



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROLOGIA
DOUTORADO EM NEUROLOGIA

WAGNER GONÇALVES HORTA

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÉTICA DOS ALELOS HLA CLASSE II DRB1,
DQA1 E DQB1 EM PACIENTES COM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL
ASSOCIADA À ESCLEROSE MESIAL HIPOCAMPAL**

RIO DE JANEIRO
2015

WAGNER GONÇALVES HORTA

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÉTICA DOS ALELOS HLA CLASSE II DRB1,
DQA1 E DQB1 EM PACIENTES COM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL
ASSOCIADA À ESCLEROSE MESIAL HIPOCAMPAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Neurologia, área de concentração Neurociências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Soniza Vieira
Alves Leon

Coorientadores: Prof. Dr. Jorge Paes
Barreto Marcondes de
Souza

Prof^a. Dr^a. Carmen
Lucia Antão Paiva

RIO DE JANEIRO
2015

H821 Horta, Wagner Gonçalves.
Estudos de associação genética dos alelos HLA classe II DRB1, DQA1 e DQB1 em pacientes com epilepsia do lobo temporal associada à esclerose mesial hipocampal / Wagner Gonçalves Horta, 2015.
87 f. ; 30 cm

Orientadora: Soniza Vieira Alves Leon.
Coorientador: Jorge Paes Barreto Marcondes de Souza.
Coorientadora: Carmen Lucia Antão Paiva.
Tese (Doutorado em Neurologia) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

1. Epilepsia. 2. Esclerose hipocampal. 3. Antígenos HLA. I. Leon, Soniza Vieira Alves. II. Souza, Jorge Paes Barreto Marcondes de. III. Paiva, Carmen Lucia Antão. IV. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Curso de Doutorado em Neurologia. V. Título.

CDD - 616.853

WAGNER GONÇALVES HORTA

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÉTICA DOS ALELOS HLA CLASSE II DRB1,
DQA1 E DQB1 EM PACIENTES COM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL
ASSOCIADA À ESCLEROSE MESIAL HIPOCAMPAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Neurologia, área de concentração Neurociências.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Soniza Vieira Alves Leon
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Prof. Dr. Jorge Paes Marcondes de Souza
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof^a. Dr^a. Cleonice Alves de Melo Bento
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Prof^a. Dr^a. Glenda Corêa Borges de Lacerda
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Prof. Dr. Marcus André Acioly de Sousa
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof^a. Dr^a. Maud Parise
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

DEDICATÓRIA

À minha família: minha filha Isabelle, minha esposa Thelma, meu pai Mauro, minha mãe Vera e minha irmã Karen que sempre foram a fonte de minha inspiração e motivo de minha perseverança, apesar das dificuldades naturais no nosso caminho.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À minha família: meus pais Mauro e Vera por serem minha base, referência, meu porto seguro e o início de toda minha formação pessoal e profissional. A minha filha Isabelle por ser minha fonte de inspiração e que me faz ter força nos momentos mais difíceis. A tia Nena que muito contribuiu para o início de minha formação pessoal. A minha esposa Thelma e a minha irmã Karen por todo o apoio dispensado para a realização desse trabalho.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Soniza Alves Leon pelo apoio em todas as horas de angústia, alegrias, dificuldades e incertezas que permeiam o curso de doutorado e sem a qual o sonho de realizar o doutorado não se concretizaria.

Aos meus co-orientadores Profs. Drs. Jorge Paes Barreto Marcondes de Souza e Carmen Lucia Antão Paiva, pelo apoio e pela inspiração durante o curso de doutorado.

À minha amiga Dr^a. Maria Emília Cosenza Andraus, seu esposo e amigo Dr. Cesar Fantezia Andraus e ao amigo Dr. José Lourenço Kallas que sempre me deram força nos bons e nem tão bons momentos desta jornada.

À minha amiga Polyanna que com sua amizade, objetividade e inteligência me ajudou no desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu amigo Eduardo, que gentilmente cedeu seu laboratório, sua mão de obra e seu material para que esse trabalho fosse desenvolvido e concluído.

Ao Luiz Eduardo da Cruz Veiga agradeço a colaboração e paciência em todos os momentos do curso e pela ajuda na finalização deste trabalho.

E, por fim, agradeço a todos os pacientes que colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho, sem os quais não poderíamos realizar o mesmo.

RESUMO

Introdução: A epilepsia do Lobo Temporal (ELT) é a epilepsia focal mais comum em adultos. Os mecanismos neuroinflamatórios das epilepsias vêm sendo descritos como fator importante na gênese das crises convulsivas e nas epilepsias refratárias, em especial naquelas com comportamento progressivo, como ocorre na epilepsia temporal associada à esclerose mesial hipocampal (ELT-EH). **Objetivo:** Estudar o perfil de suscetibilidade genética de pacientes diagnosticados com ELT-EH investigando possível associação entre ELT-EH e alelos do sistema HLA classe II. **Materiais e Métodos:** Foram coletadas amostras de sangue periférico de 42 pacientes com ELT-EH e amostra de sangue periférico de 89 controles saudáveis. A análise da expressão e tipagem de HLA classe II DRB1, DQB1 e DQA1 foi feita através do método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e identificados por sequenciamento. As análises estatísticas das frequências relativas dos alelos foram obtidas por meio de planilha excell e o valor de p, os riscos relativos (RR) e odds ratio (OD) foram calculados no software Epi Info 6.0. O p valor foi considerado estatisticamente significativo quando fosse $<0,05$ após a correção de Bonferroni. **Resultados:** O alelo HLA-DRB1*13:02 foi o único que se mostrou estatisticamente significativo ($p = 0,01$) ao comparar a sua frequência nos pacientes em relação aos controles. Contudo esse valor não resistiu à correção de Bonferroni ($p = 0,44$). Os outros alelos das regiões HLA-DRB1, HLA-DQB1 e HLA-DQA1 não mostraram associação significativa. **Conclusão:** Encontramos tendência como fator de susceptibilidade da associação com HLA DRB1*13:02 na ELT-EH.

Palavras-chave: Epilepsia, esclerose hipocampal, HLA.

ABSTRACT

Introduction: Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most common variety of focal epilepsy among adults. The neuroinflammatory mechanisms of epilepsies may be involved in the genesis of seizures and refractory epilepsies, particularly in the case of progressive syndromes such as TLE associated with mesial hippocampal sclerosis (TLE-HS). **Objective:** To investigate the genetic profile of susceptibility of individuals with TLE-HS by analyzing the possible association of TLE-HS with human leukocyte antigen (HLA) class II alleles. **Materials and methods:** Samples of peripheral blood were collected from 42 individuals with TLE-HS and 89 healthy controls. The expression and typing of the HLA class II alleles DRB1, DQB1, and DQA1 were analyzed using polymerase chain reaction (PCR) and identified through sequencing. Statistical analysis of relative allele frequencies was performed using an Excel spreadsheet; p-value, relative risk (RR), and odds ratio (OR) were calculated using the software Epi Info 6.0. P-values < 0.05 following Bonferroni correction were considered to be statistically significant. **Results:** HLA-DRB1*13:02 was the only allele with a statistically significant difference ($p = 0.01$) in frequency between patients and controls. However, the significance was lost following Bonferroni correction ($p = 0.44$). The remainder of the alleles in the HLA-DRB1, HLA-DQB1 and HLA-DQA1 regions did not exhibit any significant association. **Conclusion:** The allele HLA DRB1*13:02 exhibited a tendency to behave as a susceptibility factor for TLE-HS. **Keywords:** Epilepsy, Hippocampal sclerosis, HLA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	Escala Adaptada de Gravidade de Epilepsia (MOELLER, RAHEY; SADLER, 2009)	29
Figura 1	Localização do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) humano	35
Figura 2	TM - Região transmembrânica. Moléculas de classe I formadas por um heterodímero constituído por uma cadeia α e uma cadeia leve denominada β 2-microglobulina, enquanto que moléculas de classe II formam um heterodímero de uma cadeia α e uma cadeia β	38
Quadro 2	Características das moléculas de HLA classe I e moléculas HLA classe II	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos alelos na região HLA classe II DRB1 identificados por sistema baixa resolução	47
Tabela 2	Distribuição dos alelos na região HLA classe II DQB1 identificados por sistema baixa resolução	47
Tabela 3	Distribuição dos alelos na região HLA classe II DQA1 identificados por sistema baixa resolução	48
Tabela 4	Distribuição de alelos HLA-DRB1 identificados por sistema alta resolução	48
Tabela 5	Distribuição de alelos HLA-DQB1 identificados por sistema de alta resolução	49
Tabela 6	Distribuição de alelos HLA-DQA1 identificados por sistema de alta resolução	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BHE - Barreira Hemato Encefálica
CA - Corno de Ammon
Ca²⁺ - Cálcio
CBZ - Carbamazepina
CDC - Centers for Disease Control and Prevention
COX-2 - Cicloxigenase-2
EEG - Eletroencefalograma
EH - Esclerose Hipocampal
ELT - Epilepsia do Lobo Temporal
ELT-EH - Epilepsia do Lobo Temporal e Esclerose Hipocampal
EM - Esclerose Múltipla
EMJ - Epilepsia Mioclônica Juvenil
EMT - Epilepsia Mesial Temporal
ER - Epilepsia Refratária
ETF - Epilepsia Temporal Familiar
ETN - Epilepsia Temporal Neocortical
FAE - Fármaco antiepiléptico
GABA - Ácido Gama Aminobutírico
HLA - Antígeno Leucocitário Humano
ICAM - Moléculas de Adesão Intercelular
IIP - Incidentes Iniciais Precipitantes
IL - Interleucina
ILAE - International League Against Epilepsy (Liga Internacional Contra Epilepsia)
LES - Lúpus Eritematoso Sistêmico
MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIP-1 α /CCL3 - Proteínas Inflamatórias de Macrófagos
NF κ B - Fator de Transcrição da Inflamação Aguda
NK - Células Natural Killer
OR - Odds Ratio
PAMPs - Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PET - Tomografia Emissão de Positrons (Positrons Emission Tomography)

RM - Ressonância Magnética

RR - Risco Relativo

SNC - Sistema Nervoso Central

SPECT - Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (Single Photon Emission Computed Tomography)

SSP - Single Specific Primer

TGF β - Fatores de Transformação β

TLR - Toll Like

TNF-alfa - Fator Necrose Tumoral Alfa

VCAM-1 - Molécula de Adesão Celular Vascular 1

VEEG - Vídeo Eletroencefalograma

ZEP - Zona Epileptogênica

ZII - Zona de Início Ictal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	EPIDEMIOLOGIA	17
2.2	CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO DE EPILEPSIAS	18
2.3	FISIOPATOLOGIA DA ELT-EH	21
2.4	DIAGNÓSTICO	22
2.5	EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL ASSOCIADA A ESCLEROSE HIPOCAMPAL	25
2.6	NEUROINFLAMAÇÃO E EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL ASSOCIADO A ESCLEROSE HIPOCAMPAL	30
2.7	HLA (SISTEMA DE ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO DE HISTOCOMPATIBILIDADE HUMANO)	34
2.7.1	Descrição dos antígenos HLA	34
2.7.2	Participação de genes como função biológica e doenças	36
2.7.3	Estrutura e Tipagem do HLA	37
2.7.4	Nomenclatura do HLA	39
3	OBJETIVOS	41
4	METODOLOGIA	42
4.1	APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA	42
4.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	42
4.3	CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES	43
4.4	EXTRAÇÃO DO DNA	43
4.5	QUANTIFICAÇÃO DE DNA	44
4.6	IDENTIFICAÇÃO DE ALELOS DO SISTEMA HLA CLASSE II POR TÉCNICAS DE BAIXA E ALTA RESOLUÇÕES	44
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
4.8	SUBMISSÃO DO ESTUDO	46
5	RESULTADOS	47
6	DISCUSSÃO	51
7	CONCLUSÃO	55
8	PERSPECTIVAS E LIMITES DESTE ESTUDO	56

REFERÊNCIAS	57
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	69
APÊNDICE B - Artigo aceito na revista European Journal of Epilepsy	71

1 INTRODUÇÃO

Epilepsia do lobo temporal (ELT) constitui a síndrome epiléptica mais comum dos adultos, sendo responsável por cerca de 40% dos casos de epilepsias em geral e 60% dos casos de epilepsias de início focal (CHIANG; HANEEF, 2014; TÉLLEZ-ZENTENO; HERNANDEZ-RONQUILLO, 2012). Admite-se que constitua um grupo heterogêneo de pacientes, englobando síndromes ou subsíndromes diversas, mais apropriadamente denominadas “epilepsias do lobo temporal”, que apresentam em comum a ocorrência de crises de início focal, com ou sem generalização secundária, que teriam a sua origem presumível no lobo temporal (ENGEL, 1996; ENGEL; PEDLEY, 1998; ENGEL; WILLIAMSON, 1998; DREIFUSS, 1998; BUSTAMANTE; SAKAMOTO, 1999). O termo ELT é utilizado para denotar a condição de pacientes com ou sem lesões estruturais aparentes (ENGEL, 1996) e está de acordo com a Classificação da Liga Internacional Contra Epilepsia (*International League Against Epilepsy-ILAE*) de 1989. Ao longo dos anos, a ILAE propôs novas classificações, ainda não totalmente consolidadas, baseadas, especialmente, nas características semiológicas dos eventos, os quais deixaram de apresentar conotação anatômica ou fisiopatológica, e a ELT passou a ser classificada como epilepsia de início focal no lobo temporal (ENGEL, 2001; PARRA et al., 2001; YACUBIAN, 2002). Em 2010, a ILAE reviu conceitos, terminologias e abordagens para classificação de crises e formas de epilepsias e o termo focal foi redefinido para crises ocorrendo dentro das redes limitadas a um hemisfério e discretamente localizadas ou mais amplamente distribuído (BERG et al., 2010).

Epilepsia mesial do lobo temporal é o tipo mais freqüente de ELT, e está principalmente relacionada com esclerose hipocampal (ELT-EH), que compromete cerca de 70 a 80% dos pacientes com esse tipo de epilepsia (CENDES et al., 2014; CHIANG; HANEEF, 2014; DANTAS et al., 1998; ENGEL, 1996; ENGEL, 2003; ENGEL; WILLIAMSON, 1998; NAM et al., 2001; VIEIRA, 2002). As crises epiléticas se originam de estruturas mesiais, como amígdalas, hipocampo e giro parahipocampal (BUSTAMANTE; SAKAMOTO, 1999; ENGEL, 1996; MUMENTHALER; MATTLE, 2007; SPENCER, 1997). As crises costumam surgir na infância tardia ou adolescência, e é comum o antecedente de convulsões febris na infância e história familiar de convulsões febris na infância ou epilepsia (BUSTAMANTE; SAKAMOTO, 1999; ENGEL, 1996; KASPERAVICIUTE; CATARINO; SISODIVA, 2013;

PATTERSON; BARAM; SHINNAR, 2014). Em 2004, a ILAE compôs um grupo de trabalho que, considerando o conjunto de sinais, sintomas, dados de anamnese, semiologia das crises, vídeo-eletrencefalograma (VEEG), história familiar, aspectos de neuroimagem por ressonância magnética (RM) e de tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) ictal, resposta cirúrgica e resultados anátomo patológicos, conclui por classificar a ELT-EH como uma síndrome epiléptica (WIESER, 2004).

A ELT-EH pode apresentar caráter progressivo. Uma frequência importante de pacientes com ELT-EH apresenta histórico de alguma injúria cerebral nos primeiros anos de vida. Esses episódios são denominados “incidentes iniciais precipitantes” (IIP) e, não raro, são seguidos por períodos em que o paciente não sofre crises, e essas, quando ocorrem, são controladas por monoterapia com um fármaco antiepiléptico (FAE) por anos (KASPERAVICIUTE; CATARINO; SISODIVA, 2013; PATTERSON; BARAM; SHINNAR, 2014). Estes pacientes podem evoluir para refratariedade das crises (KWAN; SANDER, 2004), sugerindo o aspecto progressivo do quadro. O período de tempo entre o IIP e o início das crises é denominado de “período silencioso” e o período em que o paciente se encontra controlado das crises com uso de FAE é denominado de “período latente” (WIESER, 2004). Mudanças comportamentais, que ocorrem particularmente com o aumento do déficit de memória, também podem ocorrer com a progressão da doença (GALVIN et al., 2013). Entre os IIP, destacam-se convulsões febris, traumas, hipóxia e infecções do sistema nervoso central (SNC), geralmente nos primeiros anos de vida (KASPERAVICIUTE; CATARINO; SISODIVA, 2013; PATTERSON; BARAM; SHINNAR, 2014; THOM, 2014).

Neste contexto, o comportamento progressivo da ELT-EH sinalizava a participação de um gatilho de diferentes etiologias. Esse gatilho poderia levar determinados indivíduos geneticamente susceptíveis a desenvolverem uma reação inflamatória com consequente lesão tecidual e reorganização da plasticidade neuronal, condições que poderiam aumentar a excitabilidade neuronal e desencadear crises epiléticas (RAVIZZA et al., 2008a;b; VEZZANI, 2005). Entre os eventos cruciais para esse fenômeno inflamatório se perpetuar no SNC estaria à vulnerabilidade da barreira hemato-encefálica (BHE) e a ativação de moléculas pró-inflamatórias com a participação da imunidade inata e adaptativa. A cascata inflamatória em indivíduos geneticamente susceptíveis, com suficiente participação

de fatores de alteração tecidual, acabaria levando à perda neuronal e gliose tecidual, aspectos que caracterizam a esclerose hipocampal (EH) (THOM, 2014).

A participação de mecanismos inflamatórios na ELT-EH foi e continua sendo estudada por diversos autores, entretanto a causa específica que leva a essa condição ainda não foi totalmente esclarecida. Crespel e colaboradores (2002) já descreviam a participação do fator nuclear Kappa B (NFkB), um fator de transcrição da inflamação aguda, em pacientes com ELT-EH e história prévia de convulsão febril. Em 2005, Vezzani, em testes com roedores, demonstrou que sinais pró inflamatórios, tais como citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, receptores *Toll Like* (TLR), fatores do complemento e moléculas de adesão intercelular (ICAM) são rapidamente induzidos durante crises epiléticas. Ocorre uma maior concentração de moléculas da imunidade inata e da imunidade adaptativa, com IL1 beta apresentando-se numa quantidade três vezes superior ao controle (VEZZANI, 2005). Também em 2005, estes autores descrevem a participação de grande variedade de insultos que podem levar a uma inflamação crônica do cérebro, com uma cascata de eventos inflamatórios no SNC e desenvolvimento tardio de epilepsia. No modelo da ativação de linfócitos T por endotoxemia de lipopolissacarídeos, podemos invocar os IIP como possíveis fatores de indução de atividade inflamatória de múltiplas etiologias em indivíduos com predisposição genética para uma resposta anormal da na ativação da imunidade inata e imunidade adaptativa (VEZZANI; GRANATA, 2005).

Em 2007, Vezzani e Baram demonstraram a associação de IL1 beta com o desenvolvimento de ETL-EH. Segundo Albrecht e colaboradores (2007), em adultos as citocinas afetam a plasticidade das sinapses, levando a um estado epileptogênico e à progressão da doença. A análise de genes polimórficos de IL1 beta em pacientes epiléticos fármaco-resistentes sugere uma associação entre os genes de citocinas e desenvolvimento de crises epiléticas focais.

Neste cenário, os mecanismos neuroinflamatórios das epilepsias vêm sendo descritos como um fator importante na gênese das crises convulsivas e nas epilepsias refratárias, em especial naquelas com comportamento progressivo, como ocorre na ELT-EH. A busca de genes biológicos que participam da orquestração da resposta inflamatória constituiu o passo seguinte dos estudos de diversos autores. Entre esses genes, destacam-se as moléculas HLA classe I e classe II. A imunohistoquímica de hipocampus obtidos em cirurgias de pacientes com ELT-EH

mostrou expressão positiva de HLA-DR nas células microgliais e aumento da expressão de IL1 beta nas células astrocitárias (RAVIZZA et al., 2008a). O estudo em espécimes humanas, a partir de pacientes com ELT, apóia a existência de uma resposta inflamatória crônica sustentada por micróglia, astrócitos e neurônios do foco epileptogênico, embora ainda precise ser estabelecido se a inflamação é estritamente associada com a morte celular, induzida por convulsões ou ambas (VEZZANI; GRANATA, 2005).

Recentemente, em cirurgia da ELT-EH de cérebros humanos, foi demonstrada a diminuição no soro dos níveis de fator necrose tumoral alfa (TNF-alfa), interleucina 1 beta (IL-1 β) e proteínas inflamatórias de macrófagos (MIP-1 α /CCL3) importantes citocinas pró-inflamatória, em pacientes portadores de ELT-EH submetidos a procedimento cirúrgico para controle das crises, confirmando em humanos a participação destas citocinas na perpetuação das crises na ELT-EH (QUIRICO-SANTOS et al., 2013a).

Considerando que alguns alelos HLA classe II estão associados à susceptibilidade de doenças inflamatórias caracterizadas por maior expressão de citocinas do tipo fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e interleucina 1 beta (IL-1 beta) (VEZZANI; BARAM, 2007) e motivados pela demanda de pacientes com ELT-EH refratária, atendidos pelo Programa de Epilepsias do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF/UFRJ), buscamos a oportunidade de investigar o perfil de suscetibilidade genética nesses pacientes, visando elucidar se existe associação entre a ELT-EH e susceptibilidade genética com o sistema HLA classe II.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA

Epilepsia é uma das condições neurológicas mais freqüentes (CHANG; LOWEISTEIN, 2003; TAN, 2014). Aproximadamente dois milhões de pessoas nos Estados Unidos têm epilepsia, e 3% das pessoas na população geral terão epilepsia em algum momento de suas vidas (CHANG; LOWEISTEIN, 2003). Por ano, 100.000 novos casos de epilepsia são diagnosticados nos Estados Unidos. No Brasil, a prevalência é de 18,6 por 1000 habitantes (BORGES et al., 2004).

