

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Influência de polimorfismos dos genes do transportador da serotonina e do receptor 5HT1A na epilepsia do lobo temporal

Laila Cigana Schenkel

Orientador: Marino Muxfelt Bianchin

Co-orientadora: Sandra Leistner-Segal

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, Janeiro de 2011

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Influência de polimorfismos dos genes do transportador da serotonina e do receptor 5HT1A na epilepsia do lobo temporal

Laila Cigana Schenkel

Orientador: Marino Muxfelt Bianchin

Co-orientadora: Sandra Leistner-Segal

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, Janeiro de 2011

S324i Schenkel, Laila Cigana

Influência de polimorfismos dos genes do transportador da serotonina e do receptor 5HT1A na epilepsia do lobo temporal / Laila Cigana Schenkel ; orient. Marino Muxfelt Bianchin ; co-orient. Sandra Leistner-Segal. – 2011.

101 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Epilepsia do lobo temporal 2. Polimorfismo genético 3. Receptor 5-HT1A de serotonina 4. Proteínas da membrana plasmática de transporte de serotonina I. Bianchin, Marino Muxfelt II. Leistner-Sega, Sandra III. Título.

NLM: WL 385

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

“No mistério do sem-fim equilibra-se um planeta. E no planeta um jardim e no jardim um canteiro no canteiro uma Violeta e sobre ela o dia inteiro entre o planeta e o sem-fim a asa de uma borboleta.”

Cecília Meireles

Agradecimentos

“Em tempos em que quase ninguém se olha nos olhos, em que a maioria das pessoas pouco se interessa pelo que não lhe diz respeito, só mesmo agradecendo àqueles que percebem nossas descrenças, indecisões, suspeitas, tudo o que nos paralisa, e gastam um pouco da sua energia conosco, insistindo.” Martha Medeiros

Agradeço aos meus orientadores, Prof. Dr^a. Sandra Leistner-Segal e Prof. Dr. Marino Muxfelt Bianchin, pela oportunidade de realização deste estudo, e também pelos ensinamentos, dedicação e confiança.

Aos colegas de laboratório, agradeço pela ajuda, conselhos e, principalmente, pela amizade. Em especial aos amigos Ana Carolina, Fabiana, Fernanda, Rafael e Thais.

À minha família - Roberto, Rosângela, Alice e Júlia - pelo apoio, segurança e amor de sempre.

Enfim, dedico esta página a todos que estiveram, ao menos um dia, ao meu lado, insistindo.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas	7
Lista de Figuras	9
Resumo.....	10
Abstract.....	12
Introdução	14
Epilepsia – considerações gerais	15
Epilepsia do lobo temporal	17
Transtornos psiquiátricos nas epilepsias	18
Bases moleculares das epilepsias.....	21
Neurotransmissor serotonina	24
Transportador da serotonina	28
Receptores da serotonina	35
Objetivos.....	41
Referências	42
Artigo 1.....	52
Artigo 2.....	71
Considerações Finais.....	93
Apêndice 1	95
Anexo 1.....	97
Anexo 2.....	100

Lista de Abreviaturas e Siglas

5-HT: 5-hidroxitriptamina ou serotonina

5-HT1A: receptor da serotonina 1 A

5-HTP: 5-hidroxitriptofano

5-HTT: transportador da serotonina

5HTTLPR: 5HTT gene linked polymorphic region

5HTTVNTR: VNTR no intron 2 do gene 5-HTT ou STin2

ARMS: “Amplification Refractory Mutation System”

COMT: catecol orto-metiltransferase

Deaf-1: “Deformed Epidermal Autoregulatory Factor 1”, fator de transcrição

DNA: Ácido Desoxiribonucléico

DSM-IV: Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais

ELT: Epilepsia do Lobo Temporal

EMT: Esclerose Mesial Temporal

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Hes5: “Hairy and enhancer of split 5”, fator de transcrição

ILAE: “International League against Epilepsy”

IRS: Inibidor da Recaptação da Serotonina

MAO: Monoaminoxidase

Pb: Pares de base

PCR: “Polimerase Chain Reaction”

PET: "Positron Emission Tomography"

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

SNC: Sistema Nervoso Central

SNP: "Single Nucleotide Polymorphism"

TPH: Triptofano hidroxilase

VNTR: "Variable Number of Tandem Repeats"

WHO: "World Health Organization"

Lista de Figuras

Figura 1: Sinapse neuronal serotoninérgica	Página 25
Figura 2: Mecanismo de ação do transportador da serotonina	Página 30
Figura 3: Gene <i>5-HTT</i> e polimorfismos 5-HTTLPR e 5-HTTVNTR	Página 31
Figura 4: Receptores 5-HTR	Página 37
Figura 5: Gene 5-HT1A e polimorfismo C-1019G	Página 39

Resumo

A epilepsia é a segunda causa mais freqüente de doenças neurológicas em adultos. A maioria dos pacientes epiléticos apresenta epilepsia do lobo temporal (ELT), cuja zona epileptogênica está localizada no lobo temporal. Altas taxas de psicopatologias são observadas em pacientes com epilepsia, principalmente ELT, quando comparados com a população geral. Uma vez que o neurotransmissor serotonina (5-HT) contribui com o neurodesenvolvimento, funcionalidade e plasticidade do cérebro adulto, alterações na neurotransmissão serotoninérgica poderiam contribuir para a etiologia da epilepsia. Além disso, a disfunção na atividade serotoninérgica no cérebro poderia aumentar a susceptibilidade a psicopatologias nos pacientes com epilepsia. Nesta linha, estudos de PET demonstraram uma diminuição no potencial de ligação dos receptores de serotonina (5-HT_{1A}) em pacientes com epilepsia do lobo temporal, sendo que esta diminuição parece ser mais proeminente em pacientes epiléticos com depressão. Assim, genes relacionados com a neurotransmissão serotoninérgica são importantes candidatos para estudos de associação com a epilepsia. No presente trabalho, nós avaliamos o impacto de polimorfismos no gene do transportador da serotonina (5-HTT) e no gene do receptor 5-HT_{1A} na ELT e em suas comorbidades psiquiátricas. O gene do transportador da serotonina apresenta dois polimorfismos com consequências funcionais na sua expressão: uma inserção/deleção de 44 pares de base na região flanqueadora 5' (5-HTTLPR), e um número variável de repetições em tandem (VNTR) no intron 2 (5-HTTVNTR). O gene codificador do receptor 5-HT_{1A} contém um polimorfismo de troca única de base (SNP) na região promotora (C-1019G)

que altera a expressão gênica. Foram incluídos neste estudo 175 pacientes com ELT, dos quais 155 tinham avaliação neuropsiquiátrica, e 155 controles saudáveis. Primeiramente foi avaliado o impacto dos polimorfismos 5HTTLPR, 5HTTVNTR e C-1019G na epilepsia do lobo temporal. Analisando os genótipos do 5-HTTVNTR e 5-HTTLPR combinados pela atividade transcricional, os genótipos de baixa expressão gênica foram mais freqüentes nos pacientes com ELT que nos controles saudáveis (O.R.=3.24; 95% I.C.=1.08 a 9.73; $p=0.036$). Esta associação com genótipos de baixa atividade transcricional do 5-HTT poderia estar relacionada com alterações funcionais do sistema serotoninérgico, aumentando o risco para epilepsia. Entretanto, não foi encontrada associação entre o polimorfismo C-1019G e a ELT. Na segunda parte deste trabalho, nós avaliamos a influência destes polimorfismos nas comorbidades de doenças psiquiátricas, entre elas transtorno de humor e ansiedade, em pacientes com ELT. Não foi encontrada diferença significativa na frequência dos polimorfismos no gene do transportador da serotonina (5-HTT) entre pacientes com ou sem comorbidade psiquiátrica. Entretanto o polimorfismo C-1019G foi associado com transtorno de ansiedade nos pacientes com ELT. Baseado em nossos resultados, sugerimos que alterações em genes relacionados à serotonina, como 5-HTT e 5-HT1A, poderiam estar envolvidas na gênese da ELT e nas características clínicas desta doença. Além disso, nós acreditamos que estudos futuros realizados com essa metodologia serão importantes para o estabelecimento das bases genéticas envolvidas nas manifestações neuropsiquiátricas da epilepsia do lobo temporal.

Abstract

Epilepsy is the second most frequent cause of neurological disorders in young adults. The majority of the patients suffer from temporal lobe epilepsy (TLE). Higher rates of psychopathology are observed in patients with epilepsy, especially in those with TLE. Since neurotransmitter serotonin (5-HT) contributes to neurodevelopment, functionality and plasticity of the adult brain, serotonin may contribute to the etiology of epilepsy. Moreover, the impairment of serotonergic activity in the brain may enhance susceptibility to psychopathologies in patients with epilepsy. In this line, PET studies showed a decreased serotonin receptor 1A binding in TLE patients, and this alteration seems to be higher in epileptic patients with depression. In this study we evaluated the impact of serotonin transporter (5-HTT) gene and serotonin receptor 1A (5-HT1A) polymorphisms over TLE and its psychiatric comorbidities. The 5-HTT gene has two polymorphisms with functional consequences: a 44 base pairs insertion/deletion polymorphism in the 5' flanking region of this gene (5-HTTLPR), and a variable number of tandem repeats in the intron 2 (5-HTTVNTR). The gene encoding serotonin receptor 1A contains a single nucleotide polymorphism (SNP) in the promoter region (C-1019G) that regulates gene expression. In this study, were included 165 TLE patients, 155 of these had been evaluated for neuropsychiatric disease, and 110 health controls. We first evaluated the impact of 5HTTLPR, 5HTTVNTR and C-1019G in temporal lobe epilepsy. When 5-HTTVNTR and 5-HTTLPR genotypes were combined by transcriptional efficiency, the low expressing genotypes were more frequent in TLE patients than in healthy controls (O.R.=3.24; 95% I.C.=1.08 a 9.73;

$p=0.036$). This could be related to functional alterations and outgrowth inhibition of the serotonin system, and subsequently enhance the risk to epilepsy in adulthood. However we did not find an association between C-1019G and TLE. In the second part of this work we evaluated the influence of these polymorphisms on the risk for psychiatric diseases in these patients, among them mood and anxiety disorder. There were no significant differences between genotypes frequencies of 5-HTT polymorphisms and presence of any psychiatry disease. However, the C-1019G polymorphism was associated with anxiety disorder in TLE patients. Based in our results, we suggest that alteration in serotonin related genes, such as 5-HTT and 5-HT1A, might be involved in the genesis of TLE and in clinical characteristics of this disease. Moreover we believe that further studies involving molecular methodologies will be important to establish the genetic bases involved in the neuropsychiatric manifestations of TLE.

Introdução

A epilepsia é uma doença crônica caracterizada pela recorrência de episódios paroxísticos e espontâneos de disfunção cerebral. As causas da epilepsia envolvem condução iônica anormal e/ou outras alterações na membrana neuronal, ou ainda um desbalanço entre neurotransmissão excitatória e inibitória. A forma mais comum de epilepsia focal é a epilepsia do lobo temporal (ELT). Por envolver centros importantes do sistema límbico, integrador de processos emocionais, a ELT frequentemente apresenta índices elevados de associação com transtornos neuropsiquiátricos.

A neurotransmissão serotoninérgica está envolvida em processos cognitivos e emocionais, participando da etiologia de muitos transtornos psiquiátricos. Recentemente, a serotonina foi associada com a epilepsia, uma vez que regula a excitação neuronal em regiões cerebrais envolvidas com esta doença. Evidências sugerem que alterações na neurotransmissão serotoninérgica estão associadas a circuitos neuronais anormais e hiperexcitabilidade. Assim, a deficiência serotoninérgica poderia contribuir para a predisposição às epilepsias e aos transtornos psiquiátricos.

O conhecimento de fatores genéticos relacionados com a epilepsia é altamente relevante, podendo melhorar o conhecimento desta doença, o entendimento dos mecanismos biológicos e das alterações neuropsiquiátricas associadas. Os genes relacionados ao sistema serotoninérgico são candidatos promissores para estudos de associação com epilepsia e doenças psiquiátricas. Muitos estudos relatam o papel do transportador da serotonina e dos receptores, principalmente o 5-HT_{1A}, no desenvolvimento de crises epilépticas na ELT. A presente pesquisa pretende estudar

uma possível influência de determinados polimorfismos no gene do transportador da serotonina e do receptor 1A na susceptibilidade à ELT ou às alterações neuropsiquiátricas relacionadas a essa forma de epilepsia.

Epilepsia – considerações gerais

O termo epilepsia é derivado do verbo grego *epilambanein*, que significa “ser atacado, dominado ou tomado”. Na antiguidade acreditava-se que a epilepsia era provocada por uma força externa, comumente associada a fenômenos sobrenaturais. Em 400 a.c., Hipócrates inferiu que o cérebro era a sede da mente e que a epilepsia não estava associada ao caráter divino, e sim ao cérebro. Já no século XVII, René Descartes estudou a neurofisiologia e afirmou que a epilepsia originava-se no cérebro (Fuentes *et al.*, 2008). Hoje se sabe que a epilepsia é uma doença crônica, caracterizada por uma disfunção cerebral, que afeta pessoas de todas as idades e níveis sócio-econômicos.

As epilepsias são síndromes caracterizadas pela presença de crises epiléticas recorrentes. A crise epilética é resultante da atividade neuronal excessiva, hipersincrônica e anormal de neurônios localizados predominantemente no córtex cerebral. É geralmente causada pela condução iônica anormal ou outra alteração na membrana neuronal, ou pelo desbalanço entre neurotransmissão excitatória e inibitória. Assim, durante as crises epiléticas, há um aumento excessivo de descargas elétricas produzidas pelos neurônios cerebrais.

Nas manifestações clínicas da epilepsia, podemos observar alterações do nível de consciência, movimentos involuntários anormais, fenômenos sensoriais, alterações autonômicas e distúrbios transitórios do comportamento. Muitos destes pacientes respondem a fármacos anticonvulsivantes, em outros o tratamento medicamentoso não é suficiente, sendo necessárias outras formas não farmacológicas de tratamento.

Segundo a classificação proposta pela ILAE (International League against Epilepsy) em 1989, as epilepsias podem ser classificadas de acordo com a etiologia: epilepsias idiopáticas (quando estão relacionadas à predisposição genética), epilepsias sintomáticas (quando há lesões cerebrais congênitas e adquiridas), e epilepsias criptogênicas (quando parecem ser sintomáticas, mas sua etiologia não foi identificada). As crises epiléticas são também classificadas de acordo com sua manifestação clínica e eletro encefálica em crises parciais ou focais: as que se originam em uma região delimitada em um hemisfério cerebral e podem ser divididas em simples, quando não envolve perda de consciência, ou complexas, quando ocorre perda de consciência; e crises generalizadas: as que se iniciam simultaneamente em ambos os hemisférios cerebrais, em geral ocorre perda de consciência (Engel, 2001 e 2006).

As epilepsias são a segunda causa mais comum de problemas mentais em adultos jovens. A proporção estimada da população com epilepsia ativa é entre 4 a 10 por 1.000 indivíduos. Estudos em países em desenvolvimento sugerem que a prevalência nestes países é de 6 a 10 por mil habitantes. Cerca de 50 milhões de pessoas no mundo sofrem de epilepsia. Nos países desenvolvidos, a incidência anual de novos

casos varia entre 40 a 70 por 100.000 habitantes, porém em países em desenvolvimento as taxas de incidência atingem o dobro, 122 a 190 para cada 100.000 (WHO, 2009). Isso provavelmente se deve ao fato de que a população de países em desenvolvimento é mais jovem, a qualidade de vida pior e os cuidados médicos mais precários. Além disso, nestes países existe uma incidência maior de infecções do sistema nervoso central, como por exemplo, neurocisticercose. No Brasil há poucos dados epidemiológicos. As taxas de prevalência da epilepsia no nosso país variam de 1,19 a 2,03% (Feijó de Melo *et al.*, 2007).

Epilepsia do lobo temporal

A forma mais comum de epilepsia focal é a epilepsia do lobo temporal (ELT). Estima-se que 40% das síndromes epiléticas são ELT, e 60% das crises parciais iniciam-se em lobos temporais (Fuentes *et al.*, 2008). Na ELT a zona epileptogênica está localizada em estruturas corticais (neocórtex temporal) ou subcorticais (hipocampo e amígdala) do lobo temporal. Os avanços recentes nas áreas de neuroimagem, imunohistoquímica e de genética sugerem a existência de subtipos da ELT. Assim, as epilepsias do lobo temporal podem ser subdivididas em:

1) Epilepsia do lobo temporal mesial:

- A) Associada à esclerose mesial temporal (EMT)
- B) Associada a outras lesões estruturais na região mesial temporal
- C) Associada a ambas (EMT e lesão estrutural)

D) Criptogênica (sem evidência de anormalidade estrutural na Ressonância nuclear magnética - RNM)

2) Epilepsia do lobo temporal neocortical:

A) Associada à lesão exclusiva do neocórtex

B) Relacionada à lesão do neocórtex, associada à ELT

C) Criptogênica (sem evidência de anormalidade estrutural na RNM)

A epilepsia do lobo temporal associada à esclerose mesial (EMT) é a tipo mais comum dentro das síndromes de ELT (Engel, 2001). Nesta forma de epilepsia, ocorre uma reorganização neural nos circuitos mesiais do lobo temporal e os pacientes passam a desenvolver crises epiléticas características. Muitos dos pacientes podem desenvolver epilepsia tratável com esquemas terapêuticos disponíveis. Em outros, o tratamento medicamentoso não é suficiente, sendo necessário tratamento cirúrgico.

Transtornos psiquiátricos nas epilepsias

A alta comorbidade de transtornos psiquiátricos e epilepsia pode ser explicada pelo envolvimento de mecanismos patogênicos biológicos comuns destas doenças. Como as epilepsias são distúrbios do Sistema Nervoso Central (SNC), podem envolver sintomas cognitivos e psiquiátricos em concomitância com as crises epiléticas. Pacientes com epilepsia tem risco aumentado para desenvolver transtornos psiquiátricos em comparação com a população geral. Em particular, o aumento de psicopatologias é mais comum na ELT que em outras epilepsias. O problema dos transtornos psiquiátricos na epilepsia está relacionado com a qualidade de vida dos

pacientes, portanto é importante avaliar a presença de comorbidades neuropsiquiátricas e identificar pacientes com risco aumentado para estes transtornos.

Dentre os transtornos neuropsiquiátricos, a depressão é o mais freqüente nos pacientes com epilepsia, sendo mais comum em pacientes com ELT que em pacientes com epilepsia generalizada (Dudra-Jastrzebska *et al.*, 2007). Estudos longitudinais em epilepsia e depressão relataram uma associação temporal bidirecional entre essas duas condições. Nesses estudos, epilepsia pode ser frequentemente seguida de depressão, e história de depressão um fator de risco para início de epilepsia. Esta relação temporal bidirecional destas comorbidades sugere que haja fatores etiológicos comuns para transtornos do humor e epilepsia (Hasler *et al.*, 2007).

