

**CARLOS ALEXANDRE TWARDOWSCHY**

**A INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO DO CYP2C9 NA ATROFIA CEREBELAR EM  
PACIENTES USUÁRIOS DE FENITOÍNA**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Soares  
Silvado

**CURITIBA**

**2013**

T969 Twardowschy, Carlos Alexandre.  
A influência do polimorfismo do CYP2C9 na atrofia cerebelar em  
pacientes usuários de fenitoína / Carlos Alexandre Twardowschy. –  
Curitiba, 2013.  
102 f.: il.; color.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Soares Silvado.  
Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina  
Interna e Ciências da Saúde do Setor de Ciências da Saúde.  
Universidade Federal do Paraná.

1. Fenitoína. 2. Cerebelo - atrofia - tamanho do órgão. 3.  
Epilepsia. 4. Polimorfismo genético - mutação - enzimologia. I. Título.  
II. Silvado, Carlos Eduardo Soares.

NLM: WL 385



## PARECER

Aos vinte e seis dias do mês de abril do ano de dois mil e treze, a banca examinadora constituída pelos Professores: Dra. Vera Cristina Terra (USP-RP), Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro (UFPR), Dr. Fernando Cendes (UNICAMP), Dr. Hélio Afonso Ghizoni Teive (UFPR) e Dr. Carlos Eduardo Soares Silvado (UFPR) – orientador, exarou o presente parecer sobre a tese elaborada por, **CARLOS ALEXANDRE TWARDOWSCHY** do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna – Mestrado e Doutorado da Universidade Federal do Paraná, intitulada: "A INFLUENCIA DO POLIMORFISMO DO CYP2C9 NA ATROFIA CEREBELAR EM PACIENTES USUARIOS DE FENITOÍNA". A Banca examinadora considerou que o aluno apresentou trabalho adequado para tese e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Doutor em Medicina Interna**, e a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

Curitiba, 26 de abril de 2013.

Dra. Vera Cristina Terra

Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

Dr. Fernando Cendes

Dr. Hélio Afonso Ghizoni Teive

Dr. Carlos Eduardo Soares Silvado

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Soares Silvado, por ser mais do que um orientador, pelo seu contínuo esforço e incentivo para que esta pesquisa fosse realizada, pelo ensinamento diário não só de como se fazer pesquisa, mas principalmente de como se tratar os pacientes;

Ao Prof. Dr. Lineu C Werneck, pelas orientações com o projeto e pelos ensinamentos dos caminhos burocráticos para viabilização financeira deste trabalho;

À Prof. Dra. Rosana H Scola, pelo seu exemplo de dedicação e amor à vida acadêmica;

Ao Prof. Dr. Arnolfo Carvalho Neto, por facilitar o acesso à realização dos exames de imagem, sem o qual nada disso teria sido possível;

Ao Dr. João Borgio, pela ajuda com os exames de volumetria;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro desta pesquisa - Edital Universal MCT/CNPq No. 014/2008;

À Raquel Ardnt, por me introduzir ao mundo da biologia molecular, pela paciência nas horas em que tudo dava errado e pela companhia agradável durante os momentos em que passei no laboratório;

À minha esposa Cristina, por nunca me deixar desistir nos momentos de frustração, por suas valiosas opiniões, pela paciência, pelas horas roubadas de seu convívio e pelos filhos maravilhosos que me deu.

## RESUMO

Até 50% dos pacientes que utilizaram fenitoína (FNT) para tratamento de epilepsia apresentam algum grau de atrofia cerebelar, porém os mecanismos de como isto ocorre ainda não são claros. A FNT é metabolizada quase que exclusivamente pela enzima *CYP2C9* (90%) e em portadores de mutação desta enzima, esta metabolização pode estar reduzida em até 50%. O objetivo do estudo é avaliar se pacientes com epilepsia que utilizaram FNT e apresentam mutação do *CYP2C9*, portanto com metabolização deficiente de FNT, apresentam um menor volume cerebelar (VC) que os pacientes sem esta mutação. Cem pacientes com epilepsia e usuários comprovados de FNT por pelo menos 1 ano, foram classificados conforme o perfil do *CYP2C9* em selvagens (sem mutação, variante \*1) e mutantes (variantes \*2 e \*3). De 72 pacientes sem mutação foram selecionados 19 (grupo SEL-P) que apresentavam características clínicas e demográficas mais semelhantes a 19 pacientes com mutação (Grupo MUT-P). Os dois grupos realizaram volumetria encefálica por ressonância magnética, sendo no processamento das imagens e no cálculo do volumes, utilizado o software MIPAV. As características clínicas e demográficas dos grupos SEL-P e MUT-P não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Para comparação do VC, entre os grupos mutantes e selvagens, foram anuladas possíveis variáveis de confusão, através de teste de regressão logística. O grupo MUT-P apresentou uma redução no volume cerebelar total em relação ao grupo SEL-P (6,8% x 7,4%), porém sem significância estatística ( $p=0,13$ ). Na análise isolada da substância branca cerebelar o grupo MUT-P apresentou uma redução volumétrica significativa ( $p=0,002$ ) em relação ao grupo SEL-P (1,8% x 2,3%). O padrão de redução do VC, predominante na substância branca, sugere uma relação direta entre metabolização deficiente de FNT, pela presença de mutação do *CYP2C9* e atrofia cerebelar, em pacientes com epilepsia e usuários de FNT.

Palavras-chave: Fenitoína. Atrofia cerebelar. Epilepsia. *CYP2C9*. Volumetria cerebelar

## ABSTRACT

Although almost 50% of patients with epilepsy who take phenytoin develop some degree of cerebellar atrophy, the mechanisms involved in this effect have not been elucidated. Phenytoin is metabolized almost exclusively by the CYP2C9 enzyme (90%), but in individuals carrying a mutation in this enzyme phenytoin metabolism is reduced by about 50%. The main goal of this study was to investigate whether epileptic patients who have used phenytoin and carry a CYP2C9 mutation, i.e., poor metabolizers of phenytoin, have a lower cerebellar volume (CV) than patients without a CYP2C9 mutation. One hundred epileptic patients who had been phenytoin users for at least one year were classified as CYP2C9 wild-type (*CYP2C9\*1* variant) or mutant (*CYP2C9\*2* or *CYP2C9\*3* variant) carriers. Of the 72 patients without a mutation, 19 (SEL-P group) were selected according to their clinical and demographic characteristics to approximately match 19 patients with a CYP2C9 mutation (MUT-P group). Both groups had volumetric MRI scans. Post-processing image analysis was performed using MIPAV software following a standard protocol. The clinical and demographic characteristics of both groups (SEL-P and MUT-P) were not significantly different. To compare CV between mutant and wild-type groups, logistic regression analysis was used to control for confounding variables. The MUT-P group showed reduced total cerebellar volume (6.8 x 7.4%) compared with the SEL-P group, but without statistical significance ( $p=0.13$ ). Analyzing cerebellar white matter alone, the MUT-P group had a significant ( $p=0.002$ ) volume reduction compared with the SEL-P group (1.8 x 2.3%). The pattern of reduction in cerebellar white matter volume suggests a direct relationship between poor phenytoin metabolism by mutant CYP2C9 and cerebellar atrophy in epileptic phenytoin users.

Key-words: Phenytoin. Cerebellar atrophy. Epilepsy. CYP2C9. Cerebellar volume.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS APÓS A RESTRIÇÃO PELA ENZIMA AVA2.....	31
FIGURA 2. FLUXOGRAMA RESUMIDO DO MODO DE FORMAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO. ....	35
FIGURA 3. ETAPAS DO PROCESSAMENTO DAS IMAGENS PARA CÁLCULO DOS VOLUMES CEREBRAIS. ....	37
FIGURA 4. MARCAÇÃO DOS PONTOS DA COMISSURA ANTERIOR, POSTERIOR E SAGITAL MÉDIO PARA O ALINHAMENTO DE TALAIRACH.....	39
FIGURA 5. DESENHO ESQUEMÁTICO DOS PONTOS DE REFERÊNCIA UTILIZADOS PARA MARCAÇÃO DAS COORDENADAS DE TALAIRACH.....	39
FIGURA 6. IMAGEM DO ENCÉFALO ALINHADO E COMPRIMIDO NA CAIXA DE TALAIRACH. ....	40

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. PRINCIPAIS ROTAS DE ELIMINAÇÃO DAS DROGAS ANTIEPILÉPTICAS.....	9
TABELA 2. EFEITOS DE INDUÇÃO E INIBIÇÃO NAS ENZIMAS DOS ANTIEPILÉPTICOS TRADICIONAIS. ....	10
TABELA 3. RELAÇÃO DE ESTUDOS QUE DEMONSTRAM A ALTERAÇÃO DO METABOLISMO DA FENITOÍNA COMPARANDO PACIENTES SELVAGENS DOS VARIANTES.....	14
TABELA 4. FREQUÊNCIA ALÉLICA DO <i>CYP2C9*2</i> E <i>CYP2C9*3</i> EM INDIVÍDUOS NORMAIS VOLUNTÁRIOS.....	16
TABELA 5. FREQUÊNCIA ALÉLICA DO <i>CYP2C9*2</i> E <i>CYP2C9*3</i> EM PACIENTES EPILÉPTICOS.....	16
TABELA 6. DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS DA POPULAÇÃO TOTAL EM ESTUDO (N=100). ....	27
TABELA 7. CARACTERÍSTICAS DOS TIPOS DE CRISES. ....	27
TABELA 8. LISTA DOS OLIGOS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR.....	29
TABELA 9. INTERPRETAÇÃO DOS ALELOS APÓS A DIGESTÃO COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO ESPECÍFICA. ....	32
TABELA 10. FREQUÊNCIA ALÉLICA DAS VARIANTES DO <i>CYP2C9</i> NA POPULAÇÃO ESTUDADA:.....	34
TABELA 11. QUADRO COMPARATIVO ENTRE AS FREQUÊNCIAS OBSERVADAS E ESPERADAS DE ACORDO COM O PRINCÍPIO DE HARDY-WEINBERG:.....	34
TABELA 12. QUADRO COMPARATIVO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS DOIS GRUPOS MONTADOS PARA VOLUMETRIA:.....	43
TABELA 13. DADOS OBTIDOS ATRAVÉS DA VOLUMETRIA ENCEFÁLICA E ANÁLISE ESTATÍSTICA ATRAVÉS DE REGRESSÃO LOGÍSTICA.....	45
TABELA 14. TRABALHOS DE RESSONÂNCIA QUANTITATIVA DA ATROFIA CEREBELAR EM PACIENTES COM EPILEPSIA. ....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

®	Marca registrada
DAE	Droga antiepiléptica
DCV	Doença cérebro vascular
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FNT	Fenitoína
HC-UFPR	Hospital de Clínicas – Universidade Federal do Paraná
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
Kg	Kilograma
LBT	Lobectomia temporal
mg	Miligrama
MIPAV	Medical image processing analysis and visualization
MUT	Grupo de paciente portadores das variações *2 e *3
MUT-P	Grupo de paciente portadores das variações *2 e *3 selecionados para RME
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RME	Ressonância magnética encefálica
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SEL	Grupo de paciente sem as variantes. Grupo selvagem.
SEL-P	Grupo selvagem selecionado para a RME
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TC	Tomografia de crânio
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamino
TRIS	(hidroximetil)aminometano
VC/VIT	Volume cerebelar total normalizado
VC/VIT-B	Volume da substância branca do cerebelo normalizado
VC/VIT-C	Volume da substância cinzenta do cerebelo normalizado

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CONTINUAÇÃO

VE/VIT	Volume encefálico total normalizado
VE/VIT-B	Volume da substância branca do encéfalo normalizado
VE/VIT-C	Volume da substância cinzenta do encéfalo normalizado
VIT	Volume intracraniano total
VOI	Volume de interesse
$\chi^2$	Qui-quadrado
$\mu\text{g/ml}$	Micrograma por mililitro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 EPILEPSIA.....	1
1.2 GENÉTICA DE POPULAÇÕES .....	5
1.3 FARMACOGENÉTICA.....	6
1.4 FENITOÍNA E SEU METABOLISMO PELA CYP2C9 .....	12
1.5 ATROFIA CEREBELAR ASSOCIADA À FENITOINA.....	19
1.6 VOLUMETRIA ENCEFÁLICA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA .....	22
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	24
2.1. OBJETIVO PRINCIPAL .....	24
2.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS .....	24
<b>3 MATERIAISE MÉTODOS</b> .....	25
3.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES .....	25
3.1.1 Critérios de Inclusão .....	26
3.1.2 Critérios de Exclusão .....	26
3.1.3 Características dos Pacientes Seleccionados .....	26
3.2 COLETA DE SANGUE E EXTRAÇÃO DO DNA.....	28
3.3 GENOTIPAGEM .....	29
3.3.1 Amplificação dos Alelos de Interesse .....	29
3.3.2 Detecção do Produto de Amplificação .....	30
3.3.3 Interpretação dos Resultados .....	31
3.4 PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO .....	32
3.5 DEFINIÇÃO DOS ALELOS.....	33
3.6 FREQUÊNCIA ALÉLICA ENCONTRADA.....	33
3.7 FORMAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO .....	34
3.8 PAREAMENTOS DOS PACIENTES DOS GRUPOS PARA VOLUMETRIA ...	36

3.9 VOLUMETRIA CEREBELAR E ENCEFÁLICA .....	36
3.10 CONFIABILIDADE INTERNA E EXTERNA .....	41
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
4.1 CARACTERÍSTICAS DOS GRUPOS SEL-P E MUT-P .....	43
4.2 CONFIABILIDADE DAS MENSURAÇÕES.....	44
4.3 ANÁLISE VOLUMÉTRICA DOS GRUPOS SEL-P E MUT-P COMPARATIVAMENTE .....	44
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>
5.1 LIMITAÇÕES .....	54
<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>58</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>71</b>
<b>ARTIGOS</b> .....	<b>78</b>
CYP2C9 polymorphism in patients with epilepsy: Genotypic frequency analyzes and phenytoin adverse reactions correlation .....	79
The role of CYP2C9 polymorphisms in phenytoin-related cerebellar atrophy.....	86

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 EPILEPSIA

A epilepsia é uma doença comum, encontrada em todos os países e em todas as faixas etárias. A epilepsia é caracterizada principalmente pela heterogeneidade com relação à etiologia, tipo de crise, responsividade ao tratamento farmacológico, prognóstico e ocorrência de desordens associadas. Portanto, o efeito da epilepsia varia consideravelmente entre os indivíduos afetados e suas famílias. Ainda assim é importante lembrar que as formas graves de epilepsia afetam uma substancial população de pacientes com epilepsia e seus custos sociais são consideráveis.

As crises epilépticas podem ocorrer como resultado de diversas lesões cerebrais agudas ou distúrbios metabólicos. Estas crises, desencadeadas por fatores precipitantes claros, são denominadas crises sintomáticas agudas e não constituem epilepsia. A distinção entre provocadas e não provocadas, por vezes pode ser difícil de definir, principalmente em ambientes médicos pouco sofisticados (Sander, 2003). A epilepsia engloba numerosas condições neurológicas que se expressam por meio de crises epilépticas, sendo uma das mais frequentes doenças neurológicas, afetando 1 a 2 % da população. Estima-se que 50 milhões de pessoas têm epilepsia no mundo, ocorrendo em qualquer idade, sexo, raça e situação social (Hauser *et al.*, 1991, Hauser *et al.*, 1993, Annegers *et al.*, 1999, Duncan *et al.*, 2006). A maioria dos casos inicia-se em crianças e idosos, com maior incidência nos países em desenvolvimento e em moradores de áreas rurais (Sander, 2003).

Baseado na prevalência de diversos estudos e contando com a identificação de casos incompletos, o número de crianças e adolescentes na Europa com epilepsia ativa é de 0,9 milhão (prevalência de 4,5-5,0 por mil), 1,9 milhões nas idades de 20-64 anos (prevalência de 6 por mil) e 0,6 milhão na faixa etária acima de 65 anos. Aproximadamente 20-30% da população com epilepsia tem mais de 1 crise por mês. Baseado nas taxas de incidências idade-específica dos estudos europeus, o número estimado de novos casos por ano entre crianças e adolescentes é de 130.000 (incidência de 70 por cem mil), 96.000 em adultos entre 20-64 anos (incidência de 30 por cem mil) e 85.000 nos idosos acima de 65 anos (incidência de

100 por cem mil)(Forsgren *et al.*, 2005). Não existe dúvida que a epilepsia seja um grande problema em países tropicais e muito mais prevalente que nos países desenvolvidos. Os dados indicam taxas de prevalência 2 a 25 vezes maiores do que a prevalência média de 6/1.000 observada em países desenvolvidos (Rwiza *et al.*, 1992). O principal problema que os pesquisadores dos países em desenvolvimento têm é a ausência de registros médicos e hospitalares confiáveis. A maioria dos estudos na América latina têm apresentado uma taxa de prevalência entre 17 e 22 por 1.000 (de Bittencourt *et al.*, 1996),mas especificamente no Brasil, a taxa varia de 9,2 a 11,9 (Borges *et al.*, 2002, Noronha *et al.*, 2007). É provável que a diferença nos picos de incidência entre países desenvolvidos e subdesenvolvidos seja reflexo das epilepsias sintomáticas.Estas são mais prevalentes e incidentes nos países subdesenvolvidos e estão provavelmente relacionadas a fatores de risco tropicais específicos como infecções e trauma. A epilepsia é mais comum nos jovens,desta maneira, países com alta densidade de população jovem terão uma maior frequência de epilepsia(Noronha *et al.*, 2007).

A etiologia da epilepsia é multifatorial, podendo estar relacionada a fatores genéticos (alguns marcadores moleculares já foram identificados) e a alterações na morfologia e no funcionamento do sistema nervoso central (SNC), decorrentes de doenças infecciosas, tumores, traumatismos crânio-encefálicos, acidentes vasculares cerebrais (Cloyd *et al.*, 2006), teco-traumatismos e distúrbios da migração neuronal, dentre outros. Entretanto, a maioria dos casos tem causa desconhecida (Banerjee *et al.*, 2009). As crises epilépticas apresentam várias formas, embora sejam geralmente estereotipadas para um determinado indivíduo. Ao contrário da grande maioria das doenças neurológicas, os pacientes com epilepsia não apresentam sinais físicos permanentes e têm seu diagnóstico firmado pela história clínica ou pela observação de uma crise. O diagnóstico é realizado através de um julgamento clínico que pode variar dependendo das habilidades e experiência do médico e da qualidade de informações do paciente. O eletroencefalograma é útil na classificação da epilepsia, mas tem auxílio limitado para fazer o diagnóstico. Na prática, ambos diagnósticos, falso positivo e falso negativo são comuns.

Embora a epilepsia seja uma das condições neurológicas mais comuns, existem muitas deficiências relacionadas ao entendimento de sua epidemiologia. Isto ocorre em parte, a problemas metodológicos e, também, devido à falha em se levar em consideração que a epilepsia é heterogênea em sua natureza (Sander e Shorvon, 1996, Bell e Sander, 2001). Uma diversidade de estudos tem sido feito sobre a prevalência da epilepsia em diferentes situações e geralmente tem sido relatada entre 4 e 10/1000 pessoas (Rwiza *et al.*, 1992, Placencia *et al.*, 1992, Al Rajeh *et al.*, 2001, Rocca *et al.*, 2001, Jallon, 2002, Onal *et al.*, 2002, McDonald *et al.*, 2008). Parte da variação pode ser explicada pelas diferenças metodológicas utilizadas para a avaliação. Poucos estudos, na maioria das vezes conduzidos em países em desenvolvimento, têm encontrado uma prevalência acima destes valores.

O objetivo do tratamento de epilepsia é obter o controle das crises epiléticas, na ausência de efeitos colaterais indesejáveis, permitindo ao paciente atingir todo o seu potencial. As DAEs (drogas antiepiléticas) apresentam diversos mecanismos de ação e variados perfis de efeitos colaterais (Brodie e Dichter, 1996). A escolha da DAE mais apropriada para um determinado paciente deve ser individualizada, baseada no tipo de crise, atividade epilética e no perfil de efeitos colaterais esperado (Dichter e Brodie, 1996, Brodie e Dichter, 1996).

A maioria dos casos de epilepsia apresenta um bom prognóstico, com aproximadamente 60% a 70% dos pacientes obtendo controle completo das crises com o uso de drogas antiepiléticas (DAE) (Sillanpaa e Schmidt, 2006). Destes, 60% mantêm a remissão por vários anos, podendo ser suspenso o seu tratamento. Porém a dose ótima das DAEs pode variar até quatro vezes entre os indivíduos (Kwan e Brodie, 2001). Poucos preditores de boa evolução apresentam boa confiabilidade, podem ser idade de início, número de crises nos estágios iniciais de evolução, resposta precoce ao tratamento com drogas antiepiléticas e alguns achados eletroencefalográficos específicos (Sander, 1993, MacDonald *et al.*, 2000). Trauma, suicídio, pneumonia, *status epilepticus* e crises têm sido identificados como causa de morte mais frequente na população de portadores de epilepsia que em controles normais (Wu *et al.*, 2002, Nilsson *et al.*, 2002). A morte súbita inesperada em epilepsia, também tem sido uma causa cada vez mais reconhecida de morte em

pacientes com epilepsia, especialmente naqueles com epilepsias graves (Walczak *et al.*, 2001, Donner *et al.*, 2001).

O tratamento com drogas antiepilépticas tem grande eficácia em suprimir as crises na maioria dos pacientes, mas sua influência na história natural permanece desconhecida (Sander, 1993, O'Donoghue e Sander, 1996, Sander e Shorvon, 1996, Hauser e Lee, 2002). Cerca de 20 a 30 % das epilepsias são refratárias, ou seja, não são controladas com DAEs, mesmo em politerapia e em doses elevadas (Devinsky, 1999). Estes pacientes podem obter controle das crises, com a ressecção ou desconexão das áreas cerebrais, onde as crises se iniciam com o tratamento cirúrgico da epilepsia. Mesmo aqueles que eventualmente respondem ao tratamento, um quarto terá efeitos colaterais negativos que levam à retirada da droga (Mattson *et al.*, 1996).

Vários fatores podem contribuir para uma resposta variável às drogas incluindo idade, raça, sexo, interações com outras drogas, doenças concomitantes e função renal e hepática. Entretanto, existe evidência crescente de que diferenças genéticas podem ser um fator importante, influenciando na variabilidade de resposta aos fármacos (Ferraro e Buono, 2005, Sisodiya, 2005, Depondt, 2006, Szoeki *et al.*, 2006, Ferraro *et al.*, 2006, Mann e Pons, 2007, Tate e Sisodiya, 2007)

Embora existam dúvidas a respeito da definição dos critérios de refratariedade é importante lembrarmos que existe cerca de 30% de pacientes que não obtém controle das crises com o tratamento medicamentoso atualmente utilizado. Na busca dos mecanismos envolvidos na refratariedade ao tratamento, muito tem se pesquisado com relação à genômica das epilepsias, a genômica da resistência às drogas e a farmacogenômica. Evidências atuais sugerem que um melhor entendimento da biologia da doença e estudo genômico direto dos fenótipos de resistência às drogas podem muito bem levar a novos ou melhores tratamentos (Mulley *et al.*, 2005, Marini *et al.*, 2007, Depienne *et al.*, 2009, Loscher *et al.*, 2009).

## 1.2 GENÉTICA DE POPULAÇÕES

A genética de populações relaciona os processos da hereditariedade individual e o desenvolvimento da composição genética das populações e mudanças nesta composição com o tempo e o espaço (Griffiths *et al.*, 2006). A composição genética de uma população é representada pelas diferenças genotípicas desta população. Estas frequências são a consequência dos processos que atuam nos indivíduos e em geral são mantidas em gerações sucessivas.

A segregação meiótica em populações de reprodução aleatória (Panmixia) resulta em um equilíbrio de distribuição dos genótipos, logo a variação genética é mantida. As proporções de homocigotos e heterocigotos em cada geração sucessiva permanecerá a mesma. Estas frequências constantes, formam o Equilíbrio de Distribuição ou Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Hardy, 1908, Weiberg, 1908).

O Equilíbrio de Hardy-Weinberg significa que a reprodução sexual não causa uma redução constante na variação genética em cada geração. Ao contrário, a quantidade da variação permanece constante geração após geração, na ausência de outras forças perturbadoras (Griffiths *et al.*, 2006). As características que a população deve apresentar para que este princípio seja verificado são:

- A população deve ser infinita;
- Apresentar reprodução sexuada;
- Os indivíduos acasalam-se ao acaso;
- Os indivíduos devem ser diplóides;
- Não ocorre sobreposição de gerações;
- A taxa de mutação deve não ocorrer;
- As migrações não ocorrem;
- A seleção natural não ocorre nos alelos analisados;

O princípio de Hardy-Weinberg pode ser generalizado para incluir casos onde há mais de dois alelos na população. O teorema não se aplica a genes ligados ao sexo se homens e mulheres começarem com frequências gênicas desiguais.

Assim, para mostrar que uma população de determinado estudo se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg, a amostra de genótipos observada não deve ser diferente significativamente da distribuição prevista pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

### 1.3 FARMACOGENÉTICA

A farmacogenética estuda as relações entre as variações de um único gene e as respostas aos medicamentos, geralmente em um pequeno número de pacientes. Essas variações genéticas ajudam a explicar a razão da falha terapêutica ou efeito tóxico na administração de diversos compostos farmacêuticos. O conhecimento dessas variações poderá reduzir os efeitos tóxicos e maximizar os efeitos de diversas substâncias utilizadas na terapêutica (Cavalleri *et al.*, 2011). Por outro lado, a farmacogenômica examina diversos *loci* genômicos, incluindo grande número de vias biológicas em relação ao genoma inteiro, procurando identificar variações que determinem a variabilidade da resposta à terapêutica farmacológica (Roden *et al.*, 2006, Shastry, 2006). As diferenças entre estas definições são frequentemente debatidas, mas podem ser usadas como sinônimos (Johnson, 2003). É possível ver dois objetivos principais na aplicação clínica da farmacogenética: a capacidade em predizer quais pacientes têm um risco aumentado de toxicidade e a capacidade de predizer em quais pacientes são mais prováveis de se obter o efeito terapêutico desejado da droga.

A farmacogenética teve seu início, com várias descobertas, durante a década de cinquenta. Dentre as descobertas, citamos o reconhecimento de que alterações enzimáticas levariam a um prolongamento no tempo de paralisia, ocasionado pela succinilcolina; que a anemia hemolítica secundária ao uso de drogas antimaláricas ocorre devido a uma forma variante da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase e que diferenças genéticas da enzima N-acetiltransferase são responsáveis pelo desenvolvimento de neuropatia secundária ao uso de drogas tuberculostáticas (Kalow, 2001).

A variabilidade da resposta depende de variações do DNA, sempre acima de 1% de uma determinada população. A forma mais comum de polimorfismo é a troca de um único nucleotídeo na sequência do DNA. Hoje, já é claro que os polimorfismos genéticos têm um papel fundamental sobre a variabilidade farmacocinética e farmacodinâmica das DAEs e podem afetar a eficácia, tolerabilidade, segurança e duração da ação das DAEs. Outros polimorfismos são menos frequentes e podem ocorrer por inserções e deleções de uma sequência múltipla de nucleotídeos. Essas alterações no DNA, ocorrem em regiões que codificam proteínas, geralmente nas enzimas responsáveis pelas transformações dos diversos fármacos, existindo um fator étnico que pode determinar as respostas para as diversas medicações (Roden *et al.*, 2006).

O potencial de impacto clínico ocasionado pela variabilidade da atividade de enzimas metabolizadoras de drogas determinado farmacogeneticamente, e portanto a resposta a estas drogas, é melhor ilustrado atualmente pelo polimorfismo genético da *CYP2D6*. Este foi o primeiro polimorfismo CYP (complexo enzimático do citocromo P450) descoberto molecularmente e também é o mais estudado e caracterizado (Shah, 2005). Os estudos realizados na metade da década de 70, mostraram que uma população poderia ser dividida em dois fenótipos de metabolizadores de acordo com a variante de *CYP2D6*, os metabolizadores rápidos e os metabolizadores lentos, dependendo da sua capacidade parahidroxilar a droga antihipertensiva debrisoquina, hoje em dia obsoleta. Esta reação de hidroxilação é mediada pela *CYP2D6* (Mahgoub *et al.*, 1977, Evans *et al.*, 1980, Eichelbaum *et al.*, 1986). Os portadores do alelo selvagem (\*1), dominante, apresentavam metabolização normal e somente aqueles portadores de dois alelos inativos (\*3, \*4, \*5, \*6) eram fenotipicamente metabolizadores lentos. Outros subgrupos com características diferentes também foram determinados. Um grupo foi chamado de metabolizador ultra rápido, apresentava alta velocidade de depuração da droga e seus alelos tinham duas cópias das variantes \*35 e \*41. Outro grupo, chamado de metabolizadores intermediários, era composto de genótipo heterozigoto, apresentando uma capacidade moderada na metabolização da droga. Assim observamos que conforme o genótipo encontramos respostas fenotípicas diferentes.

Os metabolizados lentos podem ter a meia vida das drogas aumentada em cerca de 2-5 vezes(Shah, 2005).

Entre os diversos polimorfismos conhecidos, os mais bem estudados são os do gene *CYP2D6*(Kirchheiner *et al.*, 2001); do gene *ADRB2* que codifica os receptores adrenérgicos Beta-2 (metabolismo de agonistas beta-2 que determina broncodilatação variável) e do gene *ADD1* que codifica a alfa-aductina, implicada no uso de diuréticos e redução variável da pressão arterial (Bleecker *et al.*, 2007). Além destes, o complexo enzimático do citocromo P450 também possui vários polimorfismos clinicamente importantes no manejo dos pacientes epiléticos, já que estas enzimas estão envolvidas com a metabolização de diversas drogas antiepiléticas.

A eliminação das drogas de modo geral e sobretudo as antiepiléticas, se faz por via hepática (metabolismo) ou renal (excreção) (Tabela 1). Em geral o metabolismo representa a via mais importante em termos quantitativos e qualitativos. A metabolização é compreendida na fase I, reações oxidativas catalizadas por várias enzimas do citocromo P450, e fase II, composta por reações de conjugação e glucoronidação (Guyton e Hall, 1997). Aproximadamente 50-60% das drogas metabolizadas são realizadas através do sistema enzimático P450.

TABELA 1. PRINCIPAIS ROTAS DE ELIMINAÇÃO DAS DROGAS ANTIEPILÉPTICAS

<i>Droga</i>	<i>Principal rota(s) de eliminação</i>	<i>Principal enzima envolvida</i>
Carbamazepina	Oxidação	CYP3A4
Etoxisimida	Oxidação	CYP3A4
Fenobarbital	Oxidação + N-glucosidação (75%) e excreção renal (25%)	CYP2C9 e CYP2C19
Fenitoína	Oxidação	CYP2C9 e CYP2C19
Acido Valpróico	Oxidação (>50%) e glucoronidação (30-40%)	Oxidases mitocondriais, CYPs e glucoronil transferases
Felbamato	Oxidação(>50%) e excreção renal	Formas induzíveis de CYP
Gabapentina	Excreção renal	Nenhuma
Lamotrigina	Glucoronidação	Glucoronil transferase tipo 1A4
Levetiracetam	Excreção renal (75%) e hidrólise (25%)	Hidrolase
Oxcarbazepina	Glucoronidação (>50%) e excreção renal (<30%)	Glucoronil transferases
Pregabalina	Excreção renal	Nenhuma
Tiagabina	Oxidação	CYP3A4
Topiramato	Oxidação (20-60%) e excreção renal (40-80%)	Isoformas induzíveis de CYP
S-Vigabatrina	Excreção renal	Nenhuma
Zonizamida	Oxidação + redução + N-acetilação (>50%) e excreção renal (30%)	CYP3A4 e N-acetil-transferase

Adaptado de Perucca (2006).