A prevalência e a incidência de epilepsia nos países desenvolvidos são menores do que nos países em desenvolvimento, entretanto essa maior prevalência nos países em desenvolvimento, provavelmente, está relacionado com os aspectos metodológicos desses estudos. Já em relação à incidência, sua distribuição, ocorre em forma de U nos países desenvolvidos, com taxas mais elevadas nas crianças e idosos enquanto nos países em desenvolvimento, a epilepsia apresenta seu pico no início da idade adulta (TÉLLEZ-ZENTENO; HERNANDEZ-ROQUILLO, 2012).

Segundo Miguéns-Blanco e Rodriguez-Acevedo (2013), epilepsia é uma doença comum na população em geral, onde 10% da população apresentará uma convulsão durante toda sua vida, embora apenas 1% terá uma condição epiléptica.

Tanto a prevalência quanto a incidência de epilepsia são dramaticamente mais altas entre indivíduos mais jovens. O tipo de epilepsia, a freqüência e a imprevisibilidade das crises epilépticas quanto à hora de ocorrência são atributos que causam adversidades ao próprio paciente, aos familiares, assim como à sociedade como um todo. Por isto, ela se torna uma questão de saúde pública (BROWNE; HOLMES, 1997).

Dentro deste contexto, a ELT é a forma mais comum de epilepsia em adultos, sendo responsável por cerca de 60% das epilepsias de início focal (CHIANG; HANEEF, 2014).

De acordo com classificação da ILAE, a ELT, em relação a sua localização e etiologia, pode ser subdividida em: epilepsia mesial temporal (EMT), quando as crises se originam nas estruturas mesiais; epilepsia temporal neocortical (ETN), quando as crises se originam no lobo temporal, fora das estruturas mesiais e epilepsia temporal familiar (ETF), sendo a ETM a mais frequente (VALENÇA-

ANDRADE et al., 2006). A esclerose hipocampal (EH) é considerada o achado neuropatológico mais frequente em pacientes com ETM (CENDES et al., 2014; CHATZIKONSTANTINO, 2014; THOM, 2014). A importância clínica da ELT mesial decorre de sua alta prevalência e elevada proporção de pacientes com crises epiléticas refratárias ao tratamento medicamentoso; entre as causas de refratariedade da ELT está a esclerose mesial hipocampal, encontrada em 50-70% dos pacientes com ELT refratária ao tratamento clínico (VALENÇA-ANDRADE et al., 2006; CÚRIA et al., 2014).

2.2 CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO DE EPILEPSIAS

Epilepsia é uma desordem cerebral, caracterizada por uma predisposição duradoura para gerar crises epiléticas em condições neurobiológicas, psicológicas, cognitivas e sociais dessa condição. A definição de epilepsia requer a ocorrência de pelo menos uma crise epilética (FISHER et al., 2005). As crises epiléticas são definidas como ocorrências paroxísticas de sinais e sintomas decorrentes de atividades anormais, excessivas e sincrônicas de muitos neurônios cerebrais (MERRITT, 2007).

De acordo com Gitaí (2008), uma respeitável definição para o estudo desta patologia é a distinção em meio a os conceitos de epilepsia e crise epilética. O diagnóstico de epilepsia se arrola ao encontro de uma anormalidade epileptogênica cerebral permanente, onde mais tardiamente irá ocorrer o desencadeamento das crises recorrentes características. Em contraposição, as crises epiléticas podem se apresentar em pessoas não acometidas por esse mal. Estas crises podem advir de forma isolada em resposta a um insulto transitório ou à perda de homeostase, e desse modo, a situação de estresse presente naquele momento pode desencadear uma atividade elétrica anormal.

A ILAE define epilepsia como uma condição caracterizada por duas ou mais crises epiléticas recorrentes durante um período superior a 24 horas, não provocada por qualquer causa identificada imediata (TÉLLEZ-ZENTENO; HERNANDEZ-RONQUILLO, 2012). Posteriormente a ILAE aceitou as recomendações de uma força tarefa que alterou a definição, propondo que epilepsia é considerada uma doença do cérebro definida por qualquer uma das seguintes

condições: 1- pelo menos dois ataques não provocados que ocorrem com mais de 24 horas de intervalo, 2 - uma crise não provocada e uma probabilidade de novas crises semelhante ao risco geral de recorrência (pelo menos 60%) após duas crises não provocadas, ocorrendo ao longo dos próximos 10 anos e 3 - diagnóstico de uma síndrome epiléptica (FISHER et al., 2014).

Segundo a revisão de conceito, terminologias e abordagens para classificação de crises e formas de epilepsias realizada pela ILAE e publicada em 2010, podemos classificar a epilepsia das seguintes maneiras (BERG et al., 2010):

1. Modo de início e classificação das crises

1.1. *Crises generalizadas* - São caracterizadas por perda súbita da consciência, afetando redes neuronais que rapidamente propagam as descargas epiléticas bilateralmente, em ambos os hemisférios cerebrais. Tais propagações bilaterais podem incluir estruturas corticais e subcorticais, mas não necessariamente incluir todo o córtex. As crises generalizadas podem ser:

1.1.1. *Crises de ausência.*

1.1.2. *Crises de ausência atípicas.*

1.1.3. *Crises mioclônicas.*

1.1.4. *Crises clônicas.*

1.1.5. *Crises tônicas.*

1.1.6. *Crises tônico-clônicas.*

1.1.7. *Crises atônicas.*

1.2. *Crises de início focal* - As descargas elétricas anormais se limitam a redes localizadas numa parte do córtex, num hemisfério cerebral. Essas descargas podem ser discretamente localizadas ou ter distribuição mais ampla. As crises de início focal podem se apresentar sem ou com comprometimento da consciência:

1.2.1. *Sem comprometimento da consciência* - Podem ser crises motoras, autonômicas, somatossensoriais ou sensoriais específicas.

1.2.2. *Com comprometimento da consciência* - Cursam com comprometimento de dois ou mais dos seguintes componentes da cognição: percepção, atenção, emoção, memória e função executiva.

2. Em relação a etiologia

2.1. *Genética* - O conceito de epilepsia genética compreende o resultado de um defeito genético conhecido ou presumido, em que as convulsões são o sintoma principal da doença.

2.2. *Estrutural/Metabólica* - Conceitualmente, há outra condição distinta estrutural ou metabólica que se demonstrou estar associada com um risco substancialmente aumentado de desenvolvimento de epilepsia.

2.3. *Desconhecida* - A causa subjacente é ainda desconhecida.

3. Síndromes eletroclínicas e outras epilepsias

3.1. *Síndromes eletroclínicas* - O uso do termo síndrome será restrito a um grupo de entidades clínicas que são identificadas de forma confiável por um aglomerado de características eletroclínicas.

3.2. *Constelações* - São uma série de entidades que não são exatamente síndromes eletroclínicas no mesmo sentido, mas que representam constelações clínicas distintas, com base em lesões específicas ou outras causas. Estas são diagnosticamente formas significativas de epilepsia e podem ter implicações para o tratamento clínico, particularmente a cirurgia.

3.3. *Epilepsias estrutural/metabólica* - Inclui epilepsias secundárias a lesões ou condições específicas estruturais ou metabólicas, mas que não, se enquadram em um padrão eletroclínico.

3.4. *Epilepsias de causa desconhecida* - Eram as epilepsias chamadas anteriormente de criptogênicas.

Dentro da nova classificação, é proposto que cada síndrome e cada paciente sejam caracterizadas nos diversos aspectos, como idade de início, antecedentes cognitivos e de desenvolvimento, exame clínico, exame sensorial e motor, achados eletrencefalográficos, fatores desencadeantes e padrão de ocorrência de crises em relação ao sono (BERG et al., 2010).

2.3 FISIOPATOLOGIA DA ELT-EH

A atividade epiléptica cerebral pode ser desencadeada por diversos fatores, e por isso a epilepsia é considerada uma disfunção complexa e multifatorial (GITAÍ, 2008).

Existem duas categorias etiológicas básicas: a) distúrbio epileptogênico específico, que gera epilepsia em indivíduos susceptíveis; b) fatores precipitantes, que são perturbações endógenas ou exógenas e que evocam crises epiléticas agudas em determinados períodos de tempo (ENGEL, 1996).

Os distúrbios epileptogênicos específicos podem ser lesões, tais como trauma, infecção, neoplasia, malformação vascular, malformações congênitas e anormalidades genéticas (como mutações gênicas pontuais ou aberrações cromossômicas) (VEZZANI, 2005). Várias vias celulares associadas a esses insultos também ocorrem de forma secundária às crises recorrentes. Portanto, as próprias crises epiléticas, potencialmente, poderiam perpetuar ou agravar, em maior ou menor grau, o processo de epileptogênese (VEZZANI, 2005).

Fatores como consumo de álcool, febre e privação de sono podem precipitar crises ocasionais em muitas pessoas com epilepsia ou causar crises reativas em indivíduos sem epilepsia. Esses indivíduos, porém, têm uma sensibilidade específica a determinados fatores (ENGEL, 1996).

Segundo, Mumenthaler e Mattle (2007) a epilepsia reflete o funcionamento anormal dos neurônios cerebrais. Na epilepsia, os neurônios corticais exibem alterações do seu potencial de membrana e dos padrões de descarga. O desvio da despolarização paroxística é um potencial de despolarização pós sináptico anormalmente prolongado, capaz de causar surtos de descargas neuronais e, subsequentemente, de excitar outros neurônios, de modo a adotarem um padrão anormal de crises sincronizadas semelhantes. Este padrão pode resultar de um desequilíbrio entre neurotransmissão excitatória e inibitória.

O hipocampo é a região mais estudada em epilepsias (THOM, 2014). A esclerose mesial temporal é o achado patológico mais comum em epilepsia crônica do lobo temporal e está relacionada com a refratariedade ao tratamento medicamentoso (JARDIM et al., 2012).

Histologicamente, o hipocampo pode ser dividido em quatro setores de camadas: CA1, CA2, CA3 e CA4 que variam de tamanhos e quantidades de células

nervosas (SENDROWSKI; SOBANIEC, 2013). No exame histológico, esclerose hipocampal é caracterizada por degeneração e perda seletiva de neurônios piramidais, proliferação patológica de redes de interneurônios e gliose acentuada (SENDROWSKI; SOBANIEC, 2013).

A esclerose hipocampal refere-se a uma perda acentuada de neurônios hilares e células piramidais que podem ocorrer em todas as regiões do corno de Ammon (CA) e em regiões do giro denteado do hipocampo, acompanhada de gliose e atrofia da formação hipocampal. Também podem ser encontrados comprometimento de outras estruturas mesiais, do córtex entorrinal, e anormalidades da substância branca e do neocórtex (CÚRIA et al., 2014; SENDROWSKI; SOBANIEC, 2013; VALENÇA-ANDRADE et al., 2006).

Os mecanismos exatos da fisiopatologia da esclerose hipocampal nas crises epiléticas não foram ainda completamente esclarecidos. Acredita-se num processo inflamatório crônico, associado a uma história prévia de injúria cerebral, geralmente ocorrido na infância (THOM, 2014).

2.4 DIAGNÓSTICO

A avaliação diagnóstica tem os objetivos principais de determinar se o paciente tem epilepsia, classificar o tipo de epilepsia e identificar a síndrome epilética e, se possível, definir a causa subjacente específica (MERRITT, 2007).

Como a epilepsia é causada por diferentes etiologias e é uma doença multifatorial, e como crises epiléticas pode ser um sintoma de transtornos cerebrais diversos, não existe uma avaliação diagnóstica padrão ou mínima, e sim um conjunto de elementos que levarão a um provável diagnóstico. Uma história clínica completa é o pilar do estabelecimento de um diagnóstico de epilepsia. Uma história adequada deve proporcionar um quadro claro das características clínicas das crises e a sequência em que as manifestações evoluem (MERRITT, 2007).

O diagnóstico preciso é fundamental, principalmente nas epilepsias fármaco resistentes como é o caso da ELT-EH (MEMARIAN et al., 2013).

Uma das principais dificuldades de diagnosticar a epilepsia é distinguir entre as crises verdadeiras e outras com morbidades, como síncope e pseudocrises (ALVES-LEON et al., 2013).

O eletrencefalograma (EEG) na ELT é capaz de oferecer três tipos de informações principais: presença de atividade epileptiforme, quando anormal, o que ajuda a corroborar o diagnóstico clínico de epilepsia; auxílio na classificação da síndrome ou desordem epiléptica, pelos padrões eletrencefalográficos encontrados; informações prognósticas em alguns casos. Atividade epileptiforme é caracterizada pela presença de ondas agudas e/ou espículas, em combinação ou não com ondas lentas, e que apresentam forte associação com epilepsia. Sua ausência, no entanto, não exclui o diagnóstico clínico (COSENZA-ANDRAUS et al., 2006).

Na ELT-EH, o EEG interictal, pode demonstrar anormalidade não epileptiforme com alentecimento nas faixas teta e delta sobre as regiões temporais mesio basais. Padrão de ondas agudas e/ou espículas, com projeção temporal anterior, uni ou bilateral, podem ocorrer, entretanto, alguns pacientes apresentam EEG interictais normais, não excluindo o diagnóstico de ELT-EH (VALENÇA-ANDRADE et al., 2006).

O achado persistente ou intermitente de 4-7Hz de atividade teta ou 1-3Hz de atividade delta uni ou bilaterais nas regiões temporais é um achado inespecífico em várias condições como acidente vascular encefálico, esclerose hipocampal ou pode não ter nenhum substrato patológico, entretanto o padrão persistente está mais relacionado com anormalidade estrutural (JAVIDAN, 2012).

Estima-se que cerca de 99,5 a 99,8% dos adultos com alterações epileptiformes interictais apresentem eventos clínicos epilépticos (WALCZAK; JAYAKAR, 1998). O EEG deve incluir gravações durante sono (sonolência e sono leve), fotoestimulação, e hiperventilação, porque certos tipos de atividade epileptiforme são mais prováveis de ocorrerem sob estas condições. Em aproximadamente 50% dos pacientes que têm epilepsia, um primeiro EEG pode ser normal e, nesses casos, pode-se realizar o registro após privação de sono (o que aumenta a possibilidade de detecção de descargas epileptiformes, especialmente na ELT) (BROWNE; HOLMES, 1997).

Um dos padrões ictais típicos da ELT é uma atividade rítmica na faixa teta com diminuição da frequência e aumento da amplitude (VALENÇA-ANDRADE et al., 2006). Segundo Javidan (2012) a anormalidade epileptiforme típica é caracterizada por ponta ou onda com polaridade negativa e em muitas vezes, seguida por uma onda lenta, onde os picos temporais têm o máximo de negatividade nos eletrodos basais temporais F7, F8, T1, T2 e eletrodos esfenoidiais.

Nos casos em que o EEG interictal não revelar anormalidades e quando ocorrem dúvidas com relação ao diagnóstico, o paciente pode ser submetido a monitorização prolongada por vídeo-eletrencefalografia (vídeo-EEG). O maior objetivo da monitorização prolongada por vídeo-EEG é estudar a natureza de uma alteração comportamental, por meio dos registros eletrencefalográfico e por vídeo sincronizados (AMERICAN ELECTROENCEPHALOGRAPHIC SOCIETY, 1994; ANDRAUS et al., 2002a;b; BINNIE; MIZRAHI, 1998; GARZON, 1999a;b;c; GUERREIRO; CENDES; GUERREIRO, 2000; NAPOLITANO et al., 1999). Os achados eletrencefalográficos combinados com a semiologia clínica de crises registradas durante uma monitorização prolongada são de grande valor na localização da zona de início ictal (ZII), área do córtex onde as crises são geradas, incluindo a área de propagação precoce, sendo parte da zona epileptogênica (Zep) que é definida como a porção de córtex cerebral necessária e suficiente para iniciar as crises epiléticas, sendo sua remoção fundamental para o controle da maioria das crises dos pacientes (FOLDVARY et al., 2001; LAGE et al., 2000).

Também são utilizados exames de neuroimagem, especialmente ressonância nuclear magnética (RNM) de crânio, capaz de identificar a atrofia hipocampal. Esta é a principal ferramenta de diagnóstico para detectar anormalidades anatômicas e quando combinado com EEG, pode identificar mais precisamente a concordância ou não, com a ZII (MEMARIAN et al., 2013). Devem ser obtidas imagens tanto de planos axiais como coronais com sequências T1 e T2. A aquisição de imagens no plano coronal perpendicularmente ao eixo longo do hipocampo melhoram a detecção de atrofia do hipocampo e gliose, achados que se correlacionam muito com EMT e um lobo temporal epileptogênico (MALMGREN; THOM, 2012). As características da RNM que evidenciam EH são: 1 - Aumento da intensidade de sinal em T2, 2 - Redução do volume do hipocampo e 3 - Alteração da arquitetura interna (MALMGREN; THOM, 2012). Em pacientes que estão sendo considerados para cirurgia da epilepsia, exames de neuroimagem funcional, como tomografia computadorizada por emissão de fóton único (*single photon emission computed tomography* - SPECT) ictal e tomografia por emissão de pósitrons (*positrons emission tomography* - PET) podem fornecer informações relacionadas a alterações de fluxo sanguíneo cerebral regional e metabolismo cerebral focal respectivamente, se apresentarem concordância com a ZII (COSENZA et al., 2003; MALMGREN; THOM, 2012; MERRITT, 2007).

2.5 EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL ASSOCIADA A ESCLEROSE HIPOCAMPAL

O termo “epilepsia do lobo temporal” foi introduzido em 1951, por Herbert Jasper (1906-1999) e colaboradores, e denota a condição de pacientes que têm em comum a ocorrência de crises epiléticas de início focal, com ou sem generalizações secundárias, presumivelmente originadas no lobo temporal (CENDES; KOBAYASHI, 2000; ENGEL; WILLIAMSON, 1998; ILAE, 1985; ILAE, 1989).

O substrato patológico mais frequentemente encontrado na EMT é a esclerose mesial hipocampal que ocorre em 65% dos casos de epilepsia do lobo temporal de difícil controle (CENDES et al., 2014). No entanto, outras estruturas também estão envolvidas, como a amígdala, o giro parahipocampal e o córtex entorrinal (GLOOR, 1991). Outras alterações estruturais também podem ser encontradas isoladamente ou em associação com a esclerose hipocampal como: tumores, displasias, calcificações, malformações vasculares, entre outras (CÚRIA et al., 2014; HO et al., 1998; SENDROWSKI; SOBANIEC, 2013; VALENÇA-ANDRADE et al., 2006).

A classificação da ILAE em relação à ELT-EH definiu que a marca histopatológica da EH é a perda de células piramidais que podem afetar qualquer setor do CA. Perdas de células neuronais do hipocampo estão associadas a um padrão grave de astrogliose, definida por uma malha densa de proteína glial fibrilar. Esta consistência de tecido atrófico e endurecido levou a introdução precoce do termo “Esclerose do CA” (BLUMCKE et al., 2013).

Nas últimas décadas foram feitas várias tentativas para classificar padrões específicos de perda neuronal no hipocampo, entretanto não houve um consenso sobre as definições e terminologias, até que foi criada uma força tarefa pela ILAE para revisar as classificações anteriores e propor um sistema baseado em padrões semiquantitativos de perdas de células hipocámpais (BLUMCKE et al., 2013).

Essa força tarefa classificou a EH por exame histopatológico em três tipos:

Tipo 1 - É o tipo mais comum de EH, cerca de 60-80% dos casos de ELT-EH. O segmento CA1 é o mais afetado > 80% de perda celular, mas outros segmentos também mostram perda neuronal significativa, afetando 30-50% dos neurônios piramidais em CA2, 30-90% em CA3 e 40-90% em CA4. O giro denteado é afetado em 50-60% de perda de células granulares.

Tipo 2 - Este tipo apresenta histologicamente com perda neuronal predominante em CA1, afetando cerca de 80% das células piramidais. Todos os outros setores mostram perda celular leve, visível apenas por microscopia, onde CA2 apresenta menos de 20% de perda celular, CA3 menos de 20% e CA4 menos de 25%. Este padrão é incomum, sendo visto em cerca de 5-10% dos casos.

Tipo 3 - Ocorre perda predominantemente em CA4, com aproximadamente 50% de perda celular e no giro denteado com 35% de perda celular, ao passo que as outras regiões são moderadamente afetadas com CA3 < 30%, CA2 < 25% e CA1 < 20% de perda celular. É também um padrão raro de EH, ocorrendo em cerca de 4-7% dos casos.

Outros tipos histológicos encontrados na ELT são a gliose sem esclerose hipocampal, onde cerca de 20% dos casos de ELT não apresentam perda neuronal significativa, ocorrendo somente gliose de forma mais acentuada e dispersão de células granulares, que ocorrem em 50% dos casos de ELT (BLUMCKE et al., 2013).

A ELT possui sintomatologia complexa, resultado das conexões do lobo temporal com estruturas límbicas, lobos frontal, parietal e occipital, e com suas próprias funções na linguagem, memória, funções autonômicas e sensoriais. A fenomenologia ictal da ELT pode cursar com alteração da consciência, atualmente denominada crise discognitiva (BERG et al., 2010), e expressa à participação neocortical, hipocampal ou parahipocampal da circuitaria neuronal envolvida na crise. As crises epilépticas do lobo temporal que cursam com distúrbios da consciência apresentam correlação clínico-eletrencefalográfica bem definida, originadas nas estruturas límbicas temporais mesiais (EMT) ou na convexidade do lobo temporal (neocortical) (JAVIDAN, 2012; VALENÇA-ANDRADE et al., 2006).

As crises originadas nas estruturas mesiais, especialmente relacionadas à esclerose hipocampal, podem aparecer pela primeira vez na infância, na adolescência ou na idade adulta, porém mais comumente entre 10 e 20 anos de idade (MUMENTHALER; MATTLE, 2007). É comum que o paciente tenha tido uma ou mais convulsões febris na infância, antes do desenvolvimento da EMT (PATTERSON; BARAM; SHINNAR, 2014).

De acordo com a classificação a ILAE publicada em 2010, as crises focais, como a EMT, podem se apresentar com ou sem comprometimento da consciência (BERG et al., 2010).