A prevalência de depressão varia entre 11-44% em pacientes com epilepsia (Dudra-Jastrzebska *et al.*, 2007) e a incidência de depressão durante a vida de pacientes epiléticos é de 30 a 70% (Prueter e Norra, 2005). O suicídio é uma das maiores causas de morte dos pacientes com epilepsia, sendo o risco de suicídio em pessoas com epilepsia de 4 a 10 vezes maior do que o da população em geral. Já na ELT o risco de suicídio é 25 vezes maior (Feijó de Melo *et al.*, 2007). A prevalência dos outros transtornos psiquiátricos também é maior nos pacientes epiléticos em comparação com a população geral: Transtorno de ansiedade, 15-25% versus 2,5-6,5%; psicoses, 2-8% versus 0,5-0,7%; déficit de atenção e hiperatividade, 10-40% versus 2-10% (Dudra-Jastrzebska *et al.*, 2007). Recentemente, o grupo de Neurologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre realizou um estudo avaliando distúrbios psiquiátricos em pacientes com epilepsia do lobo temporal. A prevalência de

transtornos psiquiátricos observada nos nossos pacientes foi de 54,1%, sendo transtornos de humor observados em 42,9% e transtornos de ansiedade em 18,4% (Bragatti JA *et al.*, 2009).

Os fatores de risco para psicopatologias em pacientes epiléticos envolvem fatores clínicos, psicossociais e biológicos. Dentre os fatores clínicos estão a idade de início, a duração, o tipo e a frequência das crises epiléticas. Os fatores psicossociais envolvem as limitações socioeconômicas e educacionais e também os estigmas sociais encontrados pelos pacientes. Os fatores biológicos estão ligados a danos neuropatológicos em áreas relacionadas ao funcionamento psíquico, como amígdala, sistema límbico, córtex frontal e gânglio basal (Torta e Keller , 1999). Assim, disfunções em regiões cerebrais relacionadas à regulação do humor são importantes fatores de risco para depressão em pacientes epiléticos. Estudos mostraram que a ELT está associada com disfunção em regiões cerebrais implicadas na etiologia da depressão, baseada na densidade dos receptores de serotonina. A gravidade do hipometabolismo no lobo temporal de pacientes com ELT mostrou-se associado com sintomas de depressão nestes pacientes (Gilliam *et al.*, 2004). Nesta linha, Theodore discute que a diminuição da função serotoninérgica parece constituir o principal mecanismo patogênico para o desenvolvimento de depressão, e a serotonina também parece ter um papel na epilepsia (Theodore, 2003). Evidências sugerem ainda a influência da lateralidade hemisférica do foco epilético, do sexo e dos medicamentos anticonvulsivantes como fatores desencadeantes da depressão no epilético (para revisão Kairalla *et al.*, 2004).

Bases moleculares das epilepsias

Tanto as epilepsias quanto os transtornos psiquiátricos caracterizam-se por serem doenças complexas e multifatoriais. Estas doenças dependem, em maior ou menor grau, de fatores genéticos e de fatores ambientais, que interagem de maneira extremamente complexa. Por exemplo, a depressão é gerada pela interação de circuitos neuronais que envolvem muitas células nervosas, cada uma das quais expressam genes específicos que dirigem a produção de proteínas específicas. Assim, variações neurocomportamentais tais como a depressão, usualmente refletem as interações combinadas e bi-direcionais entre fatores ambientais e muitos genes, cada qual com apenas um pequeno efeito sobre o fenótipo (Fuentes *et al.*, 2008).

As duas categorias etiológicas básicas para epilepsia são: distúrbio epileptogênico específico, que gera epilepsia em indivíduos susceptíveis; e fatores precipitantes, que são perturbações endógenas ou exógenas que evocam crises epiléticas (Engel, 1995). Tanto os distúrbios epileptogênicos quanto os fatores precipitantes não são suficientes para a ocorrência de crises epiléticas, as quais dependem do limiar de susceptibilidade do indivíduo à epilepsia. O limiar de susceptibilidade é determinado por fatores de predisposição inespecíficos, destacando-se fatores genéticos. Assim, a combinação de distúrbio epileptogênico, fatores precipitantes e um ambiente genético facilitador, induzem alterações em determinadas vias moleculares, que interferem nos circuitos elétricos cerebrais, podendo ocasionar crises epiléticas (Gitaí *et al.*, 2008).

Os fatores genéticos podem ser estudados através da análise de variantes, patogênicas ou não, em genes de susceptibilidade. Denominam-se polimorfismos as variações genéticas encontradas com frequência maior que 1% na população. Podem atuar como marcadores genéticos, já que são transmitidos associados a outros genes localizados na região cromossômica próxima a eles. Além disso, estas variantes genéticas podem atuar aumentando o risco de ocorrência de crises epiléticas recorrentes, e dessa forma, contribuindo para o estabelecimento do limiar de susceptibilidade. Assim, polimorfismos podem exercer efeito como fatores de susceptibilidade, diminuindo o limiar da crise epilética para outros agentes indutores de epilepsia ou tornando os indivíduos mais susceptíveis para desenvolver epilepsia após provocações que poderiam não produzir epilepsia em indivíduos sem o polimorfismo (Rosenberg, 2008). Entretanto, o efeito de cada polimorfismo isoladamente não é determinante para a ocorrência de epilepsia, mas depende de uma ação aditiva de outras variantes genéticas, no mesmo e em outros genes de susceptibilidade, além de fatores ambientais.

Recentemente estudos genéticos com doenças complexas têm buscado métodos para diminuir esta heterogeneidade genética e clínica através da identificação de subgrupos fenotípicos homogêneos, mais prováveis de dividir influências genéticas comuns. Estes fenótipos subclínicos, também chamados de endofenótipos, refletem um substrato genético para uma doença e podem estar relacionados com características neurofisiológicas, bioquímicas, anatômicas, cognitivas e neuropsicológicas. A susceptibilidade genética a endofenótipos é menos complexa e mais fácil de elucidar que a susceptibilidade a fenótipos complexos, como a epilepsia.

Além disso, variações genéticas nestes endofenótipos podem representar fatores de risco para a epilepsia, ou características clínicas específicas desta doença (Pinto *et al.*, 2009).

A genética molecular tem permitido a identificação de genes relacionados a diversas doenças neurológicas e neuropsiquiátricas. A identificação de genes candidatos é uma tarefa que envolve uma pesquisa geral em todo o genoma humano. Por esse motivo, tem-se feito a identificação de genes relacionados aos sistemas que se busca estudar. A investigação de genes de susceptibilidade associados às epilepsias complexas, idiopáticas não monogênicas ou sintomáticas, tem avançado. Os estudos de associação de polimorfismos são os que apresentam um maior valor informativo para doenças complexas. Estes estudos buscam detectar alelos que contribuem para a predisposição à epilepsia, por meio da comparação na frequência de alelos específicos entre indivíduos epiléticos e indivíduos saudáveis (Gitaí *et al.*, 2008). Um alelo é dito associado com a doença se sua frequência difere entre casos e controles mais do que o predito por chance. Uma associação alélica, entretanto, pode não estar relacionada com a causa da doença, e sim, o alelo associado pode estar em desequilíbrio de ligação com o verdadeiro alelo patogênico.

A associação de polimorfismos específicos em genes candidatos pode ser de grande importância para a epilepsia, uma vez que pode melhorar o entendimento das vias moleculares associadas à hiperexcitabilidade neuronal e ao processo epileptogênico. Além disso, os estudos genéticos podem auxiliar no entendimento das

características fenotípicas da epilepsia, como tipo e duração da crise, resposta a medicamentos e coexistência de doenças neurológicas e psiquiátricas.

Neurotransmissor serotonina

A serotonina foi identificada inicialmente como efetora em diversos tipos de músculo liso e, posteriormente, como intensificadora da agregação plaquetária e como neurotransmissor no SNC. O neurotransmissor serotonina exerce funções relacionadas com o comportamento, humor, memória, sono, aprendizado e apetite.

O neurotransmissor serotonina, também chamado de 5-hidroxitriptamina (5-HT), é derivado do aminoácido triptofano. Em sua estrutura química, a 5-HT possui um anel indólico, sendo uma amina biogênica. A síntese de serotonina ocorre em dois passos: o triptofano é convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase (TPH); a seguir, o 5-HTP é transformado em 5-HT pela enzima 5-htp-descarboxilase. A síntese de serotonina parece ser controlada pela quantidade de triptofano disponível no fluido extracelular que banha os neurônios serotoninérgicos. Como o triptofano é um aminoácido essencial, sua disponibilização depende completamente da dieta. Assim, a falta de triptofano na dieta pode levar a uma depleção de serotonina no cérebro. A degradação enzimática da serotonina é realizada pelas enzimas monoaminoxidase (MAO) e catecol-O-metiltransferase (COMT). A serotonina também possui um sistema de recaptação da fenda sináptica para o neurônio pré-sináptico que é realizado pelo transportador da serotonina (5-HTT). Esta recaptação é importante para o controle da viabilidade de 5-HT na fenda sináptica e é

sensível a fármacos, dos quais o protótipo de inibidor é a fluoxetina. Existe um grande número de receptores da serotonina. Até o momento foram identificados 7 famílias de receptores, que são ainda divididas em subtipos. Agonistas e antagonistas farmacológicos dos receptores 5-HT são usados na terapêutica, em diversas enfermidades (Kapczinski *et al.*, 2004; Figura 1).

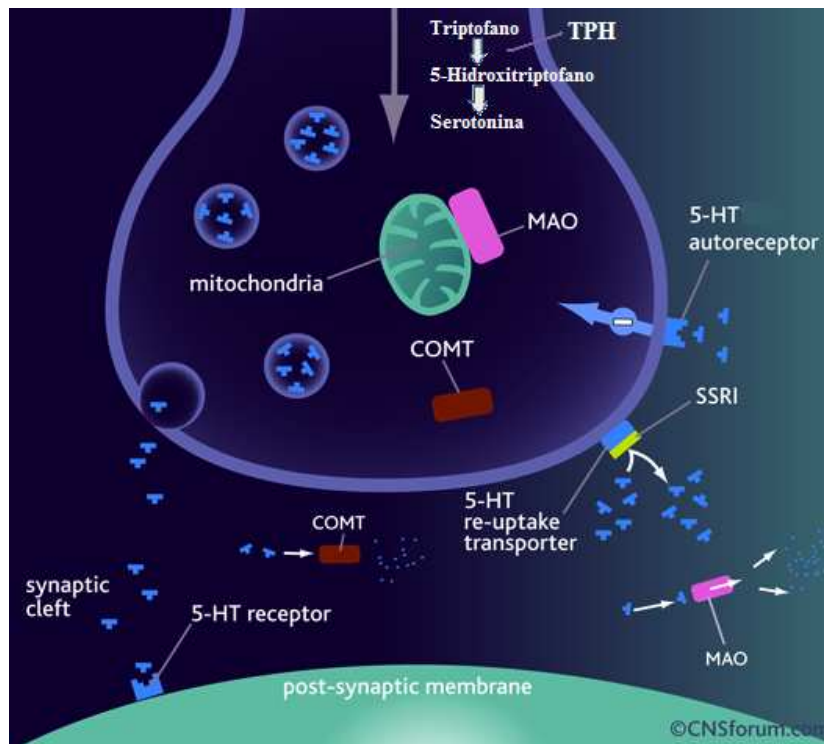


Figura 1: Representação da sinapse neuronal serotoninérgica, ilustrando a síntese da 5-HT e sua liberação na fenda sináptica, os receptores pós e pré-sinápticos, a recaptação pelo 5-HTT e a degradação pela MAO e COMT. Adaptada de www.cnsforum.com.

Problemas psiquiátricos, tais como depressão, ansiedade, agressividade, comportamento compulsivo e problemas afetivos têm sido associados a disfunções no sistema serotoninérgico. Em conformidade, a maioria dos medicamentos antidepressivos age produzindo um aumento da disponibilidade dessa substância na fenda sináptica.

A serotonina contribui com o neurodesenvolvimento, a funcionalidade e a plasticidade do cérebro adulto. Durante o desenvolvimento cerebral, o sistema serotoninérgico regula a especificação, diferenciação e manutenção neuronal, assim como o crescimento axonal e a configuração das conexões sinápticas (Catalano, 2001; Lesch, 2001). Além disso, a serotonina é um dos neurotransmissores envolvidos com o balanço excitatório/inibitório da região cortical e subcortical, participando em processos fisiológicos e patológicos no cérebro. A deficiência serotoninérgica parece contribuir para a predisposição às epilepsias e aos transtornos psiquiátricos. Estudos de PET (Positron Emission Tomography) encontraram uma diminuição na capacidade de ligação (BP – binding potential) dos receptores 5-HT1A em estruturas límbicas nos pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial (Savic *et al.*, 2004). Neste trabalho, os autores sustentam a hipótese do envolvimento da serotonina na ELT, sugerindo um mecanismo para os sintomas depressivos bastante frequentes nestes pacientes. De acordo com isso, outros estudos de PET demonstraram que pacientes epiléticos com depressão apresentam menor atividade dos receptores 5-HT1A do que aqueles somente com epilepsia. Nesta mesma linha, mudanças no sistema serotoninérgico foram associadas com a intensidade do sintoma depressivo em pacientes com ELT (Theodore, 2006; Lothe *et al.*, 2008).

Estudos com modelos animais de epilepsia demonstraram o papel da serotonina na predisposição a crise epilética: a diminuição da atividade serotoninérgica facilitou o início da crise, e aumentou a gravidade do mesmo (Jobe *et al.*, 1999). A redução da concentração de serotonina no cérebro parece aumentar a susceptibilidade a crises epiléticas tanto em modelos animais (Wenger *et al.*, 1973; Lazarova *et al.*, 1983)

quanto em humanos (Maynert *et al.*, 1975; Pallister *et al.*, 1982). Além disso, há evidências que a serotonina é um regulador da neurogênese no giro dentado: a depleção de serotonina diminui a neurogênese, enquanto tratamentos que aumentam a serotonina no hipocampo aumentam a neurogênese (Gould, 1999).

Outros trabalhos que sustentam o envolvimento da via serotoninérgica com a epilepsia mostraram que medicamentos antidepressivos apresentam propriedades anti-convulsivantes, assim como medicamentos anti-epilépticos têm propriedades anti-depressivas (Jobe *et al.*, 1999). Agentes antidepressivos que aumentam a concentração extracelular de serotonina, como o 5-hidroxitriptofano e os inibidores da recaptação da 5-HT, mostraram inibir tanto crises epilépticas focais como generalizadas (Yan QS *et al.*, 1994; Prendivile e Gale, 1993 em Bagdy *et al.*, 2007). Além disso, Ahmad *et al.* demonstraram que medicamentos anti-epilépticos, carbamazepina e fenitoína, aumentam os níveis basais ou a liberação de serotonina, enquanto que lamotrigina causa uma alteração dose-dependente na concentração de serotonina. Evidências sugerem que o aumento da neurotransmissão serotoninérgica melhora o efeito anticonvulsivante e a administração concomitante de medicamentos inibidores da recaptação da serotonina, que aumentam os níveis de serotonina disponível no cérebro, aumentam o efeito anticonvulsivante da carbamazepina e fenitoína (Ahmad *et al.*, 2005). Grosso *et al.* mostraram que o nível de serotonina plasmático aumenta significativamente após 4 meses de tratamento com o antiepiléptico topimarato em crianças com epilepsia. Neste trabalho, os autores sugerem que o topimarato poderia agir como um inibidor da recaptação da serotonina, e desse modo, aumentar os níveis de serotonina (Grosso *et al.*, 2008). De

acordo com essa hipótese, no trabalho de Cupello *et al.* foi encontrada uma diminuição na densidade dos transportadores de serotonina na membrana plaquetária, que reflete o status dos 5-HTT cerebrais, após a crise em pacientes epiléticos (Cupello *et al.*, 2008). Neste trabalho, os autores sugerem que isto poderia ser uma reação homeostática a hiperexcitabilidade neuronal via potenciação do sistema serotoninérgico, resultante de uma regulação negativa na capacidade de recaptção da 5-HT no cérebro.

Como a disfunção serotoninérgica parece estar envolvida na etiologia da epilepsia, os genes codificadores de proteínas reguladoras da neurotransmissão serotoninérgica são importantes candidatos para estudos de associação com epilepsia e comorbidades neuropsiquiátricas.

Transportador da serotonina

O transportador da serotonina (5-HTT) é a principal proteína responsável pela regulação da neurotransmissão serotoninérgica. No cérebro, o 5-HTT está situado nas membranas pré-sinápticas de terminais nervosos e dendritos próximos a corpos celulares contendo serotonina. Após liberação da serotonina do neurônio pré-sináptico, e ação desta na fenda sináptica, o 5-HTT faz a recaptção da serotonina da fenda sináptica, determinando assim a magnitude e duração da sua ação.

O 5-HTT é alvo de medicamentos inibidores da recaptção da serotonina (IRS). Estes antagonistas do 5-HTT são usados clinicamente como medicamentos psicoativos para o tratamento da depressão, distúrbio obsessivo-compulsivo e ansiedade, assim

como para outras doenças como alcoolismo e dor crônica. Estudos demonstraram que medicamentos que aumentam os níveis de serotonina extracelulares, como os IRS, apresentam ação anti-convulsivante, inibindo tanto crises focais como generalizadas (Jobe *et al.*, 1999, Yan *et al.*, 1994, Albano *et al.*, 2006; Jobe e Browning, 2005).

Em relação a estrutura, o 5-HTT é uma proteína de membrana transportadora que contém 12 domínios transmembrana. O mecanismo que opera o 5-HTT ocorre pela ligação ao sítio de ligação de Na⁺, Cl⁻ e serotonina extracelulares. Após esta ligação, ocorre uma mudança conformacional que fecha o acesso do sítio de ligação para o meio extracelular e abre o acesso para o meio intracelular, liberando o Na⁺, Cl⁻ e a serotonina. O K⁺ é então ligado ao sítio de ligação, facilitando a mudança conformacional de volta para a forma com acesso extracelular do sítio de ligação (figura 2).