A superfamília do citocromo p450 é responsável pelo metabolismo de diversas medicações e conforme a variação presente em seu gene pode aumentar o metabolismo, dificultar ou mesmo impedir a ação de algumas dessas substâncias(Wilkinson, 2005). Portanto o conhecimento do genótipo é importante para a prescrição de determinado grupo de drogas (Herranz, 2006). Dentro da superfamília do citocromo P450 algumas enzimas como a CYP2C9 e a CYP2C19 (Ingelman-Sundberg, 2004, Gardiner e Begg, 2005, Wilkinson, 2005)contribuem de modo particular para o metabolismo de algumas DAEs. Dentre as diversas medicações que são metabolizadas pela família do citocromo P450 destaca-se antiepilépticos tradicionais como fenobarbital, fenitoína (FNT) e carbamazepina (Tabela 2)(Anderson, 2004, Klotz, 2007). Alterações neste sistema enzimático têm importantes implicações no manejo destes pacientes, particularmente nos efeitos colaterais e interações medicamentosas.

TABELA 2. EFEITOS DE INDUÇÃO E INIBIÇÃO NAS ENZIMAS DOS ANTIEPILÉPTICOS TRADICIONAIS.

<i>DAE</i>	<i>Induz</i>	<i>Inibe</i>
Carbamazepina	CYP1A2, CYP2C, CYP3A, UGTs	-
Etosuximida	-	-
Fenobarbital/Primidona	CYP1A, CYP2A6, CYP2B, CYP2C, CYP3A, UGTs	-
Fenitoína	CYP2C, CYP3A, UGTs	-
Acido Valpróico	-	CYP2C9, UGTs, Hipóxido hidrolase

DAE= Drogas antiepilépticas, CYP = Isoenzimas do Citocromo P450, UGT = UDP-glucoroniltransferase.

Adaptado de Anderson (2004).

Como consequência da variação do DNA, o metabolismo das drogas podem ser alterados em vários locais. Existe um potencial para alteração na absorção, distribuição, transporte, metabolismo, eliminação e locais de ação. As drogas antiepilépticas não são apenas substratos, mas podem também inibir ou induzir genes implicados no metabolismo (Ethell *et al.*, 2003). A taxa do metabolismo também pode ser alterada pela interação gene-gene.Vários estudos têm demonstrado os efeitos da expressão gênica relacionados a transportadores de

drogas (MDR1/ABCB1,MDR2/ABCB2) (Tishler *et al.*, 1995, Lazarowski *et al.*, 2004) e metabolismo pelo citocromo P450 (CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6) (Mamiya *et al.*, 1998, Ibeanu *et al.*, 1998a, Ibeanu *et al.*, 1998b, Kidd *et al.*, 1999, Zhu *et al.*, 2002, Ho *et al.*, 2003).

É importante lembrar que em pacientes epiléticos é muito comum o uso concomitante de drogas antiepiléticas e como vimos esta interação pode induzir ou inibir a ação das enzimas do citocromo. Este fator poderia ser uma variável de confusão na análise dos efeitos colaterais da FNT ou da correlação destes efeitos com os genótipos. Por exemplo, fenobarbital, primidona e carbamazepina têm a capacidade de induzir a ação da CYP2C9 ao contrário do ácido valpróico que atua inibindo. Alguns estudos têm demonstrado que o uso concomitante de outras drogas parece não interferir de modo significativo no metabolismo da FNT (Odani *et al.*, 1997, Mamiya *et al.*, 1998, Hung *et al.*, 2004). Estudos com populações de pacientes com epilepsia que apresentavam 55% de uso concomitante com outros antiepiléticos mostraram que os efeitos na taxa de metabolização da FNT não são significativos (Hung *et al.*, 2004). Entretanto Lee *et al.* (2007) mostraram que o uso concomitante de outras drogas antiepiléticas pode alterar a taxa de eliminação da FNT. Alguns pacientes que utilizaram FNT associada com valproato apresentaram menores taxas de eliminação da FNT em seu grupo genotípico correspondente, portanto, o uso concomitante de valproato pode interferir na atividade enzimática da CYP2C9. Além disso, nesse mesmo estudo, alguns pacientes que utilizaram carbamazepina concomitante a FNT e valproato apresentaram valores de taxa de eliminação da FNT maiores que aqueles em que existia o uso de valproato e FNT (Lee *et al.*, 2007). Portanto a carbamazepina pode reduzir o nível sérico da FNT, através da indução da atividade da CYP2C9 (Spina *et al.*, 1996). Além disso, o fenobarbital também poderia alterar a farmacocinética da FNT, mas estes achados são inconsistentes (Riva *et al.*, 1996, Anderson, 1998).

#### 1.4 FENITOÍNA E SEU METABOLISMO PELA CYP2C9

A FNT foi introduzida há aproximadamente 60 anos para o uso em epilepsia (Merritt e Putnam, 1938) e ainda permanece como uma das DAE mais prescritas para controle das crises parciais com ou sem generalização secundária (Perucca, 2004). Seu principal mecanismo de ação é o bloqueio seletivo dos canais neuronais de sódio voltagem-dependente (Yaari *et al.*, 1986). Estes canais são complexas subunidades heterólogas que contêm uma grande subunidade alfa e duas pequenas subunidades betas. Acredita-se que a ação primária da FNT seja a ligação à subunidade alfa do canal de sódio no seu estado inativo (Kuo *et al.*, 1997).

O metabolismo da FNT é complexo e incluiu vias saturáveis (não-lineares), sendo que a maior etapa é a fase de conversão da FNT para 4'-OH-fenil-5-fenilhidantoína pela CYP2C9 (Bajpai *et al.*, 1996). Esta etapa é velocidade-limitante. A eliminação da FNT é realizada por oxidação hepática sob ação da CYP2C9 (90%) e CYP2C19 (10%) (Hung *et al.*, 2004, Rosemary *et al.*, 2006, Yukawa e Mamiya, 2006). Esta metabolização é reduzida de 25 a 50% conforme o polimorfismo genético destes sistemas e pela interação com outras drogas que utilizem as mesmas vias (Hung *et al.*, 2004). Um dos principais metabólitos da metabolização da FNT é a 5-(phidroxifenil)-5-fenilhidantoina (p-HPPH). Aproximadamente 98% da p-HPPH circulante está na isoforma levógera, forma "S" (Ieiri *et al.*, 1995).

O gene *CYP2C9* é um membro importante da subfamília do CYP2C mapeada no cromossomo 10q24.2, e é um gene altamente variável. Por sequenciamento de nucleotídeos já foram identificados até o momento 56 alelos (Dai *et al.*, 2013). Entretanto, apenas 3 alelos, nomeados de *CYP2C9\*1*, *CYP2C9\*2* e *CYP2C9\*3* são identificados frequentemente nas populações étnicas estudadas (Soga *et al.*, 2004). O alelo *CYP2C9\*1* é denominado de selvagem por ser o mais comumente encontrado nas populações.

A variante *CYP2C9\*2* apresenta uma transição C>T na posição 432 do exon 3 causando uma troca de Arginina por Cisteína na posição 144 (*Arg144Cys*) da proteína do complexo enzimático P450-CYP2C9. A análise da variante *CYP2C9\*3* demonstra uma transição A>T1077 no exon 7 que codifica uma troca de

aminoácidos Isoleucina por Leucina na posição 359 (*Ile359Leu*) (Sullivan-Klose *et al.*, 1996).

Estudos subsequentes identificaram que indivíduos que possuíam as variantes *CYP2C9\*2* e *CYP2C9\*3* apresentavam uma atividade enzimática significativamente reduzida (Aynacioglu *et al.*, 1999, Hung *et al.*, 2004, Tate *et al.*, 2005, Rosemary *et al.*, 2006). Indivíduos que apresentavam estas variantes tinham uma redução de 27 a 54% da metabolização da FNT, (Adithan *et al.*, 2003) ocasionando uma maior predisposição à toxicidade pela FNT nas doses usuais (Soga *et al.*, 2004, Hung *et al.*, 2004, Thakkar *et al.*, 2012). Portanto, tem sido proposto que estas drogas devem ter sua dosagem individualizada conforme o perfil metabolizador farmacogenético do usuário, sendo este perfil determinado pela genotipagem (Soga *et al.*, 2004, Lopez *et al.*, 2011).

Na análise da influência do *CYP2C9* na metabolização da FNT em indianos, observou-se que a taxa metabólica média da droga é duas vezes maior em indivíduos que apresentam o tipo selvagem (Rosemary *et al.*, 2006). Outros estudos também observaram um aumento significativo do nível sérico de FNT em pacientes portadores dos alelos *CYP2C9\*2* e *CYP2C9\*3* e em alguns estudos estes valores apresentaram uma diferença estatisticamente significativa, quando comparados ao genótipo selvagem (Tabela 3).

TABELA 3. RELAÇÃO DE ESTUDOS QUE DEMONSTRAM A ALTERAÇÃO DO METABOLISMO DA FENITOÍNA COMPARANDO PACIENTES SELVAGENS DOS VARIANTES.

<i>Estudo</i>	<i>Protocolo</i>	<i>n</i>	<i>Resultado dos mutantes comparados aos selvagens</i>	<i>Significância</i>
Rosemaryet al. (2006)	300 mg de FNT Dosagem 4 h pós-dose	27	Presença de alelos mutantes = ↑ duas vezes no NS-FNT	p = 0,01
Kerbet al. (2001)	300 mg de FNT Dosagem 12 h pós-dose	96	1 alelo mutante = ↑ 31% NS-FNT 2 alelos mutantes = ↑ 52% NS-FNT	p < 0,0001
Aynaciogluet al. (1999)	300 mg de FNT Dosagem 12 h pós-dose	101	*1/*2 = ↑ 32% NS-FNT *1/*3 = ↑ 35% NS-FNT *2/*2 = ↑ 58% NS-FNT *3/*3 = ↑ 42% NS-FNT	p = 0,009 p = 0,001 p = 0,02 não calculado
Sogaet al. (2004)	Uso crônico, dosagem 2 h pós-dose	28	*1/*3 = ↑ 58% taxa C/D	P = 0,01
Hunget al. (2004)	Uso crônico, dosagem diária média de 293,64 ± 75,20	169	*1/*1 CYP2C9 + C19 (mutante) = ↓ 20% CI *1/*3 CYP2C9 + C19 (mutante) = ↓ 50% CI	p < 0,05 p < 0,05

NS-FNT: Nível sérico de fenitoína; FNT : fenitoína; CI: clearance da fenitoína; taxa C/D: concentração sérica de fenitoína/ dosagem de fenitoína.

Da mesma forma, o gene *CYP2C19* também participa da metabolização da FNT, as mutações neste gene podem alterar a capacidade do citocromo em lidar com a droga. O polimorfismo genético desse gene foi reportado tendo como causa mutações de ponto no exon 5 (variante *CYP2C9\*2*) e exon 4 (variante *CYP2C9\*3*) no cromossomo 10. A presença destas variantes explica a baixa metabolização de FNT em pacientes japoneses, porém não existem estudos semelhantes na nossa população (Rosemary *et al.*, 2006).

De modo geral, quando se inicia com uma dose de FNT de 5mg/kg de peso corporal, a concentração sérica plasmática alcança níveis de 10 a 20 µg/ml, mas alguns terão maiores concentrações e efeitos neurotóxicos. Tem sido proposto que, conforme o perfil genotípico, a dosagem recomendada de FNT seja alterada. Em pacientes com genótipo selvagem (*\*1/\*1*) a dosagem recomendada seria de 5,5-7,5 mg/Kg/dia; nos com genótipo *\*1/\*3* de 3-4mg/Kg/dia e nos com genótipo *\*3/\*3*, associado a alelos mutantes do *CYP2C19*, de 2-3 mg/Kg/dia (Hung *et al.*, 2004).

Um número grande de estudos tem demonstrado uma variação marcante na frequência de distribuição dos alelos do *CYP2C9* no mundo, com a frequência do alelo selvagem variando de 76,5 a 96,7% (Wang *et al.*, 1995, Brockmoller *et al.*, 1995, Sullivan-Klose *et al.*, 1996, Stubbins *et al.*, 1996, Nasu *et al.*, 1997, Kimura *et al.*, 1998, Aynacioglu *et al.*, 1999, Yasar *et al.*, 1999, Scordo *et al.*, 2001, Yoon *et al.*, 2001, Gaedigk *et al.*, 2001, Hamdy *et al.*, 2002, Soga *et al.*, 2004, Vianna-Jorge *et al.*, 2004, Jose *et al.*, 2005, Scott *et al.*, 2007, Sanchez-Diz *et al.*, 2009). Esta diferença ocorre entre brancos e negros africanos (Sullivan-Klose *et al.*, 1996), brancos e negros americanos (Sullivan-Klose *et al.*, 1996), etnias indianas (Jose *et al.*, 2005), japoneses (Soga *et al.*, 2004), suecos (Yasar *et al.*, 1999) e brasileiros (Vianna-Jorge *et al.*, 2004). Embora exista alguma diferença na frequência de distribuição alélica em pacientes com epilepsia, essa parece ser próxima das populações a que estes pacientes pertencem (Soga *et al.*, 2004). A Tabela 4 resume a frequência encontrada dos alelos *CYP2C9\*2* e *CYP2C9\*3* em diversas populações mundiais e a Tabela 5 avalia os estudos de frequência alélica do *CYP2C9* em pacientes portadores de epilepsia. A análise destes dados mostra que ocorre uma clara diminuição da prevalência das mutações, em asiáticos e negros.

TABELA 4. FREQUÊNCIA ALÉLICA DO CYP2C9\*2 E CYP2C9\*3 EM INDIVÍDUOS NORMAIS VOLUNTÁRIOS.

Referência	País	Freq *2 (%)	Freq *3 (%)	n
Soga <i>et al.</i> (2004)	Japão	0	5,4	56
Nasuet <i>et al.</i> (1997)	Japão	0	2,1	218
Wang <i>et al.</i> (1995)	Chineses Han	0	1,7	115
Sullivan-klose <i>et al.</i> (1996)	Americanos	8,0	6,0	100
	Caucasianos			
Stubbinset <i>et al.</i> (1996)	Britânicos	12,5	8,5	100
	Caucasianos			
sullivan-klose <i>et al.</i> (1996)	Afro-americanos	1,0	0,5	100
Sullivan-klose <i>et al.</i> (1996)	Taiwanese	0	1,7	98
Handy <i>et al.</i> (2002)	Egípcios	12,0	6,0	247
Aynacioglu <i>et al.</i> (1999)	Turcos	10,6	10,0	499
Brokmöller <i>et al.</i> (1995)	Alemães	13	8,1	174
Yasaret <i>et al.</i> (1999)	Suecos	10,7	7,4	430
Vianna-jorge <i>et al.</i> (2004)	Brazileiros	8,6	6,5	331
José <i>et al.</i> (2005)	Indianos (sul)	4	8	346
Scordo <i>et al.</i> (2001)	Italianos	11,2	9,2	157
Kimura <i>et al.</i> (1998)	Japoneses	0	3,6	140
Yoon <i>et al.</i> (2001)	Coreanos	0	1,1	574
Gaedigk <i>et al.</i> (2001)	Índios	3	6	153
	canadenses			
Sánchez-diz <i>et al.</i> (2009)	Espanha e Italia	12,5-16,5	7,1-8,5	1076
Scott <i>et al.</i> (2007)	Judeos Ashkenazi americanos	14	8,6	250

TABELA 5. FREQUÊNCIA ALÉLICA DO CYP2C9\*2 E CYP2C9\*3 EM PACIENTES EPILÉPTICOS.

Referência	País	Freq *2 (%)	Freq *3 (%)	n
Hashimoto <i>et al.</i> (1996)	Japão	0	11,8	17
Soga <i>et al.</i> (2004)	Japão	0	10,7	28
Odani <i>et al.</i> (1997)	Japão	0	13,6	44

Até o momento identificamos apenas dois trabalhos avaliando a frequência alélica do CYP2C9 em brasileiros (Vianna-Jorge *et al.*, 2004, Lima *et al.*, 2008). Vianna-Jorge *et al.* (2004) observaram que a frequência alélica das variantes CYP2C9\*1, CYP2C9\*2 e CYP2C9\*3 são respectivamente 84,9%, 8,6%, e 6,5%. O outro trabalho, de Lima *et al.* (2008), observou uma frequência de 9,7% para \*2 e 7,3% para o alelo CYP2C9\*3 em pacientes brasileiros usuários de warfarina. Existe um único estudo avaliando a incidência das variantes CYP2C9\*2 e CYP2C9\*3 em pacientes com epilepsia em nosso país (Twardowschy *et al.*, 2011). Este trabalho mostra uma frequência de 9% para variante CYP2C9\*2 e 7% para variante CYP2C9\*3. Porém, como os pacientes portadores de epilepsia se

multiplicam aleatoriamente com os demais, estas taxas realmente devem ser semelhantes conforme estabelece a lei de Hardy-Weinberg.

A FNT pode ocasionar uma variedade de efeitos dose-relacionados ou idiossincráticos. Alterações cosméticas reversíveis (hipertrofia gengival, hirsutismo, fascies grosseiras) embora leves, podem ser problemáticas (Brodie e Dichter, 1996). Os mecanismos de desenvolvimento da hipertrofia gengival ainda não estão muito bem determinados, mas vários mecanismos tem sido propostos. Hipóteses como inflamação decorrente de placa bacteriana, aumento das glicosaminoglicanas sulfatadas, imunoglobulinas, diferenças populacionais com relação aos fibroblastos gengivais, fatores de crescimento epitelial, fatores farmacocinéticos e de ligação tecidual tem sido relatados como possíveis agentes causais (Ileri *et al.*, 1995).

Os efeitos neurotóxicos (sonolência, disartria, tremor, ataxia e dificuldades cognitivas) tornam-se muito prováveis, quando a concentração plasmática excede 20 µg/ml (Thakkar *et al.*, 2012). Outros efeitos colaterais da FNT são: queda de cabelo, linfadenopatia e rash cutâneo. Uma das mais severas manifestações é a síndrome de Stevens-Johnson e necrólise epidérmica tóxica, que ocorre principalmente nas primeiras oito semanas de tratamento (Arif *et al.*, 2007). Disfunção sexual desproporcional à idade e queda dos níveis de testosterona são comuns em homens que utilizam FNT, mais do que em controles. Efeitos tóxicos neuronais que incluem confusão, fala arrastada, visão dupla, ataxia e neuropatia podem ocorrer com o uso prolongado ou em intoxicações (Perucca, 2006).

Estudos mostram que o uso prolongado de FNT está correlacionado diretamente com o desenvolvimento de atrofia cerebelar (Ney *et al.*, 1994, De Marcos *et al.*, 2003). Existe a suspeita que exposição aguda à altas doses de FNT pode estar associada, também ao desenvolvimento desta complicação (Kuruville e Bharucha, 1997, Alioglu *et al.*, 2000, Zuin *et al.*, 2003). A atrofia cerebelar pode ser induzida experimentalmente em animais pela administração de FNT. A alteração patológica consiste na perda das células de Purkinje, gliose de Bergmann e dano à camada granular (Ohmori *et al.*, 1999).

As diferentes populações têm graus variados de polimorfismo genético, ocasionando variações significativas de metabolização da FNT e consequente risco de efeitos colaterais que pode ocasionar atrofia cerebelar. Estima-se que cerca de 20 a 30% dos indivíduos, dependendo da população étnica estudada (Adithan *et al.*, 2003), apresentariam este perfil farmacogenético metabolizador lento que corresponde a presença dos alelos *CYP2C9\*2* e *CYP2C9\*3*. Trabalhos recentes mostram que a presença de um perfil genético de metabolização lenta da FNT está associada ao desenvolvimento de hiperplasia gengival (Soga *et al.*, 2004), reações cutâneas (Lee *et al.*, 2004) e recentemente Depondt *et al.* (2011) e Kesavan *et al.* (2010) demonstraram que a presença das variantes *CYP2C9\*2* e *CYP2C9\*3* correlacionam-se significativamente com a chance de desenvolvimento de vários tipos de efeitos colaterais pela FNT.

Portanto, investigar quais polimorfismos do *CYP2C9* ocorrem em pacientes com epilepsia usuários de FNT é muito importante, para o manejo clínico destes pacientes. Em indivíduos com metabolização deficiente devemos individualizar a dose de FNT, conforme o tipo polimorfismo do *CYP2C9*, existente, evitando efeitos colaterais possivelmente graves.

A pequena faixa terapêutica da FNT aumenta o risco de falhas terapêuticas ou o desenvolvimento de efeitos colaterais. As diferenças individuais relacionadas à resposta das doses preconizadas de FNT podem ser parcialmente explicadas pela presença dos polimorfismos genéticos da enzima *CYP2C9*. Portanto, pesquisar e conhecer a frequência destes polimorfismos em uma população local de pacientes com epilepsia é fundamental para o correto manejo clínico, evitando possíveis efeitos colaterais.

Outro ponto que devemos levar em conta quando relacionamos nível sérico de FNT e efeitos colaterais é o papel dos transportadores intestinais. Diferenças na expressão destes genes como *MDR1* e *MRP2* podem influenciar variabilidade farmacocinética da FNT (Simon *et al.*, 2007).

## 1.5 ATROFIA CEREBELAR ASSOCIADA À FENITOINA

Há muitos anos, antes mesmo da introdução da FNT, a atrofia cerebelar foi reconhecida por estudos neuropatológicos (Spielmeyer, 1930, Dam, 1970, Honavar e Meldrum, 2002) ocorrendo em alguns pacientes com epilepsia crônica. Ao longo dos anos esta atrofia tem sido atribuída de modo variável a vários fatores, como dano celular mediado pelas crises, efeitos tóxicos das drogas antiepilépticas, injúria anóxica durante as crises ou uma combinação destes fatores (Ney *et al.*, 1994, Savic e Thorell, 1996, Specht *et al.*, 1997). Esta questão é pouco clara, provavelmente devido ao fato de sua análise ser confundida pelo motivo de que, geralmente, pacientes com epilepsias graves comumente utilizam altas doses de drogas antiepilépticas.

Estudos neuropatológicos de análise pós-morte de pacientes epiléticos mostram uma redução significativa na densidade de células de Purkinje comparados a controles sem epilepsia (Crooks *et al.*, 2000). Embora alguns poucos investigadores acreditam não haver uma relação entre epilepsia e atrofia cerebelar, a ideia geral é de que a atrofia pode ser causada diretamente pela epilepsia crônica, ainda que o exato mecanismo ainda não seja claro (Minogue e Latham, 1945, Meyer, 1958).

Além da própria epilepsia, vários outros estudos em humanos e animais mostram a contribuição da FNT para atrofia cerebelar (Ballenger *et al.*, 1982, Dam, 1987, Ney *et al.*, 1994, Luef *et al.*, 1996) sugerindo que o mecanismo envolvido seja a morte das células de Purkinje e a degeneração axonal, porém o exato mecanismo ainda não é claro. A atrofia cerebelar pode ser induzida em animais (Utterback *et al.*, 1958, Kokenge *et al.*, 1965, Perez del Cerro e Snider, 1967), encontrada em humanos sem epilepsia (Masur *et al.*, 1989, Masur *et al.*, 1990) ou em humanos com epilepsia bem controlada (McLain *et al.*, 1980, Lindvall e Nilsson, 1984) após a exposição aguda ou crônica à FNT.

A ocorrência de atrofia cerebelar em pacientes que utilizaram FNT, seja de forma aguda (Tan *et al.*, 2001, Zuin *et al.*, 2003) ou crônica, pode ocorrer em até 50% dos pacientes (Del Negro *et al.*, 2000). Pacientes com maior idade no início do tratamento, que utilizaram doses de FNT mais elevadas ou por maior tempo, têm

uma incidência e uma severidade maior de atrofia cerebelar (De Marcos *et al.*, 2003). A FNT pode causar graus variados de perda das células de Purkinje, com ou sem preservação das vias de saída cerebelares, um padrão diferente do observado em pacientes com atrofia pontocerebelar (Lee *et al.*, 2003). Muitas hipóteses têm sido propostas para explicar o fenômeno de atrofia cerebral e cerebelar como excitotoxicidade (Dam, 1970, Meldrum, 1978, Salcman *et al.*, 1978), hipóxia durante crises secundariamente generalizadas, toxicidade de drogas antiepilépticas, principalmente a FNT (Ghatak *et al.*, 1976, Lindvall e Nilsson, 1984, Ney *et al.*, 1994), e danos cerebrais preexistentes resultantes do dano epileptogênico inicial (Ney *et al.*, 1994). Crooks *et al.*(2000), demonstraram em um estudo histopatológico que a atrofia cerebelar em pacientes epiléticos, medida pela densidade de células de Purkinje, existe ( $p=0,015$ ) mesmo naqueles casos em que o cerebelo tem aparência macroscópica normal. Em um único paciente que não tinha história de tratamento prévio com FNT foi observado apenas uma perda leve e focal das células de Purkinje, entretanto em dois pacientes com episódios documentados de toxicidade pela FNT a densidade das células de Purkinje foi uma das mais baixas encontrada em todo o grupo de estudo. Em experimentos com animais, descargas focais induzidas pelo uso de penicilina mostraram-se capazes de desencadear disparos das células de Purkinje e neurônios no núcleo denteado (Julien e Halpern, 1972). Portanto é possível que impulsos excitatórios freqüentes e excessivos durante as crises convulsivas possam através de vias glutamatérgicas cortico-pontinas induzir a atrofia cerebelar (Stubgen, 1995). Um dado interessante é o de que as células de Purkinje são a segunda população de células neuronais mais suscetíveis ao dano hipóxico (Norman, 1964). Mas Salcman *et al.*(1978) postulam que o dano hipóxico não explica totalmente as alterações histopatológicas encontradas. Este autor encontrou que lesões unilaterais ou marcadamente assimétricas são mais freqüentes nestes pacientes que um envolvimento simétrico como visto no dano hipóxico. Portanto o mecanismo que leva a morte neuronal nos pacientes epiléticos parece não ser explicado apenas pela injúria hipóxica e provavelmente outros mecanismos peculiares a este grupo de pacientes estejam envolvidos.

Outra droga além da FNT já foi relacionada ao desenvolvimento de atrofia cerebelar. O ácido valpróico aparece em alguns relatos de caso associado a este efeito adverso (Papazian *et al.*, 1995, Ghosh *et al.*, 2011).

Outro ponto de vista seria com relação ao papel do cerebelo no controle das crises epilépticas. Os achados de perda grave das células de Purkinje no córtex cerebelar de indivíduos epilépticos pode levantar a possibilidade de que o cerebelo tenha papel significativo no processo de inibição das crises (Salcman *et al.*, 1978) e isso poderia eventualmente levar a uma perda progressiva de um sistema de controle das crises epilépticas aumentando a chance do desenvolvimento de uma epilepsia refratária.

As alterações patológicas da substância branca tem sido implicadas tanto no desenvolvimento do potencial epileptogênico quanto nas comorbidades relacionadas à epilepsia (Hermann *et al.*, 2002). Entretanto, pouco se sabe a respeito sobre influência das drogas antiepilépticas sobre a substância branca. A administração de FNT em ratos recém-nascidos podem resultar em uma redução do peso e tamanho cerebelar (Ohmori *et al.*, 1992). Alterações da substância branca, camada de células de Purkinje e camada granular já foram relatadas após a exposição de ratos a esta droga (Tauer *et al.*, 1998). Os principais achado são de edema múltiplo e difuso ao longo do axônio. Este fenômeno ocorre mesmo com doses de 40 mg de FNT. Estes efeitos citotóxicos que ocorrem após o tratamento podem gerar degeneração dendrítica, alterações celulares morfológicas e quebra das conexões estabelecidas previamente.

Somando-se à epilepsia e ao uso de FNT, a idade também é um fator a ser considerado na análise da atrofia cerebelar. Alguns estudos mostram uma correlação entre o aumento da idade com o grau de desenvolvimento de atrofia cerebelar (Hall *et al.*, 1975, Crooks *et al.*, 2000).

A disponibilidade da ressonância magnética cerebral tem levado a um aumento do reconhecimento da atrofia cerebelar, baseados em critérios visuais. Entretanto, este diagnóstico não implica em um processo patológico e pode, na realidade, ser apenas uma variação da normalidade ou uma atrofia secundária ao

envelhecimento (Pfefferbaum *et al.*, 1994, Strassburger *et al.*, 1997, Luft *et al.*, 1998). Portanto, este tipo de diagnóstico pode ser evitado somente pela análise quantitativa, por ressonância magnética encefálica (RME)(Moran *et al.*, 1999).

## 1.6 VOLUMETRIA ENCEFÁLICA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

Através dos anos a atrofia cerebelar vem sendo investigada não apenas por métodos neuropatológicos, mas também por métodos de imagem. Recentemente, com os novos pacotes de softwares disponíveis (capacidade técnica para volumetrias) e com a qualidade apurada das imagens, a RME tem se tornado a principal ferramenta para análise quantitativa de volumes cerebrais. Muitos estudos já utilizaram a RME para cálculo do volume cerebelar e quantificação da atrofia cerebelar em epiléticos ou em usuários de FNT(Masur *et al.*, 1989, Masur *et al.*, 1990, Ney *et al.*, 1994, Specht *et al.*, 1997), utilizando metodologia variável. E alguns destes trabalhos mostraram uma redução significativa no volume cerebelar dos pacientes epiléticos (Bohnen *et al.*, 1998, Lawson *et al.*, 2000, De Marcos *et al.*, 2003, Hagemann *et al.*, 2002, Hermann *et al.*, 2005, Luef *et al.*, 1996, Sandok *et al.*, 2000). Esta redução apresenta uma correlação linear com a duração da epilepsia (Hermann *et al.*, 2005), ou seja, quanto mais tempo de doença, mais atrofia cerebelar. Além disso, o tempo de uso de FNT, história de intoxicação por FNT(De Marcos *et al.*, 2003) e frequência de crises (Hagemann *et al.*, 2002), também podem contribuir significativamente para o desenvolvimento de atrofia cerebelar.

A segmentação de imagens de ressonância magnética cerebral é um passo fundamental na análise morfológica de diferentes doenças, na caracterização da relação entre função e estrutura cerebral e no planejamento e monitoramento dos tratamentos. Existem vários softwares disponíveis atualmente, porém muitos deles apresentam problemas de incompatibilidade de plataformas, suporte limitado a alguns formatos de arquivos e impossibilidade de edição manual das imagens (Pham *et al.*, 2000). Recentemente Bazin e colaboradores (Bazin *et al.*, 2005) desenvolveram ferramentas para o software *Medical Image Processing Analysis and Visualization*(MIPAV<sup>®</sup>)(McAuliffe *et al.*, 2001) que agrupam no mesmo programa etapas fundamentais no processamento de imagens como a 1) extração

*cerebral* – isolamento do cérebro e remoção das estruturas externas; 2) *classificação de tecidos* – identificação da substância cinzenta, substância branca e líquido cérebro-espinhal; 3) *alinhamento de Talairach* – alinhamento do cérebro em um sistema padrão de coordenadas (Talairach e Tournoux, 1988). Além disso, o sistema MIPAV<sup>®</sup> possui uma interface amigável e utiliza plataforma JAVA<sup>®</sup>, o que permite a execução em ambiente WINDOWS<sup>®</sup>.

