
		AC	30	38,46	53	32,32	104	38	231	61
		CC	4	5,13	4	2,44	66,67	24,36	70,43	18,60
CYP1B1	rs162561	AA	3	3,85	4	2,44	A	C	A	C
		AC	20	25,64	35	21,34	26	102	43	225
		CC	41	52,56	95	57,93	16,67	65,38	13,11	68,60
CYP1B1	rs2551188	CC	38	48,72	51	31,10	C	T	C	T
		CT	31	39,74	61	37,20	107	39	163	111
		TT	4	5,13	25	15,24	68,59	25,00	49,70	33,84
CYP1B1	rs9341244	CC	66	84,62	118	71,95	C	T	C	T
		CT	7	8,97	23	14,02	139	7	259	23
		TT	0	0,00	0	0,00	89,10	4,49	78,96	7,01
ABCB1	rs1128503	TT	9	11,54	17	10,37	T	C	T	C
		TC	35	44,87	80	48,78	53	103	114	208
		CC	34	43,59	64	39,02	33,97	66,03	34,76	63,41
ABCB1	rs1045642	TT	9	11,54	21	12,80	T	C	T	C
		CT	37	47,44	81	49,39	55	99	123	201
		CC	31	39,74	60	36,59	35,26	63,46	37,50	61,28
ABCB1	rs2235048	TT	28	35,90	64	39,02	T	C	T	C
		TC	40	51,28	79	48,17	96	54	207	121
		CC	7	8,97	21	12,80	61,54	34,62	63,11	36,89
ABCB1	rs2229109	GG	68	87,17949	150	91,46	C	T	C	T
		GA	9	11,53846	13	7,93	145	9	313	15
		AA	0	0	1	0,61	92,95	5,77	95,43	4,57
CYP3A4	rs2404955	AA	4	5,13	10	6,10	A	G	A	G
		AG	25	32,05	41	25,00	33	109	61	233
		GG	42	53,85	96	58,54	21,15	69,87	18,60	71,04
CYP3A4	rs6956344	CC	51	65,38	116	70,73	C	T	C	T
		CT	22	28,21	33	20,12	124	26	265	35
		TT	2	2,56	1	0,61	79,49	16,67	80,79	10,67
CYP3A4	rs4646437	CC	38	48,72	82	50,00	C	T	C	T
		CT	27	34,62	47	28,66	103	39	211	67
		TT	6	7,69	10	6,10	66,03	25,00	64,33	20,43
CYP3A4	rs28988579	GG	0	0,00	1	0,61	G	T	G	T
		GT	8	10,26	15	9,15	8	136	17	271
		TT	64	82,05	128	78,05	5,13	87,18	5,18	82,62
CYP3A4	rs12114000	AA	1	1,28	0,00	0,00	A	G	A	G
		AG	6	7,69	11,00	6,71	8	140	11	301

		GG	67	85,90	145,00	88,41	5,13	89,74	3,35	91,77
CYP3A5	rs776746	AA	2	2,56	6	3,66	A	G	A	G
		AG	27	34,62	42	25,61	31	111	54	230
		GG	42	53,85	94	57,32	19,87	71,15	16,46	70,12
CYP3A5	rs28365067	CC	58	74,36	133	81,10	C	T	C	T
		CT	11	14,10	17	10,37	127	17	283	17
		TT	3	3,85	0	0,00	81,41	10,90	86,28	5,18
CYP3A5	rs28371764	CC	65	83,33	123	75,00	C	T	C	T
		CT	9	11,54	26	15,85	139	9	272	28
		TT	0	0,00	1	0,61	89,10	5,77	82,93	8,54
CYP2C19	rs12768009	AA	1	1,28	3	1,83	A	G	A	G
		AG	16	20,51	37	22,56	18	128	43	263
		GG	56	71,79	113	68,90	11,54	82,05	13,11	80,18
CYP2C19	rs4986893	AA	1	1,28	2	1,22	A	G	A	G
		AG	12	15,38	23	14,02	14	132	27	279
		GG	60	76,92	128	78,05	8,97	84,62	8,23	85,06
CYP2C19	rs2104161	GG	27	34,62	81	49,39	G	T	G	T
		GT	33	42,31	52	31,71	87	53	214	82
		TT	10	12,82	15	9,15	55,77	33,97	65,24	25,00
CYP2C19	rs12253253	AA	45	57,69	113	68,90	A	C	A	C
		AC	23	29,49	36	21,95	113	37	262	48
		CC	7	8,97	6	3,66	72,44	23,72	79,88	14,63
CYP2C9	rs2253635	AA	27	34,62	59	35,98	A	G	A	G
		AG	33	42,31	75	45,73	87	57	193	111
		GG	12	15,38	18	10,98	55,77	36,54	58,84	33,84
CYP2C9	rs7089580	AA	38	48,72	101	61,59	A	T	A	T
		AT	27	34,62	31	18,90	103	39	233	45
		TT	6	7,69	7	4,27	66,03	25,00	71,04	13,72
CYP2C9	rs4086116	CC	66	84,62	110	67,07	C	T	C	T
		CT	6	7,69	38	23,17	138	10	258	48
		TT	2	2,56	5	3,05	88,46	6,41	78,66	14,63
CYP2C9	rs4918766	AA	7	8,97	35	21,34	A	G	A	G
		AG	36	46,15	66	40,24	50	90	136	166
		GG	27	34,62	50	30,49	32,05	57,69	41,46	50,61
CYP2C9	rs2153628	AA	39	50,00	113	68,90	A	G	A	G
		AG	28	35,90	34	20,73	106	42	260	42
		GG	7	8,97	4	2,44	67,95	26,92	79,27	12,80
CYP2C9	rs9332172	AA	53	67,95	92	56,10	A	G	A	G
		AG	15	19,23	52	31,71	121	21	236	66
		GG	3	3,85	7	4,27	77,56	13,46	71,95	20,12
CYP2C9	rs1934963	CC	0	0,00	16	9,76	C	T	C	T
		CT	17	21,79	50	30,49	17	131	82	218
		TT	57	73,08	84	51,22	10,90	83,97	25,00	66,46
CYP2C9	rs1057910	AA	65	83,33	127	77,44	A	C	A	C
		AC	7	8,97	18	10,98	137	7	272	22
		CC	0	0,00	2	1,22	87,82	4,49	82,93	6,71
ABCC2	rs717620	CC	47	60,26	94	57,32	C	T	C	T
		CT	24	30,77	41	25,00	118	30	229	47
		TT	3	3,85	3	1,83	75,64	19,23	69,82	14,33
ABCC2	rs2756104	CC	18	23,08	57	34,76	C	T	C	T
		CT	35	44,87	82	50,00	71	77	196	124
		TT	21	26,92	21	12,80	45,51	49,36	59,76	37,80
ABCC2	rs2273697	AA	1	1,28	6	3,66	A	G	A	G

		AG	21	26,92	47	28,66	23	127	59	257
		GG	53	67,95	105	64,02	14,74	81,41	17,99	78,35
ABCC2	rs2002042	CC	42	53,85	87	53,05	C	T	C	T
		CT	31	39,74	62	37,80	115	35	236	80
		TT	2	2,56	9	5,49	73,72	22,44	71,95	24,39
ABCC2	rs4148396	CC	26	33,33	74	45,12	C	T	C	T
		CT	27	34,62	59	35,98	79	59	207	87
		TT	16	20,51	14	8,54	50,64	37,82	63,11	26,52
ABCC2	rs3758395	GG	1	1,282051	1	0,609756	G	A	G	A
		AG	6	7,692308	12	7,317073	8	134	14	300
		AA	64	82,05128	144	87,80488	5,13	85,90	4,27	91,46
ABCC2	rs3740067	CC	23	29,49	67	40,85	C	G	C	G
		CG	35	44,87	75	45,73	81	69	209	107
		GG	17	21,79	16	9,76	51,92	44,23	63,72	32,62
ABCC2	rs17216317	CC	57	73,08	68,00	46,34	C	T	C	T
		CT	15	19,23	79,00	32,93	129	17	215	103
		TT	1	1,28	12,00	6,10	82,69	10,90	65,55	31,40
ABCC2	rs3740066	CC	23	29,49	68,00	41,46	C	T	C	T
		CT	37	47,44	79,00	48,17	83,00	67	215	103
		TT	15	19,23	12	7,32	53,21	42,95	65,55	31,40
ABCC2	rs3740065	TT	58	74,36	111	67,68	T	C	T	C
		CT	16	20,51	43	26,22	132	18	265	47
		CC	1	1,28	2	1,22	84,62	11,54	80,79	14,33
ABCC2	rs1137968	GG	64	82,05	129	78,66	G	T	G	T
		GT	10	12,82	24	14,63	138	10	282	28
		TT	0	0,00	2	1,22	88,46	6,41	85,98	8,54
ABCC2	rs8187710	AA	0	0,00	3	1,83	A	G	A	G
		AG	12	15,38	28	17,07	12	132	34	278
		GG	60	76,92	125	76,22	7,69	84,62	10,37	84,76
CYP2E1	rs915906	CC	3	3,85	7	4,27	C	T	C	T
		CT	28	35,90	62	37,80	34	110	76	232
		TT	41	52,56	85	51,83	21,79	70,51	23,17	70,73
CYP2E1	rs8192772	CC	1	1,28	2	1,22	C	T	C	T
		CT	14	17,95	21	12,80	16	130	25	271
		TT	58	74,36	125	76,22	10,26	83,33	7,62	82,62
CYP2E1	rs6413419	AA	1	1,28	2	1,22	A	G	A	G
		AG	11	14,10	14	8,54	13	131	18	280
		GG	60	76,92	133	81,10	8,33	83,97	5,49	85,37
CYP2E1	rs915907	AA	1	1,28	9	5,49	A	C	A	C
		AC	27	34,62	45	27,44	29	117	63	231
		CC	45	57,69	93	56,71	18,59	75,00	19,21	70,43
CYP2E1	rs8192775	AA	0	0,00	5	3,05	A	G	A	G
		AG	20	25,64	26	15,85	20	124	36	254
		GG	52	66,67	114	69,51	12,82	79,49	10,98	77,44
CYP2E1	rs7092584	CC	53	67,95	105	64,02	C	T	C	T
		CT	19	24,36	34	20,73	125	21	244	50
		TT	1	1,28	8	4,88	80,13	13,46	74,39	15,24
CYP2E1	rs743535	CC	53	67,95	121	73,78	C	T	C	T
		CT	15	19,23	22	13,41	121	15	264	28
		TT	0	0,00	3	1,83	77,56	9,62	80,49	8,54
CYP2E1	rs2070677	AA	44	56,41	77	46,95	A	T	A	T
		AT	26	33,33	53	32,32	114	28	207	83
		TT	1	1,28	15	9,15	73,08	17,95	63,11	25,30



CYP2E1	rs2515641	CC	43	55,13	99	60,37	C	T	C	T
		CT	27	34,62	41	25,00	113	29	239	63
		TT	1	1,28	11	6,71	72,44	18,59	72,87	19,21
CYP2E1	rs2515644	AA	5	6,41	11	6,71	A	C	A	C
		AC	34	43,59	71	43,29	44	104	93	215
		CC	35	44,87	72	43,90	28,21	66,67	28,35	65,55
CYP1A1	rs4986882	AA	63	80,77	135	82,32	A	G	A	G
		AG	11	14,10	22	13,41	137	11	292	22
		GG	0	0,00	0	0,00	87,82	7,05	89,02	6,71
CYP1A1	rs1799814	AA	3	3,85	3	1,83	A	C	A	C
		AC	17	21,79	30	18,29	23	117	36	256
		CC	50	64,10	113	68,90	14,74	75,00	10,98	78,05
CYP1A1	rs17861094	AA	53	67,95	108	65,85	A	G	A	G
		AG	16	20,51	27	16,46	122	22	243	35
		GG	3	3,85	4	2,44	78,21	14,10	74,09	10,67
CYP1A1	rs4646421	CC	44	56,41	88	53,66	C	T	C	T
		CT	26	33,33	51	31,10	114	32	227	69
		TT	3	3,85	9	5,49	73,08	20,51	69,21	21,04
CYP1A1	rs8031941	GG	0	0,00	3	1,83	G	T	G	T
		GT	7	8,97	16	9,76	7	131	22	264
		TT	62	79,49	124	75,61	4,49	83,97	6,71	80,49
CYP1A2	rs2069526	GG	1	1,28	0	0,00	G	T	G	T
		GT	11	14,10	24	14,63	13	133	24	278
		TT	61	78,21	127	77,44	8,33	85,26	7,32	84,76
CYP1A2	rs12904742	AA	0	0,00	0	0,00	A	G	A	G
		AG	18	23,08	15	9,15	18	120	15	291
		GG	51	65,38	138	84,15	11,54	76,92	4,57	88,72
CYP2D6	rs28360521	CC	53	67,95	108	65,85	G	T	G	T
		CT	17	21,79	44	26,83	123	25	260	50
		TT	4	5,13	3	1,83	78,85	16,03	79,27	15,24

The painted cells represent the associated genotypes and alleles in both groups, showing the frequency difference of genotypes and alleles between both groups.

**Table 4:** Results of regression logistic for SNP genotype between two groups: AED-responders and AED-pharmacoresistants.

Gene	SNP	genotype	$\beta$	se( $\beta$ )	Pvalue		Effect estimation		
					nominal	Corrected	OR	low 95% IC	High 95% IC
<i>CYP1B1</i>	rs162549	AA	-0,2052	0,2977	0,487601	1,00000	0,81	0,45	1,46
		AT	0,1571	0,3061	0,604875	1,00000	1,17	0,64	2,13
		TT	0,1580	0,6026	0,784733	1,00000	1,17	0,36	3,82
	rs9341263	AA	0,6379	0,2810	0,022511	0,13507	1,89	1,09	3,28
		AG	-0,6776	0,2841	0,016640	0,09984	0,51	0,29	0,89
		GG	0,0663	0,8273	0,931577	1,00000	1,07	0,21	5,41
	rs162562	AA	0,3488	0,2788	0,209363	1,00000	1,42	0,82	2,45
		AC	-0,2487	0,2826	0,377734	1,00000	0,78	0,45	1,36
		CC	-0,7550	0,7210	0,272675	1,00000	0,47	0,11	1,93
	rs162561	AA	0,0767	0,3767	0,836391	1,00000	1,08	0,52	2,26
		AC	-0,3658	0,3031	0,227417	1,00000	0,69	0,38	1,26
		CC	0,2456	0,2770	0,373330	1,00000	1,28	0,74	2,20
	rs2551188	CC	-0,4992	0,2772	0,069825	0,41895	0,61	0,35	1,05
		CT	-0,0396	0,2802	0,887173	1,00000	0,96	0,56	1,66
		TT	1,3379	0,5325	0,003831	0,02299	3,81	1,34	10,82
	rs9341244	CC	-0,7254	0,4172	0,065173	0,39104	0,48	0,21	1,10
CT		0,5208	0,4244	0,199470	1,00000	1,68	0,73	3,87	
TT		-	-	-	-	-	-	-	
<i>ABCB1</i>	rs2229109	CC	0,3498	0,4505	0,433741	1,00000	1,42	0,59	3,43
		TC	-0,4279	0,4567	0,345015	1,00000	0,65	0,27	1,60
		TT	0,3649	2,3135	0,818839	1,00000	1,44	0,02	134,20
	rs1128503	AA	-0,0197	0,4284	0,962719	1,00000	0,98	0,42	2,27
		AG	0,1790	0,2757	0,514053	1,00000	1,20	0,70	2,05
		GG	-0,1890	0,2786	0,496198	1,00000	0,83	0,48	1,43
	rs1045642	AA	0,1442	0,4196	0,725514	1,00000	1,16	0,51	2,63
		AG	0,0771	0,2750	0,778241	1,00000	1,08	0,63	1,85
		GG	-0,1623	0,2809	0,562213	1,00000	0,85	0,49	1,47
	rs2235048	AA	0,1286	0,2848	0,649392	1,00000	1,14	0,65	1,99
AG		-0,1741	0,2751	0,524798	1,00000	0,84	0,49	1,44	
GG		0,0918	0,4222	0,824722	1,00000	1,10	0,48	2,51	
<i>CYP3A4</i>	rs2404955	AA	-0,2764	0,4450	0,530861	1,00000	0,76	0,32	1,81
		AG	-0,0211	0,2946	0,942514	1,00000	0,98	0,55	1,74
		GG	0,1132	0,2778	0,682649	1,00000	1,12	0,65	1,93
	rs6956344	CC	0,2783	0,2937	0,342827	1,00000	1,32	0,74	2,35
		CT	-0,3031	0,3130	0,332730	1,00000	0,74	0,40	1,36
		TT	-0,0963	0,5619	0,860417	1,00000	0,91	0,30	2,73
rs4646437	CC	0,0914	0,2760	0,739473	1,00000	1,10	0,64	1,88	

		CT	-0,1069	0,2904	0,711709	1,00000	0,90	0,51	1,59
		TT	-0,0197	0,4284	0,962719	1,00000	0,98	0,42	2,27
		GG	-0,4107	0,9177	0,629447	1,00000	0,66	0,11	4,01
	rs28988579	GT	0,2697	0,4345	0,522562	1,00000	1,31	0,56	3,07
		TT	-0,1761	0,4002	0,653231	1,00000	0,84	0,38	1,84
		AA	-0,7465	1,4210	0,525416	1,00000	0,47	0,03	7,68
	rs12114000	AG	-0,1631	0,4883	0,734388	1,00000	0,85	0,33	2,21
		GG	0,2243	0,4648	0,625368	1,00000	1,25	0,50	3,11
		AA	0,2270	0,8016	0,760817	1,00000	1,25	0,26	6,04
	rs776746	AG	-0,3081	0,2944	0,294966	0,88490	0,73	0,41	1,31
		GG	0,2446	0,2879	0,394726	1,00000	1,28	0,73	2,25
		CC	0,3955	0,3268	0,226355	0,67907	1,49	0,78	2,82
CYP3A5	rs28365067	CT	-0,1831	0,4024	0,646725	1,00000	0,83	0,38	1,83
		TT	-0,6013	0,4720	0,198444	0,59533	0,55	0,22	1,38
		CC	-0,5485	0,3604	0,114383	0,34315	0,58	0,29	1,17
	rs28371764	CT	0,4655	0,4058	0,233283	0,69985	1,59	0,72	3,53
		TT	0,4800	0,6474	0,427146	1,00000	1,62	0,45	5,75
		AA	-0,2770	0,5339	0,597291	1,00000	0,76	0,27	2,16
	rs12768009	AG	0,2088	0,3331	0,524439	1,00000	1,23	0,64	2,37
		GG	-0,1021	0,3029	0,733818	1,00000	0,90	0,50	1,63
		AA	-0,5012	0,5578	0,359890	1,00000	0,61	0,20	1,81
	rs4986893	AG	0,0177	0,3784	0,962140	1,00000	1,02	0,48	2,14
		GG	0,1455	0,3301	0,658047	1,00000	1,16	0,61	2,21
CYP2C19		GG	0,4519	0,2772	0,100137	0,40055	1,57	0,91	2,71
	rs2104161	GT	-0,3463	0,2819	0,218297	0,87319	0,71	0,41	1,23
		TT	-0,2814	0,3935	0,472566	1,00000	0,75	0,35	1,63
		AA	0,5018	0,2910	0,084434	0,33774	1,65	0,93	2,92
	rs12253253	AC	-0,2966	0,3084	0,335785	1,00000	0,74	0,41	1,36
		CC	-0,9392	0,5742	0,091878	0,36751	0,39	0,13	1,20
		AA	0,0155	0,2791	0,955507	1,00000	1,02	0,59	1,76
	rs2253635	AG	0,2091	0,2771	0,447606	1,00000	1,23	0,72	2,12
		GG	-0,4899	0,3930	0,211547	1,00000	0,61	0,28	1,32
		AA	0,5357	0,2836	0,058393	0,46714	1,71	0,98	2,98
	rs7089580	AT	-0,3998	0,2967	0,177740	1,00000	0,67	0,37	1,20
		TT	-0,6582	0,5368	0,212132	1,00000	0,52	0,18	1,48
		CC	-1,2098	0,4050	0,000990	0,00792	0,30	0,13	0,66
CYP2C9	rs4086116	CT	1,3532	0,4507	0,000673	0,00538	3,87	1,60	9,36
		TT	0,0537	0,8273	0,944608	1,00000	1,06	0,21	5,34
		AA	0,4446	0,3349	0,172934	1,00000	1,56	0,81	3,01
	rs4918766	AG	-0,1656	0,2765	0,547732	1,00000	0,85	0,49	1,46
		GG	-0,1912	0,2919	0,511547	1,00000	0,83	0,47	1,46
		AA	0,8473	0,2833	0,002589	0,02071	2,33	1,34	4,07
	rs2153628	AG	-0,6479	0,2923	0,026489	0,21191	0,52	0,30	0,93
		GG	-0,9290	0,5370	0,076208	0,60967	0,39	0,14	1,13
	rs9332172	AA	-0,3647	0,2953	0,210092	1,00000	0,69	0,39	1,24

