

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

Doutorado

Estudo de Alelos Variantes do Gene da  
Tirosina Kinase B (*NTRK2*) na Epilepsia do Lobo  
Temporal

Aluna: Carolina Machado Torres

2015

Porto Alegre

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

Doutorado

Estudo de Alelos Variantes do Gene da  
Tirosina Kinase B (*NTRK2*) na Epilepsia do Lobo  
Temporal

Aluna: Carolina Machado Torres

Orientador: Prof. Dr. Marino Muxfeldt Bianchin

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Saraiva Pereira

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção  
do título de Doutor em Medicina: Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## **Banca Examinadora**

**Professora Gisele Gus Manfro** – Programa de Pós-Graduação em Neurociências da UFRGS

**Professora Lavínia Schüler Faccini** – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS

**Professor Matheus Roriz**- Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UFRGS

**Professor Pedro Schestatski**- Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UFRGS

Machado Torres, Carolina

Estudo de Alelos Variantes do Gene da Tirosina  
Kinase 2 (NTRK2) na Epilepsia do Lobo Temporal /  
Carolina Machado Torres. -- 2015.

122 f.

Orientador: Marino Muxfeldt Bianchin.

Coorientadora: Maria Luiza Saraiva Pereira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Epilepsia do Lobo Temporal. 2. Gene NTRK2. 3.  
Neurotrofinas. 4. Comorbidades psiquiátricas. 5.  
Polimorfismos do NTRK2. I. Muxfeldt Bianchin,  
Marino, orient. II. Saraiva Pereira, Maria Luiza,  
coorient. III. Título.

## **Agradecimentos**

Aos meus pais Paulo Nicolau Torres (*in memoriam*) e Lacy Machado Torres, por serem exemplos de vida;

Ao meu marido Thiago Quedi Furian, pelo incentivo e companheirismo;

A minha filha Bibiana Torres Furian, por ter cedido um pouco do seu tempo de criança para que eu terminasse este trabalho;

Ao meu orientador, Prof. Marino Muxfeldt Bianchin, por dispensar um pouco da sua genialidade para me ajudar nessa tarefa;

A minha co-orientadora, Profa. Maria Luiza Saraiva Pereira, cuja colaboração viabilizou a realização desta tese;

Ao Serviço de Genética Médica do HCPA;

Aos colegas José Augusto Bragatti, Suzana Schönwald e Rosane Brondani;

Ao Prof. Luis Nelson Teixeira Fernandes, pelo incentivo e receptividade;

A colega Isabel Bandeira, pela ajuda com conceitos de genética,

Aos bolsistas de iniciação científica Pedro Cherubini, Paulo de Tarso Belmonte Fagundes, Suelen Mandelli Mota, Ingridi Silveira e Martina Camerini Marafon ;

Aos pacientes com Epilepsia que participaram do estudo;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UFRGS;

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre;

Ao CNPq e FAPERGS, pelo apoio financeiro.

***“Todo o conhecimento humano começou com intuições, passou daí aos conceitos e terminou com as idéias”.***

***Immanuel Kant***

## Resumo

**Introdução** O gene *NTRK2* codifica um receptor pertencente a família de neurotrofinas Tirosina Kinase, conhecido como TrkB. O TrkB é um receptor de membrana com propriedades relacionadas a sinalização e diferenciação celular que tem sido envolvido em transtornos neuropsiquiátricos.

**Objetivo** Estudar as freqüências de alelos variantes do gene *NTRK2* em pacientes com epilepsia do lobo temporal (ELT) comparado a controles sem epilepsia. O impacto desses polimorfismos em variáveis clínicas e psiquiátricas dos pacientes com ELT também foi analisado.

**Métodos** Inicialmente, realizamos estudo de caso-controle comparando as freqüências dos polimorfismos do TrkB em 198 pacientes Brasileiros com origem Européia com ELT e 200 controles sem epilepsia. Na segunda parte, foi avaliado o impacto das variantes alélicas em características clínicas e eletroencefalográficas dos pacientes com epilepsia. Os seguintes polimorfismos foram avaliados: rs1867283A>G, rs10868235C>T, rs1147198G>T, rs11140800A>T, rs1187286G>T, rs2289656A>G, rs1624327A>G, rs1443445A>G, rs3780645C>T, rs2378672C>T. Por fim, 163 pacientes com ELT foram avaliados com uma entrevista psiquiátrica (SCID-I) para detecção de transtornos psiquiátricos ao longo da vida e esses achados foram analisados em relação aos polimorfismos do gene *NTRK2*.

**Resultados** Pacientes com epilepsia do lobo temporal evidenciaram um aumento significativo de Timina em homozigose no SNP rs10868235 do gene *NTRK2* quando comparados ao grupo controle (O.R.=1.90; 95%IC=1.17-3.09;  $p= 0.01$ ). Não foram encontradas outras diferenças entre pacientes e controles. Pacientes com Adenina em homozigose no SNP rs1443445 do gene *NTRK2* tiveram uma média de idade de início de crises mais baixa quando comparados aos demais pacientes ( $p<0.01$ ). Também observamos que a presença de Timina foi significativamente mais freqüente no SNP rs3780645 do gene *NTRK2* em pacientes que necessitam politerapia para o controle de crises se comparados aos que estão em monoterapia. Esse achado pode significar uma maior dificuldade em obter o controle das crises nesse grupo de pacientes (O.R.= 4.13; 95%IC= 1.68-10.29;  $p= 0.001$ ).

Após essa análise, estudamos 163 pacientes com ELT em relação a presença ou não de comorbidades psiquiátricas. A avaliação psiquiátrica foi realizada através da aplicação do SCID-I (Entrevista Clínica Estruturada para Detecção de Transtornos Psiquiátricos de Eixo I do DSM-IV). Setenta e seis pacientes (46.6%) apresentaram transtornos de humor. Sexo feminino, transtorno de ansiedade, genótipo A/A no SNP rs1867283 e genótipo C/C no SNP rs10868235 do gene *NTRK2* foram todos fatores independentemente associados com transtornos de humor nesses pacientes. Transtornos depressivos foram os que mais contribuíram para esses resultados. Após a regressão logística, fatores de risco independentes para transtornos depressivos em pacientes com ELT foram sexo feminino (OR=2.54; 95%IC=1.18-5.47;  $p=0.017$ ), presença de transtorno de ansiedade concomitante (OR=3.30; 95%IC=1.58-6.68;  $p=0.001$ ), genótipo A/A no SNP rs1867283 do gene *NTRK2* (OR=2.84; 95%IC=1.19-6.80;  $p=0.019$ ), e genótipo C/C no SNP rs10868235 do gene *NTRK2* (OR=2.74; IC=1.28-5.88;  $p=0.010$ ).

**Conclusões** Observamos que pacientes com ELT apresentam uma distribuição alélica distinta do gene *NTRK2* quando comparados a controles sem epilepsia e que a variabilidade alélica do *NTRK2* influenciou a idade de início de crises e talvez a resposta a terapia farmacológica anticonvulsivante. O sexo feminino, transtornos de ansiedade e variações alélicas no gene *NTRK2* foram todos fatores de risco independentes para transtornos de humor ou transtornos depressivos em pacientes com ELT. Até onde temos conhecimento, este é o primeiro estudo evidenciando associações de variantes alélicas do gene *NTRK2* em ELT. Acreditamos que outros estudos nessa área ajudarão a elucidar melhor os mecanismos envolvidos na epileptogênese do lobo temporal. Se nossos resultados forem confirmados, as variantes alélicas do gene *NTRK2* poderiam ser usadas como um biomarcador para transtornos depressivos em pacientes com ELT.

**Palavras chave:** Epilepsia de lobo temporal, *NTRK2*, TrkB, polimorfismos.



## Abstract

**Introduction** The *NTRK2* gene encodes a member of the neurotrophic tyrosine kinase family receptor known as TrkB. It is a membrane-associated receptor with signaling and cellular differentiation properties that has been involved in neuropsychiatric disorders.

**Objective** Study the frequencies of *NTRK2* allele variants in patients with temporal lobe epilepsy (TLE) compared to controls without epilepsy. The impact of these polymorphisms on major clinical and psychiatric variables in TLE was also explored.

**Methods** A case-control study comparing the frequencies of the TrkB gene polymorphism in 198 TLE Brazilian with European origin patients and in 200 matching controls without epilepsy. In a second step, the impact of allelic variation on major clinical and electroencephalographic variables in epilepsy was evaluated in the group of TLE patients. The following polymorphisms were evaluated: rs1867283A>G, rs10868235C>T, rs1147198G>T, rs11140800A>T, rs1187286G>T, rs2289656A>G, rs1624327A>G, rs1443445A>G, rs3780645C>T, rs2378672C>T. At last, 163 TLE patients were evaluated with a psychiatry interview (SCID-I) to detect lifelong psychiatric comorbidities and this findings were analyzed in relation to *NTRK2* polymorphisms.

**Results** Patients with temporal lobe epilepsy showed a significant increase of thymine homozygosis in the rs10868235 *NTRK2* SNP when compared with the control group (O.R.=1.90; 95%CI=1.17-3.09;  $p= 0.01$ ) . There were no other differences between patients and controls. Patients with adenine homozygosis in the rs1443445 *NTRK2* SNP showed an earlier mean age of seizure onset when compared with other patients ( $p<0.01$ ). Also, we observed that thymine was significantly more frequent in the rs3780645 *NTRK2* SNP in patients that needed polytherapy for seizure control when compared to those in monotherapy. This finding perhaps reflects an increased difficulty to exert seizure control in this group of patients (O.R.= 4.13; 95%CI= 1.68-10.29;  $p= 0.001$ ).

We also analyzed 163 patients in the TLE group in relation to presence of psychiatric comorbidities. Psychiatric evaluation was performed using the SCID-I (Structured Clinical Interview for DSM-IV, Axis I). Seventy six patients (46.6%) showed mood disorders. Female sex, anxiety disorders, A/A genotype in rs1867283 *NTRK2*, and C/C genotype in the rs10868235 *NTRK2* gene were all independently associated with mood disorders in these patients. Depressive disorders mostly accounted for these results. After logistic regression, independent risk factors for depressive disorder in TLE were female sex (OR=2.54; 95%CI=1.18-5.47;  $p=0.017$ ), presence of concomitant anxiety disorders (OR=3.30; 95%CI=1.58-6.68;  $p=0.001$ ), A/A genotype in rs1867283 *NTRK2* (OR=2.84; 95%CI=1.19-6.80;  $p=0.019$ ), and C/C genotype in rs10868235 *NTRK2* gene (OR=2.74; 1.28-5.88;  $p=0.010$ ).

**Conclusions** We observed that patients with epilepsy showed a difference in *NTRK2* allelic distribution when compared with controls without epilepsy, and that *NTRK2* variability influenced age of seizure onset and perhaps pharmacologic response to seizure control. Female sex, anxiety disorders and allelic variations in *NTRK2* gene were all independent risk factors for mood disorder or depressive disorders in TLE. . As far as we know, this is the first study showing an association between *NTRK2* allele variants in temporal lobe epilepsy. We believe that other studies in this venue will shade some light on the molecular mechanisms involved in temporal epileptogenesis. If our results were confirmed, *NTRK2* gene allele variants could be used as a biomarker for depressive disorders in patients with temporal lobe epilepsy.

### **Keywords**

Temporal lobe epilepsy, *NTRK2*, TrkB, polymorphisms.

## Lista de Ilustrações

Figura 1. Representação esquemática do hipocampo humano.....	27
Figura 2: RNM de encéfalo evidenciando esclerose hipocampal a direita.....	29
Figura3: Descargas de pontas bitemporais, com predomínio a direita (EEG interictal).....	30
Figura 4: Crise com início na região temporal esquerda (EEG ictal).....	31
Figura 5. Neurotrofinas e receptores.....	38
Figura 6. Representação esquemática da estrutura do TrkB.....	40
Figura 7. Cascatas intracelulares ativadas pelo TrkB.....	41

## Lista de Tabelas

### Tabelas da tese

Tabela 1: Principais estudos de associações clínicas e SNPs do gene <i>NTRK2</i> .....	50
--	----

### Tabelas do artigo 1

Tabela 1: Distribution of SNPs genotypes in the <i>NTRK2</i> gene in patients ( $n=198$ ) and controls( $n=200$ ).....	83
Tabela 2: Clinical characteristics according to variants in the <i>NKTR2</i> gene.....	85
Tabela 3: <i>NTRK2</i> SNPs and neuroimaging or interictal EEG.....	88

### Tabelas do artigo 2

Tabela 1: Characteristics of TLE patients according with mood disorder .....	111
Tabela 2. Genotypic distribution according with mood disorder .....	112
Tabela 3.Independent risk factors for mood disorders in temporal lobe epilepsy....	113
Tabela 4.Characteristics of TLE patients according with depressive disorder .....	114
Tabela 5. Genotypic distribution according with depressive disorder .....	115
Tabela 6. Independent risk factors for depressive disorders in temporal lobe epilepsy.....	116

## **Lista de Abreviaturas**

ELT: Epilepsia do Lobo Temporal

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

TLE: Temporal Lobe Epilepsy

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

SNC: sistema nervoso central

TCE: traumatismo cranio-encefálico

DAE: droga antiepiléptica

EMT: Epilepsia Mesial Temporal

CPS: crise parcial simples

CPC: crise parcial complexa

EH: esclerose hipocampal

EMT-EH: Epilepsia Mesial Temporal associada a esclerose hipocampal

BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor

TrkB: Tyrosine Kinase Receptor B

ILAE: International League Against Epilepsy

IPI: insulto precipitante inicial

RNM: Ressonância Nuclear Magnética

CA: Corno de Amon

EEG: Eletroencefalograma

TIRTA: atividade theta rítmica intermitente temporal

ms: milissegundos

DSM-IV: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders- Fourth Edition

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

NMDA: N-Metil D-Aspartato

BDI: Beck Depression Inventory

CES-D: Center for Epidemiologic Study –Depression

SCID: Structured Clinical Interview for DSM-IV

MINI : The Mini- International Neuropsychiatry Interview

IDTN-E: Inventário de Depressão em Transtornos Neurológicos para Epilepsia

NGF: Nerve Growth Factor

NT3: Neutrophin- 3

NT4: Neurotrophin-4

p75NTR: p75 Neurotrophin Receptor

TrkA: Tyrosine Kinase A

TrkC: Tyrosine Kinase C

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

RNA: Ácido Ribonucleico

GWAS: Genome-Wide Association Studies

*NTRK2: Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor type 2*

mRNA: RNA mensageiro

HIV: Human Immunodeficiency Virus

TDAH: Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

TOC: Transtorno Obsessivo-Compulsivo

## Sumário

1. Introdução .....	17
2. Revisão da Literatura.....	18
2.1. Estratégias de busca de informações na literatura.....	18
2.2. Epilepsia.....	19
2.2.1.Princípios Gerais .....	19
2.2.2. Classificação das crises epiléticas .....	20
2.2.3. Classificação das Epilepsias .....	21
2.3. Epilepsia do Lobo Temporal.....	22
2.3.1. Conceitos básicos .....	22
2.3.2. Aspectos Epidemiológicos .....	23
2.3.3. História Natural e Aspectos Clínicos .....	24
2.3.4. Aspectos fisiopatológicos .....	25
2.3.5. Esclerose Hipocampal.....	26
2.3.6. Aspectos Eletroencefalográficos .....	29
2.3.7. Prognóstico .....	31
2.3.8. Comorbidades psiquiátricas na Epilepsia de Lobo Temporal.....	32
2.3.8.1. Aspectos Gerais .....	32
2.3.8.2. Dados Epidemiológicos .....	33
2.3.8.3. Mecanismos Neurobiológicos .....	33
2.3.8.4. Características Clínicas.....	34
2.3.8.5. Métodos de Investigação Psiquiátrica.....	36
2.4. Neurotrofinas.....	37



2.4.2. Via de sinalização BDNF – TrkB .....	39
2.4.3. Estudos de Genética Humana em Neurologia .....	42
2.4.4. Trkb .....	42
2.4.5. Polimorfismos do gene <i>NTRK2</i> e associações clínicas.....	46
3. Justificativa.....	52
4. Objetivos.....	53
5. Referências da revisão de literatura.....	54
6. Artigo 1.....	66
7. Artigo 2.....	91
8. Considerações finais.....	117
9. Anexo.....	120

## 1. Introdução

A epilepsia é uma doença que se caracteriza por crises epiléticas não-provocadas recorrentes. Pessoas de diferentes raças, idade e nível sócio-econômico estão sujeitas a apresentar a doença. Nos países desenvolvidos a prevalência da epilepsia é em torno de 1% (1-7), sendo até duas vezes maior em países de baixa renda (8, 9). Nesses, os fatores de risco que contribuem para uma maior incidência são a precariedade da assistência perinatal, maior ocorrência de infecções no Sistema Nervoso Central (SNC) e traumatismo crânio-encefálico (TCE) (8). Nos países em desenvolvimento, a epilepsia constitui um problema de saúde pública e muitas mortes decorrentes da doença poderiam ser evitadas com o tratamento adequado (10).

A epilepsia originada na região mesial do lobo temporal - Epilepsia Mesial Temporal - (EMT) constitui a forma mais comum de epilepsia focal no adulto (11, 12). A EMT se caracteriza por recorrência de crises parciais simples (CPS) ou complexas (CPC) com origem nas estruturas temporais mesiais. Na maioria das vezes, a fisiopatologia envolvida na EMT é a esclerose hipocampal (EH), constituindo uma síndrome epilética característica, a Epilepsia Mesial Temporal associada a Esclerose Hipocampal (EMT-EH). Estudos mostram que 40 a 80% dos pacientes com essa síndrome são resistentes ao tratamento farmacológico, sendo encaminhados para avaliação pré-cirúrgica (13).

Os estudos dos mecanismos celulares envolvidos na epileptogênese do hipocampo apontam para a contribuição da via de sinalização BDNF-TrkB nesse processo. Em modelos animais de EMT-EH, observou-se que quando proteína BDNF se liga ao seu receptor TrkB ocorrem cascatas de sinalização intracelular que contribuirão para o processo de epileptogênese. Crises epiléticas aumentam a expressão de BDNF e TrkB nas fibras musgosas do hipocampo, favorecendo a suscetibilidade a crises e a severidade das mesmas (14). No modelo experimental de kindling, observou-se que a deleção do TrkB em camundongos Knockout evitou o processo de epileptogênese nesses animais (15).

A hipótese de que o TrkB desempenhe um papel importante no processo de epileptogênese límbica tem se mostrado mais consistente nos últimos anos. Estudos em seres humanos avaliaram o papel de polimorfismos do gene do TrkB em diferentes situações clínicas, como doença de Alzheimer, alcoolismo, suicídio, adição a nicotina, transtorno obsessivo-compulsivo, entre outras.

A presença de determinados polimorfismos do gene *NTRK2* que codifica o TrkB e sua possível relação com variabilidades clínicas na epilepsia do lobo temporal nunca foi avaliada. Em se tratando de um processo que envolve estruturas temporais mesiais nas quais o TrkB tem elevada expressão e desempenha um papel crucial, é bastante plausível a idéia de que polimorfismos desse gene estejam associados a variabilidade clínica da doença.

## **2. Revisão da Literatura**

### ***2.1. Estratégias de busca de informações na literatura***

A primeira parte da revisão da literatura aborda aspectos relevantes no entendimento da Epilepsia. Posteriormente foi analisada a Epilepsia de Lobo Temporal, como etiologia, fisiopatologia, curso natural, perfil eletroencefalográfico e prognóstico. A estratégia de busca envolveu a base de dados PUBMED. A busca incluiu os termos: “epilepsy”, “temporal lobe epilepsy”, “hippocampal Sclerosis”, “Mesial temporal lobe epilepsy”. Nessa parte, encontramos um total de 1769 artigos. Os artigos que não enfocavam o tema Epilepsia de Lobo Temporal ou que não envolviam seres humanos foram excluídos, restando 68 artigos.

A segunda parte da revisão da literatura aborda o tema “Neurotrofinas e o gene *NTRK2*”. Esta estratégia de busca envolveu a base de dados PUBMED, através dos termos “Neurotrophins”, “*NTRK2*”, “BDNF”, “TrkB”, com um total de 2280 artigos, dos quais 2.263 foram excluídos restando 17 artigos.

Por fim, a revisão buscou dados referentes ao tema “*NTRK2* polymorphisms”, com um total de 81 artigos, dos quais 60 foram excluídos, restando 21 artigos.

Ao total utilizamos 106 artigos para revisão da literatura.

## **2.2. Epilepsia**

### **2.2.1.Princípios Gerais**

A epilepsia é uma doença caracterizada por uma predisposição permanente do cérebro para gerar crises epiléticas, com repercussões nas esferas neurobiológica, cognitiva, psicológica e social (16). A Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE: International League Against Epilepsy) define crise epilética como sendo a ocorrência de sinais e sintomas transitórios devido a uma atividade excessiva ou sincrônica de neurônios cerebrais (16). A definição operacional de epilepsia proposta pela ILAE estabelece:

- 1- Ocorrência de pelo menos 2 crises não provocadas com intervalo de 24 horas entre elas, ou
- 2- Ocorrência de 1 crise não provocada com uma probabilidade de recorrência semelhante àquela encontrada após 2 crises não provocadas, ou seja, 60% de chance de recorrer nos próximos 10 anos, ou
- 3- Diagnóstico de uma síndrome epilética (17).

A diferença entre crises epiléticas e crise sintomática aguda deve ser considerada para o diagnóstico correto de epilepsia. Crises sintomáticas agudas são provocadas por uma situação que diminui transitoriamente o limiar convulsivo, como, por exemplo, um distúrbio metabólico, ou crises dentro dos 7 primeiros dias após TCE ou acidente vascular cerebral. Nesse caso, não se considera o diagnóstico de epilepsia, pois não há uma predisposição cerebral permanente a crises espontâneas (17). O diagnóstico de epilepsia geralmente é realizado de forma retrospectiva, através da coleta detalhada da história clínica. Os dois aspectos mais importantes na diferenciação de fenômenos epiléticos de outras causas de perda de

consciência são a presença de aura nas crises epiléticas focais e a ocorrência de um estado pós-ictal confusional após crises tônico-clônico generalizadas. O eletroencefalograma é uma ferramenta complementar importante para o diagnóstico de epilepsia.

A epilepsia é a doença neurológica crônica mais comum e afeta cerca de 65 milhões de pessoas ao redor do mundo. Em países desenvolvidos, a prevalência da epilepsia fica em torno de 1%, enquanto em países pobres esta taxa chega a ser duas vezes maior, devido às dificuldades com cuidados perinatais, maior incidência de traumatismo de crânio e de infecções no SNC (8, 9). A incidência da epilepsia em relação à idade apresenta uma distribuição bimodal, com uma curva em forma de U, exibindo taxas de ocorrência mais elevadas na infância e na velhice. Este padrão, entretanto, é observado em países desenvolvidos, enquanto que em países pobres existe um pico de incidência na idade adulta jovem (18).

O caráter imprevisível da doença acarreta perda da autonomia e importante comprometimento das atividades de vida diária dos pacientes portadores de epilepsia. Em decorrência disto, os pacientes sofrem com estigma social, prejuízo laboral, discriminação e com o impacto de viver com uma doença crônica (17). O problema tem uma repercussão maior nos países do terceiro mundo, onde o acesso a medicações antiepiléticas e ao tratamento cirúrgico são mais restritos (10).

Trata-se de um problema de saúde pública. O índice de mortes prematuras em epiléticos é maior que na população geral, principalmente quando existe comorbidade psiquiátrica associada. Aproximadamente metade das mortes relacionadas a epilepsia ocorrem em pessoas com menos de 55 anos de idade (19).

### **2.2.2. Classificação das crises epiléticas**

Em 1989, a Comissão em Classificação e Terminologia da Liga Internacional Contra Epilepsia (ILAE) propôs dividir as crises epiléticas em focais (parciais) e generalizadas. As crises parciais têm início em apenas uma determinada região cerebral, sendo subdivididas em parciais simples (quando não há comprometimento da consciência) e parciais complexas (quando ocorre comprometimento da

consciência) (20). As crises parciais simples (CPS) ou complexas (CPC) podem se propagar para outras áreas cerebrais e haver um processo chamado de generalização secundária, culminando com a apresentação de uma crise tônico-clônica generalizada. Um exemplo didático é a crise originada na região mesial do lobo temporal. O início é uma sensação epigástrica ascendente, que corresponde a crise parcial simples, pois o paciente tem consciência do fenômeno. A crise parcial simples também é chamada de aura epiléptica. Segue-se uma desconexão com o ambiente, ou seja, a crise passa a ser parcial complexa, pois há comprometimento da consciência. Por outro lado, as crises generalizadas são crises em que ocorre a ativação neuronal simultânea de ambos os hemisférios cerebrais, de forma difusa. As crises generalizadas são subdivididas em tônicas, atônicas, clônicas, tônico-clônica e de ausência (20).

Em 2010, a ILAE apresentou um novo relatório da Comissão de Classificação, em relação a denominação das crises epiléticas. Nesse documento, os termos focal e generalizado foram substituídos. As crises generalizadas foram redefinidas como sendo aquelas em que ocorre um envolvimento bilateral de redes neuronais corticais ou subcorticais desde o início. As crises focais seriam aquelas em que apenas um dos hemisférios cerebrais é envolvido inicialmente, seja uma parte ou uma região mais ampla do mesmo. Para cada tipo de crise focal há um determinado padrão ictal, podendo haver propagação posterior para o hemisfério oposto. Os termos parcial simples e parcial complexo foram substituídos. Optou-se pela denominação de crise discognitiva para expressar as crises com comprometimento da consciência, antes denominadas parciais complexas. As crises denominadas parciais simples na outra classificação devem ser descritas como “sem comprometimento da consciência”. Recomendou-se descrever a fenomenologia da crise, como por exemplo: crise sem comprometimento da consciência, com componentes motores, ou autonômicos, ou sensitivos ou psíquicos (21).

