

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS- UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE- ICBS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE- PPGCS

DELMA HOLANDA DE ALMEIDA

**PERFIL CLÍNICO E ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE SNP 211037 DO GENE
GABRG2 E EPILEPSIA MIOCLÔNICA JUVENIL**

MACEIÓ- AL

2012

DELMA HOLANDA DE ALMEIDA

**PERFIL CLÍNICO E ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE SNP 211037 DO GENE
GABRG2 E EPILEPSIA MIOCLÔNICA JUVENIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Professor Dr. Daniel Leite Góes Gitaí.

Co-orientadora: Professora Dra. Lívia Leite Góes Gitaí.

Maceió-AL

2012

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

A447p Almeida, Delma Holanda de.
Perfil clínico e estudo de associação entre SNP211037 do gene GABRG2 e epilepsia mioclônica juvenil / Delma Holanda de Almeida. – 2012.
109 f. : il., graf., tab.

Orientador: Daniel Leite Góes Gitaí.
Co-orientadora: Lívia Leite Góes Gitaí
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2012.

Bibliografia: f. 82-90.
Apêndices: f. 91-109.

1. Epilepsia mioclônica juvenil. 2. Gene GABRG2. 3. SNP211037. 4. PCR-RFLP. I. Título.

CDU: 616.853:575.1



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Praça Afrânio Jorge, s/n. Prado
CEP 57.010-020. Maceió-AL
(82) 3223-5613; 3336-0757
e-mail: ppgs9@gmail.com

Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna Delma Holanda de Almeida, intitulada: "Perfil clínico e estudo de associação entre o polimorfismo SNP211037 do gene GABRG2 em pacientes com epilepsia mioclônica juvenil provenientes do Estado de Alagoas", orientada pelo Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitaí, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 23 de julho de 2012.

Os membros da Banca Examinadora consideraram o candidato aprovado.

Banca Examinadora:

Prof.ª Dr.ª Livia Leite Góes Gitaí - (FAMED/UFAL)

Prof. Dr. Cláudio Torres de Miranda - (FAMED/UFAL)

Prof. Dr. Euclides Mauricio Trindade Filho - (UNCISAL)

A minha mãe, Marili de Holanda (em memória).

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, fonte de amor e inspiração constante, companheiro incondicional e imprescindível, que tem me proporcionado forças e o prazer de conviver com pessoas especiais e fundamentais na conquista desta etapa.

Aos Meus pais, Dimas de Almeida Lima (em memória) e Marili de Holanda (em memória), pela dedicação e esforços que sempre fizeram para ver minha felicidade, em especial à minha mãe, meu maior exemplo de determinação.

Aos meus irmãos, em especial Dário Holanda de Almeida, pela força que me tem dado nos momentos mais difíceis e pelo seu exemplo de força e motivação, que apesar das dificuldades nunca desanima.

À minha prima, Geane de Holanda, que desde o falecimento da minha mãe tem assumido não só o papel de prima, mas também de mãe, irmã e amiga.

Às minhas “primas” Laura e Mariana, pelo prazer de conviver durante 16 anos da minha vida, poder ver e participar do crescimento de vocês tornaram minha vida mais feliz.

Aos meus eternos amigos, Airton Omena, Layse Veloso, Renata Nobre, Hermes Augusto, José Alfredo e Samira Ogasawara Adalberto Alves e Fagner Lima, os quais tive o prazer da convivência, das brincadeiras, do apoio afetuoso nos momentos de dor, importância imprescindível em minha recuperação

À tia Solange Veloso e tia Dirce Ogasawara, as quais me ofereceram todo carinho, amor sem medir esforços para me ajudarem no que fosse preciso.

Aos meus irmãos de coração, Lucas Veloso, Luciano Veloso e Pollyana dos anjos, minha nova família, os quais me acolheram e permitiram que eu participasse de suas vidas.

Ao MSc. Fernando Tenório Gameleira, minha eterna admiração como ser humano, pois nunca mediu esforços para me ajudar, assumindo muitas vezes o papel de pai e amigo, por estar presente nas horas mais difíceis com palavras de conforto, nunca esquecerei da importância que teve durante o falecimento da minha mãe. Como médico, meu agradecimento também pelo incentivo na realização deste trabalho com a seleção dos pacientes e por permitir a realização dos eletroencefalogramas de quase todos os pacientes em sua clínica. .

Ao Dr. Adalcyr Cunha de Souza Junior, por ter me ajudado na busca pela minha saúde.

Á Dra. Izaura, por ouvir minhas Angústias e ajudar-me a entender melhor o que se passa dentro de mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitaí, pelos ensinamentos científicos e pelo apoio nos últimos momentos que para mim foram muito difíceis. Muito obrigado também pela paciência e por ter me mostrado os caminhos a serem seguidos, pelos anos de convivência, pelas dicas e, principalmente, por ter acreditado em mim.

À minha co-orientadora Prof. Dra. Lívia Leite Góes Gitaí, pelo apoio na parte clínica desde as coletas dos dados até as análises.

À Professora Dra. Luciana Cláudia Herculano Machado pela oportunidade em participar do projeto com a criação do Banco de DNA de pacientes com epilepsia e ter me ensinado também os primeiros passos na pesquisa científica.

À Universidade Federal de Alagoas, pela oportunidade de minha formação profissional e possibilitar esta etapa de aperfeiçoamento e sonho.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, pela busca constante de aperfeiçoamento.

A todos os Professores do Programa de pós Graduação em Ciências da Saúde que contribuíram para meu aperfeiçoamento intelectual.

A todos os meus colegas de turma, em especial Altair Rogério, Felipe Rebelo e Kézia Frias.

A todos os colegas do laboratório de Biologia Celular e Molecular, Bruna Priscila, Thallyta, João Paulo, João Pedro, Diego Siqueira, Evelin, Micaela, Maysa, Heloisa e thayane, pela amizade e pelas palavras de apoio em momentos que algumas reações não funcionavam, agradecimento especial a Bruna Priscila e João Paulo Born não somente pela ajuda para que esta etapa fosse realizada.

Aos pacientes pela colaboração em participar da pesquisa, pois sem eles nada seria possível.

Aos Professores Doutores Tiago Gomes de Andrade e Cláudio Torres de Miranda por aceitarem o convite em participar da banca de Qualificação.

À Instituição de Fomento: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL).

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar, pois as facilidades nos impedem de caminhar. ”

Chico Xavier

RESUMO

Introdução: A Epilepsia Mioclônica Juvenil é a mais frequente dentre as epilepsias generalizadas Idiopáticas, representando cerca de 10% de todos os tipos de epilepsia. Apesar da existência de mutações raras responsáveis por algumas formas familiares, a genética da Epilepsia Mioclônica Juvenil é complexa e provavelmente envolve interações de diferentes genes de susceptibilidade e de fatores ambientais. A identificação desses genes é um grande desafio. Com esse propósito, realizamos, neste trabalho, uma investigação de associação genética entre o polimorfismo SNP 211037 e Epilepsia Mioclônica Juvenil em indivíduos provenientes da população alagoana. **Objetivos:** a) Traçar o perfil clínico dos pacientes com Epilepsia Mioclônica Juvenil atendidos no Ambulatório de Epilepsia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Alagoas; b) expandir o banco de DNA de pacientes com epilepsia da Universidade Federal de Alagoas; c) obter e avaliar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo SNP211037 do gene *GABRG2* em indivíduos com Epilepsia Mioclônica Juvenil e em indivíduos controle. **Metodologia:** Para o estudo foram selecionados 98 pacientes e 129 indivíduos controle. Foram incluídos no estudo os pacientes cuja avaliação confirmou o diagnóstico de EMJ de acordo com a Liga Internacional Contra Epilepsia (1989). Os indivíduos foram genotipados através de PCR-RFLP. As frequências alélicas, genotípicas e análises estatísticas foram determinadas através da plataforma SnpSTAT. **Resultados:** Observamos que a idade mínima dos pacientes com EMJ foi de 12 anos e idade máxima de 65 e a média de idade de início das crises foi de 12,6 anos. 64% dos pacientes são do sexo Feminino; a idade mínima de início das crises foi 4 anos e a idade máxima de 27 anos; quanto à distribuição das crises, observamos que todos os pacientes apresentavam mioclonias massivas, sendo que 2 % apresentava apenas mioclonias, e nos demais as mioclonias estavam associadas a crises de ausências 1%, a Crises Tônico Clônica Generalizada 37,8% ou aos dois tipos de crises 59,2%. Em relação as análises genéticas, observamos que as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos estudados não foram significativamente diferentes entre a população de pacientes com EMJ e indivíduos controle. **Conclusão:** O estudo sugere fortemente que os polimorfismos SNP211037 do gene *GABRG2* não está associada à Epilepsia Mioclônica Juvenil na população Alagoana.

Palavras chave: Epilepsia Mioclônica Juvenil. Gene *GABRG2*. SNP211037. PCR-RFLP

ABSTRACT

Introduction: Juvenile Myoclonic Epilepsy accounts for 10% of all forms of epilepsy and represents a generalized idiopathic epileptic syndrome with a genetic basis. Despite the existence of rare mutations responsible for some familial forms inherited in a mendelian pattern, the genetics of Juvenile Myoclonic Epilepsy is complex and probably reflect the simultaneous involvement of multiple genes with minor effect and environmental factors. The identification of these susceptibility genes is a great challenge. This case/control study was designed to investigate whether the SNP211037 of GABRG2 gene is a risk factor for juvenile Myoclonic Epilepsy in the north-eastern Brazilian population. **Aims:** a) to describe the clinical features of patients with Juvenile Myoclonic Epilepsy selected Clinic at University Hospital of Federal University of Alagoas by the two consultant neurologists; b) to expand the DNA database of Universidade Federal de Alagoas; c) to obtain and evaluate the allelic and genotypic frequencies of SNP211037 in patients with JME and control from the state of Alagoas. **Methods:** This study included 98 unrelated Brazilian patients with Juvenile Myoclonic Epilepsy and 129 normal control subjects. The probands were unambiguously diagnosed cases of JME with classification based on the published criteria of the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. The polymorphism was genotyped using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method. All descriptive and statistical analysis were performed using SNPstat, a web-based tool offered by the Biostatistics and Bioinformatics Unit Web of The Catalan Institute Oncology. **Results:** The minimum age of patients with Juvenile Myoclonic Epilepsy was 12 years and maximum age of 65. The mean (SD) age at onset of the Juvenile Myoclonic Epilepsy probands was 12,6 years, of which 64% were females. The triad of myoclonus, absences, and generalized tonic-clonic seizures was observed in 59,2%, the combination of myoclonus and generalised tonic-clonic seizures in 37,8%, the combination of myoclonus and absence was observed in 1%, and the myoclonus alone in 2% of patients. No significant differences were observed in the genotype and allele frequencies of this polymorphism between cases and controls. **Conclusion:** These results present no evidence for an association of SNP211037 with Juvenile Myoclonic Epilepsy. Further studies are required to investigate the involvement of GABRG2 gene in the genetic susceptibility to this epilepsy syndrome.

Key words: juvenile Myoclonic Epilepsy. GABRG2 gene. SNP211037. PCR-RFLP.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Representação das subunidades do receptor do GABA e a localização das mutações com Epilepsia Autossômica Dominante e diferentes epilepsias generalizadas idiopáticas.	31
Figura 2-	Diagrama das etapas para a Expansão do Banco de DNA.	40
Figura 3-	Diagrama da metodologia utilizada para análise do polimorfismo SNP211037.	42
Figura 4-	Produto de amplificação do Gene GABRG2.	42
Figura 5-	Produtos de amplificação do fragmento do gene <i>GABRG2</i> que contém o polimorfismo SNP211037 em amostras do grupo controle	44
Figura 6-	Produtos de amplificação do fragmento do gene <i>GABRG2</i> que contém o polimorfismo SNP211037 em amostras do grupo epiléptico.	44
Figura 7-	Perfil de restrição dos produtos de PCR referentes ao fragmento do gene <i>GABRG2</i> que contém o polimorfismo SNP211037 em amostras do grupo epiléptico.	47
Figura 8-	Perfil de restrição dos produtos de PCR referentes ao fragmento do gene <i>GABRG2</i> que contém o polimorfismo SNP211037 em amostras do grupo controle.	47
Figura 9-	Faixa etária dos pacientes com EMJ.	50
Figura 10-	Escolaridade dos pacientes com EMJ maiores de 18 anos de idade e atendidos no HUPAA.	51
Figura 11-	Escolaridade dos pacientes com EMJ maiores de 18 anos de idade e atendidos em clínicas particulares.	51
Figura 12-	Renda familiar por pessoa em reais dos pacientes com EMJ maiores de 18 anos de idade e atendidos no HUPAA.	52
Figura 13-	Renda familiar por pessoa em reais dos pacientes com EMJ maiores de 18 anos de idade e atendidos em clínicas particulares.	53
Figura 14-	Tipos de crises epilépticas nos pacientes com EMJ.	54
Figura 15-	Distribuição dos pacientes segundo faixa etária de início das crises epilépticas.	55

Figura 16-	Distribuição dos pacientes segundo o tipo da primeira crise epiléptica.	55
Figura 17-	Distribuição dos pacientes segundo faixa etária de início das mioclonias.	56
Figura 18-	Faixa Etária dos Indivíduos Controles	58
Figura 19-	Perfil eletroforético do DNA genômico de 13 amostras provenientes de pacientes com EMJ.	59

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Quadro 1-	Tipos de crises epiléticas em diferentes séries de pacientes com EMJ.	70
Tabela 1-	Loci cromossômico e Genes identificados ligados a EMJ	25
Tabela 2-	Polimorfismos estudados em indivíduos com EMJ em diversas populações.	28
Tabela 3-	mutações identificadas na subunidade Y2 do canal receptor do GABA.	32
Tabela 4-	Polimorfismos identificados na subunidade y2 do canal receptor do GABA.	33
Tabela 5-	Genótipos referentes ao polimorfismo SNP211037 do gene GABRG2 detectados em pacientes com epilepsia mioclônica juvenil provenientes do estado de Alagoas.	60
Tabela 6-	Genótipos referentes ao polimorfismo SNP211037 do gene GABRG2 detectados em indivíduos controle provenientes do estado de Alagoas.	61
Tabela 7-	Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo SNP211037 do gene GABRG2, para cada grupo analisado.	63
Tabela 8-	Teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg com o polimorfismo SNP211037 do gene GABRG2.	64
Tabela 9-	Análise comparativa entre as frequências alélicas e genotípicas obtidas do polimorfismo SNP 211037 do gene GABRG2, entre os grupos com epilepsia e controle da população alagoana, através do modelo de co-dominância.	65
Tabela 10-	Análise comparativa entre as frequências alélicas e genotípicas obtidas do polimorfismo SNP 211037 do gene GABRG2, entre os grupos com epilepsia e controle da população alagoana, através do modelo de dominância.	65
Tabela 11-	Análise comparativa entre as frequências alélicas e genotípicas obtidas do polimorfismo SNP 211037 do gene GABRG2, entre os grupos com epilepsia e controle da população alagoana, através do modelo recessivo.	66

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

A	Analfabeto
CAE	Epilepsia de Ausência Infantil
CTCG	Crises Tônico-Clônicas Generalizadas
CNS	Conselho Nacional de Saúde
DAE	Droga Anti-Epiléptica
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EEG	Eletroencefalograma
EFC	Ensino Fundamental Completo
EFI	Ensino Fundamental Incompleto
EGI	Epilepsia Generalizada Idiopática
EMI	Ensino Médio Incompleto
EMJ	Epilepsia Mioclônica Juvenil.
epiGAD	<i>Epilepsy Genetic Association Database</i>
ESC	Ensino Superior Completo
ESI	Ensino Superior Incompleto
FS	Convulsão febril
GABA	Ácido Aminobutírico
GEFS+	Epilepsia Generalizada com convulsão febril
HUPAA	Hospital Universitário Professor Alberto Antunes
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
MS	Ministério da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SMEI	Epilepsia Mioclônica da Infância
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms

SPSS *Statistical Package for Social Sciences*
SRF Sem Renda Familiar
TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFAL Universidade Federal de Alagoas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Aspectos clínicos e epidemiológicos das epilepsias	18
2.2 Aspectos genéticos das epilepsias	19
2.3 Identificação de genes de susceptibilidade a epilepsia	20
2.4 Epilepsia Mioclônica Juvenil: aspectos clínicos	22
2.5 Epilepsia Mioclônica Juvenil: aspectos genéticos	24
2.5.1 Epilepsia Mioclônica Juvenil Mendeliana	25
2.5.2 Epilepsia Mioclônica Juvenil Complexa	26
2.6 Receptores do GABA_A	30
3 OBJETIVOS	35
3.1 Geral	36
3.2 Específicos	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 MÉTODOS	38
4.2 Desenho do Estudo	38
4.3 Pacientes	38
4.3.1 Descrição das características clínicas dos pacientes	39
4.4 Indivíduos Controles	39
4.5 Aspectos Éticos	39
4.6 Expansão do Banco de DNA	40
4.6.1 Coleta de Sangue	40
4.6.2 Extração de DNA Genômico	40
4.6.3 Avaliação da qualidade do material genético	41
4.7 Detecção do polimorfismo SNP 211037 referente ao gene GABRG2	41
4.7.1 PCR	42
4.7.2 Visualização dos produtos de PCR	43
4.7.3 Reação de restrição	45
4.7.4 Visualização dos produtos de restrição	45