Crises de início focais são aquelas cujas descargas elétricas anormais se limitam a redes localizadas numa parte do córtex, num hemisfério cerebral e podem ou não evoluir para crises generalizadas (BERG et al., 2010; YACUBIAN, 2002). Alguns pacientes com ELT-EH experimentam eventos pré ictal, que podem ser úteis na previsão de uma crise que vem, podendo estes durar, minutos, horas e ocasionalmente dias, sendo exemplos desses pródromos a cefaleia, a alteração de humor, mudança de personalidade e ansiedade (BLAIR, 2012).

Os sinais subjetivos iniciais de crise e que podem ser descritos pelo paciente constituem a aura (que representa o início da crise) (BLAIR, 2012; DANTAS; YACUBIAN, 2001a;b; GARGANIS et al., 2001; VALENÇA-ANDRADE et al., 2006; YACUBIAN, 2002). A ocorrência de auras é mais comum nas crises originadas nos lobos temporal e parietal (MIGUÉNS-BLANCO; RODRIGUEZ-ACEVEDO, 2013; VELASCO; BUSTAMENTE, 1999; YACUBIAN, 2002).

Auras comuns anunciando a crise incluem uma sensação de calor ou desconforto epigástrico, náuseas, alucinações olfativas e gustativas e uma sensação de familiaridade (*déjà vu*) ou não familiaridade (*jamais vu*), seguida de automatismos orais, reação de parada e olhar fixo e vago (MUMENTHALER; MATTLE, 2007).

As crises focais sem comprometimento da consciência são caracterizadas clinicamente por sintomas autonômicos e ou psíquicos, e certos fenômenos, como olfativos e auditivos (incluindo alucinações) (MIGUÉNS-BLANCO; RODRIGUEZ-ACEVEDO, 2013).

As crises parciais com comprometimento da consciência são precedidas ou não de auras, que podem ser descritas como sensação “estranha” epigástrica, sentimento de medo, fenômenos do tipo *déjà vu* ou *jamais vu*, depressão, angústia, alucinações visuais, auditivas, olfativas ou gustativas, auras somestésicas, erotismo e sensações de bem estar, sendo caracterizadas clinicamente por sintomas motor, tipicamente seguido por automatismo oro-alimentar, podendo seguir-se outros tipos de automatismos. A duração costuma ser maior do que um minuto e confusão pós-ictal é comum. As crises são geralmente seguidas por amnésia e a recuperação é gradual (DANTAS, 2001; MIGUÉNS-BLANCO; RODRIGUEZ-ACEVEDO, 2013; VALENÇA-ANDRADE et al., 2006; WILLIAMSON; ENGEL, 1998; YACUBIAN et al., 1994).

Aproximadamente 24 a 30% dos pacientes apresentam perda de contato com o meio ambiente e interrompem o que estavam fazendo antes da crise

epiléptica propriamente dita, como se estivessem “congelados” ou “parados” (reação de parada ou *behavioral arrest*), com os olhos abertos e fixos (*staring*) (BUSTAMANTE; SAKAMOTO, 1999). Cerca de 40 a 80% apresentam automatismos típicos, principalmente das mãos e boca (gestuais e mastigatórios ou oro-alimentares), ou movimentos do tronco e/ou dos membros repetidamente. Eventualmente, ocorrem desvio ou versão óculo-cefálica e postura distônica de um dos membros, que podem ou não ser contralaterais à ZEp (BUSTAMANTE; SAKAMOTO, 1999). Pode haver alterações da frequência cardíaca, do ritmo respiratório, do diâmetro pupilar e palidez ou rubor, associados aos demais sintomas (DANTAS, 2001). No período pós-ictal imediato, pode ocorrer confusão mental e alterações do comportamento (“comportamento automático”), como levantar, andar ou correr. Alguns pacientes apresentam evolução para crises tônico-clônicas generalizadas (BLAIR, 2012).

Segundo Kotagal, 1991, postura distônica pode ocorrer em cerca de 15% dos pacientes com epilepsia do lobo temporal, sendo geralmente contralateral à descarga ictal. Envolve freqüentemente os membros superiores, mas também pode afetar os membros inferiores e corresponde ao sinal clínico mais fidedigno para lateralização do foco, especialmente quando presente no início da crise (o que pode ser visualizado pelo SPECT ictal). Sua ocorrência se dá pelo hiperfluxo sanguíneo dos gânglios da base ipsilaterais ao foco no início da crise. Com o espraimento das descargas, pode ocorrer hiperfluxo contralateral dos gânglios da base e o sinal perde seu valor localizatório (ANDRAUS et al., 2002a;b).

A maioria das epilepsias, quando devidamente diagnosticadas e tratadas, são controladas com fármacos antiepilépticos (FAE). Cerca de 20 a 30% das epilepsias em geral irão apresentar refratariedade ao tratamento com FAE e serão denominadas de epilepsia refratária (ER) ou de difícil controle. Na ELT, cerca de 50% dos pacientes apresentam refratariedade aos FAE (ARONICA et al., 2004; KWAN; SANDER, 2004; YACUBIAN, 2002). Na ELTM, o achado neuropatológico de EH se caracteriza por uma maior refratariedade aos medicamentos (CENDES et al., 2014; CÚRIA et al., 2014; TAN, 2014). Medicação anti epiléptica é indicada, como tratamento de primeira linha, entretanto se a epilepsia provar ser medicamentosamente intratável, que é comum nos pacientes com ELT-EH, uma avaliação sobre procedimento cirúrgico deverá ser analisado (CHATZIKONSTANTINO, 2014). O paciente com ER é aquele que foi tratado por

pelo menos um ano com dois FAE em monoterapia com FAE considerado de primeira linha, posologia adequada, e uma ou duas vezes em combinação, com adesão confirmada ao tratamento, e mesmo assim, não obteve controle das crises (KWAN; SANDER, 2004; YACUBIAN, 2002).

Foi proposta uma escala de gravidade de epilepsia (Quadro 1) 2009 (MOELLER; RAHEY; SADLER, 2009).

<p><u>1- Livre de crises</u> A - Livre de crises sem uso de fármacos anti-epilépticos B - Livre de crises com uso de fármacos anti-epilépticos</p> <p><u>2 - Parcialmente controlado</u> A - Crises focais simples sensoriais, somente aura. B - Apenas crises noturnas. C - Menos de 1 crise a cada três meses. D - Outros</p> <p><u>3 - Sem controle</u> A - Crises <1/mês B - Crises mensais (>1/mês e <1/semana) C - Crises semanais (>1/semana e <1/dia) D - Crises diárias E - Sem controle - Outros</p>

Fonte: Epilepsia Novembro de 2009

Quadro 1: Escala Adaptada de Gravidade de Epilepsia (MOELLER, RAHEY; SADLER, 2009)

Foram feitos avanços significantes no tratamento de epilepsia durante as últimas décadas. Até mesmo em pacientes nos quais os FAE são eficazes, seu uso parece não afetar a progressão da epilepsia. Além disso, não há nenhuma droga atualmente disponível que previna o desenvolvimento de epilepsia. Assim, há três metas importantes: (1) entender melhor os processos que conduzem a epilepsia, permitindo criar terapias de prevenção de epilepsias em pacientes de risco; (2) entender os mecanismos biológicos da fármaco-resistência, permitindo desenvolver drogas para reversão ou prevenção de resistência; e (3) desenvolvimento de terapias que modifiquem a doença, inibindo os mecanismos inflamatórios e a progressão de ELT-EH. A última meta seria uma droga que combine estas três propriedades, resultando assim em uma cura completa para epilepsia (LOSCHER, 2002).

Para um melhor entendimento do estudo das epilepsias se fez necessária a busca por modelos experimentais, que são ferramentas extremamente valiosas no estudo da prevenção, diagnóstica e tratamento das doenças e síndromes epiléticas (AVANZINI, 1995; SENDROWSKI; SOBANIEC, 2013).

2.6 NEUROINFLAMAÇÃO E EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL ASSOCIADO A ESCLEROSE HIPOCAMPAL

O sistema imune e as reações inflamatórias desempenham um papel importante na proteção do tecido a partir de insultos infecciosos e não infecciosos.

Para defender o hospedeiro contra a invasão de organismos estranhos ou ameaças patogênicas, o sistema imunológico utiliza duas partes: uma responsável por uma ação imediata contra os agentes externos, chamada de sistema imune inato e outra que permite o reconhecimento antígeno específico via células apresentadoras de antígenos, que constituem o sistema imune adaptativo (VEZZANI; GRANATA, 2005).

A imunidade inata representa uma resposta imediata e não específica contra patógenos invasores. Leucócitos, incluindo as células natural killer (NK), granulócitos, monócitos, células dendríticas e receptores *Toll-Like* (TLRS) estão envolvidos na ativação da imunidade inata (VEZZANI, 2011).

Ativação de TLR inicia a resposta imune inata e a inflamação durante a infecção, ou em resposta a lesão tecidual. A estimulação desses receptores por patógenos leva a liberação de citocinas, tais como IL12, que estão envolvidos na transição entre a resposta imune inata e adaptativa (VEZZANI, 2011).

O sistema adaptativo é ativado em resposta a imunidade inata e permite reconhecer antígenos específicos, mediando uma resposta humoral (produção de anticorpos) ou respostas imunes mediadas por células de linfócitos B e T respectivamente. Células dendríticas, macrófagos e células B estimulam células T virgens a se tornarem células T efetoras. A desregulação da imunidade adaptativa e a perda da tolerância à auto antígenos pode resultar no desenvolvimento de autoimunidade. Uma subpopulação de células T chamadas de células T reguladoras ($CD4^+ CD25^+$) ajudam a controlar a atividade autoimune e assim manter a homeostasia do sistema imune e a tolerância à auto antígenos (VEZZANI, 2011).

O cérebro tem sido considerado um local imunoprivilegiado por causa da presença da barreira hemato encefálica (BHE), pela falta de um sistema linfático convencional e devido ao tráfico limitado de células imunitárias periféricas. Em condições fisiológicas a BHE controla rigorosamente a entrada de células e moléculas, incluindo proteínas no cérebro. No entanto, ambas as respostas imunes podem estar presentes no sistema nervoso central, em resposta a agentes patogênicos, auto antígenos ou lesão do tecido (ABOTT, 2006; VEZZANI, 2011). O braço da resposta inata envolve a ativação do receptor de IL-1 e toll-like (IL-1R/TLR), vias de sinalização através da ligação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou a ativação da via da cicloxigenase-2 (COX-2), e dos fatores de transformação β (TGF β). Os mediadores inflamatórios produzidos pelo sistema imune inato aumentam a permeabilidade e a expressão de moléculas de adesão do endotélio de modo a atrair os linfócitos do sistema imunitário adaptativo, conduzindo sua infiltração no sistema nervoso central (XU; MILLER; KOH, 2013).

Imunohistoquímica realizada em cortes de cérebros afetados revelaram que vários tipos de células, incluindo a microglia, astrócitos, células epêndimárias e células endoteliais do BHE, foram envolvidos nas ondas de inflamação e indução de crises convulsivas. A ativação da via inflamatória de IL-1R/TLR foi uma das primeiras a serem identificadas. A expressão de IL-1R e TLR foram detectadas no cérebro, embora em um nível baixo, entretanto após estimulação, tais como infecções virais ou bacterianas, lesões celulares, isquemia e crises convulsivas, esses níveis aumentam, sendo facilmente identificados (XU; MILLER; KOH, 2013).

Os mecanismos neuroinflamatórios das epilepsias vêm sendo descritos como um fator importante na gênese das crises convulsivas e nas epilepsias refratárias, em especial naquelas com comportamento progressivo, como ocorre na ELT-EH (BAUER et al., 2009; VEZZANI, 2011). Ênfases experimentais e clínicas advertem a inflamação cerebral ou neuroinflamação como um constituinte comum e crucial na epileptogênese e no desenvolvimento das crises epiléticas refratárias. As primeiras evidências da influência da resposta inflamatória na epilepsia foram notadas em pacientes resistentes ao tratamento com FAE, que apresentaram uma diminuição do número de crises após o uso medicamentos antiinflamatórios (WIRRELL; FARRELL; WHITING 2005).

O efeito excitatório de IL 1β parece ser associado com a redução do ácido gama aminobutírico (GABA) e alteração dos canais de cálcio (Ca^{2+}) voltagem

dependentes no hipocampo (XU; MILLER; KOH, 2013). As citocinas, como as interleucinas são proteínas que estão envolvidas na inflamação, na ativação imunitária, na diferenciação celular e apoptose (DUNDAR et al., 2013). A participação do fator de transcrição da inflamação aguda NFkB, também foi demonstrada em pacientes que apresentavam ELT-EH e história prévia de convulsão febril (CRESPER et al., 2002).

Testes com roedores mostraram que sinais pró inflamatórios, tais como citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, receptores *Toll Like* (TLR), fatores do complemento e moléculas de adesão intercelular (ICAM) são rapidamente induzidos durante crises epiléticas (VEZZANI; GRANATA, 2005). A ativação de TLRs, particularmente TLR2 e TLR4, através de lipopolissacarídeos (LPS), resulta em mudanças rápidas na excitabilidade neuronal, levando a alteração na transmissão e na regulação da potencialização sináptica (XU; MILLER; KOH, 2013).

Convulsões prolongadas podem levar a uma regulação aumentada de moléculas de adesão em células endoteliais do cérebro, facilitando o extravasamento de leucócitos circulantes. A expressão de E-selectina, P-selectina, a molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) estão aumentadas nessas situações (FABENE et al., 2008). Os ligantes dessas moléculas, integrinas e mucinas, são expressas por leucócitos circulantes após injúria e facilitam a entrada de granulócitos e linfócitos no cérebro (FABENE et al., 2008). Bloqueio de $\alpha 4\beta 1$ integrinas em leucócitos inibe a infiltração desta população de células no cérebro, e a inibição terapêutica da ativação de integrina $\alpha 4$ impede a indução de convulsões, e mesmo o desenvolvimento de epilepsia (FABENE et al., 2008).

O estudo em espécimes humana, a partir de pacientes com ELT-EH, apoia a existência de uma resposta inflamatória crônica sustentada por micróglia, astrócitos e neurônios do foco epilético, embora continue a ser estabelecido se a inflamação é estritamente associada com a morte celular, induzida por convulsões ou ambas. Nos experimentos em tecidos de cérebros humanos, mostrou uma maior concentração de moléculas da imunidade inata e da imunidade adaptativa, com IL1 beta apresentando-se numa quantidade três vezes superior ao controle (VEZZANI; BARAM, 2007).

As células da glia superam os neurônios em média de 3:1, sendo estas responsáveis por diversas funções como orientar a migração durante o

desenvolvimento, modulação da função sináptica e plasticidade, regulando o microambiente extracelular, isolantes axônicos, regulação do fluxo sanguíneo local, contribui para as funções de permeabilidade da BHE e aplicação da imunidade celular no cérebro para restaurar a função e promover a cura, onde a desregulação dessas funções podem causar convulsões e levar a um estado epileptogênico, ocorrendo nos astrócitos um processo de astrogliose reativa, com alterações na sua morfologia e composição molecular (DEVINSKY et al., 2013).

Em adultos, as citocinas afetam a plasticidade das sinapses, levando a um estado epileptogênico e à progressão da doença. A análise de genes polimórficos de IL1 β em pacientes epiléticos fármacos-resistentes sugere uma associação entre os genes de citocinas e desenvolvimento de ataques epiléticos focais (ALBRECHT, 2007). Algumas anormalidades na produção dessas citocinas têm sido observadas em pacientes epiléticos. Os níveis de citocinas como IL1 β , IL6 e TNF aumentam rapidamente após crises epiléticas, retornando aos níveis normais dentro de 2 a 3 dias após a crise. O efeito inflamatório das citocinas não depende somente do estado funcional dos neurônios, mas também da concentração dessas citocinas e do tempo de duração de exposição dos tecidos a elas. Os pacientes com epilepsia FR têm níveis mais altos de citocinas no soro, principalmente IL6 em relação aos pacientes controlados (ALBRECHT et al., 2007; BAUER et al., 2009).

Um aumento na expressão de IL1 β nas células astrocitárias foi demonstrado por imunohistoquímica em espécimes de cérebros obtidos por cirurgia de pacientes tratados para epilepsia do lobo temporal. Também foi observada a expressão positiva de HLA-DR nas células microgliais dos hipocampus escleróticos desses pacientes (RAVIZZA et al., 2008a).

Foi demonstrada também a diminuição dos níveis de TNF- α , IL-1 β e MIP-1 α /CCL3 importantes citocinas pró-inflamatória, em pacientes portadores de ELT-EH submetidos a procedimento cirúrgico para controle das crises, confirmando em humanos a participação destas citocinas na perpetuação das crises na ELT-EH (QUIRICO-SANTOS et al., 2013a). Em recente trabalho, o mesmo grupo, demonstrou em pacientes com ELT-EH, submetidos a procedimento cirúrgico para remoção do foco epileptogênico, uma redução nos níveis de metaloproteases, que participam como importantes indutores inflamatórios epileptogênicos (QUIRICO-SANTOS et al., 2013b).

A indução experimental de crises epilépticas em roedores levou ao aumento da expressão de diversas citocinas tais como TNF α , IL-1 β e IL-6 e de moléculas de MHC classe I em áreas do cérebro dentro de horas após a estimulação. Ao mesmo tempo, processos regenerativos são acionados, e estes também parecem envolver moléculas de MHC classe I (XANTHOS; SANDKÜHLER, 2014).

Um aumento significativo na expressão de HLA-DR4, -DQ2 e -DR7 foi demonstrado em pacientes com epilepsia do lobo temporal associado à esclerose hipocampal quando comparado aos controles (OZKARA et al., 2002).

Do ponto de vista clínico, o papel da inflamação na fisiopatologia da epilepsia humana é um desafio e um novo paradigma pode ser desenhado a partir das evidências atuais.

2.7 HLA (SISTEMA DE ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO DE HISTOCOMPATIBILIDADE HUMANO)

2.7.1 Descrição dos antígenos HLA

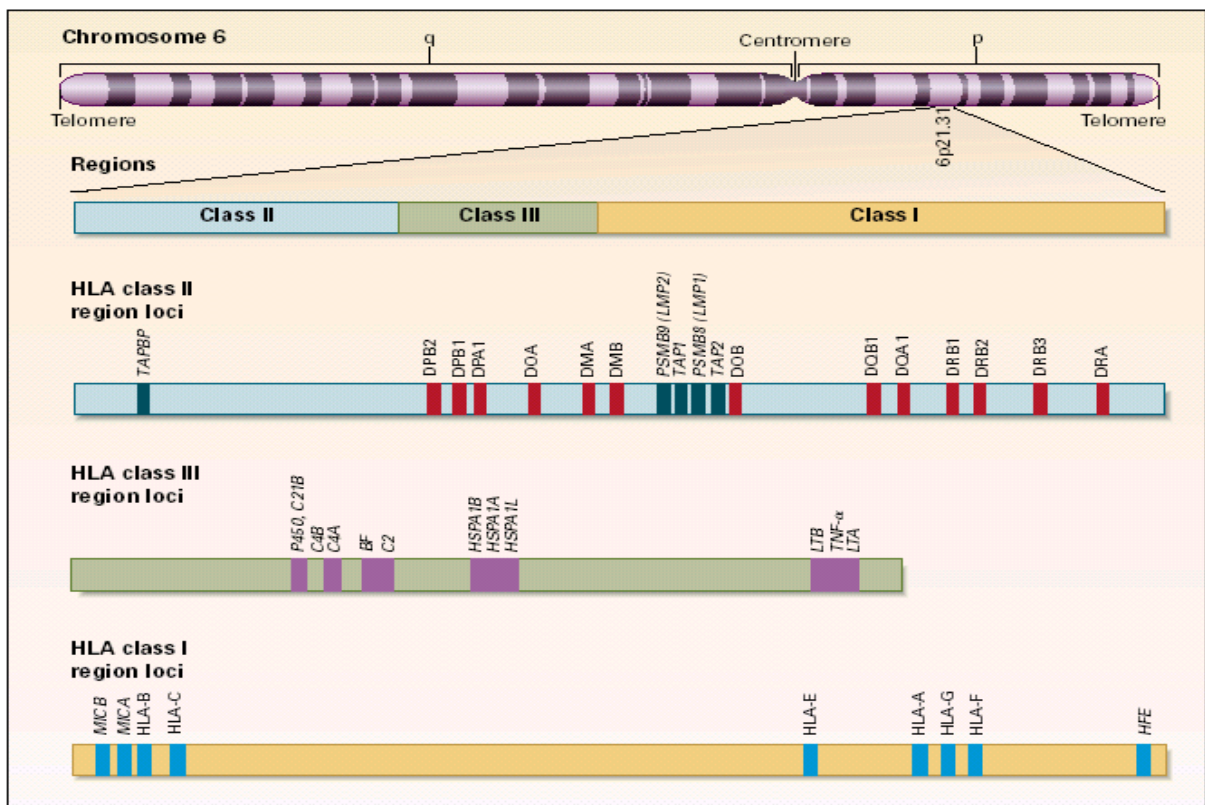
O MHC foi descoberto em 1937, por Peter Gorer. Em 1958, foram lançados os primeiros trabalhos por Jean Dausset, Jon Van Rood e Rose Payne, que viriam mais tarde a torna-se o complexo HLA. O crédito da descoberta do antígeno HLA foi para Dausset ao estudar o soro de pacientes submetidos a múltiplas transfusões de sangue. Ele deu o nome de MAC para honrar três voluntários importantes de sua pesquisa e cujos nomes tinham essas iniciais respectivamente (TOSI et al., 1978).

O sistema de antígeno leucocitário de histocompatibilidade humano (HLA) é a versão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) dos animais. O mau funcionamento do sistema HLA é a raiz de muitas desordens clínicas, não só devido ao seu papel na resposta imunológica adaptativa, mas também devido a sua grande complexidade genética (JANEWAY et al., 2002).