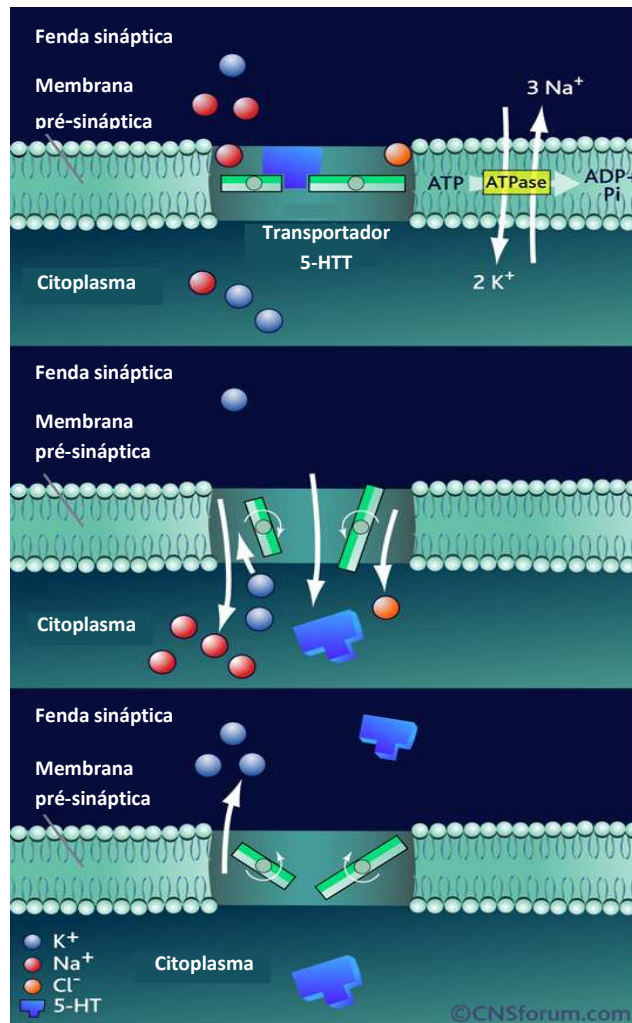


Figura 2: Mecanismo de ação do transportador da serotonina (5-HTT) na recaptção de serotonina (5-HT) da fenda sináptica. Adaptado de CNS fórum.com.

O gene do transportador de serotonina (SLC6A4, SERT, 5-HTT) está localizado no cromossomo 17, na posição 17q11.1-q12, apresenta um tamanho de 31Kb e possui 14 exons que codificam uma proteína de 630 aminoácidos (Lesh *et al.*, 1994; Ramamoorthy *et al.*, 1993; figura 3).

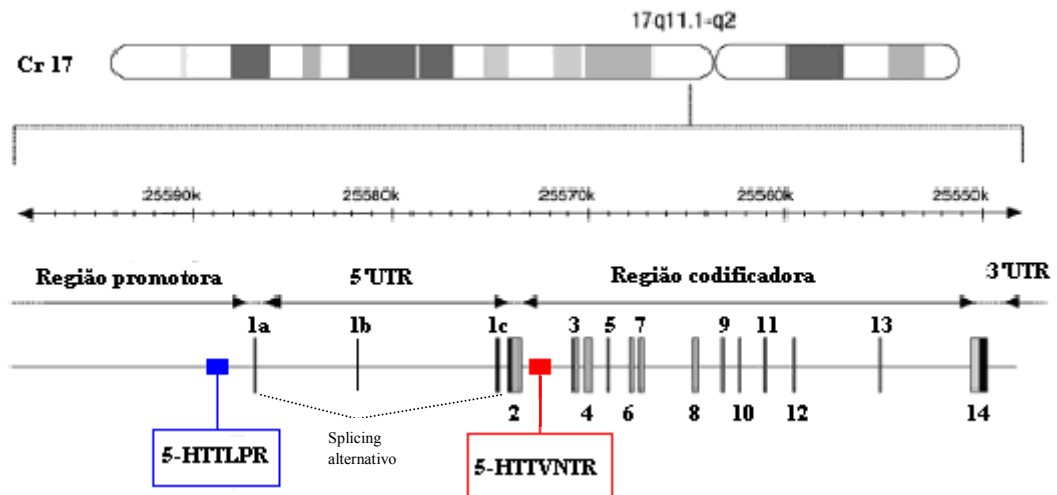


Figura 3: Representação esquemática da localização cromossômica do gene *5-HTT*. Estrutura do gene *5-HTT* representada desde a região promotora até 3'UTR e seus os exons numerados de 1 a 14. Localização dos polimorfismos 5HTTLPR e 5HTTVNTR indicados na caixa azul e vermelha, respectivamente. Figura adaptada de Garcia LF e col., 2010.

A atividade transcricional do gene *5-HTT* é modulada por um elemento repetitivo de comprimento variável na região flanqueadora 5', localizado a aproximadamente 1,4kb acima do início do sítio de transcrição, conhecido como 5HTTLPR (5HTT gene linked polymorphic region). O polimorfismo 5HTTLPR é caracterizado pela inserção/deleção de 44 pb e origina 2 alelos, um com quatorze (S-short) e outro com dezesseis (L-long) elementos de repetição (cada um com 20-23pb) (Heils *et al.*, 1996). O alelo L está relacionado a uma atividade transcricional duas a três vezes mais eficiente do *5-HTT* em comparação com a forma S, resultando numa maior atividade de recaptção da serotonina. O alelo L tem sido associado com altos níveis de 5-HTT em plaquetas, cérebro *postmortem* e cérebro funcional (Little *et al.*, 1998, Heinz *et al.*, 2000 e Greenberg *et al.*, 1999 em HU, 2006). Uma nova variante (SNP) localizada dentro do polimorfismo 5HTTLPR caracterizada pela modificação de um único nucleotídeo (A>G) foi descrita. A análise funcional deste SNP demonstrou que a

variante A do alelo L (L_A) produz altos níveis do mRNA do *5-HTT*, entretanto o L_G comporta-se equivalentemente ao alelo S (baixa expressão do *5-HTT*). O mesmo SNP pode ser utilizado para subdividir o alelo S, em S_A e S_G , mas é bastante raro (Nakamura *et al.*, 2000).

Um segundo polimorfismo no gene do *5-HTT* também foi identificado: o VNTR (repetições em tandem de número variável) de 17pb localizado no segundo intron (5HTTVNTR, STin2) (Lesch *et al.*, 1994; Olgivie *et al.*, 1996). O 5HTTVNTR apresenta dois alelos comuns (de 10 e 12 repetições) e dois alelos mais raros de 9 e 11 repetições. A região do VNTR atua como um regulador da transcrição do gene *5-HTT*, sendo o alelo com 12 repetições relacionado com maior atividade transcricional do gene em comparação com o alelo de 10 repetições (Lovejoy *et al.*, 2003). Um estudo mostrou que o alelo de 12 repetições aumenta a diferenciação de células tronco embrionárias, sugerindo que este polimorfismo pode regular a expressão gênica em células/tecidos específicos (Fiskerstrand *et al.*, 1999). Recentemente, estudando a relação entre o polimorfismo 5HTTLPR e 5HTTVNTR, Hranilovic *et al.* propuseram uma classificação baseada na atividade transcricional dos alelos destes polimorfismos. Baseado no modelo dominante dos alelos de baixa expressão (S e 10), as amostras foram classificadas como genótipos de baixa atividade, contendo pelo menos um alelo de baixa atividade, e genótipo de alta atividade, contendo ambos os alelos de alta atividade (S versus L/L para 5HTTLPR e 10 versus 12/12 para 5HTTVNTR). O efeito combinado destes polimorfismos foi analisado e separado em 3 grupos: os com genótipo de alta atividade para ambos polimorfismos (L/L e 12/12); os com apenas um genótipo de baixa atividade em um locus (L/L 10 ou S/ 12/12); e os com ambos

genótipos de baixa atividade (S e 10). A expressão do *5-HTT* foi maior no grupo com dois genótipos de alta atividade, 20% menor no grupo com um genótipo de baixa atividade e 50% menor no grupo com ambos os genótipos de baixa atividade (Hranilovic *et al.*, 2004).

Muitos estudos de associação têm avaliado a influência destes polimorfismos no gene do *5-HTT* e as doenças psiquiátricas. No estudo de metanálise realizado por Anguelova *et al.* foram selecionados 22 estudos de associação entre 5HTTLPR / 5HTTVNTR e depressão maior e 23 estudos entre estes polimorfismos e transtorno bipolar. Os resultados evidenciaram associação entre 5HTTLPR e 5HTTVNTR e transtorno bipolar, mas foram inconclusivos quanto à depressão maior (Anguelova *et al.*, 2003a). Porém, alguns estudos sustentam a hipótese de associação entre estes polimorfismos e a depressão (Olgivie *et al.*, 1996; Goldman *et al.*, 2010) e também a interação GxA (gene-ambiente) do genótipo 5HTTLPR juntamente com um ambiente desfavorável para o desencadeamento da depressão (Aguilera *et al.*, 2009; Brown e Harris, 2008). Em uma segunda metanálise, Anguelova *et al.* evidenciaram associação entre o alelo S do 5HTTLPR e o comportamento suicida (Anguelova *et al.*, 2003b). Já em um estudo realizado por nosso grupo, não foi encontrada associação do 5HTTLPR e a tentativa de suicídio (Segal *et al.*, 2009). Ainda, estudos recentes encontraram associação do 5HTTLPR e 5HTTVNTR com distúrbio de personalidade antissocial (Garcia *et al.*, 2010), e também do alelo L do 5HTTLPR no déficit de atenção e hiperatividade e no autismo (Curran *et al.*, 2005; Yirmiya *et al.*, 2001). Assim, para muitas psicopatologias os resultados de associação são controversos, e os mecanismos biológicos para a associação dos alelos de risco ainda precisa ser esclarecido.

Em relação às epilepsias, estudos de associação entre casos e controles estão sendo realizados para melhor entender a influência da serotonina e do transportador da serotonina na etiologia destas doenças. Um resumo dos principais estudos de associação está representado no quadro abaixo.

Quadro 1: Principais artigos de associação entre polimorfismos no gene do 5-HTT e a epilepsia

Análise realizada	Resultado	Artigo
5HTTLPR e 5HTTVNTR na ELT (n=376 e 309)	Associação da ELT com alelo 12 R do 5-HTTVNTR	Manna et al., 2007
5HTTVNTR e resposta a anti-convulsivante na EMT –EH (n=105)	Alelo 12 R do 5-HTTVNTR associado com pior resposta ao anti-convulsivante	Kauffman et al., 2009
5HTTLPR e 5HTTVNTR e resposta a anti-convulsivante na ELT (n=101)	Genótipos de alta atividade transcricional associados com pior resposta ao medicamento e maior frequência de crises	Hrvoje et al., 2010
5HTTLPR e 5HTTVNTR na ELT (n=101 e 170)	Não associação	Stefulj et al., 2010

Manna *et al.*, 2007, encontraram associação do polimorfismo 5HTTVNTR em pacientes italianos com ELT, sendo o alelo de 10 repetições mais freqüente nos controles que nos pacientes com ELT. Entretanto, neste trabalho não foi encontrada associação do 5HTTLPR, nem do haplótipo dos marcadores 5HTTLPR e 5HTTVNTR (Manna *et al.*, 2007). No estudo de Kauffman *et al.* foi avaliada a influência do VNTR no intron 2 do 5-HTT e a resposta ao tratamento medicamentoso em pacientes com epilepsia mesial temporal com esclerose hipocampal (EMT-EH). O alelo de 12 repetições foi relacionado com um risco aumentado de não responder ao tratamento antiepiléptico nestes pacientes (Kauffman *et al.*, 2009). Recentemente, Hrvoje *et al.*, 2010, demonstraram que a combinação dos genótipos de maior atividade

transcricional (5HTTLPR: genótipo L/L e 5HTTVNTR: genótipo 12/12) está associada com a baixa resposta ao tratamento antiepiléptico e também com uma maior frequência de crises epiléticas nos pacientes com ELT, corroborando os estudos de Kauffman *et al.*, 2009, e Manna *et al.*, 2007. Entretanto alguns estudos não encontraram associação destes polimorfismos com a ELT e também com a epilepsia generalizada (Sander *et al.*, 2000; Stefulj *et al.*, 2010). Assim, mais estudos são necessários para melhor elucidar o papel destes polimorfismos como fatores de susceptibilidade para as epilepsias ou para características específicas desta doença, como a resposta ao tratamento, a frequência de crises ou a presença de comorbidades psiquiátricas.

Receptores da serotonina

A serotonina, quando liberada na fenda sináptica, exerce sua ação através de receptores tanto pré quanto pós-sinápticos, sendo que os últimos estão localizados no neurônio-alvo, determinando um número de eventos intracelulares responsáveis pelos efeitos biológicos atribuídos a esse neurotransmissor. Os receptores da 5-HT podem, direta ou indiretamente, alterar a condução iônica, resultando em des- ou hiperpolarização. Assim, a serotonina, através de seus receptores, pode alterar significativamente a excitabilidade em muitos processos envolvidos com a epilepsia. Em conformidade, medicamentos que exercem propriedades agonistas e/ou antagonistas nos receptores 5-HT devem ser considerados importantes fatores para a patogênese da epilepsia.

Sete famílias de receptores da serotonina, acoplados a proteína G (figura 4), foram descritas (5-HT1, 5-HT2, 5-HT3, 5-HT4, 5-HT5, 5-HT6, e 5-HT7). Cada família de receptor possui subtipos, com reações diferentes ao estímulo da serotonina. A família dos receptores 5-HT1 é composta por 5 subtipos (5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E e 5-HT1F). Os receptores 5-HT1A estão localizados tanto em neurônios pré-sinápticos como em pós-sinápticos. Os receptores 5-HT1A pré-sinápticos atuam como auto-receptores das células serotoninérgicas, e regulam a liberação de serotonina através da modulação da síntese e liberação deste neurotransmissor. Os receptores 5-HT1A pós-sinápticos localizam-se predominantemente em regiões límbicas do cérebro, em células piramidais, no córtex, hipocampo, amígdala e hipotálamo. Esta dupla localização proporciona um efeito duplo na estimulação serotoninérgica dos receptores 5-HT1A. Quando estimulados os auto-receptores pré-sinápticos, há indução da hiperpolarização dos neurônios serotoninérgicos e consequente diminuição da liberação de serotonina. A estimulação dos receptores pós-sinápticos ativa a via de segundos mensageiros, completando a sinapse no sistema serotoninérgico (Rebelo e Silva, 2010; Le François *et al.*, 2008).

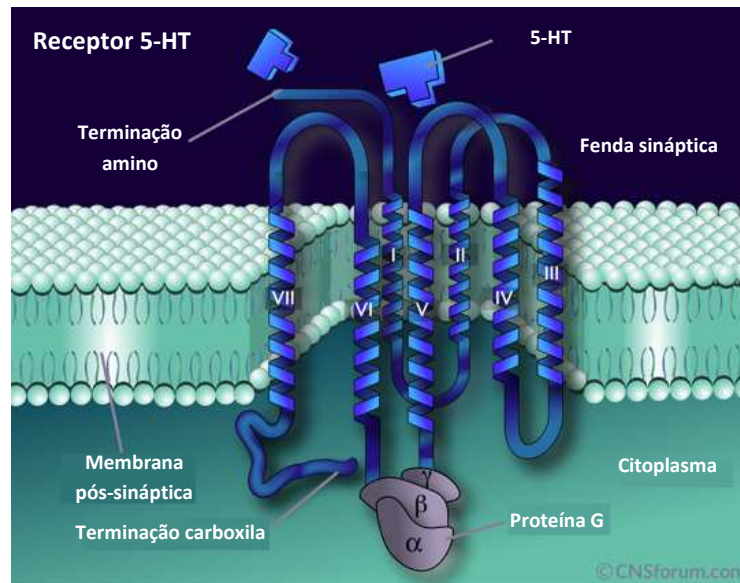


Figura 4: Representação esquemática dos receptores 5-HT. Apresentam sete hélices transmembranas e estão acoplados a proteína G. A serotonina (5-HT) liga-se no sítio de ação na porção extracelular, e ativa a proteína G que inicia a sinalização de segundos mensageiros. Adaptado de CNSforum.com.

Estudos em modelos animais mostraram que os receptores 5-HT_{1A} estão predominantemente localizados no sistema límbico e sugerem que a serotonina, via estes receptores, medeia um efeito anti-epiléptico e anticonvulsivante (Bagdy *et al.*, 2007). A administração de agonistas específicos dos receptores 5-HT_{1A} em ratos mostrou um efeito protetor a crises epilépticas (Gariboldi *et al.*, 1996). Além disso, estudos sugerem a possibilidade de que o receptor 5-HT_{1A} tenha um papel neurotrófico no desenvolvimento do cérebro (Riad *et al.*, 1994). Estudos de imagem PET em pacientes com ELT e ELT mesial encontraram uma diminuição na capacidade de ligação dos receptores 5-HT_{1A} nos focos epileptogênicos destes pacientes (Toczek *et al.*, 2003; Savic *et al.*, 2004). A redução da capacidade de ligação dos receptores 5-HT_{1A} é mais pronunciada em pacientes ELT com a presença de depressão, sugerindo um mecanismo neurobiológico para a comorbidade ELT-depressão (Hasler *et al.*,

2007). Assim, o gene do receptor 5-HT1A é um candidato promissor para estudos de predisposição genética à epilepsia e comorbidades relacionadas.

O gene do receptor 5-HT1A está localizado no cromossomo 5, em 5q11.2-q13, apresenta um tamanho de aproximadamente 1200 pb, sem introns, e codifica uma proteína de 422 aminoácidos. Wu e Comings, 1999, descreveram um polimorfismo de base única (SNP - single nucleotide polymorphism) na região promotora deste gene (rs6295, C-1019G) que parece alterar a expressão gênica do receptor (Czesak *et al.*, 2006; figura 5). Este polimorfismo está localizado em uma região palindrômica de 26 pb que é reconhecida por dois fatores de transcrição (Deaf-1 e Hes5). A ligação dos fatores de transcrição ocorre de maneira alelo-específica, a mudança de C para G altera substancialmente o sítio de ligação para o repressor Deaf-1, impedindo sua ligação. Isto levaria a uma maior expressão dos auto-receptores 5-HT1A. Parsey *et al.* corroboram esta hipótese, demonstrando por PET imagem que indivíduos com o alelo G apresentam maior potencial de ligação do receptor 5-HT1A nos núcleos da rafe (Parsey *et al.*, 2006). Além disso, o Deaf-1 exerce funções diferentes nas células pré e pós-sinápticas. Em neurônios pós-sinápticos, aumenta a expressão dos receptores 5-HT1A, e em neurônios pré-sinápticos diminui a expressão deste receptor (Czesak *et al.*, 2006). Isto poderia explicar alguns resultados conflitantes presentes na literatura: a diminuição dos receptores 5-HT1A em pacientes psiquiátricos e epiléticos nos estudos de PET imagem poderia ser mediada pela disfunção na sinalização do Deaf-1, levando a uma diminuição na expressão do receptor em neurônios pós-sinápticos (para revisão: Drago *et al.*, 2008).