Não encontramos na literatura recente um estudo que avalie através de análise volumétrica por RME os efeitos do polimorfismo do CYP2C9 no volume cerebelar em pacientes com epilepsia que utilizaram FNT. Conforme exposto acima, metabolizadores lentos de FNT (*CYP2C9\*2* e *CYP2C9\*3*), podem ser mais suscetíveis a intoxicação ou aos efeitos adversos durante o uso crônico de doses elevadas ou até mesmo usuais de FNT, e por isso estarem sujeitos ao desenvolvimento de atrofia cerebelar. Portanto, já que a etiologia da atrofia cerebelar nestes pacientes permanece desconhecida, nós pretendemos avaliar a associação da presença das variantes \*2 e \*3 com a atrofia cerebelar.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar se pacientes portadores dos alelos \*2 e \*3 do citocromo p450 *CYP2C9* (mutantes) e que utilizaram FNT apresentam um menor volume cerebelar total normalizado (VC/VIT) do que pacientes \*1 (selvagens).

### 2.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Avaliar diferença de volume entre mutantes e selvagens nos diferentes segmentos cerebrais tais como:

- Volume encefálico normalizado total (VE/VIT);
- Volume encefálico normalizado de substância branca (VE/VIT-B);
- Volume encefálico normalizado de substância cinzenta (VE/VIT-C);
- Volume cerebelar normalizado de substância branca (VC/VIT-B);
- Volume cerebelar normalizado de substância cinzenta (VC/VIT-C);

### **3 MATERIAISE MÉTODOS**

#### **3.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES**

Da população de pacientes com epilepsia atendidos no Ambulatório de Epilepsia - Adultos do Serviço de Neurologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) no período de Fevereiro de 2008 a Junho de 2009 foram selecionados os pacientes com diagnóstico comprovado de epilepsia e uso documentados no prontuário médico-hospitalar de FNT por no mínimo 1 ano.

Este ambulatório tem sua população formada principalmente por pacientes com epilepsia de difícil controle, referendados das Unidades Básicas de Saúde de Curitiba e do Estado do Paraná. Geralmente, a conduta utilizada no tratamento destes pacientes visando controlar as crises refratárias é tentar atingir a dose máxima tolerada do antiepiléptico (até o controle das crises ou aparecimento de efeitos adversos indesejados). Na maioria dos casos isto ocorre em até 6-12 meses de acompanhamento. Caso ocorram efeitos adversos indesejáveis, sem o controle das crises epiléticas, opta-se então pela adição de uma segunda ou terceira droga, antiepiléptica, conforme o caso.

Os pacientes foram entrevistados pelo próprio pesquisador e informados da finalidade e etapas da pesquisa, dos possíveis riscos e da natureza sigilosa das informações. Após o esclarecimento de eventuais dúvidas, receberam uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR registro número 1541.206/2007-10

Os pacientes que concordaram participar e assinaram o TCLE, foram incluídos na pesquisa e receberam um número de identificação.

A seguir, o prontuário médico-hospitalar do paciente era revisado, as informações relevantes eram conferidas com ele e seus acompanhantes, para identificar quais pacientes atendiam aos critérios de exclusão e inclusão abaixo especificados. Estes pacientes realizavam exame físico e neurológico, sempre pelo

próprio pesquisador, e todas estas informações eram registradas em formulário próprio.

### 3.1.1 Critérios de Inclusão

- Idade igual ou superior a 14 anos;
- Epilepsia comprovada por anamnese de equipe especializada;
- Uso documentado em prontuário médico de FNT por no mínimo 12 meses;

### 3.1.2 Critérios de Exclusão

- Presença confirmada ou suspeitada de doenças agudas ou crônicas que causem atrofia ou lesão cerebelar;
- Uso de substâncias que causem lesão cerebelar, como álcool e drogas ilícitas;
- Uso não documentado em prontuário de FNT.

### 3.1.3 Características dos Pacientes Selecionados

Foram identificados 134 pacientes com epilepsia e uso de fenitoína superior a 1 ano. Destes foram selecionados 100 pacientes que atendiam aos critérios de inclusão e exclusão. Os motivos de exclusão foram gestação em andamento ou suspeitada (2 pacientes), história de etilismo (2 pacientes), ataxia hereditária (1 paciente) e os outros 29 por não haver documentação adequada do uso de FNT ou efeitos adversos no prontuário.

A idade média no recrutamento foi  $39,6 \pm 10,3$  anos (variando de 17–72 anos). A idade média do início da epilepsia foi  $13,1 \pm 12,4$  anos (variando de 1 mês a 62 anos). A duração média da epilepsia foi de  $26,5 \pm 11,9$  anos (variando de 3–48 anos). A frequência média mensal de crises na população geral foi de 3,26. O tipo

mais frequente de síndrome epiléptica foi a localizada criptogênica (68%), seguindo pela localizada sintomática (23%), generalizada criptogênica (7%) e generalizada idiopática (2%). As características demográficas dos pacientes estão resumidos na Tabela 6. Apenas 9% dos pacientes não tinham apresentado crise epileptica no último ano.

TABELA 6. DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS DA POPULAÇÃO TOTAL EM ESTUDO (N=100).

<b>Característica</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>95% IC</b>
Idade (anos)	39,6	10,3	37,6-41,7
Frequência média mensal de crises	3,26	3,3	2,6-3,9
Idade no início da epilepsia (anos)	13,1	12,4	10,7-15,6
Tempo de uso de FNT (anos)	8,3	6,9	6,9-9,7
Duração da epilepsia (anos)	26,5	11,9	24,1-28,8
Mediana da dosagem de FNT (mg)	300	77,9	286-317

DP, desvio padrão; IC, intervalo de confiança; FNT, fenitoína

O tempo de uso médio de FNT foi  $8,3 \pm 6,9$  anos, com uma dosagem mediana de 300 mg por dia (Tabela 6). A maioria dos pacientes utilizou a droga em politerapia(65%). As outras drogas mais utilizadas foram fenobarbital (27%), carbamazepina (26%) e lamotrigina (20%). Também foram encontrados pacientes que usaram topiramato, clobazam, primidona e ácido valpróico, porém em menor número.

A maioria das crises foram do tipo parcial complexa, que ocorriam em 86% dos pacientes, com 73% delas acompanhadas por generalização secundária. Também foram encontradas crises do tipo tônico-clônico generalizada, mioclônica, parcial simples e ausência típica (Tabela 7).

TABELA 7. CARACTERÍSTICAS DOS TIPOS DE CRISES.

<b>Tipo de crise</b>	<b>Porcentagem</b>
Parcial simples	2
Parcial complexa	86
Parcial com generalização secundária	73
Ausência típica	1
Mioclônica	3
Tônico-clônica generalizada	11

Nestes 100 pacientes selecionados procedeu-se a coleta e genotipagem conforme detalhado nas próximas seções. Conforme o resultado da genotipagem dos alelos do *CYP2C9*, os 100 pacientes foram divididos em 2 grupos. O grupo MUTANTES (MUT) incluía os pacientes com presença de pelo menos um alelo mutante (variante *CYP2C9\*2* ou *CYP2C9\*3*) e o grupo SELVAGEM (SEL) incluía os pacientes que apresentavam apenas o genótipo normal ou selvagem (*CYP2C9\*1*), sem nenhum alelo mutante. Mais adiante explicaremos como se deu a seleção de alguns indivíduos do grupo MUT e do grupo SEL para realização das volumetrias.

### 3.2 COLETA DE SANGUE E EXTRAÇÃO DO DNA

O sangue para extração do DNA foi obtido por punção direta de veia periférica em antebraço realizada de forma asséptica, com coleta de 5-8 ml acondicionados em frasco próprio.

A extração de DNA foi realizada utilizando a técnica do Fenol–Clorofórmio, descrita por Sambrook *et al.* (1989). As amostras de sangue foram coletadas em tubo com EDTA 5% (BD Vacutainer®) e centrifugadas por 15 minutos a 5000 rpm. Em tubos Eppendorf separou-se a nata de leucócitos e adicionou-se 1 mL de Solução de Lise de Eritrócitos 10X (SLE 10X).

Após homogeneização, os tubos Eppendorf foram centrifugados a 12.000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Estas duas últimas etapas foram repetidas por mais duas vezes. Ao precipitado, adicionou-se proteínase K na concentração final 1 mg/mL e Dodecilsulfato de Sódio (SDS) em concentração final 0,5%.

Após misturar por inversão, os tubos foram incubados em banho-maria a 55°C por 2 horas no mínimo. Decorrido o tempo, 500µl de fenol saturado (pH 8,0) foi adicionado. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa (superior) foi retirada para tubo Eppendorf limpo e 500µl de fenol saturado (pH 8,0) e 400µl de clorofórmio foram adicionados.

Novamente, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (12000 rpm por 10 minutos) e a fase aquosa (superior) foi transferida para outro tubo Eppendorf limpo. Adicionou-se ao sobrenadante 50µl de Acetato de Sódio 3M e 800µl de etanol absoluto gelado. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante, e após, foi adicionado 500µl de etanol a 70% e centrifugado a 12000 rpm por 3 minutos.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os tubos contendo DNA foram levados ao banho seco. Após secar o DNA, adicionou-se de 50 a 200 µl de TE (Solução de TRIS-EDTA), dependendo do volume do precipitado do DNA.

### 3.3 GENOTIPAGEM

#### 3.3.1 Amplificação dos Alelos de Interesse

A amplificação dos alelos de interesse foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esta técnica possibilita a produção de numerosas cópias de sequências específicas de DNA. A lista de oligonucleotídeos utilizados, encontra-se resumida na Tabela 8.

TABELA 8. LISTA DOS OLIGOS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR

ENSAIO	TIPO	SEQÜÊNCIA	LOCALIZAÇÃO
CYP2C9*3	SENSO (3S <sub>1</sub> )	5'-AATAATAATATGCACGAGGTCCAGAGATGC-3'	EXON 7
	REVERSO (3R)	5'-GATACTATGAATTTGGGACTTC-3'	INTRON 7
CYP2C9*3	SENSO (3S <sub>2</sub> )	5'-AATAATAATATGCACGAGGTCCAGAGGTAC-3'	EXON 7
	REVERSO (3R)	5'-GATACTATGAATTTGGGACTTC-3'	INTRON 7
CYP2C9*2	SENSO	5'-TACAAATACAATGAAAATATCATG-3'	INTRON 1
	REVERSO	5'-CTAACAACCAGACTCATAATG-3'	INTRON 3

Fonte: Sullivan-Klose *et al.* (1996).

Para a detecção do variante *CYP2C9\*2* foi realizada PCR utilizando-se 15,2µL de água ultrapura, 2,5µl de Tampão 10x (1X), 1µL de MgCl<sub>2</sub> (2mM), 2 µL de dNTPs (200 mM), 1µL do iniciador universal 5'CTAACAACCAGACTCATAATG3' (50pmol), 1µL do iniciador reverso 5'TACAAATACAATGAAAATATCATG3' (50pmol), 0,3 µL de Taq DNA polimerase (1,5U) e 2µL de DNA genômico, resultando num

volume final de 25 µL. O programa no termociclador para esta PCR foi de 94°C por 5 minutos, no início, 94°C por 20 segundos, 55°C por 10 segundos, 72°C por 10 segundos, formando 35 ciclos e depois 72°C por 5 minutos (Sullivan-Klose *et al.*, 1996).

Para a detecção do variante *CYP2C9\*3* foram realizadas duas reações de PCR independentes, utilizando-se, na primeira reação, 14,2µL de água, 2,5µL de Tampão (1X), 2µL de dNTPs (200mM), 2µL de MgCl<sub>2</sub> (2mM), 1µL do iniciador universal 5'AATAATAATATGCACGAGGTCCAGAGATGC3' (50pmol), 1µL do iniciador reverso 5' GATACTATGAATTTGGGACTTC3' (50pmol), 0,3 µL de Taq DNA polimerase (cfi=1,5U) e 2µL de DNA genômico, resultando em um volume final de 25µL. Na segunda reação, foram utilizados 14,2µL de água, 2,5µL de Tampão (1X), 2µL de dNTPs (200mM), 2µL de MgCl<sub>2</sub> (2mM), 1µL do iniciador universal 5'AATAATAATATGCACGAGGTCCAGAGGTAC3' (50pmol), 1µL do iniciador reverso 5' GATACTATGAATTTGGGACTTC3' (50pmol), 0,3 µL de Taq DNA polimerase (1,5U) e 2µL de DNA genômico, resultando em um volume final de 25µL. O programa usado no termociclador para as duas reações de PCR foi de 94°C por 5 minutos, no início, 94°C por 20 segundos, 59°C por 10 segundos, 72°C por 10 segundos, formando 35 ciclos e depois 72°C por 5 minutos (Sullivan-Klose *et al.*, 1996).

### 3.3.2 Detecção do Produto de Amplificação

Para detecção do produto de amplificação, realizou-se a eletroforese em gel de acrilamida 7%, utilizando-se 17 mL de água, 7 mL de acrilamida 30%, 3mL de TBE 10x, 240 µL de Persulfato de Amônio 10% e 40 µL de TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamino) para polimerização do gel. O tempo de corrida foi de aproximadamente 2 horas. Em seguida, o gel foi acidificado com ácido nítrico a 1%, então ficou imerso em nitrato de prata 0,2 g. diluído em 10 ml de água pura. Para revelação das bandas do produto amplificado, o gel foi imerso em uma solução contendo 170 ml de água, 5 g. de nitrato de prata e 100 µL de fenol. Após alguns minutos, observou-se o surgimento das bandas.

### 3.3.3 Interpretação dos Resultados

Uma vez confirmada a amplificação, o produto de PCR utilizado na detecção da variante 2 foi digerido em 5U da enzima de restrição *Ava II* a 37°C por 24 horas e, após a digestão, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida 8%, por 2 horas. As amostras contendo o alelo selvagem *CYP2C9\*1* apresentaram fragmentos de 527 e 164 pares de base e as amostras contendo o alelo *CYP2C9\*2* apresentaram um fragmento de 691 pares de base (Figura 1)(Sullivan-Klose *et al.*, 1996).

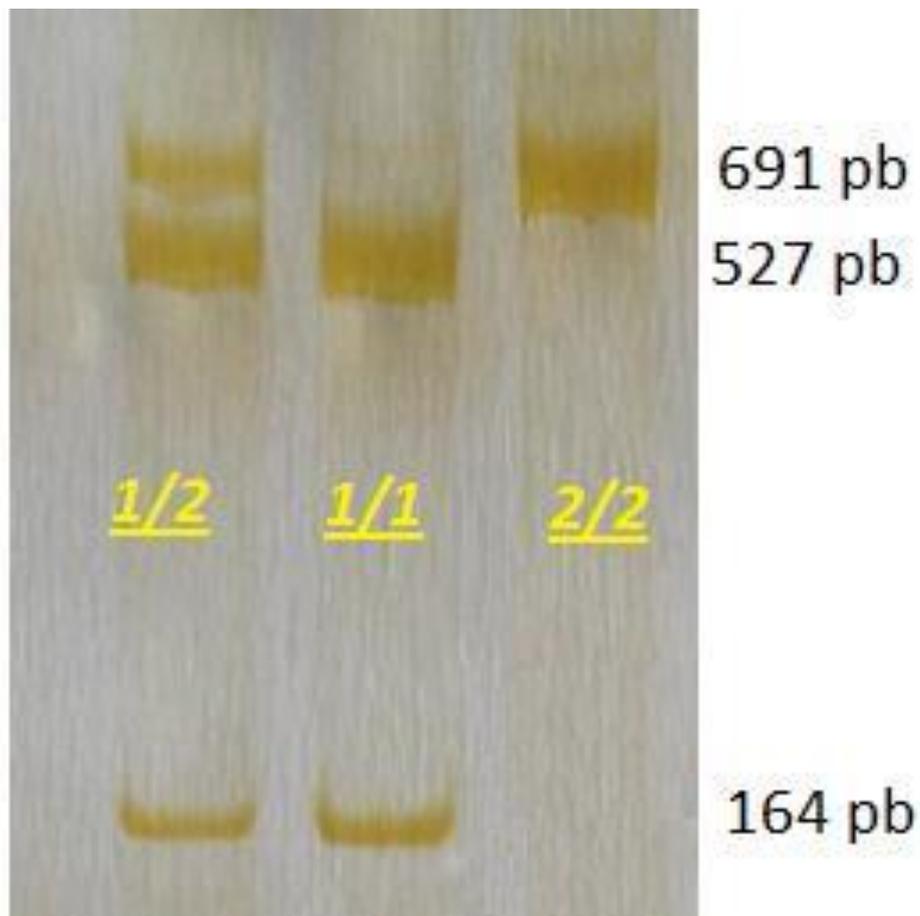


FIGURA 1. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS APÓS A RESTRIÇÃO PELA ENZIMA AVA2.

Do mesmo modo, o produto da amplificação para a variante *CYP2C9\*3* foi submetido à restrição com a enzima *KpnI* a 37 °C por 24 hs. As amostras com o alelo *CYP2C9\*1*, o produto de PCR não foi digerido, pois apresentaram um único fragmento com 141 pares de base e as amostras com alelo *CYP2C9\*3* apresentaram fragmentos com 111 e 30 pares de base (Sullivan-Klose *et al.*, 1996).

Na análise do alelo *CYP2C9\*3*, além do primer reverso comum (3R), dois oligos com sentidos diferentes foram usados para amplificar a região do exon 7, conforme demonstrado na Tabela 8. Um primeiro oligo (3S<sub>1</sub>) gera um sítio para a enzima *NsiI* (New England Biolabs, Herts, UK) no alelo selvagem, enquanto o outro oligo (3S<sub>2</sub>) amplifica um fragmento que contém um sítio na presença de *CYP2C9\*3* para a enzima *KpnI* (New England Biolabs, Herts, UK). Desta maneira, a presença da variação 1075A>C faz com que o fragmento seja digerido pela enzima *KpnI* (111 e 30 pb), mas não pela *NsiI* (151 pb). Assim, uma enzima confirma o resultado da outra (Sullivan-Klose *et al.*, 1996). A interpretação dos genótipos de *CYP2C9* foi realizada de acordo com a Tabela 9.

TABELA 9. INTERPRETAÇÃO DOS ALELOS APÓS A DIGESTÃO COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO ESPECÍFICA.

Enzima	Oligos	CYP2C9*1	CYP2C9*2	CYP2C9*3	Região analisada
<i>NsiI</i>	3S <sub>1</sub> e 3R	Digere (112 e 29 pb)	--	Não digere (151 pb)	CYP2C9*3
<i>KpnI</i>	3S <sub>2</sub> e 3R	Não digere (141 pb)	--	Digere (111 e 30 pb)	CYP2C9*3
AVA2	S e R	Digere (527 e 164 pb)	Não digere (691 pb)	--	CYP2C9*2

Fonte: Sullivan-Klose *et al.* (1996).

### 3.4 PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO

Como esperado, os produtos de amplificação mostraram-se adequados sem a presença de amplificação de bandas acessórias ou alelos muito próximos. Os resultados observados mostram que tanto a enzima *AVA2* quanto a *KpnI* e *NsiI* são específicas para o gene *CYP2C9*. Estes achados foram avaliados em outro estudo

que comparou vários métodos de genotipagem do *CYP2C9* (Yasar *et al.*, 1999) e observou que os *primers* utilizados por Sullivan-Klose *et al.* (1996) apresenta melhor especificidade, quando comparados a outras técnicas (Wang *et al.*, 1995).

### 3.5 DEFINIÇÃO DOS ALELOS

Os alelos foram interpretados e definidos conforme a Tabela 9 (Sullivan-Klose *et al.*, 1996). Após a digestão pela enzima *AVA2*, as amostras contendo o alelo selvagem *CYP2C9\*1* apresentaram fragmentos de 527 e 164 pares de base, ou seja eram totalmente digeridas. As amostras contendo o alelo *CYP2C9\*2* apresentaram um fragmento de 691 pares de base, ou seja, não eram digeridas.

Do mesmo modo, o produto de restrição para variante *CYP2C9\*3* foi submetido a restrição com a enzima *Kpn I*. As amostras com o alelo *CYP2C9\*1*, o produto de PCR não foi digerido, pois apresentaram um único fragmento com 141 pares de base (1/1) e as amostras com alelo *CYP2C9\*3*, apresentaram fragmentos com 111 e 30 pares de base. Analogamente se fez a interpretação da reação obtida pela enzima *Nsil*, mas de modo inverso a *Kpn I*, já que ao ser digerida representava amostra selvagem e a não digestão, representava amostra *CYP2C9\*3* (Sullivan-Klose *et al.*, 1996).

### 3.6 FREQUÊNCIA ALÉLICA ENCONTRADA

A frequência alélica observada neste grupo de pacientes usuários de FNT foi de 9% do alelo *CYP2C9\*2*, 7% do alelo *CYP2C9\*3* e 84 % do alelo *CYP2C9\*1* (Tabela 10). Nesta amostra de pacientes epiléticos usuários de FNT foi observado que 72 % dos pacientes apresentavam genótipo selvagem. O restante, 28%, apresentavam pelo menos um dos alelos mutantes investigados. Não foi encontrado nenhum caso de homozigose 3/3 (Tabela 11).

TABELA 10. FREQUÊNCIA ALÉLICA DAS VARIANTES DO CYP2C9 NA POPULAÇÃO ESTUDADA:

Alelo	Frequência
*1	0,84
*2	0,09
*3	0,07
Total	1

TABELA 11. QUADRO COMPARATIVO ENTRE AS FREQUÊNCIAS OBSERVADAS E ESPERADAS DE ACORDO COM O PRINCÍPIO DE HARDY-WEINBERG:

Genótipo	Número de pacientes	Frequência observada (%)	Frequência esperada (%) *
*1/*1	72	72	72.2
*1/*2	13	13	14.4
*1/*3	11	11	11
*2/*2	1	1	0.7
*2/*3	3	3	1.1
*3/*3	0	0	0.4

\*A frequência esperada foi calculada de acordo com a equação de Hardy-Weinberg. Não houve diferença significativa entre os grupos observados e esperada.

Utilizando-se o princípio de Hardy-Weinberg para estimar a frequência esperada, não apresentou diferença estatística significativa maior que a frequência genotípica encontrada. O valor de qui-quadrado obtido foi de 4,14 ( $p=0,52$ ), portanto a hipótese de igualdade estatística entre os valores esperados e observados é verdadeira (Tabela 11).

### 3.7 FORMAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO

Conforme o resultado da genotipagem dos alelos do *CYP2C9*, os 100 pacientes foram divididos em 2 grupos. O grupo MUTANTES (MUT) incluía os pacientes com presença de pelo menos um alelo mutante (variante *CYP2C9\*2* ou *CYP2C9\*3*) e o grupo SELVAGEM (SEL) incluía os pacientes que apresentavam apenas o genótipo normal ou selvagem (*CYP2C9\*1*), sem nenhum alelo mutante. Foram incluídos para o grupo SEL 72 pacientes e para o grupo MUT 28 pacientes. Foi necessário a exclusão de 2 pacientes do grupo SEL, devido a gestação e realização de tratamento cirúrgico de epilepsia (lobectomia temporal anterior), antes da volumetria cerebelar por RME. No grupo MUT foi excluído 1 paciente, também por

ter realizado lobectomia temporal anterior antes da volumetria. Para a avaliação da volumetria encefálica por RME, conforme o protocolo de aquisição especificado abaixo, foram criados 2 novos grupos de estudo a partir dos 27 pacientes do grupo MUT e dos 70 pacientes do grupo SEL. O Fluxograma da seleção dos pacientes está resumido na Figura 2.

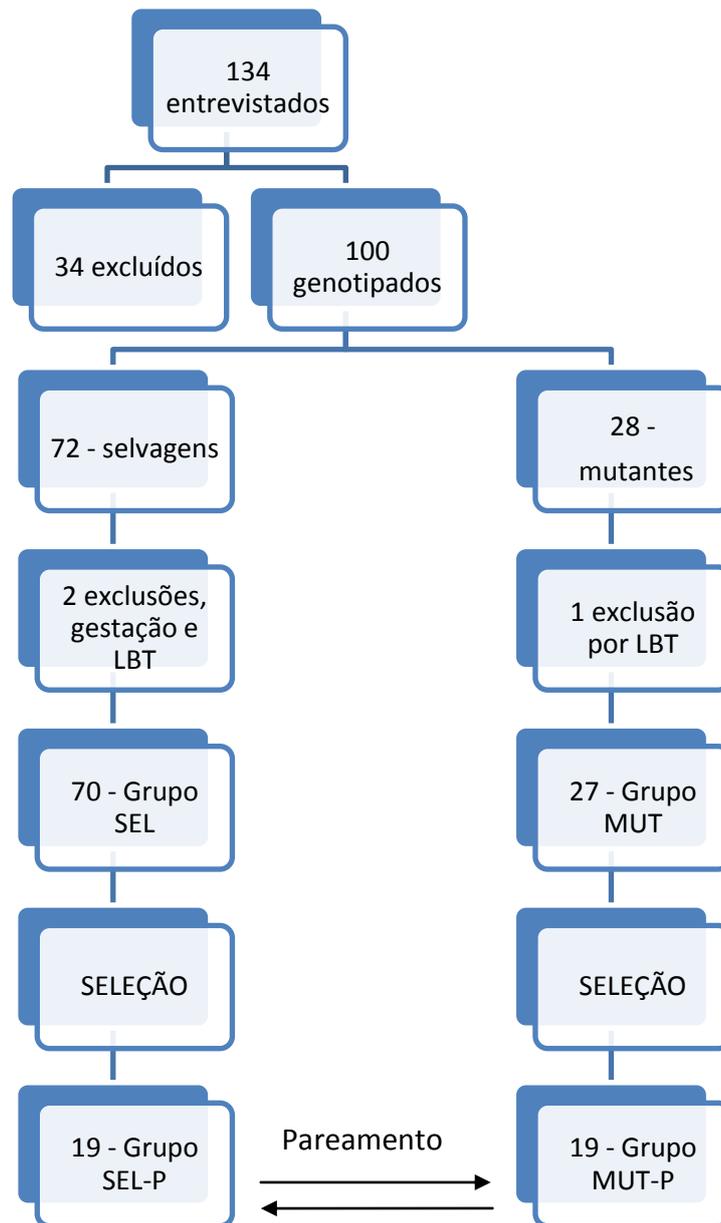


FIGURA 2. FLUXOGRAMA RESUMIDO DO MODO DE FORMAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO.

LBT, Lobectomia temporal.

### 3.8 PAREAMENTOS DOS PACIENTES DOS GRUPOS PARA VOLUMETRIA

Para um adequado pareamento é essencial que as variáveis de possível confusão sejam igualadas ao máximo nos grupos, aplicando um limite de variação máximo e mínimo para achar os pares mais semelhantes possíveis sem diminuir excessivamente o grupo de estudo.

Utilizando como critério de seleção os limites de  $\pm 8$  anos para a variável tempo de uso de FNT e  $\pm 6$  anos para a variável tempo de epilepsia encontramos 19 pares de casos e controles (38 pacientes no total) possíveis, dentre os 97 pacientes. Logicamente à medida que diminuímos este limites de variação na tentativa de melhorar o pareamento, reduzimos o número de pares identificados.

Após esta seleção foram criados 2 novos grupos de estudo, incluindo 19 pacientes em cada um deles. O grupo MUTANTE PAREADO (MUT-P) foi selecionado do grupo MUT e o grupo SELVAGEM PAREADO (SEL-P) inclui os pacientes do grupo SEL, melhor pareados aos pacientes do grupo MUT.

### 3.9 VOLUMETRIA CEREBELAR E ENCEFÁLICA

As imagens foram adquiridas utilizando um único equipamento de ressonância magnética de 1,5 Tesla, marca Siemens ®, modelo Avanto, com aquisições realizadas no plano coronal. Os cortes foram adquiridos com 01 mm de espessura, sem intervalo entre os mesmos. As sequências são uma aquisição volumétrica 3D com ângulo de rotação de 7 graus, tempo de relaxamento de 20 ms, tempo de eco de 12ms, matriz 256x256, campo de visão de 256. Após a aquisição, as imagens foram gravadas e identificadas em mídia digital de acordo com o número do paciente.

O processamento das imagens e o cálculo do volume foi realizado utilizando o software MIPAV<sup>®</sup>, versão 4.3.0 de 03-Ago-2009, da *Biomedical Imaging Research Services Section*, ISL, CIT, NIH (Bazin *et al.*, 2005, Bazin *et al.*, 2007). O programa apresenta várias ferramentas, todas validadas com boa correlação e baixo erro (Bazin *et al.*, 2007).

Cada imagem passou por um processo automatizado para correção da não-uniformidade de intensidade do aparelho de ressonância. Este algoritmo de pré-processamento corrige para artefatos de sombra, frequentemente vistos nos exames de RME. Este método é robusto, acurado e totalmente automático (McAullife, 2008, Bazin *et al.*, 2007).

Então, procedemos a sequência de processamento descrita por Bazin *et al.* (2007) (Figura 3):

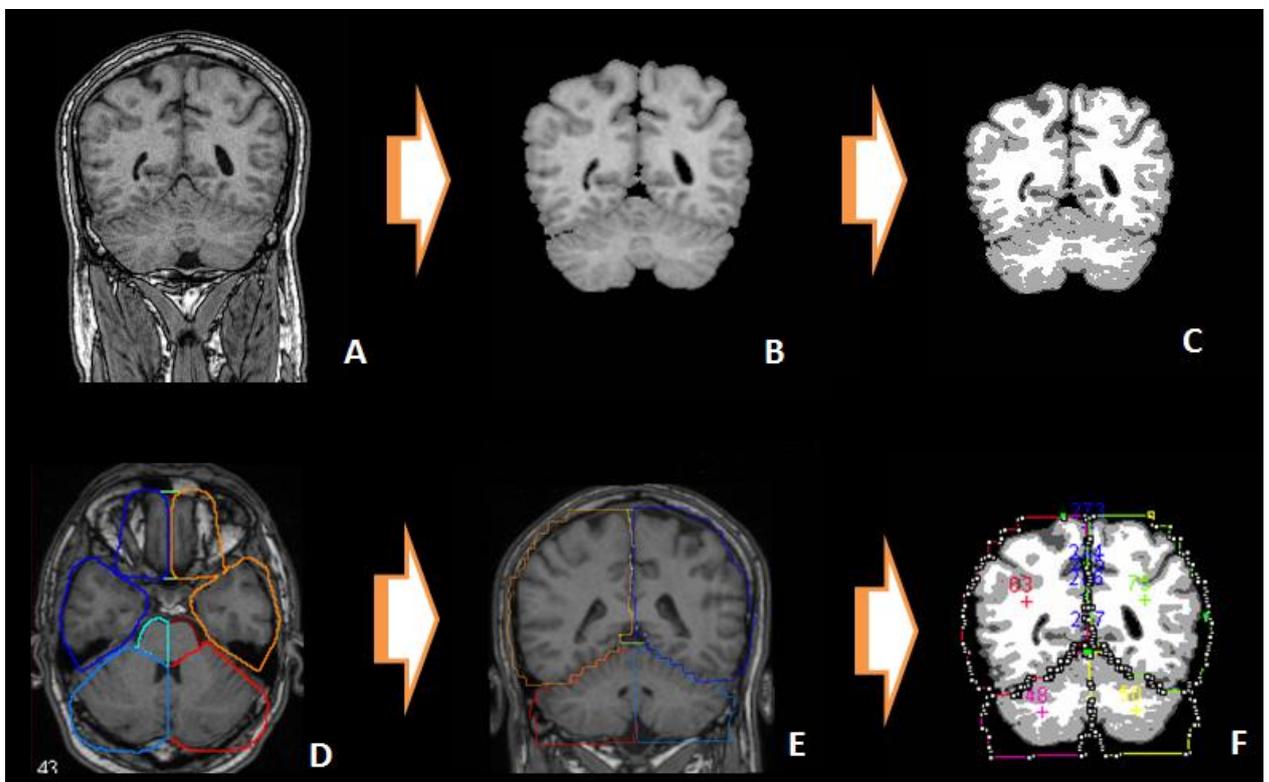


FIGURA 3. ETAPAS DO PROCESSAMENTO DAS IMAGENS PARA CÁLCULO DOS VOLUMES CEREBRAIS.