4.7.5 Genotipagem	45
4.7.5.1 Controle de Qualidade	46
4.5 Análise Estatística	48
5 RESULTADOS	49
5.1 Características Clínicas dos Pacientes com EMJ	50
5.2 Características dos Indivíduos controles	57
5.3 Expansão do banco de DNA de pacientes com epilepsia da Universidade Federal de Alagoas	58
5.4 Genotipagem dos indivíduos quanto ao polimorfismo SNP211037 no gene GABRG2	59
5.5 Análise comparativa das frequências alélicas e genotípicas obtidas entre os grupos estudados (pacientes com EMJ <i>versus</i> grupo controle).	64
6 DISCUSSÃO	67
6.1 Perfil Clínico dos Pacientes com EMJ	68
6.2 Expansão do banco de DNA de pacientes com epilepsia da Universidade Federal de Alagoas	73
6.3 Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo SNP211037 do gene GABRG2 na população Alagoana	76
6.4 Análises comparativas das frequências alélicas e genotípicas entre os pacientes com EMJ e indivíduos controle	77
7 CONCLUSÕES	80
8 REFERÊNCIAS	82
APÊNDICES	

Epilepsia é um distúrbio neurológico grave, frequente e caracterizado pela ocorrência de crises epiléticas espontâneas decorrentes de alterações eletrofisiológicas no sistema nervoso central (FISHER et al., 2005; GUILHOTO et al., 2006). Quanto à etiologia, a Classificação Internacional das Epilepsias e Síndromes Epilépticas da ILAE de 1989 classifica a epilepsia em sintomática, criptogênica ou idiopática (ILAE, 1989). A epilepsia idiopática é o resultado de mutações e/ou polimorfismos genéticos, o que não exclui a possibilidade de que fatores ambientais externos possam contribuir para a expressão da doença (BERG et al., 2010). A epilepsia mioclônica juvenil (EMJ) é a forma mais comum das epilepsias idiopáticas generalizadas (JALLON e LATOUR, 2005). A EMJ é uma síndrome generalizada, idade relacionada com início geralmente na adolescência, cuja característica clínica essencial é a ocorrência de mioclônias massivas que podem ser acompanhadas por crises tônico-clônicas generalizadas (CTCG) e, menos frequentemente, por crises de ausência (ILAE, 1989). Estudos têm demonstrado que história familiar de epilepsia é frequente em pacientes com EMJ. (ASCONAPE e PENRY, 1984; JANZ, 1985; OBEID e PANAYIOTOPOULOS, 1988; KLEVELAND e ENGELSEN, 1998; MURTHY et al., 1998; MONTALENTI et al., 2001; VIJAI et al., 2003). A EMJ é uma síndrome epilética geneticamente polimórfica, de complexo padrão de herança, heterogênea e relacionada a mutações e polimorfismos em diversos genes (COSSETTE et al., 2002). Apesar do crescimento, nos últimos 25 anos, na quantidade de estudos genéticos envolvendo epilepsia idiopática generalizada, foram identificados poucos genes que contribuem para a determinação do limiar de susceptibilidade a EMJ. Neste trabalho, estudamos esta temática em pacientes provenientes do estado de Alagoas, através de uma investigação multidisciplinar, baseada em análises clínicas e moleculares. Assim, descrevemos o perfil clínico dos pacientes com EMJ atendidos no Hospital Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas (HUPAA-UFAL) e em clínicas privadas. O material genético desses pacientes foram coletados e incorporados ao banco de DNA de pacientes com epilepsia da UFAL. Em relação aos estudos genéticos, investigamos pela primeira vez, se o polimorfismo SNP21037 do gene GABRG2 está associado a EMJ. O estudo aqui realizado, portanto, foi essencial para a contribuição dos mecanismos moleculares associados ao processo epileptogênico.

2.1 Aspectos clínicos e epidemiológicos das epilepsias.

Epilepsia é um distúrbio caracterizado por predisposição persistente do cérebro a gerar crises epiléticas e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicossociais e sociais da condição (FISHER et al., 2005; GUILHOTO et al., 2006). Trata-se da desordem neurológica grave mais comum em todo o mundo (SCOTT et al., 2001). A prevalência de epilepsia ativa é estimada em 4 a 10 casos por 1000 indivíduos em países desenvolvidos, sendo maior nas regiões em desenvolvimento como a América Latina, onde a média da prevalência é de 12,4 a cada 1000 indivíduos (ILAE, 1997; BURNEO et al., 2005). A incidência anual varia de 24 a 53 por 100.000 indivíduos nos países desenvolvidos e de 49 a 190 por 100.000 nos países em desenvolvimento (JALLON, 2002; BURNEO et al., 2005). No Brasil, estudos mostraram taxas de prevalência como 11,9/1000 na cidade de São Paulo, 9,2/1000 em cidade do interior de São Paulo, 16,3/1000 na cidade do Rio de Janeiro e 36,8/1000 em Porto Alegre (MARINO JUNIOR et al., 1986; FERNANDES, 1992; GOMES et al., 2002; BORGES et al., 2004).

Em Alagoas existe apenas um estudo epidemiológico, o qual mostrou que a prevalência da Epilepsia na Cidade de Maceió é de 24,2 por 1000 indivíduos (CALVANO et al., 2010).

A definição de epilepsia requer a ocorrência de crises epiléticas recorrentes (FISHER et al., 2005). Crise epilética é a ocorrência de sinais e/ou sintomas transitórios devidos à atividade anormal excessiva ou síncrona de neurônios cerebrais. De acordo com a Comissão de Classificação e Terminologia da ILAE, as crises epiléticas são classificadas essencialmente em focais ou generalizadas. As crises epiléticas focais originam-se em redes limitadas a um hemisfério cerebral enquanto as crises generalizadas originam-se e rapidamente disseminam-se por redes neurais de distribuição bilateral (BERG et al., 2010).

Quanto à etiologia, a Classificação Internacional das Epilepsias e Síndromes Epiléticas da ILAE de 1989 classifica a epilepsia em sintomática, criptogênica ou idiopática (ILAE, 1989). Atualmente, a ILAE recomenda que a classificação etiológica utilize os conceitos de epilepsia de causa estrutural/metabólica, de causa desconhecida ou de causa genética. A epilepsia estrutural/metabólica tem como causa primária lesões estruturais ou metabólicas já associadas a aumento substancial do risco de desenvolver epilepsia, como acidente vascular encefálico,

trauma e infecção. A epilepsia criptogênica que a nova proposta da ILAE sugere a substituição por epilepsia de causa desconhecida era classificada como provavelmente sintomática, por não apresentar uma causa conhecida. A epilepsia genética é o resultado direto de alteração genética conhecida ou presumida, o que não exclui a possibilidade de que fatores ambientais externos possam contribuir para a expressão da doença (BERG et al., 2010). A determinação dos tipos de crises combinada a dados clínicos, eletrofisiológicos e estruturais, tais como idade de início das crises, registros eletroencefalográficos (EEG) e exames de neuroimagem são utilizados para a definição do tipo de síndrome epiléptica (BERG et al., 2010). As síndromes epiléticas eletroclínicas são um grupo de entidades clínicas claramente identificadas por um conjunto de características clínicas e eletroencefalográficas e geralmente apresentam forte relação com aspectos do desenvolvimento cerebral. Assim, podem ser agrupadas de acordo com as seguintes faixas etárias de início: período neonatal, lactente, infância ou adolescência/adulto. Entre as síndromes eletroclínicas de início no adolescente ou adulto destaca-se a EMJ.

2.2 Aspectos genéticos das epilepsias:

Alterações genéticas em muitos dos aproximadamente 30 000 genes humanos podem estar associadas à epilepsia (OTTMAN, 2005). Tais alterações são caracterizadas por mudança física na estrutura do DNA e podem apresentar implicações em diferentes processos biológicos, como consequência de impactos nos níveis e/ou na fisiologia de proteínas. Quando esse impacto é drástico, ocasionando uma perda ou ganho de função da proteína, a alteração genética pode ser determinante (causa direta) para o estabelecimento das crises recorrentes. Neste caso, os pacientes são portadores de mutações em um único locus gênico, o que confere ao traço epiléptico um padrão mendeliano de herança. Tais grupos de epilepsia são denominadas de monogênicas ou mendelianas. Por outro lado, quando uma alteração genética induz uma mudança discreta na atividade da proteína, o seu efeito pode contribuir para o estabelecimento de um limiar de susceptibilidade à epilepsia. Neste caso, os genes portadores de tais alterações são denominados de genes de susceptibilidade (GITAI et al., 2008). Pressupõe-se que muitas dessas alterações são polimórficas, do tipo SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Considera-se que os genes de susceptibilidade, isoladamente, não

são determinantes para a ocorrência de epilepsia, mas dependem de uma ação aditiva de outros genes e /ou fatores ambientais. Pelo fato de muitos genes contribuírem para o fenótipo e devido ao envolvimento de múltiplos fatores ambientais, tais desordens seguem um modelo poligênico-multifatorial. Neste modelo, se enquadram tanto as epilepsias idiopáticas não-monogênicas quanto às epilepsias sintomáticas, ambas podendo ser denominadas de epilepsias geneticamente complexas.

Por outro lado, é importante observar que mesmo nas epilepsias monogênicas, há certa complexidade na correlação genótipo-fenótipo. Estudos com famílias mostram que a penetrância dessas mutações é frequentemente incompleta (menor do que 100%) e que a idade de início, bem como a gravidade do fenótipo, varia dentro da família (WINAWER, 2006). Isto indica que genes modificadores - equivalentes aos genes de susceptibilidade para epilepsias geneticamente complexas - influenciam os efeitos do gene mutado, modulando o fenótipo final. Assim, embora as epilepsias monogênicas sejam determinadas por mutação em um único gene, outros genes com efeito menores e fatores ambientais podem modular a expressão do distúrbio. Isto explica o fato, por exemplo, de que mutações no mesmo gene podem estar associadas a variados fenótipos epilépticos (LOPES-CENDES e ARAÚJO, 2006).

2.3 Identificação de genes de susceptibilidade a epilepsia:

A investigação de genes de susceptibilidade associada às epilepsias complexas tem avançado muito lentamente quando comparadas com os estudos realizados nos modelos de epilepsia monogênicas. A sua natureza poligênica e multifatorial implica em várias restrições metodológicas. Nessas epilepsias, como o efeito da alteração em um gene contribui muito discretamente para o fenótipo final, a sensibilidade para detecção de ligação entre o gene e o traço epiléptico é estrita (TAN et al., 2004).

Estudos de associação baseados em análises populacionais têm sido uma alternativa bastante utilizada para identificar genes de susceptibilidade a epilepsias e a outras condições geneticamente complexas (OTTMAN, 2005). Estes estudos buscam detectar alelos que contribuem para a predisposição ou proteção a epilepsia, através da investigação de diferenças significativas na frequência de polimorfismos entre pacientes e indivíduos normais de uma mesma população.

Polimorfismos com frequência significativamente maior nos indivíduos epiléticos devem estar associados a mecanismos de susceptibilidade, enquanto que os polimorfismos com frequência significativamente maior nos indivíduos não-epiléticos devem estar associados à haplótipos de proteção à epilepsia. A maioria dos estudos de associação tem focalizado nos polimorfismos presentes em determinados genes que, com base na sua função, são fortes candidatos a influenciar o limiar de susceptibilidade, tais como genes que codificam canais iônicos. No entanto, recentemente, os pesquisadores têm começado a considerar seriamente a aplicabilidade de estudos de associação em larga-escala (HIRSCHHORN e DALY, 2005).

Um grande número de estudos de associação em epilepsias geneticamente complexas tem sido publicado. O epiGAD (*Epilepsy Genetic Association Database*) é um banco de dados disponível na WEB (<http://www.epigad.org>) que reúne informações provenientes de estudos de associação em epilepsia que foram publicados a partir de 1985 (TAN e BERKOVIC, 2010). Até o momento, foram cadastrados 225 trabalhos, sendo que destes, cento e noventa e três investigaram genes de susceptibilidade; e trinta e dois avaliaram associação entre polimorfismos genéticos e efeitos farmacológicos. Dentre os trabalhos direcionados para genes de susceptibilidade, noventa e cinco foram realizados com epilepsia sintomáticas, sendo a epilepsia do lobo temporal a mais estudada; e setenta e nove foram realizados com epilepsia idiopática generalizada. Há registro de apenas 4 trabalhos desenvolvidos na população Brasileira, sendo que todos estes utilizaram pacientes com epilepsia do lobo temporal.

Conforme o epiGAD, até o momento, setenta e oito genes diferentes foram investigados através de estudos de associação. A maioria destes são genes que estão envolvidos diretamente no processo de transmissão sináptica, tais como os codificadores de canais iônicos, neurotransmissores, neuromoduladores, transportadores etc. É interessante notar a escassez de registros de estudos direcionados para genes envolvidos em outros processo biológicos, a despeito de um número crescente de evidência mostrando a importância de diferentes mecanismos moleculares associados a epileptogênese (GREENBERG e SUBARAN, 2011).

Apesar desses avanços, muitos dos estudos de associação em epilepsia não têm sido reprodutíveis devido a limitações como tamanho da amostra, falta de um

grupo controle apropriado, ausência de análises independentes em outras populações e uniformidade fenotípica entre os pacientes (TAN et al., 2004; GREENBERG e SUBARAN, 2011). Assim, uma estratégia interessante para o desenvolvimento de estudos baseados nesta abordagem envolve o estabelecimento de parâmetros metodológicos que contemplem tanto uma definição estridente de fenótipos (e endofenótipos), quanto uma etapa de validação em diferentes populações.

2.4 Epilepsia Mioclônica Juvenil: aspectos clínicos.

A EMJ representa 2 a 11% dos casos de Epilepsia Generalizadas Idiopáticas (EGI) (JALLON e LATOUR, 2005), com a incidência estimada em cerca de 1 para 100.000 indivíduos e a prevalência em 0,1 a 0,2 para cada 1000 indivíduos (HAUSER e KURLAND, 1975; JOENSEN, 1986; LOISEAU et al., 1990; SIDENVALL et al., 1993). Sua primeira descrição detalhada foi publicada em 1955 por Janz e Matthes (JANZ e MATTHES, 1955). Em 1989, a EMJ foi classificada entre as epilepsias generalizadas idiopáticas(EGI), sendo definida da seguinte forma:

“A EMJ surge em torno da puberdade e é caracterizada por crises de abalos mioclônicos bilaterais, isolados ou repetitivos, arrítmicos e irregulares que predominam em membros superiores. Os abalos podem levar alguns pacientes a queda súbita. Não é notada alteração de consciência. A desordem pode ser herdada e tem distribuição igual entre os sexos. Geralmente há CTCG e, menos comumente, crises de ausência infrequentes. As crises geralmente ocorrem logo após o despertar e são geralmente precipitadas por privação do sono. O EEG interictal e ictal apresentam ponta-onda e poliponta-onda irregulares, generalizadas e rápidas; sem correlação das pontas com os abalos. Frequentemente os pacientes são fotossensíveis. Há boa resposta ao tratamento farmacológico adequado.”(ILAE, 1989).

Na revisão da classificação das síndrome epiléticas, a EMJ está entre as síndrome eletroclínicas organizadas por faixa etária de início (adolescentes- adultos) (BERG et al.,2010). O início da síndrome geralmente ocorre dos 8 aos 26 anos de idade, principalmente dos 12 aos 18 anos (DELGADO-ESCUETA e ENRILE-BACSAL, 1984; JANZ, 1985; OBEID e PANAYIOTOPOULOS, 1988). A maioria dos

estudos não mostra diferença significativa da prevalência entre os sexos (JANZ, 1985; OBEID e PANAYIOTOPOULOS, 1988).

A característica clínica essencial é a ocorrência de mioclonias massivas que podem ser de forma isolada ou em salvas, afetando principalmente os membros superiores, sem comprometimento aparente da consciência (DELGADO-ESCUETA e ENRILE-BACSAL, 1984; JANZ, 1985; ILAE, 1989). Estas mioclonias tendem a ser simétricas, porém quando são assimétricas podem ser interpretadas incorretamente como crises de início focal (PANAYIOTOPOULOS et al., 1994). As crises mioclônicas associam-se a CTCG em 80 a 90% dos casos (ASCONAPE e PENRY, 1984; OBEID e PANAYIOTOPOULOS, 1988; KLEVELAND e ENGELSEN, 1998; MURTHY et al., 1998; MONTALENTI et al., 2001; VIJAI et al., 2003). As crises de ausência típica são menos frequentes, ocorrendo em cerca de 10 a 40% dos casos (JANZ, 1985; OBEID e PANAYIOTOPOULOS, 1988; KLEVELAND e ENGELSEN, 1998; MURTHY et al., 1998; MONTALENTI et al., 2001; VIJAI et al., 2003).