	AG	0,4360	0,3104	0,151441	1,00000	1,55	0,84	2,84
	GG	-0,2378	0,6385	0,700687	1,00000	0,79	0,23	2,76
	CC	1,0602	0,5414	0,028628	0,22902	2,89	1,00	8,34
rs1934963	CT	0,6043	0,3186	0,050559	0,40448	1,83	0,98	3,42
	TT	-0,9352	0,2982	0,001171	0,00937	0,39	0,22	0,70
	AA	-0,3806	0,4091	0,336011	1,00000	0,68	0,31	1,52
rs1057910	AC	0,3202	0,4321	0,443968	1,00000	1,38	0,59	3,21
	CC	0,3706	1,0421	0,689249	1,00000	1,45	0,19	11,17
	CC	0,0815	0,2852	0,774198	1,00000	1,08	0,62	1,90
rs717620	CT	-0,0785	0,2926	0,787772	1,00000	0,92	0,52	1,64
	TT	-0,1226	0,7128	0,857263	1,00000	0,88	0,22	3,58
	CC	0,3480	0,2989	0,237272	1,00000	1,42	0,79	2,54
rs2756104	CT	0,2275	0,2757	0,406776	1,00000	1,26	0,73	2,16
	TT	-0,8621	0,3429	0,011739	0,14087	0,42	0,22	0,83
	AA	-0,1063	0,6230	0,860054	1,00000	0,90	0,27	3,05
rs2273697	AG	0,1651	0,3058	0,585270	1,00000	1,18	0,65	2,15
	GG	-0,1419	0,2920	0,624182	1,00000	0,87	0,49	1,54
	CC	-0,1361	0,2773	0,621754	1,00000	0,87	0,51	1,50
rs2002042	CT	-0,0583	0,2813	0,835236	1,00000	0,94	0,54	1,64
	TT	0,9196	0,7308	0,156008	1,00000	2,51	0,60	10,50
	CC	0,2819	0,2770	0,305419	1,00000	1,33	0,77	2,28
rs4148396	CT	0,1247	0,2829	0,657186	1,00000	1,13	0,65	1,97
	TT	-0,7998	0,3797	0,034521	0,41425	0,45	0,21	0,95
	CC	-1,1624	0,6586	0,062558	0,75069	0,31	0,09	1,14
rs3758395	TC	-0,2243	0,4648	0,625368	1,00000	0,80	0,32	1,99
	TT	0,5767	0,3864	0,134848	1,00000	1,78	0,83	3,80
	CC	0,3659	0,2870	0,196899	1,00000	1,44	0,82	2,53
rs3740067	CG	0,0575	0,2760	0,834170	1,00000	1,06	0,62	1,82
	GG	-0,7529	0,3670	0,039813	0,47776	0,47	0,23	0,97
	CC	0,9043	0,3523	0,009985	0,11982	2,47	1,24	4,93
rs17216317	CT	-0,9468	0,3712	0,010268	0,12321	0,39	0,19	0,80
	TT	-0,4107	0,9177	0,629447	1,00000	0,66	0,11	4,01
	CC	0,4974	0,2886	0,079811	0,95773	1,64	0,93	2,89
rs3740066	CT	0,0529	0,2750	0,846946	1,00000	1,05	0,61	1,81
	TT	-1,1696	0,4102	0,003669	0,04402	0,31	0,14	0,69
	AA	-0,3085	0,3179	0,323379	1,00000	0,73	0,39	1,37
rs3740065	AG	0,3662	0,3293	0,255795	1,00000	1,44	0,76	2,75
	GG	-0,4107	0,9177	0,629447	1,00000	0,66	0,11	4,01
	GG	-0,2452	0,3823	0,511823	1,00000	0,78	0,37	1,66
rs1137968	GT	0,1603	0,3857	0,671853	1,00000	1,17	0,55	2,50
	TT	0,8819	1,9024	0,535113	1,00000	2,42	0,06	100,53
	AA	0,1584	0,6780	0,805779	1,00000	1,17	0,31	4,43
rs8187710	AG	-0,0339	0,3489	0,921941	1,00000	0,97	0,49	1,92
	GG	-0,0289	0,3246	0,928563	1,00000	0,97	0,51	1,84

	CC	0,0268	0,6933	0,967618	1,00000	1,03	0,26	4,00	
rs915906	CT	-0,0583	0,2813	0,835236	1,00000	0,94	0,54	1,64	
	TT	0,0385	0,2773	0,889249	1,00000	1,04	0,60	1,79	
	CC	-0,2296	1,2006	0,827350	1,00000	0,79	0,08	8,36	
rs8192772	CT	-0,3219	0,3522	0,359967	1,00000	0,72	0,36	1,45	
	TT	0,3096	0,3435	0,366843	1,00000	1,36	0,70	2,67	
	AA	-0,2296	1,2006	0,827350	1,00000	0,79	0,08	8,36	
rs6413419	AG	-0,3735	0,3858	0,331755	1,00000	0,69	0,32	1,47	
	GG	0,3533	0,3731	0,342620	1,00000	1,42	0,69	2,96	
	AA	1,1495	0,9320	0,143825	1,00000	3,16	0,51	19,61	
rs915907	AC	-0,3010	0,2890	0,296884	1,00000	0,74	0,42	1,30	
	CC	0,1089	0,2836	0,700076	1,00000	1,12	0,64	1,94	
	AA	0,9003	0,9588	0,277329	1,00000	2,46	0,38	16,11	
rs8192775	AG	-0,4467	0,3179	0,160290	1,00000	0,64	0,34	1,19	
	GG	0,2636	0,3074	0,390642	1,00000	1,30	0,71	2,38	
CYP2E1	CC	-0,1419	0,2920	0,624182	1,00000	0,87	0,49	1,54	
rs7092584	CT	-0,2353	0,3110	0,448631	1,00000	0,79	0,43	1,45	
	TT	1,0616	0,6103	0,049644	0,49644	2,89	0,87	9,56	
	CC	0,0744	0,3162	0,813069	1,00000	1,08	0,58	2,00	
rs743535	CT	-0,4689	0,3431	0,171992	1,00000	0,63	0,32	1,23	
	TT	1,0812	0,7198	0,084984	0,84984	2,95	0,72	12,08	
	AA	-0,3825	0,2778	0,164977	1,00000	0,68	0,40	1,18	
rs2070677	AT	-0,1081	0,2856	0,704090	1,00000	0,90	0,51	1,57	
	TT	1,4176	0,5960	0,005148	0,05148	4,13	1,28	13,27	
	CC	0,0536	0,2870	0,851172	1,00000	1,06	0,60	1,85	
rs2515641	CT	-0,3688	0,2959	0,212459	1,00000	0,69	0,39	1,24	
	TT	1,5269	0,9018	0,035589	0,35589	4,60	0,79	26,96	
	AA	-0,1631	0,4883	0,734388	1,00000	0,85	0,33	2,21	
rs2515644	AC	-0,0424	0,2757	0,877425	1,00000	0,96	0,56	1,65	
	CC	0,0819	0,2759	0,765615	1,00000	1,09	0,63	1,86	
	AA	0,0301	0,3686	0,934339	1,00000	1,03	0,50	2,12	
rs4986882	AG	-0,0279	0,3805	0,940897	1,00000	0,97	0,46	2,05	
	GG	-	-	-	-	-	-	-	
	AA	-0,3498	0,4505	0,433741	1,00000	0,70	0,29	1,70	
rs1799814	AC	-0,1093	0,3289	0,738515	1,00000	0,90	0,47	1,71	
	CC	0,4150	0,3039	0,172175	0,86088	1,51	0,83	2,75	
	AA	0,0211	0,2946	0,942514	1,00000	1,02	0,57	1,82	
CYP1A1	rs17861094	AG	-0,1485	0,3371	0,658238	1,00000	0,86	0,45	1,67
	GG	0,3690	0,4299	0,373949	1,00000	1,45	0,62	3,36	
	CC	-0,0355	0,2768	0,897573	1,00000	0,97	0,56	1,66	
rs4646421	CT	-0,1069	0,2904	0,711709	1,00000	0,90	0,51	1,59	
	TT	0,3565	0,4553	0,416373	1,00000	1,43	0,59	3,49	
	GG	0,4800	0,6474	0,427146	1,00000	1,62	0,45	5,75	
rs8031941	GT	0,0463	0,4466	0,915833	1,00000	1,05	0,44	2,51	

		TT	-0,2034	0,3840	0,588704	1,00000	0,82	0,38	1,73
		GG	-0,2296	1,2006	0,827350	1,00000	0,79	0,08	8,36
	rs2069526	GT	-0,0279	0,3805	0,940897	1,00000	0,97	0,46	2,05
CYP1A2		TT	0,0744	0,3705	0,839626	1,00000	1,08	0,52	2,23
		AA	-	-	-	-	-	-	-
	rs12904742	AG	-1,0816	0,3814	0,004119	0,00824	0,34	0,16	0,72
		GG	0,9701	0,3214	0,002450	0,00490	2,64	1,40	4,95
		CC	-0,0885	0,2927	0,760803	0,76080	0,92	0,52	1,62
CYP2D6	rs28360521	CT	0,2607	0,3250	0,414814	0,41481	1,30	0,69	2,45
		TT	-0,3859	0,4779	0,414552	0,41455	0,68	0,27	1,73

$\beta$ : regression coefficient;  $se(\beta)$ : standard error of regression coefficient ;OR:odds ratio. . The painted cells represent the significative results ( $p_{corrected} < 0.05$ ).

**Table 5:** Results of regression logistic for SNP allele between two groups: AED-responders and AED-pharmacoresistants.

Gene	SNP	allele	$\beta$	se( $\beta$ )	Pvalue		Effect estimation		
					nominal	Corrected	OR	low 95% IC	High 95% IC
CYP1B1	rs162549	A	-0,1580	0,6026	0,78473	1,00000	0,85	0,26	2,78
		T	0,2052	0,2977	0,48760	1,00000	1,23	0,69	2,20
	rs9341263	A	-0,0663	0,8273	0,93158	1,00000	0,94	0,18	4,74
		G	-0,6379	0,2810	0,02251	0,13507	0,53	0,30	0,92
	rs162562	A	0,7550	0,7210	0,27268	1,00000	2,13	0,52	8,74
		C	-0,3488	0,2788	0,20936	1,00000	0,71	0,41	1,22
	rs162561	A	-0,2456	0,2770	0,37333	1,00000	0,78	0,45	1,35
		C	-0,0767	0,3767	0,83639	1,00000	0,93	0,44	1,94
	rs2551188	C	-1,3379	0,5325	0,00383	0,02299	0,26	0,09	0,75
		T	0,4992	0,2772	0,06983	0,41895	1,65	0,96	2,84
rs9341244	C	-1,7016	1,6240	0,15068	0,90406	0,18	0,01	4,40	
	T	0,7254	0,4172	0,06517	0,39104	2,07	0,91	4,68	
ABCB1	rs2229109	C	-0,3649	2,3135	0,81884	1,00000	0,69	0,01	64,69
		T	-0,3498	0,4505	0,43374	1,00000	0,70	0,29	1,70
	rs1128503	A	0,1890	0,2786	0,49620	1,00000	1,21	0,70	2,09
		G	0,0197	0,4284	0,96272	1,00000	1,02	0,44	2,36
	rs1045642	A	0,1623	0,2809	0,56221	1,00000	1,18	0,68	2,04
		G	-0,1442	0,4196	0,72551	1,00000	0,87	0,38	1,97
rs2235048	A	-0,0918	0,4222	0,82472	1,00000	0,91	0,40	2,09	
	G	-0,1286	0,2848	0,64939	1,00000	0,88	0,50	1,54	
CYP3A4	rs2404955	A	-0,1132	0,2778	0,68265	1,00000	0,89	0,52	1,54
		G	0,2764	0,4450	0,53086	1,00000	1,32	0,55	3,15
	rs6956344	C	0,0963	0,5619	0,86042	1,00000	1,10	0,37	3,31
		T	-0,2783	0,2937	0,34283	1,00000	0,76	0,43	1,35
	rs4646437	C	0,0197	0,4284	0,96272	1,00000	1,02	0,44	2,36
		T	-0,0914	0,2760	0,73947	1,00000	0,91	0,53	1,57
	rs28988579	G	0,1761	0,4002	0,65323	1,00000	1,19	0,54	2,61
		T	0,4107	0,9177	0,62945	1,00000	1,51	0,25	9,11
rs12114000	A	-0,2243	0,4648	0,62537	1,00000	0,80	0,32	1,99	
	G	0,7465	1,4210	0,52542	1,00000	2,11	0,13	34,18	
CYP3A5	rs776746	A	-0,2446	0,2879	0,39473	1,00000	0,78	0,45	1,38
		G	-0,2270	0,8016	0,76082	1,00000	0,80	0,17	3,83
	rs28365067	C	0,6013	0,4720	0,19844	0,59533	1,82	0,72	4,60
		T	-0,3955	0,3268	0,22636	0,67907	0,67	0,35	1,28
rs28371764	C	-0,4800	0,6474	0,42715	1,00000	0,62	0,17	2,20	
	T	0,5485	0,3604	0,11438	0,34315	1,73	0,85	3,51	
CYP2C19	rs12768009	A	0,1021	0,3029	0,73382	1,00000	1,11	0,61	2,01
		G	0,2770	0,5339	0,59729	1,00000	1,32	0,46	3,76
	rs4986893	A	-0,1455	0,3301	0,65805	1,00000	0,86	0,45	1,65
		G	0,5012	0,5578	0,35989	1,00000	1,65	0,55	4,93
	rs2104161	G	0,2814	0,3935	0,47257	1,00000	1,32	0,61	2,87
		T	-0,4519	0,2772	0,10014	0,40055	0,64	0,37	1,10
rs12253253	A	0,9392	0,5742	0,09188	0,36751	2,56	0,83	7,88	
	C	-0,5018	0,2910	0,08443	0,33774	0,61	0,34	1,07	
CYP2C9	rs2253635	A	0,4899	0,3930	0,21155	1,00000	1,63	0,76	3,53
		G	-0,0155	0,2791	0,95551	1,00000	0,98	0,57	1,70
rs7089580	A	0,6582	0,5368	0,21213	1,00000	1,93	0,67	5,53	

	T	-0,5357	0,2836	0,05839	0,46714	0,59	0,34	1,02
	C	-0,0537	0,8273	0,94461	1,00000	0,95	0,19	4,80
rs4086116	T	1,2098	0,4050	0,00099	0,00792	3,35	1,52	7,42
rs4918766	A	0,1912	0,2919	0,51155	1,00000	1,21	0,68	2,15
	G	-0,4446	0,3349	0,17293	1,00000	0,64	0,33	1,24
rs2153628	A	0,9290	0,5370	0,07621	0,60967	2,53	0,88	7,25
	G	-0,8473	0,2833	0,00259	0,02071	0,43	0,25	0,75
rs9332172	A	0,2378	0,6385	0,70069	1,00000	1,27	0,36	4,43
	G	0,3647	0,2953	0,21009	1,00000	1,44	0,81	2,57
rs1934963	C	0,9352	0,2982	0,00117	0,00937	2,55	1,42	4,57
	T	-1,0602	0,5414	0,02863	0,22902	0,35	0,12	1,00
rs1057910	A	-0,3706	1,0421	0,68925	1,00000	0,69	0,09	5,32
	C	0,3806	0,4091	0,33601	1,00000	1,46	0,66	3,26
rs717620	C	0,1226	0,7128	0,85726	1,00000	1,13	0,28	4,57
	T	-0,0815	0,2852	0,77420	1,00000	0,92	0,53	1,61
rs2756104	C	0,8621	0,3429	0,01174	0,14087	2,37	1,21	4,64
	T	-0,3480	0,2989	0,23727	1,00000	0,71	0,39	1,27
rs2273697	A	0,1419	0,2920	0,62418	1,00000	1,15	0,65	2,04
	G	0,1063	0,6230	0,86005	1,00000	1,11	0,33	3,77
rs2002042	C	-0,9196	0,7308	0,15601	1,00000	0,40	0,10	1,67
	T	0,1361	0,2773	0,62175	1,00000	1,15	0,67	1,97
rs4148396	C	0,7998	0,3797	0,03452	0,41425	2,23	1,06	4,68
	T	-0,2819	0,2770	0,30542	1,00000	0,75	0,44	1,30
rs3758395	C	-0,5767	0,3864	0,13485	1,00000	0,56	0,26	1,20
	T	1,1624	0,6586	0,06256	0,75069	3,20	0,88	11,63
rs3740067	C	0,7529	0,3670	0,03981	0,47776	2,12	1,03	4,36
	G	-0,3659	0,2870	0,19690	1,00000	0,69	0,40	1,22
rs17216317	C	0,4107	0,9177	0,62945	1,00000	1,51	0,25	9,11
	T	-0,9043	0,3523	0,00999	0,11982	0,40	0,20	0,81
rs3740066	C	1,1696	0,4102	0,00367	0,04402	3,22	1,44	7,20
	T	-0,4974	0,2886	0,07981	0,95773	0,61	0,35	1,07
rs3740065	A	0,4107	0,9177	0,62945	1,00000	1,51	0,25	9,11
	G	0,3085	0,3179	0,32338	1,00000	1,36	0,73	2,54
rs1137968	G	-0,8819	1,9024	0,53511	1,00000	0,41	0,01	17,23
	T	0,2452	0,3823	0,51182	1,00000	1,28	0,60	2,70
rs8187710	A	0,0289	0,3246	0,92856	1,00000	1,03	0,54	1,94
	G	-0,1584	0,6780	0,80578	1,00000	0,85	0,23	3,22
rs915906	C	-0,0385	0,2773	0,88925	1,00000	0,96	0,56	1,66
	T	-0,0268	0,6933	0,96762	1,00000	0,97	0,25	3,79
rs8192772	C	-0,3096	0,3435	0,36684	1,00000	0,73	0,37	1,44
	T	0,2296	1,2006	0,82735	1,00000	1,26	0,12	13,23
rs6413419	A	-0,3533	0,3731	0,34262	1,00000	0,70	0,34	1,46
	G	0,2296	1,2006	0,82735	1,00000	1,26	0,12	13,23
rs915907	A	-0,1089	0,2836	0,70008	1,00000	0,90	0,51	1,56
	C	-1,1495	0,9320	0,14382	1,00000	0,32	0,05	1,97
rs8192775	A	-0,2636	0,3074	0,39064	1,00000	0,77	0,42	1,40
	G	-0,9003	0,9588	0,27733	1,00000	0,41	0,06	2,66
rs7092584	C	-1,0616	0,6103	0,04964	0,49644	0,35	0,10	1,14
	T	0,1419	0,2920	0,62418	1,00000	1,15	0,65	2,04
rs743535	C	-1,0812	0,7198	0,08498	0,84984	0,34	0,08	1,39
	T	-0,0744	0,3162	0,81307	1,00000	0,93	0,50	1,73
rs2070677	A	-1,4176	0,5960	0,00515	0,05148	0,24	0,08	0,78
	T	0,3825	0,2778	0,16498	1,00000	1,47	0,85	2,53



	rs2515641	C	-1,5269	0,9018	0,03559	0,35589	0,22	0,04	1,27
		T	-0,0536	0,2870	0,85117	1,00000	0,95	0,54	1,66
	rs2515644	A	-0,0819	0,2759	0,76561	1,00000	0,92	0,54	1,58
		C	0,1631	0,4883	0,73439	1,00000	1,18	0,45	3,07
	rs4986882	A	0,2296	1,2006	0,82735	1,00000	1,26	0,12	13,23
		G	-0,0301	0,3686	0,93434	1,00000	0,97	0,47	2,00
	rs1799814	A	-0,2199	0,2925	0,45133	1,00000	0,80	0,45	1,42
		C	0,3498	0,4505	0,43374	1,00000	1,42	0,59	3,43
CYP1A1	rs17861094	A	-0,1627	0,4400	0,70480	1,00000	0,85	0,36	2,01
		G	-0,0211	0,2946	0,94251	1,00000	0,98	0,55	1,74
	rs4646421	C	-0,3019	0,4581	0,49526	1,00000	0,74	0,30	1,81
		T	0,0355	0,2768	0,89757	1,00000	1,04	0,60	1,78
	rs8031941	G	0,2452	0,3823	0,51182	1,00000	1,28	0,60	2,70
		T	-0,4800	0,6474	0,42715	1,00000	0,62	0,17	2,20
CYP1A2	rs2069526	G	-0,0301	0,3686	0,93434	1,00000	0,97	0,47	2,00
		T	0,2296	1,2006	0,82735	1,00000	1,26	0,12	13,23
	rs12904742	A	0,4758	0,4860	0,32240	0,64480	1,61	0,62	4,17
		G	1,0816	0,3814	0,00412	0,00824	2,95	1,40	6,23
CYP2D6	rs28360521	C	0,3859	0,4779	0,41455	0,41455	1,47	0,58	3,75
		T	0,0885	0,2927	0,76080	0,76080	1,09	0,62	1,94

$\beta$ : regression coefficient;  $se(\beta)$ : standard error of regression coefficient ;OR:odds ratio. . The painted cells represent the significative results ( $p_{corrected} < 0.05$ ).