A) A caixa craniana e outros tecidos são extraídos de forma a isolar apenas o cérebro; B) Correção de artefatos de ruído e não-homogeneidade da imagem seguido da segmentação; C) Imagem final segmentada em substância branca, substância cinzenta e líquido; D) A imagem original é alinhada de acordo com os parâmetros de Talairach e em seguida os VOIs são carregados na imagem alinhada; E) A imagem alinhada e os VOIs são reconvertidos para imagem original; F) Os VOIs são copiados para a imagem segmentada e por fim procede-se o cálculo dos volumes.

Fonte: Bazin *et al.* (2007).

1ª. Etapa. **Ferramenta *Branstrip***: As imagens são processadas para se isolar os tecidos cerebrais, através deste método semiautomatizado (Bazin *et al.*, 2007). Neste estudo aplicamos a erosão das estruturas da caixa craniana até o limite da substância cinzenta (limite superior) e o limite inferior foi definido quando a substância branca começava a ser erodida. Então após o primeiro processamento, realizávamos duas dilatações para restabelecimento da substância cinzenta e liquor mais externo que haviam sido eliminadas na primeira etapa. Por fim os ventrículos eram preenchidos novamente pelo liquor através da ferramenta *hole filling*.

2ª. Etapa. **Ferramenta *Fantasm***: Classifica os tecidos cerebrais em substância branca, cinzenta e liquor. Esta ferramenta automaticamente classifica cada pixel da imagem como um dos tecidos, estima o campo de não-homogenidade (Bazin *et al.*, 2007).

3ª. Etapa: **Ferramenta *Talairach***: O sistema Talairach (Talairach e Tournoux, 1988) de coordenadas do cérebro humano é utilizado para descrever a localização das estruturas encefálicas, independente das diferenças individuais em tamanho ou forma do encéfalo. Outra contribuição do sistema é a de prover um atlas encefálico. O sistema talairach de coordenadas é definido marcando-se 4 pontos, a comissura anterior a comissura posterior e 2 pontos sagitais médios (Figura 4 e Figura 5). Com estes pontos a imagem original é realinhada ficando em um posicionamento padrão. Após o alinhamento, a caixa craniana é encaixada nas dimensões do atlas talairach (Figura 6). Assim o encefálo está alinhado e reformatado pronto para receber os volumes de interesse (VOIs) do atlas de talairach.

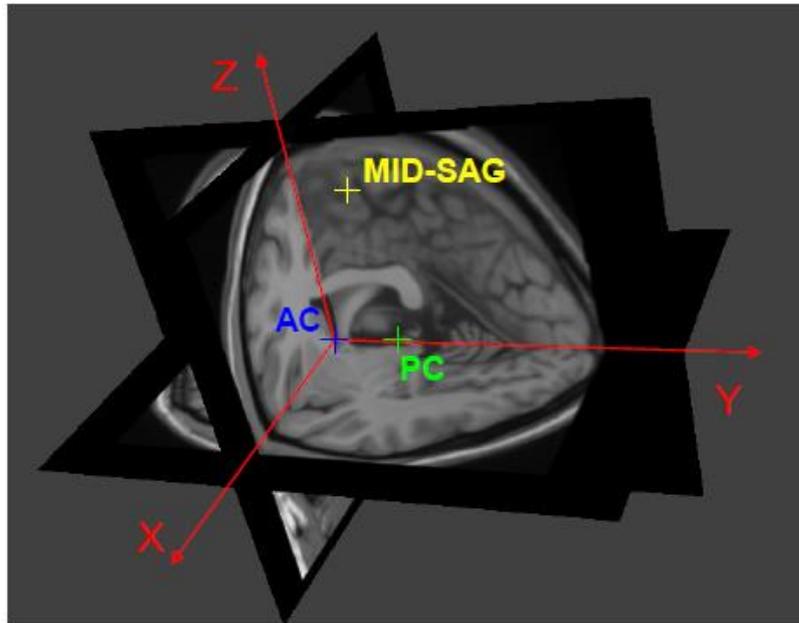
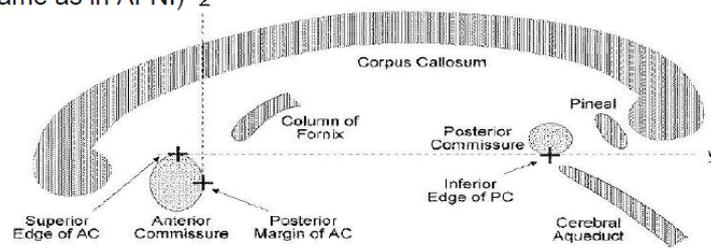


FIGURA 4. MARCAÇÃO DOS PONTOS DA COMISSURA ANTERIOR, POSTERIOR E SAGITAL MÉDIO PARA O ALINHAMENTO DE TALAIRACH.

AC: Comissura anterior, PC: Comissura posterior, MID-SAG: Ponto sagital médio.

Figura retirada do manual do software MIPAV. McAuliffe (2013).

The procedure followed in MIPAV  
(same as in AFNI) z



*Acknowledgements: thanks to the SSCC/NIMH group for providing good online material related to AFNI*

Five markers are needed to perform the alignment:

- AC superior edge** = top middle of anterior commissure
- AC posterior margin** = rear middle of anterior commissure
- PC inferior edge** = bottom middle of posterior commissure
- First mid-sag point** = some point in the mid-sagittal plane
- Second mid-sag point** = some other point in the mid-sagittal plane

FIGURA 5. DESENHO ESQUEMÁTICO DOS PONTOS DE REFERÊNCIA UTILIZADOS PARA MARCAÇÃO DAS COORDENADAS DE TALAIRACH.

Figura retirada do manual do software MIPAV. McAuliffe (2013).

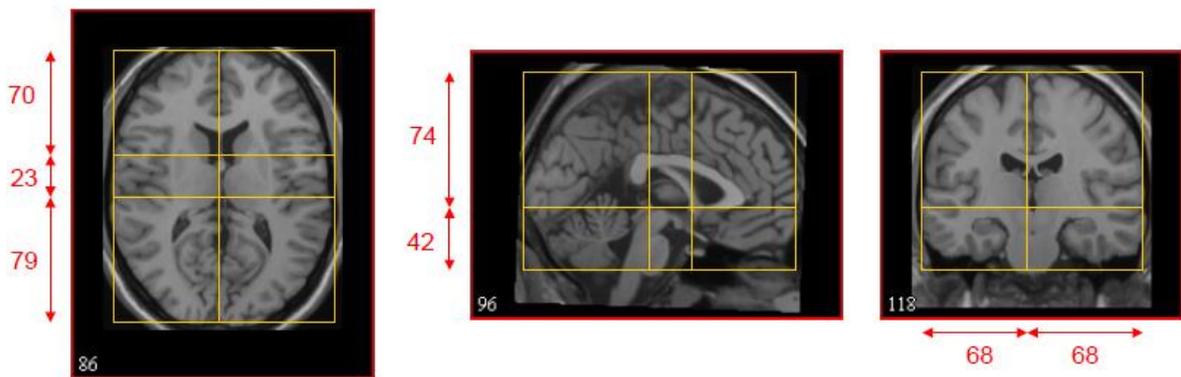


FIGURA 6. IMAGEM DO ENCÉFALO ALINHADO E COMPRIMIDO NA CAIXA DE TALAIRACH.

Figura retirada do manual do software MIPAV. McAuliffe (2013).

4ª. Etapa: **Carregamento dos volumes de interesse.** Os VOIs para o estudo eram carregados do atlas de Talairach sobre o encéfalo alinhado. Neste estudo, foi utilizado o atlas que continha os VOIs das estruturas principais encefálicas (*Main structures atlas*) contendo hemisférios cerebrais, tronco, fissura sagital e cerebelo. Eventuais erros no carregamento dos VOIs eram ajustados manualmente de modo a obter a correta delimitação das estruturas encefálicas.

5ª. Etapa. **Transformação inversa do atlas:** O cérebro alinhado nas coordenadas de Talairach contendo os VOIs eram então transformados de volta para o cérebro em seu volume original assim como os VOIs.

6ª. Etapa. **Estatística dos VOIs:** Por fim, realizava-se a medida do volume dos tecidos classificados dentro dos VOIs de maneira automática pelo software.

Ao término do cálculo realizado pelo software, os volumes dos hemisférios cerebrais, da fissura sagital e do tronco foram somados e a este valor chamou-se de volume encefálico (VE). O volume cerebelar foi obtido pela soma do volume dos hemisférios cerebelares incluindo o vermis (VC). Tanto VE como VC foram obtidos excluindo-se o líquido. Então, obtivemos o valor de VE e VC para substância branca, substância cinzenta e total. Para o cálculo do volume intracraniano total (VIT) foi utilizada a soma de VE com VC incluindo-se, somente neste caso, o líquido. Então:

- $VE = \text{volume dos hemisférios cerebrais} + \text{fissura sagital} + \text{tronco};$

- VC = volume dos 2 hemisférios cerebelares;
- VIT = VE + VC + líquido.

Como o tamanho da caixa craniana pode variar de indivíduo para indivíduo realizamos o cálculo dos volumes brutos (VC ou VE) e dividimos pelo VIT (normalização) e multiplicamos por 100. Portanto as variáveis foram reportadas em porcentagem (%). Assim obtivemos as seguintes variáveis:

- VE/VIT = Volume encefálico total normalizado;
- VC/VIT = Volume cerebelar total normalizado;
- VE/VIT-B = Volume encefálico da substância branca normalizado;
- VE/VIT-C = Volume encefálico da substância cinzenta normalizado;
- VC/VIT-B = Volume cerebelar da substância branca normalizado;
- VC/VIT-C = Volume cerebelar da substância cinzenta normalizado;

O processamento das imagens e o cálculo das volumetrias foi executado pelo próprio pesquisador, sem identificação do paciente, do grupo de estudo ou do perfil genotípico.

### 3.10 CONFIABILIDADE INTERNA E EXTERNA

Utilizamos duas medidas de todos os exames de volumetria para checagem da validade interna. Todas amostragens foram realizadas pelo mesmo examinador (o próprio investigador), em dias diferentes, de modo cego ao resultado anterior e se o paciente era mutante ou selvagem.

Já, para a checagem da confiabilidade externa selecionamos aleatoriamente 10 exames por sorteio, 26,3% da amostra total. Estes exames foram analisados por médico com experiência em volumetrias encefálicas, sem conhecimento dos resultados obtidos pelo pesquisador e cego ao perfil genotípico.

### 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para testarmos a hipótese de que a média do volume cerebelar normalizado era menor nos mutantes, em comparação aos indivíduos selvagens, realizamos uma análise multivariada para as variáveis quantitativas. Ao testarmos a hipótese através da análise multivariada foram controladas as variáveis idade, sexo, tempo de FNT, tempo de doença e frequência média mensal de crises, utilizando-se para tanto o modelo de regressão Beta com o uso do teste de Wald. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística.

Na comparação das características clínico demográficas entre o grupo SEL-P e MUT-P em relação à distribuição de sexo do paciente, foi considerado o teste exato de Fisher. As demais características foram analisadas através do teste t de Student.

Para avaliação do erro de método intra-observador investigou-se a existência de erro sistemático, considerando-se o teste t de Student para amostras pareadas, e estimou-se o erro de Dahlberg. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística. Também comparamos a primeira e segunda medidas (confiabilidade intra-observador), para cálculo de confiabilidade, de teste-reteste através do teste de Pearson. E o mesmo teste também foi utilizado na análise da confiabilidade inter-observador. De modo geral, correlação entre 0,6 e 0,7 são aceitos como sendo de boa confiabilidade e índices acima de 0,7 apresentam confiabilidade excelente.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERÍSTICAS DOS GRUPOS SEL-P E MUT-P

As características clínicas e demográficas de ambos os grupos estão resumidas na Tabela 12. A média de idade do grupo MUT-P (39,3 anos) foi superior à do grupo SEL-P (37,9 anos). Porém o tempo de uso de FNT e o tempo de doença foram maiores no grupo SEL-P. Apesar desta discreta diferença entre os grupos nenhum dos possíveis fatores de confusão analisados (idade, sexo, tempo de uso de FNT, tempo de doença e frequência média mensal de crises) mostrou diferença estatística significativa.

TABELA 12. QUADRO COMPARATIVO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS DOIS GRUPOS MONTADOS PARA VOLUMETRIA:

<b>Característica</b>	<b>MUT-P n = 19</b>	<b>SEL-P n = 19</b>	<b>Valor de p*</b>
Idade (anos)	39,3 ± 8,4	37,9 ± 7,9	0,20
Sexo feminino	7	10	0,33**
Média da dosagem máxima de FNT (mg)	315 ± 80	305 ± 40	0,55
Tempo de uso de FNT (anos)	8,4 ± 4,1	9,7 ± 6,4	0,45
Duração da epilepsia (anos)	25,1 ± 13,0	26,1 ± 12,4	0,79
Frequência média mensal de crises	2,7 ± 2,9	2,8 ± 3,3	0,92
Numero de pacientes sem crises há 1 ano	1	3	0,6
Pacientes em politerapia	13	14	1,0
Fenobarbital	3	4	
Carbamazepina	3	4	
Lamotrigina	3	2	
Outros	4	4	
<b>EEG</b>			0,63
Atividade irritativa focal	10	12	
Alentecimento	4	2	
Normal	5	5	
<b>RME</b>			0,23
Esclerose mesial	4	6	
Normal	15	13	
<b>Efeito Colateral com FNT</b>			1,0
Sinais cerebelares	3	2	
Hipertrofia gengival	2	2	

\* Teste t de Student. \*\* Teste de Fisher.

MUT-P: grupo de indivíduos portadores de pelo menos um alelo mutante; SEL-P: grupo de indivíduos portadores de alelos selvagens.

Mesmo selecionando pacientes em um ambulatório de epilepsia refratária encontramos 1 paciente, do grupo MUT-P, e 3 pacientes, do grupo SEL-P, que

estavam sem crises há 12 meses. A maioria dos pacientes estudados utilizou alguma outra droga antiepilética associada a FNT, isto é, 13 indivíduos no grupo MUT-P e 14 no grupo SEL-P utilizaram politerapia antiepilética. Com relação aos achados eletroencefalográficos, de imagem e perfil de efeitos colaterais os grupos se mostraram muito semelhantes. Contudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 12).

#### 4.2 CONFIABILIDADE DAS MENSURAÇÕES

Para análise da confiabilidade interna foram efetuadas 2 medidas em 38 casos da variável VC/VIT, já que era a principal hipótese a ser testada. Na primeira medida obtivemos uma média de 7,1% ( $\pm 1,0\%$  dp) e na segunda medida média de 7,1% ( $\pm 1,1\%$  dp), com valor de p igual a 1,00. A medida de erro estimada foi 0,0019, indicando um erro relativo de 2,64%. O teste de Pearson indicou um ótimo grau de correlação entre as duas amostragens ( $r=0,96$ ,  $p < 0,0001$ ). Do mesmo modo a confiabilidade inter-observador do método empregado foi testada em 10 casos, selecionados aleatoriamente, para as variáveis VC/VIT, VE/VIT. O teste de correlação de Pearson indicou boa confiabilidade do método entre examinadores independentes para VE/VIT ( $r = 0,71$ ,  $p = 0,01$ ) e VC/VIT ( $r = 0,85$ ,  $p = 0,002$ ).

#### 4.3 ANÁLISE VOLUMÉTRICA DOS GRUPOS SEL-P E MUT-P COMPARATIVAMENTE

Os volumes brutos e seus valores normalizados estão relacionados nos Apêndices 1-6. As médias e os desvios padrões dos volumes encefálicos analisados estão listados na Tabela 13.

TABELA 13. DADOS OBTIDOS ATRAVÉS DA VOLUMETRIA ENCEFÁLICA E ANÁLISE ESTATÍSTICA ATRAVÉS DE REGRESSÃO LOGÍSTICA.

	MUT-P		SEL-P		Valor de p
	Média (%)	D P (%)	Média (%)	D P (%)	
VE/VIT	60,3	4,0	60,5	4,4	0,981
VC/VIT	6,8	1,2	7,4	0,8	0,130
VE/VIT-B	30,1	2,1	31,1	2,9	0,358
VC/VIT-B	1,8	0,3	2,3	0,4	0,002*
VE/VIT-C	29,5	2,5	29,5	2,2	0,318
VC/VIT-C	4,8	0,9	5,1	0,8	0,790

Modelo de regressão Beta – teste de Wald.

\* Dados com significância estatística ( $p < 0,05$ )

DP = Desvio padrão; VC/VIT = Volume cerebelar total normalizado; VE/VIT = Volume encefálico total normalizado; VC/VIT = Volume cerebelar total normalizado; VC/VIT-B = Volume cerebelar da substância branca normalizado; VC/VIT-C = Volume cerebelar da substância cinzenta normalizado; VE/VIT-B = Volume encefálico da substância branca normalizado; VE/VIT-C = Volume encefálico da substância cinzenta normalizado;

Como as variáveis idade, sexo, tempo de FNT, tempo de doença e frequência média mensal de crises têm associação com as variáveis da volumetria cerebelar efetuou-se uma análise comparando-se os grupos, em relação a estas variáveis, controlando-se aquelas através de regressão logística. A hipótese principal de atrofia cerebelar nos indivíduos mutantes mostrou-se nula. Observamos que o VC/VIT, obtidos com a somatória da substância branca e cinzenta é de 7,4% (Dp = 0,8%) no grupo SEL-P e de 6,8% (Dp = 1,2%) no grupo MUP-P e não houve diferença estatística significativa ( $p = 0,13$ ). Do mesmo modo, a comparação entre os grupos do VC/VIT-C não apresenta diferença estatística ( $p = 0,79$ ). Todos os demais volumes estudados para somatória da substância cinzenta e branca ou substância cinzenta isolada mostraram uma média maior no grupo SEL-P, porém todos sem atingirem significância estatística (Tabela 14).

Todavia, analisando-se de forma isolada a substância branca do cerebelo, normalizada para o volume intracraniano total (VC/VIT-B), encontramos uma média de 2,3% (Dp = 0,4%) no grupo SEL-P e 1,8% (Dp = 0,3%) no grupo MUT-P com valor de  $p = 0,002$  (Tabela 14).

Os dados obtidos da relação entre o volume encefálico sobre o volume intracraniano total (VE/VIT) dos dois grupos são muito semelhantes e sem diferença estatística. Isto foi observado tanto para substância cinzenta, tanto para substância branca como para a somatória destes componentes (Tabela 13).

## 5 DISCUSSÃO

O principal intuito das investigações farmacogenéticas é procurar uma possível ligação entre o perfil metabolizador e um determinado fenótipo. Neste estudo tentamos avaliar se a presença das variantes *CYP2C9\*1*, *CYP2C9\*2* e *CYP2C9\*3* do citocromo P450 poderia influenciar de alguma forma o volume cerebelar de um grupo de pacientes epiléticos usuários de FNT. Apesar de o VC/VIT ser menor no grupo de indivíduos mutantes esta diferença não foi significativa. Entretanto, a análise da VC/VIT-B foi estatisticamente menor no grupo de indivíduos mutantes. E portanto, indicando talvez um padrão específico de atrofia cerebelar relacionado ao uso da FNT.

Inúmeros estudos já avaliaram o volume cerebelar em pacientes epiléticos. Alguns através da inspeção visual (Specht *et al.*, 1997) e outros por meio de métodos de imagem quantitativos (Luef *et al.*, 1996, Bohnen *et al.*, 1998, Sandok *et al.*, 2000, Lawson *et al.*, 2000, Del Negro *et al.*, 2000, Hagemann *et al.*, 2002, De Marcos *et al.*, 2003, Hermann *et al.*, 2005, Szabo *et al.*, 2006, McDonald *et al.*, 2008). A análise de alguns destes trabalhos (Tabela 14) mostra claramente que paciente epiléticos têm um menor volume cerebral e cerebelar que controles normais.

TABELA 14. TRABALHOS DE RESSONÂNCIA QUANTITATIVA DA ATROFIA CEREBELAR EM PACIENTES COM EPILEPSIA.

<i>Estudo</i>	<i>N</i>	<i>Técnica</i>	<i>Resultados</i>
Bohnen <i>et al.</i> (1998)	54	Semiautomatizada, 1.5-1.6 mm	Pacientes sem lesões cerebelares tinham menor volume do aqueles com lesão
Lawson <i>et al.</i> (2000)	231/44	Manual	Volume cerebelar 10% menor nos pacientes
De Marcos <i>et al.</i> (2003)	56/20	Manual, 6 mm	Atrofia cerebelar em 35,7% dos pacientes
Hagemann <i>et al.</i> (2002)	57/36	Semiautomática, 1.5 mm	Pacientes com atrofia cerebelar mostraram menor volume que controles
Luef <i>et al.</i> (1996)	11/20	Manual e automática, 1.1-1.4 mm	Volume cerebelar não correlacionou com os sintomas clínicos
Sandok <i>et al.</i> (2000)	185/80	Manual, 1.5-1.6 mm	Atrofia cerebelar presente em 16,2 % dos pacientes

N = Número de pacientes e controles

Isto ocorre tanto em pacientes com epilepsia focal, como do lobo temporal (Hermann *et al.*, 2005), e em crianças (Lawson *et al.*, 2000). A atrofia cerebelar tem uma prevalência variando de 16,2 a 30 % em pacientes epiléticos (Ney *et al.*, 1994, Specht *et al.*, 1997, Sandok *et al.*, 2000). No presente estudo não foi avaliada a prevalência de atrofia cerebelar, pois o objetivo era estudar a relação entre presença da mutação do *CYP2C9* e volume cerebelar. Sabemos que indivíduos mutantes do *CYP2C9* podem ter sua capacidade de metabolização da FNT reduzida em até 54 % (Adithan *et al.*, 2003). Trabalhos recentes mostram que a presença de um perfil genético de baixa metabolização da FNT está associada ao desenvolvimento de hiperplasia gengival (Soga *et al.*, 2004) e reações cutâneas (Lee *et al.*, 2004). E sabemos que alguns estudos já implicaram a FNT como um fator de risco para atrofia cerebelar (Luef *et al.*, 1996, De Marcos *et al.*, 2003). Estas evidências sugerem que usuários de FNT que sejam mutantes para o *CYP2C9*, mesmo utilizando as doses usuais de FNT, teriam um nível sérico de FNT mais elevado, e portanto um maior risco de efeitos adversos agudos ou crônicos. Assim surge a hipótese principal desta pesquisa. Será que este nível sérico de FNT elevado, ao longo de anos, não favoreceria o desenvolvimento de uma atrofia cerebelar mais grave ou mais frequente nestes usuários com mutação? Ao que parece, como observamos nesta amostra, não, mas em parte do cerebelo -na substância branca, possivelmente sim.

Existem poucos trabalhos na literatura avaliando o efeito das drogas antiepiléticas no volume cerebelar. A maioria são relatos de casos e dois estudos caso controle. Nestes dois últimos os resultados são conflitantes e abordam apenas a questão da FNT, não avaliando as outras drogas antiepiléticas. De Marcos *et al.* (2003) encontraram que, após análise de regressão múltipla, que o tempo de uso de FNT foi a variável que mais se correlacionou com a presença de atrofia cerebelar ( $p= 0.001$ ). Luef *et al.* (1996) encontraram, após o uso de regressão múltipla, uma correlação entre a dosagem diária de FNT e a duração do tempo de uso de FNT com o volume cerebelar. Entretanto, Hermann *et al.* (2005) e outros autores (Luef *et al.*, 1996, Lawson *et al.*, 2000) não encontraram associação com fatores relacionados ao tratamento como o uso ou o tempo de uso de FNT (Hermann *et al.*, 2005). As possíveis explicações para estes dados conflitantes são várias. Primeiro, existe grande dificuldade em se obter retrospectivamente informações clínicas

confiáveis sobre o uso de antiepiléticos e efeitos colaterais menores. Segundo, uma porcentagem significativa dos pacientes com epilepsia acaba utilizando múltiplas drogas para controle da epilepsia o que acaba interferindo na análise isolada do efeito de determinada droga antiepilética. E terceiro, não sabemos ao certo a respeito da variabilidade de metabolismo individual que, como aventamos na hipótese principal deste trabalho, poderia alterar o grau e perfil de efeitos colaterais, incluindo a atrofia cerebelar. Nenhum dos trabalhos citados acima levou em consideração ou tentou analisar as influências do metabolismo farmacogenético.

O papel da FNT na patogênese da atrofia cerebelar ainda não foi plenamente esclarecido. O tratamento com a FNT é frequentemente associado ao efeito cumulativo de hipóxia gerado pelas crises epilépticas repetidas. Liu *et al.* (2005) não encontraram associação entre o tratamento com a FNT, mesmo no uso prolongado ou na intoxicação aguda, com o volume cerebelar total. Porém, os autores ressaltam que as crises ou a própria FNT possa exercer um efeito seletivo regional. Portanto, estudos mais detalhados sobre as regiões dos hemisférios e vermis cerebelar são necessários. Nossos achados ainda sugerem que esta seletividade à atrofia pode estar relacionada a um determinado segmento histopatológico, no caso a substância branca, e não anatômico como Liu *et al.* (2005) acreditam.

A análise estatística baseada em voxels da substância cinzenta (SC) revela que existem alterações patológicas nos pacientes com epilepsia do lobo temporal, se comparados a indivíduos normais (Keller *et al.*, 2002, Coste *et al.*, 2002), e estas podem estender-se além dos hipocampos. Bonilha *et al.* (2006) encontraram uma redução significativa da SC em várias estruturas incluindo o cerebelo. Eles ressaltam que ainda não é claro, porque algumas regiões que são ativadas de maneira sincrônica desenvolvem atrofia da SC e outras regiões não. Bonilha *et al.* (2006) acreditam que isto possa refletir diferentes susceptibilidades regionais do cérebro aos efeitos excitotóxicos das crises.

Mas não é só a substância cinzenta que pode estar alterada. Inúmeros trabalhos de volumetria encefálica por RME têm demonstrado grandes alterações na substância branca (SB) de pacientes com epilepsia do lobo temporal (Hermann *et*

*al.*, 2002, Seidenberg *et al.*, 2005). Estas alterações ocorrem de maneira difusa e focal. Já foram evidenciadas no fornix (Seidenberg *et al.*, 2005), na amígdala (Cendes *et al.*, 1993, Bernasconi *et al.*, 1999), no giro do cíngulo (Seidenberg *et al.*, 2005), no tálamo (DeCarli *et al.*, 1998, Natsume *et al.*, 2003), nos gânglios da base (Dreifuss *et al.*, 2001), nos lobos temporais (Coste *et al.*, 2002), em todo hemisfério cerebral (Seidenberg *et al.*, 2005) e em estruturas mais distantes como o cerebelo (Lawson *et al.*, 2000, Sandok *et al.*, 2000). Alguns achados mostram que estas alterações são mais extensas e mais proeminentes naqueles pacientes com esclerose mesial (Concha *et al.*, 2009). Reduções da SB encontradas apenas em regiões ipsilaterais ao foco epiléptico, incluindo as regiões temporopolares, entorinal e peririnal já foram encontradas (Bernasconi *et al.*, 2004), mas existe um grande número de evidências indicando que este processo de atrofia é mais difuso, acometendo o hemisfério ipsilateral e contralateral ao foco epiléptico (Marsh *et al.*, 1997, Sisodiya *et al.*, 1997, Lee *et al.*, 1998, Seidenberg *et al.*, 2005). Estudos recentes realizados para o estudo da SB através de difusor de tensão e morfometria baseada em voxel (McMillan *et al.*, 2004, Mueller *et al.*, 2006, Gross *et al.*, 2006) mostraram que pacientes com esclerose mesial temporal apresentam reduções tanto da SC quanto da SB, quando comparados com controles normais, inclusive no cerebelo. Os autores ainda mostraram que as reduções de volume e concentração são mais extensas na SB (Mueller *et al.*, 2006). Como havíamos comentado, nenhum dos estudos citados acima procurou avaliar o possível efeito do perfil farmacogenético no volume cerebelar, nem tão pouco avaliaram a influência da FNT em uma possível seletividade para a substância branca.

Utilizando outra metodologia, a técnica de análise de volume de interesse (VOI), também foi encontrado estas alterações de volume da SB encefálica em pacientes com epilepsia temporal com início na infância (Hermann *et al.*, 2002) e em adultos (Hermann *et al.*, 2003). Essa redução foi associada significativamente a um pior desempenho cognitivo, atestando um significado clínico às anormalidades volumétricas. O autor ainda especula que a presença da epilepsia ou o uso de drogas antiepilépticas durante o período de crescimento máximo da SB, que ocorre até por volta dos 6-9 anos de idade, poderia afetar o desenvolvimento da SB. Porém os trabalhos baseados em análise volumétrica, que encontraram alterações da SB,

não analisaram isoladamente as SB e SC do cerebelo como nós fizemos, nem tão pouco tentaram correlacionar com as drogas antiepiléticas ou seu perfil metabolizador. Na comparação do grupo MUT-P com o SEL-P encontramos uma redução estatisticamente significativa do volume da SB cerebelar nos pacientes mutantes (2,3% no grupo SEL-P e 1,8% no grupo MUT-P com valor de  $p= 0,002$ ). Nenhum trabalho até o presente momento havia mostrado um padrão tão específico e localizado de atrofia cerebelar em pacientes metabolizadores lentos de FNT, mas algumas questões intrigantes podem ser levantadas neste ponto. Já que a atrofia acomete principalmente a substância branca, portanto os axônios, porque, no presente estudo, esta atrofia não foi observada na SB cerebral também, mas somente no cerebelo ?. Outra pergunta que surge é se em pacientes homozigotos 3/3 ou 2/2 eventualmente a atrofia não poderia ser maior ?. No grupo MUT-P foram agrupados tanto indivíduos homozigotos como heterozigotos, mas sabemos que existe uma diferença de metabolização entre estes genótipos (Hung *et al.*, 2004). Porém, como a amostra era pequena não pudemos efetuar análise de subgrupos.