As crises apresentam predomínio matutino, principalmente ao despertar (DELGADO-ESCUETA e ENRILE-BACSAL, 1984; JANZ, 1985; MURTHY et al., 1998). Os principais fatores precipitantes de crises na EMJ são privação do sono, estresse, ingestão de bebidas alcoólicas, estímulo luminoso e ciclo menstrual (DELGADO-ESCUETA e ENRILE-BACSAL, 1984; JANZ, 1985; KLEVELAND e ENGELSEN, 1998; MURTHY et al., 1998). História familiar de epilepsia está presente em 20 a 50% dos pacientes com EMJ (ASCONAPE e PENRY, 1984; DELGADO-ESCUETA e ENRILE-BACSAL, 1984; JANZ, 1985; OBEID e PANAYIOTOPOULOS, 1988; KLEVELAND e ENGELSEN, 1998; MURTHY et al., 1998; MONTALENTI et al., 2001; VIJAI et al., 2003). Antecedente de convulsão febril é relatado por cerca de 9% dos indivíduos (KLEVELAND e ENGELSEN, 1998; VIJAI et al., 2003).

Apesar da EMJ ser uma desordem frequente, ela ainda é subdiagnosticada (JALLON e LATOUR, 2005). A presença de mioclonias em vigília, é essencial para o seu diagnóstico e tende a ser ignorada se não especificamente pesquisada pelos médicos, uma vez que não costuma ser referida pelos seus pacientes. Em um estudo asiático, apenas 15% dos pacientes relataram as mioclonias espontaneamente (GUNATILAKE e SENEVIRATNE, 200).

O Eletroencefalograma (EEG) de pacientes com EMJ apresenta atividade de base normal e paroxismos epileptiformes do tipo ponta-onda e poliponta-onda

generalizada, com uma frequência de 3,5 a 6Hz (ASCONAPE e PENRY, 1984; DELGADO-ESCUETA e ENRILE-BACSAL, 1984; OBEID e PANAYIOTOPOULOS, 1988; MURTHY et al., 1998; DHANUKA et al., 2001; MONTALENTI et al., 2001; VIJAI et al., 2003). Descargas focais podem ocorrer em menor proporção dos casos (OBEID e PANAYIOTOPOULOS, 1988; ALIBERTI et al., 1994; LOMBROSO, 1997; SOUSA et al., 2005). As alterações eletrencefalográficas são mais comuns após privação de sono ou se o exame é realizado logo após o despertar e 30% dos pacientes com EMJ são sensíveis a fotoestimulação (ASCONAPE e PENRY, 1984; JANZ, 1985; APPLETON et al., 2000; SOUSA et al., 2005).

A maioria dos casos de EMJ é farmacorresponsiva com adequado controle das crises se manejo dos fatores precipitantes e utilização de droga anti-epiléptica (DAE) apropriada (ASCONAPE e PENRY, 1984; DELGADO-ESCUETA e ENRILE-BACSAL, 1984; JANZ, 1985; OBEID e PANAYIOTOPOULOS, 1988). O valproato de sódio é a droga de escolha, pois é eficaz no controle de crises mioclônicas, de crises de ausência e de CTCG (ASCONAPE e PENRY, 1984; DELGADO-ESCUETA e ENRILE-BACSAL, 1984; JANZ, 1985; OBEID e PANAYIOTOPOULOS, 1988). Cerca de 10 a 25% dos pacientes não apresentam boa resposta às DAE, o que está relacionado a transtornos psiquiátricos, associação dos três tipos de crises, menor idade de início e maior duração da epilepsia (GUARANHA et al., 2011; GELISSE et al., 2001).

Apesar da responsividade das crises epiléticas ao tratamento, na grande maioria dos casos há recrudescência das crises caso a terapia com DAE seja descontinuada (DELGADO-ESCUETA e ENRILE-BACSAL, 1984; PANAYIOTOPOULOS et al., 1994; MARTINEZ-JUAREZ et al., 2006). Recentemente foi relatado que, após 25 anos cerca de 25% dos pacientes podem permanecer sem crises após interrupção de DAE (CAMFIELD e CAMFIELD, 2009).

2.5 Epilepsia Mioclônica Juvenil: aspectos genéticos.

A EMJ é uma síndrome epilética geneticamente polimórfica, de complexo padrão de herança, heterogênea e relacionada a mutações e polimorfismos em diversos genes. A maior parte das EMJ segue o modelo de herança complexa, apenas 1 a 2% seguem o modelo de herança monogênico, na qual a alteração

genética sozinha já é suficiente para provocar o fenótipo epiléptico que pode ser herdado de forma autossômica dominante ou recessiva (COSSETTE et al., 2002).

2.5.1 Epilepsia Mioclônica Juvenil Mendeliana:

Estudos de ligação têm contribuído para a identificação de 15 loci cromossômicos ligados a EMJ (tabela 1). Além disso, também já foram identificadas mutações em 7 genes diferentes: *GABRA1*, *CLCN2*, *myoclonin 1*, *CACNB4*, *CX36*, *BRD2* e *ME2* (DELGADO-ESCUETA, 2007).

Tabela 1: Loci cromossômico e mutações identificadas ligadas a EMJ.

Locus	Nome do Locus	Gene	Modelo de Herança	Referência Bibliográfica
6p12	EJM1a	<i>Myoclonin1</i>	AD	Bai et al., 2002. Ma et al., 2006.
6p12	EJM1e	<i>Myoclonin1</i> <i>EFHC1^a</i>	AD	Pinto et al., 2006.
6p21.3	EJM1b	<i>BRD2^b</i>	AD	Pal et al., 2003.
6p20	EJM1c	<i>BRD2^b</i>	AD	Sander et al., 1997
6p21.2	EJM1d	<i>BRD2^b</i>	AR	Tauer et al., 2005
15q14	EJM2	<i>Cx36^b</i>	AR	Elmslie et al., 1997
6q24	EJM3	<i>Cx36^b</i>	AR	Bate et al., 2004.
2q22-2q23	EJM4	<i>CACNB4^a</i>	AD	Escayg et al., 2000.
5q34	EJM5	<i>GABRA1^a</i>	AD	Cossette et al., 2002
GABRa1				
3q26	EJM6	<i>CLCN2^a</i>	AD	Haug et al., 2003.
10q25-q26	EJM7	<i>ME2^b</i>	AD	Puranam et al., 2005.
7q32	EJM8	<i>ME2^b</i>	AD	Pinto et al., 2005.
16p13	EJM9	<i>ME2^b</i>	AD	Pinto et al., 2005
13q31.3	EJM10	<i>ME2^b</i>	AR	Tauer et al., 2005.
19q13	EJM11	<i>ME2^b</i>	AR	Hempelmann et al., 2006.

Fonte- Adaptado de Delgado-Escueta, 2007.

^a Mutação ; ^b variantes associados com SNPs; AD- Autossômico dominante; AR- AutAutossômico recessivo; EJM- Epilepsia Mioclônica Juvenil;

Em 2002, foi identificada uma mutação (Ala322Asp) no éxon 9 do gene *GABRA1* ligada a EMJ, que apresentava um perfil de segregação autossômica dominante em uma família franco-canadense (COSSETTE et al., 2002). Este gene está localizado no locus 5q34 e codifica a subunidade α do receptor do ácido aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central.

Em 2003, Haug e colaboradores identificaram uma inserção pontual (597G) no gene *CLCN2* (chloride channel-2 gene; OMIM 600570) ligada a EMJ, e que também apresentava um perfil de segregação autossômica dominante em família alemã (HAUG et al., 2003). Este gene está localizado no cromossomo 3q26 e codifica canal iônico para cloro (DELGADO-ESCUETA, 2007). Outras mutações neste gene também foram identificadas em membros de uma família Belga (D'AGOSTINO et al., 2004).

Em 2004, Suzuki e colaboradores descreveram cinco mutações no gene *EFHC1* ligada a EMJ, em 6 famílias não relacionadas (SUZUKI et al., 2004). Este gene codifica uma proteína de 640 aminoácidos que embora apresente função molecular desconhecida, alguns estudos mostram que *EFHC1* está envolvido em diferentes processos biológicos, tais como divisão celular, apoptose, sobrevivência e na atividade de canais de cálcio voltagem dependente. Além do mais, mutações do tipo missense, nonsense e deleções também já foram descritas em diferentes famílias em todo o mundo (MEDINA et al., 2008).

2.5.2 Epilepsia Mioclônica Juvenil Complexa

Estudos de associação têm contribuído significativamente para a identificação de polimorfismos que participam da determinação do limiar genético de susceptibilidade a EMJ. No *epiGAD*, existem 26 estudos registrados que investigaram, no conjunto, polimorfismos em 11 genes diferentes (tabela 2). Dentre os genes mais estudados destacam-se: *BRD2*, *TAP1*, *GRM-4*, *conexina 36*, *GABRA1*, *HLA* e *EFHC1*.

O gene *TAP1*, também conhecido como *RING4* ou *PSF1* (OMIM 170260), codifica uma proteína transportadora que pertence à família dos transportadores ABC (*ATP binding cassette*) e que apresentam 6-8 domínios transmembranais. *TAP* transloca peptídeos do citosol ao lúmen do retículo endoplasmático para

apresentação de antígeno na superfície da célula. Foi observado que 2 polimorfismos genéticos (Ile-333Val e Asp637Gly) estavam associados a EMJ em população da Tunísia, sugerindo que esse gene pode ser um fator de risco para JME (LAYOUNI et al., 2010 ; VAN ENDERT et al., 1992).

O gene *BRD2*, também conhecida como *Ring 3*, pertence a uma sub-família das *Double bromodomain-containing protein 2*. Existem evidências de que este gene é um regulador da transcrição que desempenha um papel importante na modelagem do sistema nervoso, durante o desenvolvimento embrionário. Foi observado que o polimorfismo (RS 3918149) está associado a EMJ em diferentes populações da Europa ocidental e dos Estados Unidos (CAVALLERI et al., 2007). Entretanto, esses dados não foram reproduzidos em outros estudos (LORENZ et al., 2007), ou em estudos com outras populações, incluindo Índia e Austrália (CAVALLERI et al., 2007).

O gene *GRM4*, também conhecido como *mGLUR4*, codifica subunidade 4 do receptor metabotrópico de glutamato e está envolvido na modulação da liberação de Glutamato e GABA na fenda sináptica de vias tálamo-corticais. Foi observado a associação entre 5 polimorfismos genéticos e EMJ em população da Alemanha (MUHLE et al., 2010; IZZI et al., 2003).

Tabela 2: Polimorfismos estudados em pacientes com EMJ em diversas populações.

Gene	Nome do Gene	Polimorfismo	População Estudada	N-EMJ/C	Valor de P	Referência Bibliográfica
GRM4	glutamate receptor, metabotropic 4.	17 SNPs	Alemanha	215/733	>0,0106*	MUHLE et al, 2010 IZZI et al., 2003.
		T1455C	Alemanhã	144/144	0,84	
TAP1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B.	333Ile-637Gly	Tunísia	154/159	0,02*	LAYOUNI et al., 2010.
		333Val-637Asp		154/159	0,007*	LAYOUNI et al., 2010.
		Ile333Val		154/159	0,83	LAYOUNI et al., 2010.
		Asp637Gly		154/159	0,92	LAYOUNI et al., 2010.
		Múltiplos SNPs		154/159	0,44	LAYOUNI et al., 2010.
BRD2(RI NG3)	bromodomain containing 2	Múltiplos SNPs	Holanda	102/360	0,05*	DE KOVEL et al., 2007
		Múltiplos SNPs		102/360	>0,5	DE KOVEL et al., 2007
		rs3918149	Estados Unidos	20/64	0,028*	PAL et al., 2003
			Alemanha, Reino Unido, Irlanda, Austrália e Índia	531/1.390	0,33	LORENZ et al., 2006.
			Reino Unido	34/256	0,001*	CAVALLERI et al., 2007.
			Irlanda	57/227	0,043*	
			Índia	48/144	1	
	146/99	0,22				

Tabela 2: Polimorfismos estudados em pacientes com EMJ em diversas populações.

conclusão

Gene	Nome do Gene	Polimorfismo	População Estudada	N-EMJ/C	Valor de P	Referência Bibliográfica
CHRWA4		C1674T	Polônia	92/222	0,03*	ROZYCKA et al., 2009.
EFHC1	EF-hand domain (C-terminal) containing.	múltiplos SNPs	Estados Unidos	124/614	0,02	BAI et al., 2009
			México	124/604	>0,05*	BAI ET AL; 2009
GABRD2	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, gamma 2.	múltiplos alelos	França	88/100	0,05*	GUIPPONI et al., 1997.
HLA	major histocompatibility complex, class I, A.	múltiplos alelos	Estados Unidos	24/24	0,017*	GREENBERG et al., 1996.
			França	93/93	0,05*	LE HALLARD et al., 1999.
GABRA5	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha	Múltiplos Alelos	França	88/100	> 0,05*	GUIPPONI et al., 1997
GABRA1	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1.	D5S422	Índia	35/100	0,0007*	KAPOOR et al., 2003.
		D5S2118		35/100	>0,35	KAPOOR et al., 2003.
EFHC2	EF-hand domain (C-terminal) containing 2	S430Y	Alemanha	97/305	0,03*	GU et al., 2005
CONEXIN A 36	gap junction proteína	C588T	Europa	169/123	0,026*	MAS et al., 2004.
			Alemanha	247/621	0,016*	HEMPELMANN et al., 2006.

Fonte- arquivo pessoal.

EMJ, Epilepsia Mioclônica Juvenil; C, grupo Controle.

O gene *Conexina 36*, codifica uma proteína integral de membrana que compõe as junções comunicantes neuronais. Essas junções fornecem a base estrutural de sinapses elétricas. Foi observado que o polimorfismo C588T no éxon 2 está associado a EMJ em estudos realizados com a população da Europa (MAS, TASKE et al., 2004) e, especificamente, com população da Alemanha (HEMPELMANN et al., 2007). Nesses estudos, observou-se que o alelo T apresenta uma frequência significativamente maior no grupo dos pacientes com EMJ quando comparados com o controle.

O gene *CHRNA4* codifica a subunidade $\alpha 4$ do receptor nicotínico de acetilcolina. Foi observado que o polimorfismo C1674T, localizado no íntron 5 do gene está associado à EMJ em indivíduos provenientes da Polônia, em que o alelo T apresentou uma frequência significativamente maior em pacientes com EMJ quando comparados aos controles (ROZYCKA et al., 2009).

O gene *EFHC2* (*EF-hand domain C-terminal containing 2*), localizado no locus Xp1 1.3, codifica uma proteína que possui 3 motivos ligantes de cálcio (*EF-hand*). Em estudo realizado com 654 pacientes (EGI) e 662 controles Alemães, foi observado que os polimorfismos rs2208592 (G/T) e Ser430Tyr do gene *EFHC2* apresentam associação com EMJ (GU et al., 2005). Outro gene estudado em indivíduos com EMJ nos Estados Unidos foi o *EFHC1*. Os autores utilizaram uma amostra populacional de 124 casos e 614 controles, porém foi observado que nenhum dos quatro polimorfismos estudados rs3804506, rs3804505, rs1266787 e rs17851770, apresentou diferença estatística significativa entre os grupos experimentais (BAI et al., 2009).

Podemos perceber que a despeito do crescimento, nos últimos 25 anos, na quantidade de estudos genéticos envolvendo epilepsia idiopática generalizada, foram identificados poucos genes que contribuem para a determinação do limiar de susceptibilidade a EMJ.