**Table 6:** Results of logistic regression for SNP interaction.

SNP interaction	$\beta$	se( $\beta$ )	Pvalue		OR	Effect estimation	
			nominal	corrected		low 95% IC	High 95% IC
rs2551188CC : rs4086116CC	-0,9252	0,3142	0,00296	0,42377	0,40	0,21	0,73
rs2551188CC : rs4086116CT	0,5142	0,5811	0,34735	1,00000	1,67	0,54	5,22
rs2551188CC : rs4086116TT	-0,6368	1,4221	0,58736	1,00000	0,53	0,03	8,59
rs2551188CC : rs2153628AA	0,3624	0,3323	0,26642	1,00000	1,44	0,75	2,76
rs2551188CC : rs2153628AG	-1,3954	0,4637	0,00162	0,23167	0,25	0,10	0,61
rs2551188CC : rs2153628GG	-2,1705	0,9798	0,00601	0,85882	0,11	0,02	0,78
rs2551188CC : rs1934963CC	1,3491	1,7518	0,30004	1,00000	3,85	0,12	119,42
rs2551188CC : rs1934963CT	0,7261	0,5158	0,13158	1,00000	2,07	0,75	5,68
rs2551188CC : rs1934963TT	-1,1471	0,3164	0,00024	0,03384	0,32	0,17	0,59
rs2551188CC : rs3740066CC	-0,2269	0,4019	0,56943	1,00000	0,80	0,36	1,75
rs2551188CC : rs3740066CT	-0,2365	0,3520	0,49982	1,00000	0,79	0,40	1,57
rs2551188CC : rs3740066TT	-1,6235	0,6810	0,00838	1,00000	0,20	0,05	0,75
rs2551188CC : rs2070677AA	-0,6923	0,3248	0,03246	1,00000	0,50	0,26	0,95
rs2551188CC : rs2070677AT	-0,2358	0,4012	0,55384	1,00000	0,79	0,36	1,73
rs2551188CC : rs2070677TT	0,2088	1,1010	0,83034	1,00000	1,23	0,14	10,66
rs2551188CC : s12904742AA	-1,9327	0,6608	0,00095	0,13532	0,14	0,04	0,53
rs2551188CC : s12904742AG	-0,1386	0,3179	0,66136	1,00000	0,87	0,47	1,62
rs2551188CT : rs4086116CC	-0,4047	0,3120	0,19314	1,00000	0,67	0,36	1,23
rs2551188CT : rs4086116CT	3,1293	1,4804	0,00029	0,04082	22,86	1,26	416,07
rs2551188CT : rs4086116TT	0,2260	1,1014	0,81650	1,00000	1,25	0,14	10,86
rs2551188CT : rs2153628AA	0,2168	0,3193	0,49203	1,00000	1,24	0,66	2,32
rs2551188CT : rs2153628AG	-0,2676	0,4361	0,53529	1,00000	0,77	0,33	1,80
rs2551188CT : rs2153628GG	-0,1146	1,2015	0,91296	1,00000	0,89	0,08	9,40
rs2551188CT : rs1934963CC	1,8162	1,6247	0,12046	1,00000	6,15	0,25	148,49
rs2551188CT : rs1934963CT	0,2249	0,4082	0,57316	1,00000	1,25	0,56	2,79
rs2551188CT : rs1934963TT	-0,2353	0,3266	0,46977	1,00000	0,79	0,42	1,50
rs2551188CT : rs3740066CC	0,6411	0,4289	0,11638	1,00000	1,90	0,82	4,40
rs2551188CT : rs3740066CT	-0,0270	0,3516	0,93827	1,00000	0,97	0,49	1,94
rs2551188CT : rs3740066TT	-1,1413	0,7410	0,09786	1,00000	0,32	0,07	1,36
rs2551188CT : rs2070677AA	0,0451	0,3479	0,89589	1,00000	1,05	0,53	2,07
rs2551188CT : rs2070677AT	-0,0090	0,3775	0,98075	1,00000	0,99	0,47	2,08
rs2551188CT : rs2070677TT	1,5803	1,6731	0,19918	1,00000	4,86	0,18	128,99
rs2551188CT : s12904742AA	-0,5878	0,5786	0,29843	1,00000	0,56	0,18	1,73
rs2551188CT : s12904742AG	0,3986	0,3234	0,21087	1,00000	1,49	0,79	2,81
rs2551188TT : rs4086116CC	1,1393	0,6164	0,03665	1,00000	3,12	0,93	10,46
rs2551188TT : rs4086116CT	0,4852	1,0437	0,59853	1,00000	1,62	0,21	12,56
rs2551188TT : rs4086116TT	0,4763	2,3142	0,76336	1,00000	1,61	0,02	150,22
rs2551188TT : rs2153628AA	1,4240	0,7097	0,01722	1,00000	4,15	1,03	16,69
rs2551188TT : rs2153628AG	0,4969	0,7838	0,48968	1,00000	1,64	0,35	7,64
rs2551188TT : rs2153628GG	0,4796	2,3140	0,76165	1,00000	1,62	0,02	150,64
rs2551188TT : rs1934963CC	1,0052	1,9029	0,47503	1,00000	2,73	0,07	113,85
rs2551188TT : rs1934963CT	0,3538	0,8030	0,63334	1,00000	1,42	0,30	6,87
rs2551188TT : rs1934963TT	1,4323	0,7097	0,01651	1,00000	4,19	1,04	16,83

rs2551188TT : rs3740066CC	0,7375	0,7576	0,28133	1,00000	2,09	0,47	9,23
rs2551188TT : rs3740066CT	1,4701	0,9160	0,04923	1,00000	4,35	0,72	26,19
rs2551188TT : rs3740066TT	0,4763	1,0435	0,60541	1,00000	1,61	0,21	12,45
rs2551188TT : rs2070677AA	0,5841	0,6496	0,33258	1,00000	1,79	0,50	6,41
rs2551188TT : rs2070677AT	1,2533	0,9334	0,10852	1,00000	3,50	0,56	21,82
rs2551188TT : rs2070677TT	1,5803	1,6731	0,19918	1,00000	4,86	0,18	128,99
rs2551188TT : s12904742AA	0,1074	0,8302	0,88962	1,00000	1,11	0,22	5,67
rs2551188TT : s12904742AG	1,3671	0,7116	0,02354	1,00000	3,92	0,97	15,83
rs4086116CC : rs3740066CC	0,2422	0,3151	0,43625	1,00000	1,27	0,69	2,36
rs4086116CC : rs3740066CT	-0,3924	0,2944	0,18141	1,00000	0,68	0,38	1,20
rs4086116CC : rs3740066TT	-1,3219	0,4742	0,00383	0,54817	0,27	0,11	0,68
rs4086116CC : rs2070677AA	-0,6929	0,3018	0,02026	1,00000	0,50	0,28	0,90
rs4086116CC : rs2070677AT	-0,4061	0,3316	0,22007	1,00000	0,67	0,35	1,28
rs4086116CC : rs2070677TT	1,3938	0,9162	0,06432	1,00000	4,03	0,67	24,28
rs4086116CC : s12904742AA	-1,4436	0,4499	0,00088	0,12610	0,24	0,10	0,57
rs4086116CC : s12904742AG	-0,0532	0,3071	0,86153	1,00000	0,95	0,52	1,73
rs4086116CT : rs3740066CC	1,7110	0,8936	0,01500	1,00000	5,53	0,96	31,89
rs4086116CT : rs3740066CT	0,7060	0,5612	0,17476	1,00000	2,03	0,67	6,09
rs4086116CT : rs3740066TT	0,3950	1,0429	0,66975	1,00000	1,48	0,19	11,46
rs4086116CT : rs2070677AA	0,7814	0,5595	0,12986	1,00000	2,18	0,73	6,54
rs4086116CT : rs2070677AT	1,7245	0,8945	0,01432	1,00000	5,61	0,97	32,39
rs4086116CT : rs2070677TT	0,9126	1,9032	0,52022	1,00000	2,49	0,06	103,85
rs4086116CT : s12904742AA	-0,1570	0,7145	0,81853	1,00000	0,85	0,21	3,47
rs4086116CT : s12904742AG	1,6508	0,5909	0,00075	0,10689	5,21	1,64	16,59
rs4086116TT : rs3740066CC	-0,7241	1,4216	0,53791	1,00000	1,71	0,11	27,78
rs4086116TT : rs3740066CT	-0,7241	1,4216	0,53791	1,00000	0,48	0,03	7,86
rs4086116TT : rs3740066TT	0,3950	1,0429	0,66975	1,00000	1,48	0,19	11,46
rs4086116TT : rs2070677AA	1,2565	1,7521	0,33916	1,00000	3,51	0,11	108,92
rs4086116TT : rs2070677AT	-0,7269	1,0113	0,42745	1,00000	0,48	0,07	3,51
rs4086116TT : s12904742AG	0,0204	0,8287	0,97902	1,00000	1,02	0,20	5,18
rs2153628AA:rs3740066CC	0,9970	0,3811	0,00514	0,73544	2,71	1,28	5,72
rs2153628AA:rs3740066CT	0,6195	0,3201	0,04691	1,00000	1,86	0,99	3,48
rs2153628AA:rs3740066TT	-1,0393	0,5261	0,04211	1,00000	0,35	0,13	0,99
rs2153628AA:rs2070677AA	0,4349	0,3035	0,14584	1,00000	1,54	0,85	2,80
rs2153628AA:rs2070677AT	0,3677	0,3605	0,29589	1,00000	1,44	0,71	2,93
rs2153628AA:rs2070677TT	1,3909	0,9155	0,06455	1,00000	4,02	0,67	24,18
rs2153628AA:rs12904742AA	-0,9794	0,4657	0,03295	1,00000	0,38	0,15	0,94
<b>rs2153628AA:rs12904742GG</b>	<b>1,4618</b>	<b>0,4924</b>	<b>0,00033</b>	<b>0,04774</b>	<b>4,31</b>	<b>1,64</b>	<b>11,32</b>
rs2153628AG:rs3740066CC	-0,2543	0,4479	0,56639	1,00000	0,78	0,32	1,87
rs2153628AG:rs3740066CT	-0,7605	0,4040	0,05832	1,00000	0,47	0,21	1,03
rs2153628AG:rs3740066TT	-1,3489	0,8647	0,08408	1,00000	0,26	0,05	1,41
rs2153628AG:rs2070677AA	-0,9115	0,4044	0,02289	1,00000	0,40	0,18	0,89
rs2153628AG:rs2070677AT	-0,5703	0,4177	0,16999	1,00000	0,57	0,25	1,28
rs2153628AG:rs2070677TT	1,2563	1,7518	0,33903	1,00000	3,51	0,11	108,83
rs2153628AG:rs12904742AA	-1,0289	0,6876	0,11674	1,00000	0,36	0,09	1,38
rs2153628AG:rs12904742AG	-0,5216	0,3444	0,13007	1,00000	0,59	0,30	1,17
rs2153628GG:rs3740066CC	-1,0829	0,9190	0,19499	1,00000	0,34	0,06	2,05
rs2153628GG:rs3740066CT	-1,6006	1,1009	0,08602	1,00000	0,20	0,02	1,75
rs2153628GG:rs3740066TT	-0,7246	1,4217	0,53771	1,00000	0,48	0,03	7,86

rs2153628GG:rs2070677AA	-2,2576	0,9798	0,00417	0,59681	0,10	0,02	0,71
rs2153628GG:rs2070677AT	-0,1999	1,2014	0,84931	1,00000	0,82	0,08	8,63
rs2153628GG:rs2070677TT	0,3950	2,3139	0,80384	1,00000	1,48	0,02	138,43
rs2153628GG:rs12904742AA	-1,3121	1,2021	0,19978	1,00000	0,27	0,03	2,84
rs2153628GG:rs12904742AG	-1,0703	0,7772	0,14204	1,00000	0,34	0,07	1,57
rs1934963CC:rs3740066CC	2,0469	1,5683	0,06216	1,00000	7,74	0,36	167,44
rs1934963CC:rs3740066CT	2,1793	1,5504	0,04061	1,00000	8,84	0,42	184,58
rs1934963CC:rs2070677AA	2,3126	1,5365	0,02525	1,00000	10,10	0,50	205,21
rs1934963CC:rs2070677AT	1,2704	1,7518	0,33294	1,00000	3,56	0,11	110,38
rs1934963CC:rs2070677TT	0,9268	1,9029	0,51305	1,00000	2,53	0,06	105,28
rs1934963CC:rs12904742AG	2,7012	1,4967	0,00405	0,57891	14,90	0,79	279,97
rs1934963CT:rs3740066CC	0,8962	0,5524	0,07525	1,00000	2,45	0,83	7,24
rs1934963CT:rs3740066CT	0,3399	0,4609	0,44486	1,00000	1,40	0,57	3,47
rs1934963CT:rs3740066TT	-0,4235	0,6031	0,47138	1,00000	0,65	0,20	2,14
rs1934963CT:rs2070677AA	0,3683	0,3985	0,34124	1,00000	1,45	0,66	3,16
rs1934963CT:rs2070677AT	0,5779	0,5189	0,23745	1,00000	1,78	0,64	4,93
rs1934963CT:rs2070677TT	1,2704	1,7518	0,33294	1,00000	3,56	0,11	110,38
rs1934963CT:rs12904742AA	-0,8137	0,6511	0,19606	1,00000	0,44	0,12	1,59
rs1934963CT:rs12904742AG	0,7715	0,3744	0,03060	1,00000	2,16	1,04	4,51
rs1934963TT:rs3740066CC	-0,0367	0,3331	0,91168	1,00000	0,96	0,50	1,85
rs1934963TT:rs3740066CT	-0,4017	0,3024	0,18312	1,00000	0,67	0,37	1,21
rs1934963TT:rs3740066TT	-1,8227	0,6683	0,00227	0,32481	0,16	0,04	0,60
rs1934963TT:rs2070677AA	-0,8549	0,3016	0,00431	0,61606	0,43	0,24	0,77
rs1934963TT:rs2070677AT	-0,4190	0,3296	0,20311	1,00000	0,66	0,34	1,25
rs1934963TT:rs2070677TT	1,1999	0,9332	0,12614	1,00000	3,32	0,53	20,68
rs1934963TT:rs12904742AA	-1,1695	0,4511	0,00815	1,00000	0,31	0,13	0,75
rs1934963TT:rs12904742AG	-0,2834	0,3006	0,34260	1,00000	0,75	0,42	1,36
rs3740066CC:rs2070677AA	0,6663	0,4243	0,09808	1,00000	1,95	0,85	4,47
rs3740066CC:rs2070677AT	-0,2710	0,3986	0,49432	1,00000	0,76	0,35	1,67
rs3740066CC:rs2070677TT	1,1714	0,9336	0,13672	1,00000	3,23	0,52	20,11
rs3740066CC:rs12904742AA	-0,8403	0,5973	0,14869	1,00000	0,43	0,13	1,39
rs3740066CC:rs12904742AG	0,8117	0,3359	0,01194	1,00000	2,25	1,17	4,35
rs3740066CT:rs2070677AA	-0,4812	0,3123	0,12278	1,00000	0,62	0,34	1,14
rs3740066CT:rs2070677AT	0,6777	0,4470	0,10858	1,00000	1,97	0,82	4,73
rs3740066CT:rs2070677TT	1,8828	1,5921	0,09819	1,00000	6,57	0,29	148,92
rs3740066CT:rs12904742AA	-1,3455	0,5074	0,00593	0,84796	0,26	0,10	0,70
rs3740066CT:rs12904742AG	0,3684	0,3054	0,22192	1,00000	1,45	0,79	2,63
rs3740066TT:rs2070677AA	-1,0520	0,5271	0,04008	1,00000	0,35	0,12	0,98
rs3740066TT:rs2070677AT	-1,2318	0,7410	0,07422	1,00000	0,29	0,07	1,25
rs3740066CC:rs12904742AA	-0,8403	0,5973	0,14869	1,00000	0,43	0,13	1,39
rs3740066CC:rs12904742AG	0,8117	0,3359	0,01194	1,00000	2,25	1,17	4,35
rs3740066CT:rs12904742AA	-1,3455	0,5074	0,00593	0,84796	0,26	0,10	0,70
rs3740066CT:rs12904742AG	0,3684	0,3054	0,22192	1,00000	1,45	0,79	2,63
rs3740066TT:rs12904742AA	-0,7966	1,4219	0,49905	1,00000	0,45	0,03	7,32
rs3740066TT:rs12904742AG	-0,8894	0,4549	0,04833	1,00000	0,41	0,17	1,00
rs2070677AA:rs12904742AA	-0,9896	0,4673	0,03172	1,00000	0,37	0,15	0,93
rs2070677AA:rs12904742AG	-0,0534	0,3063	0,86088	1,00000	0,95	0,52	1,73
rs2070677AT:rs12904742AA	-1,0118	0,6258	0,09363	1,00000	0,36	0,11	1,24
rs2070677AT:rs12904742AG	0,4757	0,3531	0,16678	1,00000	1,61	0,81	3,21
rs2070677TT:rs12904742AG	1,5000	0,9045	0,04075	1,00000	4,48	0,76	26,39

$\beta$ : regression coefficient;  $se(\beta)$ : standard error of regression coefficient ;OR:odds ratio. . The painted cells represent the significative results ( $p_{corrected}<0.05$ ).

## **CAPÍTULO 2**

**Falta de associação do gene *RLIP76*, transportador não-ABC, com a farmacoresistência em pacientes com epilepsia de lobo temporal mesial.**

Lack of association for the non-ABC drug-transporter gene (*RLIP76*) and pharmacoresistance in patients with mesial temporal lobe epilepsy.

Mariana S. Silva<sup>1</sup>, Rodrigo Secolin<sup>1</sup>, Elisabeth Bilevicius<sup>2</sup>,  
Fernando Cendes<sup>2</sup>, Iscia Lopes-Cendes<sup>1</sup>

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 19 3521 8909](tel:+551935218909)  
FAX: +55 19 3289 1818  
Email:[icendes@unicamp.br](mailto: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 gene could be associated with pharmacoresistance in a large group of patients with MTLE. We genotyped 8 dbSNPs within different drug-transporter gene, non-ABC, *RALBP1* (*RLIP76*) We ascertained 137 drug-resistant and 75 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. The AMOVA (99.59%) and Fst (0,00408) results showed that the two groups were not structured. We did not find significant associations with SNPs in *RALBP1* gene and pharmacoresistant patients with MTLE.