O complexo HLA fica situado no braço curto do cromossomo 6, e contém mais de 200 genes e mais de 40 codificadores de antígenos leucocitários. Os genes codificadores de HLA se dividem em três classes: I, II e III, onde o de classe III se localiza entre os de classe II e classe I (ROBINSON et al., 2001). Os genes da classe I são expressos pela maioria das células teciduais, porém o nível de

expressão varia dependendo do tecido. Em contraste, os genes da classe II normalmente são expressos por um subgrupo de células imunológicas, que incluem células B, células T ativadas, macrófagos, células dendríticas e células epiteliais tímicas. Entretanto, na presença de interferon- γ , outros tipos de células podem expressar moléculas de HLA classe II. A função de ambas as classes de HLA é a apresentação de pequenos peptídeos derivados de patógenos às células T, um processo que inicia a resposta imune adaptativa (MACKAY; ROSEN, 2000).

As moléculas de HLA classe I apresentam para os linfócitos T CD8 peptídeos endógenos derivados de proteínas autólogas do citoplasma, enquanto as moléculas de HLA classe II apresentam para os linfócitos T CD4 peptídeos exógenos derivados da proteólise de proteínas não autólogas nos fagolisossomos (CRUVINEL et al., 2010).



Disponível em: http://nejm.org/teaching_tools/jpegs_large/klei.fig1.jpg.

Figura 1: Localização do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) humano

Os genes do HLA são os mais polimórficos dos mamíferos, sendo provável que este polimorfismo exista para garantir a sobrevivência das espécies, já que os

haplótipos maternos e paternos em co dominância faz com que cada pessoa possa expressar em suas células diferentes moléculas de HLA, conferindo a vantagem de apresentar uma variedade maior de peptídeos antigênicos as células T e com isso combater um número maior de infecções (ALVES et al., 2005). Quanto maior o polimorfismo do HLA numa população, maior será a probabilidade de herdar haplótipos diferentes e, portanto, ser heterozigoto para todos os loci (TURNER, 2004).

2.7.2 Participação de genes do HLA como função biológica e doenças

Em 1967, Amiel descreveu a associação de HLA com doenças ao encontrar uma frequência aumentada de antígenos HLA, 4C em pacientes com doença de Hodgkin (51%) em relação a indivíduos saudáveis (27%). Em 1973, Schlosstein, Terasaki e Pearson descreveram uma forte associação entre HLA-B27 e espondilite anquilosante.

Desde então, muitas doenças têm sido associadas a antígenos de HLA e em especial as doenças autoimunes (DONADI, 2000). Dois tipos de estudos têm sido utilizados para abordar essa associação, os populacionais e os familiares. Nos estudos populacionais as frequências dos antígenos HLA são observadas em um grupo de pacientes não aparentados, sendo comparados com indivíduos do grupo controle também não aparentados. Quando uma associação é estabelecida em estudos populacionais, é útil realizar os estudos familiares para um melhor entendimento de suas bases genéticas (DONADI, 2000).

Outras doenças que também estão relacionadas com HLA são a tuberculose onde os alelos HLA-DRB1*07 e DQA1*0101 predispõem a tuberculose pulmonar, enquanto os alelos HLA-DQA1*0301 e HLA-DQA1*0501 são protetores, na síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) onde alelos HLA B*35 estão associados a uma rápida progressão da infecção pelo HIV, no lúpus eritematoso sistêmico (LES) onde o HLA-DR2 tem maior predisposição a produzir anticorpos anti DNA dupla fita, e o HLA-DR3 se associa a produção de anticorpos anti-SS-A e anti-SS-B, e os antígenos HLA-DR4 e HLA-DR5 propiciam a produção de anticorpos anti-S e anti-RNP, artrite juvenil onde portadores de HLA-DR4 tendem a manifestar doença poliarticular com fator reumatoide positivo enquanto o HLA-DR5 parece

predispor a forma sistêmica, diabetes tipo I onde foi observada a associação com os alelos HLA-DRB1, HLA-DQA1 e HLA-DQB1, principalmente DQB1*0302 e DQB1*0201, além de outras doenças como doença celíaca e doença de Hashimoto (ALVES et al., 2005).

Os alelos HLA também estão envolvidos em alguns distúrbios neurológicos como a esclerose múltipla (EM), Miastenia Grave, HTLV-1, Coreia de Sydenham, Neurocisticercose, Neurotoxoplasmose e Epilepsia Mioclônica Juvenil, onde esta última está associada a distúrbios de HLA-DR6 em população alemã e HLA-DR13 numa população árabe (ALVES et al., 2007).

Recentemente o HLA tem sido implicado em reações de hipersensibilidade a fármacos antiepiléticos, em especial a carbamazepina. Apesar de ser uma droga de primeira linha no tratamento da epilepsia, a carbamazepina possui uma individualidade e uma variabilidade inter étnica de eficácia clínica e reações adversas, incluindo reações de hipersensibilidade potencialmente fatais, como a síndrome de Stevens Johnson e necrólise epidérmica tóxica (JARAMILLO et al., 2014; BLOCH et al., 2014). Uma predisposição para esses efeitos adversos tem sido associada ao HLA-A*31:01 em várias etnias e com HLA-B*15:02 em pacientes do sudeste asiático (THORSTENSEN et al., 2014; YIP; ALFIREVIC; PIRMOHAMED, 2014).

O mapeamento dos genes de HLA envolvidos nessas doenças e os possíveis mecanismos envolvidos por trás destas associações são agora o principal foco de diversas pesquisas (THORSBY; LIE; 2005).

2.7.3 Estrutura e Tipagem do HLA

Cada molécula do MHC consiste em uma fenda ou sulco extracelular que liga peptídeos, seguida de um par de domínios semelhantes a imunoglobulinas, e está ancorada na membrana celular por meio de domínios transmembrana e citoplasmático. Os resíduos de aminoácidos polimórficos das moléculas do MHC estão localizados na fenda de ligação de peptídeos e próximos a ela. Os domínios não polimórficos semelhantes a imunoglobulinas das moléculas do MHC contêm locais de ligação para as moléculas CD4 e CD8 das células T. As moléculas do MHC I consistem em duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não covalente, uma

cadeia alfa codificada pelo MHC e outra não codificada pelo MHC chamada beta2-microglobulina. As moléculas do MHC II são compostas de duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não covalente, uma cadeia alfa e uma cadeia beta, que são codificadas por genes de MHC polimórficos. Os genes HLA-A, HLA-B e HLA-C, codificam as cadeias alfas dos antígenos da classe I. Os genes HLA-DRB1, HLA-DQB1 e HLA-DPB1, codificam a cadeia beta dos antígenos classe II. Os genes HLA-DRA1, HLA-DQA1 e HLA-DPA1, codificam a cadeia alfa dos antígenos classe II. Os genes classe I, HLA-A, HLA-B e HLA-C, estão próximos do telômero do locus de HLA, enquanto os genes classe II estão mais próximos do centrômero no locus de HLA (JANEWAY et al., 2002).

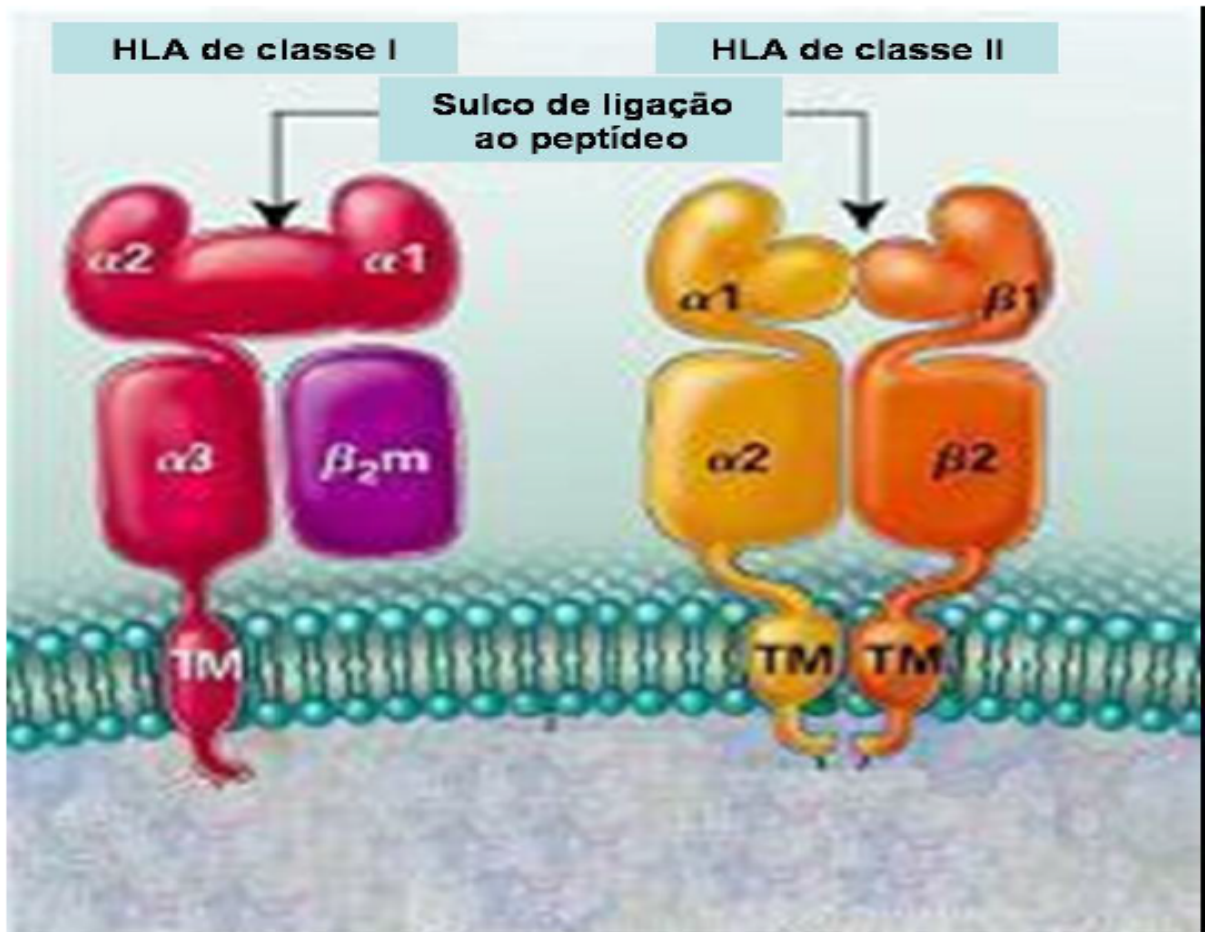


Figura 2: TM - Região transmembrânica. Moléculas de classe I formadas por um heterodímero constituído por uma cadeia α e uma cadeia leve denominada β_2 -microglobulina, enquanto que moléculas de classe II formam um heterodímero de uma cadeia α e uma cadeia β

Característica	HLA de classe I	HLA de classe II
Cadeias polipeptídicas	α (44-47 kD) β_2 -microglobulina (12 kD)	α (32-34 kD) β (29-32 kD)
Localização de resíduos de Aác polimórficos	Domínios α_1 e α_2	Domínios β_1 e β_2
Local de ligação para co-receptores da célula T	A região α_3 liga CD8 (de linfócitos T CD8+)	A região β_2 liga CD4 (de linfócitos T CD4+)
Tamanho da fenda de ligação de peptídeos	Acomoda peptídeos com 8-11 Aác	Acomoda peptídeos com 10-30 Aác
Locos	HLA-A, HLA-B, HLA-C	HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP

Aác = aminoácidos

Quadro 2: Características das moléculas HLA de classe I e moléculas HLA classe II

Os métodos de tipagem do HLA são (JANEWAY et al., 2002):

Sorológicos: Utilizam-se soros específicos para identificação dos antígenos presentes na membrana dos linfócitos.

Moleculares: Utilizando *primers* para amplificação seletiva do DNA correspondente a alelos ou grupos de alelos, seguida da revelação por eletroforese em gel de agarose.

Moleculares: Utilizando *primers* para amplificação seletiva do DNA equivalentes ao alelo HLA, seguida de hibridização com sondas de oligonucleotídeos de seqüência específica.

Análise de baixa resolução: Amplificam regiões do genoma compartilhadas por um grupo de alelos os quais são identificados apenas pelos primeiros dois dígitos (HLA-DRB1*04).

Análise de alta resolução: Amplifica regiões exclusivas de cada alelo, os quais são identificados por quatro dígitos (HLA-DRB1*0405).

2.7.4 Nomenclatura do HLA

A nomenclatura do HLA é definida por um comitê internacional (Comitê de Nomenclatura dos Fatores do Sistema HLA da Organização Mundial de Saúde), que se reúne periodicamente para nomear alelos descobertos recentemente e para rever a nomenclatura vigente. Até a década de 80, a tipificação era realizada por métodos sorológicos que detectavam antígenos e não alelos específicos (TORRES; MORAES, 2011).

A convenção para o uso de um código de 4 dígitos para distinguir os alelos HLA que diferem nas proteínas que eles codificam foi introduzido por este mesmo comitê, em 1987. A partir de então, dígitos adicionais foram introduzidos e atualmente um alelo é nomeado pela composição de quatro, seis ou oito dígitos, dependendo da sequência deste DNA (PORTO, 2010).

Nomeiam-se os antígenos com o prefixo de HLA seguidos por letras maiúsculas para a denominação do locus gênico e um ou dois dígitos para identificação numérica do antígeno. Para nomear HLA classe I acrescenta-se um asterístico após a letra maiúscula identificadora do locus gênico, o qual é seguido por quatro a oito dígitos. Os dois primeiros referem-se à tipificação sorológica do antígeno, o terceiro e o quarto aos alelos específicos, o quinto e o sexto a variações sinônimas e os dois últimos as variações nos íntrons 5' ou 3' do gene. Para o HLA classe II, os genes que codificam as cadeias α e β são representados pelas letras maiúsculas "A" e "B" após a designação do locus gênico. Para os loci DQ e DP acrescenta-se a letra "A" ou "B" e para o locus DR, acrescenta-se a letra "B". Como algumas regiões possuem diversos genes para as cadeias α e β , cada locus é seguido por um algarismo para representa-lo. Também são acrescentados quatro a oito dígitos após o asterístico (ALVES et al., 2005; MARSH et al., 2005).

O mesmo comitê se reuniu pela última vez no 15º *Workshop* Internacional de Histocompatibilidade e Imunogenética, que ocorreu no Brasil, em Setembro de 2008. Durante este evento, foram criados grupos de discussão a cerca das modificações que se faziam necessárias. O novo sistema de nomenclatura HLA se utiliza de separadores (:) entre os números dos alelos que atuam como delimitadores de campo, possibilitando assim a designação de famílias de alelos contendo mais do que 100 diferentes proteínas descritas (TORRES; MORAES, 2011).

A nova nomenclatura do sistema HLA está vigente desde 1º de Abril de 2010. Até este momento, diversos laboratórios e organizações estão estruturando seus sistemas para que estes contemplem as alterações que tem prazo estabelecido pelo banco norte americano de doadores de medula óssea (NMDP) para receber os dados na antiga e atual nomenclatura até o mês de Abril de 2011. Após esta data, somente dados no atual sistema de nomenclatura HLA serão aceitos (PORTO, 2010).

3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é estudar a suscetibilidade genética dos pacientes previamente diagnosticados com ELT-EH, atendidos no Programa de Epilepsias do HUCFF/UFRJ, investigando possível associação genética entre ELT-EH e alelos do sistema HLA classe II.

4 METODOLOGIA

4.1 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

Projeto de pesquisa Neuroinflamação e epilepsia, aprovado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do HUCFF/Faculdade de Medicina/UFRJ, sob o número 073-07, obedecendo as normas do Código de Ética propostas pela Declaração de Helsinque e do Conselho Nacional de Saúde (Resolução No 196/96 e suas complementares). Todos os pacientes incluídos assinaram termo de consentimento livre e esclarecido. Os pacientes ou seus responsáveis consentiram que seus dados de investigação fossem divulgados nessa pesquisa (APÊNDICE A).

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos 42 pacientes com ELT-EH, independente do sexo ou idade, com crises controladas ou não com FAE. Esses pacientes foram comparados com um grupo-controle de 89 indivíduos considerados saudáveis, pareados por idade, etnia e gênero, sem epilepsia ou outra doença inflamatória. Os pacientes foram procedentes do Ambulatório de Epilepsias do Programa de Epilepsias do HUCFF/UFRJ.

Os pacientes com ELT-EH apresentavam critérios clínicos e eletrencefalográficos interictais e ictais pré-estabelecidos de ELT de difícil controle, verificados por meio de anamnese, semiologia das crises, exame físico, EEG interictal e monitorização por vídeo-EEG, com duração de pelo menos 24 horas, dosagem sérica de FAE dentro da faixa terapêutica e neuroimagem, que incluiu RM do crânio com cortes coronais, sagitais e axiais nas sequências *Flair*, T1 e T2 e SPECT ictal. O grupo controle foi formado a partir de um banco de amostras da empresa DNA Forense LTDA, RJ, Brasil.

4.3 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES

Idade: a média de idade dos pacientes, no momento da inclusão nesse estudo, foi de 42,8 anos, com idade mínima de 15 anos e máxima de 65 anos. O grupo controle teve a média de idade de 43,1 anos, com idade mínima de 16 anos e idade máxima de 67 anos.

Sexo: dos 42 pacientes incluídos com EMT-EH, 22 eram do sexo feminino (52,36%) e 20 do sexo masculino (47,64%). Dos 89 controles saudáveis, 47 eram mulheres (52,8%) e 42 eram homens (47,2%).

4.4 EXTRAÇÃO DO DNA

Amostras de 10 a 15 ml de sangue periférico de pacientes e controles saudáveis (pareados por origem étnica, gênero e idade) foram coletadas entre maio de 2011 e dezembro de 2012. Uma alíquota de 0,5 ml de sangue foi estocada em papel de filtro FTA® à temperatura ambiente (20 a 25°C). O restante do sangue foi centrifugado à temperatura de 25°C a 1.400g, durante 10 minutos. Os leucócitos foram coletados e alíquotados em tubos criogênicos (500 µl). As alíquotas foram armazenadas em freezer a -70°C até a realização dos procedimentos subsequentes.

As amostras coletadas para este estudo foram submetidas à extração de DNA genômico por método orgânico, de acordo com o protocolo adaptado de Carvalho *et al.* (2010). Neste processo, 50,0 µl de sangue periférico ou um picote de 3,0 mm de papel FTA® embebido de sangue foram transferidos para um tubo com capacidade para 1,5 ml contendo 200 µl de tampão de lise (10mM Tris pH 8.0, 100mM NaCl, 10mM EDTA pH 8.0, 0,5% SDS) e proteinase K (4 µl a partir de solução estoque a 20mg/ml) e o material foi incubado a 56°C por 2 horas. Na sequência foram adicionados 500 µl de fenol: clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Após agitação suave do tubo, o material foi centrifugado por 2 minutos a 10.000 g e a fase aquosa transferida para um novo tubo, ao qual foi adicionado igual volume de isopropanol absoluto. A amostra permaneceu em banho de gelo por 30 minutos e seguiu para a centrifugação a 10.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi eliminado e o precipitado lavado com etanol 70% e depois estocado em solução TE

pH 8.0 [10 mM Tris HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH8,0)]. Os extratos de DNA foram quantificados por espectrofotometria a 260/280 nanômetros (nm).

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE DNA

Os ácidos nucleicos têm um máximo de absorção a 260nm. A maioria das amostras pode conter contaminantes, como proteínas e DNA de fita simples / RNA que absorvem no máximo de 280nm. A equação para cálculo de DNA na presença de contaminação é: $A[260] / A[280] = \text{dsDNA puro}$. Quanto maior a taxa, mais pura amostra do DNA. Foram aceitas as amostras com relação entre 1,8 e 2,0. O procedimento consistiu em se calibrar o espectrofotômetro com 1ml de TE a 260 e 280 nm; misturar 10 μ l de cada amostra com 90 μ l de TE, fazer a leitura a 260nm e a 280nm e calcular a taxa OD260nm/OD280nm.

4.6 IDENTIFICAÇÃO DE ALELOS DO SISTEMA HLA CLASSE II POR TÉCNICAS DE BAIXA E ALTA RESOLUÇÕES

As reações de SSP-PCR (SSP - *Single Specific Primer*) foram realizadas através de kits comerciais para genotipagem HLA comercializados por One Lambda (Canoga Park, CA, EUA). Estes sistemas, constituídos por placas de tipagem de DNA Micro SSP™, possuem *primers* de sequência específica para a amplificação de alelos de HLA e do gene da β -globina humana por reação de PCR. Este último gene é amplificado como controle interno da reação. Os *primers*, em forma liofilizada, são apresentados em poços na placa de tubos de parede fina para PCR e estão prontos para a adição de amostras de DNA, Taq DNA polimerase recombinante (Go Taq® Green, Promega Corp., CA, EUA) e mistura de dNTPs e tampão especialmente formulada (Micro SSP™ D-mix). A quantidade de cada *primer* foi ajustada para uma amplificação ideal de 100 ng de DNA da amostra quando usada em conjunto com o Micro SSP™ D-mix. As PCRs foram executadas em termociclador GeneAmp® PCR 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), segundo a orientação do fabricante do kit.

Após a realização da PCR, uma alíquota de 10µl de cada produto de amplificação foi submetida à eletroforese em gel de agarose na concentração de 2,5%, a 150V, por cerca de 3 a 5 minutos, até que o corante vermelho de rastreamento tivesse migrado aproximadamente 0,5 cm no gel. As corridas eletroforéticas foram realizadas em cuba de eletroforese horizontal 25 x 20 cm; Modelo DGH25 (Digel, SP, Brasil) e fonte de eletroforese digital; Modelo 300STD (GSR, SP, Brasil). Após a separação eletroforética, o gel foi transferido a uma solução de brometo de etídeo (1 mg/ml) preparada em tampão TAE 1X (Tris Base 0,04 M, ácido acético glacial 1 M, EDTA 50 mM), durante 15 a 20 minutos. Os resultados foram observados com o auxílio de transiluminador UV e interpretados usando a folha de trabalho fornecida com as placas ou com auxílio do *software* para análise de alelos HLA disponibilizado pela One Lambda, Inc. (Canoga Park, CA, EUA).