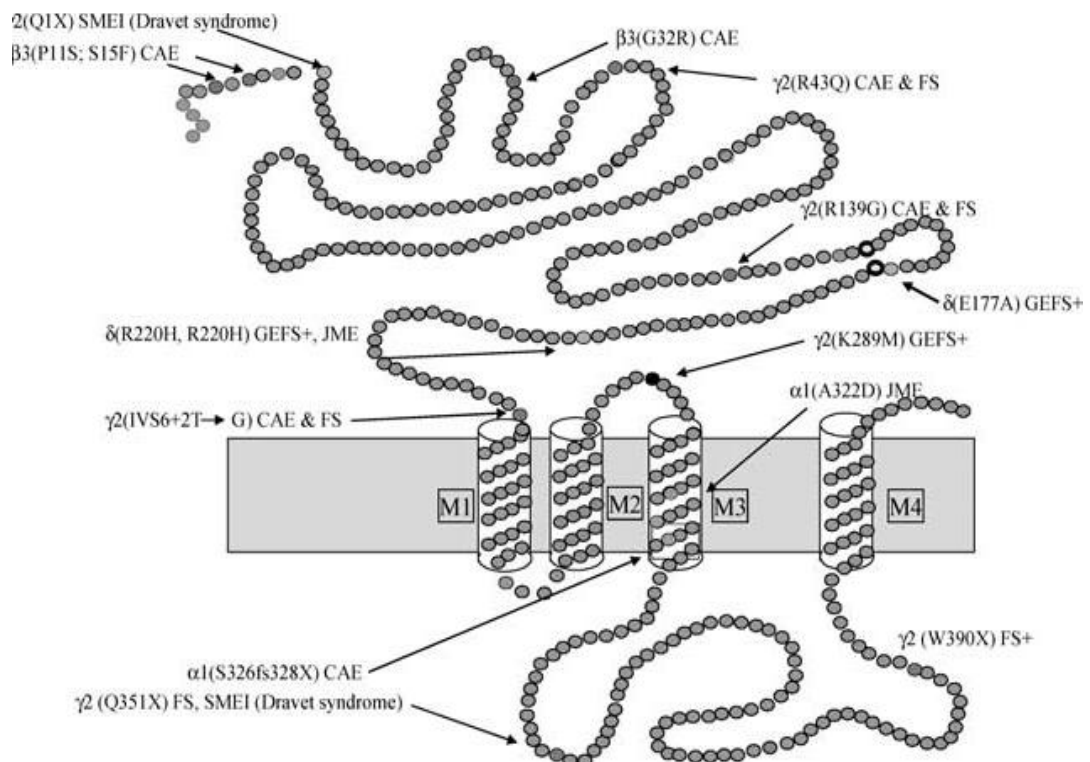
2.6 Receptores GABA_A:

O ácido aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório, que apresenta uma ampla distribuição no córtex cerebral. Falhas no processo de transmissão do GABA podem levar a hiperexcitabilidade neuronal, uma condição associada ao processo de epileptogênese (OLSEN et al., 1999).

Os Receptores GABA_A pertencem à classe de canais iônicos ligantes dependentes e são constituídos por um complexo pentamérico composto por diferentes tipos de 8 subunidades (α 1- α 6, β 1- β 3, γ 1- γ 3, δ , ϵ , π , θ , and ρ 1- ρ 3) que formam um canal seletivo ao íon cloro (KUMARI et al., 2010). A combinação da subunidade mais comum no cérebro é α 1 β 2 γ 2 (REID et al., 2009).

Tem sido descritas inúmeras mutações e polimorfismos nas subunidades α 1, β 3, γ 2, e δ do receptor GABA_A em pacientes com epilepsia idiopática generalizada (figura 1).

Figura 1- Representação geral das subunidades do receptor GABA_A, mostrando a localização de algumas mutações ligadas à epilepsia. SMEI, Epilepsia mioclônica da infância; CAE, Epilepsia de ausência infantil; GEFS+, Epilepsia Generalizada com convulsão febril; JME, Epilepsia Mioclônica Juvenil; FS, Convulsão Febril.



Fonte- MACDONALD et al.,2009.

Em relação à subunidade $\gamma 2$ do receptor GABA_A foram descritas 11 mutações e 7 polimorfismos (Tabela 3 e 4). Todas as mutações apresentam um padrão de herança autossômico dominante ou esporádico (MACDONALD et al., 2010) e os pacientes são heterozigotos.

Tabela 3- mutações identificadas na subunidade Y2 do canal receptor do GABA.

Gene	Mutações	Síndrome
GABRG2	Y2 (Q40X)	(SMEI) e síndrome de Dravet
GABRG2	Y2(R82Q)	FS
GABRG2	Y2(R177G)	FS
GABRG2	Y2(K328M)	FS,GEFS+
GABRG2	Y2 (W429X)	FS,GEFS
GABRG2	Y2 (Q390X)	FS, Síndrome de Dravet e (SMEI)
GABRG2	Y2(K289M)	GEFS+
GABRG2	Y2(IVS6+2T →G)	CAE,FS
GABRG2	Y2(P83S)	FS e IGE.
GABRG2	Y2R43Q	CAE +FS
GABRG2	YR139G11	FS

Fonte- arquivo pessoal.

SMEI, epilepsia mioclônica da infância; FS, convulsão febril; GEFS+, Epilepsia Generalizada com convulsão febril; CAE, Epilepsia de ausência infantil.

Tabela 4- polimorfismos identificados na subunidade $\gamma 2$ do canal receptor do GABA.

Gene	Polimorfismo
GABRG2	G3145A
GABRG2	rs211037
GABRG2	rs209348
GABRG2	rs209353
GABRG2	rs211029
GABRG2	rs766349
GABRG2	rs989694

Fonte- arquivo pessoal.

A mutação R82Q no gene *GABRG2*, localizada na extremidade N terminal, está associada com CAE e FS (WALLACE et al., 2001). Esta mutação prejudica na oligomerização das subunidades $\gamma 2$ e $\beta 2$ (HALES et al., 2005), reduzindo a quantidade de receptores funcionais na superfície da célula.

A mutação *missense* K289M, presente no domínio extracelular entre os segmentos transmembranais II e III, foi ligada a GEFS+. Do ponto de vista funcional, a mutação K289M acelera a desativação das correntes mediadas por GABA, reduzindo o tempo médio de abertura do canal (BIANCHI et al., 2002; HALES et al., 2006). Nos neurônios, esse efeito reduz a eficiência de inibição sináptica (EUGENE et al., 2007).

A mutação R177G, localizada na extremidade N-terminal tem sido associada a convulsão febril (FS) (AUDENAERT et al., 2006). Embora, o significado funcional da mutação ainda não tenha sido esclarecido, foi observado que os pacientes portadores da mutação apresentam uma sensibilidade reduzida a benzodiazepina (AUDENAERT et al., 2006).

A mutação Q390X, localizada no domínio intracelular entre os segmentos transmembranais III e IV, foi identificada em famílias com GEFS+ e DS (HARKIN et al., 2002). Essa mutação produz uma proteína truncada não funcional que fica retida no retículo endoplasmático. Duas outras mutações *nonsense* (Q40X e Q429X) estão localizadas, respectivamente, no primeiro resíduo do peptídeo maduro e no domínio intracelular entre os segmentos transmembranais III e IV. Embora essas mutações

tenham sido ligadas a DS (Q40X) e GEFS+ (Q429X), o significado funcional ainda não foi caracterizado.

A mutação IVS6 + 2T→G, localizada no sítio doador de Splice do íntron 6, foi identificada em família com CAE e FS (KANANURA et al., 2002). O efeito dessa mutação na função do receptor GABA_A é desconhecido, entretanto é presumível que a mutação produz uma proteína truncada não funcional.

Recentemente, uma mutação do tipo missense foi identificada na subunidade $\gamma 2$ do GABA_A, resultando na troca de um aminoácido prolina por serina (Pro83Ser). Esta alteração produz uma proteína imatura não funcional e foi observada em famílias com convulsão febril e Epilepsias Generalizadas Idiopáticas (LACHANCE-TOUCHETTE et al., 2011).

Em relação às alterações genéticas polimórficas no gene *GABRG2*, 7 polimorfismos foram identificados: o polimorfismo G3145A, localizado em região intrônica o SNP211037, um polimorfismo sinônimo (Asn196Asn) localizado na posição 588 da região codificadora (CHOU et al., 2003). Estudos relatam associação do polimorfismo SNP211037 à epilepsia idiopática generalizada em população asiática (CHOU et al., 2007), entretanto esses dados não foram reproduzidos em outras populações (KUMARI et al.; NAKAYAMA et al., 2003; CAVALLERI et al., 2005);

É importante considerar que não obstante o fato de que todas as alterações genéticas supracitadas possam contribuir com o estabelecimento de EMJ, não há relatos de estudos de associação ou ligação envolvendo essas mutações e/ou polimorfismos em epilepsia mioclônica juvenil.

3.1 GERAL: investigar perfil clínico e gene de susceptibilidade em pacientes com Epilepsia Mioclônica Juvenil provenientes do estado de Alagoas.

3.2 ESPECÍFICOS:

1. Descrever as características clínicas dos pacientes com EMJ atendidos no Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas (HUPAA-UFAL) e em 2 clínicas particulares em Maceió ;

2. Ampliar o Banco de DNA de pacientes com epilepsia e indivíduos controle, mantido no laboratório de Biologia Celular e Molecular do ICBS-UFAL;

3. Obter as frequências alélicas e genóticas do polimorfismo genético SNP 211037 do gene *GABRG2* em indivíduos com epilepsia mioclônica juvenil.

4. Obter as frequências alélicas e genóticas do polimorfismo genético SNP 211037 do gene *GABRG2* em indivíduos do grupo controle.

5. Comparar as frequências alélicas e genóticas obtidas entre os grupos analisados (pacientes com EMJ *versus* grupo controle).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MÉTODOS

4.2 Desenho do Estudo

O estudo foi do tipo caso- controle, 129 indivíduos controles e 98 pacientes com Epilepsia Mioclônica Juvenil (EMJ) provenientes do Ambulatório de Epilepsia do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes, clínicas particulares e do banco de DNA de Pacientes com Epilepsia e Indivíduos Controles Provenientes do Estado de Alagoas. As seleções dos pacientes e dos indivíduos controles ocorreram no período de fevereiro de 2006 a dezembro de 2011. Após a confirmação do diagnóstico de epilepsia mioclônica juvenil, era preenchido um questionário clínico semi-estruturado e em seguida era feita uma coleta de sangue e posteriormente a extração de DNA e em seguida o DNA era submetido a uma reação de PCR-RFLP para análise do polimorfismo SNP211037 do Gene *GABRG2*.

4.3 Pacientes

Este estudo foi o primeiro a descrever o perfil clínico da EMJ no Estado de Alagoas. Pacientes com diagnóstico de EMJ confirmados e acompanhados por médicos neurologistas do HUPAA-UFAL, no Ambulatório de Epilepsia do HUPAA-UFAL ou em clínicas particulares foram selecionados de acordo com os seguintes critérios:

Critérios de Inclusão

Os critérios de inclusão para os pacientes com EMJ foram:

- Presença de crises mioclônicas isoladas ou acompanhadas de crises TCG e/ou crises de ausência;
- Idade de início de 4 a 30 anos de idade;
- Exame neurológico normal.

Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão para os pacientes com EMJ foram:

- Recusa em participar da pesquisa;
- Presença de retardo do desenvolvimento neuropsicomotor.

4.3.1 Descrição das características clínicas dos pacientes

Para obtenção das características clínicas dos pacientes com EMJ foram realizados os seguintes procedimentos:

- Entrevista clínica com neurologistas com formação complementar em epilepsia e com atuação no HUPAA-UFAL (Profa.Dra.Lívia Leite Góes Gitaí e Dr. Fernando Tenório Gameleira);
- Aplicação de questionário semi-estruturado sobre dados de identificação, semiologia e evolução das crises epiléticas, fatores precipitantes de crises, exames complementares de neurofisiologia e neuro-imagem, antecedentes pessoais e familiares de convulsão e epilepsia, uso de DAE e controle das crises; (Apêndice 4).
- Revisão dos dados de prontuário de cada paciente;
- Realização de EEG

4.4 Indivíduos Controles

O grupo controle foi composto por amostras de DNA de indivíduos sem diagnóstico, antecedente pessoal ou antecedente familiares em até terceiro grau de epilepsia. Os indivíduos controles foram selecionados em ambulatórios do HUPAA-UFAL e em escolas na Cidade de Maceió. Os dados demográficos e as amostras de DNA compõem o banco de DNA de Pacientes com Epilepsia e Indivíduos Controles Provenientes do Estado de Alagoas.

4.5 Aspectos éticos

Este estudo teve o projeto aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas sob o protocolo de número 025445-2009-90. (Apêndice 1). Os pacientes e indivíduos controle foram adequadamente informados segundo o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Guarda de Material, baseado nas Resoluções nº. 196/96 e 251/97 do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde (CNS/MS). Todos os participantes expressaram seu consentimento mediante a assinatura pelo paciente ou responsável legal do Termo

de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 2) e Guarda de Material (Apêndice 3).

4.6 Expansão do Banco de DNA:

Os pacientes com EMJ eram submetidos à coleta de sangue periférico, e posteriormente, as amostras eram processadas para extração de DNA Genômico. A qualidade do material genético era avaliada através de eletroforese em gel de agarose 0,7% (figura 2).

Figura 2- Diagrama das etapas para a Expansão do Banco de DNA.



Fonte- Arquivo pessoal.

4.6.1 Coleta de Sangue:

Após a confirmação do diagnóstico de EMJ eram coletados 4 ml de sangue periférico de cada paciente em tubos a vácuo contendo K₃EDTA (1,8mg/ml). As amostras biológicas eram armazenadas em freezer – 20°C até o momento da extração.

4.6.2 Extração de DNA Genômico:

A extração do DNA dos indivíduos com EMJ e indivíduos controles era realizada a partir de 300µl de sangue, de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante do GFX *Genomic Blood DNA Purification Kit* (QIAGEN). Inicialmente, o sangue era incubado em banho Maria, a 37°C até descongelar, em seguida era transferido para eppendorf de 1,5 ml contendo 750µl de FG1 e centrifugado por 2 minutos a 10.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante era descartado, ao

pellet era adicionado 150µl de FG2/protease e os reagentes eram homogeneizados através de vórtex. Em seguida, a solução era centrifugada brevemente (3- 5 segundos) e incubada a 65°C, por 5 minutos. Posteriormente, adicionava-se 150µl de isopropanol (100%), a solução era misturada levemente por imersão até a formação do precipitado de DNA. As amostras eram centrifugadas por 5 minutos, o sobrenadante era descartado e ao pellet de DNA era adicionado 150µl de etanol 70%. Após esta etapa de lavagem, as amostras eram centrifugadas por mais 5 minutos, o sobrenadante era descartado e o pellet de DNA era secado a TA. Para ressuspensão do DNA, era adicionado 200µl de tampão FG3 e a solução era incubada a 65°C até o pellet de DNA tornar-se completamente invisível. As soluções de DNA eram armazenadas em freezer -20°C, até o momento de uso.

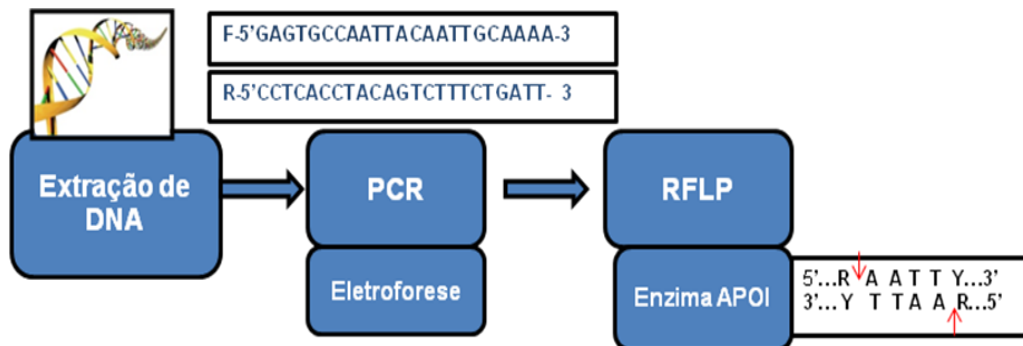
4.6.3 Avaliação da qualidade do material genético:

Em eppendorfs de 1,5ml, alíquotas de 4 µl de DNA eram misturados com 1 µl de água Milliq e 1µl de Loading buffer (sacarose 342,30M e azul de bromofenol 669,97M). As amostras eram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,7%. A corrida eletroforética ocorria a 100V, 300mA. Após a eletroforese, os géis eram corados durante 10 minutos com brometo de etídio (10mg/ml), descorados em água destilada e fotografados sob luz ultravioleta com auxílio de um sistema de captura de imagem e transiluminador (Vilber Lourmat).

4.7 Detecção do polimorfismo SNP 211037 referente ao gene GABRG2

Esta etapa foi realizada através de *PCR-RFLP*, conforme protocolo publicado (CHOU et al., 2007), com modificações (figura 3).

Figura 3- Diagrama da metodologia utilizada para análise do polimorfismo SNP211037 do gene *GABRG2*.

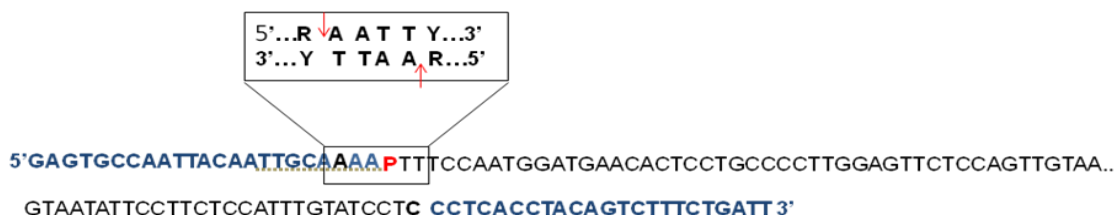


Fonte: Arquivo pessoal.

4.7.1. PCR:

Para amplificação do fragmento de 122 pb do gene *GABRG2* que contém o polimorfismo SNP211037 (Asn196 Asn) foram utilizados os seguintes pares de primers: F 5' gAg TgC CAA TTA CAA TTg CAA AA3' R e F 5' AAT CAg AAA gAC TgT Agg TgA gg 3'R (figura 4).