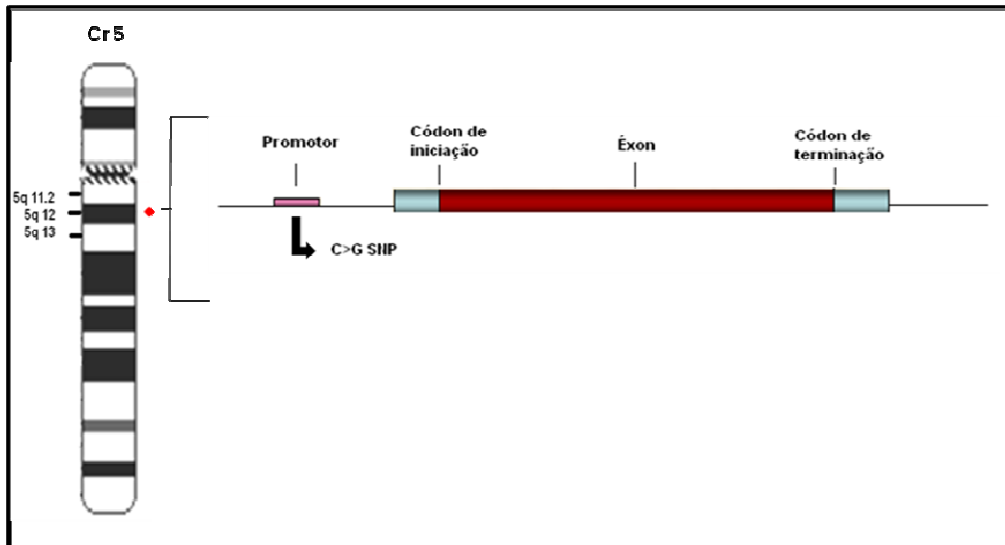


Figura 5: Localização do gene 5-HT1A no cromossomo 5, representação do gene 5-HT1A e a localização do SNP C-1019G.

Estudos de associação na área de psiquiatria sugerem que o sistema serotoninérgico é negativamente regulado pelos auto-receptores 5-HT1A. Além disso, a variante alélica G do polimorfismo tem sido associado com o aumento na expressão do gene 5-HT1A, e evidências sugerem que indivíduos com o alelo G têm maior risco para psicopatologias. Estudos demonstram que a presença do alelo G do polimorfismo C-1019G parece estar associado com depressão, comportamento suicida, transtorno do pânico e esquizofrenia. (Lemondé *et al.*, 2003; Parsey *et al.*, 2006 Freitag *et al.*, 2006, Huang *et al.*, 2004). Até o momento, somente um estudo avaliou a influência do polimorfismo C-1019G na epilepsia do lobo temporal, mas não foi encontrada associação significativa (Stefulj *et al.*, 2010). Portanto, baseado em evidências de que o receptor 5-HT1A é importante para o controle da excitabilidade neuronal, e alterações funcionais neste receptor poderiam levar a doenças como a epilepsia, é

interessante realizar mais estudos avaliando as alterações genéticas do receptor 5-HT1A em pacientes com epilepsia em diferentes populações.

Objetivos

Geral:

Determinar a frequência dos polimorfismos 5HTTLPR e 5HTTVNTR no gene do transportador da serotonina, e do SNP C-1019G no gene do receptor 5-HT1A em pacientes com epilepsia do lobo temporal (ELT) e em controles saudáveis.

Específicos:

Avaliar a associação entre os polimorfismos 5HTTLPR, 5HTTVNTR e C-1019G e a ELT, comparando a frequência genotípica destes polimorfismos entre o grupo de pacientes com ELT e o grupo de controles;

Verificar a influência destes polimorfismos no desenvolvimento de comorbidades psiquiátricas nos pacientes com ELT.

Referências

Aguilera M, Arias B, Wichers M, Barrantes-Vidal N, Moya J, Villa H, van Os J, Ibáñez MI, Ruipérez MA, Ortet G, Fananás L. Early adversity and 5-HTT/BDNF genes: new evidence of gene-environment interactions on depressive symptoms in a general population. *Psychological medicine* 2009; 1-9.

Ahmad S, Fowler LJ and Whitton PS. Lamotrigine, carbamazepine and phenytoin differentially alter extracellular levels of 5-hydroxytryptamine, dopamine and amino acids. *Epilepsy Res.* 2005; 63:141–149.

Albano C, Cupello A, Mainardi P, Scarrone S, Favale E. Successful treatment of epilepsy with serotonin reuptake inhibitors: proposed mechanism. *Neurochem Res* 2006;31: 509-14.

Anguelova M, Benkelfat C, Turecki G. A systematic review of association studies investigating gene coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: I. Affective disorders. *Molecular psychiatry* 2003a; 8: 574-591.

Anguelova M, Benkelfat C, Turecki G. A systematic review of association studies investigating gene coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: II Suicidal behavior. *Molecular Psychiatry* 2003b; 8: 646–653.

Bagdy G, Kecskemeti V, Riba P and Jakus R. Serotonin and epilepsy. *Journal of Neurochemistry* 2007; 100: 857–873.

Bragatti JA. Prevalência e fatores de risco para transtornos psiquiátricos na epilepsia do lobo temporal. <http://hdl.handle.net/10183/16373> .Tese de mestrado - Faculdade de Medicina, UFRGS, 2009.

Catalano M. Functionally gene-linked polymorphic region and genetically controlled neurotransmitters metabolism. *Eur Neuropsychopharmacol* 2001; 11:431-439.

Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification for epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* 1989; 30:389-399.

Cupello A, Audenino D, Scarrone S, Fornaro M, Gatta E, Fornaro P, Albano C. Epileptic seizures but not pseudoseizures are associated with decreased density of the serotonin transporter in blood platelet membranes. *Neurochem Res* 2008; 33: 2263-8.

Curran S, Purcell S, Craig I, Asherson P, Sham P. The Serotonin Transporter Gene as a QTL for ADHD. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)* 2005; 134B:42-47.

Czesak M, Lemonde S, Peterson EA, Rogaeva A, Albert PR. Cell-specific repressor or enhancer activities of Deaf-1 at a serotonin 1A receptor gene polymorphism. *J Neurosci* 2006;26: 1864-71.

Dailey JW, Yan QS, Adams-Curtis LE, Ryu JR, Ko KH, Mishra PK and Jobe PC. Neurochemical correlates of anti-epileptic drugs in the genetically epilepsy-prone rat (GEPR). *Life Sci.* 1996; 58:259-266.

Drago A, Ronchi DD, Serretti A. 5-HT1A gene variants and psychiatric disorders: a review of current literature and selection of SNPs for future studies. *Int J Neuropsychopharmacol* 2008;11: 701-21.

Dudra-Jastrzabska M, Andres-Mach MM, Luszczki JJ, Czuczwar SJ. Mood disorders in patients with epilepsy. *Pharmacological reports* 2007; 59: 369-378.

Engel J Jr. Concepts of epilepsy. *Epilepsia* 1995; 36: 23-9.

Engel J Jr. Classification of epileptic disorders. *Epilepsia* 2001;42: 316.

Engel, J Jr. ILAE classification of epilepsy syndromes. *Epilepsy Research* 2006; 70S: S5-S10.

Engel, J Jr. Mesial Temporal Lobe epilepsy: What have we learned?.
Neuroscientist 2001; 7: 340

Feijó de Melo M, Feijó de Melo A, Kohn R. Epidemiologia da epilepsia e transtornos mentais associados. Em Epidemiologia da saúde mental no Brasil. Artmed. 2007.

Fiskerstrand CE, Lovejoy EA, Quinn JP. An intronic polymorphic domain often associated with susceptibility to affective disorders has allele dependent differential enhancer activity in embryonic stem cells. FEBS Letters 1999; 458: 171-174.

Freitag CM, Domschke K, Rothe C, Lee YJ, Hohoff C, Gutknecht L, Sand P, Fimmers R, Lesch KP, Deckert J. Interaction of serotonergic and noradrenergic gene variants in panic disorder. Psychiatr Genet 2006;16: 59-65.

Fuentes D, Malloy-Diniz LF, Camargo CHP, Consenza RM e colaboradores. Avaliação neuropsicológica aplicada às epilepsias. Em Neuropsicologia. Artmed 2008.

G.W. Brown, T.O. Harris. Depression and the serotonin transporter 5-HTTLPR polymorphism: A review and a hypothesis concerning gene–environment interaction. Journal of Affective Disorders 2008; 111: 1–12

Garcia LF, Aluja A, Fibla J, Cuevas L, García O. Incremental effect for antisocial personality disorder genetic risk combining 5-HTTLPR and 5-HTTVNTR polymorphisms. Psychiatry Research 2010; 177: 161–166.

Gariboldi M, Tutka, P, samanin R, Vezzani A. Stimulation of 5HT1A receptors in the dorsal hippocampus and inhibition of limbic seizures induced by Kainic acid in rats. Br J Pharmacol. 1999; 119:813-818.

Gilliam FG, Santos J, Vahle V, Carter J, Brown K, Hecimovic H. Depression in epilepsy: Ignoring clinical expression of neuronal network dysfunction? Epilepsia 2004; 45: 28-33.

Giovacchini G, Toczek MT, Bonwetsch R, Bagic A, Lang L, Fraser C, et al. 5-HT 1A receptors are reduced in temporal lobe epilepsy after partial-volume correction. *J Nucl Med* 2005; 46:1128–1135.

Gitaí DLG, Romcy-Pereira RN, Gitaí LLG, Leite JP, Garcia-Cairasco N, Paço-larson ML. Genes e epilepsia I: epilepsia e alterações genéticas. *Rev Assoc Med Bras* 2008; 54(3): 272-8.

Goldman N, Gleib DA, Yu-Hsuan Lin and Maxine Weinstein. The serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR): allelic variation and links with depressive symptoms. *Depression and Anxiety* 2010; 27 : 260–269.

Gould E. Serotonin and hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology* 1999; 21:46S–51S.

Greenberg BD, Toliver TJ, Huang SJ, Li Q, Bengel D, Murphy DL. Genetic variation in the serotonin transporter promoter region affects serotonin uptake in the human blood platelets. *Am J Med Genet* 1999; 88: 83-87.

Grosso S, Bardi P, Battaglini M, Franzoni E, De Lalla A, Mostardini R, Balestri P. Topiramate effects on plasma serotonin levels in children with epilepsy. *Epilepsy Research* 2008; 81: 148-154.

Hasler G, Bonwetsch R, Giovacchini G, Toczek MT, Bagic A, Luckenbaugh DA, Drevets WC, Theodore WA. 5-HT_{1A} Receptor Binding in Temporal Lobe Epilepsy Patients With and Without Major Depression. *Biological Psychiatry* 2007; 62: 1258-1264.

Heils A, teufel A, Petri S, Stober G, Riederer P, Bengel D, Lesch P. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *Journal of Neurochemistry* 1996; 66:2621-2624.

Heinz A, Jones DW, Mazzanti C, Goldman D, Ragan P, Hommer D, Linnoila M, Weinberger DR. A relationship between serotonin transporter genotype and in vivo protein expression and alcohol neurotoxicity. *Biol Psychiatry* 2000; 47: 643-649.

Hranilovic D, Stefulj J, Schwab S, Borrmann-Hassenbach M, Albus M, Jernej B, Wildenauer D. Serotonin transporter promoter and intron 2 polymorphisms: relationship between allelic variants and gene expression. *Biol Psychiatry* 2004; 55: 1090-1094.

Hranilovic D, Stefulj J, Schwab S, Borrmann-Hassenbach M, Albus M, Jernej B, Wildenauer D. Serotonin transporter promoter and intron 2 polymorphisms: relationship between allelic variants and gene expression. *Biol Psychiatry* 2004; 55: 1090-1094.

Hrvoje H, Jasminka S, Lipa, C-S, Vida D, Branimir J. Association of serotonin transporter promoter (5-HTTLPR) and intron 2 (VNTR-2) polymorphisms with treatment response in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research* 2010; article in press.

Huang YY, Battistuzzi C, Oquendo MA, Harkavy-Friedman J, Greenhill L, Zalsman G, Brodsky B, Arango V, Brent DA, Mann JJ. Human 5-HT_{1A} receptor C(-1019)G polymorphism and psychopathology. *Int J Neuropsychopharmacol* 2004;7: 441-51.

Jobe PC, Browning RA. The serotonergic and noradrenergic effects of antidepressant drugs are anticonvulsant, not proconvulsant. *Epilepsy Behav* 2005;7: 602-19.

Jobe PC, Dailey JW, Wernicke JF. A noradrenergic and serotonergic hypothesis of the linkage between epilepsy and affective disorders. *Crit Rev Neurobiol* 1999; 13:317-356.

Kairalla ICJ, Bressan RA, Mari JJ. Epilepsia, depressão e transtorno do humor. *J epilepsy Clin Neurophysiol* 2004; 10: 59-63

Kapczinski F, Quevedo J, Izquierdo I. Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos. 2 edição. Artmed 2004.

Kauffman MA, Consalvo D, Gonzalez-Morón D, Aguirre F, D'Alessio L, Kochen S. Serotonin transporter gene variation and refractory mesial temporal epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsy Research* 2009; 85: 231-234.

Lazarova M, Bendotti C, Samanin R. Studies on the role of serotonin in different regions of the rat central nervous system on pentylenetetrazol-induced seizures and the effect of Di-n-propylacetate. *Arch Pharmacol* 1983;322:147–152.

Le François B, Czesak M, Steubl D, Albert PR. Transcriptional regulation at a HTR1A polymorphism associated with mental illness. *Neuropharmacology* 2008;55: 977-85.

Lemondé S, Turecki G, Bakish D, Du L, Hrdina PD, Bown CD, Sequeira A, Kushwaha N, Morris SJ, Basak A, Ou XM, Albert PR. Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide. *J Neurosci* 2003;23: 8788-99.

Lesch KP, Balling U, Gross J, Strauss K, Wolozin BL, Murphy DL, Riederer P. Organization of the human serotonin transporter gene. *J Neural Transm Gen* 1994; 157-162.

Lesch KP. Variation of serotonergic gene expression: neurodevelopment and the complexity of response to psychopharmacologic drugs. *Eur Neuropsychopharmacol* 2001; 11:457-474.

Little KY, McLaughlin DP, Zhang L, Livermore CS, Dalac GW, McFinton PR, DelProposto ZS, Hill E, Cassin BJ, Watson SJ, Cook EH. Cocaine ethanol and genotype effects on human midbrain serotonin transporter binding sites and mRNA levels. *Am j psychiatry* 1998; 155: 207-213.

Lothe A, Didelot A, Hammers A, Costes N, Saoud M, Gilliam F, Ryvlin P. Comorbidity between temporal lobe epilepsy and depression: a [18F]MPPF PET study. *Brain* 2008;131: 2765-82.

Lovejoy EA, Scott AC, Fiskerstrand CE, Bubb VJ, Quinn JP. The serotonin transporter intronic VNTR enhancer correlated with a predisposition to affective disorders has distinct regulatory elements within the domain based on the primary DNA sequence of the repeat unit. *Eur J Neurosci.* 2003; 17:417-420.

Manna I, Labate A, Gambardella A, Forabosco P, La Russa A, Le Piane E, Aguglia U, Quattrone A. Serotonin transporter gene (5-HTT): Association analysis with temporal lobe epilepsy. *Neuroscience letters* 2007; 421: 52-56.

Maynert E, Marczyński T, Browning R. The role of neurotransmitters in the epilepsies. *Adv Neurol* 1975;13:79–147.

Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16(3): 1215.

Nakamura M, Ueno S, Sano A, Tanabe H. The human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) shows ten novel allelic variants. *Mol Psychiatry.* 2000; 5(1):32-8.

Ogilvie AD, Battersby S, Bubb VJ, Finf G, Harmar AJ, Goodwin GM, Smith CAD. Polymorphism in serotonin transporter gene associated with susceptibility to major depression. *The Lancet* 1996; 347: 731-33.

Okada M, Kaneko S, Hirano T, Ishida M, Kondo T, Otani K And Fukushima Y. Effects of zonisamide on extracellular levels of monoamine and its metabolite, and on Ca²⁺-dependent dopamine release. *Epilepsy Res.* 1992; 13:113–119.

Pallister PD. Aggravation of epilepsy by reserpine, associated with possible bleeding and clotting disturbances. *Rocky Mt Med J* 1982;56:45–50.

Parsey RV, Oquendo MA, Ogden RT, Olvet DM, Simpson N, Huang YY, Van Heertum RL, Arango V, Mann JJ. Altered serotonin 1A binding in major depression: a [carbonyl-C-11]WAY100635 positron emission tomography study. *Biol Psychiatry* 2006;59: 106-13.

Pinto D, Trenité DKN and Lindhout D. Endophenotype Strategy in Epilepsy Genetics. In: M.S. Ritsner (ed.) *The Handbook of Neuropsychiatric Biomarkers, Endophenotypes and Genes*. Springer Science + Business Media B.V. 2009.

Prueter C and Norra C. Mood disorder and their treatment in patients with epilepsy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2005; 17: 20-28.

Ramamoorthy S, Bauman KR, Moore H, Yang Feng, Chang AS, Ganapathy V, Blakely RD. Antidepressant and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 2542-2546.

Rebelo e Silva R. Análise de polimorfismos nos genes dos receptores de serotonina 5-HT1A e 5-HT2A em pacientes deprimidos que tentaram suicídio. <http://hdl.handle.net/10183/26149>. Tese de mestrado - Faculdade de Medicina, UFRGS, 2010.

Riad M, Emerit M., Hamon M. Neurotrophic effects of ipsapirone and other 5-HT1A receptor agonists on septal cholinergic neurons in culture. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1994; 82:245–258.

Rosenberg, Roger N. *The molecular and genetic basis of neurology and psychiatric diseases*. 4ª Ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

Sander JW. The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr Opin Neurol* 2003; 16(2):165-170.

Sander T, Berlin W, Ostapowicz A, Samochowiec J, Gscheidel N, Hoehe MR. Variation of the genes encoding the human glutamate EAAT2, serotonin and dopamine

transporters and Susceptibility to idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsy Res* 2000;41: 75-81.

Savic I, Lindstrom P, Gulyas B, Halldin C, Andree B and Farde L. Limbic reductions of 5-HT_{1A} receptor binding in human temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2004; 62:1343–1351.

Segal J, Schenkel LC, Oliveira MH, Salumd GA, Baue CHD, Gus Manfro G, Leistner-Segal S. Novel allelic variants in the human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) among depressed patients with suicide attempt. *Neuroscience Letters* 2009; 451: 79–82.