### **2.2.3. Classificação das Epilepsias**

Na tentativa de trazer o tema da epilepsia para “fora das sombras” e tendo em vista os avanços na neurociência básica, assim como nas áreas de genômica, neuroimagem e biologia molecular, optou-se por realizar uma atualização na classificação das síndromes epiléticas. Portanto, em 2010, a ILAE propôs uma

classificação das síndromes epiléticas quanto a etiologia em 3 subcategorias: síndromes genéticas, estruturais/metabólicas e de causa desconhecida (21).

1- Síndromes de causas genéticas: antigamente denominadas Idiopáticas ou Primárias. Não há outra explicação para a ocorrência da epilepsia que não uma predisposição genética. Existe um defeito genético, presumido ou conhecido, responsável pela epilepsia. As epilepsias genéticas são idade relacionadas, apresentam características clínico/eletroencefalográficas típicas e geralmente são responsivas ao tratamento clínico. No entanto, existem exceções, como a Síndrome de Dravet, que atualmente é considerada uma síndrome genética e que costuma ser altamente farmacorresistente (21).

2- Síndromes de causa estrutural/metabólica: antes denominadas epilepsias sintomáticas. Existe uma condição estrutural ou metabólica responsável pelo desenvolvimento da epilepsia. As desordens estruturais adquiridas incluem, por exemplo, AVC, tumores, trauma e infecção. Danos estruturais de origem genética, como esclerose tuberosa, erros inatos do metabolismo e malformações do desenvolvimento cortical também são considerados nessa categoria (21).

3- Síndromes epiléticas de causa desconhecida: anteriormente denominadas Criptogênicas. A natureza da causa subjacente ainda é desconhecida. Representam um terço ou mais de todas as epilepsias e são objetivo de pesquisas futuras envolvendo novas tecnologias de genética e neuroimagem (21).

## ***2.3. Epilepsia do Lobo Temporal***

### **2.3.1. Conceitos básicos**

A epilepsia do lobo temporal apresenta importância clínica destacada, devido a sua alta prevalência, gravidade e refratariedade ao tratamento clínico.

O lobo temporal é o mais epileptogênico dos lobos cerebrais e as funções relacionadas a memória, comportamento e aprendizado encontram-se distribuídas em circuitos temporais.

Há evidências clínicas que indicam tratar-se de uma desordem progressiva em grande parte dos pacientes, havendo degeneração de tecido cerebral e comprometimento cognitivo gradual. Além disso, a dificuldade de tratamento leva a pensar que as crises em si colaborem para uma piora da condição epilética- “Seizures beget seizures”, um conceito já proposto por William Gowers há quase um século (14).

A Epilepsia do Lobo Temporal costuma ser dividida em 2 subtipos:

1- Epilepsia do lobo temporal lateral, com zona epileptogênica localizada na neocortex temporal.

2- Epilepsia do lobo temporal mesial, com zona epileptogênica localizada nas estruturas temporais mesiais (hipocampo, amígdala e giro parahipocampal) (22).

A epilepsia do lobo temporal mesial tem como substrato patológico mais comum a esclerose hipocampal. Estima-se que a esclerose hipocampal esteja presente em até 70% dos casos de epilepsia do lobo temporal refratária (22).

### **2.3.2. Aspectos Epidemiológicos**

A epilepsia mesial temporal (EMT) é a forma mais comum de epilepsia focal no adulto e também representa a forma mais resistente ao tratamento farmacológico (12, 22).

Os obstáculos metodológicos para realização de estudos epidemiológicos em epilepsia decorrem da heterogeneidade dos métodos de classificação e diagnóstico da doença e do viés de seleção de amostras de centros especializados. Existe, portanto, uma escassez de estudos epidemiológicos bem conduzidos em relação a epilepsia de lobo temporal (18).

No estudo clássico na comunidade de Rochester-Minnesota, a prevalência calculada de epilepsia de lobo temporal em 1960 foi de 1.7 por 1.000 pessoas. Em



outro estudo proveniente de análise de 2.200 pacientes em centro terciário e classificados de acordo com critérios da ILAE encontrou-se uma prevalência de 24% de epilepsia do lobo temporal (18).

### **2.3.3. História Natural e Aspectos Clínicos**

A epilepsia mesial temporal associada a esclerose hipocampal (EMT-EH) constitui uma síndrome epiléptica distinta. Em muitas ocasiões, existe uma história típica de crise febril no passado destes pacientes, principalmente crises febris complicadas ocorridas até os 5 anos de idade. A crise febril é o exemplo mais comum de Insulto Precipitante Inicial (IPI). O IPI é um evento frequentemente encontrado em estudos retrospectivos de EMT-EH e representa um insulto ocorrido na fase crítica do desenvolvimento cerebral (até os 5 anos), podendo corresponder a uma história de convulsões febris, traumatismo crânio-encefálico, status epilepticus ou ocorrência de infecções no SNC (23). Acredita-se que a ocorrência de um IPI na infância cause um processo de epileptogênese possivelmente relacionado à esclerose hipocampal (12, 22, 24). A predisposição genética a apresentar crises febris pode estar relacionada a maior ocorrência de crises febris prolongadas e portanto maior risco de evolução para esclerose hipocampal e EMT-EH (25).

Na história natural da EMT-EH, estudos mostram que durante a infância costumam surgir crises epilépticas recorrentes afebris e inicialmente responsivas ao tratamento medicamentoso. Estas crises geralmente ficam um longo período em remissão. Este período é chamado de período latente, com duração de 5 a 10 anos. Acredita-se que durante este tempo esteja ocorrendo o processo de epileptogênese. Ao final da adolescência ou início da idade adulta, as crises geralmente recorrem, só que agora de forma mais resistente ao tratamento farmacológico (12, 24).

As crises habituais dos pacientes com EMT geralmente começam na forma parcial simples (aura) e são resistentes a terapia. A forma mais usual é a aura de uma sensação epigástrica (desconfortável) ascendente. Outros tipos de auras são: sensação de medo, déjà vù, sensação de estranheza e outras auras autonômicas e experiénciais. As auras podem ocorrer de forma isolada ou precedendo uma CPC,

ou seja: muitas vezes existe a evolução de uma aura para uma CPC de lobo temporal. A típica CPC de lobo temporal inicia com sensação epigástrica ascendente (aura), evoluindo para desconexão com o ambiente, fixação do olhar (staring) e automatismos oroalimentares (mastigação, lambe e estalar os lábios). Muitas vezes ocorre distonia do membro superior contralateral ao foco epiléptico, representando uma propagação da crise para os núcleos da base. Raramente há o fenômeno de generalização secundária. Segue-se um período de confusão pós-ictal (12). Nos pacientes com EMT-EH as drogas antiepilépticas costumam controlar bem as crises com evolução tônico-clônica, mas cerca de 40% dos pacientes seguem apresentando CPS (auras) e CPC incapacitantes (25).

#### **2.3.4. Aspectos fisiopatológicos**

Epileptogênese é o processo através do qual um tecido cerebral normal adquire a tendência a gerar crises epiléticas espontâneas e recorrentes(14). Há mais de um século vem se estudando modelos de ictogênese, ou seja, de geração de crises epiléticas. Da mesma forma, a cada ano cresce o número de ensaios clínicos destinados a testar novas drogas anticonvulsivantes, ou seja: drogas que impedem a ocorrência de crises, mas não impedem a evolução para epilepsia. De forma diversa, os modelos capazes de reproduzir os processos de epileptogênese parecem ser mais complexos. Os estudos de agentes que possam prevenir a epileptogênese ainda são escassos, mas existem alguns mecanismos conhecidos que são alvo de pesquisas com esse objetivo, tais como:

- Perda neuronal
- Neurogênese
- Sprouting axonal
- Reorganização sináptica
- Angiogênese
- Danos dendríticos

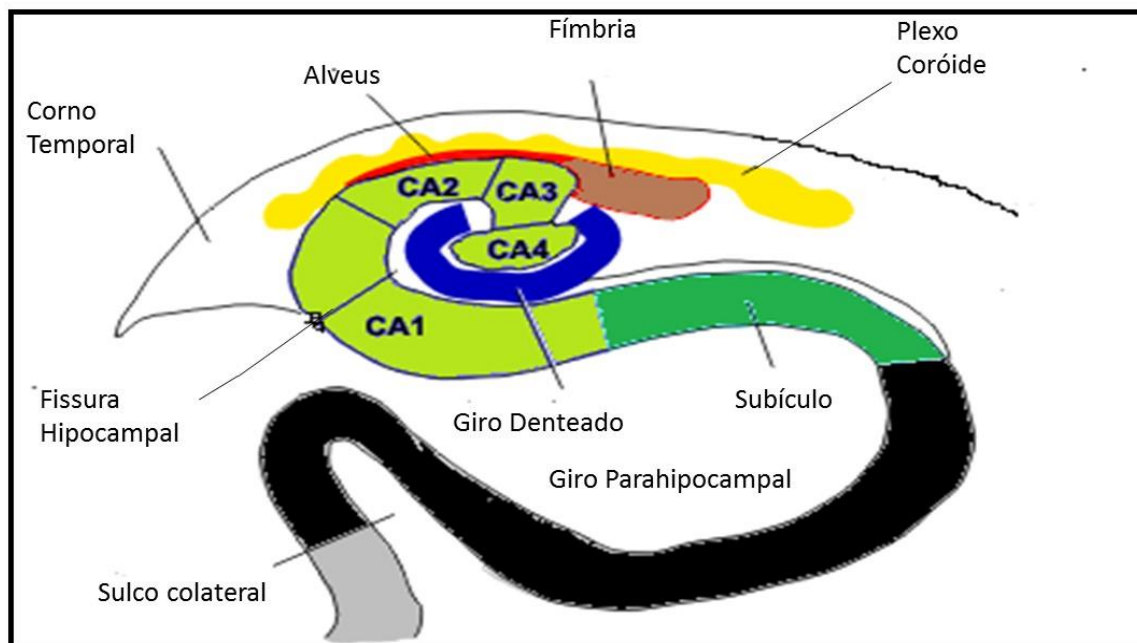
- Gliose e alterações das funções da Glia
- Quebra da barreira hematoencefálica
- Reorganização da matriz extracelular
- Alterações de propriedades intrínsecas dos neurônios (alterações de perfis de expressão genéticos e funções de canais iônicos)
- Imunidade inata e adaptativa (26)

Os mecanismos envolvidos na predisposição a geração de crises epilépticas na EMT-EH incluem principalmente a perda neuronal e uma reorganização circuitária anormal. Ainda não existem biomarcadores para epileptogênese tão fidedignos quanto a medida do hematócrito é para a anemia, por exemplo. Ainda assim, podemos apontar como potenciais biomarcadores para EMT as alterações na estrutura hipocampal visualizadas na RNM, descargas interictais no eletroencefalograma e oscilações patológicas de alta frequência (26).

### **2.3.5. Esclerose Hipocampal**

O hipocampo faz parte do arquicórtex- filogeneticamente primitivo- e é uma estrutura cerebral essencial na formação, consolidação e evocação da memória declarativa (explícita). Localiza-se na porção medial dos lobos temporais e é dividido em 3 partes: cabeça, corpo e cauda. O córtex hipocampal, também denominado de Corno de Amon, pode ser dividido em 4 setores: CA1, CA2, CA3 e CA4. A nomenclatura CA deriva de Corno de Amon. Ao Corno de Amon se liga o giro denteado, também parte do hipocampo. Possui organização interna em 3 camadas, com células granulares no giro denteado e células piramidais no Corno de Amon (27). Em seres humanos, o hipocampo direito está mais relacionado a memória viso-espacial e o hipocampo esquerdo à memória verbal (28). Esta diferença, no entanto, parece estar presente em adultos e adolescentes, enquanto crianças e idosos não evidenciam este padrão de lateralidade. Pacientes com EMT-EH de longa data apresentam déficits nas testagens neuropsicológicas relacionadas a memória e o declínio cognitivo parece estar relacionado ao tempo de doença e a idade de início das crises (29).

**Figura 1. Representação esquemática do hipocampo humano**



Adaptado de Hesselink, J.R.-The Temporal Lobe & Limbic System

A esclerose hipocampal é o achado histopatológico mais comum encontrado em peças cirúrgicas de pacientes com EMT submetidos a cirurgia da epilepsia, chegando a 70% (22, 30). Entretanto, a incidência de esclerose hipocampal na população geral é desconhecida, pois os estudos envolvem populações com ELT refratária avaliados em centros cirúrgicos(31).

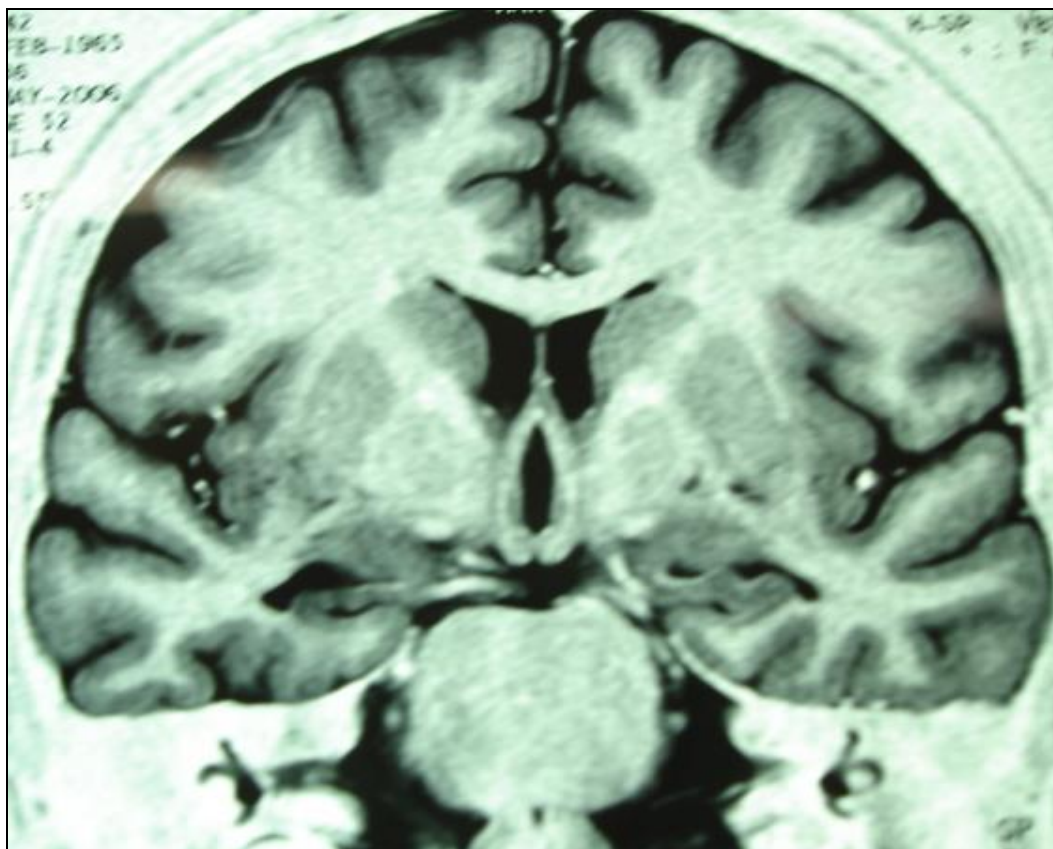
Na forma clássica de EH há perda neuronal na porção CA1 do corno de Amon e na região hilar do hipocampo (22, 30). Do ponto de vista fisiopatológico, a região CA1 do hipocampo apresenta uma vulnerabilidade maior ao stress celular metabólico (durante períodos de hipoxemia, por exemplo). Os achados patológicos da EH incluem severa perda de neurônios piramidais e gliose ao longo principalmente da porção CA1 (com relativa preservação dos neurônios piramidais de CA2 e CA3), dispersão de células granulares, brotamento de fibras musgosas e alterações nos interneurônios (23, 32). Estudos de microanatomia e imunohistoquímica de hipocampus escleróticos evidenciaram perda seletiva de

Somatostatina e Neuropeptídeo Y em neurônios inibitórios do giro denteado (12). Estudos moleculares tem evidenciado fatores envolvidos na patogênese da Esclerose Hipocampal, sendo os mais estudados: canalopatias, ativação de receptores NMDA (N-Metil-D-Aspartato), desregulação do influxo de cálcio intracelular, proteínas ligantes, canalopatias adquiridas que aumentam a excitabilidade neuronal, eventos inflamatórios e regulação epigenética (31). Na EMT, além da esclerose hipocampal, outras estruturas límbicas também costumam apresentar perda neuronal, como o uncus, a amígdala e o giro parahipocampal (30).

A associação da EH com ocorrência de IPI's na infância ainda não é totalmente clara. Estudos retrospectivos mostram a relação entre crise febril complexa na infância e o desenvolvimento de EMT-EH, no entanto, existem fatores genéticos e ambientais implicados nesse processo (33). Estudos evidenciaram que em 60 a 80% dos pacientes com epilepsia temporal intratável é possível identificar-se história de um IPI na infância (34). Alguns dados prospectivos mostraram que em 6% dos pacientes com crise febril única poderá haver evolução para síndrome de EMT-EH (25). As evidências na área ainda não estabelecem de forma clara a razão pela qual alguns indivíduos expostos a IPI's desenvolverão um quadro de epilepsia temporal enquanto outros não.

A partir da década de 1990, o uso da Ressonância Nuclear Magnética (RNM) de crânio tem sido empregado com sucesso para detecção de esclerose hipocampal. Apesar de haver variabilidade em relação a interpretação dos achados na RNM, de acordo com a técnica empregada e expertise do examinador, a RNM é o método de eleição para investigação de epilepsias focais. O protocolo preferencial de estudos de RNM para EMT inclui cortes coronais perpendiculares ao eixo longitudinal do hipocampo. Os achados típicos da EH são a redução do volume hipocampal, aumento de sinal em T2 e desorganização microestrutural (23).

**Figura 2: RNM de encéfalo evidenciando esclerose hipocampal a direita**



### **2.3.6. Aspectos Eletroencefalográficos**

O eletroencefalograma (EEG) é o registro da atividade elétrica cerebral, medida através de um amplificador diferencial. Em 1929, Hans Berger realizou o primeiro registro atividade elétrica cerebral em seres humanos. Desde então, o método vem sendo aprimorado e empregado em diversos cenários clínicos, tendo um papel significativo na classificação das epilepsias e no acompanhamento de pacientes epiléticos.

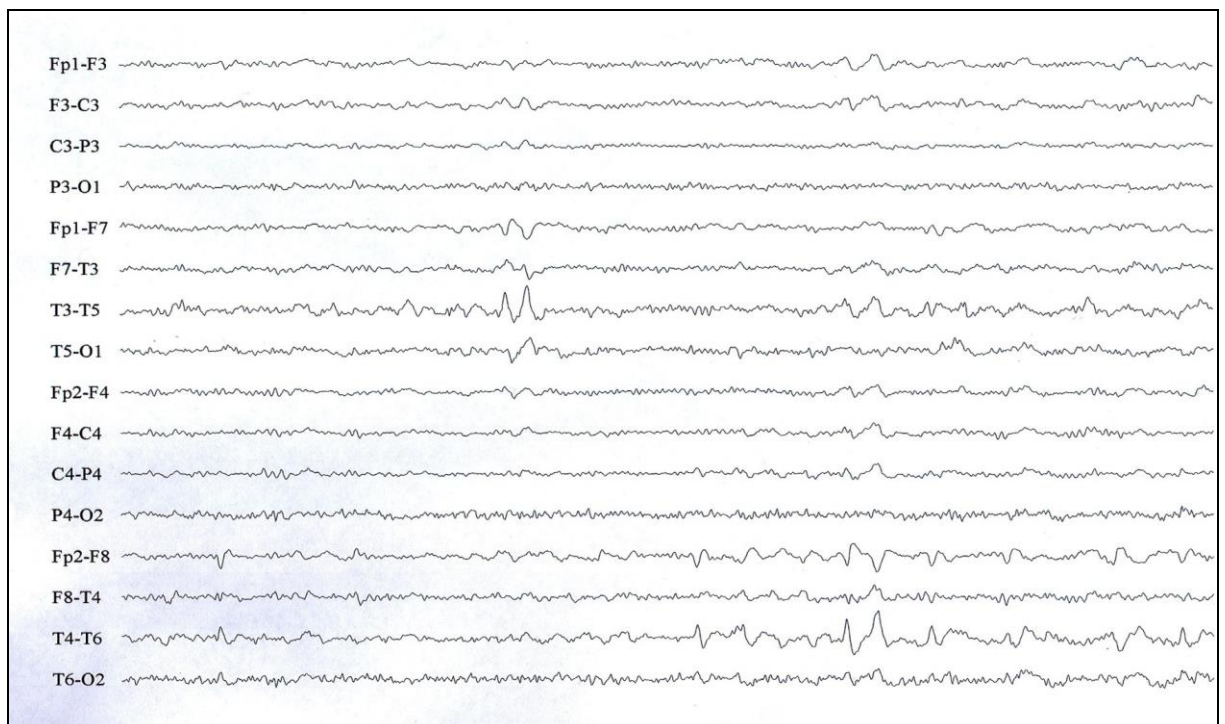
A assinatura eletroencefalográfica da EMT é o aparecimento de descargas interictais envolvendo a região temporal ântero-basal, podendo ser consideradas biomarcadores da epilepsia (12).

Na EMT, cerca de 40 a 50% dos pacientes podem apresentar anormalidades no EEG no período interictal. Essas anormalidades podem ser divididas em

alenticimentos intermitentes nas faixas theta ou delta, caracterizando os termos: TIRDA e TIRTA, correspondendo respectivamente a atividade delta rítmica intermitente temporal e atividade theta rítmica intermitente temporal. Estes padrões de alentecimento estão altamente relacionados a EMT. Outro tipo de anormalidade são as descargas interictais. As descargas interictais são divididas em pontas e ondas agudas (12, 25). As pontas têm duração de 20 a 70 milisegundos (ms) e as ondas agudas têm duração de 70 a 200 ms (35).

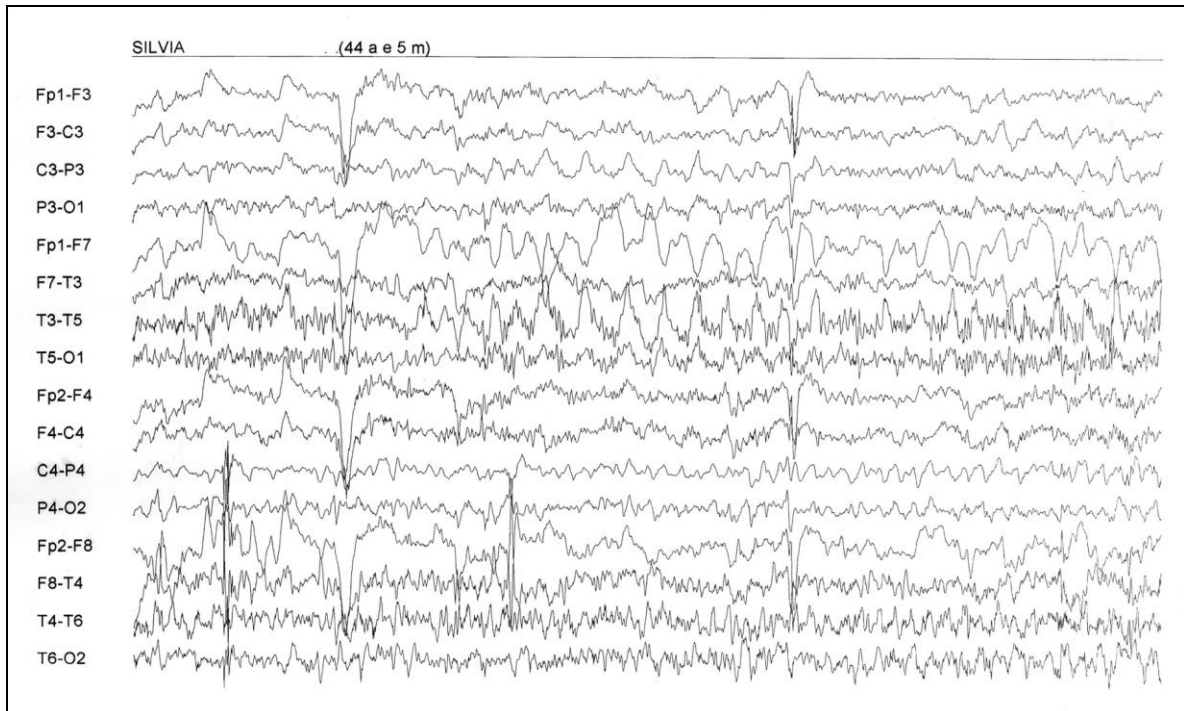
Nos casos de EMT, as descargas interictais apresentam inversão de fase nos eletrodos esfenoidais ou temporais anteriores (F8 ou F7), quando analisadas em montagens bipolares. Podem ocorrer pontas ou ondas agudas bitemporais, embora na maior parte das vezes a região responsável pela geração de crises seja um lobo temporal apenas.

**Figura 3: Descargas de pontas bitemporais, com predomínio a direita (EEG interictal).**



O registro de crises típicas do paciente no videoeletroencefalograma é o principal parâmetro utilizado para determinar a zona epileptogênica. O padrão ictal eletrográfico típico consiste em descargas rítmicas de 5 a 8 Hz iniciando em uma das áreas temporais basais com padrão ictal recrutante característico (12).

**Figura 4: crise com início na região temporal esquerda (EEG ictal).**



### 2.3.7. Prognóstico

A síndrome da EMT é altamente refratária ao tratamento farmacológico, sendo considerada uma doença cirurgicamente tratável em muitos casos.

Um ensaio clínico randomizado demonstrou a superioridade do tratamento cirúrgico em relação ao tratamento clínico continuado em casos selecionados de EMT-EH refratária (36). A taxa de pacientes que ficam livres de crises pode ser de 53 a 84% (37). Estudos que determinem fatores prognósticos de resposta ao tratamento ou mecanismos fisiopatológicos envolvidos na EMT contribuem para o melhor entendimento e manejo dessa doença, diminuindo a morbidade da doença.