Figura 4- produto de amplificação do Gene *GABRG2*. Em azul, primers Forward e Reverse; em destaque sítio de restrição para a enzima APOI; (A) em negrito no primer Forward é para reconstituir o sítio de restrição; em vermelho (P) o polimorfismo, que pode ser a troca do C>T.



Fonte- Arquivo pessoal.

A reação era realizada nas seguintes condições: para um volume total de 25 µl, utilizava-se 1µl de DNA genômico, tampão(1X), cloreto de magnésio (1,5mM), desoxiribonucleotídeos trifosfatos (0,2mM, cada), primers F e R (5pmol de cada) e Taq DNA polimerase (0,5U). As reações de amplificação eram realizadas em termociclador (Biocycler), de acordo com os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 95°C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação (94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, e 72°C por 1 minuto). Na etapa de extensão final, a

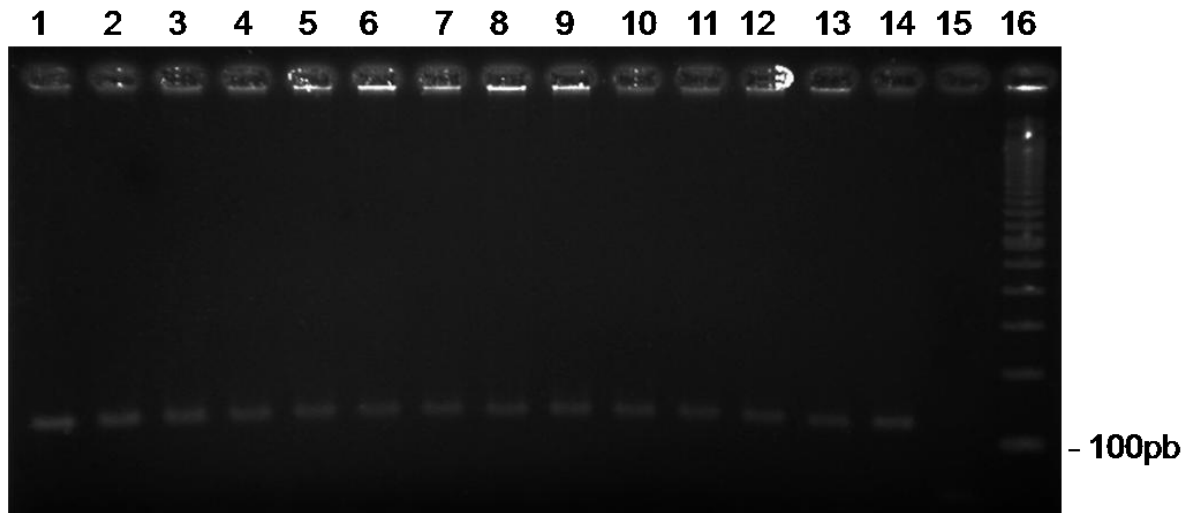
reação era incubada a 72°C por 7 minutos e permanecia a 10°C até o momento do uso.

4.7.2. Visualização dos produtos de PCR:

Alíquotas de 5µl do produto de PCR eram misturadas em ependoff de 1,5 ml com 1µl de *loading buffer*. A solução era aplicada em gel de agarose 2%. Após a corrida eletroforética, os géis eram corados durante 10 minutos com brometo de etídio (10mg/ml), descorados em água destilada e fotografados sob luz ultravioleta com auxílio de um sistema de captura de imagem e transiluminador (Vilber Lourmat).

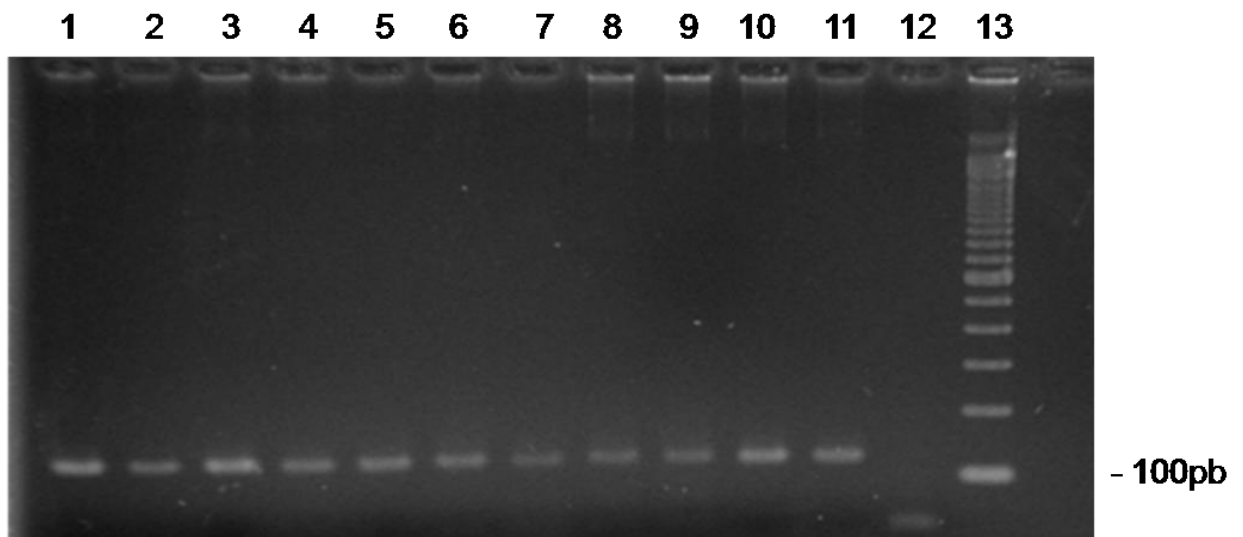
Na figura 5 e 6, temos, respectivamente, o perfil do produto de amplificação de 14 amostras do grupo controle e de 11 amostras do grupo epiléptico, representativos das demais. Podemos observar, em todas as amostras analisadas, a presença de uma única banda. Esta se encontra um pouco acima do fragmento de 100 pb referente ao marcador de peso molecular. Este perfil é compatível com o esperado (de 122 pb) para o produto de amplificação obtido com os *primers* utilizados neste estudo. A não detecção de banda espúria nas amostras e no controle negativo (reação sem DNA) indica, respectivamente, uma amplificação específica e sem contaminação.

Figura 5- Produtos de amplificação do fragmento do gene *GABRG2* que contém o polimorfismo SNP211037 em amostras do grupo controle. Eletroforese em gel de agarose 2%. Raias 1-14: diferentes amostras de indivíduos controle; raia 15: controle negativo; raia 16: marcador de peso molecular 100pb.



Fonte- Arquivo pessoal.

Figura 6- Produtos de amplificação do fragmento do gene *GABRG2* que contém o polimorfismo SNP211037 em amostras do grupo epiléptico. Eletroforese em gel de agarose 2%. Raias 1-11: diferentes amostras de indivíduos com epilepsia; raia 12: controle negativo; raia 13: marcador de peso molecular 100pb.



Fonte- Arquivo pessoal.

4.7.3 Reação de restrição:

A reação de restrição ocorreu em um volume total de 31 µl, conforme o protocolo recomendado pelo fabricante da enzima (*Fermentas Life Sciences*). Para isso, misturava-se 10 µl do produto de PCR (0,1-0,5µg de DNA), Buffer Tango (1X) e 1 U da enzima APOI. Em seguida, a reação era incubada em banho Maria, a 37°C, durante 16 horas.

4.7.4 visualização dos produtos de restrição:

Em eppendorfs de 1,5ml, alíquotas de 12 µl dos produtos de restrição eram misturados com *loading buffer* (sacarose 342,30M e azul de bromofenol 669,97M). As amostras eram submetidas à eletroforese em gel de agarose 3%. A corrida eletroforética ocorria a 100V, 300mA. Para facilitar a análise, os produtos submetidos (e não) a reação de restrição foram carregados em raias adjacentes. Após a eletroforese, os géis eram corados durante 10 minutos com brometo de etídio (10mg/ml), descorados em água destilada e fotografados sob luz ultravioleta com auxílio de um sistema de captura de imagem e transiluminador (Vilber Lourmat).

4.7.5 Genotipagem:

Para a detecção dos variantes alélicos e genotipagem dos indivíduos, o padrão eletroforético de cada amostra era analisado com base em critérios referenciados no próprio delineamento experimental adotado. Assim, quando os indivíduos são homozigotos para o alelo C, o perfil eletroforético dos produtos de restrição deve apresentar um único fragmento de 122 pb, uma vez que este alelo não apresenta sítio de restrição para *ApoI*. Genótipos heterozigotos (CT) devem apresentar 3 fragmentos (122 pb, 100pb e 22pb) como produto de restrição, uma vez que o alelo T apresenta sítio de restrição para *ApoI*. Genótipos homozigotos para o alelo T deve apresentar dois fragmentos (100 pb e 22pb) como produto de restrição.

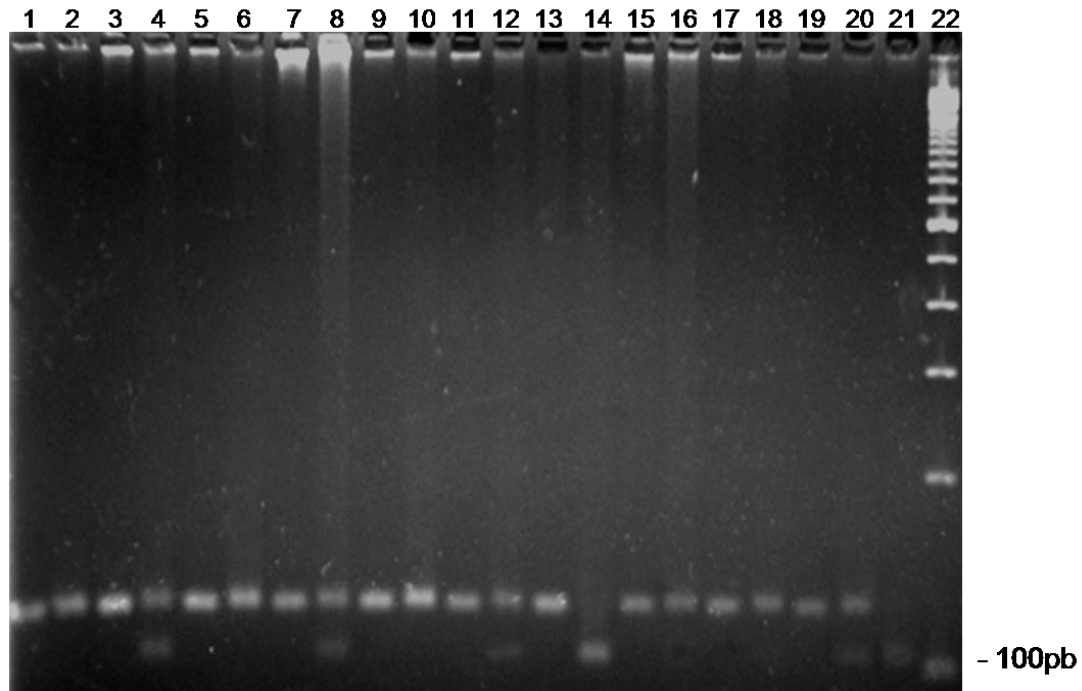
Na figura 7 e 8 podemos observar, respectivamente, o perfil de restrição de 10 amostras do grupo epiléptico e 7 do grupo controle, representativo das demais. Através de uma inspeção visual, é possível observar três padrões distintos de

bandas. Para as amostras das raias 14 e 21 (figura 7) e 14 (figura 8), observa-se um único fragmento de menor peso molecular (um pouco abaixo de 100pb), indicando a presença do alelo T em homozigose. Para as amostras das raias 4, 8, 12 e 20 (figura 7) e 2, 4, 8, 10 e 12 (figura 8), observa-se dois fragmentos compatíveis com o esperado para o genótipo polimórfico C/T. Para as demais amostras, observa-se a presença de uma única banda acima de 100pb, compatível com o esperado para o genótipo C/C, que não sofre restrição por Apol. É importante notar que o fragmento de 21 pb (esperado pela clivagem dos fragmentos referentes ao alelo T) não é visualizado no gel, provavelmente devido ao limite de sensibilidade do sistema. Entretanto, isto não restringe a análise genotípica dos indivíduos, conforme descrito acima. Uma vez que as reações foram realizadas simultaneamente, é possível inferir que a não indicação de clivagem nos produtos de algumas amostras é devido à inexistência do sítio de restrição e não a algum problema durante a montagem de restrição.

4.7.5.1 Controle da qualidade:

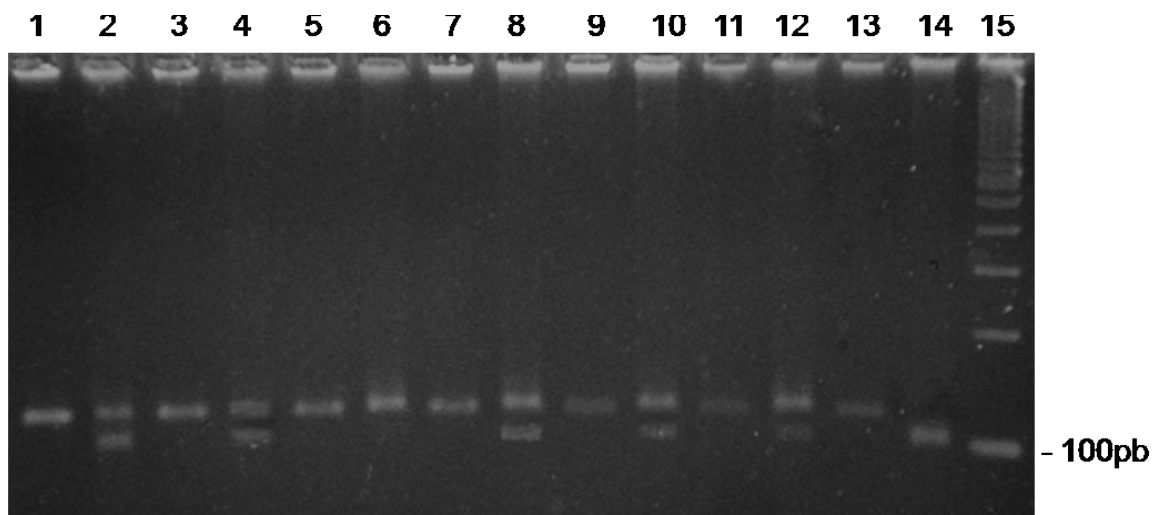
Como controle de qualidade para etapa de genotipagem, trinta e dois percento das amostras de cada grupo estudado foram re-genotipadas, através de um teste cego, por uma segunda pessoa. Houve uma concordância de 100 % entre a primeira e a segunda genotipagem.

Figura 7- Perfil de restrição dos produtos de PCR referentes ao fragmento do gene *GABRG2* que contém o polimorfismo SNP211037 em amostras do grupo epiléptico. Eletroforese em gel de agarose 3%. Raias ímpares de 1-19: Produtos de PCR de amostras diferentes, não submetidos a reação de restrição; raias pares de 2-20: Produtos de PCR das amostras nas raias ímpares submetidos a restrição; raia 21: controle positivo para homocigoto TT; raia 22: marcador de peso molecular 100pb.



Fonte- Arquivo pessoal.

Figura 8- Perfil de restrição dos produtos de PCR referentes ao fragmento do gene *GABRG2* que contém o polimorfismo SNP211037 em amostras do grupo controle. Eletroforese em gel de agarose 3%. Raias 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13: Produtos de PCR de amostras diferentes, não submetidos a reação de restrição; raias 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14: Produtos de PCR das amostras nas raias ímpares submetidos a restrição; raia 15: marcador de peso molecular 100pb.



Fonte- Arquivo pessoal.