Stefulj J, Bordukalo-Niksic T, Hecimovic H, Demarin V, Jernej B. Epilepsy and serotonin (5HT): variations of 5HT-related genes in temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett* 2010;478: 29-31.

Theodore WH Does Serotonin Play a Role in Epilepsy? *Epilepsy Curr.* 2003; 3(5):173-177

Theodore WH. Does Serotonin Play a Role in Epilepsy? *Epilepsy Curr* 2003;3: 173-177.

Toczek MT, Carson RE, Lang L, Ma Y, Der Spanaki MVMG, Fazilat S, Kopylev L, Herscovitch P, Eckelman WC and Theodore WH. PET imaging of 5-HT_{1A} receptor binding in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2003; 60:749–756.

Torta R and Keller R. Behavioral, psychotic, and anxiety disorders in epilepsy: etiology, clinical features, and therapeutic implications. *Epilepsia* 1999; 40: S2-S20.

Warren JT, Peacock ML, Rodriguez LC, Fink JK. An MspI polymorphism in the human serotonin receptor gene (5HT₂): detection by DGE and RFLP analysis. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 338.

Weese-Mayer DE, Zhou L, Berry-Kravis EM, Maher BS, Silvestri JM, Marazita ML. Association of the serotonin transporter gene with sudden infant death syndrome: a haplotype analysis. *Am J Med Genet A*. 2003; 122A(3):238-45.

Wendland JR, Martin BJ, Kruse MR, Lesch KP, Murphy DL. Simultaneous genotyping of four functional loci of human SLC6A4, with a reappraisal of 5-HTTLPR and rs25531. *Molecular Psychiatry* 2006; 11:224-226.

Wenger GR, Stitzel RE, Craig CR. The role of biogenic amines in the reserpine-induced alteration of minimal electroshock seizure thresholds in the mouse. *Neuropharmacology* 1973;12:693–703.

World Health Organization. WHO. Media Centre, Epilepsy, 2009.

Wu S, Comings DE. A common C-1018G polymorphism in the human 5-HT1A receptor gene. *Psychiatr Genet* 1999;9: 105-6.

Xia-Zhang Hu, Robert H L, Guanshan Zhu, Longina AA, Julie Taubman, Benjamin D G, Ke Xu, Paul D Arnold, Margaret A Richter, James LK, Denis LM, David G. Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *Ameri. Jour. of Human Genetics* 2006;78:815-825.

Yan QS, Jobe PC, Cheong JH, Ko KH and Dailey JW. Role of serotonin in the anticonvulsant effect of fluoxetine in genetically epilepsy prone rats. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1994; 350:149–152.

Yirmiya N, Pilowsky T, Nemanov L, Arbelle S, Feinsilver T, Fried I, Ebstein RP. Evidence for an Association With the Serotonin Transporter Promoter Region Polymorphism and Autism. *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)* 2001; 105:381-386.

Artigo 1

Submetido à revista **Epilepsy Research**

Manuscript Draft

Title: Serotonin Transporter Gene (5HTT) Polymorphisms and Temporal Lobe Epilepsy

Article Type: Research Paper

Section/Category: Clinical Research

Keywords: Epileptogenesis; serotonergic system; 5HTTLPR; 5-HTTVNTR

Corresponding Author: Dr. Marino Muxfeldt Bianchin, M.D., Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

First Author: Laila C Schenkel, MSc

Order of Authors: Laila C Schenkel, MSc; José A Bragatti, M.D., Ph.D.; Carolina M Torres , MSc., M.D.; Kelin C Martin , M.D.; Gisele G Manfro , M.D., Ph.D.; Sandra Leistner-Segal, Ph.D.; Marino Muxfeldt Bianchin, M.D., Ph.D.

Serotonin Transporter Gene (5HTT) Polymorphisms and Temporal Lobe Epilepsy

Laila Cigana Schenkel ^{a,b,c}

José Augusto Bragatti ^{b,c,d}

Carolina Machado Torres ^{b,c,d}

Kelin Cristine Martin ^{c,d}

Gisele Gus- Manfro ^{c,e}

Sandra Leistner-Segal ^{a,c}

Marino Muxfeldt Bianchin ^{b,c,d,*}

^a Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

^b Post-Graduation Course in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

^c B.R.A.I.N., Experimental Research Centre, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

^d Division of Neurology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

^e Psychiatry Service. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

* Address Correspondence to:

Marino M. Bianchin

Division of Neurology and BRAIN LAB

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Ramiro Barcelos, 2350,

Porto Alegre, RS, Brazil, 90035-903

SUMMARY

Objective: Preclinical and clinical studies have shown that serotonin levels might modulate susceptibility to seizures. Here we evaluated an association between 5HTTLPR and 5HTTVNTR allele variants in serotonin transporter gene and epileptogenesis in temporal lobe epilepsy (TLE).

Methods: A case–control candidate gene study evaluating the frequencies of 5HTTLPR biallelic and 5HTTVNTR allele variants in patients and healthy subjects. Genotypes were grouped according to transcriptional efficiency. Cases were 175 patients with TLE selected from the Epilepsy Outpatient Clinic of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, classified according to the electroclinical classification of the ILAE and neuroimaging findings. The control group consisted of 155 healthy unrelated subjects selected from the same population.

Results: We observed that less efficient transcriptional genotypes for *5-HTT* polymorphisms were more frequent in epileptic patients (O.R. = 3.24; 95% C.I.=1.08 to 9.73; $p=0.036$). Our results suggest that less efficient transcriptional genotypes for serotonin transporter gene are associated with TLE.

Conclusion: In this study we observed an association between the presence of 5HTTLPR and 5-HTTVNTR less transcriptional efficient combined genotypes and TLE. Our results suggest that modulation of the serotonergic system might be implied in epileptogenesis in TLE.

KEYWORDS: Epileptogenesis; serotonergic system; 5HTTLPR; 5-HTTVNTR

1. INTRODUCTION

Epilepsy is the second most frequent cause of neurological disorders in young adults. The annual incidence of epilepsy is estimated at 70/100,000 individuals in the general population, whereas in developing countries epilepsy rates are two times higher (Sander, 2003). The majority of patients, approximately 40%, suffer from temporal lobe epilepsy (TLE). Since the serotonin neurotransmitter (5-HT) contributes to the neurodevelopment, functionality and plasticity of the adult brain, serotonergic system may also contribute to the etiology of epilepsy (Catalano, 2001; Lesch, 2001). Preclinical and clinical studies have shown that reduction of serotonin concentration in the brain can enhance susceptibility to seizures (Lazarova et al., 1983; Cavalheiro et al., 2004; Savic et al., 2004). The impairment of serotonergic activity may facilitate seizure onset or enhance seizure severity. Agents that increase extracellular 5-HT levels, such as 5-hydroxytryptophan and selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI), might inhibit focal and generalized seizures (Bagdy et al., 2007). Conversely, antiepileptic drugs might enhance basal serotonin levels as part of their mechanism of action (Ahmad et al., 2005). More recently it was observed that SSRIs are associated with a reduced likelihood of ictal oxygen desaturation in patients with partial seizures (Bateman et al., 2010). Thus serotonergic neurotransmission may have an important role in the neurobiology of epilepsy.

The serotonin transporter (5-HTT) is an integral membrane protein responsible for the reuptake of 5-HT from the synaptic cleft, modulating the serotonergic neurotransmission. The human *5-HTT* gene (SLC6A4) has been mapped to chromosome 17q11.1-q12 (Lesh et al., 1994). Two polymorphisms of the *5-HTT* gene

have shown functional consequences. A 44 base pair insertion/deletion polymorphism in the 5' flanking region of this gene (5-HTTLPR) originates two alleles (L – long and S – short). The S allele has been reported to be associated with lower transcriptional efficiency of the *5-HTT* gene, resulting in lower serotonin uptake activity when compared with the L allele. (Lesh et al., 1996, Heils et al., 1996). This polymorphism with L and S alleles has been proposed to be biallelic for years. However, Nakamura et al. (2000) described a functional SNP A>G within the 5-HTTLPR polymorphism which generates a triallelic model with an La allele conferring gain-of function and Lg and S alleles being low-function variants. The second polymorphism in the *5-HTT* gene is a variable number of tandem repeats (VNTR) containing 9, 10 and 12 repeats of a 17 bp sequence in intron 2 (5-HTTVNTR) (Olgivie et al., 1996). The 5-HTTVNTR domain might act as a transcriptional regulator and the 12 allele has been associated with higher transcriptional activity of the *5-HTT* gene when compared to the 10 allele (Lovejoy et al., 2003). Hranilovic et al. (2004) demonstrated a dominant role of low-expressing alleles of these polymorphisms (S allele for 5-HTTLPR and 10 allele for 5-HTTVNTR) and showed the combined effect of 5-HTTLPR-biallelic and 5-HTTVNTR polymorphisms on *5-HTT* gene expression. Mean *5-HTT* gene expression was the highest in the group with two high-expression genotypes (L/L and 12/12), 20% lower in the group with one low-expression genotype (L/L 10/10, L/L 10/12, S/S 12/12 or S/L 12/12) and 50% lower in the group with both low-expression genotypes (no L/L and no 12/12).

In this study, we evaluated a plausible association between 5HTTLPR and 5HTTVNTR allele variants and epileptogenesis. For this purpose, we compared the

frequency of 5HTTLPR and 5HTTVNTR allele variants between TLE patients and a control group of healthy individuals.

2. METHODS

2.1 Patients

This is a case–control candidate gene study. The cases were 175 patients with TLE, selected from the Epilepsy Outpatient Clinic of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Inclusion criteria were based on the 1989 ILAE’s electroclinical classification (Commission on Classification Terminology of the International League Against Epilepsy, 1989) and neuroimaging results. Patients with extratemporal epilepsies, mental retardation, and those with systemic diseases were excluded. The control group consisted of 155 healthy unrelated subjects selected within the institutional staff (HCPA). The study was approved by the an Ethics Committee, in accordance with the Declaration of Helsinki, and all subjects provided written informed consent to participate in this study.

2.2 Genotyping

DNA was extracted from peripheral leukocytes according to the salt precipitation method (Miller et al., 1988). Subjects were genotyped for the 5-HTTLPR and 5-HTTVNTR.

5-HTTLPR: The amplification reaction (PCR) for the 5-HTTLPR polymorphism was carried out using primers described by Heils et al. (1996). The amplified product was digested with *MspI* restriction enzyme (New England Biolabs) which allows the detection of the A/G SNP, identifying the triallelic polymorphism (La, Lg and S variants).

The digestion products were visualized by 3% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide under UV light.

5-HTTVNTR: The intron 2 region of the 5-HTT gene containing the VNTR polymorphism was amplified using primers described by Weese-Mayer et al. (2003). The PCR product was visualized by 3% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide. The rare allele of 9 repeats was grouped with the 10 allele (both short alleles) and compared to the 12 variant (long allele).

2.3 Statistical analysis

The clinical variables and genotypes of the polymorphisms, 5-HTTLPR bi- and triallelic model and 5-HTTVNTR, were compared between TLE patients and a control group. In a second analysis we further compared the frequency of combined genotypes grouped according Hranilovic et al., (2004) between cases and controls. Categorical variables were compared by the two-tailed Chi-squared test and Fisher's exact test if necessary. Numerical variables were compared by the independent Student t-test, with the Levene test for equality of analysis of variance. As the age of patients differs from controls, we used a binary logistic regression model for controlling the effect of age. All statistical analyses were carried out using the SPSS 14.0 statistical package for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Results are expressed as odds ratio (95% confidence interval) and the level of significance was set at $p < 0.05$.

3. RESULTS

Of the 175 patients and 155 controls, 114 (65.1%) and 116 (74.8%) were women and 61 (34.9%) and 39 (25.2%) were men, respectively, with no significant differences between cases and controls ($p=0.072$). The mean age of patients and controls was 44.0 years and 32.6 years ($p<0.01$), respectively. The distributions of genotype frequency were in Hardy-Weinberg equilibrium for both cases and controls. Table 1 shows the genotype distribution of the 5-HTTLPR bi- and triallelic model and 5-HTTVNTR in TLE patients and controls. We found no significant difference in the genotype frequencies of these polymorphisms between epileptic patients and controls. Considering the dominant role of low-expressing alleles, the genotypes containing at least one low efficient allele (10 for 5-HTTVNTR and S for 5-HTTLPR-biallelic) were observed in 64.6% and 72.1% of TLE patients and in 56.8% and 65.2% of controls, a nonsignificant difference ($p=0.17$ and $p=0.23$, respectively). However, we observe significant differences when 5-HTTVNTR and 5-HTTLPR biallelic genotypes were combined by transcriptional efficiency. The combination of low expressing genotypes (no L/L and no 12/12) was more frequently observed in TLE patients, whereas the high expressing genotypes (L/L and 12/12) were more frequently observed in the controls ($p=0.028$, see Table 2).

Please insert Table 1 about here

Please insert Table 2 about here

Demographic, clinical, and radiological variables of patients, distributed according to grouped genotype of 5HTTLPR and 5HTTVNTR are present in Table 3. There were no differences in these genotypes regarding mean age of patients, mean age of epilepsy onset, mean time of epilepsy, sex, seizure control, presence of aura, history of initial precipitating injury, number of antiepileptic drugs used, use of benzodiazepines, and neuroimaging findings.

Please insert Table 3 about here

For a final analysis we divided the patients into two different groups, i.e., a group of more efficient transcriptional genotypes (L/L and 12/12) and a group of less efficient transcriptional genotypes, pooled together. A comparison between these two groups showed that more efficient transcriptional genotypes were less frequent in epileptic patients (O.R. = 3.38; 95% C.I.=1.19 to 9.62; p=0.016). This result remains significant after correction for age differences between patients and controls (O.R. = 3.24; 95% C.I.=1.08 to 9.73; p=0.036). Taken together, our results suggest that less efficient transcriptional genotypes are associated with TLE development.

4. DISCUSSION

In this study we found an association between the combination of 5HTTLPR biallelic and 5-HTTVNTR less transcriptional efficient genotypes and TLE. Although, we did not find any association between TLE patients and separate genotype analysis of 5-HTTLPR and 5-HTTVNTR, we observed that TLE patients showed higher frequencies of combined low transcriptional activity *5-HTT* genotypes compared to control subjects.

As far as we now, only four studies have previously explored the potential roles of *5-HTT* allele variants in epileptogenesis or epilepsy characteristics. Stefulj and colleagues failed to show any association between 5HTTLPR or 5HTTVNTR and TLE (Stefulj et al., 2010). However, Manna and collaborators found an association between TLE and 5-HTTVNTR allele 12, but not with 5-HTTLPR (Manna et al., 2007). The allele 12 of 5-HTTVNTR was also associated with risk for mesial temporal epilepsy not responding to medical treatment (Kauffman et al., 2009). Similarly, Hecimovic et al. found an association between high expression of combined genotypes (L/L of 5-HTTLPR and 12/12 of 5-HTTVNTR) and seizure refractoriness to antiepileptic medication therapy and shorter periods of seizure freedom (Hecimovic et al., 2010). Taken together, the last three studies contrast with our findings because they suggest that epilepsy, its severity or its response to medical treatment is associated with high, rather than low, transcriptional activity *5-HTT* genotypes. These discrepant results need to be further discussed, especially if one considers the results of Manna et al. (Manna et al., 2007) and Hecimovic et al. (Hecimovic et al., 2010), as presented above. It is possible that these genetic association observed might be related to linkage disequilibrium with

other genetic polymorphisms at the same gene or close genes. These possibilities could explain discrepant results found in association studies performed in different populations. Moreover there are possible mechanisms that could explain how increase or decrease of serotonin might be related with epileptogenesis. Considering the neurobiology of epilepsy, we are tempted do hypothesize that a tide modulation of serotonergic system during brain development or during response to brain insults might be important for brain homeostasis and for preventing epilepsy. Variability in this system that increase or decrease serotonin availability due to more efficient or less efficient transcriptional genotypes for serotonin transporter gene increase would turn neural network more prone to epileptogenesis. This view might be supported by all theses studies that are showing that modulation of the 5-HTT gene might influence epileptogenesis or the clinical characteristics of epilepsy. These are interesting questions that certainly deserve further investigations.

In agreement with our observations, there are several studies showing that low transcriptional activity *5-HTT* genotypes are associated with neuropsychiatric disorders, among them depression (Holmes et al., 2010), suicidal behavior (Anguelova et al., 2003), attention deficit hyperactivity disorder (Kent et al., 2002), and personality disorder (Garcia et al., 2010). Curiously, a bi-directional relationship has been well established between temporal lobe epilepsy and neuropsychiatric disorders, especially mood disorders. In this venue some authors have suggested that common neurobiological substrates like neural networks or genetic factors might explain the association between epilepsy and neuropsychiatric disorders (Kanner, 2009; Bragatti et al., 2009). Thus, based on our results, we are tempted to suggest that the *5HTT* gene

might be a candidate gene involved in the genesis or clinical variability of both epilepsy or neuropsychiatric disorders. There may be several possible mechanisms for this association. For example, the excessive serotonin levels during brain development could have consequences for the size and capacity of the serotonergic system and associated neural network. This could well explain the paradoxical relation between genetic variants associated with higher levels of serotonin (such as low-function alleles of *5-HTT* polymorphisms) and the neurological disorders associated with lower serotonergic levels (Nordquist and Oreland, 2010). Thus, in our view, it is plausible that low transcriptional function genotypes of 5-HTTLPR and 5-HTTVNTR could be related to increased levels of serotonin during brain development, causing functional alterations and inhibiting the outgrowth of the serotonin system, and thus being possibly associated with risk for neuropsychiatric disorders or limbic epilepsy later in life. Further studies will be conducted in this venue to clarify these matters.

We recognize that our study might have some bias. The ethnic admixture of the Brazilian sample may be a bias in genetic association studies. However, the population of Rio Grande do Sul State is mainly composed of European descendants (82% of the population) (Cordeiro et al., 2008). Moreover, the fact that the present sample is in Hardy-Weinberg equilibrium indicates that there may not be important problems of population stratification. In addition to the ethnic stratification limitation discussed above, sample size is an important limitation of this study. Thus, negative results need to be interpreted with caution due to lack of statistical power. On the other hand, significant results are less problematic in this scenario. Even so, it is necessary to consider also the possibility of false positive associations because of cofounders such

as etiology of epilepsy and the presence of limbic lesions sclerosis in our sample. Although no patients with tumors or arteriovenous malformations were included in this study, 19% of our epileptic patients had mesial temporal lobe epilepsy associated with hippocampal sclerosis. It is possible that a study using a more homogeneous sample (e.g. only patients with hippocampal sclerosis) would produce a different result. Nevertheless it is important to observe that our sample better represents the full spectrum of temporal lobe epilepsy and that might be an advantage. Thus, considering interesting preliminary findings, we believe that further studies conducted on large populations are needed to establish the real impact of *5-HTT* polymorphisms in epileptogenesis or in the clinical characteristics of epilepsy.