## **2.3.8. Comorbidades psiquiátricas na Epilepsia de Lobo Temporal**

### **2.3.8.1. Aspectos Gerais**

Ao longo da história, a epilepsia foi considerada muitas vezes como sendo causada por influência sobrenatural ou por possessões demoníacas. No seu livro “Sobre a Doença Sagrada” Hipócrates foi o primeiro a discordar desse paradigma, atribuindo a epilepsia a um processo de origem cerebral.

Hipócrates já apontava a existência de associações entre epilepsia e transtornos mentais e a observação de que pacientes com depressão são mais propensos a desenvolver epilepsia e vice-versa já havia sido proposta por ele (460-375 a.c) (38).

Durante muito tempo, o objetivo do tratamento da epilepsia concentrou-se no controle das crises epiléticas, negligenciando características neuropsiquiátricas desses pacientes. A epilepsia pode influenciar nas esferas emocional, comportamental, cognitiva e social do indivíduo. O reconhecimento do impacto negativo dos sintomas psiquiátricos na vida dos pacientes tem motivado um maior interesse em identificar e tratar precocemente estas situações. A realização de uma história clínica detalhada e a aplicação de escalas de screening para transtornos psiquiátricos favorece o diagnóstico adequado de comorbidades psiquiátricas. Tendo em vista o potencial psicotrópico dos fármacos anticonvulsivantes, a identificação de transtornos psiquiátricos ajuda na escolha adequada do tratamento da epilepsia, pois alguns fármacos tem efeito psicotrópico negativo, como o Fenobarbital, por exemplo (39). Além disso, a qualidade de vida das pessoas com epilepsia sofre maior impacto negativo quando as comorbidades psiquiátricas não recebem tratamento. A identificação e tratamento adequado da depressão em pacientes com epilepsia representa maior impacto na qualidade de vida do que o próprio controle de crises epiléticas(38,39).

### **2.3.8.2. Dados Epidemiológicos**

Os estudos que avaliam a associação entre epilepsia e transtornos psiquiátricos são heterogêneos, devido ao tipo de amostra estudada e a metodologia diagnóstica aplicada. Muitas pesquisas são realizadas em centros terciários de tratamento para epilepsia, em amostras de pacientes cirúrgicos, havendo carência de estudos de base populacional (40, 41).

A população com epilepsia em geral apresenta 6% de comorbidade com transtornos psiquiátricos e este número sobe para 10-20% em pacientes com epilepsia do lobo temporal ou epilepsias refratárias. Estudo prévio do nosso grupo analisou a prevalência de transtornos psiquiátricos em 98 pacientes com ELT e encontrou uma taxa de 54,1% de comorbidades psiquiátricas, utilizando uma entrevista semi-estruturada (42).

Considerando a população epiléptica, os transtornos do humor são os mais frequentes (24- 74%), em particular a depressão (30%), seguida por transtornos de ansiedade (10-25%), psicoses (2-7%) e transtornos de personalidade (1-2%) (40).

### **2.3.8.3. Mecanismos Neurobiológicos**

Há evidências de que os transtornos psiquiátricos e a ELT podem compartilhar mecanismos fisiopatológicos comuns. As crises epiléticas de lobo temporal, por exemplo, comumente iniciam com uma sensação de medo (aura). A atividade epileptogênica temporal mesial frequentemente envolve a amígdala e portanto é acompanhada por sensação de medo. Da mesma forma, estudos em pacientes submetidos a cirurgia da epilepsia mostraram que a estimulação elétrica da amígdala desencadeia sintomas de ansiedade, sensações de déjà vu, alucinações e distúrbios autonômicos (43).

As alterações de circuitos envolvendo neurotransmissores serotoninérgicos, noradrenérgicos, glutamatérgicos e gabaérgicos são fundamentais para a patogenia da depressão e são alvo de tratamento desta condição. Da mesma forma, a

diminuição da atividade destes sistemas parece estar relacionada ao processo de facilitação de crises epiléticas, inclusive em modelos animais (44, 45).

Alguns estudos evidenciaram maior prevalência de transtornos psiquiátricos em pacientes em ELT se comparados a pacientes com epilepsias generalizadas ou extra-temporais, enquanto outros não comprovaram esta associação (41). O envolvimento do sistema límbico na gênese tanto da ELT quanto nas patologias psiquiátricas parece representar um mecanismo fisiopatológico comum. Além disso, o aparecimento de transtornos psiquiátricos ao longo da vida de pacientes com ELT está relacionado a fatores psicossociais, neurobiológicos e farmacológicos (40, 41). Nas últimas décadas, pesquisas clínicas e experimentais têm demonstrado que existe uma relação bidirecional entre Epilepsia e transtornos psiquiátricos, ou seja: pacientes epiléticos estão sob maior risco de apresentar uma condição psiquiátrica e pacientes com transtornos psiquiátricos tem maior chance de desenvolver epilepsia (46). O substrato patológico comum tanto a epilepsia quanto a depressão parece envolver as estruturas límbicas do lobo temporal e também esta relacionado a hiperreatividade do eixo hipotálamo-hipofise-adrenal, aumento da atividade glutamatérgica e diminuição das atividades serotoninérgica e gabaérgica (44,46,47).Estudos evidenciaram que pacientes com transtorno depressivo maior tem 4 a 7 vezes mais chance de apresentar uma crise epilética não provocada(47).

#### **2.3.8.4. Características Clínicas**

O transtorno psiquiátrico mais prevalente em pacientes com epilepsia é a depressão; embora ainda seja subestimada e subtratada. A frequência de depressão em pacientes epiléticos refratários pode chegar a 50%, enquanto em pacientes controlados a frequência aproxima-se de 10% (48). Em comparação com a população geral sem epilepsia, a depressão em pacientes epiléticos refratários é 3 a 10 vezes mais comum (49). A apresentação clínica da depressão pode ser atípica. Existe a descrição de uma forma peculiar de depressão em pacientes com epilepsia, chamada de Transtorno Disfórico Interictal, descrito por Blumer, mas já observado por Kraepelin e Bleuler. Nesse transtorno, observam-se sintomas polimórficos caracterizados por irritabilidade entremeada por humor eufórico, medo, ansiedade, anergia, dor e insônia (50).

De acordo com o DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders- Fourth Edition), os transtornos depressivos podem ser de 4 tipos: transtorno depressivo maior, transtorno distímico, depressão menor e transtorno depressivo não especificado (50).

Dentro dos transtornos de humor, além da depressão, o DSM-IV inclui o transtorno bipolar, que é menos frequente em pacientes epiléticos, se comparado a depressão. O transtorno bipolar é dividido em 2 tipos: transtorno bipolar tipo I (com episódios de depressão maior associados a episódios de mania) e Transtorno bipolar tipo II (com episódios de depressão maior associados a episódios de hipomania). O transtorno ciclotímico também pode ocorrer em pacientes com epilepsia, mas sua prevalência exata é desconhecida (50).

Quanto aos transtornos de ansiedade, o DSM-IV propõe classifica-los em: transtorno de pânico, transtorno de ansiedade generalizada, transtornos fóbicos e transtorno obsessivo compulsivo (51). Em pacientes epiléticos, frequentemente os transtornos de ansiedade ocorrem como comorbidade, em associação com depressão, tendo chegado a uma taxa de 34% em um estudo populacional (52).

Dentro da classificação do DSM-IV também encontramos os transtornos psicóticos. Em pacientes com epilepsia, os sintomas psicóticos costumam ser divididos de acordo com sua relação temporal com a ocorrência das crises epiléticas:

- Sintomas ictais
- Sintomas pós-ictais
- Sintomas interictais (são independentes das crises).

A maioria dos estudos diz respeito a análise das psicoses interictais. As psicoses interictais estão mais relacionadas a epilepsia de lobo temporal (53).

Os pacientes com epilepsia também podem apresentar comorbidade psiquiátrica por abuso de álcool ou substâncias, descrito pelo DSM-IV.

### **2.3.8.5. Métodos de Investigação Psiquiátrica em Epilepsia**

A interpretação de condições psiquiátricas relacionadas a epilepsia deve ser cuidadosa, uma vez que a maioria dos estudos envolve uma metodologia de avaliação e populações diversas. Além disso, sintomas relacionados a própria epilepsia ou ao uso de fármacos anticonvulsivantes podem ser erroneamente atribuídos a um transtorno psiquiátrico, por exemplo. (54). A maioria das investigações realizadas teve como população de estudo pacientes com ELT refratária em centros cirúrgicos terciários enquanto a população geral com epilepsia em atendimento em nível primário foi menos estudada (55).

A investigação de transtornos psiquiátricos em pacientes com epilepsia geralmente é feita através do uso de instrumentos de screening para doenças psiquiátricas. Os questionários auto aplicáveis são considerados bons instrumentos, orientando o diagnóstico inicial. São exemplos de questionários auto aplicáveis a escala de Beck para Depressão, BDI (Beck Depression Inventory) e o CES-D (Center for Epidemiologic Study- Depression), ambos elaborados para medir sintomatologia depressiva na população geral. Os questionários auto aplicáveis, no entanto, tendem a superestimar a prevalência de transtornos psiquiátricos (42).

Atualmente têm sido utilizadas entrevistas estruturadas, em que o examinador realiza uma lista de perguntas ao paciente, elaborando um diagnóstico mais preciso. São exemplos de entrevistas estruturadas o SCID (Structured Clinical Interview for DSM-IV), o MINI (The Mini- International Neuropsychiatry Interview), e o IDTN-E (Inventário de Depressão em Transtornos Neurológicos para Epilepsia) (42).

A Entrevista Clínica Estruturada para Transtornos do Eixo I, a SCID-I (Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders) é uma entrevista semi-estruturada utilizada em estudos clínicos em todo o mundo, desenvolvida por Spitzer et al. em 1992 e traduzida e adaptada para o Português em 2001, por Del Ben e colaboradores (56) . A SCID I tem como objetivo diagnosticar os transtornos psiquiátricos do Eixo I do DSM-IV. Esse instrumento foi criado para ser administrado por um clínico ou profissional de saúde treinado em conduzir avaliações diagnósticas, não sendo necessário ser médico. O tempo de aplicação do instrumento tem duração média de 30 a 60 minutos, de acordo com a complexidade

do paciente. A entrevista é dividida em 6 módulos para detecção de um ou mais diagnósticos ao longo da vida, de acordo com o Eixo I do DSM-IV (transtornos de humor, psicóticos, de ansiedade, somatoformes e de uso de álcool ou substâncias)(57).

## **2.4. Neurotrofinas**

### **2.4.1. Definição**

As neurotrofinas são proteínas estruturalmente semelhantes que quando secretadas desempenham um papel importante na sobrevivência, desenvolvimento e função de neurônios do sistema nervoso central e periférico (58, 59). Em 1953, foi descoberta a primeira neurotrofina, chamada Fator de Crescimento do Nervo, NGF (Nerve Growth Factor). Desde então, inúmeras linhas de pesquisa têm se dedicado a estudar a influência dessas proteínas nos mecanismos de doenças e na fisiologia celular.

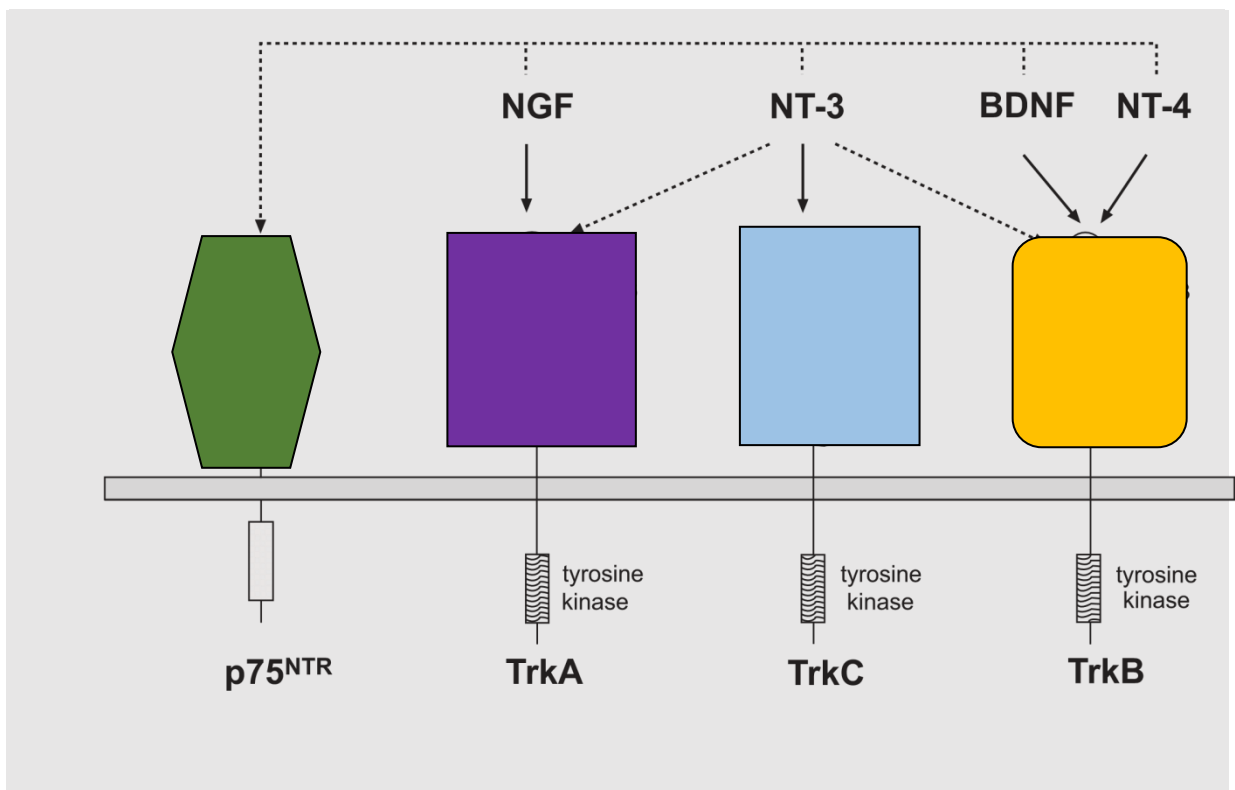
As neurotrofinas são polipeptídeos sintetizados no retículo endoplasmático rugoso, onde as pró-neurotrofinas são armazenadas em vesículas secretoras. Dentro das vesículas, as proteases convertem as pró-neurotrofinas em neurotrofinas maduras, que tem aproximadamente 120 aminoácidos em comprimento (58).

A família das neurotrofinas é composta por 4 proteínas: NGF (Nerve Growth Factor), BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), NT3 (Neurotrophin- 3) e NT4 (Neurotrophin-4). Essas neurotrofinas desempenham uma grande variedade de funções neuronais, agindo sobre os receptores p75NTR (p75 Neurotrophin Receptor), TrkA (Tyrosine Kinase A), TrkB (Tyrosine Kinase B) e TrkC (Tyrosine Kinase C) (58).

O receptor p75NTR é uma glicoproteína transmembrana que inicialmente foi identificada como tendo baixa afinidade de ligação ao NGF. Posteriormente, verificou-se que o p75NTR se liga às outras neurotrofinas de forma similar.

O NGF se liga ao receptor TrkA, O BDNF se liga ao TrkB e o NT3 se liga ao TrkC e de forma fraca ao TrkB e ao TrkA. O NT4 também apresenta ligação com o receptor TrkB. (59).

**Figura 2. Neurotrofinas e receptores**



Adaptado de Deinhardt, K. 2008. Referência 66

Há evidências de que as neurotrofinas exerçam função de proteção contra a excitotoxicidade, promoção da plasticidade, regeneração e reparação neuronal. A ação das neurotrofinas se dá em nível pré e pós-sináptico e elas podem estar envolvidas em mecanismos de morte ou sobrevivência neuronal (60-62). Estudos sobre apoptose envolvendo o papel das neurotrofinas já tem repercussões clínico-terapêuticas objetivas nos dias atuais. Um exemplo é o estudo de pacientes com

câncer, mais precisamente no Neuroblastoma, em que via de sinalização BDNF-TrkB desempenha papel crítico em relação a resposta ao tratamento. Quando há expressão significativa dos receptores TrkA ou TrkC há maiores chances de sobrevida, enquanto pacientes que expressam TrkB ligado ao BDNF tem prognóstico significativamente pior (63).

#### **2.4.2. Via de sinalização BDNF – TrkB**

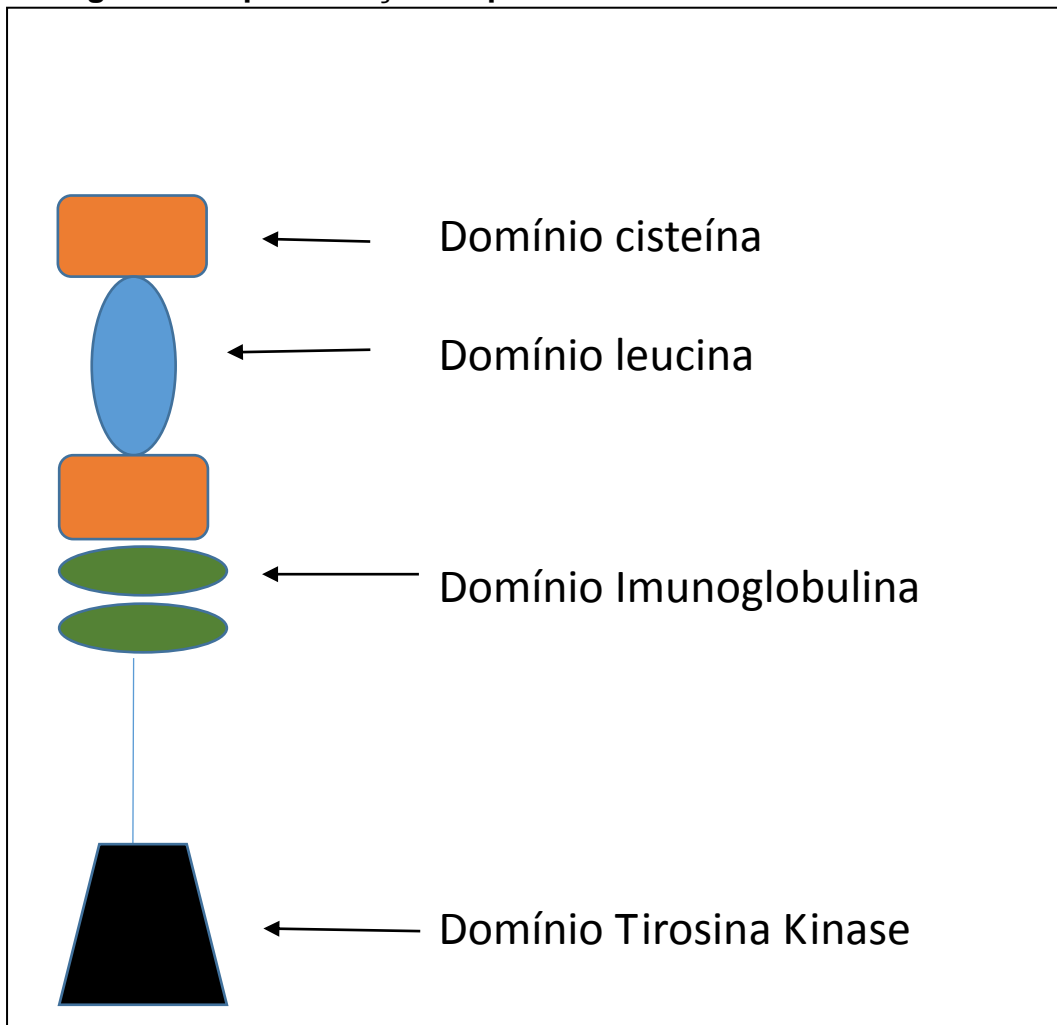
Estudos evidenciam que o BDNF tem alta expressão em estruturas hipocámpais e no córtex cerebral, principalmente da criança e do adulto jovem. Tem papel importante no controle da função sináptica e plasticidade cerebral, interferindo sobre a diferenciação, sobrevivência e morfologia neuronal. Os processos de memória e aprendizagem estão particularmente envolvidos nessa via (64).

O BDNF tem alta afinidade pelo seu receptor TrkB e ao ativá-lo desencadeia uma série de cascatas de sinalização intracelular. O TrkB faz parte do grupo de receptores Trk, composto pelo TrkA, TrkB e TrkC (58, 59).

O receptor TrkB é organizado em domínios extra e intracelular. O domínio extracelular contém 2 regiões ricas em cisteína, separadas por uma região rica em leucina, seguida por um domínio de Imunoglobulina-like, ligado ao domínio transmembrana de Tirosina Kinase (58, 59). A região transmembrana termina no citoplasma e contém diversos resíduos de Tirosina que determinam sítios de fosforilação intracelular.



**Figura 3- Representação esquemática da estrutura do TrkB**

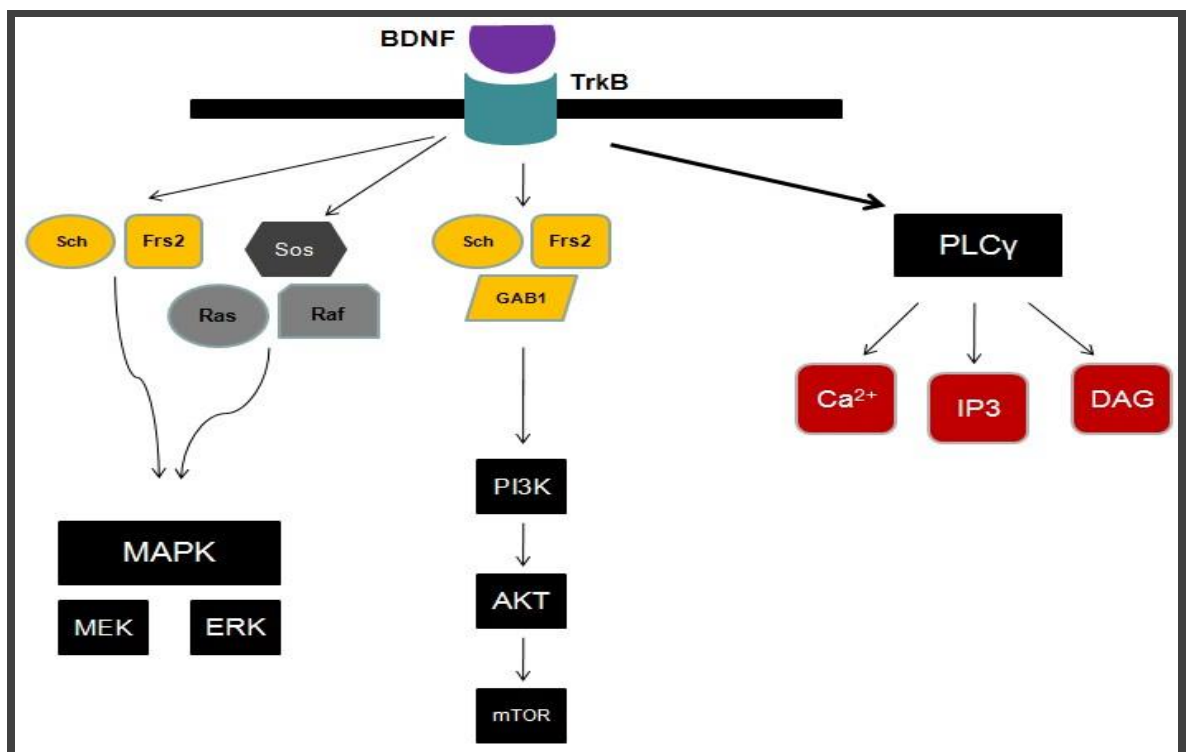


Adaptado de Deinhardt, K., 2008. Referência 66

A ligação do BDNF ao TrkB promove dimerização do receptor, desencadeando cascatas de fosforilação intracelular. São conhecidas 3 cascatas de sinalização intracelular:

- 1- Ativação mediada por sch/Frs2 e Ras/Raf da via MAPK/ MEK/ ERK.
- 2- Ativação mediada por shc/Frs2 e GAB1 da via PI3K / Akt.-mTOR
- 3- Ativação da via PLC $\gamma$ , produzindo IP3 (Inositol Trifosfato) e DAG (Diaglicerol), com aumento de cálcio intracelular (65, 66).

**Figura 4. Cascatas intracelulares ativadas pelo TrkB**



Adaptado de Deinhardt, K., 2008. Referência 66.

Estudos apontam para a contribuição de alterações na via BDNF-TrkB em várias condições neuropsiquiátricas e degenerativas, como Alzheimer, autismo, depressão e Síndrome de Rett. Variações no TrkB também foram relacionadas a obesidade e hiperfagia. Compostos sintéticos que possam mimetizar a ativação ou inibição do TrkB podem ser de grande interesse terapêutico e em sendo estudados intensamente (67).

### 2.4.3. Estudos de Genética Humana em Neurologia

O genoma humano é composto por menos de 30.000 genes. Do ponto de vista genético, os seres humanos são praticamente idênticos entre si, com uma taxa de semelhança em torno de 99,5% do seu DNA se comparado a outros indivíduos. As diferenças na sequência de DNA entre os seres humanos são denominadas polimorfismos (variações alélicas presentes em mais de 1% da população) (68, 69).

Os estudos de associação são aqueles em que se realiza a comparação da frequência alélica entre os casos e os controles. Os polimorfismos devem ser escolhidos com base em um referencial de plausibilidade biológica ou devem-se fazer estudos com grande número de variações alélicas. O principal objetivo deste tipo de estudo é identificar uma sequência alélica variante capaz de causar ou de contribuir significativamente para um determinado fenótipo. Os estudos de associação são divididos em 3 tipos (70).

1- Gene candidato- um determinado gene tem evidências prévias de desempenhar uma função de interesse, através de estudos de ligação, posição ou funcionalidade. São então escolhidos em torno de 5 a 50 SNPs para avaliação (70).

2- Mapeamento Fino. Analisa-se uma região de interesse podendo ser estudados centenas de genes (70).