## INTRODUCTION

Epilepsy is a common, chronic and treatable neurological disorder. Mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) is the more frequent and refractory among partial epilepsies. About fourth per cent of patients are drug-pharmacoresistant in treatment with antiepileptic drugs (AEDs) in MTLE. The mechanisms underlying the development of drug-resistant in epilepsy are complex and it is not fully understood. Drug-resistance in general epilepsy depends on a number of clinical aspects, such as structural brain abnormalities, age at seizure onset and age of patient. Furthermore, drug-resistance may depend on genetic factors that affecting the pharmacokinetics and pharmacodynamics of AEDs, such as polymorphisms in genes related to metabolization, transport and target of AEDs. Among these transporter-genes, the most family have been studied are ABC-family (ATP-binding cassette family), mainly the *ABCB1* gene, that codify the MDR1 protein (or, Pgp, glycoprotein P) and *ABCC2* gene, that codify the MRP2 protein, both are expressed in blood-barrier brain (BBB) in epileptic tissues. All groups are studying the relation between polymorphism and gene function in drug resistant, but the significance of this genes in pharmacoresistance is still unclear. (Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2007; Mosyagin *et al.*, 2008; Gow *et al.*, 2008).

A drug-transporter gene, that it is understudied in refractory epilepsy, is the non-ABC transporter gene, *RALBP1*, also known as *RLIP76*. Awasthi *et al.*, in 2005, proposed that this gene had a greater effect in mediating resistance to AEDs in patients with refractory epilepsy than the MDR1 (Pgp). It was seen that RLIP76 was present in the luminal capillary endothelial surface in drug-resistant patients with epilepsy and that it was a transporter energy-dependent, multiespecific and able to transport carbamazepine and phenytoin drugs. Others two groups genotyped SNPs in RALPB1 gene in patients with drug-resistance epilepsy but no significant associations with polymorphisms in RALBP1 gene and pharmacoresistance in epilepsy (Leschziner *et al.*, 2007; Soranzo *et al.*, 2007).

There are few studies with the drug-transporter gene *RLIP76* in the literature and its relationship between drug refractory MTLE. Accordingly, this gene could be related with great importance in biologic processes such as the transport of antiepileptic drugs in the brain (Awasthi *et al.*, 2005). Thus, any alterations in the gene 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 genotyped eight SNPs in RLIP76 gene and compared the allelic and genotyped frequencies 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: 75 AED-responders (48 women) corresponding to all subjects who became seizure-free after the institution of appropriate AED (AED-responders), 137 pharmacoresistants (79 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. 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 had a MAF (minor allele frequency) higher than 5% in HapMap populations; were likely to be functional polymorphisms, preferentially located in exonic regions.

### *For Genomic Control*

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 SNPBrowser<sup>TM</sup> software, version 4.0 (De La Vega *et. al.*, 2006), available at [www.allsnps.com](http://www.allsnps.com). The results of SNP selection are in Table 1, Supplemental Data (Capítulo 1).

## **Genotyping**

DNA was isolated from venous blood samples through phenolchlorophorm method (Sambrook, 1989). All SNPs (8) were genotyped using Real Time Genotyping TaqMan system<sup>TM</sup>, ABI7500 (Applied Biosystems, Foster City, California, United States).

## 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 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).

## RESULTS

The population study consisted of 137 AED-pharmacoresistants and 75 AED-responders ELTM patients, in total of 212 unrelated ELTM patients. The results of SNP selection for genomic control are in Supplemental Data, Table1 (Capítulo 1). And the Figure 1 represents the SNP localization on each chromosome containing all target genes. The results of genomic control showed an average  $F_{st}$  of 0,00408 for all SNPs. The AMOVA test showed that the genetic variability between the groups was 0.41% and consequent variability within each study group is 99.59%, which indicates high variability in each population (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.



**Figure 1.** Distribution of 119 SNPs of genomic control in six chromosomes.

**Table 1.** Analysis of molecular variance (AMOVA).

Source of variation	SDD	CDV	Genetic variability (%)
Between populations	31,604	0,12028	0,41
Within populations	7583,94	21,5476	99,59
<b>Total</b>	<b>7615,55</b>	<b>21,6679</b>	<b>100</b>

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

The comparisons regarding duration of epilepsy, FS and sex revealed no difference among groups (Table 2). Mean at the age at epilepsy onset were significantly lower in pharmacoresistants compared with AED-responders, as the age of responders patients was higher than pharmacoresistants patients. 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	51(68%)	27(36%)	47.03 $\pm$ 10.97	26.14 $\pm$ 14.96	13(17,3%)	14,27	0.95 $\pm$ 0.70	10.57 $\pm$ 18.65
resistants	127(92,7%)	57(41,6%)	41.68 $\pm$ 9.11	29.91 $\pm$ 11.94	21(15,3%)	11,5	1.82 $\pm$ 0.65	16.68 $\pm$ 26.95
P	<b>7,14E-06</b>	<b>0,3835</b>	<b>0.005</b>	0.24	1,00	<b>0,0429</b>	<b>&lt;0.005</b>	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 85.5% and average genotyping success rate of sample patients was 98.7%. A total of 8 SNPs were genotyped, of this, four SNPs, were not in *Hardy-Weinberg* equilibrium and/or had a MAF less than 5%, (Table 3). The four retained SNPs in *RALBP1* gene are in linkage equilibrium, with  $r^2 < 0.8$ . A total of 4 SNPs were remained for further analysis.

**Table 3.** Values of MAF and EHW for all SNPs genotyped for each groups and both together.

GENE	SNP	% GENOTYPING	AED-pharmacoresistants n=137		AED-responders n= 75		2 POPULATIONS n=212		
			MAF (>0.05)	HWE (P>0.05)	MAF (>0.05)	HWE (P>0.05)	MAF (>0.05)	HWE (P>0.05)	%GENOTYPING
<i>RALBP1</i>	rs1049553	99.5	0.237	0.1763	0.192	0.9767	0.221	0.3559	99.5
	rs1813100	99.1	0.452	0.9825	0.486	0.6038	0.464	0.6548	99.1
	rs8092935	100.0	0.485	<b>2,35E-30</b>	0.48	<b>1,48E-13</b>	0.483	<b>5,15E-48</b>	100.0
	rs11559053	100.0	<b>0.0</b>	1.0	<b>0.0</b>	1.0	<b>0.0</b>	1.0	100.0
	rs28552921	100.0	<b>0.011</b>	1.0	<b>0.0</b>	1.0	<b>0.0070</b>	1.0	100.0
	rs12454987	99.5	0.474	<b>7,76E-28</b>	0.48	<b>1,48E-13</b>	0.476	<b>1,81E-44</b>	99.5
	rs329007	97.6	0.224	0.3831	0.264	0.8759	0.238	0.7071	97.6
	rs12680	99.5	0.085	1.0	0.088	0.8762	0.086	0.9146	99.5

MAF: minor allele frequency; HWE: *Hardy-Weinberg* equilibrium. In red are the values that are not in *Hardy-Weinberg* equilibrium and MAF minor than five per cent each population.

The data of genotypic and allelic frequencies for each SNP are included are showed in Table 4.

**Table 4.** Genotypic and allele frequencies for SNPs with MAF >0.05 and in *Hardy-Weinberg* equilibrium ( $p > 0.05$ ).

GENE	SNP	GENOTYPIC FREQUENCY				ALLELIC FREQUENCY				
		AED-RESPONDERS		AED-PHARMACORESISTANTS		AED-RESPONDERS		AED-PHARMACORESISTANTS		
		n = 75	%	n = 137	%					
<i>RALBP1</i>	rs1049553	CC	47	62,67	83	60,58	C	T	C	T
		CT	24	32,00	43	31,39	118	28	209	65
		TT	2	2,67	11	8,03	75,64	17,95	63,72	19,82
<i>RALBP1</i>	rs1813100	AA	21	28,00	41	29,93	A	G	A	G
		AG	34	45,33	66	48,18	76	72	148	122
		GG	19	25,33	28	20,44	48,72	46,15	45,12	37,20
<i>RALBP1</i>	rs329007	AA	37	49,33	84	61,31	A	G	A	G
		AG	29	38,67	43	31,39	103	37	211	61
		GG	4	5,33	9	6,57	66,03	23,72	64,33	18,60
<i>RALBP1</i>	rs12680	CC	1	1,33	1	0,73	C	G	C	G
		CG	11	14,67	21	15,33	13	135	23	249
		GG	62	82,67	114	83,21	8,33	86,54	7,01	75,91

The results of logistic regression for genotype and allelic associations between AED-responders and AED-pharmacoresistants are showed in Table 5 and 6 respectively.

**Table 5.** Results of regression logistic for SNP genotype between two groups: AED-responders and AED-pharmacoresistants.

Gene	SNP	genotype	$\beta$	se( $\beta$ )	Pvalue		Effect estimation		
					nominal	corrected	OR	low 95% IC	High 95% IC
<i>RALBP1</i>	rs1049553	CC	-0,15694	0,30011	0,598196	1,00000	0,85	0,47	1,54
	rs1049553	CT	-0,07254	0,30945	0,813757	1,00000	0,93	0,51	1,71
	rs1049553	TT	0,95551	0,73920	0,144908	0,57963	2,60	0,61	11,07
	rs1813100	AA	0,10201	0,31704	0,745481	1,00000	1,11	0,59	2,06
	rs1813100	AG	0,08785	0,28894	0,759918	1,00000	1,09	0,62	1,92

rs1813100	GG	-0,25639	0,33817	0,446648	1,00000	0,77	0,40	1,50
rs329007	AA	0,43436	0,29146	0,134109	0,53643	1,54	0,87	2,73
rs329007	AG	-0,45307	0,29881	0,128133	0,51253	0,64	0,35	1,14
rs329007	GG	-0,06806	0,57434	0,902852	1,00000	0,93	0,30	2,88
rs12680	CC	-0,10086	1,20138	0,923279	1,00000	0,90	0,09	9,52
rs12680	CG	0,01885	0,40262	0,962119	1,00000	1,02	0,46	2,24
rs12680	GG	-0,02586	0,38850	0,946223	1,00000	0,97	0,46	2,09

$\beta$ : regression coefficient;  $se(\beta)$ : standard error of regression coefficient ;OR:odds ratio.

**Table 6.** Results of regression logistic for SNP alleles between two groups: AED-responders and AED-pharmacoresistants.

GENE	SNP	allele	$\beta$	$se(\beta)$	Pvalue		Effect estimation		
					nominal	corrected	OR	low 95% IC	High 95% IC
RALBP1	rs1049553	C	-0,955512	0,739200	0,144908	0,579630	0,38	0,09	1,64
	rs1049553	T	0,156939	0,300114	0,598196	1,000000	1,17	0,65	2,11
	rs1813100	A	0,256391	0,338167	0,446648	1,000000	1,29	0,67	2,51
	rs1813100	G	-0,102007	0,317037	0,745481	1,000000	0,90	0,49	1,68
	rs329007	A	0,068059	0,574343	0,902852	1,000000	1,07	0,35	3,30
	rs329007	G	-0,434357	0,291460	0,134109	0,536434	0,65	0,37	1,15
	rs12680	C	0,025864	0,388496	0,946223	1,000000	1,03	0,48	2,20
	rs12680	G	0,100862	1,201378	0,923279	1,000000	1,11	0,10	11,65

$\beta$ : regression coefficient;  $se(\beta)$ : standard error of regression coefficient ;OR:odds ratio.

The frequency of genotypes and alleles for all genotyped SNPs in drug-transporter gene *RALBP1* did not significantly differ between AED-responders and AED-pharmacoresistant ( $p_{corrected} > 0.05$ ).

## DISCUSSION

Although the role of Pgp has been most extensively studied in patients with refractory epilepsy, others genes could be responsible for pharmacoresistance in epilepsy, such as *RALBP1*, a drug-transporter gene, non ABC and energy-dependent (Awasthi *et al.*, 2005).

The *RALBP1* is a great candidate gene because it may be expressed in luminal surface of endothelial cell membranes in epileptic brain and act in anti-gradient transport of both phenytoin and carbamazepine. (Awasthi *et al.*, 2005). Although, Soranzo *et al.* (2007) not found the *RLIP76* how an endothelial marker in brain. And in the same study, the genotyping of six SNPs in 262 drug-responsive patients and 107 drug-resistant patients, in

both groups with epilepsy showed no association with phenotype at any level and no association with epileptic susceptibility either, compared to healthy individuals. And, Leschziner *et al.*, (2007b) also genotyped 26 common SNPs in *RALBPI* gene and related with four outcomes reflecting response to drugs such, time to first seizure, time to 12-month remission, time to withdrawal due to inadequate seizure control and time to withdrawal due to unacceptable adverse drug events. Also, no significant associations were found in whole cohort study with 503 epilepsy patients. In addition, in our study, any associations were found in 212 unrelated ELTM patients for common SNPs of *RALBPI* gene, neither to SNP.

Futhermore our studies do not provide additional supporting data to the associations studies with patients with epilepsy, but only ELTM. However, further studies would seem necessary to prove the role of *RALBPI* in pharmacoresistance in epilepsy. The role of drug-transporters in AED resistance is complex (Sisodiya and Bates, 2006) and needs further investigation before clinical applications.

## REFERENCES

Awasthi S, Hallene K, Fazio V, Singhal SS, Cucullo L, Awasthi YC, et al. RLIP76, a non-ABC transporter, and drug resistance in epilepsy. *BMC Neuroscience*. 2005; 6(61): 1-11.

Barret JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005 Jan; 21(2): 263-6.

Choudhry S, et al. Population stratification confounds genetic association studies among Latinos. *Hum Genet*. 2006; 118: 652-64.

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

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

Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the international league against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 2005; 46 (4): 470-72.



Gow JM, Hodges LM, Chinn LW, Kroetz DL. Substrate-dependent effects of human ABCB1 coding polymorphisms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2008; 325(2): 435-42.

Heinze, G, Schemper, M. A solution to the problem of separation in logistic regression. *Statistics in Medicine*. 2002; 21(16): 2409–19.

Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim I, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, et al. A Silent Polymorphism in the MDR1 Gene Changes Substrate Specificity. *Science*. 2007; 315: 525-28.

Leschziner GD, Jorgensen, AL, Andrew T, Williamson PR, Marson AG, Coffey AJ, Middleditch C, et al. The association between polymorphisms in RLIP76 and drug response in epilepsy. *Pharmacogenomics*; 2007b; 8(12): 1-8.

Mosyagin I, Runge U, Schroeder W, Dazert E, Vogelgesang S, Siegmund W, et al. Association of ABCB1 genetic variants 3435C>T and 2677G>T to ABCB1 mRNA mRNA and protein expression in brain tissue from refractory epilepsy patients. *Epilepsia*. 2008; 49(9): 1555-61.

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

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

Sisodiya SM, Bates SE. Treatment of drug resistance in epilepsy: one step at a time. *Lancet Neurol*. 2006 May; 5(5): 380-1

Soranzo N, Libusha K, Martinian, L, Burley M, Thom M, Sali A, et al. Lack of support for a role for RLPI76 (RALBP1) in response to treatment or predisposition to epilepsy. *Epilepsia*. 2007; 48(4): 674-83.

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

[www.allsnps.com](http://www.allsnps.com).

## **CAPÍTULO 3**

### **Resultados Complementares**

## 1. Genotipagem de SNP no gene *SCN1A*

Além dos genes transportadores e metabolizadores de drogas abordados neste estudo, de maneira adicional aos objetivos propostos, analisamos o SNP rs2298771, exônico, não sinônimo no gene *SCN1A* (subunidade  $\alpha 1$  do canal de sódio), sendo este gene candidato à refratariedade medicamentosa por ser alvo de DAEs. As informações detalhadas do SNP estão presentes no Anexo IV. A população analisada foi a mesma utilizada no capítulo 2 do presente estudo, sendo 212 pacientes com epilepsia de lobo temporal mesial, não relacionados, dos quais, 75 pacientes são AED-respondedores e 137 AED-resistentes. Foram calculados MAF e EHW para estes SNPs. Os resultados estão apresentados na tabela 1.

**Tabela 1.** Valores de MAF e EHW para o SNP rs2289771 do gene *SCN1A* em cada grupo separadamente e em ambos.

GENE	SNP	% GEN OTIP AGE M	DAE- farmacoresistentes n=137		DAE- respondedores n= 75		2 POPULAÇÕES n=212		
			MAF (>0.05)	EHW (P>0.05)	MAF (>0.05)	EHW (P>0.05)	MAF (>0.05)	EHW (P>0.05)	% genotipagem
<i>SCN1A</i>	rs2298771	99.5	0.281	1.0	0.295	0.6913	0.286	0.8952	99.5

MAF: minor allele frequency; EHW: equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Em vermelho são os valores dos SNPs que não estão em EHW ou obtiveram MAF menor que 5%.

Como pode ser observado na tabela 1, o SNP rs2289771 está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* na amostra estudada, tanto no grupo de AED-respondedores como no grupo de AED-resistentes. Na tabela 2, estão presentes as frequências alélicas e genotípicas obtidas pós genotipagem dos grupos.

**Tabela 2.** Frequências genótípicas e alélicas para o SNP rs2289771 com MAF>0.05 e em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ( $p>0.05$ ).

GENE	SNP	FREQUÊNCIA GENOTÍPICA				FREQUÊNCIA ALÉLICA				
		DAE-RESPONDADORES		DAE-FARMACORESISTENTES		DAE-RESPONDADORES		DAE-FARMACORESISTENTES		
		N=75	%	n = 137	%					
SCN1A	rs2298771	GG	5	6,67	11	8,03	G	A	G	A
		AG	33	44,00	54	39,42	43	103	76	194
		AA	35	46,67	70	51,09	27,56	66,03	23,17	59,15

Os dados obtidos para a regressão logística, tanto para genótipos como para alelos estão representados na tabela 3. As análises estatísticas realizadas são as mesmas descritas no capítulo 1 e 2.

**Tabela 3.** Resultados da diferença nas frequências genótípicas e alélicas através do cálculo de regressão logística entre os dois grupos analisados no estudo: DAE-respondedores e DAE-farmacoresistentes.

Gene	SNP	genotype	$\beta$	se( $\beta$ )	Pvalue		Effect estimation		
					nominal	corrected	OR	low 95% IC	High 95% IC
SCN1A	rs2298771	GG	0,13868	0,55496	0,795813	0,795813	1,15	0,39	3,41
	rs2298771	AG	-0,21250	0,29175	0,464563	0,464563	0,81	0,46	1,43
	rs2298771	AA	0,15488	0,28847	0,589464	0,589464	1,17	0,66	2,06
	rs2298771	G	-0,154882	0,288467	0,589464	0,589464	0,86	0,49	1,51
	rs2298771	A	-0,138683	0,554960	0,795813	0,795813	0,87	0,29	2,58

$\beta$ : coeficiente de regressão; se( $\beta$ ): desvio padrão do coeficiente de regressão; OR: odds ratio.

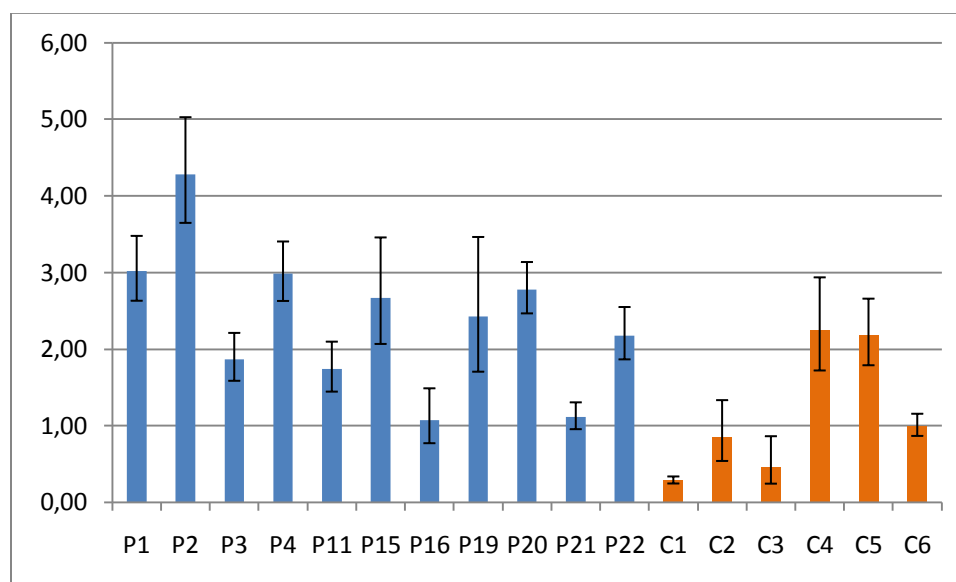
Como pode ser observado nos resultados obtidos, não houve diferença estatisticamente significativa para frequências alélicas e genótípicas do SNP exônico rs2298771 (*SCN1A*) entre os grupos de farmacoresistentes e farmacoresponsivos. Todos os valores de p foram corrigidos através da correção de Bonferroni. Este gene é um importante gene candidato à refratariedade às DAEs e será melhor investigado em estudos posteriores.