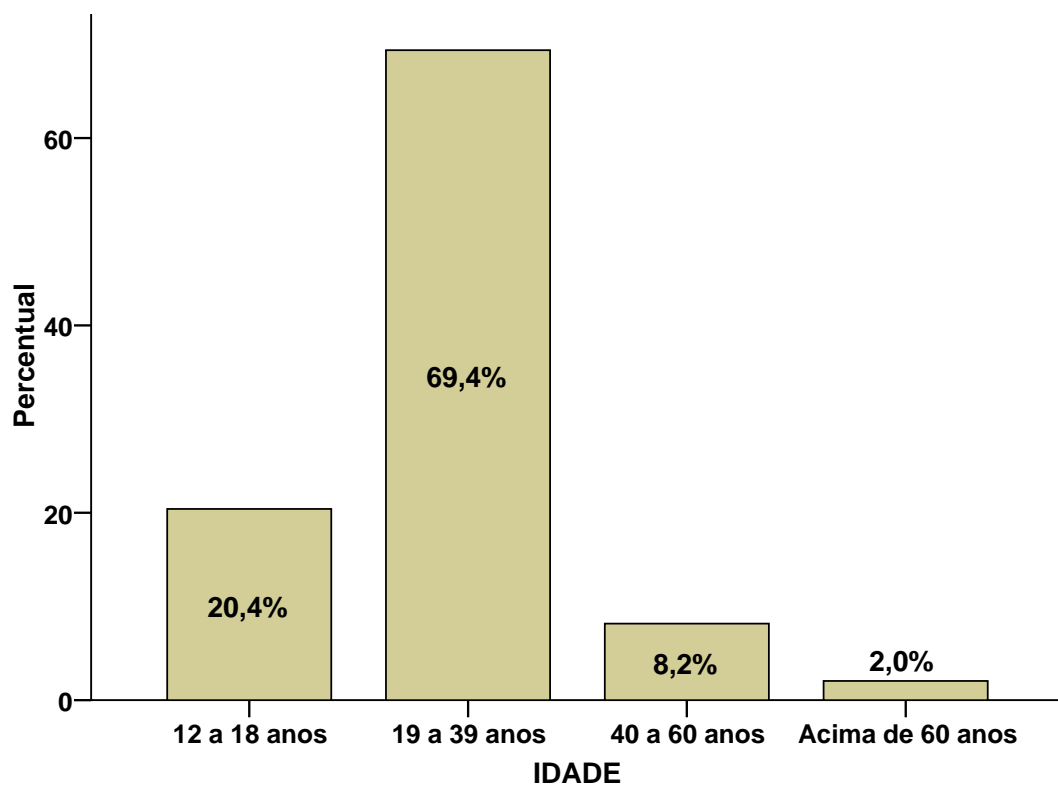
4.8 Análise Estatística:

As informações coletadas foram armazenadas em base de dados do programa Microsoft Excel. A estatística descritiva e a construção dos gráficos dos dados clínicos foram realizadas através do programa estatístico SPSS® (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 15.0. As análises estatísticas descritiva e inferencial referentes ao estudo de associação foram realizadas através da ferramenta SNPstat disponibilizada pela Universidade de Bioestatística e Bioinformática do Instituto de Oncologia de catalão (SOLÉ, 2006). Foram analisados os seguintes parâmetros: frequências alélicas e genotípicas, teste para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizando o teste do qui-quadrado; análise de associação com epilepsia baseada em regressão logística ou linear, Odds ratio (OR) com intervalo de confiança de 95%.

5.1 Características Clínicas dos Pacientes com EMJ

Foram avaliados os dados de 98 pacientes com diagnóstico confirmado de EMJ, sendo 71 pacientes (72,4%) atendidos no HUPAA-UFAL e 27 pacientes (27,6%) atendidos em clínicas particulares. Sessenta e três pacientes (64,3%) eram do sexo feminino. A idade média foi $26,4 \pm 10,8$ anos (12 a 65 anos). A distribuição dos pacientes por faixa etária está demonstrada na Figura 9.

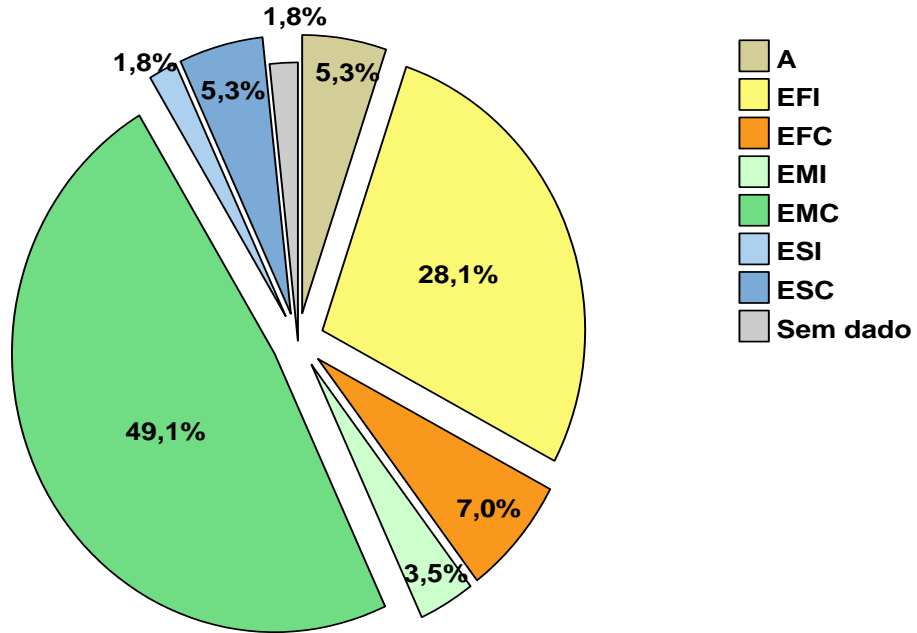
Figura 9 – Faixa etária dos pacientes com EMJ.



Fonte- Arquivo pessoal.

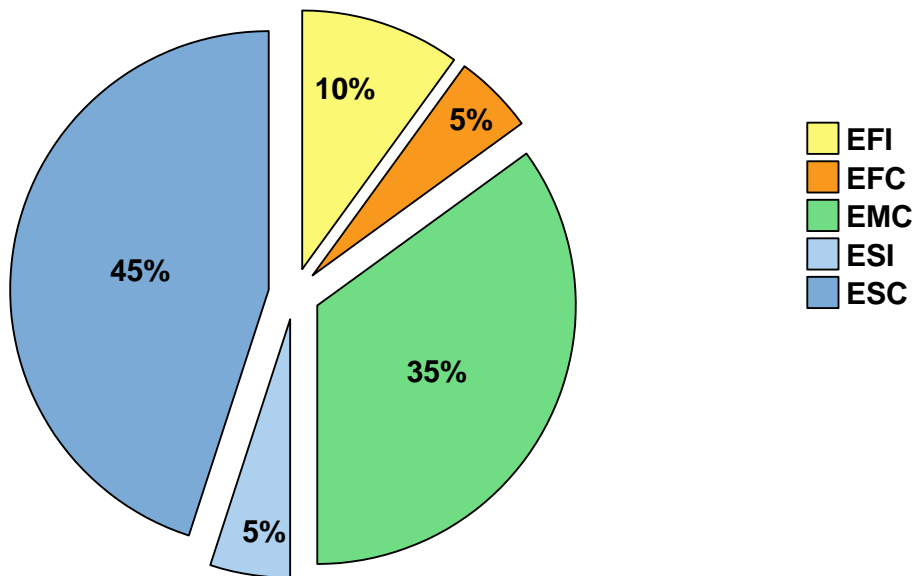
Dos 97 pacientes que informaram sobre escolaridade, 3 (3,1%) eram analfabetos, 25 (25,5%) apresentavam ensino fundamental incompleto, 10 (10,2%) apresentavam ensino fundamental completo, 2 pacientes (2%) apresentavam ensino médio incompleto, 41 (41,8%) apresentavam ensino médio completo, 4 (4,1%) apresentavam ensino superior incompleto e 12 pacientes (12,2%) apresentavam ensino superior completo. A distribuição dos pacientes maiores de 18 anos por escolaridade e segundo local de atendimento está demonstrada nas figuras 10 e 11.

Figura 10 – Escolaridade dos pacientes com EMJ maiores de 18 anos de idade e atendidos no HUPAA. A, analfabeto; EFI, ensino fundamental incompleto; EFC, ensino fundamental completo; EMI, ensino médio incompleto; ESI, ensino superior incompleto; ESC, ensino superior completo.



Fonte- Arquivo pessoal.

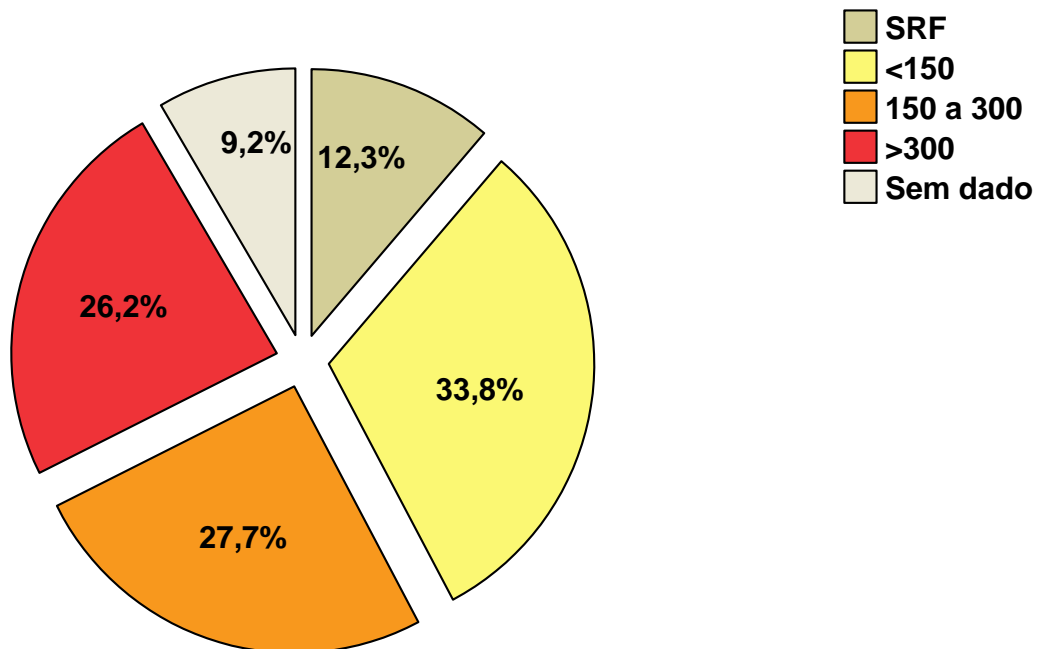
Figura 11– Escolaridade dos pacientes com EMJ maiores de 18 anos de idade e atendidos em clínicas particulares. A, analfabeto; EFI, ensino fundamental incompleto; EFC, ensino fundamental completo; EMI, ensino médio incompleto; ESI, ensino superior incompleto; ESC, ensino superior completo.



Fonte- Arquivo pessoal.

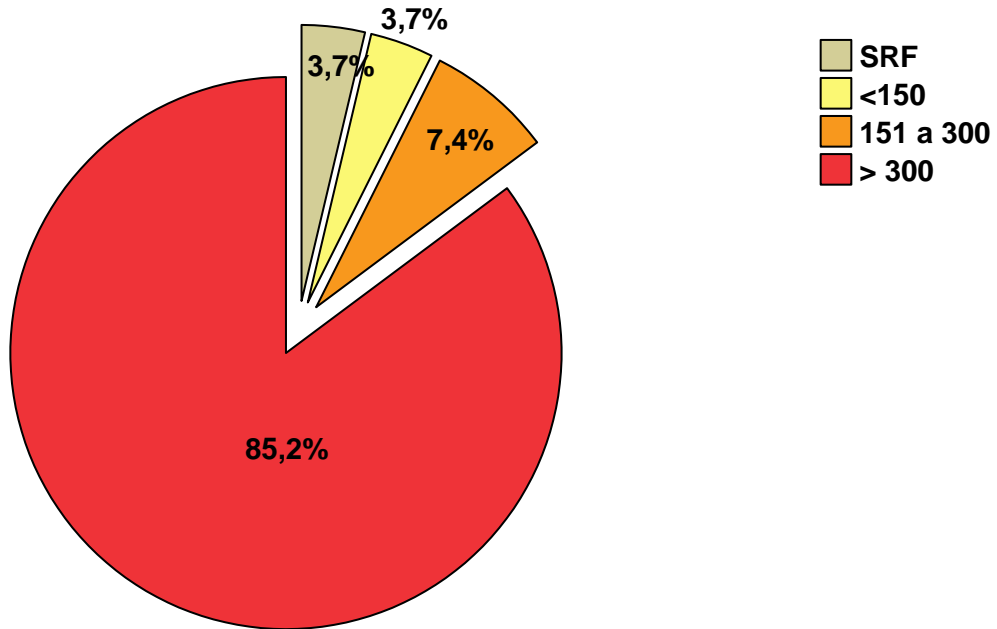
Dos 92 pacientes que informaram sobre rendimento familiar, 40 (43,5%) apresentavam renda familiar mensal maior que 300 reais por pessoa, em 20 pacientes (21,7%) a renda por pessoa ficava entre 150 e 300 reais, em 23 pacientes (25%) a renda era inferior a 150 reais por pessoa e 9 pacientes (9,2%) não apresentavam nenhuma fonte de renda. A distribuição dos pacientes por renda familiar por pessoa e segundo local de atendimento está ilustrada nas figuras 12 e 13.

Figura12– Renda familiar por pessoa em reais dos pacientes com EMJ maiores de 18 anos de idade e atendidos no HUPAA. SRF, sem renda familiar.



Fonte- Arquivo pessoal.

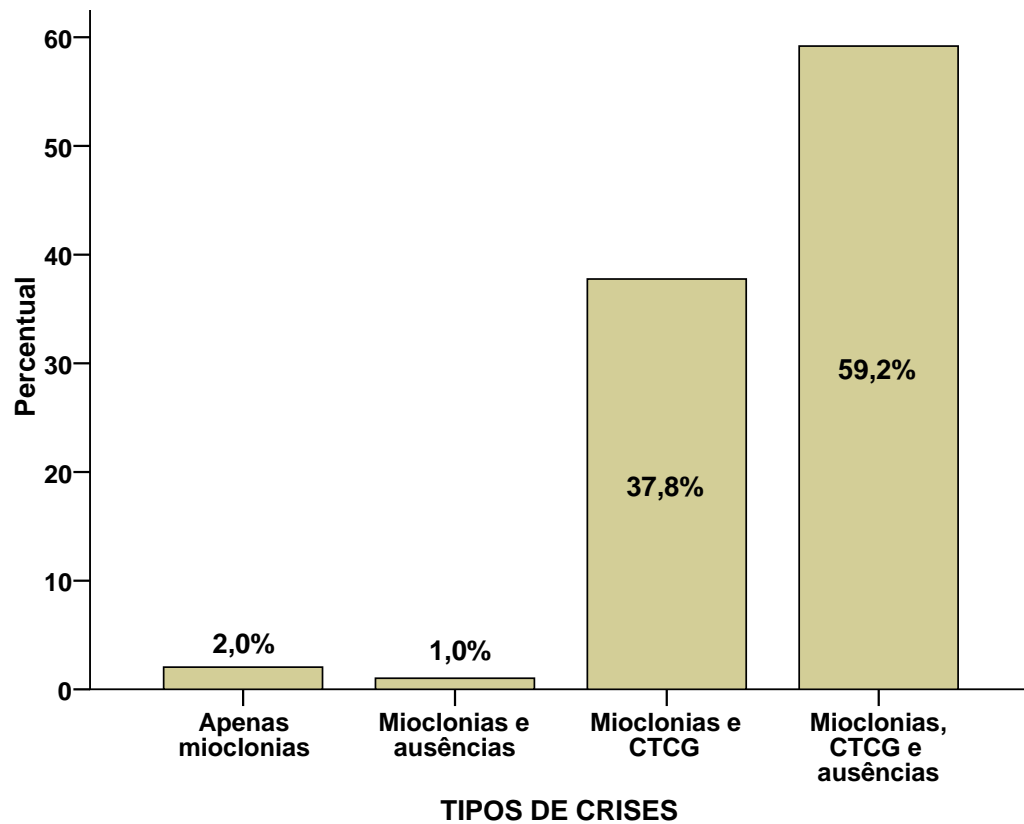
Figura13 – Renda familiar por pessoa em reais dos pacientes com EMJ maiores de 18 anos de idade e atendidos em clínicas particulares. SRF, sem renda familiar.



Fonte- Arquivo pessoal.

Por definição, todos os pacientes com EMJ apresentavam mioclonias. Noventa e quatro pacientes (95,9%) apresentavam CTCG e 59 pacientes (60,2%) apresentavam crises de ausência. A distribuição dos tipos de crises epiléticas apresentados pelos pacientes está ilustrada na figura 14.