3- Genome-Wide Association Studies (GWAS). São estudos extensos e caros, buscando identificar variações ao longo do genoma, com avaliação de até 1 milhão de polimorfismos. (70).

### 2.4.4. Trkb

O Trkb é codificado pelo gene *NTRK2* (Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor type 2), localizado na posição 22.1.do braço longo do cromossomo 9. O *NTRK2* é um gene com 590kb e 24 exons. Existem 3 isoformas geradas por splicing

alternativo, sendo a forma completa chamada de TrkB full length (TrkB F.L.) – capaz de desencadear rapidamente a cascata de eventos intracelulares quando ativada pelo BDNF. As outras duas isoformas truncadas (T1 e T2) não apresentam o domínio Tirosina Kinase intracelular e são incapazes de gerar sinalização intracelular rápida. É possível que as formas truncadas tenham papel relevante em suprimir a ação das neurotrofinas (67).

O receptor TrkB está envolvido em processos de maturação do sistema nervoso central e periférico, através de sistemas que regulam a sobrevivência, proliferação, migração e diferenciação neuronal, além da formação de sinapses e plasticidade (67).

O TrkB tem elevada expressão nas terminações sinápticas do lobo temporal, em especial no hipocampo. Evidências provenientes de estudos experimentais apontam para o importante papel do TrkB em processos de neuroplasticidade e epileptogênese (15, 71-74).

Em relação aos estudos experimentais envolvendo epileptogênese e TrkB, tem papel destacado o trabalho de McNamara e colaboradores. Em 2004, este grupo publicou a pesquisa realizada com camundongos knockout para o TrkB, ou seja, animais TrkB<sup>(-/-)</sup> não expressavam essa proteína. Verificou-se que quando submetidos ao modelo experimental de epilepsia através de kindling, esses animais foram capazes de apresentar crises tônico-clônico generalizadas porém não desenvolveram epileptogênese, portanto, não sendo capazes de gerar crises espontâneas. No mesmo estudo, os camundongos knockout para o BDNF, chamados BDNF<sup>(-/-)</sup>, quando submetidos ao modelo de kindling, foram capazes de se tornar epiléticos, gerando crises espontâneas. Através destes achados, inferiu-se a necessidade da presença TrkB no processo de epileptogênese. Até então, esta propriedade não havia sido atribuída a nenhuma proteína específica (15). Estudos posteriores do mesmo grupo corroboraram esta hipótese. O uso de substâncias capazes de reduzir a expressão do TrkB no hipocampo de camundongos no modelo de kindling inibiu o processo de epileptogênese (75).

No modelo animal de epilepsia do lobo temporal utilizando ácido Kainico para indução de status epilepticus foi possível evitar a evolução do processo

epileptogênico utilizando inibidores do TrkB, bloqueando assim a evolução para ELT. De maneira similar, sabe-se que na ELT humana a ocorrência de um episódio de status epilepticus muitas vezes pode representar um IPI e colaborara para evolução para ELT (76).

As formas truncadas do Trkb parecem ter efeitos contrários ao Trkb-F.L. Ratos transgênicos que super expressavam a forma truncada do TrkB quando submetidos ao modelo de epilepsia utilizando kainato evidenciaram epileptogênese hipocampal reduzida, devido a baixa expressão da forma Trkb F.L. (77).

Estudos com múltiplos modelos animais de epilepsia evidenciaram expressão aumentada de TrkB no hipocampo, avaliada pelo aumento da imunodeteção do TrkB fosforilado (p-TrkB). A utilização de anticorpos seletivos contra o p-TrkB em conjunto com análise microscópica e marcadores celulares mostraram maior reatividade ao TrkB nas células granulares do giro denteado e na porção CA1 do hipocampo (78). Outro estudo em camundongos evidenciou que a elevada fosforilação do TrkB nas fibras musgosas do hipocampo e na porção CA3 associa-se com indução de crises no modelo de kindling (79). Binder e colaboradores mostraram que inibição seletiva do TrkB utilizando infusão intraventricular de anticorpos contra essa proteína ocasionou declínio na epileptogênese no modelo animal de kindling (80).

Além dos efeitos da inibição do TrkB no processo de epileptogênese, recentemente foi estudado um possível efeito anticonvulsivante da inibição dessa proteína. Foram estudados camundongos submetidos ao processo de kindling e posteriormente realizou-se inibição da kinase através de boqueio químico. A redução da proteína TrkB nos camundongos tratados quimicamente foi relacionada com redução da severidade das crises e aumento no limiar convulsivante de crises focais e generalizadas (81).

A Ciclotiazida é uma droga pró-convulsivante conhecida por induzir atividade epiléptica exuberante no hipocampo de ratos. No entanto, um estudo mostrou que a inibição do Trkb antes da administração dessa droga suprimiu a atividade epileptiforme nos animais tratados (82).

Dentro da perspectiva de analisar o papel do TrkB na epileptogênese humana, Kandratavicius L. e colaboradores realizaram um estudo da expressão de receptores de neurotrofinas em fatias de hipocampos cirurgicamente ressecados de pacientes com ELT refratária, com e sem comorbidades psiquiátricas. A análise imunohistoquímica dos receptores p75, TrkA, TrkB e TrkC foi realizada em 40 hipocampos retirados de pacientes com ELT-EH refratária, comparados com 10 hipocampos humanos provenientes de indivíduos não epiléticos submetidos a necropsia. Os pacientes foram divididos em 3 subgrupos: 1- Pacientes com ELT-EH refratária sem histórico de transtornos psiquiátricos. 2- Pacientes com ELT-EH refratária associada a psicose interictal. 3- Pacientes com ELT-EH refratária e diagnóstico de depressão maior. Os autores observaram aumento na expressão de TrkB nos hipocampos de pacientes que não obtiveram remissão pós cirúrgica completa e naqueles pacientes com maior número de crises secundariamente generalizadas. Uma tendência a correlação direta entre a frequência de crises e a maior expressão do TrkB foi observada. Além disso, a expressão aumentada de TrkB foi observada no hipocampo de pacientes com história de psicose e depressão maior (83).

A influência do TrkB em transtornos psiquiátricos também tem sido estudada. Um estudo de necropsia de pacientes adolescentes vítimas de suicídio analisou o cérebro de 29 pacientes suicidas e 25 controles. Houve significativa redução na expressão de mRNA do BDNF e do TrkB no córtex pre-frontal e hipocampo dos pacientes suicidas quando comparado aos controles (84). Em relação a esquizofrenia, estudos evidenciaram diminuição de mRNA do TrkB no córtex pre-frontal de pacientes esquizofrênicos (85, 86).

De forma geral, portanto, as evidências demonstram um papel crucial do TrkB no processo de epileptogênese e de plasticidade cerebral. O bloqueio ou a modificação da atividade dessa proteína pode representar um passo importante no entendimento dos mecanismos que levam o tecido cerebral normal a ser capaz de desencadear crises epiléticas espontâneas. Assim como o TrkB está relacionado a processos de aprendizagem e memória, acredita-se que graus variados de ativação desse receptor também possam contribuir para a reorganização circuitária anormal, levando a epilepsia e transtornos psiquiátricos.

#### 2.4.5. Polimorfismos do gene *NTRK2* e associações clínicas

A denominação SNP (Single Nucleotide Polymorphism) refere-se a um polimorfismo de nucleotídeo único, em que ocorre uma variação na sequência de DNA afetando somente uma base nitrogenada- Adenina (A), Timina (T), Citosina(C) ou Guanina(G). Essas substituições de base única acontecem em média a cada 1000 pares de base. Polimorfismos de nucleotídeo único afetam mais de 1% da população. Os polimorfismos mais prováveis de influenciar em doenças são aqueles em que a mudança da base gera uma mudança no aminoácido e na proteína, como acontece na anemia falciforme, por exemplo (87).

Diversos estudos têm averiguado a influência de variações alélicas-polimorfismos- do gene *NTRK2* em patologias neurológicas e psiquiátricas. Em se tratando de doenças complexas e multifatoriais, a análise dos polimorfismos genéticos contribui para o entendimento da heterogeneidade dos fenótipos dessas doenças. As chamadas “doenças complexas” são aquelas em que a correspondência entre o genótipo e o fenótipo não é completa. Além disso, pode-se determinar interações entre diferentes loci e repercussões em vias biológicas que podem prever maior ou menor suscetibilidade a doença.

A associação entre alterações na via BDNF-TrKb e risco de suicídio em depressão é suportada por um consistente corpo de evidências (88). Um importante estudo alemão, de Kohli MA, avaliou a associação entre polimorfismos de gene *NTRK2* e história de tentativa de suicídio ao longo da vida em pacientes deprimidos. A população original consistiu de 394 pacientes deprimidos dos quais 113 tinham tido tentativa de suicídio e 366 controles. Outros 2 grupos formaram populações de replicação do estudo. Um grupo de 744 pacientes alemães com transtorno de humor dos quais 152 tiveram tentativa de suicídio e um grupo de 921 indivíduos Afro-americanos sem história de doença psiquiátrica dos quais 119 tinham tido tentativa de suicídio. Os SNPs rs10868235, rs1867283, rs1147198, rs11140800 e rs1187286

foram associados com tentativa de suicídio ao longo da vida em pacientes deprimidos e esses dados foram replicados nas duas populações alemãs e na população afro-americana com transtorno de humor (89). Murphy, T.M. e colaboradores estudaram o SNP rs1659400 do *NTRK2* e encontraram a associação entre tentativa de suicídio em pacientes psiquiátricos (90). Um estudo polonês analisou o SNP rs10868235 do *NTRK2* em estudo de caso-controle e encontrou a associação deste polimorfismo com predisposição a suicídio completo (91).

O estudo norte-americano de Dong e colaboradores avaliou 272 pacientes com transtorno depressivo maior de acordo com os critérios do DSM-IV e 264 controles saudáveis numa população de Americanos com origem Mexicana. Os SNPs rs2289657 e rs56142442 do *NTRK2* foram associados a suscetibilidade a depressão e a resposta a antidepressivos- Desipramina e Fluoxetina (92). Nessa mesma linha de pesquisa, o estudo alemão de Hennings e colaboradores avaliou um total de 894 indivíduos caucasianos com critérios de depressão pelo DSM-IV, avaliados com a escala de depressão de Hamilton. Os SNPs do gene *NTRK2* rs10868223, rs1659412 e rs11140778 foram associados a resposta ao tratamento farmacológico, definida como redução de pelo menos 50% no escore de Hamilton após 5 semanas de tratamento (93). Outro estudo norte americano avaliou a influência de polimorfismos de *NTRK2* em pacientes portadores do vírus HIV (Human Immunodeficiency Virus) em relação a depressão. Sabe-se que o HIV diminui os níveis de BDNF e por consequência as cascatas desencadeadas pelo seu receptor, TrkB. Foram incluídas somente mulheres, 1365 pacientes HIV positivos e 371 HIV negativos de origem afro-americana e caucasiana. A ausência de sintomas depressivos em pacientes HIV positivos foi associada com o polimorfismo do *NTRK2* rs1212171, podendo representar um fator protetor para depressão nesta população (94). Li e colaboradores avaliaram os SNPs do *NTRK2* rs1387923, rs2769605 e rs1565445 em 948 pacientes com transtorno depressivo maior, em um estudo prospectivo de resposta ao tratamento farmacológico. O polimorfismo rs1565445 foi significativamente associado a depressão resistente ao tratamento, relacionada a presença do alelo TT, em comparação com os alelos CC e TC (95).

A anorexia nervosa é um transtorno psiquiátrico grave e com forte componente genético. O estudo Polonês de Dmitrzak-Weglarz et al analisou a



influência dos SNPs do *NTRK2* rs1187326, rs993315, rs1187327 e rs2289656 em um estudo de caso-controle com 256 pacientes com anorexia nervosa e 167 controles. O polimorfismo rs2289656 foi associado a maior risco de anorexia nervosa nessa população (96).

A resposta ao tratamento com lítio em pacientes com transtorno bipolar parece envolver a via de sinalização BDNF-TrkB. Um estudo avaliou polimorfismos do BDNF e do TrkB em relação a resposta profilática com lítio. Apenas polimorfismos do BDNF foram relacionados a variações de resposta ao tratamento, enquanto polimorfismos do TrkB rs1187326, rs2289656, rs1187327 não mostraram associação (97). Um estudo Chinês avaliou 284 pacientes com transtorno bipolar tipo I de acordo com DSM-IV e 295 controles saudáveis. Foram estudados os polimorfismos do *NTRK2* rs2769605, rs1565445, rs1387923. Houve uma associação significativa entre o SNP rs2769605 e a resposta ao tratamento com estabilizadores do humor (Lítio e Valproato), sendo o alelo A associado a uma taxa maior de resposta quando comparado ao genótipo GG (98).

Um estudo espanhol investigou a associação de polimorfismos do *NTRK2* em relação a ocorrência de transtorno obsessivo-compulsivo (TOC). Foram estudados 215 pacientes com TOC e 342 controles de origem Hispanico-caucasiana. Esse estudo verificou uma associação significativa entre o SNP rs2378672 e TOC em pacientes do sexo feminino (99).

O grupo Finlandês de Xu et al publicou o estudo de 43 SNPs do gene *NTRK2* em 229 pacientes com dependência a álcool e 287 controles saudáveis. Os polimorfismos rs10780691 (genótipo CT) e rs 993315 (genótipo TC) mostraram forte associação com dependência a álcool (100).

Dentro da linha de investigação do papel das neurotrofinas em transtornos psiquiátricos, é plausível que a via de sinalização BDNF-TrkB esteja envolvida na patogênese do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH). Em 2008, Conner et al realizaram um estudo com 143 indivíduos adultos do sexo masculino,

analisando a influência do SNP rs1212171 do *NTRK2* em escores de pontuação para TDAH, não tendo encontrado associação significativa (101).

Em relação aos estudos de associação de polimorfismos do *NTRK2* e doença de Alzheimer, identificam-se 4 estudos. O primeiro estudo foi publicado em 2005, do grupo Finlandês de Vepsäläinen et al. Foram estudados 375 pacientes Finlandeses com doença de Alzheimer e 460 controles. Foram analisados os SNPs rs1212171, rs1187326, rs1187327. Não foram encontradas diferenças significativas nos 2 grupos (102). Em 2008, Chen et al publicaram os resultados do trabalho que analisou 14 SNPs do *NTRK2*. Nenhum SNP isolado mostrou associação com doença de Alzheimer, porém associações significativas foram encontradas para haplótipos contendo os SNPs rs1624327, rs1443445 e rs378645 (103). O estudo Italiano de Cozza et al, publicado em 2008, encontrou associação entre o SNP rs2289656 com doença de Alzheimer esporádica (104). Em 2013, Zeng et al estudaram 216 pacientes com Alzheimer e 244 controles Chineses. Foram genotipados os SNPs rs1307279, rs1212171, rs1187321, rs1187323 e rs2289656. Não houve associação estatística com doença de Alzheimer nessa população (105).

Murphy e colaboradores avaliaram a associação entre o SNP rs11140714 do gene *NTRK2* e mudanças na arquitetura cerebral de pacientes com depressão. Nesse estudo de 45 pacientes com depressão e 45 controles, observou-se redução no volume da substância branca cerebral do lobo frontal nos pacientes em homozigose do alelo A nesse SNP (106).

A seguir, apresentamos uma tabela resumindo os principais achados de associações clínicas e alelos variantes do gene *NTRK2*.

**Tabela 1: Principais estudos de associações clínicas e SNPs do gene *NTRK2***

<b>Autor</b>	<b>Ano de publicação</b>	<b>Correlação clínica</b>	<b>SNP</b>
Kohli, MA.	2010	Tentativa de suicídio	rs10868235, rs1867283, rs1147198, rs11140800 rs1187286
Murphy, TM.	2011	Tentativa de suicídio	rs1659400
Chojnicka, I.	2012	Suicídio completo	rs10868235
Dong, C.	2009	Suscetibilidade a depressão e resposta a antidepressivos	rs2289657 e rs56142442
Hennings, JM.	2013	Resposta ao tratamento antidepressivo	rs10868223, rs1659412 rs11140778
Avdoshina, V.	2013	Depressão em mulheres HIV positivo	rs1212171
Li, Z.	2013	Depressão resistente ao tratamento	rs1565445

<b>Autor</b>	<b>Ano de publicação</b>	<b>Correlação clínica</b>	<b>SNP</b>
Dmitrzak-Weglarz	2013	Anorexia nervosa	rs2289656
Wang,Z.	2013	Resposta a estabilizadores de humor em TAB I	rs2769605
Alonso, P.	2008	Transtorno obsessivo-compulsivo	rs2378672
Xu, K.	2007	Dependência a álcool	rs10780691 rs 993315
Chen, Z.	2008	Alzheimer	Haplótipos rs1624327, rs1443445 rs378645
Cozza, A.	2008	Alzheimer	rs2289656
Murphy,M.L.	2012	Substancia branca cerebral em pacientes com depressão	rs11140714

### 3. Justificativa

A epilepsia do lobo temporal é a síndrome epiléptica focal mais frequente em adultos e representa um desafio terapêutico. Apesar de terem surgido inúmeros fármacos anticonvulsivantes nas últimas décadas, não parece ter ocorrido mudança no paradigma de tratamento desses pacientes, sendo que muitos acabam evoluindo para uma abordagem cirúrgica. O estudo de aspectos genéticos relacionados a esse tipo de epilepsia representa um passo importante no entendimento dos mecanismos de epileptogênese e portanto fundamental para estratégias terapêuticas futuras.

Nos últimos 50 anos, o estudo das neurotrofinas tem tido posição de destaque tanto em patologias neurológicas quanto em distúrbios psiquiátricos. No cenário da epilepsia de lobo temporal, o receptor TrkB exerce papel crítico. Estudos experimentais consistentes demonstraram que a proteína TrkB pode ser um pré-requisito para o desenvolvimento da epilepsia. A ausência ou inibição do TrkB implica em possíveis alterações de remodelação e plasticidade de circuitos mesolímbicos levando a inibição da epilepsia em modelos animais de kindling. Além disso, estudos de polimorfismos do gene *NTRK2*, que codifica o TrkB, associaram determinadas variações alélicas com doenças neurológicas, como a doença de Alzheimer, por exemplo, também com patogênese hipocampal. Variantes alélicas do TrkB também foram associadas com transtornos psiquiátricos, como tendência ao suicídio. Há, portanto, evidências experimentais e clínicas apontando para a contribuição do TrkB em processos de doença e reorganização circuitária mesolímbica.

O estudo de polimorfismos de gene *NTRK2* em pacientes com epilepsia de lobo temporal é relevante na medida em que pode estabelecer associações entre características clínicas e variantes do gene, com implicações prognósticas e até terapêuticas no futuro. Assim como variações alélicas podem contribuir para uma organização diferenciada de circuitos mesolímbicos, é plausível que polimorfismos genéticos determinem um comportamento biológico distinto.

## 4. Objetivos

### 4.1. Objetivo Geral

1- Estudar a influência de alelos variantes representativos de todas as regiões do gene *NTRK2* na epilepsia de lobo temporal. Avaliar a influência desses polimorfismos no desenvolvimento da epilepsia e na variabilidade clínica, eletroencefalográfica e de comorbidades psiquiátricas na epilepsia de lobo temporal.

### 4.2. Objetivos específicos

1-Estudar a prevalência dos polimorfismos do *NTRK2* rs1867283A>G, rs10868235C>T, rs1147198G>T, rs11140800A>T, rs1187286G>T, rs2289656A>G, rs1624327A>G, rs1443445A>G, rs3780645C>T, rs2378672C>T em pacientes com ELT e controles.

2-Analisar a influência dos polimorfismos do *NTRK2* nas características clínicas, eletroencefalográficas e de neuroimagem dos pacientes com ELT.

3-Estudar a influência dos polimorfismos do *NTRK2* em relação às comorbidades psiquiátricas em pacientes com ELT.

## 5. Referências da revisão de literatura

1. Engel J. Clinical aspects of epilepsy. *Epilepsy research*. 1991;10(1):9-17.
2. Engel J, Jr., Starkman S. Overview of seizures. *Emergency medicine clinics of North America*. 1994;12(4):895-923.
3. Krishnamoorthy ES, Satishchandra P, Sander JW. Research in epilepsy: development priorities for developing nations. *Epilepsia*. 2003;44 Suppl 1:5-8.
4. Sander JW. Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review. *Epilepsia*. 1993;34(6):1007-16.
5. Sander JW. The epidemiology of epilepsy revisited. *Current opinion in neurology*. 2003;16(2):165-70.
6. Sander JW. The natural history of epilepsy in the era of new antiepileptic drugs and surgical treatment. *Epilepsia*. 2003;44 Suppl 1:17-20.
7. Sander JW, Shorvon SD. Epidemiology of the epilepsies. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1996;61(5):433-43.
8. Newton CR, Garcia HH. Epilepsy in poor regions of the world. *Lancet*. 2012;380(9848):1193-201.
9. Ngugi AK, Kariuki SM, Bottomley C, Kleinschmidt I, Sander JW, Newton CR. Incidence of epilepsy: a systematic review and meta-analysis. *Neurology*. 2011;77(10):1005-12.
10. Jette N, Trevathan E. Saving lives by treating epilepsy in developing countries. *Neurology*. 2014;82(7):552-3.

11. Georgiadis I, Kapsalaki EZ, Fountas KN. Temporal lobe resective surgery for medically intractable epilepsy: a review of complications and side effects. *Epilepsy research and treatment*. 2013;2013:752195.
12. Engel J, Jr. Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2001;7(4):340-52.
13. Tellez-Zenteno JF, Ladino LD. [Temporal epilepsy: clinical, diagnostic and therapeutic aspects]. *Revista de neurologia*. 2013;56(4):229-42.
14. McNamara JO, Scharfman HE. Temporal Lobe Epilepsy and the BDNF Receptor, TrkB. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, editors. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. 4th ed. Bethesda (MD)2012.
15. He XP, Kotloski R, Nef S, Luikart BW, Parada LF, McNamara JO. Conditional deletion of TrkB but not BDNF prevents epileptogenesis in the kindling model. *Neuron*. 2004;43(1):31-42.
16. Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 2005;46(4):470-2.
17. Moshe SL, Perucca E, Ryvlin P, Tomson T. Epilepsy: new advances. *Lancet*. 2014.
18. Tellez-Zenteno JF, Hernandez-Ronquillo L. A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research and treatment*. 2012;2012:630853.
19. Fazel S, Wolf A, Langstrom N, Newton CR, Lichtenstein P. Premature mortality in epilepsy and the role of psychiatric comorbidity: a total population study. *Lancet*. 2013;382(9905):1646-54.



20. Engel J, Jr., International League Against E. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2001;42(6):796-803.
21. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*. 2010;51(4):676-85.
22. Javidan M. Electroencephalography in mesial temporal lobe epilepsy: a review. *Epilepsy research and treatment*. 2012;2012:637430.
23. Malmgren K, Thom M. Hippocampal sclerosis--origins and imaging. *Epilepsia*. 2012;53 Suppl 4:19-33.
24. O'Dell CM, Das A, Wallace Gt, Ray SK, Banik NL. Understanding the basic mechanisms underlying seizures in mesial temporal lobe epilepsy and possible therapeutic targets: a review. *Journal of neuroscience research*. 2012;90(5):913-24.
25. Wieser HG, Epilepsy ICoNo. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia*. 2004;45(6):695-714.
26. Pitkanen A, Engel J, Jr. Past and Present Definitions of Epileptogenesis and Its Biomarkers. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2014.
27. Sendrowski K, Sobaniec W. Hippocampus, hippocampal sclerosis and epilepsy. *Pharmacological reports : PR*. 2013;65(3):555-65.
28. Martin A. Automatic activation of the medial temporal lobe during encoding: lateralized influences of meaning and novelty. *Hippocampus*. 1999;9(1):62-70.
29. Helmstaedter C, Elger CE. Chronic temporal lobe epilepsy: a neurodevelopmental or progressively dementing disease? *Brain : a journal of neurology*. 2009;132(Pt 10):2822-30.

30. Thom M, Mathern GW, Cross JH, Bertram EH. Mesial temporal lobe epilepsy: How do we improve surgical outcome? *Annals of neurology*. 2010;68(4):424-34.
31. Cendes F, Sakamoto AC, Spreafico R, Bingaman W, Becker AJ. Epilepsies associated with hippocampal sclerosis. *Acta neuropathologica*. 2014;128(1):21-37.
32. Mathern GW, Babb TL, Leite JP, Pretorius K, Yeoman KM, Kuhlman PA. The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. *Epilepsy research*. 1996;26(1):151-61.
33. Cendes F. Febrile seizures and mesial temporal sclerosis. *Current opinion in neurology*. 2004;17(2):161-4.
34. Mathern GW, Leite JP, Pretorius JK, Quinn B, Peacock WJ, Babb TL. Children with severe epilepsy: evidence of hippocampal neuron losses and aberrant mossy fiber sprouting during postnatal granule cell migration and differentiation. *Brain research Developmental brain research*. 1994;78(1):70-80.
35. Markand ON. Pearls, perils, and pitfalls in the use of the electroencephalogram. *Seminars in neurology*. 2003;23(1):7-46.
36. Wiebe S, Blume WT, Girvin JP, Eliasziw M, Effectiveness, Efficiency of Surgery for Temporal Lobe Epilepsy Study G. A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. *The New England journal of medicine*. 2001;345(5):311-8.
37. Spencer S, Huh L. Outcomes of epilepsy surgery in adults and children. *The Lancet Neurology*. 2008;7(6):525-37.
38. Kanner AM. Epilepsy and mood disorders. *Epilepsia*. 2007;48 Suppl 9:20-2.
39. Garcia-Morales I, de la Pena Mayor P, Kanner AM. Psychiatric comorbidities in epilepsy: identification and treatment. *The neurologist*. 2008;14(6 Suppl 1):S15-25.