## 2. Expressão gene *ABCC2* em hipocampo

O gene *ABCC2* foi um gene exhaustivamente estudado no presente estudo, no entanto, a proposta inicial era a genotipagem de SNPs para posterior estudo de associação.

Nesse sentido, como foi identificada uma associação significativa para um SNP sinônimo (rs3740066) presente neste gene, resolvemos verificar se a expressão deste gene estava alterada em tecido hipocampal de pacientes refratários à medicação antiepiléptica, tanto por PCR em tempo real, onde observamos a quantidade de mRNA expressa, como para a proteína do gene (MRP2), utilizando a técnica de *western blot*. Abaixo estão descritos os métodos utilizados para cada experimento.

Se faz importante enfatizar que no capítulo 1 está apresentado o resultado da expressão do gene *ABCC2*, mas, com valores médios de RQ por grupo. O gráfico da figura 1 mostra os valores de RQ por amostra.



**Figura 1.** Resultado da expressão do gene *ABCC2* em hipocampo de 11 pacientes refratários à medicação antiepiléptica e em 6 amostras de indivíduos saudáveis provenientes de autópsia. Os valores no eixo Y são referentes aos valores de RQ (relative quantification).

Após análise estatística, o valor de  $p_{unilateral}$  obtido foi de 0.0352, mostrando que há diferença significativa entre os grupos de caso/controle, havendo uma maior expressão do gene *ABCC2* em hipocampo de pacientes refratários em relação aos controles provenientes de autópsia.

### 3. Expressão da proteína MRP2 em hipocampo

Foi utilizado extrato protéico de testículo de rato como amostra controle para validação do anticorpo. A proteína MRP2 foi detectada apenas na amostra controle (testículo), mas não no cérebro de pacientes farmacoresistentes (amostras paciente 3 e 9) e saudáveis, provenientes de autópsia (controle 1), como está evidenciado na figura 2.



**Figura 2:** Membrana de gel obtido através da técnica de western blot. Foi utilizado método colorimétrico de coloração, com fosfatase alcalina. O marcador utilizado foi o Kaleidoscópio (Bio-Rad). Os números identificam o tamanho das bandas em quilo-daltons (KDa). MRP2 (1:200);  $\beta$ -actina (1:1000).

De acordo com a figura 2, a proteína MRP2 não pode ser observada tanto em hipocampo de pacientes refratários à medicação antiepiléptica como em tecido cerebral de pacientes saudáveis, *pos mortem*. Somente na amostra de testículo de rato a proteína aparece fracamente, o que mesmo assim, permite a validação do anticorpo. Segundo Bart et al., (2004), a proteína MRP2 é expressa, embora fracamente, em células mióides testiculares.

### 4. Referências

Bart J, Hollema H, Groen HJ, de Vries EG, Hendrikse NH, Sleijfer DT, et al. The distribution of drug-efflux pumps, P-gp, BCRP, MRP1 and MRP2, in the normal blood-testis barrier and in primary testicular tumours. *European Journal Cancer*. 2004 Sep; 40(14): 2064-70.

# DISCUSSÃO GERAL

## **6. DISCUSSÃO GERAL**

A resistência a DAEs em epilepsia é um importante fator que agrava o risco de morbidade e mortalidade causada pelas crises sem controle (Soranzo et al., 2007). Muita atenção tem sido focada no papel das proteínas transportadoras de drogas em relação à resistência ao tratamento medicamentoso em diversas situações clínicas (Sisodiya, 2003; Kwan & Brodie, 2005). Sabemos atualmente que existem vários transportadores de drogas multi-específicos, estando, muitos deles, presentes no cérebro humano (Hediger et al., 2004; van Vliet et al., 2006), podendo assim contribuir para o fenômeno da refratariedade medicamentosa em doenças do sistema nervoso central.

Uma das limitações em estudos de associação é o tamanho amostral. O tamanho amostral apropriado depende de parâmetros como capacidade de obtenção de um mínimo de diferença esperada, medida da variabilidade e poder estatístico (Eng, 2003). Um mínimo de diferença esperada entre os grupos analisados é a menor medida da diferença entre grupos que o pesquisador esperaria encontrar e, resultados de estudos pilotos ou dados de literatura podem guiar a seleção de um mínimo de diferença esperada razoável para o estudo. O tamanho da amostra escolhida também necessita ter a capacidade de detectar um valor mínimo de aumento da diferença da variabilidade, além de um poder estatístico representativo da realidade, que aumenta proporcionalmente com o tamanho da amostra utilizada. Em programas de análises estatísticas, o poder estatístico da amostra só é aceitável quando tem-se grupos de caso e controle de tamanhos iguais. No caso específico do presente estudo, o grupo controle (responsivo as DAEs) representa cerca de metade do grupo caso (resistentes às DAEs). Essa diferença reflete a frequência de ocorrência de refratariedade medicamentosa na ELTM sendo essa a proporção esperada de pacientes nesses dois grupos.

Um segundo aspecto muito relevante nos estudos de associação diz respeito a possíveis efeitos de estrutura populacional diferenciada presente nos dois grupos usados nas comparações. Portanto, após o término da etapa de coletas, o trabalho voltou-se para a caracterização genética das amostras (populações), que foi realizada através da observação da variação dos polimorfismos genéticos de indivíduos, aplicados a métodos estatísticos que medem o grau de diferenciação entre e dentro das populações (Hart & Clark, 1997). Os



cálculos mais utilizados para quantificar diferenças genéticas entre subgrupos a partir dos níveis de heterozigose média são as estatísticas *F* de Wright ou índice de fixação (Wright, 1965). Com o emprego do cálculo do *Fst* pode-se conhecer e identificar os padrões de estrutura genética entre e dentro de populações, e as informações resultantes deste cálculo são fundamentais no direcionamento dos experimentos (ver capítulos 1 e 2).

A estratificação da população pode ocorrer em grupos que possuem frequências alélicas diferentes entre e dentro de subgrupos ou em populações miscigenadas com variados padrões de ancestralidade. A maior parte da variabilidade genética entre humanos ocorre dentro de populações, portanto a maioria das populações possui alelos em comum para qualquer loco, ou seja, alelos muito frequentes podem ser observados em populações distintas (Rosenberg et al., 2002). Na população analisada no presente estudo, a variabilidade genética entre os grupos é baixa, menos de 1% entre grupo caso e controle (Capítulos 1 e 2). Estes dados sugerem que os grupos não formam unidades evolutivas isoladas, podendo ser comprovada esta hipótese pelo teste de *Fst* médio, cujo valor obtido foi inferior a 0.05 (Capítulos 1 e 2). O índice de fixação *Fst* indica a ocorrência de fluxo gênico entre os grupos, ou seja, quanto menor o *Fst* maior o fluxo gênico e menor a estruturação populacional. Nesse sentido, os dados obtidos nos capítulos 1 e 2, sugerem que os grupos artificiais (pacientes responsivos e resistentes às DAEs) representam uma população panmítica. Estes resultados possibilitam as comparações e diminuem as chances de encontrar variações nas frequências alélicas e genótípicas decorrentes de estruturação populacional, e não do fenótipo de interesse, no caso a refratariedade medicamentosa. Portanto, a estruturação de populações é um fator que deve ser considerado em um estudo de associação genética (Cardon & Bell, 2001).

Para o gene *ABCC2* foram selecionados 26 SNPs (Capítulo 1), preferencialmente polimorfismos funcionais não sinônimos, incluindo o SNP -24C/T (rs717620) na região promotora, alvo da maioria dos trabalhos que investigam o papel dos polimorfismos na refratariedade medicamentosa em epilepsia (Ufer et al., 2008). Mas, assim como outros trabalhos (Kim et al., 2009; Laechelt et al., 2010) não foi encontrada associação com o polimorfismo -24C/T na amostra estudada. Mas o SNP sinônimo rs3740066 (3972C>T), presente no exon 28 do gene *ABCC2*, merece destaque, pois o alelo C do SNP está presente em maior frequência, com diferença significativa, no grupo de pacientes refratários

(Capítulo 1). Tendo ainda sido observada por PCR em tempo real, maior expressão do gene *ABCC2* em hipocampo de pacientes farmacoresistentes, comparado com hipocampo de controles sadios, provenientes de autópsia (resultados complementares). Entretanto, a expressão da proteína MRP2 não foi visualizada através do método de *western blotting*, tanto em tecido cerebral de indivíduos controles (autópsia) como de pacientes com ELTM farmacoresistentes (resultados complementares).

Estudos recentes tem demonstrado a importância de SNPs sinônimos na velocidade de tradução da proteína, tendo um impacto significativo na conformação adquirida pela proteína (Sauna, 2008), como no SNP rs3740066 presente no exon 28, que foi analisado no presente estudo (Capítulo 1), e representa uma mutação sinônima. Um estudo conduzido por Kimchi-Sarfaty et al. (2007), com o polimorfismo sinônimo C3435T do gene *ABCB1*, mostrou que em uma substituição sinônima, a troca de um alelo por outro no códon pode levar à formação de um códon raro, que acarreta em diminuição da velocidade de tradução da proteína e consequente atraso da inserção da proteína na membrana, inibindo assim os sítios de interação com o substrato. Em células transfectadas, os haplótipos CGT e TGT dos SNPs -24C>T (rs717620), 1249G>A (rs2273697) e 3972C>T (rs3740066) respectivamente, levam à menor expressão da proteína MRP2 em relação ao haplótipo selvagem CGC (Laechelt et al., 2010).

Com base nestes trabalhos, a hipótese que pode explicar a associação com um SNP sinônimo, como observada no presente estudo (Capítulo 1), sugere que, como os pacientes farmacoresistentes tem maior frequência do alelo C, o códon mais utilizado é o mais freqüente AUC (<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/codonbycds.cgi>), que não altera o processo traducional da proteína. Enquanto nos pacientes respondedores, a presença do alelo T levaria à formação do códon mais raro AUU (14.2) o que acarretaria em alteração do processo de tradução, diminuição da inserção da proteína MRP2 na membrana e consequente, diminuição da interação com o substrato (droga). As consequências desse processo são maior tempo de permanência da droga no tecido alvo e consequente maior efeito terapêutico nos pacientes AED-responsivos. Como a proteção exercida pela barreira hemato-encefálica contra xenobióticos é um processo intrínseco, os genes responsáveis por essa função, como os transportadores de drogas, provavelmente, devem estar expressos continuamente. Por outro lado, devido à variação da disponibilidade de diferentes códons

para o RNA transportador, isso pode levar à uma maior ou menor expressão da proteína. Nos casos em que a expressão é menor, como nos pacientes com o alelo T (Capítulo 1), a resposta aos medicamentos é mais satisfatória que em pacientes que possuem o alelo C, podendo estes serem mais farmacoresistentes, devido à melhor funcionabilidade do aparato traducional.

O SNP rs17216317, também presente no gene *ABCC2*, conduz à troca de uma prolina por uma leucina na posição 1291 da proteína. Dessa forma, um aminoácido com característica ácida é substituído por um aminoácido apolar, o que poderia ter um impacto importante na funcionalidade da MRP2 (Lehninger, 2006). Da mesma forma, o SNP rs2273697 também leva a alteração de aminoácido na proteína, neste caso, a troca ocorre entre uma fenilalanina e leucina. No entanto, não foi observada correlação entre esses SNPs e a refratariedade ao tratamento com DAEs (Capítulo 1). Estudos anteriores também não foram capazes de correlacionar diversos SNPs não sinônimos do *ABCC2* com a expressão da MRP2 (Giessmann et al., 2004). Deste modo, pode ser possível que as alterações de aminoácido ocorridas não estejam presentes em sítios de grande importância para a atividade da MRP2, ou ainda, as alterações não devem levar às modificações significativas na estrutura da proteína. Portanto, os estudos com *ABCC2* e farmacoresistência são poucos, inconclusivos e muito limitados na cobertura genômica que oferecem do gene candidato, ou seja, genotipam poucos SNPs ao longo do gene.

Já para o gene *ABCB1* foram selecionados 9 polimorfismos, restando apenas 4 para as análises de associação devido à necessidade de manter um controle de qualidade dos SNPs genotipados (Capítulo 1). O SNP rs1045642 (C3435T) foi genotipado e na análise de associação não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de farmacoresistentes e responsivos (Capítulo 1). Na literatura, é sugerido que o genótipo TT está mais freqüente em pacientes AED-respondedores, sendo associado também com menor expressão do gene *ABCB1* (Sills et al., 2005), embora muitos trabalhos não tenham encontrado associação com o polimorfismo C3435T e refratariedade medicamentosa em epilepsia (Tan et al., 2004; Sills et al., 2005; Kim et al., 2006a; Kim et al., 2006b; Shahwan et al., 2006; Kim et al., 2009).

O SNP rs2229109(A/G), também chamado de 1199G>A, é uma das variantes genéticas mais freqüentes do *ABCB1* tendo sido observado em todas as etnias (Pauli-

Magnus & Kroetz, 2004; Kerb, 2006). Representa uma mutação *missense* que leva a troca de uma serina por uma asparagina na posição 400 da proteína. Essa posição encontra-se em um domínio citoplasmático da Pgp conhecido como domínio de ligação de nucleotídeos (Jones & George, 1999; Sharon et al., 2005). Este domínio é responsável pela hidrólise de ATP que é essencial para o transporte de drogas, dessa forma, a alteração de aminoácidos nesse domínio pode abolir a hidrólise do ATP, afetando o transporte de drogas pela Pgp (Loo & Clarke, 1995; Sharon et al., 2005). No entanto, apesar da escolha de SNPs no presente estudo que pudessem levar a alterações na atividade e expressão da Pgp, não foi observada correlação entre os SNPs do gene *ABCB1* estudados e a refratariedade medicamentosa às DAEs (Capítulo 1).

Outros estudos também não obtiveram êxito em demonstrar correlação entre SNPs neste gene com a sua taxa de expressão, como Lourenço et al. (2008). Por outro lado, diversos grupos descreveram SNPs nesse gene que se correlacionam com a refratariedade medicamentosa tanto na epilepsia como em outras patologias que afetam o SNC, como a depressão (Wang & Sadée, 2006; Hermann & Bassetti, 2007; Kato et al., 2008). Conforme pode ser observado há diversos achados conflitantes na literatura, e maiores estudos são necessários para melhor determinar o papel dos SNPs do gene *ABCB1* com a refratariedade às DAEs.

Tem sido sugerido que o gene *RALBP1* (RLIP76) é um transportador de drogas não pertencente à família dos transportadores ABC e não dependente de energia (ATP). Foi proposto por Awasthi (2005), que o gene *RALBP1* está expresso na superfície luminal de células endoteliais em capilares cerebrais em pacientes resistente a drogas, contribuindo para o transporte de fenitoína e carbamazepina. No entanto, estudos posteriores conduzidos por Soranzo et al. (2007) e Leschziner et al. (2007b), falharam na tentativa de demonstrar qualquer associação de polimorfismos do gene *RALBP1* e a refratariedade em epilepsia. Os dados obtidos no presente estudo, também não identificaram qualquer associação dos polimorfismos genotipados e refratariedade em pacientes com ELTM (Capítulo 2). Para o gene *RALBP1*, o empenho em selecionar variados SNPs candidatos abrangendo todo o gene parece ser maior se comparado com trabalhos feitos para os genes *ABCB1* e *ABCC2*, mas ainda são necessários inúmeros estudos, incluindo estudos funcionais, para descobrir o papel dos polimorfismos na refratariedade em epilepsia.

Uma hipótese para explicar a causa da falta de replicação dos estudos de associação, sugere que provavelmente os polimorfismos associados representem falso-positivo, como sugerido por outros autores (Ott 2004; Tan et al., 2004). Entretanto outros fatores podem mascarar a ocorrência de uma verdadeira associação como: desenho do estudo, etnia da amostra e critérios de inclusão. Segundo Soranzo et al. (2005), podem haver diferenças no tipo e número de DAEs utilizadas em cada estudo, pois interações farmacodinâmicas poderiam também mascarar o fraco efeito, porém real, da associação de algum polimorfismo com a farmacoresistência às DAEs.

Quanto aos genes metabolizadores de drogas, foram encontradas somente associações com polimorfismos intrônicos (Capítulo 1), sendo três SNPs presentes no gene *CYP2C9* (rs4086116T, rs2153628AA e rs1934963C), e dois SNPs (rs12904742GG e rs2551188TT), presentes respectivamente nos genes *CYP1A2* e *CYP1B1*, sendo estes genótipos mais frequentes em pacientes farmacoresistentes (Capítulo 1). As hipóteses que podem explicar o papel dos polimorfismos intrônicos na farmacoresistência, sugerem que eles poderiam estar em desequilíbrio de ligação com uma variante funcional causal, ou mesmo estarem localizados em regiões específicas intrônicas, como sítios conservados de *splicing* (Lomelin et al., 2009), ou ainda, poderiam estar presentes em regiões que codificam microRNAs, alterando sua funcionabilidade e posterior regulação de expressão do gene (Lomelin et al., 2009).

Muitos estudos de associação do tipo *genome-wide* (GWA) têm encontrado variantes intrônicas associadas à maior predisposição no desenvolvimento de doenças como diabetes e câncer (Scott et al., 2007). Além dos polimorfismos associados à farmacoresistência, a atrofia hipocampal em pacientes com refratariedade medicamentosa contribui com 9% no desenvolvimento da refratariedade em pacientes com ELTM, podendo então ser um fator clínico de extrema relevância para o tratamento com drogas antiepilépticas (Capítulo 1).

Sendo assim, os resultados apresentados no presente estudo contribuem para o entendimento dos fatores genéticos e ambientais associados à refratariedade medicamentosa em pacientes com ELTM, no entanto, estudos funcionais necessitam ser realizados para entender o papel dos polimorfismos na farmacoresistência em ELTM.

# CONCLUSÕES FINAIS

## 7. CONCLUSÕES FINAIS

1) Foi encontrada evidência de associação da farmacoresistência em pacientes com ELTM com o gene transportador de droga, *ABCC2* (rs3740066), e com os genes mebolizadores de drogas *CYP1B1* (rs2551188), *CYP1A2* (rs12904742) e *CYP2C9* (rs4086116, rs2153628 e rs1934963). Não foi encontrada associação com entre o gene transportador de droga, não-ABC *RALBP1* e farmacoresistência em pacientes com ELTM;

2) As interações entre os SNPs rs2551188CT:rs4086116CT (*CYP1B1:CYP2C9*) e rs2153628AA:rs12904742GG (*CYP2C9:CYP1A2*) também estão associadas com a farmacoresistência na ELTM, sendo estes os genótipos mais frequentes no grupo de pacientes refratários às DAEs, sugerindo que a farmacoresistência é de natureza poligênica;

3) A análise multivariada sugere que a atrofia hipocampal em pacientes com ELTM contribui com 9% para o fenótipo da farmacoresistência, enquanto os fatores genéticos analisados neste estudo contribuem com 12% para este fenótipo. Nesse sentido, 79% das causas da farmacoresistência nos pacientes analisados, permanece ainda relacionada a fatores desconhecidos. Indicando assim, que a causa de refratariedade em pacientes com ELTM pode ser multifatorial;

4) Os grupos de pacientes analisados no presente estudo, AED-farmacoresistentes e AED-responsivos, representam uma única população panmítica, não tendo sido identificado estruturação populacional, indicando assim, que podem ser realizadas comparações entre os grupos em análises de associação;

5) Adicionalmente, foi possível demonstrar que o gene *ABCC2* possui maior expressão em hipocampo de pacientes farmacoresistentes se comparado às amostras provenientes de autópsia;

6) Finalmente, nossos resultados são suficientes para confirmar que os polimorfismos (SNPs) em genes transportadores de metabolizadores de drogas estão associados com a refratariedade medicamentosa em pacientes com ELTM.



# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe T, Seo T, Ishitsu T, Nakagawa T, Hori M, Nakagawa K. Association between SCN1A polymorphism and carbamazepine-resistant epilepsy. *Br J Clin Pharmacol*. 2008; 66(2): 304–307.
- Albus, H, Williamson, R. Electrophysiologic analysis of the actions of valproate on pyramidal neurons in the rat hippocampal slice. *Epilepsia*. 1998; 39: 124–39.
- Ambrósio AF, Silva AP, Malva JO, Soares-da-Silva P, Carvalho AP, Carvalho CM. Inhibition of glutamate release by BIA 2-093 and BIA 2-024, two novel derivatives of carbamazepine, due to blockade of sodium but not calcium channels. *Biochem. Pharmacol*. 2001; 61: 1271–75.
- Araújo DAM, Mafra RA, Rodrigues ALP, Miguel-Silva V, Beirão PSL, Almeida RN, Quintans-Júnior LJ, et al. N-Salicyloyltryptamine, a new anticonvulsant drug, acts on voltage-dependent Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and K<sup>+</sup> ion channels. *Br J Pharmacol*. 2003; 140: 1331-9.
- Armijo JA, Shushtarian M, Valdizan EM, Cuadrado A, de las Cuevas I, Adín J. Ion channels and epilepsy. *Current Pharmaceutical Design* 2005; 11:1975–2003.
- Awasthi S, Hallene K, Fazio V, Singhal SS, Cucullo L, Awasthi YC, et al. RLIP76, a non-ABC transporter, and drug resistance in epilepsy. *BMC Neuroscience*. 2005; 6(61): 1-11.
- Awasthi S, Sharma R, Shingal SS, Zimniak P e Awasthi YC. RLIP76, a novel transporter catalyzing ATP-dependent efflux of xenobiotics. *Drug Metabolism and Disposition*. 2002; 30(12): 1300–10.
- Aynacioglu AS, Brockmoller J, Bauer S, Sachse C, Guzelbey P, Ongen G, et al. Frequency of cytochrome P450 CYP2C9 variants in a Turkish population and functional relevance for phenytoin. *Br J Clin Pharmacol*. 1999 Sep; 48(3): 409-15.
- Ayres M., Ayres M.Jr, Ayres, DL, et al. BioEstat 3.0 Aplicações Estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas. Belém, PA, 2003.
- Babb TL, Brown WJ. Pathological findings in epilepsy. In: Engel Jr (editor). *Surgical treatment of the epilepsies*. New York; Raven Press:1987, 511-540.
- Barret JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005 Jan; 21(2): 263-6.
- Basic S, Hajnsek S, Bozina N, Filipcic I, Sporis D, Mislov D, et al. The influence of C3435T polymorphism of ABCB1 gene on penetration of phenobarbital across the blood-brain barrier in patients with generalized epilepsy. *Seizure*. 2008; 17: 524-530.
- Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SDJ. The Genetic Structure of Human Populations Studied Through Short Insertion-Deletion Polymorphisms. *Ann Hum Genet*. 2006 Sep; 70(5): 658-65.
- Binder DK, Sternhäuser C. Functional Changes in Astroglial Cells in Epilepsy. *Glia*. 2006; 54: 358-68.

- Blumcke I, Beck H, Lie AA, Wilster OD. Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*. 1999; 36(2-3): 205-23.
- Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian diseases, future approaches for complex disease. *Nature Genetics*. 2003 Mar; 33:228-37.
- Brodie MJ. Do we need any more new antiepileptic drugs? *Epilepsy Research*. 2001; 45: 3-6.
- Brown TA. *Genomes 2*, 2nd ed, Manchester: Bios Scientific Publishers; 2002.
- Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Key concepts in genetic epidemiology. *The Lancet*. 2005; 366(9489): 941-51.
- Cardon LR, Abecasis GR. Using haplotype blocks to map human complex trait loci. *Trends in Genetics*. 2003 Mar; 19(3): 135-40.
- Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet*. 2001 Feb; 2: 91-9.
- Cendes F, Andermann F, Gloor P, Evans A, Jones-Gotman M, Watson C, et al. MRI volumetric measurement of amygdale and hippocampus in temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 1993a; 43: 719-25.
- Cendes F, Leproux F, Melanson D, Ethier R, Evans A, Peters T, et al. MRI of amygdale and hippocampus in temporal lobe epilepsy. *Journal of Computer Assisted Tomography*. 1993b; 17: 206-10.
- Cervený L, Pavek P, Malakova J, Staud, F, Frenndrich, Z. Lack of interactions between breast cancer resistance protein (bcpr//abcg2) and selected antiepileptic agents. *Epilepsia*. 2006; 47: 461-468.
- Chen L, Liu CQ, Hu Y, Xiao ZT, Chen Y, Liao JX. Association of a polymorphism in MDR1 C3435T with response to antiepileptic drug treatment in ethnic Han Chinese children with epilepsy. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2007 Feb; 9(1): 11-4.
- Clark AG. Finding genes underlying risk of complex disease by linkage disequilibrium mapping. *Curr Opin Genet Dev*. 2003; 13: 296–302.
- Coan A.N., Kobayashi E., Li Min Li, Cendes F. Quantification of Hippocampal Signal Intensity in Patients with Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Journal Neuroimaging*. 2003; 13: 228-33.
- Collins FS, Green ED, Guttmacher AE, Guyer MS. A vision for the future of genomics research. *Nature*. 2003; 422(6934): 835-47.
- Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*. 1989 Jul-Aug; 30(4): 389-99.
- Crawford D.C. Haplotype diversity across 100 candidate genes for inflammation, lipid metabolism, and blood pressure regulation in two populations. *Am J Hum Genet*. 2004 Apr; 74(4): 610-22.

- Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, Lander ES. High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nature Genet.* 2001; 29: 229–232.
- de Bakker PIW, Burt NP, Graham RR, Guiducci C, Yelensky R, Drake JA, et al. Transferability of tag SNPs in genetic association studies in multiple populations. *Nat Genet.* 2006 Nov; 38(11): 1298-303.
- 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. *Mutation Research.* 2005; 573: 111-35.
- De Lanerolle NC, Kim JH, Williamson A, Spencer SS, Zaveri HP, Eid T, et al. A retrospective analysis of hippocampal pathology in human temporal lobe epilepsy: evidence for distinctive patient subcategories. *Epilepsia.* 2003; 44(5): 677-87.
- Dericioglu N, Babaoglu MO, Yasar U, Bal IB, Bozkurt A, Saygi S. Multidrug resistance in patients undergoing resective epilepsy surgery is not associated with C3435T polymorphism in the ABCB1 (MDR1) gene. *Epilepsy Research.* 2008; 80: 42-6.
- Deshane J, Chaves L, Sarikonda KV, Isbell S, Wilson L, Kirk M, Grubbs, et al. Proteomics analysis of rat brain protein modulations by grape seed extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2004; 52(26): 7872-83.
- Devlin B, Roeder K. Genomic control for association studies. *Biometrics.* 1999 Dec; 55(4): 997-1004.
- Dicato M, Duhem C, Pauly M, Ries F. Multidrug resistance: molecular and clinical aspects. *Citokines, cellular & molecular therapy.* 1997; 3: 91-100.
- Dombrowski SM, Desai SY, Marroni M, Cucullo L, Goodrich K, Bingaman W, et al. Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy. *Epilepsia.* 2001; 42(12): 1501-1506.
- Eng, J. Sample Size Estimation: How Many Individuals Should Be Studied? *Radiology.* 2003; 227: 309–13.
- Engel T, Lill H, Korner J, Josten C. Bilateral posterior fracture-dislocation of the shoulder caused by an epileptic seizure: diagnostic, treatment and result, *Unfallchirurg* 1999 Nov; 102(11): 897-901.
- Estrela RC, Iberia FS, Carvalho RS, Gregório SP, Dias-Neto E, Struchiner CJ, et al. Distribution of ABCB1 polymorphisms among Brazilians: impact of population admixture. *Pharmacogenomics.* 2008; 9(3): 267-76.
- Ewens WJ. *Mathematical Population Genetics.* Heidelberg: Springer-Verlag, 1979.
- 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.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., and Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

- Falconer MA, Serafetinides EA, Coersellis JAN. Etiology and Pathogenesis of temporal lobe. *Arch Neurol*. 1988; 10: 233-248.
- Falk CT, Rubinstein P. Haplotype relative risks: an easy reliable way to construct a proper control sample for risk calculations. *Ann Hum Genet*. 1987 Jul; 51(3): 227-33.
- Ferraro TN, Buono RJ. The relationship between the pharmacology of antiepileptic drugs and human gene variation: an overview. *Epilepsy & Behavior*. 2005 Aug; 7(1): 18-36.
- Fisher PD, Sperber EF, Moshe SL. Hippocampal sclerosis revisited. *Brain Dev*. 1998; 20(8): 563-73.
- Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the international league against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 2005; 46 (4): 470-472.
- Frey HH, Löscher W. Distribution of valproate across the interface between blood and cerebrospinal fluid. *Neuropharmacology*. 1978; 17:637-42.
- Fromm MF. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci*. 2004; 25: 423-29.
- Futuyma D.J. *Biologia Evolutiva*. 2 ed. Ribeirão Preto: Funpec-RP, 2002.
- Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype block in the human genome. *Science*. 2002 Jun; 296(5576): 225-9.
- Gibbs JP, Adeyeye MC, Yang Z, Shen DD. Valproic acid uptake by bovine brain microvessels endothelial cells: role of active efflux transport. *Epilepsy Research*. 2004; 58: 53-66.
- Gibson NJ. The use of Real-Time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clin Chim Acta*, 2006 Jan; 363(1-2): 32-47.
- 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. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2004; 76(3): 192-200.
- Gu S, Pakstis AJ, Li H, Speed WC, Kidd JR, Kidd KK. Significant variation in haplotype block structure but conservation in tagSNP patterns among global populations. *Eur J Hum Genet*. 2007 Mar;15(3):302-12.
- Guengerich EP. Cytochromes P450, drugs and diseases. *Molecular Interventions*. 2003 Jun; 3(4): 195-204.
- Hardy G.H. Mendelian proportions in a mixed population. *Science*. 1908; 28:49-50.
- Hartl DL, Clark AG. *Principles of Population Genetics*. Massachusetts: Sinauer Associates, 1997.

- Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *European Journal of Physiology*. 2004; 447: 465-68.
- Heinze G, Schemper M. A solution to the problem of separation in logistic regression. *Statistics in Medicine*. 2002; 21(16): 2409–2419.
- Herman ST, Pedley TA. Novas opções para o tratamento da Epilepsia. *JAMA Brasil*. 1999; 3(1): 1634-40.
- Hermann DM, Bassetti CL, Implications of ATP-binding cassette transporters for brain pharmacotherapies. *Trends in Pharmacological Sciences* 2007; 28: 128-34.
- Heron SE, Scheffer IE, Berkovic SF, Dibbens LM, Mulley JC. Channelopathies in idiopathic epilepsy. *The American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2007; 4: 295-304.
- Hiratsuka M, Sasaki T, Mizugaki M. Genetic testing for pharmacogenetics and its clinical application in drug therapy. *Clinica Chimica Acta*. 2006; 363: 177–86.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, John A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variation and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. 2000; 97: 3473-78.
- Holmes G.L. Epidemiology and clinical mechanisms of drug resistance in epilepsy: new horizons in the development of antiepileptic drugs: the search for new targets: a conference review. *Epilepsy Res*. 2004; 60: 77-159.
- Huai-Yun H, Secret DT, Mark KS, Carney D, Brandquist C, Elmquist WF, et al. Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in brain microvessels endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 243: 816-20.
- Hübner A, Jentsch TJ. Ion channel diseases. *Human Molecular Genetic*. 2002; 1(20): 2438-45.
- Hudson RR. Properties of a neutral allele model with intragenic recombination. *Theor Popul Biol*. 1983; 23: 183–201.
- 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.
- Hung CC, Tai JJ, Lin CJ, Lee MJ, Liou HH. Complex haplotypic effects of the ABCB1 gene on epilepsy treatment response. *Pharmacogenomics*. 2005; 6(4): 411-17.
- International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005; 437: 1299–1320.
- International HapMap Consortium. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007 Oct 18;449(7164):851-61.

- Isaac H., De La Vega F.M. Knowledge-Driven selection of SNP markers for genetic association studies os complex diseases. 53<sup>rd</sup> American Society of Human Genetics Annual Meeting. Los Angeles, CA 2003.
- Ito S, Ieri I, Tanabe M, Susuki A, Higuchi K, Otsubo K. Polymorphism of the ABC transporters genes, MDR1, MRP1 and MRP2/cMOAT, in healthy Japanese subjects. *Pharmacogenetics*. 2001; 11: 175-184.
- Jackson GD, Berkovic SF, Duncan JS, Connelly A. Optimizing the diagnosis of hippocampal sclerosis using MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1993; 14: 753-62.
- Jefferys JG, Haas HL. Synchronized bursting of CA1 hippocampal pyramidal cells in the absence of synaptic transmission. *Nature*. 1982; 300: 448-50.
- Jeub M, Beck H, Siep E, Rüschemschmidt C, Speckmann EJ, Ebert U, et al. Effect of phenytoin on sodium and calcium currents in hippocampal CA1 neurons of phenytoin-resistant kindled rats. *Neuropharmacology*. 2002; 42: 107-16.
- Jing Q, Huang S, Guth S, Zarubin T, Motoyama A, Chen J, et al. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell*. 2005; 120(5): 623-34.
- Jones PM, George AM. Subunit interactions in ABC transporters: towards a functional architecture. *FEMS Microbiol Lett*. 1999; 179: 187-202.
- Jonhson JA. Pharmacogenetics: potential for individualized drug therapy through genetics. *Trends in Genetics*. 2003; 19(11): 660-6.
- Jullien-Flores V, Dorseuil O, Romero F, Letourneur F, Saragosti S, Berger R, Tavitian A, Gacon G, Camonis JH: Bridging Ral GTPase to Rho pathways. RLIP76, a Ral effector with CDC42/Rac GTPase-activating protein activity. *J Biol Chem* 1995, 270:22473-22477.
- Kalow W. Perspectives in pharmacogenetics. *Arch. Pathol. Lab.Med*. 2001a; 125: 77–80.
- Kalow W. Pharmacogenetics in perspective. *Drug Metab. Dispos*. 2001b; 29: 468–70.
- Kato M, Fukuda T, Serretti A, Wakeno M, Okugawa G, Ikenaga et al., ABCB1 (MDR1) gene polymorphisms are associated with the clinical response to paroxetine in patients with major depressive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2008; 32 : 398–404.
- Kerb R. Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy. *CancerLetters*. 2006; 234: 4-33.
- 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: 344–47.
- 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 Research*. 2009 Mar; 84(1): 86-90.

- Kim R, Leake B, Choo E, Dresser G, Kubba S, Schwarz U, et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2001; 70: 189-99.
- 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.
- Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim I, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, et al. A Silent Polimorphism in the MDR1 Gene Changes Susbstrate Specificity. *Science*. 2007; 315: 525-28.
- Klotz U. The role of pharmacogenetics in the metabolism of antiepileptic drugs: pharmacokinetic and therapeutic implications. *Clin Pharmacokinet*. 2007; 46(4): 271-9.
- Kruglyak L. Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nature Genetics*. 1999 Jun; 22(2): 139-44.
- Kruglyak L. The use of genetic map biallelic markers in linkage studies. *Nature Genetics*. 1997 Sep; 17(1): 21-4.
- Krynetski EY, Evans WE. Drug mehtylation in cancer therapy: lessons from TPMT polymorphism. *Oncogene*. 2003 Oct; 22(47): 7403-13.
- Krynetski EY, Evans WE. Genetic polymorphism of thiopurine S-methltransferase: molecular mechanism and clinical importance. *Pharmacology*. 2000; 61: 136-46.
- Kubota H, Ishihara H, Langmann T, Schmitz G, Stieger B, Wieser HG, et al. Distribution and functional activity of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in human brain microvascular endothelial cells in hippocampal sclerosis. *Epilepsy Research*. 2006; 68: 213-28.
- Kwan P, Baum L, Wong V, Ng PW, Lui CH, Sin NC, et al. Association between ABCB1 C3435T polymorphism and drug-resistant epilepsy in Han Chinese. *Epilepsy & Behavior*. 2007; 11: 112-7.
- Kwan P, Brodie MJ. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. *Epilepsia*. 2005; 46(2): 224-35.
- Kwan P, Sills GJ, Brodie MJ. The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs. *Pharmacology Therapy*. 2001; 90:21-34.
- 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.
- Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science*. 1994;30;265(5181):2037-48.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb; 409(6822): 860-921.



- Lee JH, Chung CK, Song IC, Chang KH, Kim HJ. Limited utility of interictal apparent diffusion coefficient in the evaluation of hippocampal sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 2004; 110: 53-58.
- Lehninger AL. *Princípios de Bioquímica*, 4ª Ed. São Paulo: Editora Sarvier; 2006.
- Leschziner GD, Andrew T, Leach JP, Chadwick D, Coffey AJ, Balding DJ, et al. Common ABCB1 polymorphisms are not associated with multidrug resistance in epilepsy using a gene-wide tagging approach. *Pharmacogenet Genomics.* 2007a; 17(3): 217-20.
- Leschziner GD, Jorgensen, AL, Andrew T, Williamson PR, Marson AG, Coffey AJ, Middleditch C, et al. The association between polymorphisms in RLIP76 and drug response in epilepsy. *Pharmacogenomics*; 2007b; 8(12): 1-8.
- Lewontin RC. *Molecular and Classical Biology.* Science. 1964 Oct; 146(3640):14.
- Lewontin RC. The detection of linkage disequilibrium in molecular sequence data. *Genetics.* 1995 May;140(1):377-88.
- Li CC. Population subdivision with respect to multiple alleles. *Ann Hum Genet.* 1972; 33:23-29.
- Ling V. Multidrug resistance: molecular mechanism and clinical relevance. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; 40: 3-8.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)). *Methods.* 2001;25(4), 402-408.
- Lohmueller KE, Mauney MM, Reich D, Braverman JM. Variants associated with common disease are not unusually differentiated in frequency across populations. *Am J Hum Genet.* 2006 Jan; 78(1): 130-6.
- Lomelin D, Jorgenson E, Risch N. Human genetic variation recognizes functional elements in noncoding sequence. *Genome Res.* 2010 Mar; 20(3): 311-9.
- Loo TW, Clarck DM. Covalent modification of human P-glycoprotein mutants containing a single cysteine in either nucleotide-binding fold abolishes drug-stimulated ATPase activity. *Journal of biological chemistry.* 1995; 270: 22957-61.
- Löscher W, Klotz U, Zimprich F, Schimidt D. The clinical impact of pharmacogenetics on the treatment of epilepsy. *Epilepsia.* 2009; 50(1): 1-23.
- Löscher W, Potschka H. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette (ABC) gene family. *NeuroRx.* 2005a; 2: 113-8.
- 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.
- Löscher W, Schmidt D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. *Epilepsy Research.* 2002; 50: 3-16.
- Löscher W. New visions in the pharmacology of anticonvulsion. *European Journal of Pharmacology.* 1998; 342:1-13.

- Lourenço JJ, Maia RC, Scheiner MA, Vasconcelos FC, Moreira MA. Genomic variation at the MDR1 promoter and P-glycoprotein expression and activity in AML patients, *Leukemia Research*. 2008 Jun; 32(6): 976-9.
- Luer MS, Harani C, Dujovny M, Gidal B, Cwik M, Deyo K, et al. Saturable transport of gabapentin at the blood-brain barrier. *Neurological Research*. 1999; 21: 559-62.
- Lugo MR, Sharom FJ. Interaction of LDS-751 and rhodamine 123 with P-glycoprotein: evidence for simultaneous binding of both drugs. *Biochemistry*. 2005; 44: 14020-29.
- Luna-Tortós C, Fedrowitz M, Löscher W. Evaluation of transport of common antiepileptic drugs by human multidrug resistance-associated proteins (MRP1, 2 and 5) that are overexpressed in pharmacoresistant epilepsy. *Neuropharmacology*. 2010; 58: 1019-32.
- Luna-Tortós C, Rambeck B, Jürgens UH, Löscher W. The antiepileptic drug topiramate is a substrate for human P-glycoprotein but not multidrug resistance proteins. *Pharmaceutical Research*. 2009; 26(11): 2464-70.
- Maglóczy Z, Halász P, Vajda J, Czirják S, Freund TF. Loss of Calbindin-D28K immunoreactivity from dentate granule cells in human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*. 1997 Jan;76(2):377-85.
- Mann MW, Pons G. Various pharmacogenetic aspects of antiepileptic drug therapy: a review. *CNS Drugs*. 2007; 21(2): 143-64.
- Marchi N, Hallene KL, Kight KM, Cucullo L, Moddel G, Bingaman W, et al. Significance of MDR1 and multiple drug resistance in refractory epilepsy human epileptic brain. *BMC Medicine*. 2004; 2(37): 1-10.
- Margerison JHM, Corsellis JAN. Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain*. 1996; 89: 499-530.
- Mathern GW, Babb TL, Pretorius KK, Melendez M. & Levesque M.F. The pathophysiologic relationships between lesion pathology, intracranial ictal EEG onsets, and hippocampal neuron losses in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research* 1995a; 21: 133-147.
- Mazunder B, Seshadri V, Fox PI. Translational control by the 3'UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem Sci*. 2003; 28(2): 91-98.
- Mc Donald RL, Kelly KM. Antiepileptic drug mechanisms of action. *Epilepsia* 1995; 2: 2-12.
- McNamara JO. Emerging insights into the genesis of epilepsy. *Nature*. 1999; 399:15-22.
- Meldrum BS. Update on the mechanism of action of antiepileptic drugs. *Epilepsia* 1996; 37(6): 4-11.
- Mosyagin I, Runge U, Schroeder W, Dazert E, Vogelgesang S, Siegmund W, et al. Association of ABCB1 genetic variants 3435C>T and 2677G>T to ABCB1 mRNA mRNA and protein expression in brain tissue from refractory epilepsy patients. *Epilepsia*. 2008; 49(9): 1555-61.