Alguns dos fragmentos amplificados foram purificados e submetidos a sequenciamento bidirecional na plataforma ABI PRISM 3500 GENETIC ANALYZER (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), fazendo uso do kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e dos *primers* utilizados na amplificação. Antes da sua utilização na reação de sequenciamento, o produto de PCR foi convenientemente purificado por centrifugação em colunas de Sephadex G-50 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia) para remoção do excesso de *primers* e nucleotídeos. Estes fragmentos foram obtidos através da utilização de didesoxirrinucleotídeos marcados com fluorescência (uma marcação diferente para cada um dos quatro nucleotídeos do DNA), os quais terminam a polimerização da nova cadeia sempre que são incluídos. Após remoção do excesso de didesoxirribonucleotídeos marcados, a utilização do sequenciador automático para a separação dos fragmentos e a identificação do nucleotídeo inserido no fim de cada um deles permitiu a obtenção da sequência nucleotídica do fragmento analisado. As seqüências obtidas foram analisadas com o programa Matchtools Allele Identification (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de forma a identificar os alelos presentes.

Os dados de sequenciamento foram utilizados para alinhamento com as seqüências de referência disponíveis no banco de dados do NCBI (National Center of Biotechnology Information, EUA).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências relativas dos alelos dos pacientes e controles pareados por sexo e idade, foram obtidas por meio de planilha *Excell*. As análises de OR (*odds ratio*), valor de p (“p-value”) e RR (risco relativo) foram realizados, com auxílio do software CDC - Epi Info™ Stat Calc 38 (obtido gratuitamente de <http://wwwn.cdc.gov/epiinfo/>). Este *software* é distribuído por CDC (Centers for Disease Control and Prevention), Estados Unidos da América. Os resultados encontrados para os alelos HLA-Classe II foram considerados estatisticamente significativos somente após a correção de Bonferroni pelo número total de alelos. Este último cálculo foi executado com o auxílio da calculadora disponível no *website* SISA (*Simple Interactive Statistical Analysis*), disponível em <http://www.quantitativeskills.com/sisa/>. Os achados que indicaram possível tendência de relação com a susceptibilidade à doença foi p valor $<0,05$ após a correção de Bonferroni.

4.8 SUBMISSÃO DO ESTUDO

O presente estudo originou o artigo com o título “*Genetic association study of the HLA class II alleles DRB1, DQA1, and DQB1 in patients with pharmacoresistant temporal lobe epilepsy associated with mesial hippocampal sclerosis*” o qual foi aceito para publicação pela revista *European Journal of Epilepsy* em junho 2015 (APÊNDICE B).

5 RESULTADOS

Não foram evidenciadas associações significativas quando comparadas as frequências de regiões alélicas entre pacientes e controles nas regiões HLA-DRB1, HLA-DQB1 e HLA-DQA1 identificadas por sistema de baixa resolução (Tabelas 1, 2 e 3).

Tabela 1: Distribuição dos alelos na região HLA classe II DRB1 identificados por sistema baixa resolução

DRB1	Pacientes (N=42)	Fr%	Controles (N=89)	Fr%	P	RR	OR
DRB1*01	07	8,33	12	6,74	0,62	1,18	1,28
DRB1*03	07	8,33	15	8,42	0,97	0,99	0,99
DRB1*04	12	14,28	23	12,92	0,74	1,10	1,15
DRB1*07	02	2,38	02	1,12	0,43	1,59	2,17
DRB1*08	05	5,95	13	7,30	0,67	0,85	0,79
DRB1*09	0	0	02	1,12	0,32	IND	0
DRB1*10	0	0	01	0,56	0,49	IND	0
DRB1*11	07	5,95	17	10,11	0,73	0,89	0,85
DRB1*12	09	10,71	10	5,61	0,12	1,61	2,15
DRB1*13	12	13,09	16	8,98	0,16	1,47	1,83
DRB1*14	05	5,95	22	12,35	0,09	0,52	0,41
DRB1*15	12	14,28	23	12,92	0,74	1,10	1,15
DRB1*16	09	10,71	21	11,79	0,78	0,92	0,88
TOTAL	87		177				

Legenda: RR = risco relativo, OD = Odds ratio, IND = indefenido.

Tabela 2: Distribuição dos alelos na região HLA classe II DQB1 identificados por sistema baixa resolução

DQB1	Pacientes (N=42)	Fr%	Controles (N=89)	Fr%	P	RR	OR
DQB1*02	10	11,94	25	14,04	0,60	0,86	0,80
DQB1*03	17	20,23	29	16,29	0,37	1,26	1,41
DQB1*04	16	19,04	26	14,60	0,30	1,30	1,49
DQB1*05	18	21,42	38	21,34	0,98	1,0	1,01
DQB1*06	23	27,38	60	33,70	0,16	0,70	0,59
TOTAL	84		178				

Legenda: RR = risco relativo, OD = Odds ratio.

Tabela 3: Distribuição dos alelos na região HLA classe II DQA1 identificados por sistema baixa resolução

DQA1	Pacientes (N=42)	Fr%	Controles (N=89)	Fr%	P	RR	OR
DQA1*01	32	40,47	53	29,77	0,06	1,73	2,17
DQA1*02	11	14,28	17	9,55	0,35	1,31	1,50
DQA1*03	08	9,52	24	13,48	0,32	0,73	0,64
DQA1*04	07	9,52	23	12,92	0,24	0,67	0,57
DQA1*05	22	26,19	61	34,26	0,07	0,64	0,50
TOTAL	80		178				

Legenda: RR = risco relativo, OD = Odds ratio.

Na análise por alta resolução, o alelo HLA-DRB1*1302 foi o único que mostrou associação significativa sugerindo susceptibilidade genética ($p = 0,01$) quando comparada a sua frequência nos pacientes em relação aos controles. Esse valor depois de submetido à correção de Bonferroni perdeu a significância ($p = 0,44$). O valor do risco relativo (RR) do respectivo alelo foi de 0,29. O alelo mais frequente na tipagem por alta resolução foi o DRB1*1503. Contudo, todos os outros alelos HLA-DRB1, inclusive o *1503, não mostraram diferença significativa entre os pacientes e os controles (Tabela 4).

Tabela 4: Distribuição de alelos HLA-DRB1 identificados por sistema alta resolução

DRB1	Pacientes (N=42)	Fr%	Controles (N=89)	Fr%	P	B	RR	OR
*01:01	2	2,32	3	1,68	0,69		0,88	0,7
*01:02	1	1,19	3	1,68	0,75		1,11	1,43
*01:03	4	4,76	6	3,37	0,57		0,87	0,69
*03:01	5	5,95	6	3,37	0,32		0,79	0,53
*03:05	2	2,32	6	3,37	0,65		1,11	1,45
*03:08	0	0	3	1,68	0,22		1,49	IND
*04:02	2	2,32	6	3,36	0,65		1,11	1,45
*04:03	1	1,19	2	1,12	0,96		0,98	0,94
*04:06	0	0	1	0,56	0,49		1,48	IND
*04:07	1	1,19	0	0	0,14		IND	0
*04:08	2	2,32	4	2,24	0,94		0,98	0,94
*04:09	1	1,19	1	0,56	0,58		0,73	0,47
*04:10	1	1,19	3	1,68	0,75		1,11	1,43
*04:11	4	4,76	6	3,37	0,57		0,87	0,69
*07:01	2	2,32	2	1,12	0,43		0,73	0,46
*08:01	2	2,32	3	1,68	0,69		0,88	0,7
*08:03	3	3,57	6	3,37	0,93		0,98	0,94
*08:04	0	0	2	1,12	0,32		1,48	IND
*08:07	0	0	2	1,12	0,32		1,48	IND
*09:01	0	0	2	1,12	0,32		1,48	IND
*10:01	0	0	1	0,56	0,49		1,48	IND
*11	2	2,32	6	2,32	0,65		1,11	1,45

Legenda: B = Bonferroni, RR = risco relativo, OD = Odds ratio, IND = indefinido.

DRB1	Pacientes (N=42)	Fr%	Controles (N=89)	Fr%	P	B	RR	OR
*11:01	3	4,76	5	2,80	0,73		0,92	0,77
*11:02	1	1,19	3	1,68	0,75		1,11	1,43
*11:03	1	1,19	3	1,68	0,75		1,11	1,43
*12:01	5	5,95	9	5,05	0,75		0,94	0,83
*12:02	4	4,76	1	0,56	0,96		0,98	0,94
*13	1	1,19	0	1,19	0,14		IND	0
*13:01	3	3,57	4	2,24	0,52		0,83	0,61
*13:02	4	4,76	1	0,56	0,01	0,44	0,29	0,11
*13:03	3	3,57	5	2,80	0,73		0,92	0,77
*13:04	0	0	1	0,56	0,49		1,48	IND
*13:06	1	1,19	3	1,65	0,75		1,11	1,43
*13:09	0	0	2	1,12	0,32		1,48	IND
*14:01	0	0	3	1,65	0,22		1,49	IND
*14:02	2	2,32	3	1,65	0,69		0,88	0,7
*14:05	1	1,19	9	5,05	0,11		1,36	4,61
*14:06	2	2,32	7	3,93	0,51		1,16	1,71
*15:01	2	2,32	9	5,05	0,3		1,23	2,25
*15:02	3	3,57	5	2,80	0,73		0,92	0,77
*15:03	7	8,33	9	5,05	0,28		0,81	0,56
*16:01	2	2,32	7	3,93	0,51		1,16	1,71
*16:02	3	3,57	8	4,49	0,72		1,08	1,28
*16:03	4	4,76	6	3,37	0,57		0,87	0,69
TOTAL	87		177					

Legenda: B = Bonferroni, RR = risco relativo, OD = Odds ratio, IND = indefinido.

Em relação à região DQB1 e a investigação alélica por alta resolução, o HLA-DQB1*0401 foi o mais frequente apresentando-se em 10 pacientes e 15 controles. Contudo o mesmo, assim como os demais alelos HLA-DQB1, não apresentou diferença significativa quando comparados os pacientes em relação aos controles (Tabela 5).

Tabela 5: Distribuição de alelos HLA-DQB1 identificados por sistema de alta resolução

DQBI	PACIENTES (N=42)	Fr%	CONTROLE (N=89)	Fr%	P	RR	OR
*02:01	8	9,52	19	10,67	0,76	1,05	1,15
*02:03	2	2,38	6	3,37	0,65	1,11	1,45
*03:01	4	4,76	6	3,37	0,57	0,87	0,69
*03:02	3	3,57	5	0,57	0,73	0,92	0,77
*03:03	3	4,57	5	0,73	0,73	0,92	0,77
*03:04	5	5,95	8	0,73	0,6	0,9	0,73
*03:05	0	0	2	0,6	0,32	1,48	IND
*03:07	2	2,38	3	0,32	0,69	0,88	0,7
*04:01	10	11,90	15	8,42	0,34	0,86	0,65
*04:02	6	7,14	11	6,17	0,75	0,95	0,85
*05:01	8	9,52	14	7,86	0,63	0,92	0,79
*05:02	2	2,38	5	2,80	0,83	1,05	1,19
*05:03	6	7,14	9	5,05	0,48	0,87	0,68
*05:04	2	2,38	10	10,11	1,44	1,26	2,53
*06:01	2	2,38	3	1,68	0,69	0,88	0,7

Legenda: RR = risco relativo, OD = odds ratio, IND = indefinido.

DQBI	Pacientes (N=42)	Fr%	Controle (N=89)	Fr%	P	RR	OR
*06:02	8	9,52	14	7,86	0,63	0,92	0,79
*06:03	5	5,95	9	5,05	0,75	0,94	0,83
*06:04	0	0	2	1,12	0,32	1,48	IND
*06:05	3	4,57	8	4,49	0,72	1,08	1,28
*06:06	0	0	3	1,68	0,22	1,49	IND
*06:07	0	0	3	1,68	0,22	1,49	IND
*06:08	2	2,38	9	5,05	0,3	1,23	2,25
*06:11	3	4,57	9	5,05	0,58	1,12	1,46
Total	84		178				

Legenda: RR = risco relativo, OD = odds ratio, IND = indefinido.

O alelo HLA-DQA1*0501 foi o mais frequente em pacientes e controles com a técnica de alta resolução, mas também não mostrou diferença significativa entre pacientes e controles, assim como todos os outros alelos DQA1 (Tabela 6).

Tabela 6: Distribuição de alelos HLA-DQA1 identificados por sistema de alta resolução

DQA1	Pacientes (N=42)	Fr%	Controle (N=89)	Fr%	P	RR	OR
*01:01	8	11,90	18	10,11	0,87	1,02	1,08
*01:02	8	9,52	13	7,30	0,51	0,9	0,73
*01:03	9	10,71	14	7,86	0,42	0,88	0,68
*01:04	7	8,33	8	4,49	0,19	0,76	0,49
*02:01	11	14,28	17	9,55	0,35	0,87	0,67
*03:01	8	9,58	24	13,48	0,32	1,14	1,57
*04:01	7	9,58	23	12,92	0,24	1,17	1,74
*05:01	16	19,04	42	23,59	0,32	1,12	1,45
*05:02	6	7,14	19	10,67	0,33	1,15	1,63
Total	80		178				

Legenda: RR = risco relativo, OD = odds ratio, IND = indefinido.

6 DISCUSSÃO

Estudos sobre mecanismos inflamatórios e suas relações com doenças do SNC têm grande importância nas pesquisas da última década (XU; MILLER; KOH, 2013). Estudos experimentais e clínicos atribuem a participação de mecanismos neuroinflamatórios um constituinte comum e crucial na epileptogênese e no desenvolvimento das crises epiléticas refratárias ao tratamento (ALBRECHT et al., 2007; VEZZANI, 2005; VEZZANI, 2011; VEZZANI; BALOSSO; RAVIZZA, 2008; VEZZANI; GRANATA, 2005; XU; MILLER; KOH, 2013). Ravizza e colaboradores (2008a) mostraram em hipocampus extraídos cirurgicamente de pacientes com ELT-EH expressão positiva maior de HLA-DR e infiltrado de macrófagos nas células microgliais e aumento da expressão de IL1 beta nas células astrocíticas.

Nosso grupo mostrou diminuição dos níveis de TNF- α , IL-1 β e MIP-1 α /CCL3, importantes citocinas pró-inflamatórias e dos níveis de metaloproteinases, importantes indutores inflamatórios, em pacientes portadores de ELT-EH submetidos a procedimento cirúrgico para controle das crises, confirmando em humanos a participação destes na perpetuação das crises na ELT-EH (QUIRICO-SANTOS et al., 2013a;b).

Em outro estudo recente em hipocampus ressecados cirurgicamente de portadores de ELT, a fim de se observar se a ativação de astrócitos resulta em ativação de cascata inflamatória, foi examinada a expressão de COX-2, NF κ B e TGF β , através do método de Western Blot, demonstrando um aumento significativo dessas citocinas, sugerindo que fenômenos inflamatórios e produção de citocinas possam desempenhar um papel na patologia da ELT, mas não indica se está é uma alteração de proteção ou de agressão (DEVINSKY et al., 2013).

Considerando que alguns alelos HLA classe II estão associados à susceptibilidade de doenças inflamatórias caracterizadas por maior expressão de citocinas do tipo fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e interleucina 1 beta (IL-1 beta), como ocorre na ELT-EH (VEZZANI; BARAM, 2007), hipotetizamos que os alelos HLA-DRB1, HLA-DQB1 e HLA-DQA1 poderiam estar participando da resposta inflamatória a diferentes antígenos durante os primeiros anos de vida em indivíduos susceptíveis, que poderiam levar a esclerose hipocampal e consequente epilepsia refratária.

Este estudo investigou a associação entre a frequência dos alelos HLA-DRB1, HLA-DQB1 e HLA-DQA1 em uma coorte de pacientes com ELT-EH e grupo controle pareado de indivíduos saudáveis.

No presente estudo, o alelo DRB1*1302 ($p=0,01$) foi significativamente associado à susceptibilidade para ELT-EH, mas essa associação não se manteve após a correção de Bonferroni. Até o presente momento, ainda não existe nenhum trabalho que demonstre qualquer tipo de associação desse alelo com ELT-EH, seja como fator protetor ou de susceptibilidade para a doença. Foi demonstrado que na epilepsia mioclônica juvenil (EMJ) não há evidências de que a susceptibilidade estaria associada à HLA-DR13, onde nenhum dos alelos investigados ou haplótipos (DRB1*13:01-DQB1*06:03 ou DRB1*13:02-DQB1*06:04) mostrou diferença significativa entre pacientes e controles querem fossem para susceptibilidade ou para proteção (LE HELLARD et al., 1999). Podemos considerar ainda que na EMJ não encontramos a história natural de IIP e progressão, observada na maioria dos casos de ELT-EH, altamente sugestivos de reorganização tecidual e neuroplasticidade orquestrada por fenômenos locais. Atribuímos ainda nossos achados e a perda de significância estatística aqui encontrada no alelo HLA DRB1*13:02 ao número baixo de pacientes incluídos e ao fato de que analisamos amostras de sangue periférico. Acreditamos que a susceptibilidade para ELT-EH tem, no alelo HLA DRB1*13:02 um provável candidato no reconhecimento de autoantígenos que podem interferir na evolução e na morbidade de pacientes. Essa hipótese de reconhecimento de autoantígenos em outras doenças etnia-dependente é corroborada por Oh e colaboradores (2004), que demonstraram que em crianças coreanas com esclerose múltipla, o alelo HLADRB1*1302 é mais frequente em comparação com crianças ocidentais.

Dentro do contexto de que hipocampus de pacientes com ELT-EH submetidos à cirurgia apresentam aumento positivo na expressão de DR e macrófagos nas células microgliais e IL1 beta nas células astrocitárias, acreditamos que fatores transcripcionais e a baixa amostra estudada são os responsáveis pela perda de significância. Assim, a participação de alelos DR nos mecanismos inflamatórios das epilepsias parece encontrar evidência nos estudos histopatológicos (RAVIZZA et al., 2008a). É sabido que as epilepsias, de maneira geral, são resultado de condições multifatoriais e da interação de múltiplos genes. O mecanismo mediado por susceptibilidade envolvendo HLA classe I e evoluindo com reação

inflamatória por meio de imunidade inata justifica a maior presença de infiltrado de macrófagos no tecido estudado. Este fato poderia explicar não termos encontrado alelos Classe II na susceptibilidade para ELT-EH, onde, talvez, essa susceptibilidade estaria mais associada a alelos HLA classe I. Corroborando essa hipótese, estão os resultados encontrados por Nakahara e colaboradores (2010) mostrando aumento na expressão de linfócitos T CD4 e linfócitos T CD8 em hipocampos extraídos cirurgicamente de pacientes com ELT-EH. A quantidade variou de acordo com cada paciente e houve uma maior expressão significativa de linfócitos T CD8 em relação aos linfócitos T CD4 nesses hipocampos. Essa maior expressão de linfócitos T CD8 parece apoiar e justificar os resultados que não encontramos.

A indução experimental de crises epilépticas em roedores levou ao aumento da expressão de moléculas de MHC classe I, que corresponde ao HLA classe I dos humanos em animais, em áreas do cérebro dentro de horas após a estimulação. Ao mesmo tempo, processos regenerativos são acionados, e estes também parecem envolver moléculas de MHC classe I (XANTHOS; SANDKÜHLER, 2014).

Nossos resultados contrariam aqueles encontrados por Ozkara e colaboradores (2002), onde os autores analisaram a participação de HLA Classe II na ELT-EH. No referido estudo, os autores encontraram uma frequência maior de HLA-DR4, HLA-DR7 e HLA-DQ2 nos pacientes com ELT-EH em comparação com os controles, sugerindo que esses possam estar envolvidos na susceptibilidade da ELT-EH. Contudo, esse artigo analisou somente os haplótipos de algumas regiões (DR4, DR7 e DQ2) e não dos alelos separados em alta resolução. Os autores concluíram que esses haplótipos parecem oferecer fator de risco, mas não essenciais para a expressão da doença. Entretanto, em nosso estudo, além dos haplótipos, os alelos das regiões HLA-DRB1, HLA-DQB1 e HLA-DQA1 foram avaliados separadamente e não encontramos aumento da expressão desses nos pacientes com ELT-EH em relação ao grupo de controles, com exceção da tendência de fator de susceptibilidade do HLA DRB1*1302. Alguns dos alelos dessas regiões estudados por Ozkara e colaboradores (2002), como DQB1*02:02 que participa da região (DQ2), DRB1*04:011, *04:012, *04:04, *04:051, *04:052, *04:12, *04:13, *04:14, *04:15, *04:16, *04:17, *04:18, *04:19, *04:20, *04:21, *04:22, *04:23, *04:24, *04:25, *04:26, *04:27 que formam a região (DR4) e DRB1*07:02 que forma a região (DR7) não foram encontrados nem nos pacientes com ELT-EH e nem nos controles do nosso estudo. Comparando com os nossos resultados de regiões

alélicas antes da análise por alta resolução, ainda assim, nossos resultados foram negativos para qualquer tipo de associação.

Considerando a participação da imunidade inata nas epilepsias, encontramos vários estudos mostrando susceptibilidade genética para reações de hipersensibilidade a fármacos antiepiléticos, especialmente à carbamazepina, associada a alelos HLA Classe I como HLA-B*15:02 e HLA-A*33:01 (BLOCH et.al., 2014; BORRONI, 2014; THORSTENSEN et al., 2014). Vale dizer, em função desses dados encontrados na literatura, que os pacientes incluídos neste estudo haviam usado ou estavam em uso de carbamazepina e vários outros FAE, mas nenhum deles apresentou história de eventos adversos.

Apesar de o sistema HLA classe II ser dotado de um notável polimorfismo e estar relacionado com susceptibilidade de diversas doenças, nossos achados, sugerem que talvez, grupos étnicos e fatores ambientais diversos, podem estar influenciando a associação ou não entre HLA classe II e ELT-EH. Em nosso estudo, devido a grande miscigenação da população brasileira, todos os pacientes quanto os controles foram oriundos da mesma região demográfica e apresentavam o mesmo estrato social.