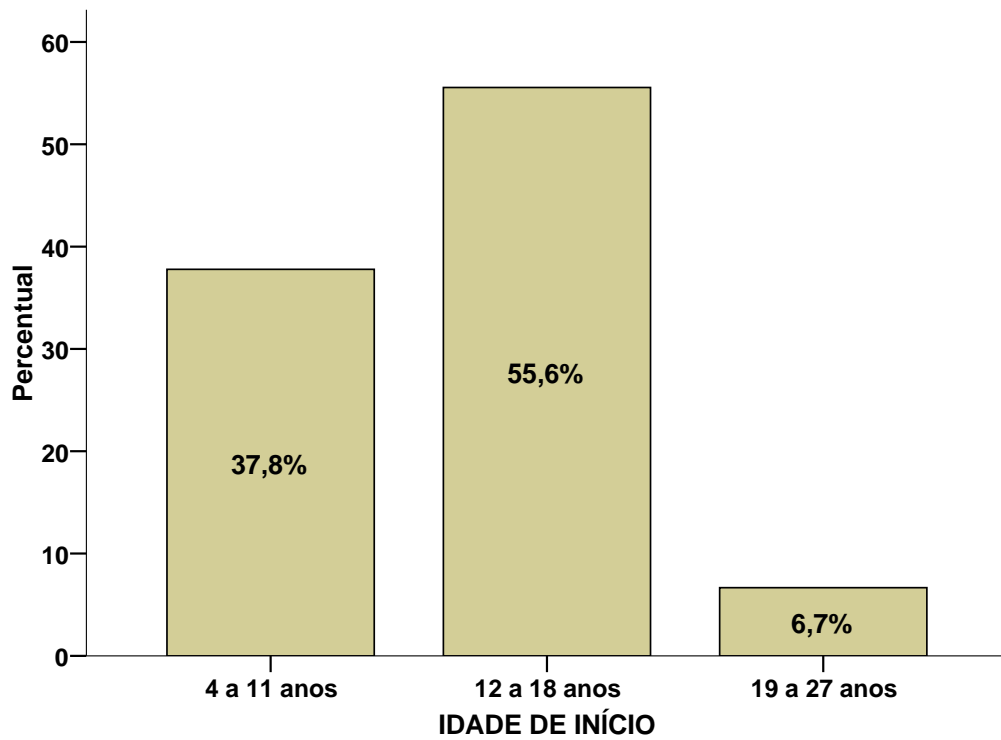
Figura14 – Tipos de crises epilépticas nos pacientes com EMJ. CTCG, crises tônico-clônicas generalizadas.



Fonte- Arquivo pessoal.

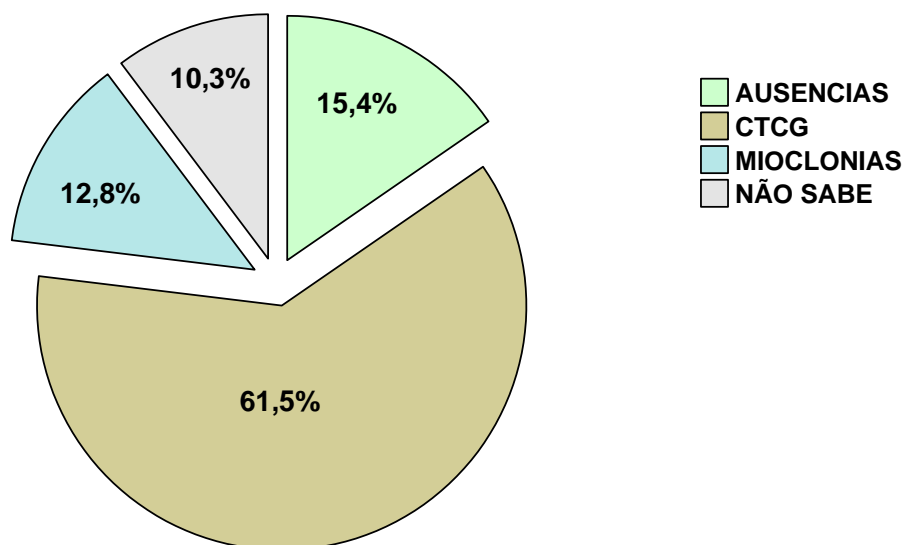
A média de idade de início das crises epilépticas foi de $12,6 \pm 4,2$ anos (4 a 27 anos). A distribuição dos pacientes por faixa etária de início das crises está descrita na figura 15. A distribuição do tipo da primeira crise epiléptica está ilustrada na figura 16.

Figura15– Distribuição dos pacientes segundo faixa etária de início das crises epiléticas.



Fonte- Arquivo pessoal.

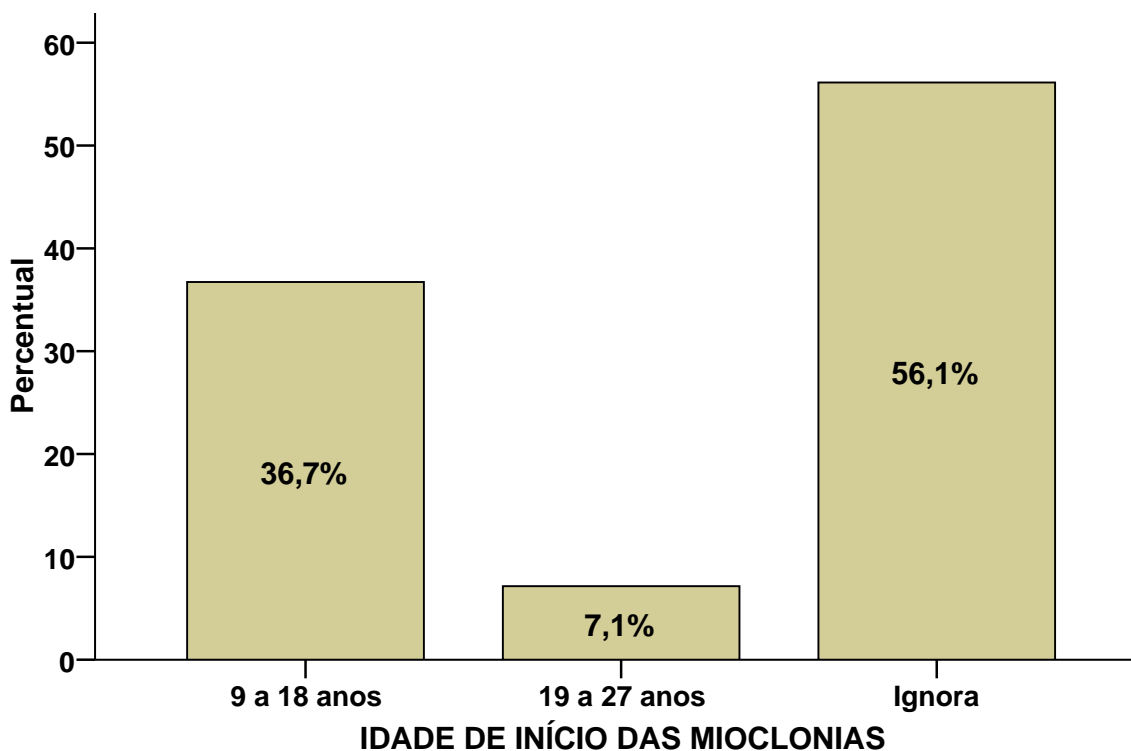
Figura16 – Distribuição dos pacientes segundo o tipo da primeira crise epilética.



Fonte- Arquivo pessoal.

A idade média de início das mioclonias foi $15,3 \pm 4,2$ anos (9 a 27 anos), sendo que 55 pacientes (56,1%) não sabiam informar sobre esse dado. A distribuição dos pacientes segundo faixa etária de início das mioclonias está ilustrada na figura 17.

Figura 17 – Distribuição dos pacientes segundo faixa etária de início das mioclonias.



Fonte- Arquivo pessoal.

A idade média de início das crises de ausência foi $12,3 \pm 4,4$ anos (4 a 22 anos), sendo que, dos 59 pacientes que referiram já ter apresentado crises de ausência, 37 pacientes (62,7%) não souberam informar sobre a idade de início desse tipo de crise. A idade média de início das CTCG foi $14,2 \pm 5,7$ anos (5 a 45 anos), sendo que, dos 94 pacientes que referiram já ter apresentado CTCG, 12 pacientes (12,7%) não souberam informar sobre a idade de início desse tipo de crise.

Fatores precipitantes de crises foram referidos por 63 pacientes (64,3%), sendo 1 fator precipitante identificado em 37 pacientes (37,8%), 2 fatores em 18 pacientes (18,4%) e 3 fatores em 8 pacientes (8,2%). Privação do sono foi referida como fator precipitante de crises por 45 pacientes (45,9%), situações de estresse emocional por 34 pacientes (34,7%), ingestão de bebidas alcoólicas por 6 pacientes (6,1%), luminosidade por 3 pacientes (3,1%), esforço físico ou mental por 2 pacientes (2%) e ciclo menstrual por 5 pacientes do sexo feminino (7,9%).

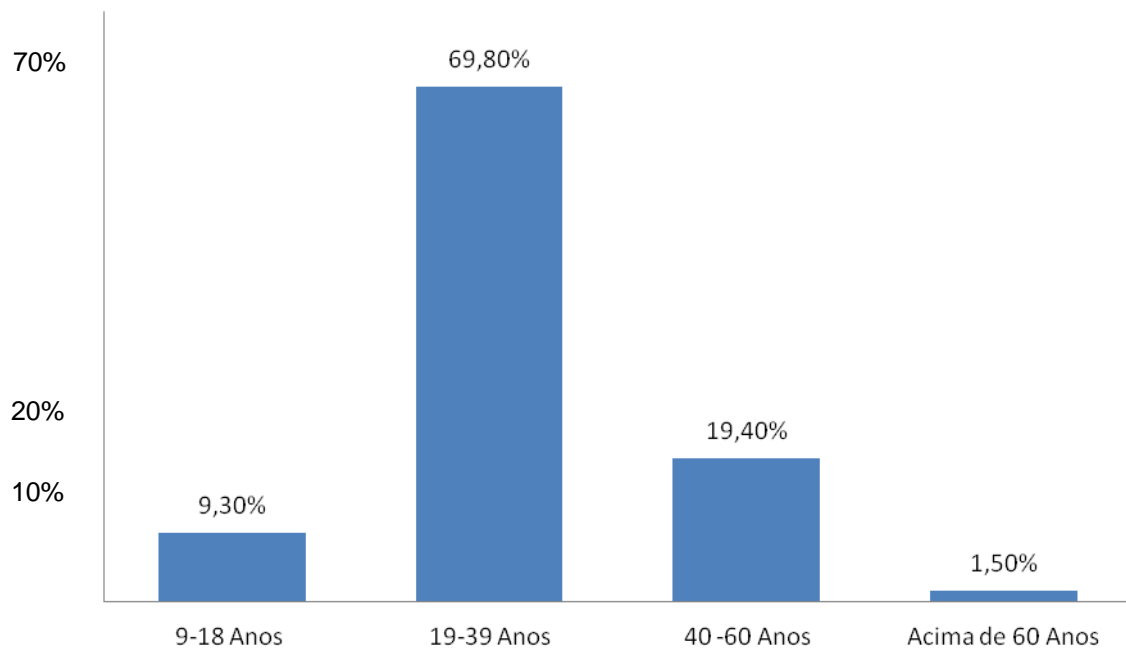
Vinte pacientes (20,4%) apresentavam antecedente de convulsão febril. História familiar de epilepsia estava presente em 63 pacientes (64,3%) e 4 pacientes (4,1%) ignoravam a história familiar. História familiar de epilepsia em parentes de primeiro grau estava presente em 24 pacientes (24,5%). Vinte pacientes (20,4%) apresentavam antecedente de convulsão febril.

Noventa e 5 pacientes (96,9%) foram submetidos a EEG, sendo que 83 pacientes (87,4%) apresentaram pelo menos um exame com achados compatíveis com atividade generalizada e 12 pacientes (12,6%) apresentavam exame normal. Noventa pacientes (91,8%) estavam em uso de alguma DAE, sendo que 61 pacientes (62,2%) estavam em monoterapia. Dos 6 pacientes que não estavam usando DAE, apenas três estavam sem crises há mais de 1 ano. Sessenta e seis pacientes (67,3%) usavam valproato de sódio ou divalproato de sódio em monoterapia ou politerapia. Fenobarbital era utilizado por 23 pacientes (23,5%) e lamotrigina era utilizada por 12 pacientes (12,2%). Vinte e dois pacientes (22,4%) estavam livres de crises há mais de 1 ano.

5.2 Características dos Indivíduos Controles

Foram analisados os dados de 129 indivíduos controles sem parentesco em até terceiro grau com epilepsia, Destes 43 eram do sexo masculino e 86 do sexo feminino. sendo 12 indivíduos com idade entre 9 e 18 anos, 90 indivíduos com idade entre 19 e 39 anos, 25 indivíduos apresentaram idades entre 40 e 60 anos e 2 indivíduos estavam acima de 60 anos. A idade média para esse grupo foi de $28,7 \pm 11,27$ anos (12 a 64 anos). A distribuição por faixa etária destes indivíduos está demonstrada na figura 18.

Figura 18: Faixa Etária dos Indivíduos Controles.



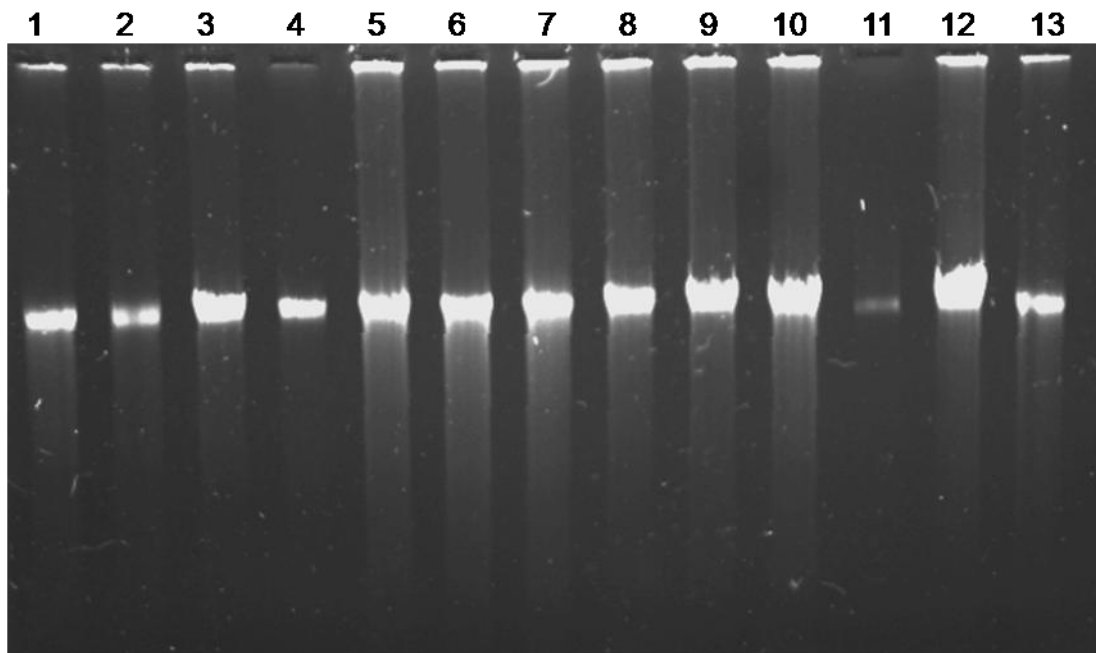
Fonte- Arquivo pessoal.

5.3 Expansão do Banco de Dna de Pacientes com Epilepsia da Universidade Federal de Alagoas

Neste estudo, expandimos nosso banco de DNA para 98 amostras de pacientes com EMJ provenientes do Estado de Alagoas. Destas, 65 foram extraídas e incorporadas ao Banco durante a execução do projeto.

A avaliação da integridade e quantidade dos DNAs genômicos foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 0,7%. A figura 19 contém o perfil eletroforético de algumas das amostras analisadas, representativo das demais.

Figura 19- Perfil eletroforético do DNA genômico de 13 amostras provenientes de pacientes com EMJ. Eletroforese em gel de agarose 0,7%.



Fonte- Arquivo pessoal.

Podemos observar que todas as amostras apresentam uma única banda com intensidade relativamente forte. Este padrão de intensidade indica que DNA genômico extraído apresenta-se em concentrações satisfatórias. A não detecção (ou discreta) de rastro abaixo das bandas indica que o DNA genômico está relativamente íntegro e portanto, adequado para as análises subsequentes.

5.4 Genotipagem dos indivíduos quanto ao polimorfismo SNP211037 no gene *GABRG2*

Todos os 98 pacientes com epilepsia mioclônica juvenil investigados foram genotipados (tabela 5). Em relação ao grupo controle, cento e vinte e quatro indivíduos tiveram o genótipo determinado (Tabela 6).

Tabela 5- Genótipos referentes ao polimorfismo SNP211037 do gene *GABRG2* detectados em pacientes com epilepsia mioclônica juvenil provenientes do estado de Alagoas.