In this study we observed an association between the presence of 5HTTLPR biallelic and 5-HTTVNTR less transcriptional efficient combined genotypes and TLE. In our opinion, this finding is important because it might help to elucidate epileptogenesis, especially regarding TLE. Moreover, implication of the serotonergic system in epileptogenesis might offer an interesting link to better understand the association between TLE and frequent neuropsychiatric comorbidities observed in these patients. Further studies are necessary to confirm our findings.

Acknowledgements: This work was supported by Brazilian Government Research Funds, FIPE-HCPA and CNPq (#551902/2009-4; #306644/2010-0; #483108/2010-3).

REFERENCES

Ahmad, S., Fowler, L.J. and Whitton, P.S., 2005. Lamotrigine, carbamazepine and phenytoin differentially alter extracellular levels of 5-hydroxytryptamine, dopamine and amino acids. *Epilepsy Res.* 63, 141–149.

Anguelova, M., Benkelfat, C., Turecki, G., 2003. A systematic review of association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: II. Suicidal behavior. *Molecular Psychiatry* 646–653.

Bagdy, G., Kecskemeti, V., Riba, P. and Jakus, R., 2007. Serotonin and epilepsy. *Journal of Neurochemistry* 100, 857–873.

Bateman, L.M., Li, C.S., Lin, T.C., Seyal, M., 2010. Serotonin reuptake inhibitors are associated with reduced severity of ictal hypoxemia in medically refractory partial epilepsy. *Epilepsia*. Epub ahead of print.

Bragatti, J.A., Torres, C.M., Assmann, J.B., Fontana, V., Rigotti, C.P., Hidalgo, M.P., Chaves, M.L., Bianchin, M.M., 2009. Left-sided EEG focus and positive psychiatric family history are independent risk factors for affective disorders in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 87, 169-76.

Catalano, M., 2001. Functionally gene-linked polymorphic region and genetically controlled neurotransmitters metabolism. *Eur Neuropsychopharmacol.* 11, 431-439.

Cavalheiro, E.A., Fernandes, M.J., Turski, L., Naffah-Mazzacoratti, M.G., 2004. Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. *Epilepsia* 35, 1-11.

Cordeiro, Q., Rezende Souza, B., Correa, H., Guindalini, C., Hutz, M.H., Vallada, H., Romano-Silva, M., 2008. A review of psychiatric genetics research in the Brazilian population. *Rev Bras Psiquiatr.* 415, 1-9.

Garcia, L.F., Aluja, A., Fibla, J., Cuevas, L., García, O., 2010. Incremental effect for antisocial personality disorder genetic risk combining 5-HTTLPR and 5-HTTVNTR polymorphisms. *Psychiatry Research* 177, 161-166.

Heils, A., Teufel, A., Petri, S., Stober, G., Riederer, P., Bengel, D., Lesch, P., 1996. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *Journal of Neurochemistry* 66, 2621-2624.

Holmes, A.J., Bogdan, R., Pizzagalli, D.A., 2010. Serotonin Transporter Genotype and Action Monitoring Dysfunction: A Possible Substrate Underlying Increased Vulnerability to Depression. *Neuropsychopharmacology* 35(5), 1186–1197.

Hranilovic, D., Stefulj, J., Schwab, S., Borrmann-Hassenbach, M., Albus, M., Jernej, B., Wildenauer, D., 2004. Serotonin transporter promoter and intron 2 polymorphisms: relationship between allelic variants and gene expression. *Biol Psychiatry* 55, 1090-1094.

Hecimovic, H., Jasminka, S., Lipa, C-S., Vida, D., Branimir, J., 2010. Association of serotonin transporter promoter (5-HTTLPR) and intron 2 (VNTR-2) polymorphisms with treatment response in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 91(1), 35-8.

Kanner, A.M., 2009. Depression and epilepsy: a review of multiple facets of their close relation. *Neurol Clin.* 27, 865-880.

Kauffman, M.A., Consalvo, D., Gonzalez-Morón, D., Aguirre, F., D'Alessio, L., Kochen, S., 2009. Serotonin transporter gene variation and refractory mesial temporal epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res.* 85, 231-234.

Kent, L., Doerry, U., Hardy, E., Parmar, R., Gingell, K., Hawi, Z., Kirley, A., Lowe, N., Fitzgerald, M., Gill, M., Craddock, N., 2002. Evidence that variation at the serotonin transporter gene influences susceptibility to attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): analysis and pooled analysis. *Molecular Psychiatry* 7, 908–912.

Lazarova, M., Bendotti, C., Samanin, R., 1983. Studies on the role of serotonin in different regions of the rat central nervous system on pentylentetrazole-induced seizures and the effect of Di-n-propylacetate. *Arch Pharmacol.* 322, 147–152.

Lesch, K.P., Balling, U., Gross, J., Strauss, K., Wolozin, B.L., Murphy, D.L., Riederer, P., 1994. Organization of the human serotonin transporter gene. *J Neural Transm Gen.* 157-162.

Lesh, K.P., Bengel, D., Heils, A., Sabol, S.Z., Greenberg, B.D., Petri, S. et al., 1996. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 274, 1527-1531.

Lesch, K.P., 2001. Variation of serotonergic gene expression: neurodevelopment and the complexity of response to psychopharmacologic drugs. *Eur Neuropsychopharmacol.* 11, 457-474.

Lovejoy, E.A., Scott, A.C., Fiskerstrand, C.E., Bubb, V.J., Quinn, J.P., 2003. The serotonin transporter intronic VNTR enhancer correlated with a predisposition to affective disorders has distinct regulatory elements within the domain based on the primary DNA sequence of the repeat unit. *Eur J Neurosci.* 17, 417-420.

Manna, I., Labate, A., Gambardella, A., Forabosco, P., La Russa, A., Le Piane, E., Aguglia, U., Quattrone, A., 2007. Serotonin transporter gene (5-HTT): Association analysis with temporal lobe epilepsy. *Neuroscience letters* 421, 52-56.

Miller, A.S., Dykes, D.D., Polesky, H.F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16(3), 1215.

Nakamu, M., Ueno, S., Sano, A., Tanabe, H., 2000. The human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) shows ten novel allelic variants. *Mol Psychiatry* 5(1), 32-8.

Nordquist, N. and Orelund, L., 2010. Serotonin, genetic variability, behavior, and psychiatric disorders – a review. *Uppsala Journal of Medical Sciences* 115, 2-10.

Olgivie, A.D., Battersby, S., Bubb, V.J., Harmar, A.J., Goodwin, G.M., Dale Smith, C.A., 1996. Polymorphism in serotonin transporter gene associated with susceptibility to major depression. *The Lancet* 347, 731-33.

Sander, J.W., 2003. The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr Opin Neurol.* 16(2), 165-170.

Savic, I., Lindstrom, P., Gulyas, B., Halldin, C., Andree, B., Farde, L., 2004. Limbic reductions of 5-HT_{1A} receptor binding in human temporal lobe epilepsy. *Neurology* 62, 1343-1351.

Stefulj, J., Bordukalo-Niksic, T., Hecimovic, H., Demarin, V., Jernej, B., 2010. Epilepsy and serotonin (5HT): Variation of 5HT-related genes in temporal lobe epilepsy. *Neuroscience Letters* 478, 29-31.

Weese-Mayer, D.E., Zhou, L., Berry-Kravis, E.M., Maher, B.S., Silvestri, J.M., Marazita, M.L., 2003. Association of the serotonin transporter gene with sudden infant death syndrome: a haplotype analysis. *Am J Med Genet A* 122A, 238-45.

Table 1: Distribution of 5-HTTVNTR and 5-HTTLPR–bi and triallelic genotypes in temporal lobe epilepsy (TLE) patients and controls

	Patients TLE (n=175)	Controls (n=155)	All (n=330)	p
5-HTTVNTR				
12/12	62 (35.4)	67 (43.2)	129 (39.1)	0.27
12/10	81 (46.3)	67 (43.2)	148 (44.8)	
10/10	32 (18.3)	21 (13.5)	53 (16.1)	
5-HTTLPR bialelic				
L/L	48 (27.4)	54 (34.8)	102 (30.9)	0.14
L/S	91 (52.0)	64 (41.3)	155 (47.0)	
S/S	36 (20.6)	37 (23.9)	73 (22.1)	
5-HTTLPR triallelic				
La/La	43 (24.6)	37 (23.9)	80 (24.2)	0.96
La/Lg, La/S	87 (49.7)	76 (49.0)	163 (49.4)	
S/S, Lg/S	45 (25.7)	42 (27.1)	87 (26.4)	

Values are presented as frequency (percentage).

Table 2: Combined genotypes distribution in temporal lobe epilepsy (TLE) patients and healthy controls subjects

	Patients TLE (n=175)	Controls (n=155)	All (n=330)	P
Group A (L/L 12/12)	5 (2.9)	14 (9.0)	19 (5.8)	0.028*
Group B (L/L 10/10, L/L 10/12, S/S 12/12, S/L 12/12)	101 (57.7)	93 (60.0)	194 (58.8)	
Group C (no L/L, no 12/12)	69 (39.4)	48 (31.0)	117 (35.5)	

Values are presented as frequency (percentage). (*) significant.

Tabela 3: Clinical and demographical variables of TLE patients according combined genotypes of 5-HTT polymorphisms

Variable	All (n=175)	Group A	Group B	Group C	p
Mean age of patients (y; S.D.)	44.0 (12.6)	41.0 (16.7)	43.4 (12.6)	45.2 (12.5)	0.56
Mean age of epilepsy onset (y; S.D.)	18.9 (14.2)	17.4 (16.4)	18.5 (14.6)	19.6 (13.7)	0.87
Mean time of epilepsy (y; S.D.)	25.1 (14.2)	23.5 (13.6)	24.8 (13.6)	25.6 (15.2)	0.91
Sex					
Female	114 (65.1)	4 (3.5)	68 (59.6)	42 (36.8)	
Male	61 (34.9)	1 (1.6)	33 (54.1)	27 (44.3)	0.53
Seizure control					
Yes	79 (45.1)	3 (3.8)	48 (60.8)	28 (35.4)	
No	96 (54.9)	2 (2.1)	53 (55.2)	41 (42.7)	0.53
Aura					
Present	102 (58.3)	1 (1.0)	57 (55.9)	44 (43.1)	
Absent	73 (41.7)	4 (5.5)	44 (60.3)	25 (34.2)	0.14
History of initial precipitating injury					
Yes	42 (24.0)	2 (4.8)	22 (52.4)	18 (42.9)	
No	133 (76.0)	3 (2.3)	79 (59.4)	51 (38.3)	0.57
Antiepileptic drugs					
Politerapy	87 (49.7)	2 (2.3)	49 (56.3)	36 (41.4)	
Monotherapy	88 (50.3)	3 (3.4)	52 (59.1)	33 (37.5)	0.81
Benzodiazepine use					
Yes	28 (16.0)	0	16 (57.1)	12 (42.9)	
No	147 (84.0)	5 (3.4)	85 (57.8)	57 (38.8)	0.59
Neuroimage findings					
Hippocampal sclerosis	33 (18.9)	2 (6.1)	16 (48.5)	15 (45.5)	
Other lesions (*)	29 (16.6)	1 (3.4)	16 (55.2)	12 (41.4)	
Normal	113 (64.6)	2 (1.8)	69 (61.1)	42 (37.2)	0.57

Values are presented as frequency (percentage); y=years; S.D.=standard deviation; Group A = (L/L 12/12); Group B = (L/L 10/10, L/L 10/12, S/S 12/12, S/L 12/12); Group C = (no L/L, no 12/12). (*) Other lesions on neuroimaging were neurocysticercosis, gliosis, and cortical dysplasia.

Artigo 2

Submetido à revista **PlosOne**

Manuscript Draft

Title: Serotonin Gene Polymorphisms and Psychiatry Comorbidities in Temporal Lobe Epilepsy: A Cohort Study

Article Type: Original Report

Keywords: Epilepsy, serotonergic system, 5-HTT, 5-HT1A, comorbidities, mood disorder, anxiety, psychosis, alcohol and drug abuse

Corresponding Author: Dr. Marino Muxfeldt Bianchin, M.D.

Corresponding Author's Institution: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

First Author: Laila C Schenkel, MSc

Order of Authors: Laila C Schenkel, MSc; José A Bragatti, M.D., MSc; Juliana Allebrand Becker; Carolina M Torres, M.D.; Kelin C Martin, M.D.; Ana C de Souza, M.D.; Sandra Leistner-Segal, PhD; Marino Muxfeldt Bianchin, M.D.

Serotonin Gene Polymorphisms and Psychiatry Comorbidities in Temporal Lobe Epilepsy: A Cohort Study

Laila Cigana Schenkel ^{a,b,c}

José Augusto Bragatti ^{b,c,d}

Juliana Allebrand Becker ^a

Carolina Machado Torres ^{b,c,d}

Kelin Cristine Martin ^{c,d}

Ana Claudia de Souza ^{c,d}

Sandra Leistner-Segal ^{a,c}

Marino Muxfeldt Bianchin ^{b,c,d,*}

^a Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

^b Post-Graduation Course in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

^c B.R.A.I.N., Experimental Research Centre, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

^d Division of Neurology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

* Address Correspondence to:

Marino M. Bianchin

Division of Neurology and B.R.A.I.N.

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Ramiro Barcelos, 2350,

Porto Alegre, RS, Brazil, 90035-903

mbianchin@hotmail.com

ABSTRACT

Neuropsychiatric comorbidities are frequent in temporal lobe epilepsy (TLE). It is biologically plausible that alterations in serotonin-related genes may be one of the biological mechanisms for the higher susceptibility to psychiatric disease in these individuals. Based on previous investigations, we performed a cohort study in 155 patients with TLE to evaluate the influence of 5-HTTLPR and 5-HTTVNTR polymorphisms in the *5-HTT* gene and the C-1019G polymorphism in the *5-HT1A* gene in psychiatric comorbidities of TLE. We observed that presence of C allele of 5-HT1A C-1019G polymorphism was an independent risk factor for anxiety disorders in TLE. As far as we know, this is the first study showing a biological plausible association between a functional gene polymorphism and a psychiatric comorbidity in TLE. We believe that other studies in this venue will shade some light on molecular mechanisms involved in psychiatric comorbidities in epilepsy.

KEYWORDS: Epilepsy, serotonergic system, 5-HTT, 5-HT1A, comorbidities, mood disorder, anxiety, psychosis, alcohol and drug abuse

INTRODUCTION

Epilepsy is a chronic disorder that affects people of all ages and social levels. Neuropsychiatric comorbidities are more frequent in these patients than in the general population. Among epileptic patients, those with temporal lobe epilepsy (TLE) are especially at risk to develop psychiatric disorders. The main psychiatric disorders involved in TLE, in order of frequency, are depression, anxiety and psychosis with prevalence ranging from 11 to 44 %, 15 to 25 % and 2 to 8 %, respectively [1, 2]. Evidence suggests that the association of psychiatric disorders with epilepsy might be related to common biological substrates [3, 4].

Dysfunction of serotonergic neurotransmission has been long associated with psychiatric diseases. Recent studies support that serotonin (5-HT) may also contribute to a predisposition to epilepsy. Serotonergic activation may change ionic conductance, resulting in de- or hyperpolarization of neurons, and as a consequence can cause a significant shift in the neuroexcitability involved in epilepsy [5]. There is evidence that anticonvulsants can cause increased 5-HT levels as part of their mechanisms of action [6,7]. Furthermore, agents that elevate extracellular serotonin levels inhibit both focal and generalized seizures [5]. On this basis, Savic et al. [8] found a reduced serotonin receptor (5-HT_{1A}) binding potential in limbic structures in patients with mesial TLE, supporting the hypothesis of an involvement of serotonin in the neurobiology of TLE, perhaps suggesting a mechanism underlying affective symptoms in these patients

Genes coding for proteins related to serotonin neurotransmission can regulate 5-HT availability. Of particular interest are the gene encoding the serotonin transporter

(5-HTT), responsible for the clearance of 5-HT from the synaptic cleft, and the gene encoding the serotonin receptor 1A (5-HT1A), that acts as an autoreceptor presynaptically and mediates the action of serotonin postsynaptically. Previous studies have shown two functional polymorphisms in the *5-HTT* gene, in the promoter (5-HTTLPR) and intron 2 (5-HTTVNTR) regions. 5-HTTLPR is a 44 base pair insertion/deletion polymorphism in the 5' flanking region of this gene, that gives origin to two alleles (L – long and S – short). The S allele of 5-HTTLPR has been reported to be associated with lower transcriptional efficiency of the *5-HTT* gene, resulting in lower serotonin uptake activity when compared with the L allele [9, 10]. 5-HTTVNTR consists of a variable number of tandem repeats containing 9, 10 and 12 repeats of a 17 bp sequence in intron 2 (5-HTTVNTR) [11]. The 5-HTTVNTR domain might act as a transcriptional regulator and the 12 allele has been associated with higher transcriptional activity of the *5-HTT* gene when compared to the 10 allele [12]. The *HT1A* gene contains a single nucleotide polymorphism (SNP) in the promoter region (C-1019G) that seems to regulate gene expression [13, 14]. The G allele of C-1019G has been postulated to up-regulate autoreceptor expression, but to decrease postsynaptic *5-HT1A* expression [15].

The 5-HTTLPR and 5-HTTVNTR polymorphisms in the *5-HTT* gene and the C-1019G polymorphism in the *5-HT1A* gene have been studied in various psychiatric diseases, among them depression [16, 17, 18], suicidal behavior [19, 20], anxiety [21, 22], personality disorder [23], bipolar disorder and schizophrenia [24]. Recently, some authors have evaluated the association between *5-HTT* variants and epilepsy [25, 26, 27, 28]. Most of these studies have shown that modulation of the *5-HTT* gene might

influence epileptogenesis or the clinical characteristics of epilepsy. Thus, it is biologically plausible that alterations in serotonin-related genes may be one of the biological mechanisms involved in higher susceptibility to psychiatric disease in patients with TLE. Based on these previous investigations and in a biologically plausible hypothesis, we study the contribution of 5-HTTLPR and 5-HTTVNTR and C-1019G polymorphisms in the genesis of psychiatric comorbidities in a cohort of 155 patients with TLE. As far as we know, this is the first study evaluating a possible genetic involvement in the development of psychiatric comorbidities in epilepsy.