7 CONCLUSÃO

A susceptibilidade genética para ELT-EH não é conferida por alelos HLA classe II das regiões DRB1, DQB1 e DQA1 numa subpopulação brasileira.

O alelo HLA DRB1*13:02 apresentou certa tendência como fator de susceptibilidade para ELT-EH.

8 PERSPECTIVAS E LIMITES DESTE ESTUDO

O número pequeno de pacientes incluídos pode ter sido um fator limitante. Mas a característica inédita de estudos de alta resolução para susceptibilidade genética em genes que são forte mediadores da resposta inflamatória pode contribuir para as novas pesquisas de caráter genético, que visem elucidar o intrincado mecanismo da ELT-EH.

REFERÊNCIAS

ABOTT, N.J. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurol.*, [S.l.], v. 7, p. 41-53, 2006.

ALBRECHT, O.; JUSTYNA, M.; STEINBORN, B.; ZAROWSKI, M. Cytokines, epilepsy and antiepileptic drugs - is there a mutual influence. *Pharmacological Reports*, [S.l.], v. 59, p. 129-38, 2007.

ALVES, C.; VIGA, S.; SOUZA, T.; TORALLES, M.B. Aspectos imunogenéticos de doenças neuropediátricas: o papel dos antígenos de histocompatibilidade humana. *Revista Neurociências*, [S.l.], v. 5, n. 1, p. 77-83, 2007.

ALVES, C.; SOUZA, T.; VEIGA, S.; ALVES, C.; TORALLES, M.B.; LEMAIRE, D. Importância do sistema de histocompatibilidade humana (HLA) em pediatria. *Pediatria*, [S.l.], v. 27, n. 4, p. 274-86, 2005.

ALVES-LEON, S.V.; PINTO, M.P.; ANDRAUS, M.E.C.; PEREIRA, V.C.S.R.; MEIRA, I.D.; OLIVEIRA, R.C.; VILLAS BOAS, S.; REGO, C.C.S.; SOUZA, J.P.B.M.; PEDORSA, R.C. Syncope in patients with drug resistant epilepsy without apparent cardiovascular disease. *Arq Neuropsiquiatr.*, São Paulo, v. 71, n. 12, p. 925-30, 2013.

AMERICAN ELECTROENCEPHALOGRAPHIC SOCIETY. Guideline twelve: guidelines for long-term monitoring for epilepsy. *J Clin Neurophysiol.*, [S.l.], v. 11, n. 1, p. 88-110, 1994.

AMIEL, J.L. Study of the leukocyte phenotypes in Hodgkin's disease In: CURTONI, E.S.; MATTIUZ, P.L.; TOSI, R.M. (eds). *Histocompatibility testing*. Munksgaard. Copenhagen 1967. p. 78-81.

ANDRAUS, M.E.C.; COSENZA, C.A.N.; FONSECA, L.M.B.; ANDRAUS, C.F.; D'ANDREA, I.; ALVES-LEON, S.V. SPECT cerebral interictal em pacientes com epilepsia do lobo temporal de difícil controle. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, v. 60, n. 3-B, p. 779-87, 2002a.

ANDRAUS, M.E.C.; LEON, S.V.A.; SARDINHA, V.O.; SIQUEIRA, C.A.; NASCIMENTO, A.M.N.L.; NUNES, R.G. Clinical and electroencephalographic correlation through video-EEG of patients with medically refractory temporal lobe epilepsy (abstract). *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, v. 60, n. Supl 1, p. 433, 2002b.

ARONICA, E.; GOTER, J.A.; RAMKEMA, M.; REDEKER, S.; GERÇERER-OZBAS, F.; VLIET, E.; SCHEFFER, G.L.; SCHEPER, R.J.; BAAYEN, J.C.; TROOST, D. Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, [S.l.], v. 45, n. 5, p. 441-51, 2004.

AVANZINI, G. Animal models relevant to human epilepsies. *Ital J Neurol Sci*, [S.l.], v. 16, n. 1-2, p. 5-8, 1995.

BAUER, S.; CEPOK, S.; RUDOLPH-TODOROVA, A.; NOWAK, M.; KOLLER, M.; LORENZ, R.; ROSENOW, F.; HEMMER, B.; HAMER, H.M. Etiology and site of temporal lobe epilepsy influence postictal cytokine release. *Epilepsy Research*, [S.l.], v. 86, p. 82-88, 2009.

BERG, A.T.; BERKOVIC, S.F.; BRODIE, M.J.; BUCHHALTER, J.; CROSS, J.H.; VAN EM DE BOAS, W.; ENGEL, J.; FRENCH, J.; GLAUSER, T.A.; et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, [S.l.], 2010.

BINNIE, C.D.; MIZRAHI, E.M. The epilepsy monitoring unit. In: ENGEL J Jr, PEDLEY TA (eds.). *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1998. p. 1011-9.

BLAIR, R.D.G. Temporal lobe epilepsy semiology. *Epilepsy Research and Treatment* 2012.

BLOCH, K.M.; SILLS, G.J.; Pirmohamed, M.; Alfirevic, A. Pharmacogenetics of antiepileptic drug induced hypersensitivity. *Pharmacogenics*, [S.l.], v. 15, n. 6, p. 857-68, 2014.

BLUMCKE, I.; THOM, M.; ARONICA, E.; ARMSTRONG, D.D.; BARTOLOMEI, F.; BERNASCONI, A.; BIEN, C.G.; CENDES, F.; CORAS, R.; CROSS, H.; et al. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: A Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia*, [S.l.], v. 54, n. 7, p. 1315-29, 2013.

BORGES, M.A.; MIN, L.L.; GUERREIRO, C.A.; YACUBIAN, E.M.T.; CORDEIRO, J.A.; TOGNOLA, W.A.; BORGES, A.P.; ZANETTA, D.M. Urban prevalence of epilepsy: populational study in São Jose Rio Preto, a medium-sized city in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.*, [S.l.], v. 62, p. 199-200, 2004.

BORRONI, R.G. Pharmacogenetics markers of severe cutaneous drug reactions. *G. Ital. Dermatol. Venereol.*, [S.I.], v. 149, n. 2, p. 219-26, 2014.

BROWNE, T.R.; HOLMES, G.L. *Handbook of epilepsy*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1997. 262 p.

BUSTAMANTE, V.C.T.; SAKAMOTO, A.C. Epilepsias do lobo temporal: características clínicas e semiologia crítica ao vídeo-EEG. In: Yacubian EMT, Garzon E, Sakamoto AC (eds.). *Vídeo-eletrencefalografia: fundamentos e aplicação na investigação das epilepsias*. São Paulo: Lemos Editorial; 1999. p 73-81.

CENDES, F.; KOBAYASHI, E. Epilepsia de lobo temporal. In: Guerreiro CAM, Guerreiro MM, Cendes F, Lopes-Cendes I (eds.). *Epilepsia*. São Paulo: Lemos Editorial; 2000. p. 201-13.

CENDES, F.; SAKAMOTO, A.C.; SPREAFICO, R.; BINGAMAN, W.; BECKER, A.J. Epilepsies associated with hippocampal sclerosis. *Acta Neuropathologica*, [S.I.], 2014.

CHANG, B.S.; LOWEISTEIN, D.H. Mechanisms of Disease Epilepsy. *The New England Journal of Medicine*, [S.I.], v. 349, p. 1257-66, 2003.

CHATZIKONSTANTINOOU, A. Epilepsy and hippocampus. The Hippocampus in Clinical. *Neuroscience*, [S.I.], v. 34, p. 121-42, 2014.

CHIANG, S.; HANEEF, Z. Graph Theory findings in the pathophysiology of temporal lobe epilepsy. *Clinical Neurophysiology*, [S.I.], v. 14, p. 192-8, 2014.

COSENZA-ANDRAUS, M.E.; NUNES-COSENZA, C.A.; GOMES-NUNES, R.; FANTEZIA-ANDRAUS, C.; ALVES-LEON, S.V. Monitorización prolongada por videoelectroencefalografia de pacientes com diagnóstico ambulatorio de epilepsia del lóbulo temporal de difícil control: aplicación del modelo de lógica fuzzy. *Rev. Neurol.*, [S.I.], v. 42, p. 1-8, 2006.

COSENZA, C.A.N.; ANDRAUS, M.E.C.; ANDRAUS, C.F.; ALVES-LEON, S.V. Fuzzy Method for evaluation of SPECT interictal in patients with difficult control epilepsy. In: Mondaini R (ed.). *Proceedings of the Second Brazilian Symposium on Mathematical and Computational Biology*. Rio de Janeiro: E-Papers, 2003. p. 357-66.

ILAE - International League Against Epilepsy. Proposal for classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*, [S.l.], v. 26, n. Suppl 3, p. 268-78, 1985.

ILAE - International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*, [S.l.], v. 30, p. 389-99, 1989.

CREPEL, A.; COUBES, P.; BOCKAERT, M.C.; BALDY-MOULINIER, M.; NATOLI-LERNER, M. Inflammatory reactions in human medial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Brain Research*, [S.l.], v. 952, p. 159-69, 2002.

CRUVINEL W.M., JUNIOR D.M., ARAUJO J.A.P., CATELAN T.T.T., SILVA A.W.S., SILVA N.P., ANDRADE L.E.C. Immune system fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanism of inflammatory response. *Bras. J. Reumatol.*, [S.l.], v. 50, n. 4, p. 448-61, 2010.

CÚRIA, L.; LUCCHI, C.; VINET, J.; GUALTIERI, F.; MARINELLI, C.; TORSELLO, A.; COSTANTINO, G.; BIAGINI, G. Pathophysiology of mesial temporal lobe epilepsy: is prevention of damage antiepileptogenic? *Curr. Med. Chem.*, [S.l.], v. 21, n. 6, p. 663-88, 2014.

DANTAS, F.G. Aspectos clínicos diferenciais entre crises epilépticas temporais hipocámpais e neocorticais. *BJECN*, [S.l.], v. 7, n. 3, p. 155-8, 2001.

DANTAS, F.G.; YACUBIAN, E.M.T. Auras na epilepsia do lobo temporal. *BJECN*, [S.l.], v. 7, n. 1, p. 13-7, 2001a.

DANTAS, F.G.; YACUBIAN, E.M.T. Automatismos e fenômenos motores nas crises epilépticas do lobo temporal: valor localizatório e lateralizatório. *BJECN*, [S.l.], v. 7, n. 2, p. 81-3, 2001b.

DANTAS, F.G.; YACUBIAN, E.M.T.; JORGE, C.L.; PEDREIRA, C.C.; BUENO, J.F.; VALÉRIO, R.M. Clinical and EEG analysis of mesial and lateral temporal lobe seizures. *Arq Neuropsiquiatr.*, São Paulo, v. 56, p. 341-9, 1998.

DEVINSKY, O.; VEZZANI, A.; NAJJAR, S.; LANEROLLE, N.; ROGAWSKI, M.A. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci*, [S.l.], v. 36, n. 3, p. 174-84, 2013.

DONADI, E.A. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre os antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. *Medicina*, v. 33, p. 7-18, 2000.

DREIFUSS, F.E. Classification of epileptic seizures. In: Engel J Jr, Pedley TA (eds.). *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1998. p. 517-24.

DUNDAR, O.N.; AKTEKIN, B.; EKINCI N, C.; SAHINTURK, D.; YAVUZER, U.; YEGIN, O.; HASPOLAT, S. Interleukin 1 β secretion in hippocampal sclerosis patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Neurol Int.*, [S.l.], v. 5, n. 17, 2013.

ENGEL, J. Jr. A greater role for surgical treatment of epilepsy: why and when? *Epilepsy Currents*, [S.l.], v. 3, n. 2, p. 37-40, 2003.

ENGEL, J. Jr. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE task force on classification and terminology. *Epilepsia*, [S.l.], v. 42, n. 6, p. 1-8, 2001.

ENGEL, J. Jr. Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*, [S.l.], v. 26, n. 1, p. 141-50, 1996.

ENGEL, J. Jr, PEDLEY, T.A. Introduction: what is epilepsy? In: ENGEL, J. Jr.; PEDLEY, T.A. (eds.). *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1998. p 1-7.

ENGEL, J. Jr.; WILLIAMSON, P.D.; WIESER, H.G. Mesial temporal lobe epilepsy. In: ENGEL J. Jr.; PEDLEY, T.A. (eds.). *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1998. p. 2417-26.

FABENE P.F., MORA G.N., MARTINELLO M., ROSSI B., MERIGO F., OTTOBONI L., BACH S., ANGIARI S., BENATI D., CHAKIR A., ZANETTI L.; et al. A role for leukocyte endothelial adhesion mechanisms in epilepsy. *Nat. Med.*, [S.l.], v. 14, n. 12, p. 1377-1383, 2008.

FISHER, R.S.; ACEVEDO, C.; ARZIMANOGLU, A.; BOGACZ, A.; CROSS, H.; ELGER, C.E.; ENGEL, JR. J.; FORSGREN, L.; FRENCH, J.A.; et al. A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, [S.l.], v. 55, n. 4, p. 475-82, 2014.

FISHER R.S.; BOAS, W.E.; BLUME, W.; ELGER, C.; GENTON, P.; LEE, P.; ENGEL, J. Epileptic Seizures and Epilepsy. Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, [S.l.], v. 46, n. 4, 2005.

FOLDVARY, N.; BINGAMAN, W.E.; WYLLIE, E. Surgical treatment of epilepsy. *Neurol Clin*, [S.l.], v. 19, n. 2, p. 491-515, 2001.

GALVIN, P.W.; JANSON, S.; SIDHU, M.K.; SYMMS, M.R.; THOMPSON, T.J.; DUNCAN, J.S. Structural correlates of impaired working memory in hippocampal sclerosis. *Epilepsia*, [S.l.], v. 54, n. 7, p. 1143-53, 2013.

GARGANIS, K.; PAPADIMITRIOU, C.; GYMNPOULOS, K.; MILONAS, J. Pharyngeal dysesthesias as an aura in temporal lobe epilepsy associated with amygdalar pathology. *Epilepsia*, [S.l.], v. 42, n. 4, p. 565-71, 2001.

GARZON, E. Epilepsias generalizadas secundárias: características clínicas e semiologia crítica ao vídeo-EEG. In: YACUBIAN, E.M.T.; GARZON, E.; SAKAMOTO, A.C. (eds.). Vídeoeletrencefalografia: fundamentos e aplicação na investigação das epilepsias. São Paulo: Lemos Editorial, 1999a. p. 173-81.

GARZON, E. Vídeoeletrencefalografia em pacientes com esclerose tuberosa (lesões múltiplas). Definição de zona epileptogênica. In: YACUBIAN, E.M.T.; GARZON, E.; SAKAMOTO, A.C. (eds.). Vídeoeletrencefalografia: fundamentos e aplicação na investigação das epilepsias. São Paulo: Lemos Editorial; 1999b. p 183-97.

GARZON, E. Vídeoeletrencefalografia, conceito e metodologia, eletrodos convencionais e eletrodos especiais, o sistema 10-20 e o uso racional do sistema 10-10, técnica e indicação. In: YACUBIAN, E.M.T.; GARZON, E.; SAKAMOTO, A.C. (eds.). Vídeoeletrencefalografia: fundamentos e aplicação na investigação das epilepsias. São Paulo: Lemos Editorial; 1999c. p 29-43.

GITAÍ, D.L.G. Genes e epilepsia I: Epilepsia e alterações genéticas. *Rev Assoc Med Bras*, v. 54, n. 3, p. 272-278, 2008.

GLOOR, P. Mesial temporal sclerosis: historical background and an overview from a modern perspective. In: LUDERS, H. *Epilepsy surgery*. New York: Raven SSess. p. 689-703, 1991.

GUERREIRO, C.A.M.; CENDES, F.; GUERREIRO, M.M. Monitorização eletrencefalográfica prolongada. In: GUERREIRO, C.A.M.; GUERREIRO, M.M.; CENDES, F.; LOPES-CENDES, I. (eds.). *Epilepsia*. São Paulo: Lemos Editorial; 2000. p. 105-11.

HO, S.S.; KUZNIECKY, R.I.; GILLIAM, F.; FAUGHT, E.; MORAWETZ, R. Temporal lobe developmental malformations and epilepsy: dual pathology and bilateral hippocampal abnormalities. *Neurology*, [S.l.], v. 50, p. 748-54, 1998.

JANEWAY, C.A.; TAVARES P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. *Imunobiologia*. 5ª ed. Artmed, São Paulo, 2002.

JARAMILLO, N.M.; GALINDO, I.F.; VAZQUEZ, A.O.; COOK, H.J.; LLERENA, A.; LOPEZ, M.L. Pharmacogenetic potential biomarkers for carbamazepine adverse drug reactions clinical response. *Drug Metabol Drug Interact*, [S.l.], v. 29, n. 2, p. 67-79, 2014.

JARDIM, A.P.; COSTA NEVES, R.S.; CABLOCO, L.O.; LANCELLOTTI, C.L.; MARINHO, M.M.; CENTENO, R.S.; CAVALHEIRO, E.A.; SCORZA, C.A.; YACUBIM, E.M. Temporal lobe epilepsy with mesial temporal sclerosis: hippocampal neuronal loss as a predictor of surgical outcome. *Arq. Neuropsiquiatr.*, São Paulo, v. 70, n. 5, p. 319-24, 2012.

JAVIDAN, M. Electroencephalography in mesial temporal lobe epilepsy: a review. *Epilepsy Research and Treatment*, [S.l.], v. 12, 2012.

KASPERAVICIUTE, D.; CATARINO, C.B.; SISODIVA, S.M. Epilepsy, hippocampal sclerosis and febrile seizures linked by common genetic variation around SCN1A. *Brain*, [S.l.], v. 136, p. 3140-50, 2013.

KWAN, P.; SANDER, J.W. The natural history of epilepsy: an epidemiological view. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, [S.l.], v. 75, p. 1376-81, 2004.

LAGE, J.S.; GARZON, E.; SAKAMOTO, A.C.; YACUBIAN, E.M.T. Avaliação de pacientes com epilepsias refratárias às drogas anti-epilépticas. *Rev. Neurociências*, [S.l.], v. 8, n. 2, p. 60-5, 2000.

LE HELLARD, S.; NEIDHART, E.; THOMAS, P.; FEINGOLD, J.; MALAFOSSE, A.; TAFTI, M. Lack of association between juvenile myoclonic epilepsy and HLA-DR13. *Epilepsia*, [S.l.], v. 40, n. 1, p. 117-9, 1999.

- LOSCHER, W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.*, [S.I.], v. 50, n. 1-2, p. 105-23, 2002.
- MACKAY, I.; ROSEN, S.F. The HLA System. *The New England Journal of Medicine*, [S.I.], v. 343, n. 10, p. 702-9, 2000.
- MALMGREN, K.; THOM, M. Hippocampal sclerosis origins and imaging. *Epilepsia*, [S.I.], v. 53, n. 4, p. 19-33, 2012.
- MARSH, S.G.E.; ALBERT, E.D.; BODMER, W.F.; BONTROP, R.E.; DUPONT, B.; ERLICH, H.A.; GERAGHTY, D.E.; HANSEN, J.A.; MACH, B.; MAYR, W.R.; et al. Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens*, [S.I.], v. 65, p. 301-9, 2005.
- MEMARIAN, N.; THOMPSON, M.P.; ENGEL, J. Jr.; STABA, R. Quantitative analysis of structural neuroimaging of mesial temporal lobe epilepsy. *Imaging Med*, [S.I.], v. 5, n. 3, 2013.
- MERRITT. *Tratado de Neurologia*. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- MIGUÉNS-BLANCO, I.; RODRIGUEZ-ACEVEDO, B. Epilepsia del lóbulo temporal: déjà vu en atención primaria. *Semergen*, [S.I.], v. 39, n. 7, p. 57-59, 2013.
- MOELLER, J.J.; RAHEY, S.R.; SADLER, R.M. Lamotrigine-valproic acid combination therapy for medically refractory epilepsy. *Epilepsia*, [S.I.], v. 50, n. 3, p. 475-9, 2009.
- MUMENTHALER, M.; MATTLE, H. *Neurologia*. 4th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- NAKAHARA, H.; KONISHI, Y.; BEACH, T.G.; YAMADA, N.; MAKINO, S.; TOOYAMA, I. Infiltration of T lymphocytes and expression of ICAM-1 in the hippocampus of patients with hippocampal sclerosis. *Acta Histochem Cytochem*, [S.I.], v. 43, n. 6, p. 157-62, 2010.
- NAM, H.; LEE, S.K.; HONG, K.S.; CHANG, K.H.; LEE, D.S. Incidence and clinical profile of extra-medial temporal epilepsy with hippocampal atrophy. *J Korean Med Sci*, [S.I.], v. 16, n. 1, p. 95-102, 2001.

NAPOLITANO, E.; BRAVO, M.; FERRER, S.; TAPIA, E. Prolonged electroencephalographic and video monitoring an experience from a military Chilean hospital. *Rev Med Chil.*, [S.I.], v. 127, n. 4, p. 451-8, 1999.

OH, H.H.; KWON, S.H.; KIM, C.H.; CHOE, B.H.; KO, C.W.; JUNG, H.D.; SUH, J.S.; LEE, J.H. Molecular analysis of HLA class II associated susceptibility to neuroinflammatory diseases in Korean children. *J. Korean. Med. Sci.*, [S.I.], v. 19, p. 426-30, 2004.

OZKARA, C.; ALTINTAS, A.; YILMAZ, E.; ESKAZAN, E.; ERKOL, G.; OZYURT, E.; ERDOGAN, E.; KUDAY, C. An association between mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis and human leukocyte antigens. *Epilepsia*, [S.I.], v. 43, n. 3, p. 236-9, 2002.

PARRA, J.; AUGUSTJN, P.B.; GEERTS, Y.; VAN EMDE BOAS, W. Classification of epileptic seizures: a comparison of two systems. *Epilepsia*, [S.I.], v. 42, n. 4, p. 476-82, 2001.