- 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.
- Ndoye NF, Sow AD, Diop AG, Sessouma B, Sène-Diouf F, Boissy L, et al. Prevalence of epilepsy its treatment gap and knowledge, attitude and practice of its population in sub-urban Senegal in ILAE/IBE/WHO study. *Seizure*. 2005; 14: 106-11.
- Nebert DW, Mskinnon RA, Puga A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphism: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol*. 1996; 15: 273-280.
- Nebert DW, Zhang G, Vesell ES. From human genetics and genomics to pharmacogenetics and pharmacogenomics: past lessons, future directions. *Drug Metabol Rev*. 2008 Apr; 40: 187-224.
- Ohta T, Kimura M: Linkage disequilibrium between two segregating nucleotide sites under the steady flux of mutations in a finite population. *Genetics*. 1971; 68: 571– 80.
- Olsen RW, McCabe RT, Wamsley JK. GABA<sub>A</sub> receptor subtypes: autoradiographic comparison of GABA, benzodiazepine, and convulsant binding sites in the rat central nervous system. *J Chem Neuroanat*. 1990; 3: 59-76.
- Ott J. Association of genetic loci: Replication or not, that is the question. *Neurology*. 2004; 63: 955-8.
- Owen A, Pirmohamed M, Tettey JN, Morgan P, Chadwick D, Park BK. Carbamazepine is not a substrate for P-glycoprotein. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2001; 51: 345-9.
- Pauli-Magnus C, Kroetz, DL. Functional implications of genetic polymorphisms in the multidrug resistance gene MDR1 (ABCB1). *Pharmaceutical Research*. 2004; 21: 904-13.
- Peltonen L, Mckusick VA. Genomics and medicine. Dissecting human disease in the postgenomic era. *Science*. 2001 Feb; 291(5507): 1224-9.
- Perucca E, Richens IA. Biotransformation. In: Levy RH, Mattson RH, Meldrum BS (eds.). *Antiepileptic drugs*, 4ª edição. New York: Raven Press, 1995: 31-50.
- Phillips MS, Lawrence R, Sachidanandam R, Morris AP, Balding DJ, Donaldson MA. et al. Chromosome-wide distribution of haplotype blocks and the role of recombination hot spots. *Nat. Genet*. 2003; 33: 382–87.
- Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, Maselli L, Soares RP, Moura-Neto RS, et al. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Hum Hered*. 2006;62(4):190-5.
- Pirazzoli A, Recchia G. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: are they still promising? *Pharmacol Res*. 2004; 49(4): 357-61.
- Pirmohamed M, Park K.B. Genetic Susceptibility to adverse drug reactions. *Pharmacological Sciences*. 2001; 22: 298-305.

- Porto LA, Siqueira JS, Seixas LN, Almeida JRGS, Quintans-Júnior LJ. O Papel dos Canais Iônicos nas Epilepsias e Considerações Sobre as Drogas Antiepilépticas – Uma breve revisão. *J Epilepsy Clin Neurophysiol*. 2007; 13(4): 169-175.
- Potschka H, Baltes S, Löscher W. Inhibition of multidrug transporters by verapamil or probenecid does not alter blood-brain barrier penetration of levetiracetam in rats. *Epilepsy Research*. 2004; 58: 85-91.
- 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: 1479-86.
- Potschka H, Fedrowitz M, Löscher W. Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain barrier function and restricts antiepileptics drug activities. *Journal Pharmacol Exp Therapeutics*. 2003a; 306: 124-31.
- Potschka H, Fedrowitz M, Löscher W. P-glycoprotein-mediated efflux of Phenobarbital, lamotrigine and felbamate at the blood-brain barrier: evidence from microdialysis experiments in rats. *Neuroscience Lett*. 2002; 327: 173-6.
- Potschka H, Fedrowitz M, Löscher W. P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein are involved in the regulation of extracellular levels of the major antiepileptic drug carbamazepina in the brain. *Neuroreport*. 2001; 12:3557-60.
- Potschka H, Löscher W. In vivo evidence for P-glycoprotein mediated transport of phenytoin at the blood- brain barrier of rats. *Epilepsia*. 2001a; 42: 1231-40.
- Potschka H, Löscher W. Multidrug resistance-associated protein is involved in the regulation of extracellular levels of phenytoin in the brain. *Neuroreport*. 2001b; 12: 2387-9.
- Pritchard JK, Rosenberg NA. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *Am J Hum Genet*. 1999 Jul; 65(1): 220-8.
- Prokunina L, Alarcón-Riquelme ME. Regulatory SNPs in complex diseases: their identification and functional validation. *Expert Rev. Mol Med*. 2004; 6(10): 1-15.
- Proper EA, Oestreicher AB, Jansen GH, Veelen CWMv, Rijen PCv, Gispen WH, et al. Immunohistochemical characterization of mossy fibre sprouting in the hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Brain*. 2000; 123: 19-30.
- Rang, HP; Dale, MM; Ritter, JM; Flower RJ. *Farmacologia*. 6ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org>. 2010.
- Regest G, Tanganelli P. Clinical aspects and biological bases of drug resistant epilepsies. *Society for Neuroscience*. 1999; 34: 109-22.
- Reich DE, Cargill M, Bolk S, Ireland J, Sabeti PC, Richter DJ, et al. Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature*. 2001 May 10;411(6834):199-204.
- Remy S, Beck H. Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain*. 2006; 129: 18-35.

- Remy S, Urban BW, Elger CE, Beck H. Anticonvulsant pharmacology of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels in hippocampal neurons of control and chronically epileptic rats. *European Journal Neuroscience*. 2003; 17: 2648–58.
- Rettie AE, Haining RL, Bajpai M, Levy RH. A common genetic basis for idiosyncratic toxicity of warfarin and phenytoin. *Epilepsy Research*. 1999 Jul; 35(3): 253-5.
- Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*. 1996 Sep; 273(5281): 1516-7.
- Rizzi M, Caccia S, Guiso G, Richichi C, Gorter JA, Aronica E, et al. Limbic seizures induced P-glycoprotein in rodents brain: functional implications for pharmacoresistance. *Journal Neuroscience*. 2002; 22: 5833-9.
- Rogawsk M, Löscher W. The Neurobiology of antiepileptic drugs. *Nature Neuroscience*. 2004 july; 5: 553-64.
- Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber JL, Cann HM, Kidd KK, Zhivotovsky LA, et al. Genetic structure of human populations. *Science*. 2002; 298: 2381–85.
- Rosse C, L'Hoste S, Offner N, Picard A, Camonis J: RLIP, an effector of the Ral GTPases, is a platform for Cdk1 to phosphorylate epsin during the switch off of endocytosis in mitosis. *J Biol Chem* 2003, 278:30597-30604.
- Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 2001; 409: 928-33.
- Saito S, Iida A, Sekine A, Miura Y, Ogawa C, Kawauchi S, et al. Identification of 779 genetic variations in eight genes encoding members of the ATP-binding cassette, subfamily C (ABCC/MRP/CFTR). *J Hum Genet*. 2002; 47: 147-71.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (Eds). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989, pp. E3-E4.
- Sánchez MB, Herranz JL, Leno C, Arteaga R, Oterino A, Valdizán EM, Nicolás JM, Aín J, Armijo JÁ. Genetic Factors associated with drug-resistance of epilepsy: relevance of stratification by patient age and aetiology of epilepsy. *Seizure*. 2010; 19: 93-101.
- Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C, Ambudkar SV, Gottesman MM. Silent Polymorphisms Speak: How They Affect Pharmacogenomics and the Treatment of Cancer. *Cancer Research*. 2007; 67(20): 9609-12.
- Schauf CL. Zonisamide enhances slow sodium inactivation in *Myxicola*. *Brain Research*. 1987 ; 413 : 185–8
- Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2003; 55: 3–29.
- Schmidt D, Löscher W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiology and clinical mechanisms. *Epilepsia*. 2005; 46(6): 858-77.
- Schmutz M, Brugger F, Gentsch C, McLean MJ, Olpe HR. Oxcarbazepine: preclinical anticonvulsant profile and putative mechanisms of action. *Epilepsia*. 1994; 35(5): 47–50.

- Schrodi SJ, Garcia VE, Rowland C, Jones HB. Pairwise linkage disequilibrium under disease models. *European Journal of Human Genetics*. 2007; 15: 212-20.
- Schwarzs UI. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C9 gene. *Eur J. Clin Invest*. 2003; 2: 23-30.
- Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science*. 2007 Jun; 316(5829): 1341-5.
- Seo T, Ishitsu T, Ueda N, Nakada N, Yurybe K, Ueda K, Nakagawa K. ABCB1 polymorphisms influence the response to antiepileptic drugs in Japanese epilepsy patients. *Pharmacogenomics*. 2006; 7(4): 551-61.
- Shahwan A, Murphy K, Doherty C, Cavalleri GL, Muckian C, Dicker P, et al. The controversial association of ABCB1 polymorphisms in refractory epilepsy: an analysis of multiple SNPs in an Irish population. *Epilepsy Res*. 2007 Feb; 73(2): 192-8.
- Sharma R, Singhal SS, Cheng J, Yang Y, Sharma A, Zimniak P, et al. RLIP76 is the major ATP-dependent transporter of glutathione-conjugates and doxorubicin in human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys*. 2001; 391: 171-9.
- Sharom FJ, Lugo MR, Eckford PD. New Insights into the drug binding, transport and lipid flippase activities of the P-glycoprotein multidrug transporter. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2005; 37: 481-487.
- Shields PG. Pharmacogenetics: detecting sensitive populations. *Environ Health Perspect*. 1994; 102 (11): 81-7.
- Shintani M, Ieiri I, Inoue K, Mamiya K, Ninomiya H, Tashiro N, et al. Genetic polymorphisms and functional characterization of the 5'-flanking region of the human CYP2C9 gene: in vitro and in vivo studies. *B Clin Pharmacol Ther*. 2001 Aug; 70(2): 175-82.
- Shmulewitz D, Zhang J, Greenberg DA. Case-Control Association Studies in Mixed Populations: Correcting Using Genomic Control. *Hum Hered*. 2004; 58: 145-153.
- Siddiqui A, Kerb R, Weale ME, Brinkmann U, Smith A, Goldstein DB, et al. Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1. *N Engl J Med*. 2003; 348: 1442-8.
- Sills GJ, Kwan P, Buttler E, de Lange EC, van den Berg DJ, Brodie MJ. P-glycoprotein-mediated efflux of antiepileptic drugs: preliminary studies in mdrla knockout mice. *Epilepsy Behav*. 2002; 3: 427-32.
- 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: 261-4.

- Sisodiya SM. Mechanisms of antiepileptic drug resistance. *Curr Opin Neurol.* 2003; 16: 197-201.
- Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature.* 2007 Feb; 445(7130): 881-5.
- Soga Y, Nishimura F, Ohtsuka Y, Araki H, Iwamoto Y, Naruishi H, et al. CYP2C polymorphisms, phenytoin metabolism and gingival overgrowth in epileptic subjects. *A Life Sci.* 2004 Jan; 74(7): 827-34.
- 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; 14:1333-44.
- Soranzo N, Goldstein DB, Sisodiya SM. The role of common variation in drug transporter genes in refractory epilepsy. *Expert Opin Pharmacother.* 2005; 6: 1305-12.
- Soranzo N, Libusha K, Martinian, L, Burley M, Thom M, Sali A, et al. Lack of support for a role for RLPI76 (RALBP1) in response to treatment or predisposition to epilepsy. *Epilepsia.* 2007; 48(4): 674-83.
- Standart M, Jackson RJ. MicroRNAs repress translation of m7Gppp-capped target mRNAs in vitro by inhibiting initiation and promoting deadenylation. *Genes Dev.* 2007; 21(16): 1975-82.
- Stephens JC, Schneider JA, Tanguay DA, Choi J, Acharya T, Stanley SE, et al. Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science.* 2001 Jul; 293(5529): 489-93.
- Stranger BE, Forrest MS, Clark AG, Minichiello MJ, Deutsch S, Lyle R, et al. Genome-wide associations of gene expression variation in humans. *PLoS Genet.* 2005 Dec; 1(6): e-78.
- Sutula T.P. Experimental models of temporal lobe epilepsy: new insights from the study of kindling and synaptic reorganization. *Epilepsia.* 1990; 31: 45-54.
- Suzuki H, Sugiyama Y. Single Nucleotide Polymorphisms in multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2): its impact on drug disposition. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54: 1311-31.
- Sved JA. Linkage disequilibrium and homozygosity of chromosome segments in finite populations. *Theor. Popul. Biol.* 1971 Jun; 2(2): 125-41.
- Tagliatela M, Ongini E, Brown AM, Di Renzo G, Annunziato L. Felbamate inhibits cloned voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels from human and rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 1996; 316: 373-7.
- 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; 63:1090-92.

- Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y., et al. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *Journal Pharm Exper Ther.* 2001; 297: 1137-43.
- Tate SK, Depondt C, Sisodiya SM, Cavalleri GL, Schorge S, Soranzo N, 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 Apr; 102(15): 5507-12.
- Tate SK, Singh R, Hung CC, Tai JJ, Depondt C, Cavalleri GL, et al. A common polymorphism in the SCN1A gene associates with phenytoin serum levels at maintenance dose. *Pharmacogenet Genomics.* 2006 Oct; 16(10): 721-6.
- Taverna S, Mantegazza M, Franceschetti S, Avanzini G. Valproate selectively reduces the persistent fraction of Na<sup>+</sup> current in neocortical neurons. *Epilepsy Res.* 1998; 32: 304–8.
- Taverna S, Sancini G, Mantegazza M, Franceschetti S, Avanzini G. Inhibition of transient and persistent Na<sup>+</sup> current fractions by the new anticonvulsant topiramate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999; 288: 960–8.
- The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature.* 2005; 437(27): 1299-320.
- Tian C, Hinds DA, Shigeta R, Kittles R, Ballinger DG, Seldin MF. A genomewide single-nucleotide-polymorphism panel with high ancestry information for African American admixture mapping. *Am J Hum Genet.* 2006 Oct; 79(4): 640-9.
- Traub RD, Llinas R. Hippocampal pyramidal cells: significance of dendritic ionic conductances for neuronal function and epileptogenesis. *Journal of Neurophysiology.* 1979; 42: 476-96.
- Ufer M, Mosyagin I, Muhle H, Jacobsen T, Haenisch S, Häsler R, et al. Non-response to antiepileptic pharmacotherapy is associated with the ABCB2 – 24C > T polymorphism in young and adult patients with epilepsy. *Pharmacogenetics and Genomics.* 2009; 19(5): 353-62.
- Vahab SA, Sen S, Ravindran N, Mony S, Mathew A, Vuayan N, et al. Analysis of Genotype and Haplotype Effects of ABCB1 (MDR1) Polymorphisms in the Risk of Medically Refractory Epilepsy in an Indian Population. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2009; 24(3): 255–260.
- Vallada HPJ, Barbosa NR. Farmacogenética: implicações no tratamento com drogas antiepilépticas e interações medicamentosas. Yacubian EMT. In: *Tratamento Medicamentoso das Epilepsias.* 2ª edição, São Paulo: Ed. Lemos, 2004.
- Van den Berg R J, Kok P, Voskuyl RA. Valproate and sodium currents in cultured hippocampal neurons. *Exp. Brain. Res.* 1993; 93: 279-287.
- Van Paesschen W, Sisodiya S, Connelly A, Duncan JS, Free SL, Raymond AA, et al. Quantitative hippocampal MR1 and intractable temporal lobe epilepsy. *Neurology.* 1995; 45: 2233-40.



Van Vliet EA, Redeker S, Aronica E, Edelbroek PM, Gorter JA. Expression of multidrug transporters MRP1, MRP2 and BCRP shortly after status epilepticus, during the latent period, and in chronic epileptic rats. *Epilepsia* 2005; 46(10): 1569-80.

Van Vliet EA, Van Schaik R, Edelbroek PM, Redeker S, Aronica E, Wadman WJ, et al. Inhibition of the multidrug transporter P-glycoprotein improves seizures control in phenytoin-treated chronic epileptic rats. *Epilepsia*. 2006; 47: 672-80.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001 Feb; 291(5507): 1304-51.

Wada M. Single Nucleotide polymorphisms in ABCC2 and ABCB1 genes and their clinical impact in physiology and drug response. *Cancer Letters*. 2006; 234: 40-50.

Wallace RH. Mutations in GABA-receptor genes cause human epilepsy. *The Lancet Neurology*. 2002; 1(4): 212.

Wang D, Sadée W. Searching for Polymorphisms That Affect Gene Expression and mRNA Processing: Example ABCB1 (MDR1). *AAPS Journal*. 2006; 8(3): 515-20.

Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping polymorphisms in the human genome. *Science*, 1998 May; 280(5366): 1077-82.

Warren MS, Zerangue N, Woodford K, Roberts LM, Tate EH, Feng B, et al. Feuerstein TJ, Gibbs J, Smith B, Morais SN, Dower WD, Koller KJ. Comparative gene expression profiles of ABC transporters in brain microvessel endothelial cells and brain in five species including human. *Pharmacol Res*. 2009 Jun; 59(6): 404-13.

Weber MJ. New human and mouse microRNA genes found by homology search. *FEBS J*. 2005; 272: 59-73.

Weinberg W. Über den Nachweis der Verebung beim Menschen. *Jahreshefte des Vereins für vaterländische Naturkunde in Württemberg*. 1908; 64: 368-82.

Weiss J, Kerpen CJ, Lindenmaier H, Dormann SM, Haefeli WE. Interaction of antiepileptic drugs with human p-glycoprotein in vitro. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2003; 307: 262-7.

Weiss KM, Clark AG. Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits. *Trends Genet*. 2002; 18: 19-24.

Wright, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regards to systems of mating. *Evolution*, v.19, p.395-420, 1965.

[www.allsnps.com](http://www.allsnps.com)

[www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com).

[www.imm.ki.se/CYPalleles](http://www.imm.ki.se/CYPalleles)

[www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/codonbycds.cgi](http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/codonbycds.cgi)).

[www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/snps.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/snps.html)

[www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/)

[www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP)

[www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/GeneGt.cgi?geneID=5243](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/GeneGt.cgi?geneID=5243)

Xie X, Dale TJ, John VH, Cater HL, Peakman TC, Clare JJ. Electrophysiological and pharmacological properties of the human brain type IIA Na<sup>+</sup> channel expressed in a stable mammalian cell line. *Pflugers Arch.* 2001; 441: 425–33.

Yaari Y, Konnerth A, Heinemann U. Spontaneous epileptiform activity of CA1 hippocampal neurons in low extracellular calcium solutions. *Experimental Brain Research.* 1983; 51: 153-56.

Zimprich F, Sunder-Plassmann R, Stogmann E, Gleiss A, Dal-Bianco A, et al. Association of the ABCB1 gene haplotype with pharmacoresistence in temporal lobe epilepsy.

*Neurology.* 2004; 63: 1087-89.