Enfim, existem evidências de diminuição tanto da substância branca como da substância cinzenta em pacientes epiléticos. Mas o papel da FNT nesta alteração ainda não esta definida. A eliminação da FNT é realizada por oxidação hepática sob ação do *CYP2C9* (90%) e *CYP2C19* (10%) (Hung *et al.*, 2004, Rosemary *et al.*, 2006). Esta metabolização pode ser reduzida em 25 a 50% conforme o polimorfismo genético destes sistemas e pela interação com outras drogas que utilizem as mesmas vias (Hung *et al.*, 2004). No presente estudo encontramos uma redução do volume cerebelar da substância branca normalizado (VC/VIT-B) nos pacientes portadores de mutação *CYP2C9*\*2 e *CYP2C9*\*3 comparados aos selvagens. Mesmo assim, apesar dos nossos resultados apontarem uma certa seletividade, não acreditamos que a FNT atue de maneira tão específica no desenvolvimento da atrofia cerebelar. Ao contrário, conforme evidenciado nos parágrafos anteriores, o processo de acometimento cerebral e cerebelar parece ser mais difuso e generalizado. Um estudo com maior número de casos e mais mutantes homozigotos poderiam definir esta dúvida, se evidenciarem uma atrofia mais intensa e generalizada no grupo mutantes.

Sempre que estudarmos os fatores relacionados à atrofia cerebelar em indivíduos epiléticos outras variáveis precisam ser levadas em consideração. A frequência de crises, idade, duração da epilepsia, duração do tratamento com FNT e o total de crises generalizadas correlacionam-se significativamente com o desenvolvimento de atrofia cerebelar em epiléticos(Luef et al., 1996, Bohnen et al., 1998, Lawson et al., 2000, Sandok et al., 2000, Hagemann et al., 2002, De Marcos et al., 2003, Hermann et al., 2005). Estas correlações podem não ocorrer, dependendo da série estudada(Luef *et al.*, 1996, Bohnen *et al.*, 1998), mas a maioria das publicações apontam uma clara relação entre estas variáveis e o desenvolvimento de atrofia cerebelar(Lawson *et al.*, 2000, Sandok *et al.*, 2000, Hagemann *et al.*, 2002, De Marcos *et al.*, 2003). Hermann *et al.* (2005) encontraram uma queda significativa do volume cerebelar ajustado pela idade, sexo e volume intracraniano total, em função da duração da epilepsia. Nenhum destes estudos avaliou as substâncias branca e cinzenta isoladamente. No presente estudo tentamos anular o efeito destas variáveis para avaliar o efeito do perfil genotípico no grau e padrão de atrofia cerebelar.

Em indivíduos normais o uso de modelos de regressão linear mostram que existe uma perda significativa da SC com a idade(aproximadamente 11,5% aos 50 anos) e em menor volume da SB (Kruggel, 2006). Porém deve-se salientar que ambas contribuem para o estabelecimento da atrofia cerebral. A SC mostra um declínio começando já em indivíduos jovens e esta alteração é constante e linear através das idades. Entretanto, a SB mostra um padrão de mudança quadrático, ou seja, existe um ganho de volume até por volta dos 40 anos e a partir dos 50 anos inicia-se uma perda significativa (Ge *et al.*, 2002). Com isso temos uma queda no volume encefálico (-113 ml, - 8,2%/50 anos) o que conseqüentemente leva a um aumento significativo no volume do líquido cefaloraquidiano de aproximadamente +75 ml/50 anos(Kruggel, 2006). Esta diferença pode explicar a estabilidade do volume intracraniano total observado ao longo da vida (Kruggel, 2006). Além da idade o sexo também influencia no volume dos compartimentos cerebrais (Cowell *et al.*, 1994, Xu *et al.*, 2000, Kruggel, 2006). Kruggel(2006) observou que todos os compartimentos cerebrais são maiores em homens e portanto sugere que seja essencial adotarmos parâmetros de normalização sexo-específicos quando

comparamos volumes encefálicos . Estas alterações de volume relacionado a idade e sexo também se aplicam ao cerebelo (Raz et al., 1998, Luft et al., 1999). Entretanto o padrão de evolução da atrofia é conflitante. Raz et al.(1998) e Luft et al.(1998), sugerem que ocorra um padrão linear de atrofia com a idade. Luft *et al.*(1999), encontrou uma correlação exponencial entre o volume cerebelar total e a idade com um declínio mais acentuado do volume após os 50 anos. Nenhum destes trabalhos avaliou o comportamento da substância branca e cinzenta do cerebelo através das idades ou sua possível relação com o sexo.Durante a análise multivariada para comparação entre o grupo MUT-P e SEL-P todas estas possíveis variáveis de confundimento foram ajustadas.

A análise das atuais evidências sobre os padrões e causas da atrofia cerebral e cerebelar ainda não permitem conclusões sólidas. Apesar de alguns estudos mostrarem uma clara redução da substancia branca cerebelar em epiléticos nenhum trabalho havia mostrado, até o presente momento, uma ligação deste tipo seletivo de atrofia com o perfil metabolizador. Além disso, a correlação entre FNT e atrofia cerebelar aparece de forma inconsistente na literatura. As possíveis explicações para esta divergência são o uso de diferentes metodologias, populações heterogêneas e, como mostramos neste estudo, talvez o perfil metabolizador dos pacientes. Assim, o fato de alguns estudos não encontrarem uma correlação entre atrofia cerebelar e o uso da FNT eventualmente pode ser explicado pela amostra de pacientes com vários graus de metabolização a esta droga. O ideal seria desenhar uma coorte de pacientes com epilepsia sem uso de drogas antiepilépticas comparados a um grupo usando drogas antiepilépticas, mas isto é impossível por questões éticas.

Para um melhor entendimento da relação entre atrofia cerebelar e a epilepsia ainda é necessário o delineamento de pesquisas com um número maior de indivíduos e desenho prospectivo de forma a controlar de forma segura os efeitos das drogas antiepilépticas. Mas, como sugerimos neste estudo, uma melhor avaliação dos efeitos da farmacogenética no desenvolvimento da atrofia cerebelar merece atenção, pois poderia esclarecer muitas questões que ainda estão em aberto. Assim,

talvez no futuro possamos entender melhor o efeito da FNT no papel da gênese da atrofia cerebelar.

### 5.1 LIMITAÇÕES

Como este estudo inclui pacientes com epilepsia de diversas etiologias este grupo é inevitavelmente heterogêneo o que pode determinar uma susceptibilidade variável de dano cerebelar. Esta diversidade pode ter influenciado na capacidade do estudo em detectar diferenças em algumas variáveis analisadas. Além disso, é importante lembrar que em pacientes epiléticos é muito comum o uso concomitante de drogas antiepilépticas e como vimos esta interação pode induzir ou inibir a ação das enzimas do citocromo. Alguns relatos relacionam o ácido valpróico à atrofia cerebelar. É importante ressaltar que nesta amostra o comparativo entre o número de pacientes em politerapia entre os dois grupos analisados não mostrou diferença significativa. Além disso a utilização de um grupo heterogêneo (quanto a etiologia e tratamento) de pacientes é mais relevante para a população portadora de epilepsia que nós tratamos na prática clínica diária do que a análise de um grupo muito selecionado de pacientes.

Existem outros fatores que podem possivelmente contribuir para a atrofia cerebelar. Neste estudo não avaliamos o efeito das convulsões febris. Como este trabalho tinha como grupo de estudo indivíduos adultos a obtenção da história acurada de convulsão febril ficou prejudicada. Estudos prévios parecem mostrar que paciente com convulsão febril podem ter um padrão particular de perda do volume subcortical, porém estes achados precisam ser confirmados com estudo maiores (Dreifuss *et al.*, 2001, Natsume *et al.*, 2003). Também não avaliamos os níveis séricos de FNT nestes pacientes. Entretanto, parece não haver correlação destes níveis com o desenvolvimento de atrofia cerebelar (Luef *et al.*, 1996). No presente estudo a frequência de crises epilépticas foi analisada independente do tipo, parcial ou generalizada. Parece haver alguma correlação significativa da atrofia com a frequência de crises generalizadas (Hagemann *et al.*, 2002), mas existem trabalhos que não encontraram tal associação (De Marcos *et al.*, 2003). Acreditamos que os dados obtidos com estas variáveis não são confiáveis uma vez que sua obtenção,

mesmo através de dados de prontuários, é feita retrospectivamente. O mesmo viés pode ocorrer com a tentativa da análise da variável do histórico de uso de FNT endovenosa ou a variável efeitos colaterais. Sabemos que estes dados são frequentemente difíceis de se obter e efeitos colaterais menores poderiam ser subreportados.

Além disso, a amostra utilizada é pequena. Portanto nosso estudo pode estar sem força estatística para detectar pequenas alterações de volume entre os grupos estudados. Cabe lembrar ainda que existem trabalhos mostrando que os dados obtidos através da volumetria por RME são altamente dependentes do aparelho utilizado, força do campo magnético e espessura do corte (Pedraza *et al.*, 2004). Todos os participantes do nosso estudo foram registrados no mesmo aparelho de 1.5 Tesla usando o mesmo protocolo de cortes finos de 1 mm sem intervalo (GAP). Além disso as análises de confiabilidade interna e externa da metodologia empregada mostraram boa correlação. Entretanto, a generalização do nosso procedimento dependerá da obtenção de dados consistentes utilizando-se diferentes aparelhos de RME e replicação dos resultados obtidos.

## CONCLUSÕES

1. Não houve diferença significativa no volume cerebelar normalizado (VC/VIT) comparando-se o grupo mutante com o selvagem.

2. A análise do volume da substância branca cerebelar normalizada (VC/VIT-B) foi estatisticamente menor no grupo de indivíduos mutantes. Nos demais volumes estudados não houve diferença significativa.

O principal intuito das investigações farmacogenéticas é procurar uma possível ligação entre o perfil metabolizador e um determinado fenótipo. Neste estudo tentamos avaliar se a presença das mutações \*1,\*2 e \*3 do citocromo P450 poderia influenciar de alguma forma o volume cerebelar de um grupo de pacientes epiléticos usuários de fenitoína. Apesar de o volume cerebelar normalizado ser menor no grupo de indivíduos mutantes esta diferença não foi significativa. Entretanto, a análise da substância branca cerebelar normalizada foi estatisticamente menor no grupo de indivíduos mutantes. E portanto, indicando talvez um padrão específico de atrofia cerebelar relacionado ao uso da fenitoína.

A análise das atuais evidências sobre os padrões e causas da atrofia cerebral e cerebelar ainda não permitem conclusões sólidas. Apesar de alguns estudos mostrarem uma clara redução da substancia branca cerebelar em epiléticos nenhum trabalho havia mostrado, até o presente momento, uma ligação deste tipo seletivo de atrofia com o perfil metabolizador. Além disso, a correlação entre fenitoína e atrofia cerebelar aparece de forma inconsistente na literatura. As possíveis explicações para esta divergência são o uso de diferentes metodologias, populações heterogêneas e, como mostramos neste estudo, talvez o perfil metabolizador dos pacientes. Assim, o fato de alguns estudos não encontrarem uma correlação entre atrofia cerebelar e o uso da fenitoína eventualmente pode ser explicado pela amostra de pacientes com vários graus de metabolização a esta droga.

Para um melhor entendimento da relação entre atrofia cerebelar e a epilepsia ainda é necessário o delineamento de pesquisas com um número maior de

indivíduos e desenho prospectivo de forma a controlar de forma segura os efeitos das drogas antiepiléticas. Mas, como sugerimos neste estudo, uma melhor avaliação dos efeitos da farmacogenética no desenvolvimento da atrofia cerebelar merece atenção, pois poderia esclarecer muitas questões que ainda estão em aberto. Assim, talvez no futuro possamos entender melhor o efeito da fenitoína no papel da gênese da atrofia cerebelar.

## REFERÊNCIAS

- ADITHAN, C., GERARD, N., VASU, S., BALAKRISHNAN, R., SHASHINDRAN, C. H. & KRISHNAMOORTHY, R. 2003. Allele and genotype frequency of CYP2C9 in Tamilnadu population. *Eur J Clin Pharmacol*, 59, 707-9.
- AL RAJEH, S., AWADA, A., BADEMOSI, O. & OGUNNIYI, A. 2001. The prevalence of epilepsy and other seizure disorders in an Arab population: a community-based study. *Seizure*, 10, 410-4.
- ALIOGLU, Z., SARI, A., VELIOGLU, S. K., OUMI & ZMENOGLU, M. 2000. Cerebellar atrophy following acute phenytoin intoxication. *J Neuroradiol*, 27, 52-5.
- ANDERSON, G. D. 1998. A mechanistic approach to antiepileptic drug interactions. *Ann Pharmacother*, 32, 554-63.
- ANDERSON, G. D. 2004. Pharmacogenetics and enzyme induction/inhibition properties of antiepileptic drugs. *Neurology*, 63, S3-8.
- ANNEGERS, J. F., DUBINSKY, S., COAN, S. P., NEWMARK, M. E. & ROHT, L. 1999. The incidence of epilepsy and unprovoked seizures in multiethnic, urban health maintenance organizations. *Epilepsia*, 40, 502-6.
- ARIF, H., BUCHSBAUM, R., WEINTRAUB, D., KOYFMAN, S., SALAS-HUMARA, C., BAZIL, C. W., RESOR, S. R., JR. & HIRSCH, L. J. 2007. Comparison and predictors of rash associated with 15 antiepileptic drugs. *Neurology*, 68, 1701-9.
- AYNACIOGLU, A. S., BROCKMOLLER, J., BAUER, S., SACHSE, C., GUZELBEY, P., ONGEN, Z., NACAK, M. & ROOTS, I. 1999. Frequency of cytochrome P450 CYP2C9 variants in a Turkish population and functional relevance for phenytoin. *Br J Clin Pharmacol*, 48, 409-15.
- BAJPAI, M., ROSKOS, L. K., SHEN, D. D. & LEVY, R. H. 1996. Roles of cytochrome P450C9 and cytochrome P450C19 in the stereoselective metabolism of phenytoin to its major metabolite. *Drug Metab Dispos*, 24, 1401-3.
- BALLENGER, C. E., 3RD, LUCKE, J. F., KING, D. W., EL GAMMAL, T., BROOKS, B. S. & GREEN, J. B. 1982. Cerebellar atrophy in epilepsy and headache: lack of relationship to phenytoin. *Neurology*, 32, 910-2.
- BANERJEE, T. K., HAZRA, A., BISWAS, A., RAY, J., ROY, T., RAUT, D. K., CHAUDHURI, A. & DAS, S. K. 2009. Neurological disorders in children and adolescents. *Indian J Pediatr*, 76, 139-46.
- BAZIN, P.-L., CUZZOCREO, J. L., YASSA, M. A., GANDLER, W., MCAULIFFE, M. J., BASSETT, S. S. & PHAM, D. L. 2007. Volumetric neuroimage analysis extensions for the MIPAV software package. *Journal of Neuroscience Methods*, 165, 111-121.
- BAZIN, P.-L., MCAULIFFE, M., GANDLER, W. & PHAM, D. L. Year. Free software tools for atlas-based volumetric neuroimage analysis. In: *Proceedings of SPIE Medical Imaging*, 2005. 1824-1833.
- BELL, G. S. & SANDER, J. W. 2001. The epidemiology of epilepsy: the size of the problem. *Seizure*, 10, 306-14; quiz 315-6.
- BERNASCONI, N., BERNASCONI, A., ANDERMANN, F., DUBEAU, F., FEINDEL, W. & REUTENS, D. C. 1999. Entorhinal cortex in temporal lobe epilepsy: a quantitative MRI study. *Neurology*, 52, 1870-6.

- BERNASCONI, N., DUCHESNE, S., JANKE, A., LERCH, J., COLLINS, D. L. & BERNASCONI, A. 2004. Whole-brain voxel-based statistical analysis of gray matter and white matter in temporal lobe epilepsy. *Neuroimage*, 23, 717-23.
- BLEECKER, E. R., POSTMA, D. S., LAWRENCE, R. M., MEYERS, D. A., AMBROSE, H. J. & GOLDMAN, M. 2007. Effect of ADRB2 polymorphisms on response to longacting beta2-agonist therapy: a pharmacogenetic analysis of two randomised studies. *Lancet*, 370, 2118-25.
- BOHNEN, N. I., O'BRIEN, T. J., MULLAN, B. P. & SO, E. L. 1998. Cerebellar changes in partial seizures: clinical correlations of quantitative SPECT and MRI analysis. *Epilepsia*, 39, 640-50.
- BONILHA, L., MONTENEGRO, M. A., RORDEN, C., CASTELLANO, G., GUERREIRO, M. M., CENDES, F. & LI, L. M. 2006. Voxel-based morphometry reveals excess gray matter concentration in patients with focal cortical dysplasia. *Epilepsia*, 47, 908-15.
- BORGES, M. A., BARROS, E. P., ZANETTA, D. M. & BORGES, A. P. 2002. [Prevalence of epilepsy in Bakairi indians from Mato Grosso State, Brazil]. *Arq Neuropsiquiatr*, 60, 80-5.
- BROCKMOLLER, J., ROST, K. L., GROSS, D., SCHENKEL, A. & ROOTS, I. 1995. Phenotyping of CYP2C19 with enantiospecific HPLC-quantification of R- and S-mephenytoin and comparison with the intron4/exon5 G-->A-splice site mutation. *Pharmacogenetics*, 5, 80-8.
- BRODIE, M. J. & DICHTER, M. A. 1996. Antiepileptic drugs. *N Engl J Med*, 334, 168-75.
- CAVALLERI, G. L., MCCORMACK, M., ALHUSAINI, S., CHAILA, E. & DELANTY, N. 2011. Pharmacogenomics and epilepsy: the road ahead. *Pharmacogenomics*, 12, 1429-47.
- CENDES, F., ANDERMANN, F., GLOOR, P., EVANS, A., JONES-GOTMAN, M., WATSON, C., MELANSON, D., OLIVIER, A., PETERS, T., LOPES-CENDES, I. & ET AL. 1993. MRI volumetric measurement of amygdala and hippocampus in temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 43, 719-25.
- CLOYD, J., HAUSER, W., TOWNE, A., RAMSAY, R., MATTSON, R., GILLIAM, F. & WALCZAK, T. 2006. Epidemiological and medical aspects of epilepsy in the elderly. *Epilepsy Res*, 68 Suppl 1, S39-48.
- CONCHA, L., BEAULIEU, C., COLLINS, D. L. & GROSS, D. W. 2009. White-matter diffusion abnormalities in temporal-lobe epilepsy with and without mesial temporal sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 80, 312-9.
- COSTE, S., RYVLIN, P., HERMIER, M., OSTROWSKY, K., ADELEINE, P., FROMENT, J. C. & MAUGUIERE, F. 2002. Temporopolar changes in temporal lobe epilepsy: a quantitative MRI-based study. *Neurology*, 59, 855-61.
- COWELL, P. E., TURETSKY, B. I., GUR, R. C., GROSSMAN, R. I., SHTASEL, D. L. & GUR, R. E. 1994. Sex differences in aging of the human frontal and temporal lobes. *J Neurosci*, 14, 4748-55.
- CROOKS, R., MITCHELL, T. & THOM, M. 2000. Patterns of cerebellar atrophy in patients with chronic epilepsy: a quantitative neuropathological study. *Epilepsy Res*, 41, 63-73.
- DAI, D. P., XU, R. A., HU, L. M., WANG, S. H., GENG, P. W., YANG, J. F., YANG, L. P., QIAN, J. C., WANG, Z. S., ZHU, G. H., ZHANG, X. H., GE, R. S., HU, G. X. & CAI, J. P. 2013. CYP2C9 polymorphism analysis in Han Chinese populations: building the largest allele frequency database. *Pharmacogenomics J*.

- DAM, M. 1970. Number of Purkinje cells in patients with grand mal epilepsy treated with diphenylhydantoin. *Epilepsia*, 11, 313-20.
- DAM, M. 1987. Neuropathology of the cerebellum. *In*: WOLF, P., DAM, M., JANZ, D. & DREIFUS, F. E. (eds.) *Advances in Epileptology*.
- DE BITTENCOURT, P. R., ADAMOLEKUM, B., BHARUCHA, N., CARPIO, A., COSSIO, O. H., DANESI, M. A., DUMAS, M., MEINARDI, H., ORDINARIO, A., SENANAYAKE, N., SHAKIR, R. & SOTELO, J. 1996. Epilepsy in the tropics: I. Epidemiology, socioeconomic risk factors, and etiology. *Epilepsia*, 37, 1121-7.
- DE MARCOS, F. A., GHIZONI, E., KOBAYASHI, E., LI, L. M. & CENDES, F. 2003. Cerebellar volume and long-term use of phenytoin. *Seizure*, 12, 312-5.
- DECARLI, C., HATTA, J., FAZILAT, S., GAILLARD, W. D. & THEODORE, W. H. 1998. Extratemporal atrophy in patients with complex partial seizures of left temporal origin. *Ann Neurol*, 43, 41-5.
- DEL NEGRO, A., DANTAS, C. D., ZANARDI, V., MONTENEGRO, M. A. & CENDES, F. 2000. [Dose-dependent relationship of chronic use of phenytoin and cerebellar atrophy in patients with epilepsy]. *Arq Neuropsiquiatr*, 58, 276-81.
- DEPIENNE, C., TROUILLARD, O., SAINT-MARTIN, C., GOURFINKEL-AN, I., BOUTEILLER, D., CARPENTIER, W., KEREN, B., ABERT, B., GAUTIER, A., BAULAC, S., ARZIMANOGLU, A., CAZENEUVE, C., NABBOUT, R. & LEGUERN, E. 2009. Spectrum of SCN1A gene mutations associated with Dravet syndrome: analysis of 333 patients. *J Med Genet*, 46, 183-91.
- DEPOND, C. 2006. The potential of pharmacogenetics in the treatment of epilepsy. *Eur J Paediatr Neurol*, 10, 57-65.
- DEPOND, C., GODARD, P., ESPEL, R. S., DA CRUZ, A. L., LIENARD, P. & PANDOLFO, M. 2011. A candidate gene study of antiepileptic drug tolerability and efficacy identifies an association of CYP2C9 variants with phenytoin toxicity. *Eur J Neurol*, 18, 1159-64.
- DEVINSKY, O. 1999. Patients with refractory seizures. *N Engl J Med*, 340, 1565-70.
- DICHTER, M. A. & BRODIE, M. J. 1996. New antiepileptic drugs. *N Engl J Med*, 334, 1583-90.
- DREIFUSS, S., VINGERHOETS, F. J., LAZEYRAS, F., ANDINO, S. G., SPINELLI, L., DELAVELLE, J. & SEECK, M. 2001. Volumetric measurements of subcortical nuclei in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 57, 1636-41.
- DUNCAN, J. S., SANDER, J. W., SISODIYA, S. M. & WALKER, M. C. 2006. Adult epilepsy. *Lancet*, 367, 1087-100.
- EICHELBAUM, M., MINESHITA, S., OHNHAUS, E. E. & ZEKORN, C. 1986. The influence of enzyme induction on polymorphic sparteine oxidation. *Br J Clin Pharmacol*, 22, 49-53.
- ETHELL, B. T., ANDERSON, G. D. & BURCHELL, B. 2003. The effect of valproic acid on drug and steroid glucuronidation by expressed human UDP-glucuronosyltransferases. *Biochem Pharmacol*, 65, 1441-9.
- EVANS, D. A., MAHGOUB, A., SLOAN, T. P., IDLE, J. R. & SMITH, R. L. 1980. A family and population study of the genetic polymorphism of debrisoquine oxidation in a white British population. *J Med Genet*, 17, 102-5.
- FERRARO, T. N. & BUONO, R. J. 2005. The relationship between the pharmacology of antiepileptic drugs and human gene variation: an overview. *Epilepsy Behav*, 7, 18-36.

- FERRARO, T. N., DLUGOS, D. J. & BUONO, R. J. 2006. Challenges and opportunities in the application of pharmacogenetics to antiepileptic drug therapy. *Pharmacogenomics*, 7, 89-103.
- FORSQREN, L., BEGHI, E., OUN, A. & SILLANPAA, M. 2005. The epidemiology of epilepsy in Europe - a systematic review. *Eur J Neurol*, 12, 245-53.
- GAEDIGK, A., CASLEY, W. L., TYNDALE, R. F., SELLERS, E. M., JURIMA-ROMET, M. & LEEDER, J. S. 2001. Cytochrome P4502C9 (CYP2C9) allele frequencies in Canadian Native Indian and Inuit populations. *Can J Physiol Pharmacol*, 79, 841-7.
- GARDINER, S. J. & BEGG, E. J. 2005. Pharmacogenetic testing for drug metabolizing enzymes: is it happening in practice? *Pharmacogenet Genomics*, 15, 365-9.
- GE, Y., GROSSMAN, R. I., BABB, J. S., RABIN, M. L., MANNON, L. J. & KOLSON, D. L. 2002. Age-related total gray matter and white matter changes in normal adult brain. Part I: volumetric MR imaging analysis. *AJNR Am J Neuroradiol*, 23, 1327-33.
- GHATAK, N. R., SANTOSO, R. A. & MCKINNEY, W. M. 1976. Cerebellar degeneration following long-term phenytoin therapy. *Neurology*, 26, 818-20.
- GHOSH, V. B., KAPOOR, S., PRAKASH, A. & BHATT, S. 2011. Cerebellar atrophy in a child with valproate toxicity. *Indian J Pediatr*, 78, 999-1001.
- GRIFFITHS, A. J. F., WESSIER, S. R., LEWONTIN, R. C., GELBART, W. M., SUZUKI, D. T. & MILLER, J. H. 2006. *Introdução a genética*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- GROSS, D. W., CONCHA, L. & BEAULIEU, C. 2006. Extratemporal white matter abnormalities in mesial temporal lobe epilepsy demonstrated with diffusion tensor imaging. *Epilepsia*, 47, 1360-3.
- GUYTON, A. C. & HALL, J. E. 1997. *Tratado de Fisiologia Médica*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- HAGEMANN, G., LEMIEUX, L., FREE, S. L., KRAKOW, K., EVERITT, A. D., KENDALL, B. E., STEVENS, J. M. & SHORVON, S. D. 2002. Cerebellar volumes in newly diagnosed and chronic epilepsy. *J Neurol*, 249, 1651-8.
- HALL, T. C., MILLER, A. K. H. & CORSELLIS, J. A. N. 1975. VARIATIONS IN THE HUMAN PURKINJE CELL POPULATION ACCORDING TO AGE AND SEX. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 1, 267-292.
- HAMDY, S. I., HIRATSUKA, M., NARAHARA, K., EL-ENANY, M., MOURSI, N., AHMED, M. S. & MIZUGAKI, M. 2002. Allele and genotype frequencies of polymorphic cytochromes P450 (CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1) and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) in the Egyptian population. *Br J Clin Pharmacol*, 53, 596-603.
- HARDY, G. H. 1908. Mendelian Proportions in a Mixed Population. *Science*, 28, 49-50.
- HAUSER, W. A., ANNEGERS, J. F. & KURLAND, L. T. 1991. Prevalence of epilepsy in Rochester, Minnesota: 1940-1980. *Epilepsia*, 32, 429-45.
- HAUSER, W. A., ANNEGERS, J. F. & KURLAND, L. T. 1993. Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. *Epilepsia*, 34, 453-68.
- HAUSER, W. A. & LEE, J. R. 2002. Do seizures beget seizures? *Prog Brain Res*, 135, 215-9.
- HERMANN, B., SEIDENBERG, M., BELL, B., RUTECKI, P., SHETH, R., RUGGLES, K., WENDT, G., O'LEARY, D. & MAGNOTTA, V. 2002. The neurodevelopmental impact of childhood-onset temporal lobe epilepsy on brain structure and function. *Epilepsia*, 43, 1062-71.
- HERMANN, B., SEIDENBERG, M., BELL, B., RUTECKI, P., SHETH, R. D., WENDT, G., O'LEARY, D. & MAGNOTTA, V. 2003. Extratemporal quantitative MR volumetrics and

- neuropsychological status in temporal lobe epilepsy. *J Int Neuropsychol Soc*, 9, 353-62.
- HERMANN, B. P., BAYLESS, K., HANSEN, R., PARRISH, J. & SEIDENBERG, M. 2005. Cerebellar atrophy in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav*, 7, 279-87.
- HERRANZ, J. L. 2006. [Pharmacogenetics, pharmacogenomics and individualised antiepileptic therapy]. *Rev Neurol*, 43 Suppl 1, S43-9.
- HO, P. C., ABBOTT, F. S., ZANGER, U. M. & CHANG, T. K. 2003. Influence of CYP2C9 genotypes on the formation of a hepatotoxic metabolite of valproic acid in human liver microsomes. *Pharmacogenomics J*, 3, 335-42.
- HONAVAR, M. & MELDRUM, B. 2002. Epilepsy. In: GRAHAM, D. I. & LANTOS, P. L. (eds.) *Greenfield's neuropathology*. London: Edward Arnold.
- HUNG, C. C., LIN, C. J., CHEN, C. C., CHANG, C. J. & LIOU, H. H. 2004. Dosage recommendation of phenytoin for patients with epilepsy with different CYP2C9/CYP2C19 polymorphisms. *Ther Drug Monit*, 26, 534-40.
- IBEANU, G. C., BLAISDELL, J., GHANAYEM, B. I., BEYELER, C., BENHAMOU, S., BOUCHARDY, C., WILKINSON, G. R., DAYER, P., DALY, A. K. & GOLDSTEIN, J. A. 1998a. An additional defective allele, CYP2C19\*5, contributes to the S-mephenytoin poor metabolizer phenotype in Caucasians. *Pharmacogenetics*, 8, 129-35.
- IBEANU, G. C., GOLDSTEIN, J. A., MEYER, U., BENHAMOU, S., BOUCHARDY, C., DAYER, P., GHANAYEM, B. I. & BLAISDELL, J. 1998b. Identification of new human CYP2C19 alleles (CYP2C19\*6 and CYP2C19\*2B) in a Caucasian poor metabolizer of mephenytoin. *J Pharmacol Exp Ther*, 286, 1490-5.
- IEIRI, I., GOTO, W., HIRATA, K., TOSHITANI, A., IMAYAMA, S., OHYAMA, Y., YAMADA, H., OHTSUBO, K. & HIGUCHI, S. 1995. Effect of 5-(p-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin (p-HPPH) enantiomers, major metabolites of phenytoin, on the occurrence of chronic-gingival hyperplasia: in vivo and in vitro study. *Eur J Clin Pharmacol*, 49, 51-6.
- INGELMAN-SUNDBERG, M. 2004. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends Pharmacol Sci*, 25, 193-200.
- JALLON, P. 2002. Epilepsy and epileptic disorders, an epidemiological marker? Contribution of descriptive epidemiology. *Epileptic Disord*, 4, 1-13.
- JOHNSON, J. A. 2003. Pharmacogenetics: potential for individualized drug therapy through genetics. *Trends Genet*, 19, 660-6.
- JOSE, R., CHANDRASEKARAN, A., SAM, S. S., GERARD, N., CHANOLEAN, S., ABRAHAM, B. K., SATYANARAYANAMOORTHY, K., PETER, A. & RAJAGOPAL, K. 2005. CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms: frequencies in the south Indian population. *Fundam Clin Pharmacol*, 19, 101-5.
- JULIEN, R. M. & HALPERN, L. M. 1972. Effects of diphenylhydantoin and other antiepileptic drugs on epileptiform activity and Purkinje cell discharge rates. *Epilepsia*, 13, 387-400.
- KALOW, W. 2001. Perspectives in pharmacogenetics. *Arch Pathol Lab Med*, 125, 77-80.
- KELLER, S. S., WIESHMANN, U. C., MACKAY, C. E., DENBY, C. E., WEBB, J. & ROBERTS, N. 2002. Voxel based morphometry of grey matter abnormalities in patients with medically intractable temporal lobe epilepsy: effects of side of seizure onset and epilepsy duration. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 73, 648-55.