PATTERSON, K.P.; BARAM, T.Z.; SHINNAR, S. Origins of temporal lobe epilepsy: febrile seizures and febrile status epilepticus. *Neurotherapeutics*, [S.I.], v. 11, n. 2, p. 242-50, 2014.

PORTO, L.C. Bone Marrow Transplantation, [S.I.], v. 45, p. 846-8, 2010.

QUIRICO-SANTOS, T.; D'ANDREA, I.M.; GOMES, A.C.; PEREIRA, V.C.; PINTO, M.; MONTEIRO, M.; SOUZA, J.M.; ALVES-LEON, S.V. Resection of the epileptogenic lesion abolishes seizures and reduces inflammatory cytokines of patients with temporal lobe epilepsy. *JNeuroimmunol.*, [S.I.], v. 254, p. 125-30, 2013a.

QUIRICO-SANTOS, T.; MELLO, A.N.; GOMES, A.C.; PONTES DE CARVALHO, L.; SOUZA, J.M.; ALVES-LEON, S.V. Increased metalloprotease activity in the epileptogenic lesion-lobectomy reduces metalloprotease activity and urokinase type uPAR circulating levels. *Brain Research*, 2013b.

RAVIZZA, T.; GAGLIARDI, B.; NOÉ, F.; BOER, K.; ARONICA, E.; VEZZANI, A. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease*, [S.I.], v. 29, p. 142-60, 2008a.

RAVIZZA, T.; NOÉ, F.; ZARDONI, D.; VAGHI, V.; SIFRINGER, M.; VEZZANI, A. Interleukin converting enzyme inhibition impairs kindling epileptogenesis in rats by blocking astrocytic IL - 1 β production. *Neurobiology of Disease*, [S.I.], v. 31, p. 327-33, 2008b.

ROBINSON, J.; WALLER, M.J.; PARHAM, P.; BODMER, J.G.; MARSCH, S.G.E. IMGT/HLA Database - a sequence database for the human major histocompatibility complex. *Nucleic Acid Research*, [S.I.], v. 29, n. 1, p. 210-3, 2001.

SENDROWISK, K.; SOBANIEC, W. Hippocampus and hippocampal sclerosis and epilepsy. *Pharmacological Reports*, [S.I.], v. 65, p. 555-65, 2013.

SCHLOSSTEIN, L.; TERASAKI, P.I.; PEARSON, C.M. High association of an HLA antigen B 27 with ankylosing spondylitis. *N. Engl. J. Med.*, [S.I.], p. 704-6, 1973.

SPENCER, S.S. Selection of candidates for temporal lobe epilepsy. In: WILLIE, E. (ed.). *The treatment of epilepsy*. 2 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997. p. 1036-48.

TAN, M. Epilepsy in adults. *Aust. Fam. Physician*, [S.I.], v. 43, n. 3, p. 100-104, 2014.

TÉLLEZ-ZENTENO, J.F.; HERNANDEZ-RONQUILLO, L. A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research and Treatment*, [S.I.], 2012.

THOM, M. Hippocampal sclerosis in epilepsy: A neuropathology review. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2014.

THORSBY, E.; LIE, B.A. HLA associated genetic predisposition to autoimmune diseases: genes involved and possible mechanisms. *Transplant Immunology*, [S.I.], v. 14, p. 175-82, 2005.

THORSTENSEN, K.; KVITLAND, M.; SHIRZADI, M.; HELDE, G.; MOEN, T.; BRODTKORB, E. Carbamazepine induced cutaneous reactions: A simple assay to identify patients carrying the HLA-A*31:01 allele. *Scand J. Clin. Lab. Invest*, [S.I.], 2014.

TORRES, M.A.; MORAES, M.E.H. Nomenclature for factors of the HLA system. *Einstein*, [S.I.], v. 9, n. 2 Pt 1, p. 249-51, 2011.

TOSI, R.; TANIGAKI, N.; CENTIS, D.; FERRARA, G.B.; PRESSMAN, D. Immunological dissection of human Ia molecules. *J. Exp. Med.*, [S.l.], v. 148, p. 1592-611, 1978.

TURNER, D. The human leucocyte antigen (HLA) system. *Vox Sanguinis*, [S.l.], v. 87, p. S87-90, 2004.

VALENÇA-ANDRADE, L.P.A.; VALENÇA, M.M.; VELASCO, T.R.; LEITE, J.P. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *J Epilepsy Clin Neurophysiol*, [S.l.], v. 12, n. 1, p. 31-36, 2006.

VELASCO, T.R.; BUSTAMANTE, V.C.T. Epilepsias dos lobos parietal e occipital. Características clínicas e semiologia crítica ao vídeo-EEG. In: YACUBIAN, E.M.T.; GARZON, E.; SAKAMOTO, A.C. (eds.). Vídeoeletrencefalografia: fundamentos e aplicação na investigação das epilepsias. São Paulo: Lemos Editorial, 1999. p. 97-104.

VEZZANI, A. Inflammation and epilepsy. *Epilepsy Currents*, [S.l.], v. 5, n. 1, p. 1-6, 2005a.

VEZZANI, A. The role of inflammation in epilepsy. *Nat. Rev Neurol.*, [S.l.], v. 7, p. 31-42, 2011.

VEZZANI, A.; BALOSSO, S.; RAVIZZA, T. The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. *Brain, Behavior, and Immunity*, [S.l.], v. 22, p. 797-803, 2008.

VEZZANI, A.; BARAM, T.Z. New roles for interleukin - 1 beta in the mechanism of epilepsy. *Epilepsy Currents*, [S.l.], v. 7, n. 2, p. 45-50, 2007.

VEZZANI, A.; GRANATA, T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia*, [S.l.], v. 46, n. 11, p. 1724-43, 2005.

VIEIRA, J.O. Jr. Tratamento cirúrgico da epilepsia do lobo temporal. In: Cukiert A (ed.). Tratamento clínico e cirúrgico das epilepsias de difícil controle. São Paulo: Lemos Editorial, 2002. p 269-92.

WALCZAK, T.; JAYAKAR, P. Interictal EEG. In: ENGEL, J. Jr.; PEDLEY, T.A. (eds.). *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1998. p. 831-48.

WIESER, H.G. ILAE Commission report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia*, [S.l.], v. 45, p. 695-714, 2004.

WIRRELL, E.; FARRELL, K.; WHITING, S. The epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *Can J. Neurol Sci*, [S.l.], v. 32, n. 4, p. 409-18, 2005.

WILLIAMSON, P.D.; ENGEL, J. Jr. Complex partial seizures. In: Engel J Jr, Pedley TA (eds.). *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1998. p. 557-66.

XANTHOS, D.N.; SANDKÜHLER, J. Neurogenic neuroinflammation. Inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. *Nature Reviews*, [S.l.], v. 15, 2014.

Xu, D.; Miller, S.D.; Koh, S. Immune mechanisms in epileptogenesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, [S.l.], v. 7, 2013.

YACUBIAN, E.M.T. Proposta de classificação das crises e síndromes epilépticas. Correlação vídeoeletrencefalográfica. *Rev. Neurociências*, [S.l.], v. 10, n. 2, p. 49-65, 2002.

Yacubian, E.M.T.; Valério, R.M.F.; Jorge, C.L.; Fiore, L.A.; Cukiert, A.; Assis, L.M. Manifestações clínicas de crises parciais complexas do lobo temporal: um estudo vídeoeletrencefalográfico. *Arq Neuropsiquiatr.*, São Paulo, v, 52, n. 2, p. 137-43, 1994.

YIP, V.L.; ALFIREVIC, A.; PIRMOHAMED, M. Genetics of immune mediated adverse drug reactions: a comprehensive and clinical review. *Clin Rev Allergy Immunol.*, [S.l.], 2014.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROLOGIA
DOUTORADO EM NEUROLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ATENÇÃO:

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), do estudo/pesquisa intitulado Estudo de Associação Genética dos Alelos HLA Classe II DRB1, DQA1 e DQB1 em Pacientes com Epilepsia do Lobo Temporal Associada à Esclerose Mesial Hipocampal, conduzida por Wagner Gonçalves Horta. Este estudo tem por objetivo investigar a possível associação genética entre Epilepsia do Lobo Temporal com Esclerose Hipocampal ELT-EH e alelos do sistema HLA classe II. Você foi selecionado(a) por prévio diagnóstico e acompanhamento de ELT-EH no ambulatório de epilepsia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho. Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa, desistência ou retirada de consentimento não acarretará prejuízo para pesquisa. A participação nesta pesquisa não implica em riscos físicos ou emocionais para o convidado(a). Essa pesquisa também não será remunerada e nem acarretará gastos a sua participação. Sua participação nesta pesquisa consistirá em doar amostras de sangue periférico para posterior extração de DNA e análise dos alelos HLA. Os dados obtidos por meio desta pesquisa serão confidenciais e não serão divulgados em nível individual, visando assegurar o sigilo de sua participação. O pesquisador responsável se compromete a tornar públicos nos meios acadêmicos e científicos os resultados obtidos de forma consolidada sem qualquer identificação de indivíduos participantes. Caso você concorde em participar desta pesquisa, assine ao final deste documento,

que possui duas vias, sendo uma delas sua, e a outra, do pesquisador responsável / coordenador da pesquisa. Seguem os telefones e o endereço eletrônico do pesquisador responsável. Contatos do pesquisador responsável: Wagner Gonçalves Horta, médico, wghorta@gmail.com, tel 988762933. Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa, e que concordo em participar. Rio de Janeiro, ___ de _____ de _____.

Assinatura do(a) participante: _____ Assinatura do(a) pesquisador(a): _____

APÊNDICE B - Artigo aceito na revista European Journal of Epilepsy

01/07/2015

Fwd: Track your article [YSEIZ_2552] submitted to Seizure: European Journal of Epilepsy - luizcveiga@gmail.com - Gmail

----- Forwarded message -----

From: **Elsevier - Article Status** <Article_Status@elsevier.com>

Date: 2015-06-12 1:50 GMT-03:00

Subject: Track your article [YSEIZ_2552] submitted to Seizure: European Journal of Epilepsy

To: sonizavleon@pesquisador.cnpq.br

Please note this is a system generated email from an unmanned mailbox.
If you have any queries we really want to hear from
you via our 24/7 support at <http://help.elsevier.com>

Dear Prof. Alves-Leon,

Your article Genetic association study of the HLA class II alleles DRB1, DQA1, and DQB1 in patients with pharmacoresistant temporal lobe epilepsy associated with mesial hippocampal sclerosis. will be published in Seizure: European Journal of Epilepsy.

To track the status of your article throughout the publication process, please use our article tracking service:

http://authors.elsevier.com/TrackPaper.htm?trk_article=YSEIZ2552&trk_surname=Alves-Leon

For help with article tracking: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/90

We are committed to publishing your article as quickly as possible. We will therefore send you an alert of each next step in the production process where your involvement is required. Once the expected dispatch date of your proofs is available, you will be automatically alerted by e-mail.

Yours sincerely,
Elsevier Author Support

Estudo de associação genética dos alelos HLA Classe II DRB1, DQA1 e DQB1 em Pacientes com Epilepsia do Lobo Temporal Associada à Esclerose Mesial Hipocampal

Wagner Gonçalves Horta^{1,3}, Eduardo Paradela¹, Andre Figueiredo¹, Isabella D'Andrea Meira³, Valéria Coelho Santa Rita Pereira³, Pollyana Moura³, Cláudia Cecília Rêgo, Maria Emília Cosenza Andraus¹, Jorge Paes Barreto Marcondes de Souza², Carmen Lucia Antão Paiva¹ e Soniza Vieira Alves-Leon^{1,3}.

1. UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (UNIRIO) - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROLOGIA (PPGNEURO).

2. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO (UFRJ) – SERVIÇO DE NEUROCIRURGIA.

3. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO (UFRJ) – CENTRO DE EPILEPSIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO FRAGA FILHO.

RESUMO

Introdução: A epilepsia do Lobo Temporal (ELT) é a epilepsia focal mais comum em adultos. Os mecanismos neuroinflamatórios das epilepsias vêm sendo descritos como fator importante na gênese das crises convulsivas e nas epilepsias refratárias, em especial naquelas com comportamento progressivo, como ocorre na epilepsia temporal associada à esclerose mesial hipocampal (ELT-EH). **Objetivo:** Estudar o perfil de suscetibilidade genética de pacientes diagnosticados com ELT-EH investigando possível associação entre ELT-EH e alelos do sistema HLA classe II.

Materiais e Métodos: Foram coletadas amostras de sangue periférico de 42 pacientes com ELT-EH e amostra de sangue periférico de 89 controles saudáveis. A análise da expressão e tipagem de HLA classe II DRB1, DQB1 e DQA1 foi feita através do método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e identificados por sequenciamento. As análises estatísticas das frequências relativas dos alelos foram obtidas por meio de planilha excell e o valor de p, os riscos relativos (RR) e odds ratio (OD) foram calculados no software Epi Info 6.0. O p valor foi considerado estatisticamente significativo quando fosse <0,05 após a correção de Bonferroni.

Resultados: O alelo HLA-DRB1*13:02 foi o único que se mostrou estatisticamente significativo (P = 0,01) ao comparar a sua frequência nos pacientes em relação aos

controles. Contudo esse valor não resistiu à correção de Bonferroni ($P = 0,44$). Os outros alelos das regiões HLA-DRB1, HLA-DQB1 e HLA-DQA1 não mostraram associação significativa. **Conclusão:** Encontramos tendência como fator de susceptibilidade da associação com HLA DRB1*13:02 na ELT-EH.

INTRODUÇÃO

A Epilepsia do lobo temporal (ELT) constitui a síndrome epiléptica mais comum dos adultos, sendo responsável por cerca de 40% dos casos de epilepsias em geral e 60% dos casos de epilepsias de início focal (Telléz Zenteno, *et al.*, 2012, Chiang, *et al.*, 2014). Epilepsia mesial do lobo temporal é o tipo mais freqüente de ELT, e está principalmente relacionada com esclerose hipocampal (ELT-EH), que compromete cerca de 70 a 80% dos pacientes com esse tipo de epilepsia (Engel, *et al.*, 2001, Engel, *et al.*, 2003, Chiang, 2014, Cendes, *et al.*, 2014).

As crises podem aparecer pela primeira vez na infância, na adolescência ou na idade adulta, porém mais comumente entre 10-20 anos. É comum que o paciente tenha tido uma ou mais convulsões febris na infância, antes do desenvolvimento da epilepsia mesial temporal (Mumenthaler, 2007). Diferentes etiologias vêm sendo atribuídas à causa de injúria cerebral que levariam à progressiva gliose do lobo temporal, denominados como “incidentes iniciais precipitantes (IIP)” (Kwan & Sander, 2004, Kasperaviciute, *et al.*, 2013). A importância clínica da ELT-EH decorre de sua alta prevalência e à elevada proporção de pacientes com crises epiléticas refratárias ao tratamento medicamentoso; entre as causas de refratariedade da ELT está a esclerose hipocampal, encontrada em 50-70% dos pacientes com ELT refratária ao tratamento clínico (Valença *et al.*, 2006, Chatzikonstantinou, 2014).

Os mecanismos neuroinflamatórios das epilepsias vêm sendo descritos como um fator importante na gênese das crises convulsivas e nas epilepsias refratárias, em especial naquelas com comportamento progressivo, como ocorre na ELT-EH (Vezzani *et al.*, 2011). Vezzani *et al.*, 2005, mostraram a participação de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 beta (IL1-beta) na ativação de astrócitos por lesão de barreira hemato-encefálica (BHE). Mostramos recentemente que pacientes com ELT-EH operados apresentam diminuição significativa de fator necrose tumoral alfa (TNF-alfa), importante citocina pró-inflamatória (Quirino-Santos *et al.*, 2012). Ravizza *et al.*, 2008, mostraram que hipocampus humanos extraídos cirurgicamente de pacientes com ELT-EH marcados para HLA DR apresentam maior expressão de

macrófagos nas células microgliais em comparação aos controles. Ozkara *et al.*, 2002, encontraram associação de HLA DR4, DQ2 e DR7 em pacientes com ELT-EH. Esses achados hipotetizam a possível participação de genes envolvidos na resposta inume com a susceptibilidade a doenças neuroinflamatórias, entre essas a ELT-EH. O objetivo deste trabalho é estudar a suscetibilidade genética dos pacientes previamente diagnosticados com ELT-EH, investigando possível associação entre ELT-EH e o sistema HLA classe II.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de sangue periférico de 42 pacientes [22 do sexo feminino (52,36%) e 20 do sexo masculino (47,64%)] com idade entre 15 e 65 anos (média de idade de 42,8 anos) e critérios para ELT-EH procedentes do Centro de Epilepsia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (UFRJ) e amostra de sangue periférico de 89 controles saudáveis [47 mulheres (52,8%) e 42 homens (47,2%)] pareados e analisados por sexo e idade.

A extração do DNA foi feita utilizando o kit de purificação de DNA genérico/baixa resolução e kit DNA alta resolução classe II. A análise da expressão e tipagem de HLA classe II DRB1, DQB1 e DQA1 dos pacientes e do grupo controle foram feitas através do método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e identificados por sequenciamento específico de alta e baixa resolução, utilizando os kits One Lambda (Canoga Park, CA, USA) como recomendado pelo fabricante.

As análises estatísticas das frequências relativas dos alelos foram obtidas por meio de planilha excell e o valor de p, os riscos relativos (RR) e odds ratio (OR) foram calculados no software Epi Info 6.0. O p valor foi considerado estatisticamente significativo quando fosse $<0,05$ após a correção de Bonferroni.

Conforme o protocolo do estudo, que foi aprovado pelo comitê de ética interno da instituição, todos os pacientes foram devidamente informados em relação à utilização dos seus dados clínicos e genéticos e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

RESULTADOS

Não foi evidenciada associação genética significativa quando comparadas as frequências de regiões alélicas entre pacientes e controles nas regiões HLA-DRB1,

HLA-DQB1 e HLA-DQA1 identificadas por sistema de baixa resolução (Tabelas 1, 2 e 3).

Tabela 1 – DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS NA REGIÃO HLA CLASSE II DRB1 IDENTIFICADOS POR SISTEMA BAIXA RESOLUÇÃO.

DRB1	PACIENTES (N=42)	CONTROLES (N=89)	P	RR	OR
DRB1*01	07	12	0,62	1,18	1,28
DRB1*03	07	15	0,97	0,99	0,99
DRB1*04	12	23	0,74	1,10	1,15
DRB1*07	02	02	0,43	1,59	2,17
DRB1*08	05	13	0,67	0,85	0,79
DRB1*09	0	02	0,32	IND	0
DRB1*10	0	01	0,49	IND	0
DRB1*11	07	17	0,73	0,89	0,85
DRB1*12	09	10	0,12	1,61	2,15
DRB1*13	12	16	0,16	1,47	1,83
DRB1*14	05	22	0,09	0,52	0,41
DRB1*15	12	23	0,74	1,10	1,15
DRB1*16	09	21	0,78	0,92	0,88
TOTAL	87	177			

Abreviações: RR = RISCO RELATIVO, OD = ODDS RATIO, IND = INDEFINIDO.

Tabela 2 – DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS NA REGIÃO HLA CLASSE II DQB1 IDENTIFICADOS POR SISTEMA BAIXA RESOLUÇÃO.

DQB1	PACIENTES (N=42)	CONTROLES (N=89)	P	RR	OR
DQB1*02	10	25	0,60	0,86	0,80
DQB1*03	17	29	0,37	1,26	1,41
DQB1*04	16	26	0,30	1,30	1,49
DQB1*05	18	38	0,98	1,0	1,01
DQB1*06	23	60	0,16	0,70	0,59
TOTAL	84	178			

Abreviações: RR = RISCO RELATIVO, OD = ODDS RATIO

Tabela 3 – DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS NA REGIÃO HLA CLASSE II DQA1 IDENTIFICADOS POR SISTEMA BAIXA RESOLUÇÃO.

DQA1	PACIENTES (N=42)	CONTROLES (N=89)	P	RR	OR
DQA1*01	32	53	0,06	1,73	2,17
DQA1*02	11	17	0,35	1,31	1,50
DQA1*03	08	24	0,32	0,73	0,64
DQA1*04	07	23	0,24	0,67	0,57
DQA1*05	22	61	0,07	0,64	0,50
TOTAL	80	178			

Abreviações: RR = RISCO RELATIVO, OD = ODDS RATIO

O alelo HLA-DRB1*13:02 foi o único que se mostrou significativo com valor de $p = 0,01$ ao comparar a sua frequência nos pacientes em relação aos controles. Esse valor depois de submetido à correção de Bonferroni perdeu a significância $p = 0,44$. O valor do risco relativo (RR) do respectivo alelo foi de 0,29. Todos os outros alelos HLA-DRB1, inclusive o alelo DRB1*15:03 que foi o mais frequente, aparecendo em 7 pacientes, se mostraram com uma diferença não significativa na relação com os controles (Tabela 4).

Tabela 4 – DISTRIBUIÇÃO DE ALELOS HLA-DRB1 IDENTIFICADOS POR SISTEMA ALTA RESOLUÇÃO.