METHODS

Patients

This is a retrospective cohort study of 155 patients with TLE of the Epilepsy Outpatient Clinic of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Inclusion criteria were based on the 1989 ILAE's electroclinical classification (Commission on Classification Terminology of the International League Against Epilepsy, 1989) [29] and neuroimaging results. Patients with extratemporal epilepsies, mental retardation, and those with systemic diseases were excluded. All patients were submitted to the Structured Clinical Interview for DSM-IV (SCID) [30]. SCID is divided into six modules, for the detection of one or more life-long diagnoses of the Axis I Diagnostic and Statistical Manual, fourth edition (DSM-IV) [31]. SCID detected Axis I Psychiatric Diagnostic in 99 (63.9%) of the 155 patients with TLE (TLE-PSYCH group). In 56 (36.1%) of the 155 TLE patients SCID was negative (TLE-ONLY group). These two groups of patients (TLE-PSYCH group and TLE-ONLY group) were compared for clinical and

genotypic differences. This study was approved by the Ethics Committee of our institution in accordance with the Declaration of Helsinki, and all subjects provided written informed consent to participate.

Genotyping

DNA was extracted from peripheral leukocytes by the salt precipitation method [32]. Subjects were genotyped for the 5-HTTLPR and 5-HTTVNTR polymorphisms in the *5-HTT* gene and the C-1019G polymorphism in the *5-HT1A* gene.

5-HTTLPR: The amplification reaction (PCR) for the 5-HTTLPR polymorphism was carried out using primers described by Heils et al. [10]. The amplified product was digested with *MspI* restriction enzyme (New England Biolabs) which allows the detection of the A/G SNP, identifying the triallelic polymorphism (La, Lg and S variants). The digestion products were visualized by 3% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining under UV light.

5-HTTVNTR: The intron 2 region of the 5-HTT gene containing the VNTR polymorphism was amplified using primers described by Weese-Mayer et al. [33]. The PCR product was visualized by 3% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. The rare 9 repeat was grouped with the 10 allele (both short alleles) and compared to the 12 variant (long allele).

C-1019G: An allele-specific polymerase chain reaction (ARMS-PCR) analysis was performed according to Parsey et al. [17]. Each sample was amplified twice using a specific primer for the G allele and another primer for the C allele [13]. Electrophoresis

was performed on 1.5% agarose gel and the amplification product was visualized under UV light.

Statistical analysis

Categorical variables were compared by the two-tailed Chi-square test and Fisher's exact test. Numerical variables were compared by the independent Student t-test, with the Levene test for equality of analysis of variance. All statistical analyses were carried out using the SPSS 14.0 statistical package for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). In order to examine the independent effect of each variable we used an unconditional binary logistic regression model. To determine the number of independent variables to be included in our logistic regression model we used the parameters suggested [34, 35, 36]. Results are reported as odds ratio (95% confidence interval) and were considered significant if p was lower than 0.05.

RESULTS

Of the 155 TLE patients, 100 (64.5%) were women and 55 (35.5%) were men. Psychiatric disorders were observed in 99 (63.9%) of the patients studied. In our sample, the most frequent psychiatric comorbidities were mood disorder (47.1%) and anxiety disorder (31.0%). The mean age of epileptic patients with psychiatric disorders (TLE-PSYCH group) and without psychiatric disorders (TLE-ONLY group) was 44.0 and 45.2 years, respectively, with no significant difference between them ($p=0.55$). Most of the patients with psychiatric disorders (TLE-PSYCH group) were women (71.7%), while only 28.3% were men, whereas in TLE-ONLY group 51.8% were women and 48.2%

were men, a significant difference for sex ($p=0.015$). The age of onset, time of disease, family history for both epilepsy and psychiatric disorders, seizure control, presence of aura, EEG interictal activity, presence of initial precipitating injury and use of benzodiazepine (BZD) did not differ between TLE patients with and without psychiatric comorbidities in our cohort. Clinical and demographic characteristics of the sample are presented in TABLE 1.

Please Insert Table 1 About Here

The genotype distribution of C-1019G, 5-HTTVNTR and 5-HTTLPR polymorphisms according to psychiatric disease in TLE patients is summarized in TABLE 2. We found no significant association between these polymorphisms in the *5-HT1A* and *5-HTT* genes and the combined presence of neuropsychiatric disorders in patients with TLE (TLE-ONLY group versus TLE-PSYCH group). However, when we analyzed each psychiatric disorder individually (mood disorder, anxiety disorder, psychosis and drug/alcohol abuse), the frequency of C-1019G polymorphism was different between TLE patients with and without anxiety disorder. The frequency of GG genotype of C-1019G polymorphism was lower in patients with anxiety disorder than in patients without anxiety, observed in 6 (12.5%) of 48 patients with anxiety disorders but 27 (25.2%) of 107 patients without anxiety disorders. This difference approached statistical significance ($p=0.058$). Because of this observation, we further studied the clinical and demographics variables of our cohort regarding the presence or absence of anxiety

disorder in TLE patients. The results of this analysis are presented in TABLE 3. In this analysis, we did not observe significant differences between clinical and demographics characteristics of TLE patients regarding the presence of anxiety disorder, except for gender. Women with TLE had more frequently anxiety disorders than men ($p=0.031$). In order to study the independence of variables as risk factor for anxiety disorders in TLE, we included sex, time of epilepsy, age of epilepsy onset and C-1019G polymorphism in a binary logistic regression model. After logistic regression, presence of C allele of *5-HT1A* C-1019G polymorphism and sex remained significantly and independently associated with anxiety disorder in TLE patients. The final results of logistic regression are presented in TABLE 4.

Please Insert Table 2 and Table 3, and Table 4 About Here

DISCUSSION

In the present study we investigated the influence of 5-HTTVNTR and 5-HTTLPR in the *5-HTT* gene and of C-1019G in the *5-HT1A* gene on psychiatric comorbidities in TLE. We observed no significant differences in these genotype frequencies among TLE patients regarding the presence of psychiatric comorbidities. As expected, women had a higher prevalence of psychiatric comorbidities than men, except for substance abuse. These results are in agreement with the literature [37, 38, 39]. Interesting, we observed that the presence of C allele was an isolated predictor of anxiety disorder in TLE.

5-HT_{1A} is highly expressed in limbic structures and serotonin activation of this receptor might have antiepileptic effect [5]. PET studies found a reduction in 5-HT_{1A} receptor binding in depressed patients [40] as well as in epileptic patients [8]. Interestingly, individuals with epilepsy plus depression have lower 5-HT_{1A} activity than those with epilepsy alone [41] and changes of the serotonergic pathway are associated with depressive symptoms in TLE patients [42]. Taken together, these studies suggest that abnormalities in the 5-HT_{1A} receptor might be a common mechanism linking epilepsy and depression. Thus, it is plausible that genetic changes in the *5-HT1A* gene altering its expression may be associated with a risk for epilepsy or for psychiatric comorbidities in epileptic patients. Here we observed that patients with the C allele of C-1019G polymorphism in the *5-HT1A* gene had higher frequency of anxiety disorder. Some studies indicate that C-1019G polymorphism impact transcriptional regulation of the gene through altered binding of the transcription factors human nuclear deformed epidermal autoregulatory factor-1 (DEAF-1) and Hairy/enhancer of split-5 (Hes5). Specifically, G allele of C-1019G polymorphism abolishes repression of the *5-HT1A* gene by DEAF-1 and partially impairs Hes5-mediated repression [43]. As a consequence it would lead to the increase of 5-HT_{1A} autoreceptor expression and, according with Fakar et al. it is associated with decrease of the amygdala reactivity [44]. Several studies have correlating amygdala reactivity with anxiety disorders [45, 46, 47]. Taken together, these evidences are in line with our results, once we observed that patients with C allele showed increased frequency of anxiety disorders, and it might be due to increased amygdala activation. In contrast, some studies have found that the G allele of C-1019G is a risk factor for the

development of neuropsychiatric diseases, among them depression and panic disorder [21, 22, 48]. As far as we know, only one study has evaluated the influence of the *5-HT1A* gene C-1019G polymorphism on epileptogenesis, showing no significant results [28]. However, no one before has evaluated the effect of *5-HT1A* gene C-1019G polymorphism on the development of neuropsychiatric disorders in TLE. Here we observed for the first time an association between *5-HT1A* gene C-1019G polymorphism and anxiety disorders in TLE.

Regarding the *5-HTT* polymorphisms (5-HTTVNTR and 5-HTTLPR), several studies have shown that low transcriptional activity *5-HTT* genotypes are associated with neuropsychiatric disorders, among them depression [16], suicidal behavior [19], attention deficit hyperactivity disorder [49], and personality disorder [23]. Moreover, recent studies have suggested that epilepsy, its severity or its response to medical treatment is associated with 5-HTTLPR and 5-HTTVNTR polymorphism [25, 26, 27]. Since *5-HTT* polymorphisms seem to be associated with both epilepsy and psychopathologies, we investigated the association of these genetic variants in psychiatric comorbidity in patients with TLE. However, despite strong biological plausibility, we were unable to demonstrate any association of 5-HTTLPR and 5-HTTVNTR with mood disorder, anxiety disorder, psychosis or drug/alcohol abuse in TLE patients. However, because of the impact of serotonin gene polymorphisms on several psychiatric diseases and the evidence of the influence of the serotonergic system on epilepsy, further studies with larger samples evaluating possible influences of serotonergic gene polymorphisms in psychiatric comorbidities in epilepsy are still necessary before reaching final conclusions.

We recognize that our work has limitations. The ethnic admixture of the Brazilian sample may be a bias in genetic studies. However, the population of Rio Grande do Sul State, where this study was conducted, is mainly composed of Caucasian European descendants (82% of the population) [50]. In addition to the ethnic stratification limitation discussed above, sample size is an important limitation of this study. Thus, negative results need to be interpreted with caution due to lack of statistical power. On the other hand, significant results are less problematic in this scenario, especially if resulting from functional polymorphisms and are biologically plausible. Moreover, our result remained significant after logistic regression, showing that the *5-HT1A* C-1019G polymorphism was independently associated with anxiety disorders in TLE.

In summary, we observed in our study that presence of C allele of *5-HT1A* C-1019G polymorphism was an independent risk factor for anxiety disorders in TLE. As far as we know, this is the first study showing a biological plausible association between a functional gene polymorphism and a psychiatric comorbidity in TLE. We believe that other studies in this venue will shade some light on molecular mechanisms involved in psychiatric comorbidities in epilepsy.

Acknowledgments: This work was supported by Brazilian Government Research Funds, FINE-HCPA and CNPq (#551902/2009-4; #306644/2010-0; #483108/2010-3). The authors have declared that no competing interests exist. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

REFERENCES

- [1] Schmitz Bettina WP (1995) Psychosis with epilepsy: frequency and risk factors. *J Epilepsy*. pp. 295-305.
- [2] Schmitz B (2006) Effects of antiepileptic drugs on mood and behavior. *Epilepsia* 47, Supl 2: S28-S33.
- [3] Torta R, Keller R (1999) Behavioral, psychotic, and anxiety disorders in epilepsy: etiology, clinical features, and therapeutic implications. *Epilepsia* 40 Suppl 10: S2-20.
- [4] Dudra-Jastrzebska M, Andres-Mach MM, Łuszczki JJ, Czuczwar SJ (2007) Mood disorders in patients with epilepsy. *Pharmacol Rep* 59: 369-378..
- [5] Bagdy G, Kecskemeti V, Riba P, Jakus R (2007) Serotonin and epilepsy. *J Neurochem* 100: 857-873.
- [6] Ahmad S, Fowler LJ, Whitton PS (2005) Lamotrigine, carbamazepine and phenytoin differentially alter extracellular levels of 5-hydroxytryptamine, dopamine and amino acids. *Epilepsy Res* 63: 141-149.
- [7] Grosso S, Bardi P, Battaglini M, Franzoni E, De Lalla A, et al. (2008) Topiramate effects on plasma serotonin levels in children with epilepsy. *Epilepsy Res* 81: 148-154.
- [8] Savic I, Lindström P, Gulyás B, Halldin C, Andréé B, et al. (2004) Limbic reductions of 5-HT_{1A} receptor binding in human temporal lobe epilepsy. *Neurology* 62: 1343-1351.
- [9] Lesch KP, Balling U, Gross J, Strauss K, Wolozin BL, et al. (1994) Organization of the human serotonin transporter gene. *J Neural Transm Gen Sect* 95: 157-162.
- [10] Heils A, Teufel A, Petri S, Stöber G, Riederer P, et al. (1996) Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem* 66: 2621-2624.
- [11] Ogilvie AD, Battersby S, Bubb VJ, Fink G, Harmar AJ, et al. (1996) Polymorphism in serotonin transporter gene associated with susceptibility to major depression. *Lancet* 347: 731-733.
- [12] Lovejoy EA, Scott AC, Fiskerstrand CE, Bubb VJ, Quinn JP (2003) The serotonin transporter intronic VNTR enhancer correlated with a predisposition to affective disorders has distinct

regulatory elements within the domain based on the primary DNA sequence of the repeat unit. *Eur J Neurosci* 17: 417-420.

[13] Wu S, Comings DE (1999) A common C-1018G polymorphism in the human 5-HT1A receptor gene. *Psychiatr Genet* 9: 105-106.

[14] Czesak M, Lemonde S, Peterson EA, Rogaeva A, Albert PR (2006) Cell-specific repressor or enhancer activities of Deaf-1 at a serotonin 1A receptor gene polymorphism. *J Neurosci* 26: 1864-1871.

[15] Savitz J, Lucki I, Drevets WC (2009) 5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder. *Prog Neurobiol* 88: 17-31.

[16] Holmes AJ, Bogdan R, Pizzagalli DA (2010) Serotonin transporter genotype and action monitoring dysfunction: a possible substrate underlying increased vulnerability to depression. *Neuropsychopharmacology* 35: 1186-1197.

[17] Parsey RV, Oquendo MA, Ogden RT, Olvet DM, Simpson N, et al. (2006) Altered serotonin 1A binding in major depression: a [carbonyl-C-11]WAY100635 positron emission tomography study. *Biol Psychiatry* 59: 106-113.

[18] Kishi T, Tsunoka T, Ikeda M, Kawashima K, Okochi T, et al. (2009) Serotonin 1A receptor gene and major depressive disorder: an association study and meta-analysis. *J Hum Genet* 54: 629-633.

[19] Anguelova M, Benkelfat C, Turecki G (2003) A systematic review of association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: I. Affective disorders. *Mol Psychiatry* 8: 574-591

[20] Serretti A, Mandelli L, Giegling I, Schneider B, Hartmann AM, et al. (2007) HTR2C and HTR1A gene variants in German and Italian suicide attempters and completers. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B: 291-299.

[21] Freitag CM, Domschke K, Rothe C, Lee YJ, Hohoff C, et al. (2006) Interaction of serotonergic and noradrenergic gene variants in panic disorder. *Psychiatr Genet* 16: 59-65.

[22] Hettema JM, An SS, van den Oord EJ, Neale MC, Kendler KS, et al. (2008) Association study between the serotonin 1A receptor (HTR1A) gene and neuroticism, major depression, and anxiety disorders. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B: 661-666.

- [23] Garcia LF, Aluja A, Fibla J, Cuevas L, García O (2010) Incremental effect for antisocial personality disorder genetic risk combining 5-HTTLPR and 5-HTTVNTR polymorphisms. *Psychiatry Res* 177: 161-166.
- [24] Kishi T, Okochi T, Tsunoka T, Okumura T, Kitajima T, et al. (2011) Serotonin 1A receptor gene, schizophrenia and bipolar disorder: An association study and meta-analysis. *Psychiatry Res* 185: 20-26.]
- [25] Kauffman MA, Consalvo D, Gonzalez-Morón D, Aguirre F, D'Alessio L, et al. (2009) Serotonin transporter gene variation and refractory mesial temporal epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res* 85: 231-234.
- [26] Hecimovic H, Jasminka S, Lipa CS, Vida D, Branimir J (2010) Association of serotonin transporter promoter (5-HTTLPR) and intron 2 (VNTR-2) polymorphisms with treatment response in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 91: 35-38.
- [27] Manna I, Labate A, Gambardella A, Forabosco P, La Russa A, et al. (2007) Serotonin transporter gene (5-Htt): association analysis with temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett* 421: 52-56.
- [28] Stefulj J, Bordukalo-Niksic T, Hecimovic H, Demarin V, Jernej B (2010) Epilepsy and serotonin (5HT): variations of 5HT-related genes in temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett* 478: 29-31.
- [29] Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy (1989) *Epilepsia* 30: 389-399.
- [30] First M, Spitzer, RL, Gibbon, M, Williams, JBW (2001) Structured Clinical Interview for Axis I DSM-IV-TR Disorders: Non-Patient Edition. Biometrics Research Department, New York State Psychiatric Institute.
- [31] Association AP (2000) American Psychiatric Association, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV: American Psychiatric Press, Washington.
- [32] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.

- [33] Weese-Mayer DE, Zhou L, Berry-Kravis EM, Maher BS, Silvestri JM, et al. (2003) Association of the serotonin transporter gene with sudden infant death syndrome: a haplotype analysis. *Am J Med Genet A* 122A: 238-245.
- [34] Stevens J (1996) *Applied multivariate statistic for the social sciences*. 3rd ed. Rahway, New Jersey: Lawrence Erlbaum.
- [35] Hosmer D, Lemeshow S (1989) *Applied logistic regression*. John Wiley and Sons, Inc.
- [36] Tabachnick B, Fidell L (1996) *Using multivariate statistics*. 3rd ed. Harper Collins.
- [37] Andrade LHSG, Viana MC, Silveira CM (2006) Epidemiology of women's psychiatric disorders. *Rev. Psiq. Clín.* 33 (2): 43-54.
- [38] Bragatti JA, Torres CM, Assmann JB, Fontana V, Rigotti CP, et al. (2009) Left-sided EEG focus and positive psychiatric family history are independent risk factors for affective disorders in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 87: 169-176.
- [39] Bragatti JA, Torres CM, Londero RG, Assmann JB, Fontana V, et al. (2010) Prevalence of psychiatric comorbidities in temporal lobe epilepsy: the value of structured psychiatric interviews. *Epileptic Disord* 12: 283-291.
- [40] Drevets WC, Frank E, Price JC, Kupfer DJ, Holt D, et al. (1999) PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression. *Biol Psychiatry* 46: 1375-1387.
- [41] Theodore WH (2003) Does Serotonin Play a Role in Epilepsy? *Epilepsy Curr* 3: 173-177.
- [42] Lothe A, Didelot A, Hammers A, Costes N, Saoud M, et al. (2008) Comorbidity between temporal lobe epilepsy and depression: a [18F]MPPF PET study. *Brain* 131: 2765-2782.
- [43] Lemonde S, Turecki G, Bakish D, Du L, Hrdina PD, et al. (2003) Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide. *J Neurosci* 23: 8788-8799.
- [44] Fakra E, Hyde LW, Gorka A, Fisher PM, Muñoz KE, et al. (2009) Effects of HTR1A C(-1019)G on amygdala reactivity and trait anxiety. *Arch Gen Psychiatry* 66: 33-40.
- [45] Somerville LH, Kim H, Johnstone T, Alexander AL, Whalen PJ (2004) Human amygdala responses during presentation of happy and neutral faces: correlations with state anxiety. *Biol Psychiatry* 55: 897-903.