40. Gaitatzis A, Trimble MR, Sander JW. The psychiatric comorbidity of epilepsy. *Acta neurologica Scandinavica*. 2004;110(4):207-20.
41. Swinkels WA, Kuyk J, van Dyck R, Spinhoven P. Psychiatric comorbidity in epilepsy. *Epilepsy & behavior : E&B*. 2005;7(1):37-50.
42. Bragatti JA, Torres CM, Londero RG, Assmann JB, Fontana V, Martin KC, et al. Prevalence of psychiatric comorbidities in temporal lobe epilepsy: the value of structured psychiatric interviews. *Epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape*. 2010;12(4):283-91.
43. Beyenburg S, Mitchell AJ, Schmidt D, Elger CE, Reuber M. Anxiety in patients with epilepsy: systematic review and suggestions for clinical management. *Epilepsy & behavior : E&B*. 2005;7(2):161-71.
44. Kanner AM, Balabanov A. Depression and epilepsy: how closely related are they? *Neurology*. 2002;58(8 Suppl 5):S27-39.
45. Pruefer C, Norra C. Mood disorders and their treatment in patients with epilepsy. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*. 2005;17(1):20-8.
46. Kanner AM, Mazarati A, Koepp M. Biomarkers of epileptogenesis: psychiatric comorbidities (?). *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2014;11(2):358-72.
47. Kanner AM. Depression and epilepsy: A bidirectional relation? *Epilepsia*. 2011;52 Suppl 1:21-7.
48. Gilliam F, Kanner AM. Treatment of depressive disorders in epilepsy patients. *Epilepsy & behavior : E&B*. 2002;3(5S):2-9.
49. Lambert MV, Robertson MM. Depression in epilepsy: etiology, phenomenology, and treatment. *Epilepsia*. 1999;40 Suppl 10:S21-47.
50. Kanner AM. Depression and epilepsy: a new perspective on two closely related disorders. *Epilepsy currents / American Epilepsy Society*. 2006;6(5):141-6.

51. Vazquez B, Devinsky O. Epilepsy and anxiety. *Epilepsy & behavior : E&B*. 2003;4 Suppl 4:S20-5.
52. Tellez-Zenteno JF, Patten SB, Jette N, Williams J, Wiebe S. Psychiatric comorbidity in epilepsy: a population-based analysis. *Epilepsia*. 2007;48(12):2336-44.
53. Trimble M, Kanner A, Schmitz B. Postictal psychosis. *Epilepsy & behavior : E&B*. 2010;19(2):159-61.
54. Wiglusz MS, Cubala WJ, Galuszko-Wegielnik M, Jakuszkowiak-Wojten K, Landowski J. Mood disorders in epilepsy - diagnostic and methodological considerations. *Psychiatria Danubina*. 2012;24 Suppl 1:S44-50.
55. Jones JE, Hermann BP, Barry JJ, Gilliam F, Kanner AM, Meador KJ. Clinical assessment of Axis I psychiatric morbidity in chronic epilepsy: a multicenter investigation. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*. 2005;17(2):172-9.
56. Del-Ben CM. Confiabilidade da "Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV- Versão Clínica" traduzida para o Portugues. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2001;23(3):156-9.
57. First MBS, R.L.; Gibbon,M. et al. Structured Clinical Interview for DSM-IV- TR Axis I Disorder-non patent ed. (SCID-I NP-2/2001 Revision). 2001.
58. Lewin GR, Carter BD. Neurotrophic factors. Preface. *Handbook of experimental pharmacology*. 2014;220:v-vi.
59. Skaper SD. The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *CNS & neurological disorders drug targets*. 2008;7(1):46-62.
60. Felderhoff-Mueser U, Sifringer M, Pesditschek S, Kuckuck H, Moysich A, Bittigau P, et al. Pathways leading to apoptotic neurodegeneration following trauma to the developing rat brain. *Neurobiology of disease*. 2002;11(2):231-45.

61. Schuman EM. Neurotrophin regulation of synaptic transmission. *Current opinion in neurobiology*. 1999;9(1):105-9.
62. Kalb R. The protean actions of neurotrophins and their receptors on the life and death of neurons. *Trends in neurosciences*. 2005;28(1):5-11.
63. Schramm A, Schulte JH, Astrahantseff K, Apostolov O, Limpt V, Sieverts H, et al. Biological effects of TrkA and TrkB receptor signaling in neuroblastoma. *Cancer letters*. 2005;228(1-2):143-53.
64. Yamada K, Nabeshima T. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *Journal of pharmacological sciences*. 2003;91(4):267-70.
65. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2006;361(1473):1545-64.
66. Deinhardt KJ, F. More than just an off-switch: the essential role of protein dephosphorylation in the modulation of BDNF signaling events. 2012.
67. Gupta VK, You Y, Gupta VB, Klistorner A, Graham SL. TrkB Receptor Signalling: Implications in Neurodegenerative, Psychiatric and Proliferative Disorders. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(5):10122-42.
68. Goldstein DB, Cavalleri GL. Genomics: understanding human diversity. *Nature*. 2005;437(7063):1241-2.
69. Schafer AJ, Hawkins JR. DNA variation and the future of human genetics. *Nature biotechnology*. 1998;16(1):33-9.
70. Hattersley AT, McCarthy MI. What makes a good genetic association study? *Lancet*. 2005;366(9493):1315-23.
71. Pezet S, Malcangio M. Brain-derived neurotrophic factor as a drug target for CNS disorders. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2004;8(5):391-9.

72. Tsai SJ. TrkB partial agonists: potential treatment strategy for epilepsy, mania, and autism. *Medical hypotheses*. 2006;66(1):173-5.
73. Berardi N, Lodovichi C, Caleo M, Pizzorusso T, Maffei L. Role of neurotrophins in neural plasticity: what we learn from the visual cortex. *Restorative neurology and neuroscience*. 1999;15(2-3):125-36.
74. Koyama R, Yamada MK, Fujisawa S, Katoh-Semba R, Matsuki N, Ikegaya Y. Brain-derived neurotrophic factor induces hyperexcitable reentrant circuits in the dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(33):7215-24.
75. Kotloski R, McNamara JO. Reduction of TrkB expression de novo in the adult mouse impairs epileptogenesis in the kindling model. *Hippocampus*. 2010;20(6):713-23.
76. Liu G, Gu B, He XP, Joshi RB, Wackerle HD, Rodriguiz RM, et al. Transient inhibition of TrkB kinase after status epilepticus prevents development of temporal lobe epilepsy. *Neuron*. 2013;79(1):31-8.
77. Heinrich C, Lahtinen S, Suzuki F, Anne-Marie L, Huber S, Haussler U, et al. Increase in BDNF-mediated TrkB signaling promotes epileptogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of disease*. 2011;42(1):35-47.
78. Helgager J, Liu G, McNamara JO. The cellular and synaptic location of activated TrkB in mouse hippocampus during limbic epileptogenesis. *The Journal of comparative neurology*. 2013;521(3):499-521, Spc1.
79. He XP, Minichiello L, Klein R, McNamara JO. Immunohistochemical evidence of seizure-induced activation of trkB receptors in the mossy fiber pathway of adult mouse hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(17):7502-8.
80. Binder DK, Routbort MJ, Ryan TE, Yancopoulos GD, McNamara JO. Selective inhibition of kindling development by intraventricular administration of TrkB

receptor body. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1999;19(4):1424-36.

81. Liu G, Kotloski RJ, McNamara JO. Antiseizure effects of TrkB kinase inhibition. *Epilepsia*. 2014;55(8):1264-73.

82. Wang Y, Qi JS, Kong S, Sun Y, Fan J, Jiang M, et al. BDNF-TrkB signaling pathway mediates the induction of epileptiform activity induced by a convulsant drug cyclothiazide. *Neuropharmacology*. 2009;57(1):49-59.

83. Kandratavicius L, Hallak JE, Carlotti CG, Assirati JA, Jr., Leite JP. Neurotrophin receptors expression in mesial temporal lobe epilepsy with and without psychiatric comorbidities and their relation with seizure type and surgical outcome. *Acta neuropathologica communications*. 2014;2:81.

84. Pandey GN, Ren X, Rizavi HS, Conley RR, Roberts RC, Dwivedi Y. Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B receptor signalling in post-mortem brain of teenage suicide victims. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum*. 2008;11(8):1047-61.

85. Weickert CS, Lignons DL, Romanczyk T, Ungaro G, Hyde TM, Herman MM, et al. Reductions in neurotrophin receptor mRNAs in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Molecular psychiatry*. 2005;10(7):637-50.

86. Takahashi M, Shirakawa O, Toyooka K, Kitamura N, Hashimoto T, Maeda K, et al. Abnormal expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptor in the corticolimbic system of schizophrenic patients. *Molecular psychiatry*. 2000;5(3):293-300.

87. Pittman A, Hardy J. Genetic analysis in neurology: the next 10 years. *JAMA neurology*. 2013;70(6):696-702.

88. Dwivedi Y, Rizavi HS, Conley RR, Roberts RC, Tamminga CA, Pandey GN. Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Archives of general psychiatry*. 2003;60(8):804-15.

89. Kohli MA, Salyakina D, Pfennig A, Lucae S, Horstmann S, Menke A, et al. Association of genetic variants in the neurotrophic receptor-encoding gene NTRK2 and a lifetime history of suicide attempts in depressed patients. *Archives of general psychiatry*. 2010;67(4):348-59.
90. Murphy TM, Ryan M, Foster T, Kelly C, McClelland R, O'Grady J, et al. Risk and protective genetic variants in suicidal behaviour: association with SLC1A2, SLC1A3, 5-HTR1B &NTRK2 polymorphisms. *Behavioral and brain functions : BBF*. 2011;7:22.
91. Chojnicka I, Strawa K, Fudalej S, Fudalej M, Pawlak A, Kostrzewa G, et al. Analysis of four genes involved in the neurodevelopment shows association of rs4307059 polymorphism in the cadherin 9/10 region with completed suicide. *Neuropsychobiology*. 2012;66(2):134-40.
92. Dong C, Wong ML, Licinio J. Sequence variations of ABCB1, SLC6A2, SLC6A3, SLC6A4, CREB1, CRHR1 and NTRK2: association with major depression and antidepressant response in Mexican-Americans. *Molecular psychiatry*. 2009;14(12):1105-18.
93. Hennings JM, Kohli MA, Czamara D, Giese M, Eckert A, Wolf C, et al. Possible associations of NTRK2 polymorphisms with antidepressant treatment outcome: findings from an extended tag SNP approach. *PloS one*. 2013;8(6):e64947.
94. Avdoshina V, Mocchetti I, Liu C, Young MA, Anastos K, Cohen M, et al. Single-nucleotide polymorphisms in TrkB and risk for depression: findings from the women's interagency HIV study. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 2013;64(2):138-41.
95. Li Z, Zhang Y, Wang Z, Chen J, Fan J, Guan Y, et al. The role of BDNF, NTRK2 gene and their interaction in development of treatment-resistant depression: data from multicenter, prospective, longitudinal clinic practice. *Journal of psychiatric research*. 2013;47(1):8-14.
96. Dmitrzak-Weglarczyk M, Moczko J, Skibinska M, Słopien A, Tyszkiewicz M, Pawlak J, et al. The study of candidate genes related to the neurodevelopmental



hypothesis of anorexia nervosa: classical association study versus decision tree. *Psychiatry research*. 2013;206(1):117-21.

97. Dmitrzak-Weglarczyk M, Rybakowski JK, Suwalska A, Skibinska M, Leszczynska-Rodziewicz A, Szczepankiewicz A, et al. Association studies of the BDNF and the NTRK2 gene polymorphisms with prophylactic lithium response in bipolar patients. *Pharmacogenomics*. 2008;9(11):1595-603.

98. Wang Z, Fan J, Gao K, Li Z, Yi Z, Wang L, et al. Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2 (NTRK2) gene associated with treatment response to mood stabilizers in patients with bipolar I disorder. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2013;50(2):305-10.

99. Alonso P, Gratacos M, Menchon JM, Saiz-Ruiz J, Segalas C, Baca-Garcia E, et al. Extensive genotyping of the BDNF and NTRK2 genes define protective haplotypes against obsessive-compulsive disorder. *Biological psychiatry*. 2008;63(6):619-28.

100. Xu K, Anderson TR, Neyer KM, Lamparella N, Jenkins G, Zhou Z, et al. Nucleotide sequence variation within the human tyrosine kinase B neurotrophin receptor gene: association with antisocial alcohol dependence. *The pharmacogenomics journal*. 2007;7(6):368-79.

101. Conner AC, Kissling C, Hodges E, Hunnerkopf R, Clement RM, Dudley E, et al. Neurotrophic factor-related gene polymorphisms and adult attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) score in a high-risk male population. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*. 2008;147B(8):1476-80.

102. Vepsäläinen S, Castren E, Helisalmi S, Iivonen S, Mannermaa A, Lehtovirta M, et al. Genetic analysis of BDNF and TrkB gene polymorphisms in Alzheimer's disease. *Journal of neurology*. 2005;252(4):423-8.

103. Chen Z, Simmons MS, Perry RT, Wiener HW, Harrell LE, Go RC. Genetic association of neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2 (NTRK2) with Alzheimer's disease. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric*

genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics. 2008;147(3):363-9.

104. Cozza A, Melissari E, Iacopetti P, Mariotti V, Tedde A, Nacmias B, et al. SNPs in neurotrophin system genes and Alzheimer's disease in an Italian population. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2008;15(1):61-70.

105. Zeng F, Zou HQ, Zhou HD, Li J, Wang L, Cao HY, et al. The relationship between single nucleotide polymorphisms of the NTRK2 gene and sporadic Alzheimer's disease in the Chinese Han population. *Neuroscience letters*. 2013;550:55-9.

106. Murphy ML, Carballedo A, Fagan AJ, et al. Neurotrophic Tyrosine Kinase Polymorphism Impacts White Matter Connections in Patients with Major Depressive Disorder. *Biol Psychiatry* 2012; 72:663–670.

## 6. Artigo 1

### ***NTRK2* gene variants display association with temporal lobe epilepsy**

Carolina Machado Torres<sup>a,b,c</sup>

Marina Siebert<sup>d</sup>

Hugo Bock<sup>d</sup>

José Augusto Bragatti<sup>c</sup>

Suellen Mandelli Mota<sup>b</sup>

Martina Camerini Marafon<sup>b</sup>

Ingridi Silveira<sup>b</sup>

Maria Luiza Saraiva-Pereira<sup>a,b,d</sup>

Marino Muxfeldt Bianchin<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Posgraduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

<sup>b</sup>Basic Research and Advanced Investigations in Neurology, Experimental Research Centre, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>c</sup>Division of Neurology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

<sup>d</sup>Laboratory of Genetics Identification, Experimental Research Centre, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil.

#### **Address Correspondence to:**

Marino M. Bianchin, [mmbianchin@hotmail.com](mailto:mmbianchin@hotmail.com)

B.R.A.I.N.Experimental Research Centre

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Ramiro Barcelos, 2350,

Porto Alegre, RS, Brazil, 90035-903

## ABSTRACT

**Objective:** The *NTRK2* gene encodes for a member of the neurotrophic tyrosine receptor kinase family known as TrkB. It is a membrane-associated receptor with signaling and cellular differentiation proprieties that has been involved in neuropsychiatric disorders, including epilepsy. We report here frequencies of *NTRK2* allele variants in patients with temporal lobe epilepsy (TLE) compared to controls without epilepsy and explore the impact of these polymorphisms on major clinical variables in TLE.

**Methods:** A case-control study comparing the frequencies of the *NTRK2* gene polymorphisms in 198 TLE Brazilian patients and in 200 matching controls without epilepsy. In a second step, the impact of allelic variation on major clinical and electroencephalographic variables in epilepsy was evaluated in the group of TLE patients. Testing different regions in the *NTRK2* gene, the following polymorphisms were evaluated: rs1867283, rs10868235, rs1147198, rs11140800, rs1187286, rs2289656, rs1624327, rs1443445, rs3780645, and rs2378672.

**Results:** Patients with temporal lobe epilepsy showed a statistically significant increase of T/T genotype in the rs10868235 when compared with the control group (O.R.=1.90; 95%CI=1.17-3.09;  $p=0.01$ ). No further differences were observed between patients and controls. Patients that are homozygous for A allele in the rs1443445 showed earlier mean age of seizure onset,  $p<0.01$  (16.6 versus 22.4 years-old). We have also observed that T allele in the rs3780645 was more frequent in patients that needed polytherapy for seizure control when compared to those in monotherapy, (O.R.=4.13; 95%CI=1.68-10.29;  $p=0.001$ ). This finding may reflect an increased difficulty to exert seizure control in this group of patients. No additional differences were observed in this study.

**Conclusion:** Patients with epilepsy showed a difference in rs10868235 allelic distribution when compared with controls without epilepsy. *NTRK2* variability influenced age of seizure onset and pharmacologic response to seizure control. As far as we are aware, this is the first study showing an association between *NTRK2* allelic variants in temporal lobe epilepsy. We

believe that further studies in this venue will shade some light on the molecular mechanisms involved in epileptogenesis and its characteristics.

**Keywords:**

***NTRK2*, polymorphism, TrkB, temporal lobe epilepsy.**

## INTRODUCTION

Temporal lobe epilepsy is one of the most common types of human focal epilepsy and its molecular and genomic basis has been extensively evaluated.<sup>1-7</sup> Promising large-scale investigations, such as genome-wide association studies, have been employed with great expectation, but those studies have not succeed in discovering reliable markers in epilepsy genomics so far.<sup>8,9</sup> On the other hand, more recent observations suggest that a genetic basis to epilepsy predisposition, epilepsy development, or epilepsy phenotype variability are perhaps broader than what has been observed to date, but remains largely unknown.<sup>10-15</sup> Genetic markers of epilepsy are far from being elucidated; therefore new studies regarding still warranted.

In a broader sense, neurotrophins are secreted factors that have a nourishing effect on neurons.<sup>16-21</sup> Nerve growth factor (NGF), brain derived nerve growth factor (BDNF), neurotrophin 3 and 4 (NT3 and NT4) are neurotrophins prototypes. These neurotrophins and their receptors, p75NTR, TrkA, TrkB, and TrkC, have been extensively studied during the last decades, and many of their molecular mechanisms have already been described.<sup>16-21</sup> Briefly, p75NTR can bind to, and is activated by, all four neurotrophins in their mature form or as pro-neurotrophins. Trk receptors are more specific, and usually bind to, and are activated by, selective and mature forms of neurotrophins. NGF preferentially binds and activates TrkA, whereas NT3 preferentially binds and activates TrkC. BDNF and NT4 preferentially bind to, and activate, TrkB.<sup>16-21</sup> The Trk family of tyrosine kinase receptors contains three single-pass type I transmembrane proteins with glycosylated extracellular domains and three leucine-rich repeats flanked by two cysteine repeats and immunoglobulin-C2 (Ig) domains proximal to the transmembrane region. Intracellularly, Trk receptors possess a tyrosine kinase domain.<sup>16-21</sup> These neurotrophins and their receptors are mainly involved in neuronal development and signaling, including cell survival and differentiation, axonal and dendritic growth and arborization, neural protection, and synaptic plasticity.<sup>16-21</sup> While TrkB is predominantly expressed within the central nervous system, TrkA and TrkC are largely found on peripheral neuronal populations.<sup>16-21</sup> Due to its functions, neurotrophins and their receptors, and more specifically TrkB, have been studied in neuropsychiatric disorders with growing interest, and

they are rising as potential targets for the development of new therapies for neurological and psychiatric disorders.<sup>22-24</sup>

TrkB is a neurotrophin receptor that has been emerged as a potential candidate for epileptogenesis and epilepsy treatment. The mRNAs levels of BDNF and TrkB are increased after epileptic seizures.<sup>25-27</sup> In refractory focal cortical dysplasia, TrkB is expressed in large dysplastic and in small neurons.<sup>28</sup> TrkB knockout mice showed impaired epileptogenesis after kindling.<sup>29</sup> Reduction of expression of TrkB *de novo* in the mature brain impaired epileptogenesis in mice.<sup>30</sup> Transitory inactivation of TrkB inhibited epileptogenesis after status epilepticus in a kainic model of epilepsy.<sup>31</sup> More recently, Liu and colleagues showed that reduction of TrkB receptors might impair electric induction of seizures that suggest TrkB as a potential molecular target for the development of new antiepileptic drugs.<sup>32</sup> In spite of these interesting results in animal models of epilepsy and their potential implication for human epileptogenesis, only few studies have examined genes that encode neurotrophins as candidate markers or targets for human epilepsy. Moreover, most of these studies examined the *BDNF* gene and not its binding receptor, TrkB, with varied results.<sup>33-41</sup>

The *NTRK2* gene encodes for TrkB.<sup>42,43</sup> a membrane receptor kinase that autophosphorylates when activated by ligand binding and is effective via the MAPK signaling pathways. TrkB is involved in neuronal outgrowth and arborization, and in synaptic plasticity.<sup>18</sup> As briefly discussed above, TrkB is a potential molecular target for blocking epileptogenesis and for epilepsy treatment. In previous studies, the *NTRK2* allele variants were first associated with mood disorders, eating disorders, vulnerability to nicotine or alcohol dependence, obsessive-compulsive disorder, attention-deficit/hyperactivity disorder, autism, and Alzheimer disease.<sup>44-54</sup> However, as far as we are aware and in spite of promising preclinical molecular studies, there are no association studies of variants in the *NTRK2* gene in human epilepsy. We report here the results of a study designed to investigate SNPs within the *NTRK2* gene in epilepsy. More specifically, this is an association study where frequencies of variants in *NTRK2* are compared between patients with temporal lobe epilepsy and controls without epilepsy. In a second step, data from patients' group, evaluating the impact of allelic variation on major clinical and electroencephalographic variables in epilepsy were explored.

## 2. METHODS

### 2.1 Patients

This is a case-control study of 198 patients with temporal lobe epilepsy seen at the Epilepsy Outpatient Clinic of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Inclusion criteria were based on the 2010 ILAE's electroclinical classification and epilepsy etiology (Commission on Classification Terminology of the International League Against Epilepsy, 2010).<sup>55</sup> Patients with extratemporal epilepsies, mental retardation, and those with systemic diseases were excluded. All patients were submitted to interictal EEG studies and neuroimaging studies (MRI and CT-scan). Controlled or refractory epilepsy was classified according with ILAE recommendations. The control group was composed by 200 non-related healthy subjects that agreed in participating in the study, matched by age, gender and ethnicity, and enrolled from the same geographical region and socio-economic class of patients with epilepsy. For exclusion based on any neurological, psychiatric or major clinical disorders, a structured interview was utilized. In order to avoid different ethnical groups, we included only Brazilian with European origin individuals in this study. Porto Alegre is the capital of Rio Grande do Sul state. A great part of the State population is composed by Caucasian European immigrants (e.g. Germans, Italians, and Portuguese) (IBGE Cities)<sup>56</sup>. Thus we believe that we selected only controls and patients from Caucasian origin. Non-caucasian controls and patients were excluded. The study was approved by the Ethics Committee of our institution, Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and it is in agreement with the Declaration of Helsinki. All subjects included provided written informed consent to participate in this study.

### 2.2. DNA extraction and analysis

DNA was isolated from peripheral leukocytes according to standard procedures.<sup>57</sup> Subjects were genotyped for specific SNPs distributed in different regions of the *NTRK2* gene as follows: rs1867283, rs10868235, rs1147198, rs11140800, rs1187286, rs2289656, rs1624327, rs1443445, rs3780645, and rs2378672. SNPs flanking regions were amplified by real-time PCR using TaqMan® SNP genotyping assays (Applied Biosystems). SNPs information was obtained from the National Center for Biotechnology Information SNP



database (available on the site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) and they were chosen based on previously published studies. PCR reaction was prepared according to manufacture's instructions and analyses were performed on the ABI Prism 7500 Fast Sequence Detector System® (Applied Biosystems).

For each SNP analyzed, DNA samples from two homozygous individuals for each allele and two heterozygous individuals (six samples for each SNP) were sequenced to confirm results. For DNA sequencing, new sets of primers were designed, PCR reaction was performed, and products were purified using the QIA PCR Purification kit (Qiagen). PCR reaction products were then sequenced using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) and analyzed on ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Results were analyzed by SeqScape® Software v3.1 (Applied Biosystems).

### **2.3. Variables and statistical analysis**

At first, we assessed statistical differences between patients and controls in relation to the variants studied. In a second step, we studied the patient group only, evaluating clinical variables related to the epileptogenic process associated with same variants in the *NTRK2* gene. Variables studied were age, age of epilepsy onset, duration of epilepsy, gender, seizure control, mono or polytherapy for epilepsy, extension of irritative zone, and neuroimaging variables. Good seizure control was defined as no seizure during the past year. Extension of irritative zone was defined as unilateral only if 90% or more of all EEG epileptiform discharges were located in one of the temporal lobes. For data analysis, we used Fisher's Exact Test for qualitative variables. For quantitative variables, we used independent T-test with Levene's test for equality of variances. Qualitative variables are expressed in number and percentage. Quantitative variables are expressed as mean and standard deviation (S.D). All statistical analyses were carried out with SPSS 16 statistical package for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Results were considered significant when  $p < 0.05$ .