- KESAVAN, R., NARAYAN, S. K. & ADITHAN, C. 2010. Influence of CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms on phenytoin-induced neurological toxicity in Indian epileptic patients. *Eur J Clin Pharmacol*, 66, 689-96.
- KIDD, R. S., STRAUGHN, A. B., MEYER, M. C., BLAISDELL, J., GOLDSTEIN, J. A. & DALTON, J. T. 1999. Pharmacokinetics of chlorpheniramine, phenytoin, glipizide and nifedipine in an individual homozygous for the CYP2C9\*3 allele. *Pharmacogenetics*, 9, 71-80.
- KIMURA, M., IEIRI, I., MAMIYA, K., URAE, A. & HIGUCHI, S. 1998. Genetic polymorphism of cytochrome P450s, CYP2C19, and CYP2C9 in a Japanese population. *Ther Drug Monit*, 20, 243-7.
- KIRCHHEINER, J., BROSEN, K., DAHL, M. L., GRAM, L. F., KASPER, S., ROOTS, I., SJOQVIST, F., SPINA, E. & BROCKMOLLER, J. 2001. CYP2D6 and CYP2C19 genotype-based dose recommendations for antidepressants: a first step towards subpopulation-specific dosages. *Acta Psychiatr Scand*, 104, 173-92.
- KLOTZ, U. 2007. The role of pharmacogenetics in the metabolism of antiepileptic drugs: pharmacokinetic and therapeutic implications. *Clin Pharmacokinet*, 46, 271-9.
- KOKENGE, R., KUTT, H. & MCDOWELL, F. 1965. Neurological Sequelae Following Dilantin Overdose in a Patient and in Experimental Animals. *Neurology*, 15, 823-9.
- KRUGGEL, F. 2006. MRI-based volumetry of head compartments: normative values of healthy adults. *Neuroimage*, 30, 1-11.
- KUO, C. C., CHEN, R. S., LU, L. & CHEN, R. C. 1997. Carbamazepine inhibition of neuronal Na<sup>+</sup> currents: quantitative distinction from phenytoin and possible therapeutic implications. *Mol Pharmacol*, 51, 1077-83.
- KURUVILLA, T. & BHARUCHA, N. E. 1997. Cerebellar atrophy after acute phenytoin intoxication. *Epilepsia*, 38, 500-2.
- KWAN, P. & BRODIE, M. J. 2001. Effectiveness of first antiepileptic drug. *Epilepsia*, 42, 1255-60.
- LAWSON, J. A., VOGRIN, S., BLEASEL, A. F., COOK, M. J. & BYE, A. M. 2000. Cerebral and cerebellar volume reduction in children with intractable epilepsy. *Epilepsia*, 41, 1456-62.
- LAZAROWSKI, A., MASSARO, M., SCHTEINSCHNAIDER, A., INTRUVINI, S., SEVLEVER, G. & RABINOWICZ, A. 2004. Neuronal MDR-1 gene expression and persistent low levels of anticonvulsants in a child with refractory epilepsy. *Ther Drug Monit*, 26, 44-6.
- LEE, A. Y., KIM, M. J., CHEY, W. Y., CHOI, J. & KIM, B. G. 2004. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C9 in diphenylhydantoin-induced cutaneous adverse drug reactions. *Eur J Clin Pharmacol*, 60, 155-9.
- LEE, J. W., ANDERMANN, F., DUBEAU, F., BERNASCONI, A., MACDONALD, D., EVANS, A. & REUTENS, D. C. 1998. Morphometric analysis of the temporal lobe in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 39, 727-36.
- LEE, S. K., MORI, S., KIM, D. J., KIM, S. Y., CHU, M., HEO, K., LEE, B. I. & KIM, D. I. 2003. Diffusion tensor MRI and fiber tractography of cerebellar atrophy in phenytoin users. *Epilepsia*, 44, 1536-40.
- LEE, S. Y., LEE, S. T. & KIM, J. W. 2007. Contributions of CYP2C9/CYP2C19 genotypes and drug interaction to the phenytoin treatment in the Korean epileptic patients in the clinical setting. *J Biochem Mol Biol*, 40, 448-52.

- LIMA, M. V., RIBEIRO, G. S., MESQUITA, E. T., VICTER, P. R. & VIANNA-JORGE, R. 2008. CYP2C9 genotypes and the quality of anticoagulation control with warfarin therapy among Brazilian patients. *Eur J Clin Pharmacol*, 64, 9-15.
- LINDVALL, O. & NILSSON, B. 1984. Cerebellar atrophy following phenytoin intoxication. *Ann Neurol*, 16, 258-60.
- LIU, R. S., LEMIEUX, L., BELL, G. S., SISODIYA, S. M., BARTLETT, P. A., SHORVON, S. D., SANDER, J. W. & DUNCAN, J. S. 2005. Cerebral damage in epilepsy: a population-based longitudinal quantitative MRI study. *Epilepsia*, 46, 1482-94.
- LOPEZ, M., DORADO, P., MONROY, N., ALONSO, M. E., JUNG-COOK, H., MACHIN, E., PENASLLEDO, E. & LLERENA, A. 2011. Pharmacogenetics of the antiepileptic drugs phenytoin and lamotrigine. *Drug Metabol Drug Interact*, 26, 5-12.
- LOSCHER, W., KLOTZ, U., ZIMPRICH, F. & SCHMIDT, D. 2009. The clinical impact of pharmacogenetics on the treatment of epilepsy. *Epilepsia*, 50, 1-23.
- LUEF, G., BURTSCHER, J., KREMSER, C., BIRBAMER, G., AICHNER, F., BAUER, G. & FELBER, S. 1996. Magnetic resonance volumetry of the cerebellum in epileptic patients after phenytoin overdoses. *Eur Neurol*, 36, 273-7.
- LUFT, A. R., SKALEJ, M., SCHULZ, J. B., WELTE, D., KOLB, R., BURK, K., KLOCKGETHER, T. & VOIGHT, K. 1999. Patterns of age-related shrinkage in cerebellum and brainstem observed in vivo using three-dimensional MRI volumetry. *Cereb Cortex*, 9, 712-21.
- LUFT, A. R., SKALEJ, M., WELTE, D., KOLB, R., BURK, K., SCHULZ, J. B., KLOCKGETHER, T. & VOIGHT, K. 1998. A new semiautomated, three-dimensional technique allowing precise quantification of total and regional cerebellar volume using MRI. *Magn Reson Med*, 40, 143-51.
- MACDONALD, B. K., COCKERELL, O. C., SANDER, J. W. & SHORVON, S. D. 2000. The incidence and lifetime prevalence of neurological disorders in a prospective community-based study in the UK. *Brain*, 123 ( Pt 4), 665-76.
- MAHGOUB, A., IDLE, J. R., DRING, L. G., LANCASTER, R. & SMITH, R. L. 1977. Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet*, 2, 584-6.
- MAMIYA, K., IEIRI, I., SHIMAMOTO, J., YUKAWA, E., IMAI, J., NINOMIYA, H., YAMADA, H., OTSUBO, K., HIGUCHI, S. & TASHIRO, N. 1998. The effects of genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 on phenytoin metabolism in Japanese adult patients with epilepsy: studies in stereoselective hydroxylation and population pharmacokinetics. *Epilepsia*, 39, 1317-23.
- MANN, M. W. & PONS, G. 2007. Various pharmacogenetic aspects of antiepileptic drug therapy: a review. *CNS Drugs*, 21, 143-64.
- MARINI, C., MEI, D., TEMUDO, T., FERRARI, A. R., BUTI, D., DRAVET, C., DIAS, A. I., MOREIRA, A., CALADO, E., SERI, S., NEVILLE, B., NARBONA, J., REID, E., MICHELUCCHI, R., SICCA, F., CROSS, H. J. & GUERRINI, R. 2007. Idiopathic epilepsies with seizures precipitated by fever and SCN1A abnormalities. *Epilepsia*, 48, 1678-85.
- MARSH, L., MORRELL, M. J., SHEAR, P. K., SULLIVAN, E. V., FREEMAN, H., MARIE, A., LIM, K. O. & PFEFFERBAUM, A. 1997. Cortical and hippocampal volume deficits in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 38, 576-87.
- MASUR, H., ELGER, C. E., LUDOLPH, A. C. & GALANSKI, M. 1989. Cerebellar atrophy following acute intoxication with phenytoin. *Neurology*, 39, 432-3.

- MASUR, H., FAHRENDORF, G., OBERWITTLER, C. & REUTHER, G. 1990. Cerebellar atrophy following acute intoxication with phenytoin. *Neurology*, 40, 1800-1.
- MATTSON, R. H., CRAMER, J. A. & COLLINS, J. F. 1996. Prognosis for total control of complex partial and secondarily generalized tonic clonic seizures. Department of Veterans Affairs Epilepsy Cooperative Studies No. 118 and No. 264 Group. *Neurology*, 47, 68-76.
- MCAULIFFE, M., LALONDE, F., MCGARRY, D., GANDLER, W., CSAKY, K. & TRUS, B. Year. Medical image processing, analysis and visualization in clinical research. In: Proceedings of the 14th IEEE Symposium on Computer-Based Medical Systems, 2001. 381-386.
- MCAULLIFE, M. 2008. MIPAV user's guide. *Algorithms*. Rockville: NIH.
- MCDONALD, C. R., HAGLER, D. J., JR., AHMADI, M. E., TECOMA, E., IRAGUI, V., DALE, A. M. & HALGREN, E. 2008. Subcortical and cerebellar atrophy in mesial temporal lobe epilepsy revealed by automatic segmentation. *Epilepsy Res*, 79, 130-8.
- MCLAIN, L. W., JR., MARTIN, J. T. & ALLEN, J. H. 1980. Cerebellar degeneration due to chronic phenytoin therapy. *Ann Neurol*, 7, 18-23.
- MCMILLAN, A. B., HERMANN, B. P., JOHNSON, S. C., HANSEN, R. R., SEIDENBERG, M. & MEYERAND, M. E. 2004. Voxel-based morphometry of unilateral temporal lobe epilepsy reveals abnormalities in cerebral white matter. *Neuroimage*, 23, 167-74.
- MELDRUM, B. 1978. Physiological changes during prolonged seizures and epileptic brain damage. *Neuropadiatrie*, 9, 203-12.
- MERRITT, H. H. & PUTNAM, T. J. 1984. Landmark article Sept 17, 1938: Sodium diphenyl hydantoinate in the treatment of convulsive disorders. By H. Houston Merritt and Tracy J. Putnam. *JAMA*, 251, 1062-7.
- MEYER, A. 1958. Epilepsy. In: GREENFIELD, J. G., BLACKWOOD, W., MCMENEMEY, W. H., MEYER, A. & NORMAL, R. M. (eds.) *Neuropathology*. London: Edward Arnold.
- MINOGUE, S. J. & LATHAM, O. 1945. Cerebellar degeneration with epilepsy. *Med J Aust*, 1, 430-3.
- MORAN, N. F., LEMIEUX, L., MAUDGIL, D., KITCHEN, N. D., FISH, D. R. & SHORVON, S. D. 1999. Analysis of temporal lobe resections in MR images. *Epilepsia*, 40, 1077-84.
- MUELLER, S. G., LAXER, K. D., CASHDOLLAR, N., BUCKLEY, S., PAUL, C. & WEINER, M. W. 2006. Voxel-based optimized morphometry (VBM) of gray and white matter in temporal lobe epilepsy (TLE) with and without mesial temporal sclerosis. *Epilepsia*, 47, 900-7.
- MULLEY, J. C., SCHEFFER, I. E., PETROU, S., DIBBENS, L. M., BERKOVIC, S. F. & HARKIN, L. A. 2005. SCN1A mutations and epilepsy. *Hum Mutat*, 25, 535-42.
- NASU, K., KUBOTA, T. & ISHIZAKI, T. 1997. Genetic analysis of CYP2C9 polymorphism in a Japanese population. *Pharmacogenetics*, 7, 405-9.
- NATSUME, J., BERNASCONI, N., ANDERMANN, F. & BERNASCONI, A. 2003. MRI volumetry of the thalamus in temporal, extratemporal, and idiopathic generalized epilepsy. *Neurology*, 60, 1296-300.
- NEY, G. C., LANTOS, G., BARR, W. B. & SCHAUL, N. 1994. Cerebellar atrophy in patients with long-term phenytoin exposure and epilepsy. *Arch Neurol*, 51, 767-71.
- NILSSON, L., AHLBOM, A., FARAHMAND, B. Y., ASBERG, M. & TOMSON, T. 2002. Risk factors for suicide in epilepsy: a case control study. *Epilepsia*, 43, 644-51.

- NORMAN, R. M. 1964. The Neuropathology of Status Epilepticus. *Med Sci Law*, 4, 46-51.
- NORONHA, A. L., BORGES, M. A., MARQUES, L. H., ZANETTA, D. M., FERNANDES, P. T., DE BOER, H., ESPINDOLA, J., MIRANDA, C. T., PRILIPKO, L., BELL, G. S., SANDER, J. W. & LI, L. M. 2007. Prevalence and pattern of epilepsy treatment in different socioeconomic classes in Brazil. *Epilepsia*, 48, 880-5.
- O'DONOGHUE, M. & SANDER, J. W. 1996. Does early anti-epileptic drug treatment alter the prognosis for remission of the epilepsies? *J R Soc Med*, 89, 245-8.
- ODANI, A., HASHIMOTO, Y., OTSUKI, Y., UWAI, Y., HATTORI, H., FURUSHO, K. & INUI, K. 1997. Genetic polymorphism of the CYP2C subfamily and its effect on the pharmacokinetics of phenytoin in Japanese patients with epilepsy. *Clin Pharmacol Ther*, 62, 287-92.
- OHMORI, H., KOBAYASHI, T. & YASUDA, M. 1992. Neurotoxicity of phenytoin administered to newborn mice on developing cerebellum. *Neurotoxicol Teratol*, 14, 159-65.
- OHMORI, H., OGURA, H., YASUDA, M., NAKAMURA, S., HATTA, T., KAWANO, K., MICHIKAWA, T., YAMASHITA, K. & MIKOSHIBA, K. 1999. Developmental neurotoxicity of phenytoin on granule cells and Purkinje cells in mouse cerebellum. *J Neurochem*, 72, 1497-506.
- ONAL, A. E., TUMERDEM, Y., OZTURK, M. K., GURSES, C., BAYKAN, B., GOKYIGIT, A. & OZEL, S. 2002. Epilepsy prevalence in a rural area in Istanbul. *Seizure*, 11, 397-401.
- PAPAZIAN, O., CANIZALES, E., ALFONSO, I., ARCHILA, R., DUCHOWNY, M. & AICARDI, J. 1995. Reversible dementia and apparent brain atrophy during valproate therapy. *Ann Neurol*, 38, 687-91.
- PEDRAZA, O., BOWERS, D. & GILMORE, R. 2004. Asymmetry of the hippocampus and amygdala in MRI volumetric measurements of normal adults. *J Int Neuropsychol Soc*, 10, 664-78.
- PEREZ DEL CERRO, M. & SNIDER, R. S. 1967. Studies on Dilantin intoxication. I. Ultrastructural analogies with the lipoidoses. *Neurology*, 17, 452-66.
- PERUCCA, E. 2004. NICE guidance on newer drugs for epilepsy in adults. *BMJ*, 328, 1273-4.
- PERUCCA, E. 2006. Clinically relevant drug interactions with antiepileptic drugs. *Br J Clin Pharmacol*, 61, 246-55.
- PFEFFERBAUM, A., MATHALON, D. H., SULLIVAN, E. V., RAWLES, J. M., ZIPURSKY, R. B. & LIM, K. O. 1994. A quantitative magnetic resonance imaging study of changes in brain morphology from infancy to late adulthood. *Arch Neurol*, 51, 874-87.
- PHAM, D. L., XU, C. & PRINCE, J. L. 2000. Current methods in medical image segmentation. *Annu Rev Biomed Eng*, 2, 315-37.
- PLACENCIA, M., SHORVON, S. D., PAREDES, V., BIMOS, C., SANDER, J. W., SUAREZ, J. & CASCANTE, S. M. 1992. Epileptic seizures in an Andean region of Ecuador. Incidence and prevalence and regional variation. *Brain*, 115 ( Pt 3), 771-82.
- RAZ, N., DUPUIS, J. H., BRIGGS, S. D., MCGAVRAN, C. & ACKER, J. D. 1998. Differential effects of age and sex on the cerebellar hemispheres and the vermis: a prospective MR study. *AJNR Am J Neuroradiol*, 19, 65-71.
- RIVA, R., ALBANI, F., CONTIN, M. & BARUZZI, A. 1996. Pharmacokinetic interactions between antiepileptic drugs. Clinical considerations. *Clin Pharmacokinet*, 31, 470-93.
- ROCCA, W. A., SAVETTIERI, G., ANDERSON, D. W., MENEGHINI, F., GRIGOLETTO, F., MORGANTE, L., REGGIO, A., SALEMI, G., PATTI, F. & DI PERRI, R. 2001. Door-to-door prevalence survey of epilepsy in three Sicilian municipalities. *Neuroepidemiology*, 20, 237-41.

- RODEN, D. M., ALTMAN, R. B., BENOWITZ, N. L., FLOCKHART, D. A., GIACOMINI, K. M., JOHNSON, J. A., KRAUSS, R. M., MCLEOD, H. L., RATAIN, M. J., RELLING, M. V., RING, H. Z., SHULDINER, A. R., WEINSHILBOUM, R. M. & WEISS, S. T. 2006. Pharmacogenomics: challenges and opportunities. *Ann Intern Med*, 145, 749-57.
- ROSEMARY, J., SURENDIRAN, A., RAJAN, S., SHASHINDRAN, C. H. & ADITHAN, C. 2006. Influence of the CYP2C9 AND CYP2C19 polymorphisms on phenytoin hydroxylation in healthy individuals from south India. *Indian J Med Res*, 123, 665-70.
- RWIZA, H. T., KILONZO, G. P., HAULE, J., MATUJA, W. B., MTEZA, I., MBENA, P., KILIMA, P. M., MWALUKO, G., MWANG'OMBOLA, R., MWAIJANDE, F. & ET AL. 1992. Prevalence and incidence of epilepsy in Ulanga, a rural Tanzanian district: a community-based study. *Epilepsia*, 33, 1051-6.
- SALCMAN, M., DEFENDINI, R., CORRELL, J. & GILMAN, S. 1978. Neuropathological changes in cerebellar biopsies of epileptic patients. *Ann Neurol*, 3, 10-9.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANCHEZ-DIZ, P., ESTANY-GESTAL, A., AGUIRRE, C., BLANCO, A., CARRACEDO, A., IBANEZ, L., PASSIU, M., PROVEZZA, L., RAMOS-RUIZ, R., RUIZ, B., SALADO-VALDIVIESO, I., VELASCO, E. A. & FIGUEIRAS, A. 2009. Prevalence of CYP2C9 polymorphisms in the south of Europe. *Pharmacogenomics J*, 9, 306-10.
- SANDER, J. W. 1993. Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review. *Epilepsia*, 34, 1007-16.
- SANDER, J. W. 2003. The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr Opin Neurol*, 16, 165-70.
- SANDER, J. W. & SHORVON, S. D. 1996. Epidemiology of the epilepsies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 61, 433-43.
- SANDOK, E. K., O'BRIEN, T. J., JACK, C. R. & SO, E. L. 2000. Significance of cerebellar atrophy in intractable temporal lobe epilepsy: a quantitative MRI study. *Epilepsia*, 41, 1315-20.
- SAVIC, I. & THORELL, J. O. 1996. Localized cerebellar reductions in benzodiazepine receptor density in human partial epilepsy. *Arch Neurol*, 53, 656-62.
- SCORDO, M. G., AKLILLU, E., YASAR, U., DAHL, M. L., SPINA, E. & INGELMAN-SUNDBERG, M. 2001. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C9 in a Caucasian and a black African population. *Br J Clin Pharmacol*, 52, 447-50.
- SCOTT, S. A., EDELMANN, L., KORNREICH, R., ERAZO, M. & DESNICK, R. J. 2007. CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 allele frequencies in the Ashkenazi Jewish population. *Pharmacogenomics*, 8, 721-30.
- SEIDENBERG, M., KELLY, K. G., PARRISH, J., GEARY, E., DOW, C., RUTECKI, P. & HERMANN, B. 2005. Ipsilateral and contralateral MRI volumetric abnormalities in chronic unilateral temporal lobe epilepsy and their clinical correlates. *Epilepsia*, 46, 420-30.
- SHAH, R. R. 2005. Pharmacogenetics in drug regulation: promise, potential and pitfalls. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 360, 1617-38.
- SHASTRY, B. S. 2006. Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. *Pharmacogenomics J*, 6, 16-21.
- SILLANPAA, M. & SCHMIDT, D. 2006. Natural history of treated childhood-onset epilepsy: prospective, long-term population-based study. *Brain*, 129, 617-24.

- SIMON, C., STIEGER, B., KULLAK-UBLICK, G. A., FRIED, M., MUELLER, S., FRITSCHY, J. M., WIESER, H. G. & PAULI-MAGNUS, C. 2007. Intestinal expression of cytochrome P450 enzymes and ABC transporters and carbamazepine and phenytoin disposition. *Acta Neurol Scand*, 115, 232-42.
- SISODIYA, S. M. 2005. Genetics of drug resistance. *Epilepsia*, 46 Suppl 10, 33-8.
- SISODIYA, S. M., MORAN, N., FREE, S. L., KITCHEN, N. D., STEVENS, J. M., HARKNESS, W. F., FISH, D. R. & SHORVON, S. D. 1997. Correlation of widespread preoperative magnetic resonance imaging changes with unsuccessful surgery for hippocampal sclerosis. *Ann Neurol*, 41, 490-6.
- SOGA, Y., NISHIMURA, F., OHTSUKA, Y., ARAKI, H., IWAMOTO, Y., NARUISHI, H., SHIOMI, N., KOBAYASHI, Y., TAKASHIBA, S., SHIMIZU, K., GOMITA, Y. & OKA, E. 2004. CYP2C polymorphisms, phenytoin metabolism and gingival overgrowth in epileptic subjects. *Life Sci*, 74, 827-34.
- SPECHT, U., MAY, T., SCHULZ, R., ROHDE, M., EBNER, A., SCHMIDT, R. C., SCHUTZ, M. & WOLF, P. 1997. Cerebellar atrophy and prognosis after temporal lobe resection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 62, 501-6.
- SPIELMEYER, W. 1930. The anatomic substratum of the convulsive state. *Arch. Neurol. Psychiatry*, 23, 869-875.
- SPINA, E., PISANI, F. & PERUCCA, E. 1996. Clinically significant pharmacokinetic drug interactions with carbamazepine. An update. *Clin Pharmacokinet*, 31, 198-214.
- STRASSBURGER, T. L., LEE, H. C., DALY, E. M., SZCZEPANIK, J., KRASUSKI, J. S., MENTIS, M. J., SALERNO, J. A., DECARLI, C., SCHAPIRO, M. B. & ALEXANDER, G. E. 1997. Interactive effects of age and hypertension on volumes of brain structures. *Stroke*, 28, 1410-7.
- STUBBINS, M. J., HARRIES, L. W., SMITH, G., TARBIT, M. H. & WOLF, C. R. 1996. Genetic analysis of the human cytochrome P450 CYP2C9 locus. *Pharmacogenetics*, 6, 429-39.
- STUBGEN, J. P. 1995. Crossed cerebellar diaschisis related to recurrent focal seizures. *Epilepsia*, 36, 316-8.
- SULLIVAN-KLOSE, T. H., GHANAYEM, B. I., BELL, D. A., ZHANG, Z. Y., KAMINSKY, L. S., SHENFIELD, G. M., MINERS, J. O., BIRKETT, D. J. & GOLDSTEIN, J. A. 1996. The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics*, 6, 341-9.
- SZABO, C. A., LANCASTER, J. L., LEE, S., XIONG, J. H., COOK, C., MAYES, B. N. & FOX, P. T. 2006. MR imaging volumetry of subcortical structures and cerebellar hemispheres in temporal lobe epilepsy. *AJNR Am J Neuroradiol*, 27, 2155-60.
- SZOEKE, C. E., NEWTON, M., WOOD, J. M., GOLDSTEIN, D., BERKOVIC, S. F., TJ, O. B. & SHEFFIELD, L. J. 2006. Update on pharmacogenetics in epilepsy: a brief review. *Lancet Neurol*, 5, 189-96.
- TALAIRACH, J. & TOURNOUX, P. 1988. *Co-planar stereotaxic atlas of the human brain : an approach to medical cerebral imaging*, Stuttgart ; New York  
New York, G. Thieme ;  
Thieme Medical Publishers.
- TAN, E. K., CHAN, L. L. & AUCHUS, A. P. 2001. Phenytoin cerebellopathy without epilepsy. *Acta Neurol Scand*, 104, 61-2.
- TATE, S. K., DEPONDY, C., SISODIYA, S. M., CAVALLERI, G. L., SCHORGE, S., SORANZO, N., THOM, M., SEN, A., SHORVON, S. D., SANDER, J. W., WOOD, N. W. & GOLDSTEIN, D.

- B. 2005. Genetic predictors of the maximum doses patients receive during clinical use of the anti-epileptic drugs carbamazepine and phenytoin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 5507-12.
- TATE, S. K. & SISODIYA, S. M. 2007. Multidrug resistance in epilepsy: a pharmacogenomic update. *Expert Opin Pharmacother*, 8, 1441-9.
- TAUER, U., KNOTH, R. & VOLK, B. 1998. Phenytoin alters Purkinje cell axon morphology and targeting in vitro. *Acta Neuropathol*, 95, 583-91.
- THAKKAR, A. N., BENDKHALE, S. R., TAUR, S. R., GOGTAY, N. J. & THATTE, U. M. 2012. Association of CYP2C9 polymorphisms with phenytoin toxicity in Indian patients. *Neurol India*, 60, 577-80.
- TISHLER, D. M., WEINBERG, K. I., HINTON, D. R., BARBARO, N., ANNETT, G. M. & RAFFEL, C. 1995. MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. *Epilepsia*, 36, 1-6.
- TWARDOWSCHY, C. A., WERNECK, L. C., SCOLA, R. H., BORGIO, J. G., DE PAOLA, L. & SILVADO, C. 2013. The role of CYP2C9 polymorphisms in phenytoin-related cerebellar atrophy. *Seizure*, 22, 194-7.
- TWARDOWSCHY, C. A., WERNECK, L. C., SCOLA, R. H., DE PAOLA, L. & SILVADO, C. E. 2011. CYP2C9 polymorphism in patients with epilepsy: genotypic frequency analyzes and phenytoin adverse reactions correlation. *Arq Neuropsiquiatr*, 69, 153-8.
- UTTERBACK, R. A., OJEMAN, R. & MALEK, J. 1958. Parenchymatous cerebellar degeneration with Dilantin intoxication. *J Neuropathol Exp Neurol* 17, 516-9.
- VIANNA-JORGE, R., PERINI, J. A., RONDINELLI, E. & SUAREZ-KURTZ, G. 2004. CYP2C9 genotypes and the pharmacokinetics of tenoxicam in Brazilians. *Clin Pharmacol Ther*, 76, 18-26.
- WANG, S. L., HUANG, J., LAI, M. D. & TSAI, J. J. 1995. Detection of CYP2C9 polymorphism based on the polymerase chain reaction in Chinese. *Pharmacogenetics*, 5, 37-42.
- WEINBERG, W. 1908. Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. *Jahreshefte des Vereins für vaterländische Naturkunde in Württemberg*, 368-382.
- WILKINSON, G. R. 2005. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engl J Med*, 352, 2211-21.
- WU, Y. W., SHEK, D. W., GARCIA, P. A., ZHAO, S. & JOHNSTON, S. C. 2002. Incidence and mortality of generalized convulsive status epilepticus in California. *Neurology*, 58, 1070-6.
- XU, J., KOBAYASHI, S., YAMAGUCHI, S., IJIMA, K., OKADA, K. & YAMASHITA, K. 2000. Gender effects on age-related changes in brain structure. *AJNR Am J Neuroradiol*, 21, 112-8.
- YAARI, Y., SELZER, M. E. & PINCUS, J. H. 1986. Phenytoin: mechanisms of its anticonvulsant action. *Ann Neurol*, 20, 171-84.
- YASAR, U., ELIASSON, E., DAHL, M. L., JOHANSSON, I., INGELMAN-SUNDBERG, M. & SJOQVIST, F. 1999. Validation of methods for CYP2C9 genotyping: frequencies of mutant alleles in a Swedish population. *Biochem Biophys Res Commun*, 254, 628-31.
- YOON, Y. R., SHON, J. H., KIM, M. K., LIM, Y. C., LEE, H. R., PARK, J. Y., CHA, I. J. & SHIN, J. G. 2001. Frequency of cytochrome P450 2C9 mutant alleles in a Korean population. *Br J Clin Pharmacol*, 51, 277-80.

- YUKAWA, E. & MAMIYA, K. 2006. Effect of CYP2C19 genetic polymorphism on pharmacokinetics of phenytoin and phenobarbital in Japanese epileptic patients using Non-linear Mixed Effects Model approach. *J Clin Pharm Ther*, 31, 275-82.
- ZHU, B., CHEN, G. L., CHEN, X. P., HE, N., LIU, Z. Q., JIANG, C. H., WANG, D. & ZHOU, H. H. 2002. Genotype of CYP3A1 associated with CYP3A activity in Chinese Han population. *Acta Pharmacol Sin*, 23, 567-72.
- ZUIN, D. R., NEME, R., PORTA, L., VERA, J. & LOPEZ, O. L. 2003. [Acute cerebellar atrophy caused by diphenylhydantoin intoxication resulting from drug interaction]. *Rev Neurol*, 36, 195-6.

## APÊNDICES

APÊNDICE 1. TABELA COM VOLUMES BRUTOS (EM MILÍMETROS CÚBICOS) E SEUS RESPECTIVOS ÍNDICES DO GRUPO SEL-P, PARA SUBSTÂNCIA BRANCA E CINZENTA SOMADAS (n=19).