DRB1	PACIENTES (N=42)	CONTROLES (N=89)	P	B	RR	OR
*01:01	2	3	0,69		0,88	0,7
*01:02	1	3	0,75		1,11	1,43
*01:03	4	6	0,57		0,87	0,69
*03:01	5	6	0,32		0,79	0,53
*03:05	2	6	0,65		1,11	1,45
*03:08	0	3	0,22		1,49	IND
*04:02	2	6	0,65		1,11	1,45
*04:03	1	2	0,96		0,98	0,94
*04:06	0	1	0,49		1,48	IND
*04:07	1	0	0,14		IND	0
*04:08	2	4	0,94		0,98	0,94
*04:09	1	1	0,58		0,73	0,47
*04:10	1	3	0,75		1,11	1,43
*04:11	4	6	0,57		0,87	0,69

*07:01	2	2	0,43		0,73	0,46
*08:01	2	3	0,69		0,88	0,7
*08:03	3	6	0,93		0,98	0,94
*08:04	0	2	0,32		1,48	IND
*08:07	0	2	0,32		1,48	IND
*09:01	0	2	0,32		1,48	IND
*10:01	0	1	0,49		1,48	IND
*11	2	6	0,65		1,11	1,45
*11:01	3	5	0,73		0,92	0,77
*11:02	1	3	0,75		1,11	1,43
*11:03	1	3	0,75		1,11	1,43
*12:01	5	9	0,75		0,94	0,83
*12:02	4	1	0,96		0,98	0,94
*13	1	0	0,14		IND	0
*13:01	3	4	0,52		0,83	0,61
*13:02	4	1	0,01	0,44	0,29	0,11
*13:03	3	5	0,73		0,92	0,77
*13:04	0	1	0,49		1,48	IND
*13:06	1	3	0,75		1,11	1,43
*13:09	0	2	0,32		1,48	IND
*14:01	0	3	0,22		1,49	IND
*14:02	2	3	0,69		0,88	0,7
*14:05	1	9	0,11		1,36	4,61
*14:06	2	7	0,51		1,16	1,71
*15:01	2	9	0,3		1,23	2,25
*15:02	3	5	0,73		0,92	0,77
*15:03	7	9	0,28		0,81	0,56
*16:01	2	7	0,51		1,16	1,71
*16:02	3	8	0,72		1,08	1,28
*16:03	4	6	0,57		0,87	0,69
TOTAL	87	177				

Abreviações: B = BONFERRONI, RR = RISCO RELATIVO, OD = ODDS RATIO, IND = INDEFINIDO.

O HLA-DQB1*04:01 foi o mais frequente apresentando-se em 10 pacientes. Contudo o mesmo, assim como os outros alelos HLA-DQB1 não mostraram diferença significativa quando comparados os pacientes em relação aos controles (Tabela 5).

Tabela 5 – DISTRIBUIÇÃO DE ALELOS HLA-DQB1 IDENTIFICADOS POR SISTEMA DE ALTA RESOLUÇÃO.

DQBI	PACIENTES (N=42)	CONTROLE (N=89)	P	RR	OR
*02:01	8	19	0,76	1,05	1,15
*02:03	2	6	0,65	1,11	1,45
*03:01	4	6	0,57	0,87	0,69
*03:02	3	5	0,73	0,92	0,77
*03:03	3	5	0,73	0,92	0,77
*03:04	5	8	0,6	0,9	0,73
*03:05	0	2	0,32	1,48	IND
*03:07	2	3	0,69	0,88	0,7
*04:01	10	15	0,34	0,86	0,65
*04:02	6	11	0,75	0,95	0,85
*05:01	8	14	0,63	0,92	0,79
*05:02	2	5	0,83	1,05	1,19
*05:03	6	9	0,48	0,87	0,68
*05:04	2	10	1,44	1,26	2,53
*06:01	2	3	0,69	0,88	0,7
*06:02	8	14	0,63	0,92	0,79
*06:03	5	9	0,75	0,94	0,83
*06:04	0	2	0,32	1,48	IND
*06:05	3	8	0,72	1,08	1,28
*06:06	0	3	0,22	1,49	IND
*06:07	0	3	0,22	1,49	IND
*06:08	2	9	0,3	1,23	2,25
*06:11	3	9	0,58	1,12	1,46
Total	84	178			

Abreviações: RR = RISCO RELATIVO, OD = ODDS RATIO, IND = INDEFINIDO

O HLA-DQA1*05:01 foi o mais frequente em pacientes e controles, mas também não mostrou diferença significativa na relação pacientes e controles, assim como todos os outros alelos DQA1 (Tabela 6).

Tabela 6 – DISTRIBUIÇÃO DE ALELOS HLA-DQA1 IDENTIFICADOS POR SISTEMA DE ALTA RESOLUÇÃO.

DQA1	PACIENTES (N=42)	CONTROLE (N=89)	P	RR	OR
*01:01	8	18	0,87	1,02	1,08
*01:02	8	13	0,51	0,9	0,73
*01:03	9	14	0,42	0,88	0,68
*01:04	7	8	0,19	0,76	0,49
*02:01	11	17	0,35	0,87	0,67
*03:01	8	24	0,32	1,14	1,57
*04:01	7	23	0,24	1,17	1,74
*05:01	16	42	0,32	1,12	1,45
*05:02	6	19	0,33	1,15	1,63
Total	80	178			

Abreviações: RR = RISCO RELATIVO, OD = ODDS RATIO, IND = INDEFINIDO

DISCUSSÃO

Estudos sobre mecanismos inflamatórios e suas relações com doenças do sistema nervoso central têm grande importância nas pesquisas da última década. A participação de mecanismos neuroinflamatórios parece ser um constituinte comum e crucial na epileptogênese e no desenvolvimento das crises epiléticas refratárias ao tratamento (Vezzani *et al*, 2005;. Albrecht, 2007, Vezzani, 2011). Ravizza *et al*, 2008 mostraram em hipocampus extraídos cirurgicamente de pacientes com ELT- EH expressão positiva maior de HLA-DR e infiltrado de macrófagos nas células microgliais e aumento da expressão de IL1 beta nas células astrocitárias.

Mostramos recentemente diminuição dos níveis de fator necrose tumoral alfa (TNF-alfa), interleucina 1 beta (IL-1 β) e proteínas inflamatórias de macrófagos (MIP-1 α /CCL3) importantes citocinas pró-inflamatória e dos níveis de metaloproteinases, importantes indutores inflamatórios, em pacientes portadores de ELT-EH submetidos a procedimento cirúrgico para controle das crises, confirmando em humanos a participação desta citocina na perpetuação das crises na ELT-EH (Quirico-Santos *et al.*, 2013, Quirico-Santos *et al.*, 2013). Considerando que alguns alelos HLA classe II estão associados à susceptibilidade de doenças inflamatórias caracterizadas por maior expressão de citocinas do tipo fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e interleucina 1 beta (IL-1 beta), como ocorre na ELT-EH (Vezzani, 2007), hipotetizamos que os alelos HLA-DRB1, HLA-DQB1 e HLA-DQA1 poderiam estar

participando da resposta inflamatória a diferentes antígenos durante os primeiros anos de vida que em indivíduos susceptíveis, poderiam levar a ELT-EH.

No presente estudo, o alelo DRB1*13:02 ($p=0,01$) foi significativamente associado à susceptibilidade para ELT-EH, mas essa associação não se manteve após a correção de Bonferroni. Até o presente momento, ainda não existe nenhum trabalho que demonstre qualquer tipo de associação desse alelo com ELT-EH, seja como fator protetor ou de susceptibilidade para a doença. Foi demonstrado que na epilepsia mioclônica juvenil (EMJ) não há evidências de que a susceptibilidade para a doença estaria associada ao fenótipo HLA-DR13, onde nenhum dos alelos investigados ou haplótipos (*DRB1*13:01-DQB1*06:03* ou *DRB1*13:02-DQB1*06:04*) mostrou diferença significativa entre pacientes e controles querem fossem para susceptibilidade ou para proteção (Le Hellard *et al*, 1999). Podemos considerar ainda que na EMJ não encontramos a história natural de IIP e progressão, observada na maioria dos casos de ELT-EH, altamente sugestivos de reorganização tecidual e neuroplasticidade orquestrada por fenômenos locais.

Nossos resultados contrariam aqueles encontrados por Ozkara, 2004, únicos autores que analisaram a participação de HLA Classe II na ELT-EH. No referido estudo, os autores encontraram uma frequência maior de HLA-DR4, HLA-DR7 e HLA-DQ2 nos pacientes com ELT-EH em comparação com os controles, sugerindo que esses possam estar envolvidos na susceptibilidade da ELT-EH. Os autores concluíram que esses haplótipos parecem oferecer fator de risco, mas não essenciais para a expressão da doença. Entretanto, em nosso estudo, além dos haplótipos, os alelos das regiões HLA-DRB1, HLA-DQB1 e HLA-DQA1 foram avaliados separadamente e não encontramos aumento da expressão desses nos pacientes com ELT-EH em relação ao grupo de controles, com exceção da tendência de fator de susceptibilidade do HLA DRB1*13:02. Alguns dos alelos dessas regiões estudados por Ozkara, como DQB1*02:02 que participa da região (DQ2), DRB1*04:011, *04:012, *04:04, *04:051, *04:052, *04:12, *04:13, *04:14, *04:15, *04:16, *04:17, *04:18, *04:19, *04:20, *04:21, *04:22, *04:23, *04:24, *04:25, *04:26, *04:27 que formam a região (DR4) e DRB1*07:02 que forma a região (DR7) não foram encontrados nem nos pacientes com ELT-EH e nem nos controles do nosso estudo. Comparando com os nossos resultados de regiões alélicas antes da análise por alta resolução, ainda assim, nossos resultados foram negativos para qualquer tipo de associação.

Atribuímos ainda nossos achados e a perda de significância estatística aqui encontrada no alelo HLA DRB1*13:02 ao número baixo de pacientes incluídos e ao fato de que analisamos amostras de sangue periférico. Acreditamos que a susceptibilidade para ELT-EH tem, no alelo HLA DRB1*13:02 um provável candidato no reconhecimento de autoantígenos que podem interferir na evolução e na morbidade de pacientes. Dentro do contexto de que hipocampos de pacientes com ELT-EH submetidos à cirurgia apresentam aumento positivo na expressão de DR e macrófagos nas células microgliais e IL1 beta nas células astrocíticas, acreditamos que fatores transcricionais e a baixa amostra estudada são os responsáveis pela perda de significância. Assim, a participação de alelos DR nos mecanismos inflamatórios das epilepsias parece encontrar evidência nos estudos histopatológicos (Ravizza *et al*, 2008).

É sabido que as epilepsias, de maneira geral, são resultado de condições multifatoriais e da interação de múltiplos genes. O mecanismo mediado por susceptibilidade envolvendo HLA classe I e evoluindo com reação inflamatória por meio de imunidade inata justificaria a maior presença de infiltrado de macrófagos no tecido estudado. Este fato poderia explicar igualmente não termos encontrado alelos Classe II na susceptibilidade para ELT-EH, onde, talvez, essa susceptibilidade estaria mais associada a alelos HLA classe I. Corroborando essa hipótese, estão os resultados encontrados por Nakahara *et al*, 2010 mostrando aumento na expressão de linfócitos T CD4 e linfócitos T CD8 em hipocampos extraídos cirurgicamente de pacientes com ELT-EH. A quantidade variou de acordo com cada paciente e houve uma maior expressão significativa de linfócitos T CD8 em relação aos linfócitos T CD4 nesses hipocampos. Essa maior expressão de linfócitos T CD8 parece apoiar e justificar os resultados que não encontramos. A indução experimental de crises epiléticas em roedores levou ao aumento da expressão de moléculas de MHC classe I, que corresponde ao HLA classe I dos humanos em animais, em áreas do cérebro dentro de horas após a estimulação. Ao mesmo tempo, processos regenerativos são acionados, e estes também parecem envolver moléculas de MHC classe I (Xanthos & Sandkuhler, 2014).

Apesar de o sistema HLA classe II ser dotado de um notável polimorfismo e estar relacionado com susceptibilidade de diversas doenças, nossos achados, sugerem que talvez, grupos étnicos e fatores ambientais diversos, podem estar influenciando a associação ou não entre HLA classe II e ELT-EH.

Podemos concluir que a susceptibilidade genética para ELT-EH não é conferida por alelos HLA classe II das regiões DRB1, DQB1 e DQA1 mas que alelo HLA DRB1*13:02 apresentou certa tendência como fator de susceptibilidade para ELT-EH.

PERSPECTIVAS E LIMITES DESTE ESTUDO

O número pequeno de pacientes incluídos pode ter sido um fator limitante. Mas a característica inédita de estudos de alta resolução para susceptibilidade genética em genes que são forte mediadores da resposta inflamatória pode contribuir para as novas pesquisas de caráter genético, que visem elucidar o intrincado mecanismo da ELT-EH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abott, N.J. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neuro*, 7, 41-53.
2. Albrecht, O., Justyna, M., Steinborn, B., & Zarowski, M. (2007). Cytokines, epilepsy and antiepileptic drugs – is there a mutual influence. *Pharmacological Reports*, 59, 129-138.
3. Andraus-Cosenza, M.E., Cosenza-Nunes, C.A., Nunes Gomes, R., Andraus-Fantezia, C., & Alves-Leon, S.V. (2006). Monitorización prolongada por videoelectroencefalografia de pacientes com diagnóstico ambulatorio de epilepsia del lóbulo temporal de difícil control: aplicación del modelo de lógica fuzzy. *Rer. Neurol.*, 42, 1-8.
4. Aronica, E., Goter, J.A., Ramkema, M., Redeker, S., Gerçerer-Ozbas, F., Vliet, E., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., Baayen, J.C., & Troost, D. (2004). Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 45(5), 441-451.
5. Avanzini G. (1995). Animal models relevant to human epilepsies. *Ital J Neurol Sci*, 16(1-2), 5-8.
6. Babb T.L., Brown W.J., Pretorius, J.K., Davenport C.J., Lieb J.P., & Crandall P.H. (1984). Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 25(6), 729-740.

7. Babb T.L., & Brown W.J. (1987). Pathological findings in epilepsy. In: Engel, J.Jr. *Surgical Treatment of the epilepsies*. New York: Raven Press, 511- 540.
8. Bauer, S., Cepok, S., Rudolph-Todorova, A., Nowak, M., Koller, M., Lorenz, R., Rosenow, F., Hemmer, B., & Hamer, H.M. (2009). Etiology and site of temporal lobe epilepsy influence postictal cytokine release. *Epilepsy Research*, 86, 82-88.
9. Bertram, E.H. (2009). Temporal lobe epilepsy: where do the seizures really begin? *Epilepsy Behav*, 14(1), 32-37.
10. Borges M.A., Min, L.L., Guerreiro C.A., Yacubian E.M.T., Cordeiro J.A., Tognola W.A., Borges A.P., & Zanetta D.M. (2004). Urban prevalence of epilepsy: populational study in São Jose Rio Preto, a medium-sized city in Brazil. *Arq Neuropsiquiatrica*, 62, 199-200.
11. Bruton C.J. (1988). The neuropathology of temporal lobe epilepsy. England, *Oxford University Press*, 1-158.
12. Cendes, F, Sakamoto, A.C., Spreafico, R, Bingaman, W, Becker, A.J. (2014). Epilepsies associated with hippocampal sclerosis. *Acta Neuropathologica*, Published on line.
13. Chang B.S., & Loweinstein D.H. (2003). Mechanisms of Disease Epilepsy. *The New England Journal of Medicine*, 349, 1257-1266.
14. Chatzikonstantinou A. (2014). Epilepsy and Hippocampus. *The Hippocampus in Clinical Neuroscience*, 34, 121-42.
15. Chiang S. & Haneef Z. (2014). Graph Theory findings in the pathophysiology of temporal lobe epilepsy. *Clinical Neurophysiology*, S1388-2457 (14) 00192-8.
16. Fisher R.S., Boas W.E., Blume W., Elger C., Genton P., Lee P., & Engel J. Epileptic Seizures and Epilepsy. (2005) Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(4).

17. Crespel, A., Coubes, P., Bockaert, M.C., Baldy-Moulinier, M., & Natoli-Lerner, M. (2002). Inflammatory reactions in human medial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Brain Research*, 952, 159–169.
18. Duarte-Rey, C., Pardo, A.L., Velosa-Rodriguez, Y., Mantilla, R.D., Anava, J.M., & Villarraga, A. (2009). HLA class II association with hepatitis in latin America: a meta-analysis. *Autoimmun Rev.*, 8(4), 325-331.
19. Engel, Jr. (2001). ILAE Commission Report. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizure and with epilepsy: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*, 42(6), 796-803.
20. Engel, Jr. (2003). A greater role for surgical treatment of epilepsy: why and when? *Epilepsy Currents*, 3 (2): 37-40.
21. Gloor, P. (1991). Mesial temporal sclerosis: historical background and an overview from a modern perspective. In: Luders H. Epilepsy surgery. *New York: Raven Press*, 689-703.
22. Hafez, M., Nagaty, M., & Saied, E. (1985). HLA Antigens and Idiopathic Epilepsy. *Epilepsia*, 26(1), 15-18.
23. Ho, S.S., Kuzniecky, R.I., Gilliam, F., Faught, E., & Morawetz, R. (1998). Temporal lobe developmental malformations and epilepsy: dual pathology and bilateral hippocampal abnormalities. *Neurology*, 50, 748-754.
24. Kasperaviciute D., Catarino C.B., Sisodiva S.M. (2013). Epilepsy, hippocampal sclerosis and febrile seizures linked by common genetic variation around SCN1A. *Brain A Journal of Neurology*, 136; 3140-3150.
25. Kleen, J.K., & Holmes, G.L. (2008). Brain inflammation initiates seizures. *Nature Medicine*, 14, 1309-1310.
26. Kwan, P., & Sander, J.W. (2004). The natural history of epilepsy: an epidemiological view. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75, 1376–1381.
27. Le Hellard, S., Neidhart, E., Thomas, P., Feingold, J., Malafosse, A., & Tafti, M. (1999). Lack of association between juvenile myoclonic epilepsy and HLA-DR13. *Epilepsia*, 40(1), 117-119.

28. Maciag, P.C., Schlecht, N.F., Souza, P.S., Franco, E.L., Villa, L.L., & Petzl-Erler, M.L. (200). Major histocompatibility complex class II polymorphisms and risk of cervical cancer and human papillomavirus infection in Brazilian women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 9(11), 1183-1191.
29. Mackay I., & Rosen S.F. (2000). The HLA System. *The New England Journal of Medicine*, 343(10), 702-709.
30. Maroso, M. (2010). Toll-like receptor4 and high mobility group box 1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nat Med*, 16, 413- 419.
31. Mazarati, A.M., Pineda, E., Shin, D., Tio, D., Taylor, A.N., & Sankar, R. (2010). Comorbidity between epilepsy and depression: Role of hippocampal interleukin-1 β . *Neurobiology of Disease*, 37, 461-467.
32. Micheucci, R., Pasini, E., & Nobile, C. (2009). Lateral temporal lobe epilepsies: clinical and genetic features. *Epilepsia*, 50(5), 52-54.
33. Molina-Somera, K.C., Nair, S., Van Eldik, L.J., Watterson, D.M., & Wainwright, M.S. (2009). Enhanced microglial activation and proinflammatory cytokine upregulation are linked to increased susceptibility to seizures and neurologic injury in a "two-hit" seizure model. *Brain Research*, 1282, 162-172.
34. Mumenthaler, M., & Mattle, H. (2007). Neurologia. (4th ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, (Chapter 7).
35. Nakahara, H., Konishi, Y., Beach, T.G., Yamada, N., Makino, S., & Tooyama I. (2010). Infiltration of T lymphocytes and expression of ICAM-1 in the hippocampus of patients with hippocampal sclerosis. *Acta Histochem. Cytochem*, 43 (6), 157–162.
36. Oh, H.H., Kwon, S.H., Kim, C.H., Choe, B.H., Ko, C.W., Jung H.D., Suh, J.S., Lee, J.H. (2004). Molecular analysis of HLA class II associated susceptibility to neuroinflammatory diseases in Korean children. *J. Korean. Med. Sci.*, 19: 426-30.

37. Ozkara, C., Altintas, A., Yilmaz, E., Eskazan, E., Erkol, G., Ozyurt, E., Erdogan, E., & Kuday, C. (2002). An association between mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis and human leukocyte antigens. *Epilepsia*, 43(3), 236-239.
38. Quirino-Santos, T., D'Andrea, I.M., Gomes, A.C., Pereira, V.C., Pinto, M., Monteiro, M., Souza, J.M., & Alves-Leon, S.V. (2013). Resection of the epileptogenic lesion abolishes seizures and reduces inflammatory cytokines of patients with temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroimmunology*, 254: 125-130.
39. Quirico-Santos, T., Mello, A.N., Gomes, A.C., Pontes de Carvalho, L., Souza, J.M., Alves-Leon, S. (2013). Increased metalloprotease activity in the epileptogenic lesion –lobectomy reduces metalloprotease activity and urokinase type uPAR circulating levels. *Brain Reseach*.
40. Ravizza, T., Noé, F., Zardoni, D., Vaghi, V., Sifringer, M., & Vezzani, A. (2008). Interleukin converting enzyme inhibition impairs kindling epileptogenesis in rats by blocking astrocytic IL – 1 β production. *Neurobiology of Disease*, 31, 327–333.
41. Ravizza, T., Gagliardi, B., Noé, F., Boer, K., Aronica, E., & Vezzani, A. (2008). Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease*, 29, 142–160.
42. Télles Zentano, J.F., Hernandez Ronquillo, L. (2012). A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research and Treatment*. Article ID 630853, 5 pages
43. Torre, C., Martinez, V., Palmi, A., Paglioli, E., Portuguez, M., & Azambuja, N. (2006). Unilateral hippocampal sclerosis with subdural strips in seizures from the contralateral temporal lobe: case report. *J Epilepsy Clin Neurophysiol*, 12(2), 95-98.

44. Valença-Andrade, L.P.A., Valença, M.M., Velasco, T.R., & Leite J.P. (2006). Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *J Epilepsy Clin Neurophysiol*, 12(1), 31-36.
45. Vezzani, A., & Granata, T. (2005). Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia*, 46(11), 1724–1743.
46. Vezzani, A. (2005). Inflammation and epilepsy. *Epilepsy Currents*, 5(01), 1-6.
47. Vezzani, A., & Baram, T.Z. (2007). New roles for interleukin – 1 beta in the mechanism of epilepsy. *Epilepsy Currents*, 7(2), 45–50.
48. Vezzani, A., Balosso, S., & Ravizza T. (2008). The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22, 797–803.
49. Vezzani, A. (2011). The role of inflammation in epilepsy. *Nat. Rev Neurol*, 7, 31- 42.
50. Wieser, H.G. (2004). ILAE Commission report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia*, 45, 695-714.
51. Wirrell, E. (2005). The epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *Can. J.Neurol.Sc*, 32, 409-415.
52. Xanthos, D., Sandkuhler. (2014). Neurogenic neuroinflammation. Inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. *Nature Reviews*, Vol.15.