### 3. Results

Gender distribution of patients' group (198) was 131(66%) females and 67(34%) males. The mean age in patients was 43.4 (minimum 19 and maximum 79 years, SD=12.5). Distributions of genotypes frequency were all in Hardy-Weinberg equilibrium for both cases and controls. Table 1 shows SNPs genotype distribution in the *NTRK2* gene in patients with TLE and in controls. In this study, we observed that patients with temporal lobe epilepsy showed a statistically significant increase of T/T genotype in the rs10868235 when compared with the control group (O.R.=1.90; 95%CI=1.17-3.09;  $p=0.01$ ) (Table 1). No additional differences were observed between patients and controls. In a second step of this study, we analyzed if genomic variants showed different distribution in epilepsy patients regarding main clinical or eletrographic variables. Patients that are homozygous for the A allele in the rs1443445 showed earlier mean age of seizure onset (mean age=16.56 years old; SD=12.51) when compared to other patients (mean age 22.4 years old; SD=16.44), a significant difference ( $p=0.01$ ). We also observed that presence of T allele, either in heterozygous or in homozygous state, was significantly more frequent in the rs3780645 in patients that needed polytheraphy for seizure control when compared with those in monotherapy (O.R.=4.13; 95%CI=1.68-10.29;  $p=0.001$ ), a finding that might reflect an increased difficulty of achieving pharmacological seizure control in this group of patients (Table 2). The presence of T allele in patients with refractory epilepsy was increased, but did not reach a significant difference (O.R.=2.06; 95%CI=0.91-4.70;  $p=0.08$ ). There were no differences in analyses of interictal EEG epileptiform discharges (Table 3). Regarding neuroimaging, 96 (48.5%) patients had normal neuroimaging findings, 41 (20.7%) patients had hippocampal sclerosis, 30 (15.2%) patients had gliosis, 12 (6.1%) had neurocysticercosis and the remaining 19 (9.6%) had other diagnosis (low grade tumor, cystic lesions, lobar or other atrophies). No *NTRK2* allele variants were associated with specific neuroimaging findings (Table3). No further differences were observed in this study.

---

Please, Insert Table1, Table 2 and Table 3 about here

---

#### 4. DISCUSSION

In this study we observed that patients with epilepsy showed a significant increase of T/T genotype in the rs10868235 when compared to the control group. This result suggests that *NTRK2* genetic variability might predispose to epilepsy. Moreover, patients that are homozygous for the A allele in the rs1443445 showed a significantly earlier mean age of seizure onset when compared to other patients. We have also observed that T allele in the rs3780645 was more frequent in patients that need polytherapy for seizure control when compared with those in monotherapy, a finding perhaps reflecting an increased difficulty of managing seizures via pharmacological means in this group of patients. Differences observed in age of epilepsy onset and seizure control (as reflected by a difference in number of drugs that patients were using for epilepsy control) suggest that *NTRK2* variants might have impact in clinical variables in epilepsy. Taken together, these results may suggest that the *NTRK2* gene variants, and perhaps TrkB genetic variability, might influence human epileptogenesis as well as some characteristics of epilepsy expression in patients with temporal lobe epilepsy.

In humans, BDNF preferentially activates TrkB that is phosphorylate at the tyrosine residue of the transmembrane domain, creating a Shc binding site that is important for CREB and CaM kinase signaling and hippocampal long term potentiation.<sup>18,58</sup> TrkB binding also activates phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) which results in Akt membrane docking and increased protein translation via the mammalian target of rapamycin (mTOR)-p70S6 kinase and 4E-BP1 pathways, leading to axonal growth.<sup>18</sup> Besides neurotrophins, others ligands, such as glucocorticoids or zinc, are able to transactivate TrkB receptors.<sup>18,59,60</sup> Due to these important roles in synaptic plasticity, TrkB is becoming increasingly studied in neuropsychiatric disorders.<sup>22</sup> Regarding epilepsy, in a seminal study He et al. tested the role of BDNF or TrkB in epileptogenesis by submitting synapsin-Cre conditional BDNF(-/-) and TrkB(-/-) mice using the kindling model of epilepsy.<sup>29</sup> Only in TrkB(-/-) mice there was a reduction of electrophysiological parameters and no behavioral evidence of epileptogenesis during the kindling process. Thus, TrkB but not BDNF seems to be crucial for epileptogenesis, and TrkB downstream signaling pathways are potential molecular targets for the development of drugs that could block epileptogenicity.<sup>29</sup> Danzer and colleagues examined hippocampal dentate granule cells in these conditional TrkB knockout mice and observed an increase in the number of giant mossy fiber buttons with fewer primary dendrites and enlarged dendritic spines in hippocampal dentate granule cells.<sup>61</sup> These findings might

indicate that TrkB is required for development and/or maintenance of normal synaptic connectivity of the granule cells in the hippocampus, and that abnormalities in these circuits would favor hippocampal epileptogenicity.<sup>61</sup> In line with this conclusion are the observations that reduction of expression of TrkB *de novo* in the mature brain is sufficient to impair epileptogenesis in the kindling model of epileptogenesis,<sup>30</sup> and that selective and transitory inactivation of TrkB inhibited epileptogenesis after status epilepticus provoked by amygdala kainic acid microinfusion.<sup>31</sup>

*NTRK2* variants were first studied in psychiatric diseases including mood disorders, anorexia nervosa, eating disorders, and attention-deficit/hyperactivity, with variable results.<sup>44,46,50,51</sup> *NTRK2* allele variants were also associated with nicotine and alcohol dependence.<sup>47,48</sup> In line with findings related with mood disorders, variants in the *NTRK2* gene have been associated with antidepressant treatment and the variability of the *NTRK2* gene has been linked to suicidal behavior.<sup>51,52,54</sup> At this time, it is unknown whether *NTRK2* polymorphisms are associated with differences in neurophysiological functions, but this is an interesting possibility that needs to be further investigated in the future. In this venue, Murphy and colleagues observed reduced MRI fractional anisotropy in brain regions involved in emotional regulation of depressed patients, and significantly smaller gray matter volume in frontal lobe regions in patients who are homozygous for the A allele of the *rs11140714* SNP in *NTRK2*.<sup>62</sup> The authors concluded that polymorphisms in the *NTRK2* gene increase risk of architectural changes in brain regions involved in modulation of emotional response and might play an important role in depression.

Regarding neurological disorders, *NTRK2* association studies were conducted for Alzheimer's disease and autism. For Alzheimer's disease, at least four studies were published.<sup>45,49,63,64</sup> Two studies, one conducted in Finnish and another in Chinese ham Alzheimer patients, failed to show differences in *NTRK2* variants between patients and controls.<sup>45,63</sup> Chen and colleagues genotyped *NTRK2* in 203 families with at least two AD affected siblings. They found no single SNP association, but observed a significant association for locus haplotypes in areas of the gene containing sequences that could be involved in alternative splicing and/or regulation of *NTRK2*.<sup>49</sup> Cozza and colleagues observed genotype-wide association of the *rs2289656* on *NTRK2* in patients with sporadic Alzheimer's disease.<sup>64</sup> For autism, Correia et al. observed higher BDNF levels in autistic children and tested if *BDNF* or *NTRK2* variants would be associated with BDNF increased levels.<sup>53</sup> These

authors observed no evidence for *BDNF* or *NTRK2* genetic variability could play a major role in BDNF increased levels in autistic children. However, they observed an association of six single nucleotide polymorphisms and multiple haplotypes in the *NTRK2*, but not in the *BDNF* gene. The authors suggested a role of *NTRK2* as a susceptibility factor for autism.<sup>53</sup> Autism is associated with epilepsy and both might share a common genetic background.<sup>65</sup> Interestingly, we previously failed to observe association between the Val66Met *BDNF* variant in temporal lobe epilepsy,<sup>38</sup> but we are reporting now that *NTRK2* is associated with epilepsy or with some clinical characteristics that might reflect epileptogenicity itself in the same group of patients.

We are aware that our work presents some 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 composed of Caucasian European descendants and we included only patients with this ethnic background in this study. 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, especially when there is biological plausibility supporting the results.

In summary, we observed that patients with epilepsy have a different variant distribution in *NTRK2* gene when compared with controls without epilepsy, and that *NTRK2* variability influenced age of seizure onset and possibly seizure control. As far as we are aware, this is the first study showing an association between *NTRK2* variants in epilepsy. We believe that additional studies in this field will shed some light upon the molecular mechanisms involved in human epileptogenesis as well as in characteristics associated to this condition.

### **Acknowledgments**

This study was fully supported by Brazilian Government research grant agencies CNPq, FAPESP and FAPERGS. Bianchin MM is further supported by CNPq (#485423/2012-0, #307084/2014-0) and PRONEM-FAPERGS/CNPq (#11/2043.0). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. None of the authors has any conflict of interest to disclose. We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

## References

1. Coan AC, Cendes F. Understanding the spectrum of temporal lobe epilepsy: contributions for the development of individualized therapies. *Expert Rev Neurother.* 2013;13(12):1383-1394.
2. Grabenstatter HL, Russek SJ, Brooks-Kayal AR. Molecular pathways controlling inhibitory receptor expression. *Epilepsia.* 2012;53 Suppl 9:71-78.
3. Tatum WO. Mesial temporal lobe epilepsy. *J Clin Neurophysiol.* 2012;29(5):356-365.
4. Pitkanen A, Engel J, Jr. Past and Present Definitions of Epileptogenesis and Its Biomarkers. *Neurotherapeutics.* 2014.
5. Pitkanen A, Lukasiuk K. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2009;14 Suppl 1:16-25.
6. Engel J, Jr., Pitkanen A, Loeb JA, et al. Epilepsy biomarkers. *Epilepsia.* 2013;54 Suppl 4:61-69.
7. Dogini DB, Avansini SH, Vieira AS, Lopes-Cendes I. MicroRNA regulation and dysregulation in epilepsy. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:172.
8. Heinzen EL, Depondt C, Cavalleri GL, et al. Exome sequencing followed by large-scale genotyping fails to identify single rare variants of large effect in idiopathic generalized epilepsy. *Am J Hum Genet.* 2012;91(2):293-302.
9. Buono RJ. Genome wide association studies (GWAS) and common forms of human epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2013;28 Suppl 1:S63-65.
10. Helbig I, Lowenstein DH. Genetics of the epilepsies: where are we and where are we going? *Curr Opin Neurol.* 2013;26(2):179-185.
11. Campbell IM, Rao M, Arredondo SD, et al. Fusion of large-scale genomic knowledge and frequency data computationally prioritizes variants in epilepsy. *PLoS Genet.* 2013;9(9):e1003797.
12. Vadlamudi L, Milne RL, Lawrence K, et al. Genetics of epilepsy: The testimony of twins in the molecular era. *Neurology.* 2014;83(12):1042-1048.
13. Venugopal AK, Sameer Kumar GS, Mahadevan A, et al. Transcriptomic Profiling of Medial Temporal Lobe Epilepsy. *J Proteomics Bioinform.* 2012;5(2).

14. Klassen T, Davis C, Goldman A, et al. Exome sequencing of ion channel genes reveals complex profiles confounding personal risk assessment in epilepsy. *Cell*. 2011;145(7):1036-1048.
15. Jia P, Ewers JM, Zhao Z. Prioritization of epilepsy associated candidate genes by convergent analysis. *PloS one*. 2011;6(2):e17162.
16. Bothwell M. NGF, BDNF, NT3, and NT4. *Handb Exp Pharmacol*. 2014;220:3-15.
17. West AE, Pruunsild P, Timmusk T. Neurotrophins: transcription and translation. *Handb Exp Pharmacol*. 2014;220:67-100.
18. Deinhardt K, Chao MV. Trk receptors. *Handb Exp Pharmacol*. 2014;220:103-119.
19. Bronfman FC, Lazo OM, Flores C, Escudero CA. Spatiotemporal intracellular dynamics of neurotrophin and its receptors. Implications for neurotrophin signaling and neuronal function. *Handb Exp Pharmacol*. 2014;220:33-65.
20. Ceni C, Unsain N, Zeinieh MP, Barker PA. Neurotrophins in the regulation of cellular survival and death. *Handb Exp Pharmacol*. 2014;220:193-221.
21. Skaper SD. The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Methods Mol Biol*. 2012;846:1-12.
22. Castren E. Neurotrophins and psychiatric disorders. *Handb Exp Pharmacol*. 2014;220:461-479.
23. Andero R, Choi DC, Ressler KJ. BDNF-TrkB receptor regulation of distributed adult neural plasticity, memory formation, and psychiatric disorders. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2014;122:169-192.
24. Obianyo O, Ye K. Novel small molecule activators of the Trk family of receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1834(10):2213-2218.
25. Merlio JP, Ernfors P, Kokaia Z, et al. Increased production of the TrkB protein tyrosine kinase receptor after brain insults. *Neuron*. 1993;10(2):151-164.
26. Kokaia Z, Bengzon J, Metsis M, Kokaia M, Persson H, Lindvall O. Coexpression of neurotrophins and their receptors in neurons of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(14):6711-6715.
27. McNamara JO, Scharfman HE. Temporal Lobe Epilepsy and the BDNF Receptor, TrkB. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, eds. *Jasper's Bas Mechan Epilep*. 4th ed. Bethesda (MD)2012.

28. Nishio S, Morioka T, Hamada Y, Hisada K, Fukui M. Immunohistochemical expression of trk receptor proteins in focal cortical dysplasia with intractable epilepsy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1999;25(3):188-195.
29. He XP, Kotloski R, Nef S, Luikart BW, Parada LF, McNamara JO. Conditional deletion of TrkB but not BDNF prevents epileptogenesis in the kindling model. *Neuron.* 2004;43(1):31-42.
30. Kotloski R, McNamara JO. Reduction of TrkB expression de novo in the adult mouse impairs epileptogenesis in the kindling model. *Hippocampus.* 2010;20(6):713-723.
31. Liu G, Gu B, He XP, et al. Transient inhibition of TrkB kinase after status epilepticus prevents development of temporal lobe epilepsy. *Neuron.* 10 2013;79(1):31-38.
32. Liu G, Kotloski RJ, McNamara JO. Antiseizure effects of TrkB kinase inhibition. *Epilepsia.* 2014;55(8):1264-1273.
33. Kanemoto K, Kawasaki J, Tarao Y, et al. Association of partial epilepsy with brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene polymorphisms. *Epilepsy Res.* 2003;53(3):255-258.
34. Chou IC, Tsai CH, Lee CC, Lin SS, Tsai FJ. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphisms in febrile seizures. *Epilepsy Res.* 2004;60(1):27-29.
35. Lohoff FW, Ferraro TN, Dahl JP, et al. Lack of association between variations in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 2005;66(1-3):59-62.
36. Nectoux J, Bahi-Buisson N, Guellec I, et al. The p.Val66Met polymorphism in the BDNF gene protects against early seizures in Rett syndrome. *Neurology.* 2008;70(22 Pt 2):2145-2151.
37. Louhivuori V, Arvio M, Soronen P, Oksanen V, Paunio T, Castren ML. The Val66Met polymorphism in the BDNF gene is associated with epilepsy in fragile X syndrome. *Epilepsy Res.* 2009;85(1):114-117.
38. Bragatti JA, Schenkel LC, Torres CM, et al. No major clinical impact of Val66Met BDNF gene polymorphism on temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 2010;88(2-3):108-111.
39. Tondo M, Poo P, Naudo M, et al. Predisposition to epilepsy in fragile X syndrome: does the Val66Met polymorphism in the BDNF gene play a role? *Epilepsy Behav.* 2011;22(3):581-583.



40. Unalp A, Bora E, Cankaya T, et al. Lack of association of childhood partial epilepsy with brain derived neurotrophic factor gene. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:414797.
41. Gkampeta A, Fidani L, Clarimon J, et al. Association of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and elongator protein complex 4 (ELP4) polymorphisms with benign epilepsy with centrotemporal spikes in a Greek population. *Epilepsy Res*. 2014;108(10):1734-1739.
42. Nakagawara A, Liu XG, Ikegaki N, et al. Cloning and chromosomal localization of the human TRK-B tyrosine kinase receptor gene (NTRK2). *Genomics*. 1995;25(2):538-546.
43. Valent A, Danglot G, Bernheim A. Mapping of the tyrosine kinase receptors trkA (NTRK1), trkB (NTRK2) and trkC(NTRK3) to human chromosomes 1q22, 9q22 and 15q25 by fluorescence in situ hybridization. *Eur J Hum Genet :EJHG*. 1997;5(2):102-104.
44. Adams JH, Wigg KG, King N, et al. Association study of neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2 (NTRK2) and childhood-onset mood disorders. *Am J Med Genet. Part B, Neuropsych Genet*. 2005;132B(1):90-95.
45. Vepsalainen S, Castren E, Helisalmi S, et al. Genetic analysis of BDNF and TrkB gene polymorphisms in Alzheimer's disease. *J Neurol*. 2005;252(4):423-428.
46. Ribases M, Gratacos M, Badia A, et al. Contribution of NTRK2 to the genetic susceptibility to anorexia nervosa, harm avoidance and minimum body mass index. *Mol Psychiatry*. 2005;10(9):851-860.
47. Beuten J, Ma JZ, Payne TJ, et al. Association of specific haplotypes of neurotrophic tyrosine kinase receptor 2 gene (NTRK2) with vulnerability to nicotine dependence in African-Americans and European-Americans. *Biol Psychiatry*. 2007;61(1):48-55.
48. Xu K, Anderson TR, Neyer KM, et al. Nucleotide sequence variation within the human tyrosine kinase B neurotrophin receptor gene: association with antisocial alcohol dependence. *Pharmacogenomics J*. 2007;7(6):368-379.
49. Chen Z, Simmons MS, Perry RT, Wiener HW, Harrell LE, Go RC. Genetic association of neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2 (NTRK2) With Alzheimer's disease. *Am J Med Genet. Part B, Neuropsych Genet*. 2008;147(3):363-369.

50. Ribases M, Hervas A, Ramos-Quiroga JA, et al. Association study of 10 genes encoding neurotrophic factors and their receptors in adult and child attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2008;63(10):935-945.
51. Dong C, Wong ML, Licinio J. Sequence variations of ABCB1, SLC6A2, SLC6A3, SLC6A4, CREB1, CRHR1 and NTRK2: association with major depression and antidepressant response in Mexican-Americans. *Mol Psychiatry*. 2009;14(12):1105-1118.
52. Kohli MA, Salyakina D, Pfennig A, et al. Association of genetic variants in the neurotrophic receptor-encoding gene NTRK2 and a lifetime history of suicide attempts in depressed patients. *Arch Gen Psychiatry*. 2010;67(4):348-359.
53. Correia CT, Coutinho AM, Sequeira AF, et al. Increased BDNF levels and NTRK2 gene association suggest a disruption of BDNF/TrkB signaling in autism. *Genes Brain Behav*. 2010;9(7):841-848.
54. Hennings JM, Kohli MA, Czamara D, et al. Possible associations of NTRK2 polymorphisms with antidepressant treatment outcome: findings from an extended tag SNP approach. *PloS one*. 2013;8(6):e64947.
55. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*. 2010;51(4):676-685.
56. <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/home.php>.
57. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
58. Minichiello L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(12):850-860.
59. Jeanneteau F, Garabedian MJ, Chao MV. Activation of Trk neurotrophin receptors by glucocorticoids provides a neuroprotective effect. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(12):4862-4867.
60. Huang YZ, Pan E, Xiong ZQ, McNamara JO. Zinc-mediated transactivation of TrkB potentiates the hippocampal mossy fiber-CA3 pyramid synapse. *Neuron*. 2008;57(4):546-558.
61. Danzer SC, Kotloski RJ, Walter C, Hughes M, McNamara JO. Altered morphology of hippocampal dentate granule cell presynaptic and postsynaptic terminals following conditional deletion of TrkB. *Hippocampus*. 2008;18(7):668-678.

62. Murphy ML, Carballedo A, Fagan AJ, et al. Neurotrophic tyrosine kinase polymorphism impacts white matter connections in patients with major depressive disorder. *Biol Psychiatry*. 2012;72(8):663-670.
63. Zeng F, Zou HQ, Zhou HD, et al. The relationship between single nucleotide polymorphisms of the NTRK2 gene and sporadic Alzheimer's disease in the Chinese Han population. *Neurosci Lett*. 2013;550:55-59.
64. Cozza A, Melissari E, Iacopetti P, et al. SNPs in neurotrophin system genes and Alzheimer's disease in an Italian population. *J Alzheimers Dis*. 2008;15(1):61-70.
65. Tuchman R, Rapin I. Epilepsy in autism. *Lancet Neurol*. 2002;1(6):352-358.

**Table 1: Distribution of SNPs genotypes in the *NTRK2* gene in patients ( $n=198$ ) and controls ( $n=200$ )**

SNP	Genotype distribution			<i>p</i>
<b>rs10868235</b>	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>	
<b>Patients</b>	59 (30%)	85 (43%)	54 (27%)	
<b>Controls</b>	65 (33%)	102 (51%)	33 (16%)	<b>0.032*</b>
<b>rs11140800</b>	<b>AA</b>	<b>AC</b>	<b>CC</b>	
<b>Patients</b>	55 (28%)	91 (46%)	52 (26%)	
<b>Controls</b>	49 (25%)	97 (48%)	54 (27%)	<b>0.754</b>
<b>rs1147198</b>	<b>GG</b>	<b>GT</b>	<b>TT</b>	
<b>Patients</b>	13 (6%)	71 (36%)	114 (58%)	
<b>Controls</b>	17 (9%)	86 (43%)	97 (48%)	<b>0.190</b>
<b>rs1187286</b>	<b>GG</b>	<b>GT</b>	<b>TT</b>	
<b>Patients</b>	11 (6%)	72 (36%)	115 (58%)	
<b>Controls</b>	15 (8%)	75 (37%)	110 (55%)	<b>0.678</b>
<b>rs1443445</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>	
<b>Patients</b>	114 (58%)	72 (36%)	12 (6%)	
<b>Controls</b>	130 (65%)	63 (32%)	07 (3%)	<b>0.228</b>
<b>rs1624327</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>	
<b>Patients</b>	14 (7%)	74 (37%)	110 (56%)	
<b>Controls</b>	12 (6%)	94 (47%)	94 (47%)	<b>0.151</b>

<b>rs1867283</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>	
<b>Patients</b>	41 (21%)	103 (52%)	54 (27%)	
<b>Controls</b>	34 (17%)	121 (61%)	45 (22%)	<b>0.234</b>
<b>rs2289656</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>	
<b>Patients</b>	04 (2%)	50 (25%)	144 (73%)	
<b>Controls</b>	03 (2%)	48 (24%)	149 (74%)	<b>0.879</b>
<b>rs2378672</b>	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>	
<b>Patients</b>	-	15 (8%)	183 (92%)	
<b>Controls</b>	-	20 (10%)	180 (90%)	<b>0.393</b>
<b>rs3780645</b>	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>	
<b>Patients</b>	169 (85%)	28 (14%)	01 (1%)	
<b>Controls</b>	169 (84%)	30 (15%)	01 (1%)	<b>0.971</b>

Table 2: Clinical characteristics according to variants in the *NKTR2* gene

SNP	Age at onset Mean (SD)	Seizure control		Familial history of Epilepsy		Antiepileptic Drug	
		Controlled	Refractory	No	Yes	Monotherapy	Polytherapy
<b>rs10868235</b>							
CC	18.0 (14.3)	28 (47%)	31 (53%)	40 (68%)	19 (32%)	32 (54%)	27 (46%)
CT	17.7 (12.7)	40 (47%)	45 (53%)	63 (74%)	22 (26%)	39 (46%)	46 (54%)
TT	20.5 (14.7)	30 (56%)	24 (44%)	34 (63%)	20 (37%)	32 (59%)	22 (41%)
	<b>p = 0.48</b>		<b>p = 0.58</b>		<b>p = 0.37</b>		<b>p = 0.28</b>
<b>rs11140800</b>							
AA	19.3 (14.4)	28 (51%)	27 (49%)	35 (64%)	20 (36%)	33 (60%)	22 (40%)
AC	19.6 (14.1)	44 (48%)	47 (52%)	68 (75%)	23 (25%)	21 (40%)	31 (60%)
CC	16.0 (12.2)	26 (50%)	26 (50%)	34 (65%)	18 (35%)	49 (54%)	42 (46%)
	<b>p = 0.30</b>		<b>p = 0.95</b>		<b>p = 0.29</b>		<b>p = 0.11</b>
<b>rs1147198</b>							
GG	18.1 (16.8)	04 (30%)	09 (70%)	12 (92%)	01 (08%)	08 (62%)	05 (38%)
GT	15.9 (13.0)	36 (51%)	35 (49%)	51 (72%)	20 (28%)	39 (55%)	32 (45%)
TT	20.2 (13.7)	58 (51%)	56 (49%)	74 (65%)	40 (35%)	56 (49%)	58 (51%)

	<b>p = 0.12</b>		<b>p = 0.38</b>		<b>p = 0.11</b>		<b>p = 0.58</b>
<b>rs1187286</b>							
GG	15.6 (9.9)	04 (36%)	07 (64%)	07 (64%)	04 (36%)	04 (36%)	07 (64%)
GT	18.1 (12.7)	38 (53%)	34 (47%)	51 (71%)	21 (29%)	34 (47%)	38 (53%)
TT	19.1 (14.7)	56 (49%)	59 (51%)	79 (69%)	36 (31%)	65 (57%)	50 (43%)
	<b>p = 0.70</b>		<b>p = 0.58</b>		<b>p = 0.88</b>		<b>p = 0.26</b>
<b>rs1443445</b>							
AA	16.0 (11.7)	57 (50%)	57 (50%)	79 (69%)	35 (31%)	59 (52%)	55 (48%)
AG	22.2 (16.4)	34 (47%)	38 (53%)	50 (69%)	22 (31%)	41 (57%)	31 (43%)
GG	20.4 (9.0)	07 (58%)	05 (42%)	08 (67%)	04 (33%)	03 (25%)	09 (75%)
	<b>p &lt; 0.01</b>		<b>p = 0.76</b>		<b>p = 0.98</b>		<b>p = 0.12</b>
<b>rs1624327</b>							
AA	18.1 (17.4)	06 (43%)	08 (57%)	10 (71%)	04 (29%)	07 (50%)	07 (50%)
AG	17.3 (11.3)	42 (57%)	32 (43%)	52 (70%)	22 (30%)	42 (57%)	32 (43%)
GG	19.3 (14.8)	50 (45%)	60 (55%)	75 (68%)	35 (32%)	54 (49%)	56 (51%)
	<b>p = 0.62</b>		<b>p = 0.28</b>		<b>p = 0.94</b>		<b>p = 0.59</b>
<b>rs1867283</b>							
AA	18.7 (14.4)	23 (56%)	18 (44%)	28 (68%)	13 (32%)	22 (54%)	19 (46%)
AG	18.3 (13.7)	50 (49%)	53 (51%)	70 (68%)	33 (32%)	54 (52%)	49 (48%)
GG	19.0 (13.6)	25 (46%)	29 (54%)	39 (72%)	15 (28%)	27 (50%)	27 (50%)