<b>PCT</b>	<b>VC</b>	<b>VE</b>	<b>VIT</b>	<b>VE/VIT</b>	<b>VC/VIT</b>
<b>2</b>	128.224,00	896.916,00	1.530.165,00	0,59	0,08
<b>6</b>	122.357,00	842.170,00	1.479.335,00	0,57	0,08
<b>10</b>	87.033,00	820.515,00	1.453.477,00	0,56	0,06
<b>11</b>	120.758,00	1.005.811,00	1.410.986,00	0,71	0,09
<b>22</b>	106.042,00	791.482,00	1.298.849,00	0,61	0,08
<b>25</b>	87.009,00	714.147,00	1.249.981,00	0,57	0,07
<b>26</b>	98.851,00	692.904,00	1.147.086,00	0,60	0,09
<b>29</b>	108.392,00	899.292,00	1.520.500,00	0,59	0,07
<b>35</b>	105.919,00	917.089,00	1.536.349,00	0,60	0,07
<b>39</b>	95.229,00	782.368,00	1.379.798,00	0,57	0,07
<b>47</b>	103.993,00	774.003,00	1.317.338,00	0,59	0,08
<b>52</b>	132.553,00	922.799,00	1.671.976,00	0,55	0,08
<b>55</b>	109.616,00	897.018,00	1.445.760,00	0,62	0,08
<b>63</b>	123.611,00	1.033.249,00	1.547.281,00	0,67	0,08
<b>66</b>	118.363,00	1.039.864,00	1.690.123,00	0,62	0,07
<b>67</b>	101.863,00	815.288,00	1.426.504,00	0,57	0,07
<b>73</b>	71.493,00	828.974,00	1.189.937,00	0,70	0,06
<b>75</b>	109.748,00	930.065,00	1.539.195,00	0,60	0,07
<b>88</b>	90.729,00	889.616,00	1.453.177,00	0,61	0,06
<b>MÉDIA</b>	106.409,63	868.082,63	1.436.200,89	60,5%	7,4%
<b>DP</b>	15.828,21	97.696,18	146.691,84	4,3%	0,8%

PCT = paciente; VC = volume cerebelar; VE = volume encefálico; VIT = volume intracraniano total; DP = desvio padrão. Média foi multiplicada por 100. VE/VIT = Volume encefálico total normalizado; VC/VIT = Volume cerebelar total normalizado.

APÊNDICE 2. TABELA COM OS VOLUMES BRUTOS (EM MILÍMETROS CÚBICOS) E SEUS RESPECTIVOS ÍNDICES DO GRUPO MUT-P, PARA SUBSTÂNCIA BRANCA E CINZENTA SOMADAS (N = 19).

<b>PCT</b>	<b>VC</b>	<b>VE</b>	<b>VIT</b>	<b>VE/VIT</b>	<b>VC/VIT</b>
<b>3</b>	101490,00	916.226,00	1.420.761,00	0,64	0,07
<b>4</b>	78338,00	821.837,00	1.271.506,00	0,65	0,06
<b>7</b>	117877,00	763.832,00	1.351.268,00	0,57	0,09
<b>14</b>	119943,00	992.242,00	1.627.240,00	0,61	0,07
<b>17</b>	67662,00	891.939,00	1.489.782,00	0,60	0,05
<b>19</b>	120721,00	967.182,00	1.612.101,00	0,60	0,07
<b>24</b>	107287,00	991.647,00	1.553.104,00	0,64	0,07
<b>28</b>	109814,00	908.698,00	1.598.289,00	0,57	0,07
<b>31</b>	123340,00	894.722,00	1.469.593,00	0,61	0,08
<b>32</b>	71587,00	944.694,00	1.511.001,00	0,63	0,05
<b>38</b>	140512,00	1.064.888,00	1.602.020,00	0,66	0,09
<b>51</b>	112179,00	857.557,00	1.533.275,00	0,56	0,07
<b>53</b>	87962,00	811.093,00	1.287.847,00	0,63	0,07
<b>57</b>	118691,00	926.173,00	1.606.700,00	0,58	0,07
<b>61</b>	117988,00	1.042.085,00	1.658.245,00	0,63	0,07
<b>62</b>	101580,00	898.747,00	1.464.701,00	0,61	0,07
<b>82</b>	82848,00	744.232,00	1.527.620,00	0,49	0,05
<b>91</b>	65576,00	884.024,00	1.453.177,00	0,61	0,05
<b>95</b>	104944,00	770.591,00	1.339.486,00	0,58	0,08
<b>MÉDIA</b>	102.649,42	899.600,47	1.493.564,00	60,3%	6,8%
<b>DP</b>	21.272,70	90.533,26	116.696,26	4,06%	1,29%

PCT = paciente; VC = volume cerebelar; VE = volume encefálico; VIT = volume intracraniano total; DP = desvio padrão. Média foi multiplicada por 100. VE/VIT = Volume encefálico total normalizado; VC/VIT = Volume cerebelar total normalizado.

APÊNDICE 3. TABELA COM OS VOLUMES BRUTOS (EM MILÍMETROS CÚBICOS) E SEUS RESPECTIVOS ÍNDICES DO GRUPO SEL-P, PARA SUBSTÂNCIA BRANCA (N=19).

PCT	VC	VE	VIT	VE/VIT-B	VC/VIT-B
2	43.357,00	452.389,00	1.530.165,00	0,30	0,03
6	39.765,00	454.321,00	1.479.335,00	0,31	0,03
10	20.597,00	391.072,00	1.453.477,00	0,27	0,01
11	27.613,00	498.803,00	1.410.986,00	0,35	0,02
22	26.630,00	396.630,00	1.298.849,00	0,31	0,02
25	37.789,00	362.042,00	1.249.981,00	0,29	0,03
26	22.763,00	359.734,00	1.147.086,00	0,31	0,02
29	36.677,00	472.126,00	1.520.500,00	0,31	0,02
35	37.105,00	448.855,00	1.536.349,00	0,29	0,02
39	25.092,00	363.866,00	1.379.798,00	0,26	0,02
47	27.965,00	385.535,00	1.317.338,00	0,29	0,02
52	34.650,00	466.418,00	1.671.976,00	0,28	0,02
55	30.272,00	465.016,00	1.445.760,00	0,32	0,02
63	37.198,00	545.263,00	1.547.281,00	0,35	0,02
66	46.254,00	547.245,00	1.690.123,00	0,32	0,03
67	34.126,00	431.460,00	1.426.504,00	0,30	0,02
73	23.255,00	443.356,00	1.189.937,00	0,37	0,02
75	34.251,00	505.082,00	1.539.195,00	0,33	0,02
88	37.448,00	479.438,00	1.453.177,00	0,33	0,03
<b>MÉDIA</b>	32.779,32	445.718,47	1.436.200,89	31,0%	2,3%
<b>DP</b>	7.236,35	57.563,53	146.691,84	2,9%	0,4%

PCT = paciente; VC = volume cerebelar; VE = volume encefálico; VIT = volume intracraniano total; DP = desvio padrão. Média foi multiplicada por 100. VE/VIT-B = Volume encefálico de substância branca normalizado; VC/VIT-B = Volume cerebelar de substância branca normalizado.

APÊNDICE 4. TABELA COM OS VOLUMES BRUTOS (EM MILÍMETROS CÚBICOS) E SEUS RESPECTIVOS ÍNDICES DO GRUPO MUT-P, PARA SUBSTÂNCIA BRANCA (N=19).

<b>PCT</b>	<b>VC</b>	<b>VE</b>	<b>VIT</b>	<b>VE/VIT-B</b>	<b>VC/VIT-B</b>
<b>3</b>	25.885,00	464.058,00	1.420.761,00	0,33	0,02
<b>4</b>	24.865,00	406.816,00	1.271.506,00	0,32	0,02
<b>7</b>	32.512,00	348.610,00	1.351.268,00	0,26	0,02
<b>14</b>	38.613,00	512.165,00	1.627.240,00	0,31	0,02
<b>17</b>	20.030,00	445.970,00	1.489.782,00	0,30	0,01
<b>19</b>	34.106,00	500.905,00	1.612.101,00	0,31	0,02
<b>24</b>	27.329,00	531.973,00	1.553.104,00	0,34	0,02
<b>28</b>	25.051,00	481.710,00	1.598.289,00	0,30	0,02
<b>31</b>	26.583,00	430.110,00	1.469.593,00	0,29	0,02
<b>32</b>	23.805,00	446.189,00	1.511.001,00	0,30	0,02
<b>38</b>	46.081,00	520.880,00	1.602.020,00	0,33	0,03
<b>51</b>	33.152,00	426.448,00	1.533.275,00	0,28	0,02
<b>53</b>	23.458,00	387.335,00	1.287.847,00	0,30	0,02
<b>57</b>	32.515,00	462.219,00	1.606.700,00	0,29	0,02
<b>61</b>	35.435,00	584.361,00	1.658.245,00	0,35	0,02
<b>62</b>	22.244,00	452.073,00	1.464.701,00	0,31	0,02
<b>82</b>	18.138,00	417.209,00	1.527.620,00	0,27	0,01
<b>91</b>	23.396,00	444.987,00	1.453.177,00	0,31	0,02
<b>95</b>	26.311,00	397.452,00	1.339.486,00	0,30	0,02
<b>MÉDIA</b>	28.395,21	455.866,84	1.493.564,00	30,1%	1,8%
<b>DP</b>	6.984,44	56.700,69	116.696,79	2,2%	0,3%

PCT = paciente; VC = volume cerebral; VE = volume encefálico; VIT = volume intracraniano total; DP = desvio padrão; VC b/c = volume cerebral da substância branca divididos pela cinzenta. Média foi multiplicada por 100. VE/VIT-B = Volume encefálico de substância branca normalizado; VC/VIT-B = Volume cerebral de substância branca normalizado.

APÊNDICE 5. TABELA COM OS VOLUMES BRUTOS (EM MILÍMETROS CÚBICOS) E SEUS RESPECTIVOS ÍNDICES DO GRUPO SEL-P, PARA SUBSTÂNCIA CINZENTA (N=19).

<b>PCT</b>	<b>VC</b>	<b>VE</b>	<b>VIT</b>	<b>VE/VIT-C</b>	<b>VC/VIT-C</b>
<b>2</b>	84.867,00	444.527,00	1.530.165,00	0,29	0,06
<b>6</b>	82.592,00	387.849,00	1.479.335,00	0,26	0,06
<b>10</b>	66.436,00	429.443,00	1.453.477,00	0,30	0,05
<b>11</b>	93.145,00	507.008,00	1.410.986,00	0,36	0,07
<b>22</b>	79.412,00	394.852,00	1.298.849,00	0,30	0,06
<b>25</b>	49.220,00	352.105,00	1.249.981,00	0,28	0,04
<b>26</b>	76.088,00	333.170,00	1.147.086,00	0,29	0,07
<b>29</b>	71.715,00	427.166,00	1.520.500,00	0,28	0,05
<b>35</b>	68.814,00	468.234,00	1.536.349,00	0,30	0,04
<b>39</b>	70.137,00	418.502,00	1.379.798,00	0,30	0,05
<b>47</b>	76.028,00	388.468,00	1.317.338,00	0,29	0,06
<b>52</b>	97.903,00	456.381,00	1.671.976,00	0,27	0,06
<b>55</b>	79.344,00	432.002,00	1.445.760,00	0,30	0,05
<b>63</b>	86.413,00	487.986,00	1.547.281,00	0,32	0,06
<b>66</b>	72.109,00	492.619,00	1.690.123,00	0,29	0,04
<b>67</b>	67.737,00	383.828,00	1.426.504,00	0,27	0,05
<b>73</b>	48.238,00	385.618,00	1.189.937,00	0,32	0,04
<b>75</b>	75.497,00	424.983,00	1.539.195,00	0,28	0,05
<b>88</b>	53.281,00	410.178,00	1.453.177,00	0,28	0,04
<b>MÉDIA</b>	73.630,31	422.364,15	1.436.200,89	29,4%	5,1%
<b>DP</b>	13.341,46	46.737,85	146.691,84	2,2%	0,8%

PCT = paciente; VC = volume cerebelar; VE = volume encefálico; VIT = volume intracraniano total; DP = desvio padrão; VE/VIT-C = Volume encefálico de substância cinzenta normalizado; VC/VIT-C = Volume cerebelar de substância cinzenta normalizado.

APÊNDICE 6. TABELA COM OS VOLUMES BRUTOS (EM MILÍMETROS CÚBICOS) E SEUS RESPECTIVOS ÍNDICES DO GRUPO MUT-P, PARA SUBSTÂNCIA CINZENTA (N=19).

PCT	VC	VE	VIT	VE/VIT-C	VC/VIT-C
3	75.605,00	452.168,00	1.420.761,00	0,32	0,05
4	53.473,00	415.021,00	1.271.506,00	0,33	0,04
7	85.365,00	415.222,00	1.351.268,00	0,31	0,06
14	81.330,00	480.077,00	1.627.240,00	0,30	0,05
17	47.632,00	445.969,00	1.489.782,00	0,30	0,03
19	86.615,00	466.277,00	1.612.101,00	0,29	0,05
24	79.958,00	459.674,00	1.553.104,00	0,30	0,05
28	84.763,00	426.988,00	1.598.289,00	0,27	0,05
31	96.757,00	464.612,00	1.469.593,00	0,32	0,07
32	47.782,00	498.505,00	1.511.001,00	0,33	0,03
38	94.431,00	544.008,00	1.602.020,00	0,34	0,06
51	79.027,00	431.109,00	1.533.275,00	0,28	0,05
53	64.504,00	423.758,00	1.287.847,00	0,33	0,05
57	86.176,00	463.954,00	1.606.700,00	0,29	0,05
61	82.553,00	457.724,00	1.658.245,00	0,28	0,05
62	79.336,00	446.674,00	1.464.701,00	0,30	0,05
82	64.710,00	327.023,00	1.527.620,00	0,21	0,04
91	42.180,00	439.037,00	1.453.177,00	0,30	0,03
95	78.633,00	373.139,00	1.339.486,00	0,28	0,06
<b>MÉDIA</b>	74.245,21	443.733,63	1.493.564,84	29,8%	4,8%
<b>DP</b>	16.192,66	45.562,20	116.696,84	2,8%	0,9%

PCT = paciente; VC = volume cerebelar; VE = volume encefálico; VIT = volume intracraniano total; DP = desvio padrão; VE/VIT-C = Volume encefálico de substância cinzenta normalizado; VC/VIT-C = Volume cerebelar de substância cinzenta normalizado.

**ARTIGOS**

CYP2C9 polymorphism in patients with epilepsy: Genotypic frequency analyzes and phenytoin adverse reactions correlation (Twardowschy et al., 2011).

# CYP2C9 polymorphism in patients with epilepsy

## Genotypic frequency analyzes and phenytoin adverse reactions correlation

Carlos Alexandre Twardowschy<sup>1</sup>, Lineu César Werneck<sup>1,2</sup>,  
Rosana Herminia Scola<sup>1,2</sup>, Luciano De Paola<sup>1,2</sup>, Carlos Eduardo Silvado<sup>1,2</sup>

### ABSTRACT

**Objective:** CYP2C9 is a major enzyme in human drug metabolism and the polymorphism observed in the corresponding gene may affect therapeutic outcome during treatment. The distribution of variant CYP2C9 alleles and prevalence of phenytoin adverse reactions were hereby investigated in a population of patients diagnosed with epilepsy. **Method:** Allele-specific PCR analysis was carried out in order to determine frequencies of the two most common variant alleles, CYP2C9\*2 and CYP2C9\*3 in genomic DNA isolated from 100 epileptic patients. We also analyzed the frequency of phenytoin adverse reactions among those different genotypes groups. The data was presented as mean±standard deviation. **Results:** The mean age at enrollment was 39.6±10.3 years (range, 17-72 years) and duration of epilepsy was 26.5±11.9 years (range 3-48 years). The mean age at epilepsy onset was 13.1±12.4 years (range, 1 month-62 years). Frequencies of CYP2C9\*1 (84%), CYP2C9\*2 (9%) and CYP2C9\*3 (7%) were similar to other published reports. Phenytoin adverse reactions were usually mild and occurred in 15% patients, without correlation with the CYP2C9 polymorphism (p=0.34). **Conclusion:** Our findings indicate an overall similar distribution of the CYP2C9 alleles in a population of patients diagnosed with epilepsy in the South of Brazil, compared to other samples. This sample of phenytoin users showed no drug related adverse reactions and CYP2C9 allele type correlation. The role of CYP2C9 polymorphism influence on phenytoin adverse reaction remains to be determined since some literature evidence and our data found negative results.

**Key words:** CYP2C9, polymorphism, Brazilian population, phenytoin, adverse reactions.

### Polimorfismo do CYP2C9 em pacientes com epilepsia: estudo da frequência genotípica e correlação com os efeitos colaterais da fenitoína

### RESUMO

**Objetivo:** A CYP2C9 é uma das principais enzimas do metabolismo de drogas humano e o polimorfismo observado no respectivo gene pode afetar o resultado terapêutico durante o tratamento. Neste trabalho investigamos em uma população de pacientes portadores de epilepsia a distribuição dos alelos variantes do CYP2C9 e a frequência de efeitos adversos da fenitoína tentando estabelecer uma correlação. **Método:** Realizamos uma análise através de uma PCR alelo específica para determinar a frequência dos alelos variantes mais comuns, CYP2C9\*2 e CYP2C9\*3, isolados da amostra de 100 pacientes com epilepsia. Também levantamos a frequência de reações adversas da fenitoína nestes diferentes grupos genotípicos. Os dados são apresentados na forma de média e desvio-padrão. **Resultados:** A idade média na inclusão foi 39,6±10,3 anos (variando de 17-72 anos) e a duração da epilepsia era 26,5±11,9 anos (variando de 3-48 anos). A idade média dos pacientes no início da epilepsia era 13,1±12,4 anos (variando de 1 mês-62 anos). As frequências do CYP2C9\*1 (84%), CYP2C9\*2 (9%) e CYP2C9\*3 (7%) foram similares

### Correspondence

Carlos Silvado  
Hospital de Clínicas / UFPR  
Rua General Carneiro 181 / 3º andar  
80060-900 Curitiba PR - Brasil  
E-mail: silvado@hc.ufpr.br

### Support

This work received funds from the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq)

Received 1 June 2010

Received in final form 1 November 2010

Accepted 8 November 2010

Molecular Biology Laboratory, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR), Curitiba PR, Brazil: <sup>1</sup>Neurologist, HC-UFPR; <sup>2</sup>Professor of Neurology, HC-UFPR.

a outros estudos publicados. As reações adversas da fenitoína foram frequentemente leves e ocorreram em 15% dos pacientes, sem correlação com o polimorfismo do *CYP2C9* ( $p=0.34$ ). **Conclusão:** Nossos achados indicam uma distribuição similar dos alelos variantes \*2 e \*3 nesta população de pacientes com epilepsia comparado a outros estudos. Esta amostra de usuários de fenitoína mostrou não haver correlação entre efeitos colaterais relacionados à droga e o tipo de alelo variante. O papel da influência do polimorfismo do *CYP2C9* nos efeitos colaterais da fenitoína precisam ser melhor determinados, já que algumas evidências da literatura e este trabalho mostraram resultados negativos.

**Palavras-chave:** *CYP2C9*, polimorfismo, fenitoína, reações adversas.

Pharmacogenetics constitutes a potential tool for predicting among patients those who are likely to express the desired response to a drug, those who are likely to experience little or no benefit and those who are at risk for toxicity. Cytochrome P450 2C9 (*CYP2C9*) catalyses the metabolism of many important drugs such as phenytoin, S-warfarin, tolbutamide, losartan, torasemide, as well as, nonsteroidal antiinflammatories<sup>1</sup>. Genetic variation in the *CYP2C9* gene can affect metabolism, leading to altered phenotypes. Individuals with poor metaboliser alleles of *CYP2C9* gene were shown to have a reduced metabolism of phenobarbital, phenytoin and valproate compared with those with wild-type (normal) alleles<sup>2-9</sup>. Several studies indicate that the most common allelic variants are *Arg144Cys* (*CYP2C9*\*2) and *Ile358Leu* (*CYP2C9*\*3) which encode enzymes with decreased substrate turnover<sup>10,11</sup>. As the most commonly prescribed antiepileptic drugs (AEDs) in developed countries are metabolized by the cytochrome p450 system, the identification of patients' genotype prior to AEDs administration could potentially prevent higher serum drug concentrations leading to adverse side effects.

Phenytoin was first added to epilepsy treatment in the 60's<sup>12</sup> and besides the new AEDs it remains one of the most prescribed AED for partial seizures with or without secondary generalization<sup>13</sup>. Its main route of elimination is through hepatic oxidation under *CYP2C9* (90%) and *CYP2C19* (10%) metabolism<sup>8,14,15</sup>. Phenytoin metabolism rate can be reduced by 25 to 50% depending on the individual genetic polymorphism and drug interactions through same pathway<sup>2,8,14,16</sup>. Its use can be associated to several dose related or idiosyncratic adverse events. Cosmetic facial changes, in spite of generally mild, can be problematic<sup>17</sup>. Neuronal toxic effects including confusion, dysarthric speech, double vision, ataxic gait and neuropathy could be observed during prolonged use or in acute intoxications<sup>13</sup>. Moreover, some studies have tried to link the development of those side effects looking for a correlation between *CYP2C9* genetic polymorphism and phenytoin adverse reactions<sup>18-20</sup>.

Interethnic differences in *CYP2C9* allele distribu-

tion have been described between Europeans, Asians and Africans<sup>1,21</sup>. Brazil represents one of World's most heterogeneous populations, as the result of 500 years of extensive interethnic crossover. Until now, just three studies assessed the *CYP2C9* polymorphism frequency among Brazilian population<sup>22-24</sup>. The genotype analyses revealed that the frequencies of *CYP2C9*\*2 and *CYP2C9*\*3 were 8-9% and 6-7%<sup>22,23</sup>.

Thus, the purpose of the present study was to determine the frequency of the different *CYP2C9* alleles (\*2 and \*3) in a Brazilian group of people with epilepsy and to potentially correlate phenytoin adverse events to a specific genotypic profile.

## METHOD

### Subjects

Most of the individuals were characterized as having refractory drug resistant epilepsy followed in a tertiary epilepsy program at the Hospital de Clínicas, Federal University of Paraná, Brazil. All subjects come from either Curitiba or its metropolitan area, accounting for estimated 3 million people. The study protocol was approved by the Hospital de Clínicas - UFPR research ethics committee. After a detailed explanation all subjects signed a written informed consent form. All subjects in the study have had a documented use of phenytoin for over 1 year. They were selected during February 2008 until June 2009. All patients meeting those criteria were included until we have one hundred patients (52 men and 48 women). Before the blood collection hospital records were reviewed retrospectively looking for phenytoin adverse reactions (PAR) reports. Also, the patient was inquired about any adverse events during phenytoin exposure. The mean age at enrollment was  $39.6 \pm 10.3$  years (range, 17-72 years). The mean age at epilepsy onset was  $13.1 \pm 12.4$  years (range, 1 month-62 years). The epilepsy duration was  $26.5 \pm 11.9$  years (range 3-48 years). Seizure frequency in a given month varied from a mean of  $1.6 \pm 2.1$  seizures to  $4.6 \pm 4.6$ . The most frequent epilepsy type was symptomatic localized, 22%, followed by 12% non classified, 7% cryptogenic general-

**Table 1.** Overall studied population demographic and clinical data.

Characteristics	Mean	SD	95% CI
Age	39.6 years	10.3	37.6-41.7
Maximum seizure frequency/month	4.6	4.6	3.7-5.5
Minimum seizure frequency/month	1.6	2.1	1.2-2.0
Epilepsy onset	13.1 years	12.4	10.7-15.6
Epilepsy duration	26.5 years	11.9	24.1-28.8

SD: standard deviation; CI: confidence interval.

**Table 2.** Correlation between genotype, epilepsy and drug treatment.

	Overall	Variants *2 and *3	Wild-type	p valor
Number of cases	100	28	72	
Epilepsy duration - mean years (SD)	26.58 (±11.91)	22.85 (±13.53)	27.92 (±10.99)	0.66*
Duration of phenytoin usage - mean years (SD)	8.33 (±6.91)	5.04 (±7.14)	8.88 (±7.56)	0.18*
Maximum phenytoin dosage - mean mg (SD)	312.6 (±77.6)	326.9 (±91.9)	308.2 (±77.72)	0.31*
Reported side effects - number of individuals (%)	15 (15%)	6 (21%)	9 (12%)	0.34**

\*Mann-Whitney U-test; \*\*Fisher's exact test.

ized, 5% localized cryptogenic and 3% idiopathic generalized. Demographic features of the studied population are summarized in Table 1. The mean use of phenytoin was 8.3 years (±6.9 years) for the entire group, with an average maximum daily dosage of 301.5 mg (±78 mg) (Table 2). All patients had their phenytoin regimen titrated according to clinical efficacy versus adverse side effects, over a period of approximately 3 to 6 months.

### CYP2C9 genotyping

The crude DNA samples were analyzed using polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism (RFLP) method for *Arg144Cys* (*CYP2C9*\*2) and *Ile359Leu* (*CYP2C9*\*3) variant alleles using the primers mentioned by Sullivan-Klose et al. 1996<sup>10</sup>.

### Data analysis

Allelic frequencies were derived by gene counting. The Chi-square test was used to compare allele frequencies. Mann-Whitney U-test was used to compare time of phenytoin usage, phenytoin maximum dosage and epilepsy duration since data do not assume a Gaussian distribution. Frequency of phenytoin adverse events were compared with Fisher's exact test. The observed genotype frequencies of *CYP2C9* were also analyzed by Hardy Weinberg Equilibrium (HWE) for the predicted frequencies. The value  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

The genotype frequencies for the study population

**Table 3.** Frequency (%) of *CYP2C9* genotypes in an epileptic South Brazilian population.

Genotype	Number of subjects	Observed frequency (%)	Predicted frequency(%)*
*1/*1	72	72	72.2
*1/*2	13	13	14.4
*1/*3	11	11	11
*2/*2	1	1	0.7
*3/*3	0	0	0.4
*2/*3	3	3	1.1

\*Predicted frequency calculated according to the Hardy-Weinberg equation. There are no significant difference between the observed and predicted groups.

are listed in Table 3. The variant alleles *CYP2C9*\*2 and *CYP2C9*\*3 were detected in 9% (n=18 alleles) and 7% (n=14 alleles), respectively, of the overall study population. Among the study population, one subject were homozygous for *CYP2C9*\*2 and three were heterozygous for both \*2 and \*3 variants. No patient was found carrying the *CYP2C9*\*3 homozygous. The observed frequencies for the overall study population was concordant with HWE (Table 2).

There were no significant differences regarding the maximum phenytoin daily dose (Table 3), between the variant group (326.9 mg±91.9) and the wild-type group (308.2 mg±77.72, p=0.31). Other variables such as duration of phenytoin usage (p=0.18) and duration of epilepsy (p=0.66) were not significant, as well (Table 3).

The frequency of PAR in the overall study population was 15% (n=15) and for the group with at last one

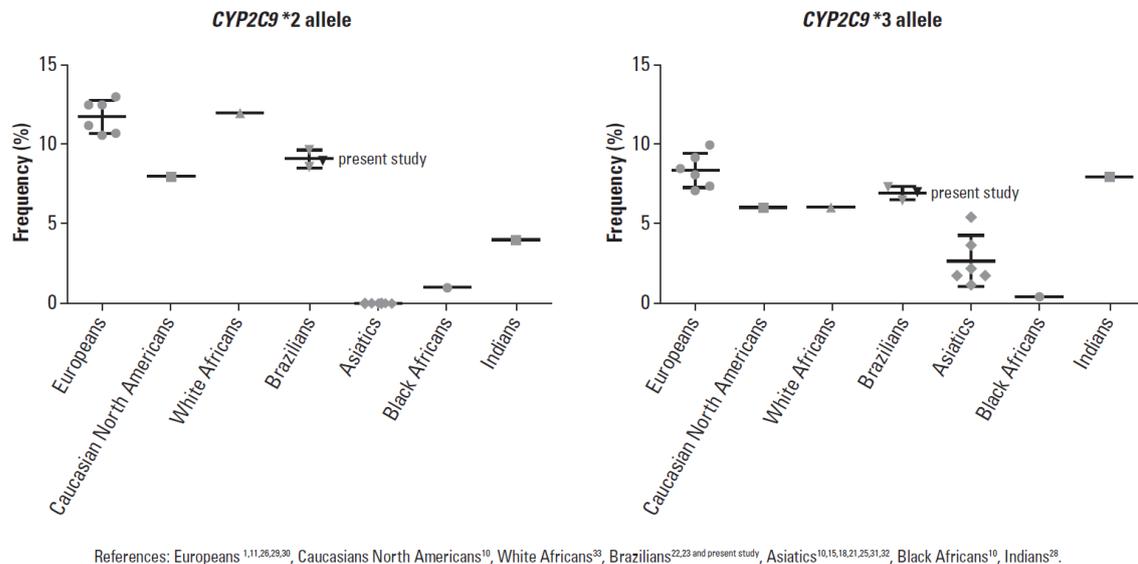


Figure. Frequency (%) of *CYP2C9* alleles around the world.

variant allele it was 21% (n=6), a non-statistically significant difference ( $p=0.34$ ), comparing variants with mutants (Table 3). Subgroups analysis regarding heterozygous, homozygous or variant type were not possible due to the limited size of our population. The most common PAR observed were gingival overgrowth, in 8% (n=8), and cerebellar intoxication signs, in 7% (n=7). Mild nystagmus on lateral forced gaze, without any other cerebellar signs were not considerate as PAR, since it is frequently found during phenytoin titration and has no clinical significance.

As the majority of patients were characterized as refractory epilepsy a high number of individuals used more than one drug. At some point during the phenytoin treatment period 76% used another concomitant drug therapy. The most common associated used drugs were phenobarbital, 27%, carbamazepine, 26% and lamotrigine, 20%. Also, topiramate, clobazam, primidone and valproic acid were used less frequently.

## DISCUSSION

The characterization of *CYP2C9* genetic polymorphism might contribute to the optimization of therapy in a range of clinically important drugs like antiepileptics. Many studies have shown considerable interethnic differences in *CYP2C9* polymorphism around the World<sup>1,10,11,16,18,23,25-30</sup>.

Global distribution analyses of *CYP2C9* polymorphism suggests that *CYP2C9\*2* and *CYP2C9\*3* variants

are more frequently found in European populations. Some studies demonstrated that *CYP2C9\*2* frequency varied from 10.7%<sup>26</sup> to 16.5%<sup>30</sup> and the *CYP2C9\*2* from 7.1%<sup>30</sup> to 9.2%<sup>1</sup> in such population. Asiatics<sup>10,18,21,25,31,32</sup> present no *CYP2C9\*2* mutation and very low incidence of *CYP2C9\*3*, ranging from 1.1%<sup>32</sup> to 5.4%<sup>18</sup>. These findings may imply that the *CYP2C9* allele evolved quite recently. In accordance, Asiatics and Africans<sup>1</sup> also had shown a low incidence of both *CYP2C9\*2* (4%) and *CYP2C9\*3* (2%) alleles. Similarly, black North<sup>10</sup> and South Americans<sup>22,23</sup> showed low mutation rates of *CYP2C9\*2* and *CYP2C9\*3* alleles, 1.0-4.5 and 0.5-3.2 respectively. The frequencies of the *CYP2C9\*2* (9%) and *CYP2C9\*3* (7%) found in our epileptic Brazilian population were very close to those found in European populations (Figure).