- [46] Stein MB, Goldin PR, Sareen J, Zorrilla LT, Brown GG (2002) Increased amygdala activation to angry and contemptuous faces in generalized social phobia. *Arch Gen Psychiatry* 59: 1027-1034.
- [47] Schwartz CE, Wright CI, Shin LM, Kagan J, Rauch SL (2003) Inhibited and uninhibited infants "grown up": adult amygdalar response to novelty. *Science* 300: 1952-1953.
- [48] Le François B, Czesak M, Steubl D, Albert PR (2008) Transcriptional regulation at a HTR1A polymorphism associated with mental illness. *Neuropharmacology* 55: 977-985.
- [49] Kent L, Doerry U, Hardy E, Parmar R, Gingell K, et al. (2002) Evidence that variation at the serotonin transporter gene influences susceptibility to attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): analysis and pooled analysis. *Mol Psychiatry* 7: 908-912.
- [50] Cordeiro Q, Rezende Souza B, Correa H, Guindalini C, Vallada H, et al. (2008) A review of psychiatric genetics research in the Brazilian population. *Rev Bras Psiquiatr.* 415(1):1–9.

TABLE 1: Clinical and demographic characteristics of TLE patients with and without neuropsychiatric comorbidities

Variable	All (n=155)	TLE-ONLY group (n=56)	TLE-PSYCH group (n=99)	P
Mean age in years (S.D.)	44.6 (12.5)	45.2 (12.2)	44.0 (12.8)	0.55
Mean age of onset in years (S.D.)	19.0 (14.8)	19.0 (15.0)	19.1 (14.6)	0.96
Mean time of disease in years (S.D.)	25.6 (14.0)	26.2 (13.4)	24.9 (14.5)	0.57
Female sex	100 (64.5)	29 (51.8)	71 (71.7)	0.015*
Family history of epilepsy	52 (33.5)	18 (32.1)	34 (34.3)	0.86
Family history of psychiatric disease	52 (33.5)	13 (23.2)	39 (39.4)	0.05
Seizure control	71 (45.8)	27 (48.2)	44 (44.4)	0.74
Presence of Aura	75 (48.4)	28 (50.0)	47 (47.5)	0.87
EEG interictal unilateral	90 (58.1)	34 (60.7)	56 (56.6)	0.73
Initial Precipitating Injury	38 (24.5)	14 (25.0)	24 (24.2)	1.0
Benzodiazepine Use	27 (17.4)	8 (14.3)	19 (19.2)	0.51

Values are presented as frequency (percentage) or mean (S.D.). TLE-PSYCH and TLE-ONLY groups = Temporal lobe epilepsy patients with and without psychiatric comorbidities respectively. (*) significant.

TABLE 2: Genotype distribution of C-1019G in 5-HT1A gene, 5-HTTVNTR and 5-HTTLPR in 5-HTT gene in temporal lobe epilepsy (TLE) patients according to neuropsychiatric diseases

	TLE-ONLY group	TLE-PSYCH group	Mood Disorder	Anxiety Disorder	Psychosis	Alcohol/Drug abuse
All (n=155)	56 (36.1)	99 (63.9)	73 (47.1)	48 (31.0)	14 (9.0)	8 (5.2)
C-1019G						
CC	13 (23,2)	27 (27.3)	21 (28.8)	10 (20.8)	5 (35.7)	3 (37.5)
CG	28 (50,0)	54 (54.5)	38 (52.1)	32 (66.7)	8 (57.1)	3 (37.5)
GG	15 (26,8)	18 (18.2)	14 (19.2)	6 (12.5)	1 (7.1)	2 (25.0)
P		0.447	0.678	0.058	0.353	0.644
5-HTTVNTR						
10/10	6 (10,7)	22 (22.2)	16 (21.9)	10 (20.8)	2 (14.3)	3 (37.5)
10/12	28 (50,0)	43 (43.4)	32 (43.8)	19 (39.6)	9 (64.3)	3 (37.5)
12/12	22 (39,3)	34 (34.3)	25 (34.2)	19 (39.6)	3 (21.4)	2 (25.0)
P		0.202	0.500	0.573	0.335	0.336
5-HTTLPR						
SS	14 (25,0)	19 (19.2)	15 (20.5)	10 (20.8)	1 (7.1)	0
SL	26 (46,4)	53 (53.5)	37 (50.7)	26 (54.2)	10 (71.4)	5 (62.5)
LL	16 (28,6)	27 (27.3)	21 (28.8)	12 (25.0)	3 (21.4)	3 (37.5)
P		0.624	0.956	0.846	0.231	0.316

Values are presented as frequency (percentage). TLE-PSYCH and TLE-ONLY groups = Temporal lobe epilepsy patients with and without psychiatric comorbidities respectively.

TABLE 3: Clinical and demographic characteristics of TLE patients according Anxiety Disorder

Variables	All (n=155)	No Anxiety Disorder (n=107)	Anxiety Disorder (n=48)	P
Mean age in years (S.D.)	44.6 (12.5)	12.3 (1.18)	13.4 (1.93)	0.56
Mean age of onset in years (S.D.)	19.0 (14.8)	14.2 (1.37)	15.8 (2.28)	0.18
Mean time of disease in years (S.D.)	25.6 (14.0)	13.3 (1.28)	15.4 (2.23)	0.63
Female sex	100 (64.5)	63 (58.9)	37 (77.1)	0.03*
Family history of epilepsy	52 (33.5)	36 (33.6)	16 (33.3)	1.00
Family history of psychiatric disease	52 (33.5)	36 (33.6)	16 (33.3)	1.00
Seizure control	71 (45.8)	51 (47.7)	20 (41.7)	0.60
Presence of Aura	75 (48.4)	53 (49.5)	22 (45.8)	0.73
EEG interictal unilateral	90 (58.1)	63 (58.9)	27 (56.3)	0.86
Initial Precipitating Injury	38 (24.5)	26 (24.3)	12 (25.0)	1.00
Benzodiazepine Use	27 (17.4)	20 (18.7)	7 (14.6)	0.65
C allele of C-1019G	122 (78.7)	80 (74.8)	42 (87.5)	0.07
G allele of C-1019G	115 (74.2)	77 (72.0)	38 (79.2)	0.34

Values are presented as frequency (percentage) or mean (S.D.). (*) significant.

TABLE 4: Risk Factors for Anxiety Disorders after Logistic Regression

Variables	No Anxiety Disorders n=107	Anxiety Disorders n=48	O.R. (95% C.I.)	p
Sex				
Female	63 (58.9)	37 (77.1)		
Male	44 (41.1)	11 (22.9)	2.38 (1.08 – 5.28)	0.03*
Mean age of onset in years (S.D.)	14.2 (1.37)	15.8 (2.28)	1.00 (0.97 – 1.03)	1.00
Mean time of disease in years (S.D.)	13.3 (1.28)	15.4 (2.23)	0.98 (0.95 – 1.02)	0.28
C-1019G				
Presence of C allele	80 (74.8)	42 (87.5)	2.82 (1.02 - 7.81)	0.04*
Presence of G allele	77 (72.0)	38 (79.2)	1.78 (0.75 - 4.23)	0.19

Values are presented frequency (percentage) or mean (S.D.). (*) significant.

Considerações Finais

O presente trabalho estudou aspectos de susceptibilidade genética em pacientes com epilepsia do lobo temporal (ELT). Como genes candidatos, foram analisados genes associados com a neurotransmissão serotoninérgica, visto que a serotonina parece contribuir com a etiologia da epilepsia, assim como de psicopatologias. As variantes genéticas estudadas foram dois polimorfismos funcionais no gene do transportador da serotonina (5HTTLPR e 5HTTVNTR) e um SNP no gene do receptor da serotonina 1A (C-1019G). Em um primeiro momento foi realizado um estudo de caso-controle para avaliar a influência destes polimorfismos e a presença de ELT. Já em uma segunda análise, avaliou-se a influência destas variantes genéticas no desenvolvimento de comorbidades psiquiátricas nos pacientes epiléticos.

Os polimorfismos 5HTTLPR e 5-HTTVNTR no gene do transportador da serotonina, quando analisados agrupados pela expressividade do gene, foram associados com a ELT. Sendo que genótipos relacionados com a baixa atividade transcricional do gene foram associados com uma maior susceptibilidade a epilepsia.

Em relação à presença de transtornos psiquiátricos (transtorno de humor, ansiedade, psicose e abuso de álcool/drogas) nos pacientes com ELT não foi encontrada associação com os polimorfismos do gene 5-HTT. Entretanto, o polimorfismo C-1019G do receptor da serotonina 1A foi associado com transtorno de ansiedade nos pacientes epiléticos. Pacientes que tinham o alelo C do C-1019G apresentaram mais ansiedade que pacientes sem este alelo. Visto que as variantes

genéticas dos genes do transportador da serotonina e do receptor 5-HT1A têm sido associadas com diversas psicopatologias, a associação destas com as comorbidades psiquiátricas na epilepsia são plausíveis.

Alguns estudos já foram realizados pelo nosso grupo, avaliando aspectos clínicos, psiquiátricos e genéticos dos pacientes com ELT. Dentre os genes candidatos já estudados está o BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), com resultados ainda não significativos. Mais estudos devem ser realizados avaliando alterações genéticas em outros genes candidatos à epilepsia, como os genes relacionados com a neurotransmissão dopaminérgica, noradrenérgica e proteínas receptoras no SNC. A pesquisa global de todos estes genes relacionados com o funcionamento cerebral em regiões envolvidas com a epilepsia poderá ajudar na compreensão da etiologia desta doença, assim como auxiliar no desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e na identificação de indivíduos susceptíveis.

Apêndice 1

Dados não submetidos à publicação

Análise da associação do polimorfismo C-1019G com a ELT

A frequência do polimorfismo C-1019G no gene do receptor 5-HT1A foi comparada entre pacientes com epilepsia do lobo temporal (ELT) e controles saudáveis. Estudos sugerem que a presença do alelo G pode influenciar a atividade serotoninérgica, diminuindo a transcrição do *5-HT1A*. O polimorfismo C-1019G foi analisado de acordo com a distribuição dos genótipos (CC x CG x GG) e também de acordo com os genótipos agrupados segundo a atividade de transcrição gênica (CC versus CG, GG). Estes resultados estão apresentados nas tabelas abaixo (tabela 1 e tabela 2).

Tabela 1: Distribuição genotípica do polimorfismo C-1019G nos pacientes com ELT e controles

	Pacientes (n=161)	Controles (n=153)	<i>p</i>
CC	40 (28.4)	44 (28.8)	
CG	86 (53.4)	76 (49.7)	
GG	35 (21.7)	33 (21.6)	0.718

Tabela 2: Distribuição dos genótipos agrupados do polimorfismo C-1019G nos pacientes com ELT e controles

	Pacientes (n=161)	Controles (n=153)	<i>p</i>
CC	40 (28.4)	44 (28.8)	
CG, GG	121 (75.2)	109 (71.2)	0.447

Não foi encontrada associação do polimorfismo C-1019G e a ELT. Este polimorfismo parece não influenciar na susceptibilidade a epilepsia, uma vez que sua frequência não difere entre casos e controles. Nosso resultado está de acordo com o estudo de Stefulj e colaboradores, 2010, no qual não foi demonstrada associação deste SNP com ELT. Entretanto, como há evidências que variações no receptor da serotonina 1A estão associadas com a epilepsia, estudos avaliando alterações funcionais e moleculares neste receptor podem ajudar no entendimento da relação do receptor 5-HT1A e da via serotoninérgica com a epilepsia.

Anexo 1

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Serviço de Genética Médica

Laboratório de Genética Molecular

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (1)

TÍTULO DA PESQUISA: Influência de polimorfismos no gene do transportador da serotonina e do receptor 5HT1A na epilepsia do lobo temporal

Estamos lhe convidando, através deste termo de consentimento, a participar de um estudo que tem por objetivo contribuir para o tratamento da sua doença no futuro. Esta pesquisa visa identificar a presença de polimorfismos no gene do transportador da serotonina (5-HTT) e no gene do receptor da serotonina (5-HT1A) utilizando o DNA obtido do sangue dos pacientes, e a influência destes nas características clínicas da epilepsia de lobo temporal.

Se você concordar em participar deste estudo, acontecerá o seguinte:

1. Responderá a algumas questões sobre sua história clínica, para confirmar o diagnóstico de epilepsia do lobo temporal. Isto levará cerca de 15 minutos.
2. Será submetido a um exame físico e neurológico simples, com cerca de 10 minutos de duração.
3. Será feita uma coleta de sangue com agulha no seu braço, para estudar a presença ou não da alteração genética em questão. A agulha geralmente causa

um desconforto que não dura mais do que 1 minuto. Eventualmente podem ocorrer hematomas ou uma infecção leve, mas é pouco provável.

4. O material colhido ficará armazenado no Serviço de Genética do HCPA por um período máximo de 5 anos. Caso sejam realizadas outras análises, será solicitada autorização ao Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, e você será contatado novamente.

Você pode não ter benefícios diretos da participação nesta pesquisa. Entretanto, poderá saber se possui ou não uma alteração genética com possível influência sobre a gravidade de sua doença. Realizará os exames acima descritos gratuitamente.

Se você sofrer algum dano como resultado da participação nesta pesquisa, terá atendimento ao seu dispor. Para obter maiores informações sobre este assunto, poderá contatar a Comissão de Ética em Pesquisa do HCPA, ramal 8304.

Os resultados dos exames realizados durante o estudo serão discutidos com você, e estarão ao seu dispor para eventuais consultas com médico (s) particular (es) ou de outra (s) instituição (s). Com exceção dessa liberação de resultados, todas as informações obtidas neste estudo serão consideradas confidenciais e usadas estritamente para fins de pesquisa. Os dados deste trabalho serão divulgados sem que o nome dos participantes seja revelado.

O investigador, Dr. José Augusto Bragatti, discutirá estas informações com você, oferecendo-se para responder suas dúvidas. Caso você tenha perguntas adicionais, poderá contatá-lo pelo telefone (51) 2101-8520.

A pesquisadora Sandra Leistner-Segal, responsável por este estudo, também se dispõe para responder suas dúvidas. Poderá contatá-la pelo telefone (51) 2101-8011.

Sua participação no estudo é totalmente voluntária, sendo você livre para recusar a tomar parte ou abandonar a pesquisa a qualquer momento, sem afetar ou pôr em risco seu futuro atendimento médico na instituição.

() Concordo em participar deste estudo. Recebi uma cópia do presente termo e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer dúvidas.

() Autorizo armazenamento do material para estudos posteriores.

() não autorizo armazenamento do material para estudos posteriores.

Paciente:

Responsável legal (quando for o caso):

Documento de identidade do responsável legal:

Assinatura do paciente ou do responsável legal:

Pesquisadora responsável: Sandra Leistner-Segal

Endereço: Rua Ramiro Barcelos, 2350, 3º andar – Centro de Pesquisas

Cidade: Porto Alegre CEP: 90035-903 Telefone: (51) 2101-8011

Assinatura e carimbo do médico

Data

Anexo 2

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Serviço de Genética Médica

Laboratório de Genética Molecular

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (2)

TÍTULO DA PESQUISA: Influência de polimorfismos no gene do transportador da serotonina e do receptor 5HT1A na epilepsia do lobo temporal

Estamos lhe convidando, através deste termo de consentimento, a participar de um estudo que tem por objetivo contribuir para o tratamento da sua doença no futuro. Esta pesquisa visa identificar a presença de polimorfismos no gene do transportador da serotonina (5-HTT) e no gene do receptor da serotonina (5-HT1A) utilizando o DNA obtido do sangue dos pacientes, e a influência destes nas características clínicas da epilepsia de lobo temporal.

Você já participou de um estudo, projeto 06-568, e autorizou o armazenamento do seu material para estudos posteriores. Estamos contatando-lhe para convidá-lo a participar deste novo estudo. Como você já realizou a entrevista clínica, o exame físico e neurológico e a coleta de sangue para extração de DNA, para o projeto 06-568 “ESTUDO DO EFEITO DO POLIMORFISMO VAL66MET DO GENE DO BDNF EM COMORBIDADES PSIQUIÁTRICAS NOS PACIENTES COM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL”, não será necessário refazer estes procedimentos. Apenas pedimos sua autorização para utilizar seu material de DNA armazenado no Serviço de

Genética do HCPA e seus dados clínicos e exames físicos e neurológicos para o presente estudo.

Você pode não ter benefícios diretos da participação nesta pesquisa. Entretanto, poderá saber se possui ou não uma alteração genética com possível influência sobre a gravidade de sua doença. Realizará os exames acima descritos gratuitamente.

Se você sofrer algum dano como resultado da participação nesta pesquisa, terá atendimento ao seu dispor. Para obter maiores informações sobre este assunto, poderá contatar a Comissão de Ética em Pesquisa do HCPA, ramal 8304.

Os resultados dos exames realizados durante o estudo serão discutidos com você, e estarão ao seu dispor para eventuais consultas com médico (s) particular (es) ou de outra (s) instituição (s). Com exceção dessa liberação de resultados, todas as informações obtidas neste estudo serão consideradas confidenciais e usadas estritamente para fins de pesquisa. Os dados deste trabalho serão divulgados sem que o nome dos participantes seja revelado.

O investigador, Dr. José Augusto Bragatti, discutirá estas informações com você, oferecendo-se para responder suas dúvidas. Caso você tenha perguntas adicionais, poderá contatá-lo pelo telefone (51) 2101-8520.

A pesquisadora Sandra Leistner-Segal, responsável por este estudo, também se dispõe para responder suas dúvidas. Poderá contatá-la pelo telefone (51) 2101-8011.

Sua participação no estudo é totalmente voluntária, sendo você livre para recusar a tomar parte ou abandonar a pesquisa a qualquer momento, sem afetar ou pôr em risco seu futuro atendimento médico na instituição.

() Concordo em participar deste estudo. Recebi uma cópia do presente termo e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer dúvidas.

() Autorizo uso do material para este estudo.

() não autorizo uso do material para este estudos.

Paciente:

Responsável legal (quando for o caso):

Documento de identidade do responsável legal:

Assinatura do paciente ou do responsável legal:

Pesquisadora responsável: Sandra Leistner-Segal

Endereço: Rua Ramiro Barcelos, 2350, 3º andar – Centro de Pesquisas

Cidade: Porto Alegre CEP: 90035-903 Telefone: (51) 2101-8011

Assinatura e carimbo do médico

Data