	<b>p = 0.95</b>		<b>p = 0.61</b>		<b>p = 0.85</b>		<b>p = 0.93</b>
<b>rs2289656</b>							
AA	12.5 (5.20)	03 (75%)	01 (25%)	04 (100%)	-	03 (75%)	01 (25%)
AG	20.4 (17.4)	27 (54%)	23 (46%)	33 (66%)	17 (34%)	27 (54%)	23 (46%)
GG	18.0 (12.4)	68 (47%)	76 (53%)	100 (69%)	44 (31%)	73 (51%)	71 (49%)
	<b>p = 0.39</b>		<b>p = 0.42</b>		<b>p = 0.36</b>		<b>p = 0.60</b>
<b>rs2378672</b>							
CT	23.2 (16.7)	05 (33%)	10 (67%)	11 (73%)	04 (27%)	06 (40%)	09 (60%)
TT	18.1 (13.5)	93 (51%)	90 (49%)	126 (69%)	57 (31%)	97 (53%)	86 (47%)
	<b>p = 0.17</b>		<b>p = 0.20</b>		<b>p = 0.72</b>		<b>p = 0.33</b>
<b>rs3780645</b>							
CC	18.8 (13.6)	88 (52%)	81 (48%)	118 (70%)	51 (30%)	96 (57%)	73 (43%)
CT	16.4 (14.6)	10 (36%)	18 (64%)	18 (64%)	10 (36%)	07 (25%)	21 (75%)
TT	28.0 ( --)	-	01 (100%)	01 (100%)	-	-	01(100)
	<b>p = 0.55</b>		<b>p = 0.17</b>		<b>p = 0.67</b>		<b>p &lt; 0.01</b>



**Table 3: *NTRK2* SNPs and neuroimaging or interictal EEG**

SNP	Neuroimaging			Interictal EEG		
	Normal	Altered	<i>p</i>	Unilateral	Bilateral	<i>p</i>
<b>rs10868235</b>						
CC	32 (54%)	27 (46%)		40 (68%)	19 (32%)	
CT	44 (52%)	41 (48%)		47 (55%)	38 (45%)	
TT	20 (37%)	34 (63%)	<b>0.137</b>	28 (52%)	26 (48%)	<b>0.181</b>
<b>rs11140800</b>						
AA	21 (38%)	34 (62%)		27 (49%)	28 (51%)	
AC	50 (55%)	41 (45%)		54 (59%)	37 (41%)	
CC	25 (48%)	27 (52%)	<b>0.145</b>	34 (65%)	18 (35%)	<b>0.220</b>
<b>rs1147198</b>						
GG	03 (23%)	10 (77%)		06 (46%)	07 (54%)	
GT	41 (58%)	30 (42%)		38 (54%)	33 (46%)	
TT	52 (46%)	62 (54%)	<b>0.05</b>	71 (62%)	43 (38%)	<b>0.334</b>
<b>rs1187286</b>						
GG	03 (27%)	08 (73%)		09 (82%)	02 (18%)	
GT	30 (42%)	42 (58%)		40 (56%)	32 (44%)	

TT	63 (55%)	52 (45%)	<b>0.076</b>	66 (57%)	49 (43%)	<b>0.252</b>
<b>rs1443445</b>						
AA	62 (54%)	52 (46%)		69 (59%)	47 (41%)	
AG	29 (40%)	43 (60%)		39 (54%)	33 (46%)	
GG	05 (42%)	07 (58%)	<b>0.153</b>	09 (75%)	03 (25%)	<b>0.389</b>
<b>rs1624327</b>						
AA	05 (36%)	09 (64%)		09 (64%)	05 (36%)	
AG	37 (50%)	37 (50%)		46 (62%)	28 (38%)	
GG	54 (49%)	56 (51%)	<b>0.607</b>	60 (55%)	50 (45%)	<b>0.524</b>
<b>rs1867283</b>						
AA	16 (39%)	25 (61%)		21 (51%)	20 (49%)	
AG	58 (56%)	45 (44%)		62 (60%)	41 (40%)	
GG	22 (41%)	32 (59%)	<b>0.071</b>	32 (59%)	22 (41%)	<b>0.603</b>
<b>rs2289656</b>						
AA	02 (50%)	02 (50%)		03 (75%)	01 (25%)	
AG	28 (56%)	22 (44%)		28 (56%)	22 (44%)	
GG	66 (46%)	78 (54%)	<b>0.463</b>	84 (58%)	60 (42%)	<b>0.755</b>
<b>rs2378672</b>						
CT	04 (27%)	11 (73%)		08 (53%)	07 (47%)	
TT	92 (50%)	91 (50%)	<b>0.079</b>	107 (58%)	76 (42%)	<b>0.698</b>

<b>rs3780645</b>						
CC	80 (47%)	89 (53%)		95 (56%)	74 (44%)	
CT	16 (57%)	12 (43%)		19 (68%)	09 (32%)	
TT	-	01 (100%)	<b>0.392</b>	01 (100%)	-	<b>0.356</b>

## 7. Artigo 2

### **The TkrB gene (*NTRK2*) is associated with mood disorders in temporal lobe epilepsy**

Carolina Machado Torres<sup>a,b,c</sup>

Marina Siebert<sup>d</sup>

Hugo Bock<sup>d</sup>

Suellen Mandelli Mota<sup>b</sup>

Maria Luiza Saraiva-Pereira<sup>a,b,d</sup>

Marino Muxfeldt Bianchin<sup>a,b,c\*</sup>

<sup>a</sup>Posgraduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

<sup>b</sup>Basic Research and Advanced Investigations in Neurology, Experimental Research Centre, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>c</sup>Division of Neurology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

<sup>d</sup>Laboratory of Genetics Identification, Experimental Research Centre, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

#### **Address Correspondence to:**

Marino M. Bianchin, [mmbianchin@hotmail.com](mailto:mmbianchin@hotmail.com)

B.R.A.I.N.; Experimental Research Centre

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Ramiro Barcelos, 2350,

Porto Alegre, RS, Brazil, 90035-903

## ABSTRACT

**Rationale:** Psychiatric comorbidities are very prevalent in epilepsy, adding important burden to the disease and profoundly affecting quality of life in these individuals. Patients with temporal lobe epilepsy (TLE) are especially at risk to develop depression and diverse evidences suggest that the association of depression with epilepsy might be related to common biological substrates. In this study we test if *NTRK2* allele variants are associated with mood disorders or depression in patients with temporal lobe epilepsy.

**Methods:** Association study of 163 patients with TLE of the Epilepsy Outpatient Clinic of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). *NTRK2* allele variants studied were rs1867283, rs10868235, rs1147198, rs11140800, rs1187286, rs2289656, rs1624327, rs1443445, rs3780645, and rs2378672. All patients were submitted to the Structured Clinical Interview for DSM-IV (SCID-I) and patients with mood disorders were compared with patients without these condition.

**Results:** In our TLE cohort, seventy six patients (46.6%) showed mood disorders. Female sex, anxiety disorders, A/A genotype in rs1867283 *NTRK2*, and C/C genotype in the rs10868235 *NTRK2* gene were all independently associated with mood disorders in these patients. Depressive disorders mostly accounted for these results. After logistic regression, independent risk factors for depressive disorder in TLE were female sex (OR=2.54; 95%CI=1.18-5.47;  $p=0.017$ ), presence of concomitant anxiety disorders (OR=3.30; 95%CI=1.58-6.68;  $p=0.001$ ), A/A genotype in rs1867283 *NTRK2* (OR=2.84; 95%CI=1.19-6.80;  $p=0.019$ ), and C/C genotype in rs10868235 *NTRK2* gene (OR=2.74; 1.28-5.88;  $p=0.010$ ).

**Significance:** Female sex, anxiety disorders, and allelic variations in *NTRK2* gene were all independent risk factors for mood disorder or depressive disorders in TLE. If

our results were confirmed, *NTRK2* gene allele variants could be used as a biomarker for depressive disorders in patients with temporal lobe epilepsy.

**KEYWORDS: neurotrophins, temporal lobe epilepsy, biomarkers**

## **INTRODUCTION**

Psychiatric comorbidities are very prevalent in epilepsy, adding important burden to the disease and profoundly affecting quality of life in these individuals.<sup>1-4</sup> Patients with temporal lobe epilepsy (TLE) are especially at risk to develop mood, anxiety or psychosis disorder, with prevalence ranging from 11 to 44 %, 15 to 25 % and 2 to 8 %, respectively.<sup>1-4</sup> Evidence suggests that the association of psychiatric disorders with epilepsy might be related to common biological substrates.<sup>1-4</sup> For example, both TLE and depression are comorbid and might share abnormalities in the same limbic structures.<sup>2,5,6</sup> It is plausible that the same kind of intersection also occur at molecular level, with epilepsy and psychiatric comorbidity sharing some common genetic background.

Neurotrophins are secreted factors that have nourishing or sustaining effect on neurons and some of them might play a major role in neuropsychiatric disorders.<sup>7-12</sup> Nerve growth factor (NGF), brain derived nerve growth factor (BDNF), neurotrophin 3 and 4 (NT-3 and NT-4) are prototypes of neurotrophins.<sup>16-21</sup> These neurotrophins

and their receptors, p75NTR, TrkA, TrkB, and TrkC, have been extensively studied during the last decades, and many of their molecular mechanisms have already been described.<sup>7-12</sup> Briefly, p75NTR can bind to, and is activated by, all four neurotrophins in their mature form or as pro-neurotrophins. Trk receptors are more specific, and usually bind to, and are activated by, selective and mature forms of neurotrophins. NGF preferentially binds and activates TrkA, whereas NT3 preferentially binds and activates TrkC. BDNF and NT4 preferentially bind to, and activate, TrkB.<sup>7-11</sup> The Trk family of tyrosine kinase receptors contains three single-pass type I transmembrane proteins with glycosylated extracellular domains and three leucine-rich repeats flanked by two cysteine repeats and immunoglobulin-C2 (Ig) domains proximal to the transmembrane region. Intracellularly, Trk receptors possess a tyrosine kinase domain.<sup>7-11</sup> These neurotrophins and their receptors are mainly involved in neuronal development and signaling, including cell survival and differentiation, axonal and dendritic growth and arborization, neural protection and synaptic plasticity.<sup>7-11</sup> While TrkB is predominantly expressed within the central nervous system, TrkA and TrkC are largely found on peripheral neuronal populations.<sup>7-11</sup>

Because of its functions, neurotrophins and their receptors, specially BDNF/TrkB, have been studied with great interest in neuropsychiatric disorders and are growing as potential biomarkers or targets for the development of new therapies for neurological or psychiatric disorders.<sup>11</sup> TRKB is a membrane receptor kinase that auto-phosphorylates when activated by neurotrophins binding and is effective through the MAPK signaling pathways. TRKB is involved in neuronal outgrowth and arborization and synaptic plasticity.<sup>9</sup> *NTRK2* gene codifies TrkB receptor.<sup>13</sup> More recently, *NTRK2* allele variants have been associated with neurological or psychiatric disorders like mood disorders,<sup>14</sup> vulnerability to nicotine dependence or alcohol

abuse,<sup>15,16</sup> obsessive-compulsive disorder,<sup>17</sup> attention-deficit/hyperactivity disorder,<sup>18</sup> autism<sup>19</sup> and Alzheimer disease.<sup>20</sup>

Depression is a very common psychiatric comorbidity in temporal lobe epilepsy having important impact in quality of life of patients.<sup>1-4,21</sup> In this study, we investigate if *NTRK2* allele variants are associated with depression in temporal lobe epilepsy. More specifically, this is an association study where we compare frequencies of selected *NTRK2* allele variants between patients with temporal lobe epilepsy that have or not psychiatric comorbidities, with especial interest in mood and depression disorders. As far as we know, this is the first study evaluating a plausible involvement of *NTRK2* in the development of psychiatric comorbidities in epilepsy.

## **METHODS**

### **Patients**

This is a retrospective cohort study of 163 patients with TLE of the Epilepsy Outpatient Clinic of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Inclusion criteria were based on the 2010 ILAE's electroclinical classification and epilepsy etiology (Commission on Classification Terminology of the International League Against Epilepsy, 2010). Patients with extratemporal epilepsies, mental retardation, and those with systemic diseases were excluded. All patients were submitted to interictal EEGs studies and neuroimaging with CT-scans and MRI studies. Seizure control was defined according with ILAE recommendations. Extension of irritative zone was defined as unilateral only if 90% or more of all EEG epileptiform discharges were located in one of the temporal lobes. Also, all patients were submitted to the Structured Clinical Interview for DSM-IV (SCID).<sup>22</sup> 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).<sup>29</sup> Based on SCID results, patients with mood disorders were grouped in the group of patients with TLE and mood disorders as comorbidities (MOOD DISORDERS group) or TLE and no mood disorder group (NO MOOD DISORDERS group). These two groups of patients (MOOD DISORDERS group and NO MOOD DISORDERS group) were compared for clinical and genotypic differences. We also analyzed only patients with depressive disorders (DEPRESSIVE group) and compared with patients with no depressive disorders (NO DEPRESSIVE group). In order to avoid different ethnic between groups, we included only Brazilian with European origin individuals in this study. Porto Alegre is the capital of Rio do Sul state. A great part of the State population is composed by Caucasian European immigrants (e.g. Germans, Italians, and Portuguese).<sup>3,23,24</sup> Thus, we believe that we selected only controls and patients from Caucasian origin. Non-caucasian patients or controls were excluded from analysis. The 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 isolated from peripheral leukocytes according to standard procedures. Subjects were genotyped for specific SNPs distributed in different regions of the NTRK2 gene as follows: rs1867283, rs10868235, rs1147198, rs11140800, rs1187286, rs2289656, rs1624327, rs1443445, rs3780645, and rs2378672. SNPs flanking regions were amplified by real-time PCR using TaqMan® SNP genotyping assays (Applied Biosystems). SNPs information was obtained from the National Center for Biotechnology Information SNP database (available on the site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) and they were chosen based on previously

published studies. PCR reaction was prepared according to manufacture's instructions and analyses were performed on the ABI Prism 7500 Fast Sequence Detector System® (Applied Biosystems).

For each SNP analyzed, DNA samples from two homozygous individuals for each allele and two heterozygous individuals (six samples for each SNP) were sequenced to confirm results. For DNA sequencing, new sets of primers were designed, PCR reaction was performed, and products were purified using the QIA PCR Purification kit (Qiagen). PCR reaction products were then sequenced using the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) and analyzed on ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Results were analyzed by SeqScape® Software v3.1 (Applied Biosystems).

### **Statistical analysis**

Categorical variables were compared by the two-tailed Chi-square test or Fisher's exact test. Numerical variables were compared by the independent Student t-test, with the Levene test for equality of analysis of variance. In order to examine the independent effect of each variable we used an unconditional binary logistic regression model. All statistical analyses were carried out using the SPSS 16.0 statistical package for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Results are expressed as odds ratio (95% confidence interval) and were considered significant if  $p$  was lower than 0.05.

## RESULTS

The demographic and clinical characteristics of the patients are presented in Table 1. The mean age of TLE patients evaluated was 43.38 (SD=12.51) years age with no significant difference between the two groups studied. Female patients were 108 (66.3%) and male patients were 55 (33.7%). Overall, psychiatric disorders were observed in 152 patients (93.2%) being mood disorder the more frequent psychiatric comorbidity, observed in 76 (46.6%) patients. Presence of mood disorder was significantly more frequent in women than men and in those patients with anxiety disorders. The age of patients, age of epilepsy onset, duration of disease, seizure control, use of monotherapy or polytherapy, lateralization of EEG interictal activity, presence of other types of psychiatry disorders (other than anxiety disorders) did not differ between both groups. Seventy eight patients (47.9%) showed normal neuroimaging. Hippocampal sclerosis was observed in 36 patients (22.1%), gliosis in 24 (14.7%), neurocysticercosis in 12 (7.4%) and other abnormalities (atrophy, cystic lesions, low grade glioma) in 13 patients (8%). Positive neuroimaging or specific pathologies were not associated with mood disorders in our patients (Table 1).

### **Please Insert Table 1 About Here**

The genotype distribution of *NTRK2* gene allele variants according with mood disorders in TLE patients is summarized in Table 2. We found that patients with A/A genotype in rs1867283 *NTRK2* or C/C genotype in rs10868235 SNP, showed significantly increase of mood disorders when compared with other TLE patients. No

other differences were observed for SNPs rs1147198G>T, rs11140800A>T, rs1187286G>T, rs2289656A>G, rs1624327A>G, rs1443445A>G, rs3780645C>T, rs2378672C>T.

### **Please Insert Table 2 About Here**

In order to study the independence of variables as risk factor for depression disorders in TLE, we included sex, presence of anxiety disorders, A/A genotype in rs1867283 *NTRK2* and CC genotype in rs10868235 SNP in *NTRK2* gene in an unconditional binary logistic regression model. After logistic regression, all four variables remained statistically significant associated with depressive disorders in TLE patients. The final results of logistic regression are presented in Table 3.

### **Please Insert Table 3 About Here**

Sixty seven patients (41.1% from the total patients) had diagnostic of a depressive disorders and major depressive disorder was diagnosed in 45 (67.2% from depressed patients) of them (two with dysthymia associated). Eight patients (11.9% from depressed patients) were diagnosed with dysthymic disorder. The remained 14 patients (20.9%) had other depressive disorders. Most of TLE patients with depressive disorders (DEPRESSION group) were women 53 (79.1%), while only 14 (20.9%) were men. In NO DEPRESSION group 55 (57.3%) were women and 41 (42.7%) were men, a significant difference. Anxiety disorders were observed in 32 (61.5%) patients with depressive symptoms and in 20 (38.5%) patients with no depressive symptoms, also a significant difference (Table 4).The age of patients, age

of epilepsy onset, duration of disease, seizure control, use of monotherapy or polytherapy, lateralization of EEG interictal activity, presence of other types of psychiatry disorders other than anxiety disorders or positive neuroimaging findings did not differ between both groups.

**Please Insert Table 4 About Here**

*NTRK2* A/A genotype in rs1867283, and C/C genotype in the rs10868235 were both associated with depressive symptoms in TLE patients (Table 5). After logistic regression, independent risk factors for depressive disorder in TLE were female sex (OR=2.54; 95%CI=1.18-5.47;  $p=0.017$ ), presence of concomitant anxiety disorders (OR=3.30; 95%CI=1.58-6.68;  $p=0.001$ ), A/A genotype in rs1867283 *NTRK2* (OR=2.84; 95%CI=1.19-6.80;  $p=0.019$ ), and C/C genotype in rs10868235 *NTRK2* gene (OR=2.74; 1.28-5.88;  $p=0.010$ ).

**Please Insert Table 5 and Table 6 About Here**

## DISCUSSION

In this study we investigated the influence of *NTRK2* gene in development of mood or depressive comorbidities, the most common psychiatric comorbidities in TLE. Depression was more common in patients with A/A genotype in rs1867283 or C/C genotype in rs10868235 SNP in *NTRK2* gene. No *NTRK2* allele variant studied was associated with anxiety, but anxiety was more common in depressed patients. Depression was also more common in female patients. After logistic regression adjustments, we concluded that female sex, presence of anxiety disorder and A/A genotype in rs1867283 or C/C genotype in rs10868235 SNP in *NTRK2* gene were all independently associated with depression in TLE patients. Our study suggests that the presence of selected allele variants in *NTRK2* gene might be isolated risk factors for depression in patients with TLE. If these findings were confirmed in other populations, it could be used as biomarkers for depression risk in TLE.

More recently, allele variability of *NTRK2* gene has been investigated in neurological and psychiatric disorders. In neurological disorders, *NTRK2* association studies were published for Alzheimer's disease and autism,<sup>19,20,26,27</sup> but as far as we know, not for epilepsy. For Alzheimer disease, Chen and collaborators found no single SNP association, but observed a significant association for locus haplotypes in areas of the gene containing sequences that could be involved in alternative splicing and/or regulation of *NTRK2*.<sup>20</sup> Cozza and colleagues observed genotype-wise association of one *NTRK2* SNP in patients with sporadic Alzheimer's disease.<sup>28</sup> However, two other studies, one from Finland and another from China, failed to show differences in *NTRK2* allele variants between patients and controls.<sup>26,27</sup> For autism, Correia et al. observed higher seric BDNF levels in autistic children and tested if *BDNF* or *NTRK2* allele variants would be associated with seric increased levels of

BDNF.<sup>19</sup>These authors observed no evidence that *BDNF* or *NTRK2* genetic variability would explain BDNF increased levels in autistic children. However, they observed an association of six single nucleotide polymorphisms and multiple haplotypes in the *NTRK2*, but not in the *BDNF*, gene.<sup>19</sup>The authors suggested a role of *NTRK2* as a susceptibility factor for autism, a disorder also associated with epilepsy.

In general, studies of association of *NTRK2* allele variants have been more successful in finding significant associations when researchers study psychiatric disorders. In this venue, *NTRK2* allele variants have been associated with risk for development of diverse types of psychiatric disorders, including mood disorders,<sup>14</sup>vulnerability to nicotine dependence or alcohol abuse,<sup>15,16</sup>obsessive-compulsive disorder,<sup>17</sup> and attention-deficit/hyperactivity disorder.<sup>18</sup> Interestingly, some authors, but not all, have been observing an association of specific *NTRK2* allele variants with mood disorders, response to pharmacological treatment in mood disorders and suicidal behavior.<sup>14,29-34</sup> In a large association study with German and African American patients, Kohli et al. studied if SNPs of *BDNF* or *NTRK2* genes confer risk for suicide attempt in patients with diagnosis of major depressive disorders.<sup>34</sup>They failed to observe any associations of suicide behavior with *BDNF* allele variants. However, select allele variants of *NTRK2* gene, includingrs10868235, were associated with risk for suicide attempt in depressed patients.<sup>34</sup>Perroud N et al. reported results of a genome-wide association study designed to identify genetic variants involved in increasing suicidal ideation during treatment for depression in 706 adult participants of European ancestry.<sup>33</sup> They observed increased suicidal ideation with selected *BDNF/NTRK2* allele variants.<sup>33</sup> A positive association of *NTRK2* allele variants and suicide behavior was further observed by two additional

studies.<sup>35-36</sup> Li Z et al. in a prospective study, observed that *NTRK2* allele variants could influence the treatment of major depressive disorder and suggested that this might also be true for a combination of *BDNF/NTRK2* allele variants.<sup>37</sup> Hennings et al. performed a single and multi-marker association study with antidepressant treatment outcome in 398 depressed Caucasian patients and two Caucasian replication samples, resulting in a total of 894 patients investigated.<sup>29</sup> They observed that three *NTRK2* SNPs (rs10868223, rs1659412 and rs11140778) showed a significant association with treatment response and it was confirmed in at least one replication sample.<sup>29</sup> Avdoshina V et al. observed protective effect of *TrkB* allele variants for depression in HIV-infected individuals, a finding suggesting that *NTRK2* allele variants might be associated with depressive comorbid symptoms in HIV positive individuals, a result in line with our observations in epilepsy.<sup>38</sup>

Findings of *NTRK2* allele variants with depressive symptoms or response to its treatment are particularly relevant for our study. Epilepsy, depression and suicide behavior are comorbid and epilepsy and depression share a bidirectional association, with epileptic patients in risk to develop depression and depression been more commonly associated with epilepsy.<sup>6,21,39</sup> Thus, it is biological plausible that both disorders share common molecular substrates and genetic variability of *NTRK2* gene could contribute with this scenario. Unfortunately at this time, it is not possible to know if *NTRK2* polymorphisms are associated with differences in neurophysiological functions in patients or if they are marking something else, but this is an interesting possibility that needs to be explored in future. In this venue, Murphy and colleagues observed reduced MRI fractional anisotropy in brain regions involved in emotional regulation of depressed patients, and significantly smaller gray matter volume in frontal lobe regions in patients who are homozygous for the A allele of the



rs11140714 SNP in *NTRK2*.<sup>40</sup>The authors concluded that polymorphisms of *NTRK2* gene increase risk of architectural changes in brain regions involved in modulation of emotional response and might play an important role in depression.

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. 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 biologically plausible hypothesis. Moreover, our result remained significant after logistic regression, showing that selected *NTRK2* gene polymorphism were independently associated with depressive disorders in TLE. A positive aspect of our study is that all patients were evaluated with SCID, decreasing the possibility of a subjective and biased psychiatric evaluation in our sample.

In summary, we observed in our study that A/A genotype in rs1867283 or C/C genotype in rs10868235 SNP in *NTRK2* gene were independently associated with mood or depressive disorders in TLE patients. As far as we know, this is the first study showing a biological plausible association between *NTRK2* gene allele variants 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.

**DISCLOSURE**

This study was fully supported by Brazilian Government research grant agencies CNPq, FAPESP and FAPERGS. Bianchin MM is further supported by CNPq (#485423/2012-0, #307084/2014-0) and PRONEM-FAPERGS/CNPq (#11/2043.0). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. None of the authors has any conflict of interest to disclose. We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

## REFERENCES

1. LaFrance WC, Kanner AM, Hermann B. Psychiatric comorbidities in epilepsy. *Int Rev Neurobiol* 2008; 83:347–383.
2. Dalmagro CL, Velasco TR, Bianchin MM, et al. *Epilepsy Behav* 2012; 25:593–597.
3. Bragatti JA, Torres CM, Londero RG, et al. Prevalence of psychiatric comorbidities in temporal lobe epilepsy in a Southern Brazilian population. *Arq Neuropsiquiatr* 2011; 69:159–165.
4. Hamid H, Blackmon K, Cong X, et al. Mood, anxiety, and incomplete seizure control affect quality of life after epilepsy surgery. *Neurology* 2014; 82:887–94.
5. Kanner AM. Depression and epilepsy: A bidirectional relation? *Epilepsia* 2011; 52 (Suppl 1):21–27.
6. Kanner AM. Can neurobiological pathogenic mechanisms of depression facilitate the development of seizure disorders? *Lancet Neurol* 2012; 11:1093–102.
7. Bothwell M. Neurotrophic Factors [Internet]. Lewin GR, Carter BD, editors. *Handbook of experimental pharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014 [cited 2015 Mar 15]. 3-15 p.
8. West AE, Pruunsild P, Timmusk T. NeurotrophicFactors [Internet]. Lewin GR, Carter BD, editors. *Handbook of experimental pharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014 [cited 2015 Mar 15]. 67-100 p.
9. Deinhardt K, Chao M V. Neurotrophic Factors [Internet]. Lewin GR, Carter BD, editors. *Handbook of experimental pharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014 [cited 2015 Mar 15]. 103-19 p.
10. Bronfman FC, Lazo OM, Flores C, Escudero CA. NeurotrophicFactors. Lewin GR, Carter BD, editors. *Handbook of experimental pharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014 [cited 2015 Mar 15]. 33-65 p.