Almost all genetic studies reveal the predominance of *CYP2C9\*2* mutation over the *CYP2C9\*3*. By contrast we find higher rates of *CYP2C9\*3* allele in comparison with *CYP2C9\*2* in populations such Asiatics (Japanese<sup>3</sup>, Chinese<sup>25</sup>, Korean<sup>32</sup>), Canadian Native Indians<sup>28</sup> and Indians<sup>14</sup>.

The South Brazilian epileptic patients in this study showed similar genotyping results consistent with evidence that subjects from many parts of the World have a significantly higher frequency of both *CYP2C9\*2* and *CYP2C9\*3* alleles than do black, Asiatic or Indian subjects. The frequency analysis of *CYP2C9* polymorphism in Brazilian healthy volunteers<sup>23,24</sup> showed overall results very similar to ours. In this study, when a comparison

with the genotypic distributions reported for other populations was performed no significant differences were observed between white Brazilians and other European or between black Brazilians and either Africans from Ethiopia or African Americans<sup>23</sup>.

A few studies have tried to establish a relationship between the development of phenytoin side effects and the presence of *CYP2C9*\*2 and *CYP2C9*\*3 variants<sup>18,20</sup>. Incidence of phenytoin induced gingival overgrowth in epileptic patients may be as high as 57%<sup>19</sup>, but whether this or other phenytoin side effects may be influenced by cytochrome P450 polymorphism remains to be yet determined. In our study only 8% showed this adverse reaction. Subjects with more severe gingival overgrowth exhibited significantly higher serum phenytoin concentration, but the degree of gingival overgrowth did not directly correlate with *CYP2C9* polymorphisms<sup>18</sup>. However, *CYP2C9*\*3 variant could play a role in the proportion of patients with diphenylhydantoin induced cutaneous adverse reaction<sup>20</sup>.

We could expect that variant group would have reached a lower phenytoin maximum dosage, because the lower metabolization rate, but it was not founded. The mean maximum dosage used was similar in both groups. Although PAR were almost twice more frequent in variant group (21%×12%), these findings were no statistical significant. Maybe if we were able to do subgroup analyses splitting in heterozygote and homozygote some PAR genotype correlation could exist.

We were not able to find an association between the report of PAR and *CYP2C9* genetic polymorphism. However, it seems to be clear that several factors may contribute to the lack of correlation between *CYP2C9* genetic polymorphism and PAR. Not only *CYP2C9* but also *CYP2C19* has been reported to catalyze phenytoin<sup>8,14</sup>. Some studies also indicate the role of P-glycoprotein in the disposition of phenytoin. Unfortunately, we are unable to do such genotyping. Moreover, concomitant drug therapies maybe could significant interfere with the phenytoin metabolism. In our study 76% of patients used concomitant medications at some point during the treatment which could possible modify the phenytoin metabolism. In this sample we do not had the actual or past phenytoin plasma concentrations.

Of course, this work has some limitations. A main problem could be the reduced number of subjects with PAR. Perhaps a larger sample may overcome this issue. Moreover, this study seems underpowered in this respect. But, besides the small sample, our findings indicate an overall similar distribution of the *CYP2C9* alleles in the South Brazilian epileptic population compared to European or Brazilian samples. Up to this point, development of side adverse effects related to phenytoin were

no different among the *CYP2C9* genotypes, but larger studies with control of the interfering factors are needed to clarify some of the pending issues described above. The characterization of *CYP2C9* genetic polymorphism influence on phenytoin adverse events might contribute to a better therapy optimization.

## REFERENCES

- Scordo MG, Akillu E, Yasar U, Dahl ML, Spina E, Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C9 in a Caucasian and a black African population. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52:447-450.
- Tate SK, Depondt C, Sisodiya SM, et al. Genetic predictors of the maximum doses patients receive during clinical use of the anti-epileptic drugs carbamazepine and phenytoin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:5507-5512.
- Mamiya K, Ieiri I, Shimamoto J, et al. The effects of genetic polymorphisms of *CYP2C9* and *CYP2C19* on phenytoin metabolism in Japanese adult patients with epilepsy: studies in stereoselective hydroxylation and population pharmacokinetics. *Epilepsia* 1998;39:1317-1323.
- Ho PC, Abbott FS, Zanger UM, Chang TK. Influence of *CYP2C9* genotypes on the formation of a hepatotoxic metabolite of valproic acid in human liver microsomes. *Pharmacogenomics J* 2003;3:335-342.
- Mamiya K, Hadama A, Yukawa E, et al. *CYP2C19* polymorphism effect on phenobarbitone. *Pharmacokinetics in Japanese patients with epilepsy: analysis by population pharmacokinetics. Eur J Clin Pharmacol* 2000;55:821-825.
- Odani A, Hashimoto Y, Otsuki Y, et al. Genetic polymorphism of the *CYP2C* subfamily and its effect on the pharmacokinetics of phenytoin in Japanese patients with epilepsy. *Clin Pharmacol Ther* 1997;62:287-292.
- Xiao ZS, Goldstein JA, Xie HG, et al. Differences in the incidence of the *CYP2C19* polymorphism affecting the S-mephenytoin phenotype in Chinese Han and Bai populations and identification of a new rare *CYP2C19* mutant allele. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;281:604-609.
- Hung CC, Lin CJ, Chen CC, Chang CJ, Liou HH. Dosage recommendation of phenytoin for patients with epilepsy with different *CYP2C9/CYP2C19* polymorphisms. *Ther Drug Monit* 2004;26:534-540.
- Taguchi M, Hongou K, Yagi S, et al. Evaluation of phenytoin dosage regimens based on genotyping of *CYP2C* subfamily in routinely treated Japanese patients. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005;20:107-112.
- Sullivan-Klose TH, Ghanayem BI, Bell DA, et al. The role of the *CYP2C9*-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics* 1996;6:341-349.
- Stubbins MJ, Harries LW, Smith G, Tarbit MH, Wolf CR. Genetic analysis of the human cytochrome P450 *CYP2C9* locus. *Pharmacogenetics* 1996;6:429-439.
- Merritt HH, Putnam TJ. Landmark article Sept 17, 1938: Sodium diphenylhydantoin in the treatment of convulsive disorders. *JAMA* 1984;251:1062-1067.
- Perucca E. NICE guidance on newer drugs for epilepsy in adults. *BMJ* 2004;328:1273-1274.
- Rosemary J, Surendiran A, Rajan S, Shashindran CH, Adithan C. Influence of the *CYP2C9* AND *CYP2C19* polymorphisms on phenytoin hydroxylation in healthy individuals from South India. *Indian J Med Res* 2006;123:665-670.
- Yukawa E, Mamiya K. Effect of *CYP2C19* genetic polymorphism on pharmacokinetics of phenytoin and phenobarbital in Japanese epileptic patients using non-linear mixed effects model approach. *J Clin Pharm Ther* 2006;31:275-282.
- Aynacioglu AS, Brockmoller J, Bauer S, et al. Frequency of cytochrome P450 *CYP2C9* variants in a Turkish population and functional relevance for phenytoin. *Br J Clin Pharmacol* 1999;48:409-415.
- Brodie MJ, Dichter MA. Antiepileptic drugs. *N Engl J Med* 1996;334:168-175.
- Soga Y, Nishimura F, Ohtsuka Y, et al. *CYP2C* polymorphisms, phenytoin metabolism and gingival overgrowth in epileptic subjects. *Life Sci* 2004;74:827-834.
- Prasad VN, Chawla HS, Goyal A, Gauba K, Singhi P. Incidence of phenytoin induced gingival overgrowth in epileptic children: a six month evaluation. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2002;20:73-80.
- Lee AY, Kim MJ, Chey WY, Choi J, Kim BG. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C9 in diphenylhydantoin-induced cutaneous adverse drug reactions. *Eur J Clin Pharmacol* 2004;60:155-159.

*CYP2C9* polymorphism: phenytoin adverse reactions  
Twardowschy et al.

Arq Neuropsiquiatr 2011;69(2-A)

21. Kimura M, Ieiri I, Mamiya K, Urae A, Higuchi S. Genetic polymorphism of cytochrome P450s, CYP2C19, and CYP2C9 in a Japanese population. *Ther Drug Monit* 1998;20:243-247.
22. Lima MV, Ribeiro GS, Mesquita ET, Victor PR, Vianna-Jorge R. CYP2C9 genotypes and the quality of anticoagulation control with warfarin therapy among Brazilian patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2008;64:9-15.
23. Vianna-Jorge R, Perini JA, Rondinelli E, Suarez-Kurtz G. CYP2C9 genotypes and the pharmacokinetics of tenoxicam in Brazilians. *Clin Pharmacol Ther* 2004;76:18-26.
24. Suarez-Kurtz G, Perini JA, Vianna-Jorge R. CYP2C9 genotyping and phenotyping in Brazilians: effects on the pharmacokinetics of the NSAID tenoxicam. *Clin Pharmacol Ther* 2004;75:P20.
25. Wang SL, Huang J, Lai MD, Tsai JJ. Detection of CYP2C9 polymorphism based on the polymerase chain reaction in Chinese. *Pharmacogenetics* 1995;5:37-42.
26. Yasar U, Eliasson E, Dahl ML, Johansson I, Ingelman-Sundberg M, Sjoqvist F. Validation of methods for CYP2C9 genotyping: frequencies of mutant alleles in a Swedish population. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254:628-631.
27. Jose R, Chandrasekaran A, Sam SS, et al. CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms: frequencies in the south Indian population. *Fundam Clin Pharmacol* 2005;19:101-105.
28. Gaedigk A, Casley WL, Tyndale RF, Sellers EM, Jurima-Romet M, Leeder JS. Cytochrome P4502C9 (CYP2C9) allele frequencies in Canadian Native Indian and Inuit populations. *Can J Physiol Pharmacol* 2001;79:841-847.
29. Scott SA, Edelmann L, Kornreich R, Erazo M, Desnick RJ. CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 allele frequencies in the Ashkenazi Jewish population. *Pharmacogenomics* 2007;8:721-730.
30. Sanchez-Diz P, Estany-Gestal A, Aguirre C, et al. Prevalence of CYP2C9 polymorphisms in the south of Europe. *Pharmacogenomics* 2009;9:306-310.
31. Nasu K, Kubota T, Ishizaki T. Genetic analysis of CYP2C9 polymorphism in a Japanese population. *Pharmacogenetics* 1997;7:405-409.
32. Yoon YR, Shon JH, Kim MK, et al. Frequency of cytochrome P450 2C9 mutant alleles in a Korean population. *Br J Clin Pharmacol* 2001;51:277-280.
33. Hamdy SI, Hiratsuka M, Narahara K, et al. Allele and genotype frequencies of polymorphic cytochromes P450 (CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1) and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) in the Egyptian population. *Br J Clin Pharmacol* 2002;53:596-603.

The role of CYP2C9 polymorphisms in phenytoin-related cerebellar atrophy(Twardowschy et al., 2013).



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Seizure

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yseiz](http://www.elsevier.com/locate/yseiz)

## The role of *CYP2C9* polymorphisms in phenytoin-related cerebellar atrophy

Carlos A. Twardowschy, Lineu C. Werneck, Rosana H. Scola, João G. Borgio, Luciano De Paola, Carlos Silvado\*

Neurology Service and Molecular Biology Laboratory, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 July 2012

Received in revised form 4 December 2012

Accepted 4 December 2012

#### Keywords:

Phenytoin

Cerebellar

*CYP2C9*

Atrophy

### ABSTRACT

**Purpose:** Phenytoin is known to be able to induce cerebellar atrophy in patients with epilepsy. It is also known that a *CYP2C9* mutation (\*2 or \*3) reduces phenytoin metabolism by 25–50% and can increase the risk of phenytoin-related side effects. We examined the influence of *CYP2C9* polymorphisms on total cerebellar volume and cerebellar gray and white matter volumes in patients with epilepsy taking phenytoin.

**Methods:** For the genotyping, 100 adult patients with documented epilepsy who had been taking phenytoin for >1 year were selected. From this group, we randomly selected 19 mutant individuals (MT group; *CYP2C9*\*2 and \*3) for a whole-brain volume measurement using MRI and 19 wild-type individuals (group WT; *CYP2C9*\*1) with similar clinical and demographic characteristics to those in the MT group for comparison. Total intracranial volume measurements were used to normalize the acquired volumes, which were separated into gray matter volume, white matter volume, and total volume.

**Results:** The MT group exhibited a significant reduction in cerebellar white matter volume ( $p = 0.002$ ) but not in total cerebellar volume.

**Conclusion:** Our study is the first to report evidence linking *CYP2C9* polymorphism and a reduction in cerebellar volume in epileptic users of phenytoin.

© 2012 British Epilepsy Association. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Genetic variation in the *CYP2C9* gene produces altered phenotypes that can affect metabolism. In individuals with poor *CYP2C9* metabolizer alleles, metabolism of phenytoin can be 25–50% lower than in individuals with wild-type alleles depending on the genetic polymorphism the patient carries and drug interactions that affect the cytochrome P450 pathway.<sup>1</sup> Several studies have shown that the most common allelic variants are Arg<sub>144</sub>Cys (*CYP2C9*\*2) and Ile<sub>359</sub>Leu (*CYP2C9*\*3), which encode enzymes with decreased turnover rates.<sup>2</sup> The main route by which phenytoin is metabolized and eliminated is through hepatic oxidation by *CYP2C9* (90%) and *CYP2C19* (10%).<sup>3</sup>

Cerebellar atrophy has been reported as a common finding in patients suffering from epilepsy.<sup>4</sup> Although the exact cause is unknown, atrophy is often attributed to either the seizure activity itself or antiepileptic medication,<sup>5</sup> and phenytoin is by far the most implicated drug.

Since the etiology of cerebellar atrophy in phenytoin users remains unknown, we hypothesize that *CYP2C9* polymorphism may be involved. The aim of this study was to evaluate the relationship between poor phenytoin metabolism and cerebellar atrophy in patients with epilepsy using this medication.

### 2. Methods

#### 2.1. Subjects

**Initial selection.** The inclusion criteria were age  $\geq 14$  years and at least one year of clearly documented use of phenytoin for epilepsy treatment. The study was approved by the Research Ethics Committee at the Hospital de Clínicas, Federal University of Paraná. One hundred subjects were selected for genotyping. Mean age at enrollment was  $39.6 \pm 10.3$  years (17–72 years) and mean age at onset of epilepsy was  $13.1 \pm 12.4$  years (1 month–62 years). Mean duration of epilepsy was  $26.5 \pm 11.9$  years (3–48 years) and mean length of phenytoin use was  $8.3 \pm 6.9$  years for all patients, with an average maximum daily dosage of  $301.5 \pm 78$  mg.

#### 2.2. *CYP2C9* genotyping

Crude DNA samples were analyzed using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and the

\* Corresponding author at: Hospital de Clínicas UFPR, Rua General Carneiro, 181 3° andar, Curitiba, Paraná CEP 80.060-900, Brazil. Tel.: +55 41 99328828; fax: +55 41 37792083.

E-mail address: [silvado@hc.ufpr.br](mailto:silvado@hc.ufpr.br) (C. Silvado).

primers described by Sullivan-Klose et al.<sup>2</sup> to identify the CYP2C9\*2 and CYP2C9\*3 allelic variants of CYP2C9. Genotype frequencies of the studied population were 72% for the \*1/\*1 genotype and 28% for the other genotypes (\*1/\*2, \*2/\*2, \*1/\*3, \*2/\*3), showing that this population is in Hardy–Weinberg equilibrium.<sup>6</sup>

### 2.3. Study groups

To compare the cerebral and cerebellar volumes of the 28 patients with at least one variant allele (mutant, or MT, group) with the corresponding volumes of the 72 patients with wild-type CYP2C9 (wild-type, or WT, group), we randomly selected 19 individuals from MT group. WT group we select 19 individuals that were most matching to each one of the MT group, the selection criteria were number of years of epilepsy and years of phenytoin use.

### 2.4. Imaging data

The 38 subjects were scanned on a 1.5 T GE Sigma MRI scanner (GE Medical Systems). A 3D volume was acquired for volumetric measurements (TR, 430 ms; TI, 12 ms; flip angle, 180; matrix size, 250 × 250; and FOV, 25 × 25 cm) with continuous 1 mm-thick slices. All image records were identified by the MRI number alone, and observers were blinded to subjects' genetic data when measurements were taken.

Volumetric analyses were processed with MIPAV (version 4.3.0–2009-08-03 from Biomedical Imaging Research Services Section, ISL, CIT, NIH).<sup>7</sup> All images were processed according to a semi-automatic standard protocol.<sup>8</sup>

For measurement purposes, we considered brain volume (BV) as the sum of the following volumes of interest (VOIs): cerebral hemispheres, basal ganglia, inter-hemispheric fissure, and pons. Cerebellar volume (CV) and BV were calculated excluding cerebrospinal fluid (CSF). Total intracranial volume (TICV) was considered as the sum of CV, BV, and CSF. All VOI measurements were normalized by dividing VOI by TICV (for example, CV/TICV\*100 or BV/TICV\*100) and recorded as percentages. Normalized CV and BV volumes were analyzed for gray matter (GM) and

white matter (WM) alone or for both (total). Thus, CV-GM is the normalized cerebellar gray matter volume. We preferred to use TICV-normalized volumes to avoid differences in volumes due to cranial size.

### 2.5. Reproducibility of measurements

To determine the validity of the volumetric measurements, all examinations were conducted twice by the same observer (intra-rater reliability). To evaluate inter-rater reliability, 10 randomly selected examinations were measured by another observer, who was blinded to the previous results. The reliability of the whole segmentation procedure, as well as volumetric analysis, was estimated by performing the measurements in all 38 subjects. The relative error in CV was 2.64%, with an estimated measurement error of 0.0019. Pearson's test indicated excellent correlation between samples for CV ( $r = 0.96$ ,  $p < 0.0001$ ). Inter-observer reproducibility was analyzed for 10 randomly selected cases. Pearson's correlation test also showed good results for CV ( $r = 0.85$ ,  $p = 0.002$ ).

### 2.6. Statistical analysis

BVs and CVs for the MT and WT groups were compared by multivariate analysis controlled for age, sex, duration of phenytoin use, epilepsy duration, and monthly mean number of seizures. We used the beta regression model with the Wald test. Pearson's test was used for inter-rater and intra-rater reliability analysis. For risk factors and comparisons of other characteristics of the groups, we performed a univariate analysis with Student's *t*-test. Sex distribution was compared with Fisher's exact test.

## 3. Results

### 3.1. Group characteristics

The characteristics of both groups are summarized in Table 1. Although the mean age in the MT group (39.3 years) was higher

**Table 1**  
Characteristics of the MT and WT groups.

Characteristics	MT n=19	WT n=19	p value
Age (years)	39.3 ± 8.4	37.9 ± 7.9	0.20
Female (number of individuals)	7	10	0.33 <sup>a</sup>
Phenytoin maintenance dosage (mean/mg)	315 ± 80	305 ± 40	0.55
Duration of phenytoin use (years)	8.4 ± 4.1	9.7 ± 6.4	0.45
Epilepsy duration (years)	25.1 ± 13.0	26.1 ± 12.4	0.79
Seizure frequency (monthly/median)	1.75	1	0.85
<i>Number of patients on polytherapy</i>	13	14	1.0 <sup>b</sup>
Phenobarbital	3	4	
Carbamazepine	3	4	
Lamotrigine	3	2	
Others	4	4	
<i>Reported adverse side effects of phenytoin (number of individuals)</i>			1.0 <sup>b</sup>
Symptoms of cerebellar intoxication	3	2	
Gingival overgrowth	2	2	
<i>EEG (number of individuals)</i>			0.63 <sup>b</sup>
Focal epileptic activity	10	12	
Nonspecific slowing	4	2	
Normal	5	5	
<i>MRI (number of individuals)</i>			0.23 <sup>b</sup>
Mesial temporal sclerosis	4	6	
Normal	15	13	

MT: mutant group; WT: wild or control group; p value calculated with the Student's *t*-test.

<sup>a</sup> Fisher exact test.

<sup>b</sup> Chi-square test.

than in the WT group (37.9 years) and the number of years of phenytoin use and duration of epilepsy were higher in the latter, no significant statistical differences were observed between the groups. The electroencephalographic findings, brain images, and reported side effects were very similar in both groups, as can be seen in the comparative analysis in Table 1.

### 3.2. Volume measurements

Multivariate analysis revealed that the normalized volume of cerebellar white matter (CV-WM) was the only intracranial volume that showed a significant difference between the groups (Table 2). Analyzing only the white matter, the adjusted cerebellar volume was lower in the mutant *CYP2C9* group (1.8% versus 2.3%;  $p = 0.002$ ). Although total CV (CV-WM + CV-GM) was lower in the MT group than in the WT group (6.8% and 7.4%, respectively), however this difference was not statistically significant ( $p = 0.13$ ).

## 4. Discussion

To date, cerebellar volume in patients with epilepsy has been evaluated by visual inspection<sup>9</sup> and, more recently, quantitative imaging.<sup>4,10</sup> Both approaches clearly show that patients with epilepsy have smaller cerebellar volumes than normal controls. In fact, cerebellar atrophy has an estimated prevalence of between 16.2% and 30% in these patients.<sup>5,9</sup>

In *CYP2C9* mutants the maximum metabolic rate for phenytoin can be reduced by 25–54%.<sup>11</sup> The poor *CYP2C9* metabolizer genotype has been associated with the development of gingival overgrowth and cutaneous reaction in patients using this drug. In addition, some reports have suggested that use of phenytoin causes cerebellar atrophy.<sup>4,12</sup> This led us to hypothesize that phenytoin users who carry the *CYP2C9*\*2 or \*3 variants, including those who take normal doses of phenytoin, could have a higher blood phenytoin level and be more predisposed to cerebellar atrophy than wild-type *CYP2C9* phenytoin users. In this study, we observed that patients with epilepsy and more than one year of phenytoin use had a reduction in CV-WM even if they carried only one variant allele.

The pathogenesis of phenytoin-induced cerebellar atrophy is not yet completely understood. Corroborating our findings, Liu et al.<sup>13</sup> emphasize that seizures or phenytoin itself could have a regional selective effect on cerebellar volume. This selectivity may be restricted to a histological segment such as gray or white matter.

Comparison of both groups in our study revealed a significant reduction in the volume of cerebellar white matter in mutant *CYP2C9* patients. No previous work has shown such specific and localized atrophy of cerebellar white matter in patients with poor metabolism of phenytoin. Even though our results indicate a localized pattern of atrophy of white matter, we believe that the

toxic effect of phenytoin is more diffuse (gray and white matter), as suggested by the trend toward reduction in volume of cerebellar gray matter in our cases and in other studies.<sup>14–18</sup> A larger study population would allow this hypothesis to be investigated in greater detail.

Pathologic white matter modifications have been implicated in both epileptogenic potential and epilepsy-related comorbidities.<sup>19</sup> Nevertheless, there is a dearth of literature on the influence of AEDs on brain white matter in patients with epilepsy. Administration of phenytoin in newborn rats has been shown to lead to a reduction in cerebellar weight and size.<sup>20</sup> Furthermore, white matter alterations have been reported in rats after exposure to phenytoin, the main findings being focal axonal swellings.<sup>21</sup> These effects could be observed even when low doses were used and led to cell morphological alterations and breakage of synaptic connections. Moreover, regional effects could compromise more than just gray matter. Indeed, volumetric studies have shown major changes in brain white matter too.<sup>15,19</sup> These changes can occur locally and diffusely in both hemispheres, in the fornix, amygdala, cingulate gyrus, thalamus, basal ganglia, temporal lobe and cerebellum.<sup>14–18</sup> Recently, voxel-based morphometry and tensor diffusion studies in patients with epilepsy have shown reductions in both white and gray matter in various parts of the brain, including the cerebellum, compared with normal subjects.<sup>22</sup> As in our patients, the reductions were more pronounced in white matter. In other studies using a similar methodological procedure to that we adopted (volume-of-interest analysis), reductions in white matter were observed.<sup>19,23</sup> Again, none of the studies referred to above explore the pharmacogenetic aspects or role of phenytoin in these white matter alterations.

The few studies that have been published about AEDs and cerebellar volume are conflicting. Using multiple regression analysis, De Marcos et al. and Luef et al.<sup>4,12</sup> demonstrated that duration of phenytoin treatment was a principal risk factor for the presence of cerebellar atrophy ( $p = 0.001$ ). Serum phenytoin levels as well as duration of treatment with phenytoin could be related to the development of cerebellar atrophy. In our study we could not evaluate phenytoin serum levels because some patients were not using this medication at the time. However, Luef et al. found no correlation between serum levels of phenytoin and development of cerebellar atrophy.<sup>12</sup>

## 5. Conclusion

Although several mechanisms have been implicated in the pathogenesis of cerebellar atrophy, it seems likely that it has multifactorial etiologies. Investigation of the pharmacogenetic aspects of phenytoin could explain some unresolved issues regarding the relationship between epilepsy and cerebellar atrophy. However, confirmation of the results described here by replication in a second cohort is required.

## Acknowledgments

This study was partly funded by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). The authors declare no competing financial interests in relation to the work described. We wish to thank Dr. Arnolfo de Carvalho Neto and DAPI (*Diagnóstico Avançado Por Imagem*), who allowed the MRI images to be taken.

## References

1. Tate SK, Depondt C, Sisodiya SM, Cavalleri GL, Schorge S, Soranzo N, et al. Genetic predictors of the maximum doses patients receive during clinical use of the anti-epileptic drugs carbamazepine and phenytoin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102(15):5507–12.

**Table 2**  
Comparison of brain volumes between the MT and WT groups.

	MT (n = 19) % Mean ± SD	WT (n = 19) % Mean ± SD	p value
Total BV	60.3 ± 4.0	60.5 ± 4.4	0.981
Total CV	6.8 ± 1.2	7.4 ± 0.8	0.130
BV-WM	30.1 ± 2.1	31.1 ± 2.9	0.358
CV-WM	1.8 ± 0.3	2.3 ± 0.4	0.002*
BV-GM	29.5 ± 2.5	29.5 ± 2.2	0.318
CV-GM	4.8 ± 0.9	5.1 ± 3.7	0.790

D: Standard deviation; CV: normalized cerebellar volume; BV: normalized brain volume; WM: white matter; GM: gray matter; total: volume of gray matter plus white matter. Beta regression model—Wald test. Multivariate analysis.

\*  $p < 0.05$ .

2. Sullivan-Klose TH, Ghanayem BI, Bell DA, Zhang ZY, Kaminsky LS, Shenfield GM, et al. The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics* 1996;**6**(4):341–9.
3. Hung CC, Lin CJ, Chen CC, Chang CJ, Liou HH. Dosage recommendation of phenytoin for patients with epilepsy with different CYP2C9/CYP2C19 polymorphisms. *Therapeutic Drug Monitoring* 2004;**26**(5):534–40.
4. De Marcos FA, Ghizoni E, Kobayashi E, Li LM, Cendes F. Cerebellar volume and long-term use of phenytoin. *Seizure* 2003;**12**(5):312–5.
5. Ney GC, Lantos G, Barr WB, Schaul N. Cerebellar atrophy in patients with long-term phenytoin exposure and epilepsy. *Archives of Neurology* 1994;**51**(8):767–71.
6. Hardy GH. Mendelian proportions in a mixed population. *Science* 1908;**28**(706):49–50.
7. Bazin P-L, McAuliffe M, Gandler W, Pham DL. Free software tools for atlas-based volumetric neuroimage analysis. Paper presented at: *Proceedings of SPIE Medical Imaging*. 2005.
8. Bazin P-L, Cuzzocreo JL, Yassa MA, Gandler W, McAuliffe MJ, Bassett SS, et al. Volumetric neuroimage analysis extensions for the MIPAV software package. *Journal of Neuroscience Methods* 2007;**165**(1):111–21.
9. Specht U, May T, Schulz R, Rohde M, Ebner A, Schmidt RC, et al. Cerebellar atrophy and prognosis after temporal lobe resection. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 1997;**62**(5):501–6.
10. Szabo CA, Lancaster JL, Lee S, Xiong JH, Cook C, Mayes BN, et al. MR imaging volumetry of subcortical structures and cerebellar hemispheres in temporal lobe epilepsy. *American Journal of Neuroradiology* 2006;**27**(10):2155–60.
11. Adithan C, Gerard N, Vasu S, Balakrishnan R, Shashindran CH, Krishnamoorthy R. Allele and genotype frequency of CYP2C9 in Tamilnadu population. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2003;**59**(8–9):707–9.
12. Luef G, Burtcher J, Kremser C, Birbamer G, Aichner F, Bauer G, et al. Magnetic resonance volumetry of the cerebellum in epileptic patients after phenytoin overdoses. *European Neurology* 1996;**36**(5):273–7.
13. Liu RS, Lemieux L, Bell GS, Sisodiya SM, Bartlett PA, Shorvon SD, et al. Cerebral damage in epilepsy: a population-based longitudinal quantitative MRI study. *Epilepsia* 2005;**46**(9):1482–94.
14. Concha L, Beaulieu C, Collins DL, Gross DW. White-matter diffusion abnormalities in temporal-lobe epilepsy with and without mesial temporal sclerosis. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 2009;**80**(3):312–9.
15. Seidenberg M, Kelly KG, Parrish J, Geary E, Dow C, Rutecki P, et al. Ipsilateral and contralateral MRI volumetric abnormalities in chronic unilateral temporal lobe epilepsy and their clinical correlates. *Epilepsia* 2005;**46**(3):420–30.
16. Marsh L, Morrell MJ, Shear PK, Sullivan EV, Freeman H, Marie A, et al. Cortical and hippocampal volume deficits in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 1997;**38**(5):576–87.
17. Lee JW, Andermann F, Dubeau F, Bernasconi A, MacDonald D, Evans A, et al. Morphometric analysis of the temporal lobe in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 1998;**39**(7):727–36.
18. Sisodiya SM, Moran N, Free SL, Kitchen ND, Stevens JM, Harkness WF, et al. Correlation of widespread preoperative magnetic resonance imaging changes with unsuccessful surgery for hippocampal sclerosis. *Annals of Neurology* 1997;**41**(4):490–6.
19. Hermann B, Seidenberg M, Bell B, Rutecki P, Sheth R, Ruggles K, et al. The neurodevelopmental impact of childhood-onset temporal lobe epilepsy on brain structure and function. *Epilepsia* 2002;**43**(9):1062–71.
20. Ohmori H, Kobayashi T, Yasuda M. Neurotoxicity of phenytoin administered to newborn mice on developing cerebellum. *Neurotoxicology and Teratology* 1992;**14**(3):159–65.
21. Tauer U, Knoth R, Volk B. Phenytoin alters Purkinje cell axon morphology and targeting in vitro. *Acta Neuropathologica* 1998;**95**(6):583–91.
22. Mueller SG, Laxer KD, Cashdollar N, Buckley S, Paul C, Weiner MW. Voxel-based optimized morphometry (VBM) of gray and white matter in temporal lobe epilepsy (TLE) with and without mesial temporal sclerosis. *Epilepsia* 2006;**47**(5):900–7.
23. Hermann B, Seidenberg M, Bell B, Rutecki P, Sheth RD, Wendt G, et al. Extra-temporal quantitative MR volumetrics and neuropsychological status in temporal lobe epilepsy. *Journal of the International Neuropsychological Society* 2003;**9**(3):353–62.