ANEXOS

**Questionário para coleta de dados de pacientes com ELTM**



Universidade Estadual de Campinas  
Departamento de Neurologia

**Questionário:**

NOME: \_\_\_\_\_ NASCIMENTO: \_\_/\_\_/\_\_

IDADE: \_\_\_\_ anos SEXO: M  F

ENDEREÇO: \_\_\_\_\_ BAIRRO: \_\_\_\_\_

CIDADE: \_\_\_\_\_ TELEFONE: (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_

IDADE DE INÍCIO DAS CRISES: \_\_\_\_ anos

OCORRÊNCIA DE CRISES FEBRIS NA INFÂNCIA: sim  não

FREQUÊNCIA DA CRISE ATUAL: \_\_\_\_\_

FREQUÊNCIA DE CRISES INICIAIS: \_\_\_\_\_

PADRÃO EVOLUTIVO: \_\_\_\_\_

EXAME NEUROLÓGICO: \_\_\_\_\_

EEG: \_\_\_\_\_ RM: \_\_\_\_\_

INSULTO PRECIPITANTE INICIAL: \_\_\_\_\_

MEDICAÇÃO EM USO (DAEs): \_\_\_\_\_

DOSE DIÁRIA: \_\_\_\_\_ POSOLOGIA: \_\_\_\_\_

OUTRAS MEDICAÇÕES: \_\_\_\_\_

DOSE DIÁRIA: \_\_\_\_\_

ADERÊNCIA: \_\_\_\_\_

MEDICAÇÃO PRÉVIA (DAEs): \_\_\_\_\_

HISTÓRIA FAMILIAR : \_\_\_\_\_

**Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) utilizado para coleta  
de sangue de pacientes**



Universidade Estadual de Campinas

Departamento de Genética Médica

## FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA

**Título do Projeto:** Avaliação do impacto de polimorfismos em genes do Citocromo P450 na resposta ao tratamento medicamentoso em pacientes com epilepsia de lobo temporal mesial.

**Investigador Principal:** Mariana Saragiotto da Silva

### OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa envolvendo pacientes com o meu tipo de epilepsia. O objetivo geral desse estudo é tentar descobrir se há diferenças nos genes responsáveis pela metabolização de drogas, isto é, pelo modo de como nosso organismo reage à medicação. O estudo será realizado em dois grupos de pacientes: grupo A) pacientes que possuem um bom controle das crises com a medicação; e grupo B) pacientes que não conseguem um bom controle das crises apenas com a medicação. O estudo desses genes é de grande importância, pois pode trazer conhecimentos que ajudem em um tratamento mais eficaz da doença.

### PROCEDIMENTO

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, o pesquisador fará algumas perguntas sobre meu tratamento e como são as minhas crises. Uma amostra de 20 a 30ml de sangue venoso será colhida para o estudo dos genes. Todo o procedimento deve durar aproximadamente 30 minutos em um único encontro.

### RISCO E DESCONFORTO

Devido à coleta de sangue existe a possibilidade de ocorrer dor e manchas roxas no local da coleta. Mas o desconforto será mínimo, pois essa coleta será feita na veia do braço do paciente por profissional devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

---

Faculdade de Ciências Médicas – Cidade Universitária “Zeferino Vaz” – Distrito de Barão Geraldo –  
Campinas – SP – Brasil – CEP 13081-970 – Fone: (19) 3788-8907 – FAX: (19) 3788-8909

## **VANTAGENS**

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

## **SIGILO**

Toda a informação clínica e o resultado dos testes genéticos serão utilizados somente para este estudo. O material genético, isolado do meu sangue, não será armazenado, mas sim será mantido congelado, sem a minha identificação, enquanto durar o estudo, por um período máximo de 5 anos e após, será destruído. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizadas para publicação científica, meu nome não será utilizado.

## **FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL**

Eu entendo que posso pedir informações e esclarecer minhas dúvidas quanto ao estudo a qualquer momento. A pesquisadora Mariana Saragiotto da Silva, tel (19)3521-8956/ (19)3521-8902 estará disponível para responder minhas questões. Em caso de dúvidas ou reclamações relacionadas aos aspectos éticos devo procurar a secretaria da Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, tel (19)3521-7232.

## **RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO**

Eu entendo que a minha participação é voluntária, ou seja, não sou obrigado a aceitar o convite para participar. Posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper minha participação no estudo, incluindo a retirada do material genético a qualquer momento sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC-Unicamp.



Eu confirmo que a aluna **Mariana Saragiotto da Silva** me explicou o objetivo desse estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos, desconforto e possíveis vantagens desse projeto de pesquisa. Esse formulário me foi explicado e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

_____ Nome do participante ou responsável	_____ data
_____ Assinatura do participante ou responsável	
_____ Nome da testemunha	_____ data
_____ Assinatura da testemunha	

#### **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	_____ data
_____ Assinatura do pesquisador ou associado	_____ data

---

Faculdade de Ciências Médicas – Cidade Universitária “Zeferino Vaz” – Distrito de Barão Geraldo –  
Campinas – SP – Brasil – CEP 13081-970 – Fone: (19) 3788-8907 – FAX: (19) 3788-8909

**Parecer de aprovação do Comitê de Ética da FCM para estudos de  
farmacogenética em pacientes com ELTM**



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0\_19) 3788-8936

FAX (0\_19) 3788-8925

🌐 [www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

✉ [cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

CEP, 04/01/06 .  
(Grupo I)

**PARECER PROJETO: N° 510/2005**

**CAAE: 0245.0.146.000-05**

## **I-IDENTIFICAÇÃO:**

**PROJETO: “AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE POLIMORFISMO EM GENES DO CITOCROMO P450 NA RESPOSTA AO TRATAMENTO MEDICAMENTOSO EM PACIENTES COM EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL MESIAL”**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Mariana Saragiotto da Silva

**INSTITUIÇÃO:** Departamento de Genética Médica/ FCM/UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 12/09/2005

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 25/10/06

## **II - OBJETIVOS**

Genotipar 110 polimorfismos, pequenas inserções e deleções em nove genes codificadores do citocromo p450 e por metodologia de análise de associação verificar a importância dos mesmos na resposta ao tratamento medicamento da ELTM.

## **III - SUMÁRIO**

Serão incluídos 100 pacientes portadores de ETLM, previamente diagnosticados (classificação ILAE 1989) sendo 50 que responderam ao tratamento com drogas antiepiléticas e 50 refratários. Serão coletadas amostras de sangue para extração do DNA, genotipagem, amplificação do DNA alvo, purificação, fragmentação, marcação e detecção e captação dos arrays. Análise estatística adequadamente descrita.

## **IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES**

Trata-se de um projeto relacionado a dissertação de mestrado. A metodologia é apropriada, com critérios de inclusão e exclusão bem definidos. Apresenta cronograma e orçamento. A pesquisadora atendeu de forma adequada as questões levantadas pelos assessores e tanto o projeto quanto o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido estão dentro das normas estabelecidas pela CONEP/MS.

## 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 X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 25 de outubro de 2005.

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

**Tabela contendo informações sobre os SNPs genotipados no presente trabalho**

Chr	GENE	dbSNP (ID)	ALELO S	ALELO ANCESTRAL	CONTIG (NT)	POSICÃO	CONTIG (NM)	POSICÃO	CONTIG (NP)	POSICÃO	EXON	FUNÇÃO	FUNCTION	HGVs name (NM)	
2	CYP18A1	rs162549	A/T	A	NT_022184.15	17117343	NM_000104.3	4444	---	---	exon 3	---	3' UTR	*2409A>T	
		rs9341263	A/G	A	NT_022184.15	17118212	NM_000104.3	3575	---	---	exon 3	---	3' UTR	*1540A>G	
		rs2855658	A/G	A	NT_022184.15	17118777	NM_000104.3	3010	---	---	exon 3	---	3' UTR	*975A>G	
		rs162562	A/C	A	NT_022184.15	17119402	NM_000104.3	2385	---	---	exon 3	---	3' UTR	*350C>A	
		rs1800440	A/G	A	NT_022184.15	17120026	NM_000104.3	1761	NP_000095.2	453	exon 3	AAC => AGC	N [Asn] => S [Ser]	1358A>G	
		rs1056836	C/G	G	NT_022184.15	17120090	NM_000104.3	1697	NP_000095.2	432	exon 3	CTG => GTG	L [Leu] => V [Val]	1294C>G	
		rs162561	A/C	C	NT_022184.15	17120764	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	1044-424A>C
		rs9341249	C/G	---	NT_022184.15	17123690	NM_000104.3	1132	NP_000095.2	243	exon 2	GTG => GTC	V [Val] => V [Val]	729G>C	
		rs2551188	C/T	T	NT_022184.15	17124681	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	-2+129G>A
		rs9341244	C/T	T	NT_022184.15	17124982	NM_000104.3	229	---	---	---	exon 1	---	5' UTR	-175C>T
		rs2235048	C/T	T	NT_007933.15	25171354	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	3489+80C>T
		rs1045642	C/T	---	NT_007933.15	25171488	NM_000927.3	3853	NP_000918.2	1145	exon 27	ATT => ATC	I [Ile] => I [Ile]	3435T>C	
		rs2032582	T/G	---	NT_007933.15	25193461	NM_000927.3	3095	NP_000918.2	893	exon 22	TCT => GCT	S [Ser] => A [Ala]	2677T>G	
		rs2235039	A/G	G	NT_007933.15	25198697	NM_000927.3	2819	NP_000918.2	801	exon 21	GTG => ATG	V [Val] => M [Met]	2401G>A	
rs1128503	T/C	C	NT_007933.15	25212444	NM_000927.3	1654	NP_000918.2	412	exon 13	GGT => GGC	G [Gly] => G [Gly]	-3401A>A			
rs2032586	A/G	G	NT_007933.15	25212459	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	1225-4G>A		
rs2229109	G/A	G	NT_007933.15	25212652	NM_000927.3	1617	NP_000918.2	400	exon 12	AGT => AAT	S [Ser] => N [Asn]	1199G>A			
rs9282564	A/G	A	NT_007933.15	25262283	NM_000927.3	479	NP_000918.2	21	exon 3	AAT => GAT	N [Asn] => D [Asp]	61A>G			
rs3213619	C/T	C	NT_007933.15	25263036	NM_000927.3	290	---	---	---	exon 2	---	5' UTR	-129T>C		
7	CYP3A4	rs12333983	A/T	A	NT_007933.15	37386957	NM_017460.3	---	---	---	---	---	nearGene-3	---	
		rs6956344	C/T	C	NT_007933.15	37391994	---	---	---	---	---	---	noncoding	1253+513G>A	
		rs4646437	C/T	T	NT_007933.15	37397926	---	---	---	---	---	---	noncoding	671-202C>T	
		rs28988579	G/T	T	NT_007933.15	37401542	---	---	---	---	---	---	noncoding	319-841T>G	
		rs2687111	C/T	T	NT_007933.15	37402437	---	---	---	---	---	---	noncoding	318+619T>C	
		rs2405184	A/G	A	NT_007933.15	37411607	---	---	---	---	---	---	noncoding	72-1056T>C	
		rs12114000	A/G	G	NT_007933.15	37415804	NM_017460.3	---	---	---	---	---	---	nearGene-5	---
		rs2404955	A/G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	---
		rs28365083	A/C	C	NT_007933.15	37283079	NM_000777.2	1280	NP_000768.1	398	exon 11	ACT => AAT	T [Thr] => N [Asn]	1193C>A	
		rs28365087	A/G	G	NT_007933.15	37291203	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	866-78G>A
		rs10264272	C/T	T	NT_007933.15	37295678	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	624G>A
		rs776746	A/G	A	NT_007933.15	37303382	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	219-237G>A
		rs28365067	C/T	C	NT_007933.15	37305153	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	166-102C>T
		rs28371764	G/T	C	NT_007933.15	37310436	NM_000777.2	14	---	---	---	---	exon 1	UTR-5	-74C>T
rs4646457	G/T	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
10	CYP2C19	rs11568732	G/T	T	NT_030059.13	47326038	NM_000769.1	---	---	---	---	---	nearGene-5	---	
		rs12773342	C/T	---	NT_030059.13	47327547	---	---	---	---	---	---	noncoding	168+453T>C	
		rs12768009	A/G	G	NT_030059.13	47330329	---	---	---	---	---	---	noncoding	168+3235G>A	
		rs7916649	A/G	A	NT_030059.13	47339048	---	---	---	---	---	---	noncoding	169-231G>A	
		rs12778026	A/T	T	NT_030059.13	47340691	---	---	---	---	---	---	noncoding	481+931T>A	
rs4986893	A/G	---	NT_030059.13	47344874	NM_000769.1	636	NP_000760.1	212	exon 4	TGG => TGA	W [Trp] => X [OPA]	636G>A			
rs4304697	A/G	G	NT_030059.13	47345353	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	642+473G>A		
rs12571421	A/G	A	NT_030059.13	47346446	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	819+228A>G		
rs2104161	G/T	T	NT_030059.13	47369036	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	820-15681G>T		
rs1322179	A/G	G	NT_030059.13	47379706	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	820-5011C>T		
rs4417205	C/G	C	NT_030059.13	47384666	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	820-511C>G		
rs12253253	A/C	A	NT_030059.13	47386620	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	961+1762A>C		
rs11188092	A/C	A	NT_030059.13	47402215	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	962-4843A>C		
rs3758580	C/T	---	NT_030059.13	47407086	NM_000769.1	990	NP_000760.1	330	exon 7	GTC => GTT	V [Val] => V [Val]	990C>T			
rs3758581	A/G	A	NT_030059.13	47407087	NM_000769.1	991	---	---	---	exon 7	ATT => GTT	I [Ile] => V [Val]	991A>G		
rs11597626	C/G	C	NT_030059.13	47408737	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	1149+1492C>G		
rs1555474	C/G	C	NT_030059.13	47409791	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	1149+2546G>C		
rs4917623	C/T	T	NT_030059.13	47414032	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	1150-106T>C		
rs4617515	A/G	A	NT_030059.13	47416298	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	1292-656G>A		
rs12268020	C/T	C	NT_030059.13	47416835	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	1292-119C>T		
rs9332104	C/T	---	NT_030059.13	47503154	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	168-83T>C		
rs2253635	A/G	A	NT_030059.13	47505001	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	169-1078C>T		
rs7089580	A/T	A	NT_030059.13	47509687	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	482-2313A>T		
rs4086116	C/T	T	NT_030059.13	47511666	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	482-334C>T		
rs2256871	C/T	T	NT_030059.13	47513438	NM_000771.3	777	NP_000762.2	251	exon 5	CAC => CGC	H [His] => R [Arg]	752A>G			
rs4918766	A/G	A	NT_030059.13	47516348	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	819+2843G>A		
rs2475376	C/T	C	NT_030059.13	47516864	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	819+3359A>G		
rs7897079	A/G	A	NT_030059.13	47524982	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	820-11343A>G		
rs1200313	G/T	T	NT_030059.13	47526523	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	820-9802C>A		
rs2153628	A/G	A	NT_030059.13	47527888	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	820-8437A>G		
rs4917639	A/C	C	NT_030059.13	47529999	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	820-6326A>C		
rs9332168	C/T	C	NT_030059.13	47535756	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	820-569C>T		
rs9332172	A/G	G	NT_030059.13	47536252	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	820-738A>G		
rs9332174	A/G	A	NT_030059.13	47536561	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	961+95A>G		
rs1856908	G/T	G	NT_030059.13	47537195	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	961+729T>G		
rs1934963	C/T	C	NT_030059.13	47539140	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	961+2674T>C		
rs1057910	A/C	A	NT_030059.13	47545517	NM_000771.3	1100	NP_000762.2	359	exon 7	ATT => CTT	I [Ile] => L [Leu]	1075A>C			
rs4918797	C/T	T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	---		
rs1505	C/G	C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	---		
rs1885301	A/G	A	NT_030059.13	52345517	NM_000392.3	---	---	---	---	---	---	nearGene-5	---		
rs1722646	A/G	G	NT_030059.13	52345827	NM_000392.3	---	---	---	---	---	---	nearGene-5	---		
rs717620	A/G	G	NT_030059.13	52347042	NM_000392.3	116	---	---	---	---	exon 1	UTR-5	-24C>T		
rs2756104	C/T	C	NT_030059.13	52348490	---	---	---	---	---	---	---	noncoding	34-339C>T		



**TCLE utilizado para coleta e uso de tecido hipocampal após extração  
cirúrgica**



Título do projeto: Caracterização neuropatológica da epilepsia de lobo temporal mesial familiar

Investigadores principais:

Profa. Cláudia V. Maurer Morelli, Prof. Dr. Luciano de Souza Queiroz, Prof. Dr. Fernando Cendes e Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes

#### OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidado (a) a participar em um projeto de pesquisa envolvendo pacientes e famílias de indivíduos com epilepsia. O objetivo geral do estudo é comparar se a lesão do tecido nervoso cerebral encontrada em pacientes com epilepsia familiar são iguais àquelas encontradas em pacientes com epilepsia na forma esporádica (sem antecedentes familiares). Esse estudo pode eventualmente melhorar o diagnóstico e levar a um melhor tratamento dessa doença. Tanto as amostras de tecido nervoso como a informação médica a meu respeito, bem como a respeito de minha família que forem obtidas para esse estudo, poderão ser compartilhadas com outros pesquisadores que trabalham com epilepsia. O sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos 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. O meu consentimento se refere ao uso do material que será retirado durante a cirurgia para a realização de estudos científicos. É importante lembrar que a cirurgia mencionada acima, faz parte do tratamento médico. A pesquisa laboratorial utilizando as amostras de tecido poderá ser feita durante um período máximo de 30 anos após a coleta. Após o término desta pesquisa com prazo de duração de cerca de 4 anos, pretende-se armazenar este material durante no máximo 30 anos caso haja a necessidade de se dar continuidade a pesquisas complementares. Neste caso será feito novo protocolo para submissão à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa local e se necessário ao Conselho Nacional de Ética em Saúde (CONEP).

#### RISCO E DESCONFORTO:

Não há quaisquer riscos ou prejuízos adicionais para os sujeitos da pesquisa, já que o material utilizado para a pesquisa (pequena amostra de tecido nervoso) será obtido de pacientes submetidos à retirada cirúrgica do tecido lesado, como forma de tratamento.

Título do projeto: Caracterização neuropatológica da epilepsia de lobo temporal mesial familiar

Investigadores principais:

Profa. Cláudia V. Maurer Morelli, Prof. Dr. Luciano de Souza Queiroz, Prof. Dr. Fernando Cendes e Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes

VANTAGENS:

Eu entendo que não terei nenhuma vantagem pessoal com a participação neste estudo e que o diagnóstico e o tratamento de possíveis familiares com a epilepsia familiar ou esporádica não serão modificados. Contudo, os resultados desse estudo podem, em longo prazo, oferecer vantagens para os indivíduos com epilepsia e suas famílias, possibilitando um melhor diagnóstico e um tratamento mais adequado. Caso, no futuro, pesquisas com o material venham a trazer resultados com algum tipo de benefício aos familiares envolvidos, estes serão prontamente informados.

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados dos estudos decorrentes desse projeto de pesquisa, serão submetidos aos regulamentos do HC-UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica, o que garante que os dados pessoais dos participantes não serão de livre acesso.

Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será revelado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Eu entendo que posso requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. A Dra. Iscia Lopes Cendes, tel (019) 3788-8907 estará disponível para responder minhas questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contactar a secretaria da comissão de ética da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (019) 3788-7232.

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 sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC- UNICAMP. Eu reconheço também que a Dra. Iscia Lopes Cendes pode interromper a minha participação nesse estudo a qualquer momento que julgarem apropriado.

Título do projeto: Caracterização neuropatológica da epilepsia de lobo temporal mesial familiar

Investigadores principais:

Profa. Cláudia V. Maurer Morelli, Prof. Dr. Luciano de Souza Queiroz, Prof. Dr. Fernando Cendes e Profa. 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 advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como 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

**Parecer de aprovação do Comitê de Ética da FCM para uso de tecido humano proveniente de autópsia**



CEP, 14/12/04  
(PARECER PROJETO 470/2003)

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP  
☎ (0\_19) 3788-8936  
FAX (0\_19) 3788-8925  
🌐 [www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)  
✉ [cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

## PARECER

### I-IDENTIFICAÇÃO

PROJETO: "CARACTERIZAÇÃO NEUROPATOLÓGICA DA EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL MESIAL FAMILIAR"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Cláudia Vianna Maurer Morelli

### II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou Adendo que inclui a análise de expressão gênica em larga escala, referente ao 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.

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

Página 1 de 1