11. Ceni C, Unsain N, Zeinieh MP, Barker PA. Neurotrophic Factors [Internet]. Lewin GR, Carter BD, editors. Handbook of experimental pharmacology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014 [cited 2015 Mar 15]. 193-221 p.
12. Castrén E. NeurotrophicFactors [Internet]. Lewin GR, Carter BD, editors. Handbook of experimental pharmacology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014 [cited 2015 Mar 15]. 461-79 p.
13. Nakagawara A, Liu XG, Ikegaki N, et al. Cloning and chromosomal localization of the human TRK-B tyrosine kinase receptor gene (NTRK2). *Genomics* 1995; 25:538–546.
14. Dong C, Wong M-L, Licinio J. Sequence variations of ABCB1, SLC6A2, SLC6A3, SLC6A4, CREB1, CRHR1 and NTRK2: association with major depression and antidepressant response in Mexican-Americans. *Mol Psychiatry* 2009; 14:1105–1118.
15. Li MD, Lou X-Y, Chen G, et al. Gene-Gene Interactions among CHRNA4, CHRNB2, BDNF, and NTRK2 in Nicotine Dependence. *Biol Psychiatry* 2008; 64:951–957.
16. Xu K, Anderson TR, Neyer KM, et al. Nucleotide sequence variation within the human tyrosine kinase B neurotrophin receptor gene: association with antisocial alcohol dependence. *Pharmacogenomics J* 2007; 7:368–379.
17. Alonso P, Gratacòs M, Menchón JM, et al. Extensive genotyping of the BDNF and NTRK2 genes define protective haplotypes against obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry* 2008; 63:619–628.
18. Conner AC, Kissling C, Hodges E, et al. Neurotrophic factor-related gene polymorphisms and adult attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) score in a high-risk male population. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 2008; 147B:1476–80.

19. Correia CT, Coutinho AM, Sequeira AF, et al. Increased BDNF levels and NTRK2 gene association suggest a disruption of BDNF/TrkB signaling in autism. *Genes Brain Behav* 2010; 9:841–848.
20. Chen Z, Simmons MS, Perry RT, et al. Genetic Association of Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor Type 2 (NTRK2) With Alzheimer's Disease. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 2008; 147B:363–369.
21. Kanner AM, Schachter SC, Barry JJ, Hesdorffer DC, Hersdorffer DC, Mula M, et al. Depression and epilepsy: epidemiologic and neurobiologic perspectives that may explain their high comorbid occurrence. *Epilepsy Behav.* 2012; 24:156–68.
22. Bragatti JA, Torres CM, Londero RG, et al. Prevalence of psychiatric comorbidities in temporal lobe epilepsy: the value of structured psychiatric interviews. 2010; 12:283–291.
23. Schenkel LC, Bragatti JA, Becker JA, et al. Serotonin gene polymorphisms and psychiatry comorbidities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 2012; 99:260–266.
24. Schenkel LC, Bragatti JA, Torres CM, Martin KC, Manfro GG-, Leistner-Segal S, et al. Serotonin transporter gene (5HTT) polymorphisms and temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 2011; 95:152–7.
25. Mula M, Schmitz B, Sander JW. The pharmacological treatment of depression in adults with epilepsy. *Expert OpinPharmacother*2008; 9:3159–68.
26. Zeng F, Zou H-Q, Zhou H-D, et al. The relationship between single nucleotide polymorphisms of the NTRK2 gene and sporadic Alzheimer's disease in the Chinese Han population. *Neurosci Lett* 2013; 550:55–9.
27. VepsäläinenS, Castren E, Helisalmi S, et al. Genetic analysis of BDNF and TrkB gene polymorphisms in Alzheimer's disease. *J Neurol* 2005; 252:423–428.
28. Cozza A, Melissari E, Iacopetti P, et al. SNPs in neurotrophin system genes and

- Alzheimer's disease in an Italian population. *J AlzheimersDis*2008; 15:61–70.
29. Hennings JM, Kohli MA, Czamara D, et al. Possible Associations of NTRK2 Polymorphisms with Antidepressant Treatment Outcome: Findings from an Extended Tag SNP Approach. Palmer AA, editor. *PLoS One* 2013; 8(6):e64947.
30. Wang Z, Fan J, Gao K, et al. Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor Type 2 (NTRK2) Gene Associated with Treatment Response to Mood Stabilizers in Patients with Bipolar I Disorder. *J Mol Neurosci* 2013; 50:305–310.
31. Dmित्रzak-Weglarz M, Rybakowski JK, Suwalska A, et al. Association studies of the BDNF and the NTRK2 gene polymorphisms with prophylactic lithium response in bipolar patients. *Pharmacogenomics* 2008; 9:1595–1603.
32. Perroud N, Aitchison KJ, Uher R, et al. Genetic Predictors of Increase in Suicidal Ideation During Antidepressant Treatment in the GENDEP Project. *Neuropsychopharmacology*2009; 34:2517–2528.
33. Perroud N, Uher R, Ng MYM, et al. Genome-wide association study of increasing suicidal ideation during antidepressant treatment in the GENDEP project. *Pharmacogenomics J* 2012; 12:68–77.
34. Kohli MA, Salyakina D, Pfennig A, et al. Association of Genetic Variants in the Neurotrophic Receptor–Encoding Gene NTRK2 and a Lifetime History of Suicide Attempts in Depressed Patients. *Arch Gen Psychiatry* 2010; 67:348-59.
35. Murphy TM, Ryan M, Foster T, et al., Risk and protective genetic variants in suicidal behavior: association with SLC1A2, SLC1A3, 5-HTR1B &NTRK2 polymorphisms. *Behav Brain Funct* 2011;7:22. doi: 10.1186/1744-9081-7-22.
36. Schosser A, Butler AW, Ising M, et al. Genome wide associations can of suicidal thoughts and behavior in major depression. *PLoS One* 2011; 6:e20690.
37. Li Z, Zhang Y, Wang Z, et al. The role of BDNF, NTRK2 gene and the interaction

in development of treatment-resistant depression: Data from multicenter, prospective, longitudinal clinic practice. *J Psychiatr Res* 2013; 47:8–14.

38. Avdoshina V, Mocchetti I, Liu C, et al. Single-Nucleotide Polymorphisms in TrkB and Risk for Depression. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013; 64:138–141.

39. Kanner AM. Epilepsy, suicidal behavior, and depression: do they share common pathogenic mechanisms? *Lancet Neurol* 2006; 5:107–108.

40. Murphy ML, Carballedo A, Fagan AJ, et al. Neurotrophic Tyrosine Kinase Polymorphism Impacts White Matter Connections in Patients with Major Depressive Disorder. *Biol Psychiatry* 2012; 72:663–670.

**Table 1. Characteristics of TLE patients according with mood disorder**

<b>Variable</b>	<b>All Patients</b>	<b>MD Absence</b>	<b>MD Presence</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b>P</b>
<b>Age, y (SD)</b>	43.38 (12.51)	44.75 (12.35)	44.16 (12.27)	-	0.962
<b>Epilepsy age onset,y(SD)</b>	18.58 (13.79)	19.08 (14.89)	19.28 (14.46)	-	0.418
<b>Epilepsy duration, y (SD)</b>	24.87 (13.68)	25.66 (14.14)	24.88 (14.08)	-	0.360
<b>Sex</b>					
Female	108 (66.3 %)	50 (46.3%)	58 (53.7%)		
Male	55 (33.7 %)	37 (67.3%)	18 (32.7%)	2.38 (1.20-4.76)	<b>0.018*</b>
<b>Seizure Control</b>					
Controlled	79 (48.5%)	42 (53.2%)	37 (46.8%)		
Non-controlled	84 (51.5%)	45 (53.6%)	39 (46.4%)	0.98 (0.53-1.82)	1.000
<b>Neuroimaging</b>					
Normal	78 (47.9%)	40 (51.3%)	38 (48.7%)		
Abnormal	85 (52.1%)	47 (55.3%)	38 (44.7%)	0.85 (0.46-1.58)	0.722
<b>Interictal EEG</b>					
Unilateral	91 (55.8%)	49 (53.8%)	42 (46.2%)		
Bilateral	72 (44.2%)	38 (52.8%)	34 (47.2%)	1.04 (0.56-1.94)	1.000
<b>AED</b>					
Monotherapy	88 (54.0%)	48 (55.2%)	40 (52.6%)		
Polytherapy	75 (46.0%)	39 (44.8%)	36 (47.4%)	1.11 (0.60-2.05)	0.867
<b>Anxiety Disorders</b>					
Absent	111 (68.1%)	68 (61.3%)	43 (38.7%)		
Present	52 (31.9%)	19 (36.5%)	33 (63.5%)	2.75 (1.39-5.43)	<b>0.0005*</b>
<b>Psychotic Disorders</b>					
Absent	147 (90.2%)	81 (55.1%)	66 (44.9%)		
Present	16 (9.8%)	06 (37.5%)	10 (62.5%)	2.04 (0.71-5.92)	0.282
<b>Alcohol /Drug Abuse</b>					
Absent	155 (95.1%)	83 (53.5%)	72 (46.5%)		
Present	08 (4.9%)	04 (50.0%)	04 (50.0%)	1.15 (0.28-4.78)	1.00

MD=mood disorders, y=years, SD=standard deviation, (\*)=significant, OR=odds ratio, CI=confidence interval



Table 2. Genotypic distribution according with mood disorder

SNP	MD Absence <i>n</i> (%)	MD Presence <i>n</i> (%)	<i>p</i>
<b>rs1867283</b>			
AA	11 (34.4%)	21 (65.6%)	
AG	50 (54.9%)	41 (45.1%)	
GG	26 (65.0%)	14 (35.0%)	<b>0.032*</b>
<b>rs10868235</b>			
CC	20 (42.6%)	27 (57.4%)	
CT	44 (62.0%)	27 (38.0%)	
TT	23 (51.1%)	22 (48.9%)	0.110
<b>rs1147198</b>			
GG	04 (40.0%)	06 (60.0%)	
GT	34 (57.6%)	25 (42.4%)	
TT	49 (52.1%)	45 (47.9%)	0.547
<b>rs11140800</b>			
AA	25 (53.2%)	22 (46.8%)	
AC	42 (54.5%)	35 (45.5%)	
CC	20 (51.3%)	19 (48.7%)	0.946
<b>rs1187286</b>			
GG	04 (66.7%)	02 (33.3%)	
GT	34 (54.0%)	29 (46.0%)	
TT	49 (52.1%)	45 (47.9%)	0.781
<b>rs2289656</b>			
AA	01 (33.3%)	02 (66.7%)	
AG	24 (64.9%)	13 (35.1%)	
GG	62 (50.4%)	61 (49.6%)	0.237
<b>rs1624327</b>			
AA	06 (50.0%)	06 (50.0%)	
AG	33 (55.9%)	26 (44.1%)	
GG	48 (52.2%)	44 (47.8%)	0.877
<b>rs1443445</b>			
AA	48 (53.3%)	42 (46.7%)	
AG	34 (54.0%)	29 (46.0%)	
GG	05 (50.0%)	05 (50.0%)	0.973
<b>rs3780645</b>			
CC	71 (51.1%)	68 (48.9%)	
CT	16 (66.7%)	08 (33.3%)	0.187
<b>rs2378672</b>			
CT	05 (33.3%)	10 (66.7%)	
TT	82 (55.4%)	96 (44.6%)	0.113

(\*)=significant

**Table 3. Independent risk factors for mood disorders in temporal lobe epilepsy.**

<b>Risk Factors</b>	<b>Crude OR (95% CI)</b>	<b><i>p</i></b>	<b>Adjusted OR (95% CI)</b>	<b><i>p</i></b>
<b>Female Sex</b>	2.38 (1.20-4.76)	<b>0.018*</b>	2.22 (1.07-4.58)	<b>0.031*</b>
<b>Anxiety Disorder</b>	2.75 (1.39-5.43)	<b>0.0005*</b>	2.54 (1.24-5.23)	<b>0.011*</b>
<b>AA rs1867283</b>	2.64 (1.18-5.92)	<b>0.027*</b>	3.30 (1.38-7.88)	<b>0.007*</b>
<b>CC rs10868235</b>	1.84 (0.93-3.66)	0.112	2.16 (1.03-4.53)	<b>0.042*</b>

(\*)=significant, OR=odds ratio, CI=confidence interval

**Table 4. Characteristics of TLE patients according with depressive disorder**

<b>Characteristics</b>	<b>Depressed</b>	<b>Non-Depressed</b>	<b>OR</b>	<b><i>p</i></b>
<b>Age, y (SD)</b>	44.01 (12.63)	44.79 (12.08)	-	0.692
<b>Epilepsy age onset, y (SD)</b>	19.52 (14.23)	18.93 (15.00)	-	0.801
<b>Epilepsy duration, y (SD)</b>	24.49 (14.44)	25.86 (13.68)	-	0.543
<b>Sex</b>				
Female	53 (49.1%)	55 (50.9%)		
Male	14 (25.5%)	41 (74.5%)	2.82 (1.38-5.77)	0.004
<b>Seizure control</b>				
Controlled	31 (39.2%)	48 (60.8%)		
Non-controlled	36 (42.9%)	48 (57.1%)	0.86 (0.46-1.61)	0.379
<b>Neuroimaging</b>				
Normal	35 (44.9%)	43 (55.1%)		
Abnormal	32 (37.6%)	53 (62.4%)	1.35 (0.72-2.52)	0.437
<b>Interictal EEG</b>				
Unilateral	37 (55.2%)	54 (56.2%)		
Bilateral	30 (44.8%)	42 (43.8%)	0.96 (0.51-1.80)	1.000
<b>AED</b>				
Monotherapy	37 (55.2%)	51 (53.1%)		
Polytherapy	30 (44.8%)	45 (46.9%)	1.09 (0.58-2.04)	0.917
<b>Anxiety Disorder</b>				
Absent	35 (31.5%)	76 (68.5%)		
Present	32 (61.5%)	20 (38.5%)	3.45 (1.75-7.14)	<b>0.001*</b>
<b>Psychotic disorders</b>				
Absent	57 (38.8%)	90 (61.2%)		
Present	10 (62.5%)	06 (37.5%)	0.38 (0.13-1.02)	0.118
<b>Alcohol /Drugs</b>				
Absent	64 (41.3%)	91 (58.7%)		
Present	03 (37.5%)	05 (62.5%)	1.17 (0.27-5.08)	1.000

y=years, SD=standard deviation, (\*)=significant, OR=odds ratio, CI=confidence interval

Table 5. Genotypic distribution according with depressive disorder

SNP	Depressed <i>n</i> (%)	Non-depressed <i>n</i> (%)	<i>p</i>
<b>rs1867283</b>			
AA	18 (56.3%)	14 (43.8%)	
AG	36 (39.6%)	55 (60.4%)	
GG	13 (32.5%)	27 (67.5%)	0.114
<b>rs10868235</b>			
CC	26 (55.3%)	21 (44.7%)	
CT	22 (31.0%)	49 (69.0%)	
TT	19 (42.2%)	26 (57.8%)	<b>0.031*</b>
<b>rs1147198</b>			
GG	05 (50.0%)	05 (50.0%)	
GT	20 (33.9%)	39 (66.1%)	
TT	42 (44.7%)	52 (55.3%)	0.352
<b>rs11140800</b>			
AA	19 (40.4%)	28 (59.6%)	
AC	31 (40.3%)	46 (59.7%)	
CC	17 (43.6%)	22 (56.4%)	0.937
<b>rs1187286</b>			
GG	02 (33.3%)	04 (66.7%)	
GT	25 (39.7%)	38 (60.3%)	
TT	40 (42.6%)	54 (57.4%)	0.868
<b>rs2289656</b>			
AA	02 (66.7%)	01 (33.3%)	
AG	13 (35.1%)	24 (64.9%)	
GG	52 (42.3%)	71 (57.7%)	0.491
<b>rs1624327</b>			
AA	05 (41.7%)	07 (58.3%)	
AG	22 (37.3%)	37 (62.7%)	
GG	40 (43.5%)	52 (56.5%)	0.752
<b>rs1443445</b>			
AA	39 (43.3%)	51 (56.7%)	
AG	23 (36.5%)	40 (63.5%)	
GG	05 (50.0%)	05 (50.0%)	0.588
<b>rs3780645</b>			
CC	60 (43.2%)	79 (56.8%)	
CT	07 (29.2%)	17 (70.8%)	0.144
<b>rs2378672</b>			
CT	08 (53.3%)	07 (46.7%)	
TT	59 (39.9%)	97 (60.1%)	0.410

(\* )=significant

**Table 6. Independent risk factors for depressive disorders in temporal lobe epilepsy.**

<b>Risk Factors</b>	<b>Crude OR (95% CI)</b>	<b><i>p</i></b>	<b>Adjusted OR (95% CI)</b>	<b><i>p</i></b>
<b>Female Sex</b>	2.82 (1.38-5.77)	<b>0.004*</b>	2.54 (1.18-5.47)	<b>0.017*</b>
<b>Anxiety Disorder</b>	3.45 (1.75-7.14)	<b>0.001*</b>	3.30 (1.58-6.68)	<b>0.001*</b>
<b>AA rs1867283</b>	2.15 (0.21-1.02)	0.082	2.84 (1.19-6.80)	<b>0.019*</b>
<b>CC rs10868235</b>	2.26 (1.14-4.51)	<b>0.030*</b>	2.74 (1.28-5.88)	<b>0.010*</b>

(\*)=significant

## 8. Considerações finais

O estudo de polimorfismos de nucleotídeo único em doenças complexas ainda é uma área a ser explorada, principalmente em doenças neurológicas, como a Epilepsia. A Epilepsia de Lobo Temporal constitui uma síndrome epiléptica distinta e bastante estudada. No entanto, ainda são desconhecidos os mecanismos através dos quais uma rede cerebral normal desenvolve a capacidade de gerar crises epiléticas espontâneas, e, apesar de modelos animais tentarem mimetizar o que acontece em seres humanos, não temos um entendimento completo a esse respeito. Hipóteses relacionadas a ocorrência de insultos precipitantes iniciais durante a primeira infância como causa da ELT associada a esclerose hipocampal valorizam os aspectos ambientais na gênese da doença. Por outro lado, ainda desconhecemos o motivo por que alguns indivíduos submetidos a insultos iniciais nunca desenvolverão epilepsia enquanto outros apresentam uma forma refratária de ELT, por exemplo. Talvez o entendimento dessa doença envolva o estudo de fatores genéticos predisponentes, que quando ativados ou transcritos, sob determinada influência ambiental, colaborem para a ocorrência da ELT.

O receptor transmembrana TrkB tem se mostrado bastante importante na organização da micro-estrutura cerebral, principalmente em circuitos meso-límbicos envolvendo a formação hipocampal. Como vimos, vários estudos tem relacionado as funções desse receptor a mecanismos de doenças neuropsiquiátricas, plasticidade cerebral e formação de memórias. Interessantemente, a inibição do TrkB em modelos animais impediu o desenvolvimento de Epileptogênese, apontando para essa proteína como um fator essencial para o desenvolvimento de epilepsia. O gene *NTRK2* codifica o TrkB e portanto é plausível que alterações na estrutura desse gene tenham repercussões na função do receptor.

Até o momento, não temos conhecimento de outro estudo avaliando as repercussões de polimorfismos de gene *NTRK2* em pacientes com ELT. Nosso estudo evidenciou primeiramente uma diferença nas frequências alélicas do polimorfismo rs10868235 do gene *NTRK2*, com aumento de homozigose de Timina nos pacientes epiléticos comparados aos controles. Posteriormente, analisamos as principais características clínicas dos pacientes com ELT em relação aos polimorfismos do *NTRK2* e encontramos uma idade de início de crises mais precoce em pacientes com homozigose de Adenina no SNP rs1443445. Também observamos que Timina em homozigose ou heterozigose no SNP rs3780645 foi relacionado a necessidade de politerapia para controle de crises epiléticas. Por fim, realizamos uma entrevista semi-estruturada de avaliação psiquiátrica em um subgrupo de pacientes com ELT. Constatamos que a presença de sexo feminino, transtorno de ansiedade e do genótipo CC no SNP rs10868235 do gene *NTRK2* e do genótipo A/A no SNP rs1867283 foram fatores independentes associados a transtornos depressivos nos pacientes com ELT. Analisando esses achados, observamos com especial atenção o fato de que o mesmo SNP (rs10868235) quando em homozigose de Timina foi mais freqüente em pacientes com ELT do que em controles e quando em homozigose de Citosina foi associado a depressão em pacientes com ELT, talvez representando um *loci* interessante para estudos posteriores tanto em epilepsia quanto em depressão. Ambas as doenças – depressão e epilepsia- parecem compartilhar mecanismos fisiopatológicos comuns, havendo uma bidirecionalidade em relação a elas, ou seja: indivíduos com epilepsia estão sob maior risco de desenvolver depressão e aqueles com depressão têm mais chances de tornarem-se epiléticos. Nas duas situações, freqüentemente, ocorre exposição a estressores significantes no período que antecede a instalação da doença. No caso da epilepsia, chama atenção a ocorrência de insultos precipitantes iniciais e no caso da depressão a ocorrência de eventos estressantes traumáticos. Dessa forma, tais situações podem influenciar e modular a atividade dos circuitos meso-limbicos, em especial do hipocampo, agindo de forma plástica, induzindo potencialização de longa duração e determinando padrões de aprendizado e de memória, muitas vezes de forma disruptiva e mal adaptativa. Tais processos de plasticidade, neurogênese e remodelamento estão intimamente relacionados a expressão de neurotrofinas no sistema nervoso central. O uso de antidepressivos,

por exemplo, aumenta a expressão de BDNF e sua ligação ao seu receptor, TrkB, contribuindo para neurogênese hipocampal. A epilepsia e a depressão, portanto, parecem compartilhar mecanismos etiopatogênicos comuns, envolvendo a hiperreatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, aumento da atividade glutamatérgica e diminuição da atividade gabaérgica e serotoninérgica nos circuitos meso-limbicos. Nesse cenário, encontramos evidências consistentes de estudos apontando para a contribuição do TrkB na patogênese das duas doenças.

Esperamos que o nosso estudo contribua para um melhor entendimento dos mecanismos de epileptogênese e de depressão na ELT e que seja replicado em outras populações, determinando assim maior aplicabilidade dos achados. A possibilidade de que polimorfismos do gene *NTRK2* encontrados no nosso estudo representem biomarcadores para depressão em pacientes com epilepsia pode ser uma perspectiva futura bastante interessante.



## 9. Anexo

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação - GPPG- número do projeto: 07-559, versão aprovada em 22/05/2009.

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### **TÍTULO DA PESQUISA:** Estudo dos Polimorfismos do gene *NTRK2* na Epilepsia do Lobo Temporal

Esse estudo investiga a influência de uma alteração genética específica (presença de um polimorfismo específico) sobre as características clínicas e eletroencefalográficas da epilepsia de lobo temporal. O objetivo desta pesquisa é identificar um possível fator de risco para piores prognósticos neurológico, psiquiátrico e neuropsicológico, o que poderá contribuir para o tratamento da epilepsia no futuro.

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

1. Responderei algumas questões sobre a minha história clínica, para confirmar que tenho epilepsia do lobo temporal. Isto levará cerca de 15 minutos. Responderei uma entrevista psiquiátrica, que pode durar de 30 a 60 minutos.
2. Farei um exame físico e neurológico simples, com cerca de 10 minutos de duração.
3. Será feita uma coleta de sangue com agulha de meu 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.

Posso não ter benefícios diretos da participação nesta pesquisa. Entretanto, poderei descobrir se possuo ou não uma alteração genética com possível influência sobre a gravidade da minha doença. Farei os exames acima descritos gratuitamente.

Não são previstos riscos adicionais ao manejo da minha doença.

Os custos desse tratamento poderão ser pagos pelo Governo Federal. Se eu sofrer algum dano como resultado da minha participação nesta pesquisa, terei tratamento ao meu dispor. Para obter maiores informações sobre este assunto, poderei contatar a Comissão de Ética em Pesquisa do HCPA.

Os resultados dos exames realizados durante o estudo serão discutidos comigo, e estarão ao meu 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. Minha identidade será mantida em segredo, de acordo com o que a lei permitir.

A investigadora, Dra. Carolina Machado Torres, discutiu estas informações comigo, oferecendo-se para responder minhas dúvidas. Caso eu tenha perguntas adicionais, poderei contatá-la pelo telefone (51) 3359-8520.

Minha participação no estudo é totalmente voluntária, sendo eu livre para recusar a tomar parte ou abandonar a pesquisa a qualquer momento, sem afetar ou pôr em risco meu futuro atendimento médico.

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

Paciente:

Documento de identidade:

Sexo: Idade:

Endereço:

Cidade: CEP: Telefone: ( )

Responsável legal (quando for o caso):

Documento de identidade do responsável legal:

Assinatura do paciente ou do responsável legal

Médico responsável: Carolina Machado Torres CRM: 26206 UF: RS

Endereço: Rua Ramiro Barcelos, 2350/2040

Cidade: Porto Alegre CEP: 90035-003 Telefone: (51) 3359-8520

Assinatura e carimbo do médico

Data