Continua

N	Pacientes	Genótipo	N	Pacientes	Genótipo	N	Pacientes	Genótipo
1	MCZE053	C/T	34	MCZE195	T/T	67	MCZE239	C/C
2	MCZE079	C/T	35	MCZE196	C/T	68	MCZE240	C/C
3	MCZE092	C/C	36	MCZE197	C/C	69	MCZE245	C/C
4	MCZE099	C/C	37	MCZE198	C/C	70	MCZE246	C/C
5	MCZE103	C/T	38	MCZE199	C/C	71	MCZE248	T/T
6	MCZE130	C/C	39	MCZE200	C/T	72	MCZE252	C/T
7	MCZE138	C/T	40	MCZE201	C/C	73	MCZE253	C/T
8	MCZE139	C/C	41	MCZE202	C/C	74	MCZE255	T/T
9	MCZE149	C/C	42	MCZE204	C/C	75	MCZE256	C/T
10	MCZE157	C/T	43	MCZE205	C/T	76	MCZE257	T/T
11	MCZE159	T/T	44	MCZE206	T/T	77	MCZE261	C/T
12	MCZE160	T/T	45	MCZE207	C/C	78	MCZE262	C/T
13	MCZE161	C/C	46	MCZE208	C/C	79	MCZE263	C/C
14	MCZE164	C/C	47	MCZE211	C/C	80	MCZE266	C/C
15	MCZE166	C/C	48	MCZE212	C/C	81	MCZE267	C/C
16	MCZE167	C/C	49	MCZE214	C/C	82	MCZE180	C/T
17	MCZE168	C/C	50	MCZE215	C/T	83	MCZE224	C/T
18	MCZE169	T/T	51	MCZE216	C/T	84	MCZE175	C/T
19	MCZE170	C/C	52	MCZE217	T/T	85	MCZE194	C/T
20	MCZE171	C/T	53	MCZE218	C/T	86	MCZE251	C/C
21	MCZE172	C/T	54	MCZE219	C/T	87	MCZE268	C/C
22	MCZE174	C/C	55	MCZE220	T/T	88	MCZE269	C/C
23	MCZE177	C/T	56	MCZE221	C/T	89	MCZE270	C/T
24	MCZE178	C/T	57	MCZE222	T/T	90	MCZE134	C/T
25	MCZE179	T/T	58	MCZE223	C/T	91	MCZE235	C/T
26	MCZE181	C/T	59	MCZE226	C/T	92	MCZE244	C/T
27	MCZE182	C/T	60	MCZE227	C/C	93	MCZE247	C/C
28	MCZE183	C/T	61	MCZE228	C/C	94	MCZE265	C/T
29	MCZE187	C/T	62	MCZE229	C/C	95	MCZE 151	C/T
30	MCZE188	C/T	63	MCZE230	T/T	96	MCE173	C/C

Tabela 5- Genótipos referentes ao polimorfismo SNP211037 do gene *GABRG2* detectados em pacientes com epilepsia mioclônica juvenil provenientes do estado de Alagoas. Conclusão

N	Pacientes	Genótipo	N	Pacientes	Genótipo	N	Pacientes	Genótipo
31	MCZE190	C/T	64	MCZE231	C/T	97	MCZE 242	C/T
32	MCZE191	C/C	65	MCZE232	C/T	98	MCZE 250	C/T
33	MCZE193	T/T	66	MCZE234	C/C			

N: Amostras utilizadas, total de 98. C/C: homocigotos para o alelo C; C/T: heterocitos; T/T: homocigotos para o alelo T. Método de genotipagem:PCR-RFLP.

Tabela 6- Genótipos referentes ao polimorfismo SNP211037 do gene *GABRG2* detectados em indivíduos controles provenientes do estado de Alagoas. Continua

N	Controles	Genótipo	N	Controles	Genótipo	N	Controles	Genótipo
1	MCZC003	C/C	44	MCZC075	C/T	87	MCZC135	C/T
2	MCZC005	C/C	45	MCZC076	C/C	88	MCZC136	C/C
3	MCZC007	C/C	46	MCZC078	C/C	89	MCZC139	C/C
4	MCZC009	C/T	47	MCZC079	C/C	90	MCZC140	C/T
5	MCZC008	C/C	48	MCZC081	C/C	91	MCZC144	T/T
6	MCZC010	C/T	48	MCZC082	C/T	92	MCZC148	T/T
7	MCZC011	C/T	50	MCZC085	C/T	93	MCZC152	C/C
8	MCZC012	T/T	51	MCZC088	C/C	94	MCZC153	C/C
9	MCZC015	C/C	52	MCZC090	C/T	95	MCZC154	C/T
10	MCZC017	C/T	53	MCZC091	C/C	96	MCZC155	C/T
11	MCZC018	C/T	54	MCZC092	C/C	97	MCZC156	C/T
12	MCZC020	C/T	55	MCZC093	C/C	98	MCZC157	T/T
13	MCZC022	C/C	56	MCZC094	C/T	99	MCZC158	C/T
14	MCZC023	C/T	57	MCZC095	C/T	100	MCZC159	C/C
15	MCZC025	C/C	58	MCZC099	C/T	101	MCZC160	T/T
16	MCZC026	C/T	59	MCZC100	C/T	102	MCZC161	T/T
17	MCZC028	C/T	60	MCZC102	C/T	103	MCZC162	C/T

Tabela 6- Genótipos referentes ao polimorfismo SNP211037 do gene *GABRG2* detectados em indivíduos controles provenientes do estado de Alagoas.

Continua								
N	Controles	Genótipo	N	Controles	Genótipo	N	Controles	Genótipo
18	MCZC031	C/C	61	MCZC104	C/C	104	MCZC163	C/T
19	MCZC032	T/T	62	MCZC105	C/C	105	MCZC164	C/T
20	MCZC033	C/T	63	MCZC106	C/T	106	MCZC165	C/C
21	MCZC035	C/C	64	MCZC108	C/C	107	MCZC166	C/C
22	MCZC036	T/T	65	MCZC110	C/C	108	MCZC167	C/C
23	MCZC037	C/T	66	MCZC111	T/T	109	MCZC168	C/C
24	MCZC038	C/T	67	MCZC112	C/C	110	MCZC169	C/C
25	MCZC040	C/C	68	MCZC113	C/C	111	MCZC171	C/T
26	MCZC041	C/C	69	MCZC114	C/C	112	MCZC172	C/C
27	MCZC042	C/C	70	MCZC115	C/T	113	MCZC173	C/C
28	MCZC043	C/C	71	MCZC116	C/T	114	MCZC174	C/C
29	MCZC044	C/C	72	MCZC117	C/C	115	MCZC175	C/C
30	MCZC047	C/C	73	MCZC118	C/C	116	MCZC176	C/C
31	MCZC050	C/T	74	MCZC119	C/C	117	MCZC177	C/C
32	MCZC051	C/T	75	MCZC120	C/T	118	MCZC178	C/T
33	MCZC052	C/T	76	MCZC121	C/T	119	MCZC181	C/T
34	MCZC055	C/T	77	MCZC122	C/C	120	MCZC182	C/C
35	MCZC056	C/T	78	MCZC126	C/C	121	MCZC185	C/C
36	MCZC057	C/T	79	MCZC127	C/T	122	MCZC187	C/T
37	MCZC059	C/T	80	MCZC128	C/T	123	MCZC188	C/T
38	MCZC064	C/C	81	MCZC129	C/T	124	MCZC189	T/T
39	MCZC065	C/T	82	MCZC130	C/T	125	MCZC190	C/T
40	MCZC067	C/C	83	MCZC131	C/T	126	MCZC191	C/C

Tabela 6- Genótipos referentes ao polimorfismo SNP211037 do gene *GABRG2* detectados em indivíduos controles provenientes do estado de Alagoas.

						Conclusão		
N	Controles	Genótipo	N	Controles	Genótipo	N	Controles	Genótipo
41	MCZC068	C/C	84	MCZC132	C/T	127	MCZC192	C/T
42	MCZC071	C/C	85	MCZC133	C/T	128	MCZC194	C/C
43	MCZC072	C/T	86	MCZC134	C/C	129	MCZC195	C/C

Fonte- arquivo pessoal.

N: Amostras utilizadas, total de 129. C/C: homozigotos para o alelo C; C/T: heterozitos; T/T: homozigotos para o alelo T. Método de genotipagem: PCR-RFLP.

As frequências alélicas e genóticas para a população de pacientes com EMJ e indivíduos controle foram calculadas utilizando-se o programa SNPStat (Tabela 7).

Tabela 7- Frequências alélicas e genóticas do polimorfismo SNP211037 do gene *GABRG2*, para cada grupo analisado.

Pacientes com EMJ		Grupo controle
Alelos	N=98 (100%)	N=129 (100%)
C	124 (63%)	181(70%)
T	72 (37%)	77 (30%)
Genótipos		
CC	40 (41%)	61(47%)
CT	44 (45%)	59 (46%)
TT	14 (14%)	9 (7%)

Fonte- arquivo pessoal.

N= total de indivíduos analisados.

Podemos observar que entre os pacientes, o variante C apresentou uma frequência de 63% e o variante T de 37%. As frequências genóticas dos homozigotos CC e TT e do heterozigoto CT foram, respectivamente: 41%, 14% e 45%. Para a população de indivíduos controle, o variante C apresentou uma frequência de 70% e o T 30%. As frequências genóticas dos homozigotos CC e TT e do heterozigoto CT foram, respectivamente: 47%, 7% e 46%.

Para verificar se as populações estudadas encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado teste estatístico do Qui-Quadrado (tabela 8).

Podemos observar que a distribuição genotípica nas população de pacientes e controle não são estatisticamente diferente daquelas esperadas para uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esta situação também permanece quando agrupamos todos os indivíduos (com epilepsia e controle), o que indica que os grupos estudados são amostras representativas de suas populações.

Tabela 8- Teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg (n= 227) com o polimorfismo SNP211037 do gene *GABRG2*.

	CC	CT	TT	C	T	Valor de P
Todos os sujeitos	101	103	23	305	149	0.76
Grupo controle	61	59	9	181	77	0.4
Grupo pacientes	40	44	14	124	72	0.83

Fonte- arquivo pessoal.

P < 0,05, considerado significativo.

5.5 Análise comparativa das frequências alélicas e genóticas obtidas entre os grupos estudados (pacientes com EMJ versus grupo controle).

As frequências alélicas e genóticas obtidas foram comparadas entre as populações (pacientes com epilepsia versus controle), utilizando diferentes modelos de herança (Tabelas 9 - 11).

Tabela 9- Análise comparativa entre as frequências alélicas e genótípicas obtidas do polimorfismo SNP 211037 do gene *GABRG2*, entre os grupos com epilepsia e controle da população alagoana, através do modelo de co-dominância (N=227, análise não ajustada para sexo + etnia).

Modelo	Genótipo	Controle	Pacientes	OR (95% CI)	Valor de P
Co-dominante	C/C	61 (47.3%)	40 (40.8%)	1.00	0,21
	C/T	59 (45.7%)	44 (44.9%)	1,17/ 0,67-2.06	
	T/T	9 (7.0 %)	14 (14.3%)	2.30/ 0.91-5.82	

Fonte- arquivo pessoal.

OR = Odds Ratio; CI= Intervalo de Confiança; P< 0,05, considerado significativo. Análises realizadas através da plataforma SNPStat.

Tabela 10- Análise comparativa entre as frequências alélicas e genótípicas obtidas do polimorfismo SNP 211037 do gene *GABRG2*, entre os grupos com epilepsia e controle da população alagoana, através do modelo de dominância. (N=227, análise não ajustada para sexo + etnia).

Modelo	Genótipo	Controle	Pacientes	OR (95% CI)	Valor de P
Dominante	C/C	61 (47.3%)	40 (40,8%)	1.00	0,29
	C/T – T/T	68 (52.7%)	58 (59.2%)	1.33/ 0.78 – 2.27	

Fonte- arquivo pessoal.

OR = Odds Ratio; CI= Intervalo de Confiança; P< 0,05, considerado significativo. Análises realizadas através da plataforma SNPStat.

Tabela 11- Análise comparativa entre as frequências alélicas e genótípicas obtidas do polimorfismo SNP 211037 do gene *GABRG2*, entre os grupos com epilepsia e controle da população alagoana, através do modelo recessivo (N=227, análise não ajustada para sexo + etnia).

Modelo	Genótipo	Controle	Pacientes	OR (95% CI)	Valor de P
Recessivo	C/C-C/T	120 (93 %)	84 (85.7%)	1.00	0,091
	T/T	9 (7%)	14 (14,3%)	2.12/ 0,88 – 5.15	

Fonte- arquivo pessoal.

OR = Odds Ratio; CI= Intervalo de Confiança; P< 0,05, considerado significativo. Análises realizadas através da plataforma SNPStat.

Podemos observar que com todos os modelos utilizados (dominância, co-dominância e recessivo) não houve diferença estatisticamente significativa nas frequências genótípicas entre os grupos estudados, mesmo quando as análises foram ajustadas para sexo e etnia (dado não mostrado).

6.1 Perfil Clínico dos Pacientes com EMJ

Neste estudo houve um predomínio dos pacientes do sexo feminino, que corresponderam a cerca de 64% da amostra, o que também já foi observado em várias séries como 75% na Carolina do Norte (ASCONAPE e PENRY, 1984), 74,4% na Noruega (KLEVELAND e ENGELSEN, 1998), 73,1% no estado de Santa Catarina, Brasil (FIGUEREDO et al., 1999), 60,3% na Itália (FIGUEREDO et al., 1999), 58% em estudo multicêntrico (MARTINEZ-JUAREZ et al., 2006) e 52,5% na Ásia (GUNATILAKE e SENEVIRATNE, 2000). Outros autores, entretanto, observaram leve predomínio do sexo masculino como 53,5% (DELGADO-ESCUETA e ENRILE-BACSAI, 1984), 54,2% (MURTHY et al., 1998) e 51,9% (VIJAI et al., 2003). Como esses estudos também foram realizados em pacientes acompanhados em clínicas, ainda são necessários grandes estudos populacionais para esclarecer se a prevalência de EMJ difere entre os sexos.

O fato de quase 80% das amostras serem compostas de pacientes acima de 18 anos, sendo que cerca de 10% de pacientes acima de 39 anos, indica que a EMJ é uma desordem cujas manifestações mantêm-se além da adolescência. A tendência à recorrência das crises após a interrupção do uso de DAE é uma característica conhecida da EMJ, mas ainda não há muitos estudos com seguimento desses pacientes a longo prazo (DELGADO-ESCUETA e ENRILE-BACSAI, 1984; JANZ, 1985). Recentemente, um estudo prospectivo mostrou que, após 20 anos do início das crises, 73% dos 22 pacientes analisados ainda apresentavam crises epiléticas ou estavam em uso de DAE (CAMFIELD e CAMFIELD, 2009).

Foram incluídos no estudo todos os pacientes com EMJ avaliados pelos neurologistas envolvidos na pesquisa, em atendimentos no HUPAA-UFAL ou em clínicas particulares. Para análise adequada de renda familiar por pessoa e escolaridade, foi necessário dividir a amostra de acordo com o local de atendimento, uma vez que uma menor parcela dos pacientes era oriunda de clínicas particulares. Dessa forma, observamos que, entre os pacientes acima de 18 anos de idade atendidos no HUPAA-UFAL, 5,3% eram analfabetos e 28,1% não chegaram a terminar o ensino fundamental. Em Alagoas, 64,4% das pessoas com 10 anos ou mais de idade não têm instrução ou não completaram o ensino fundamental (IBGE, 2010). Entre os pacientes maiores de 18 anos de idade atendidos no HUPAA-UFAL,

12,3% referiram não apresentar nenhuma fonte de renda e 33,8% referiram renda familiar por pessoa inferior a 150 reais. Em Alagoas, 39,1% das pessoas com 10 anos ou mais de idade apresenta renda familiar por pessoa de até 1 salário-mínimo. Observamos, assim, pacientes que, apesar de relatarem um bom nível de escolaridade em relação aos dados do estado de Alagoas, apresentam precárias condições econômicas (IBGE, 2010). Os dados descrevem escolaridade e renda familiar em nosso grupo de pacientes, mas não permitem uma comparação adequada com a população geral do estado, pois referem-se predominantemente, mas não exclusivamente, a pacientes residentes na cidade de Maceió.

Cerca de 96% dos pacientes apresentavam CTCG, proporção ainda superior à encontrada na maioria dos estudos: 86% na Arábia Saudita (OBEID e PANAYIOTOPOULOS, 1988), 83% no estado de Carolina do Norte, EUA, 84,7% na região de Telengana, sul da Índia (MURTHY et al., 1998), 86% na Noruega (KLEVELAND e ENGELSEN, 1998), 90,4% na Itália (MONTALENTI et al., 2001), 90,7% na cidade de Los Angeles, EUA (DELGADO-ESCUETA e ENRILE-BACSAL, 1984), 92,4% no estado de Santa Catarina, Brasil (FIGUEREDO et al., 1999) e 92,9% no estado de Kerala, sul da Índia (VIJAI et al., 2003). A proporção de pacientes com crises de ausência, 60,2%, também foi superior à proporção relatada em outras séries: 12% na Arábia Saudita (OBEID e PANAYIOTOPOULOS, 1988), 20% na Carolina do Norte, EUA (ASCONAPE e PENRY, 1984), 20,8% na região de Telengana, sul da Índia (MURTHY, RAO *ET AL.*, 1998), 32,5% na Noruega (KLEVELAND E ENGELSEN, 1998), 33,3% na Itália (MONTALENTI et al., 2001), 39,5% na cidade de Los Angeles (DELGADO-ESCUETA e ENRILE-BACSAL, 1984), 19,2% no estado de Santa Catarina, Brasil (FIGUEREDO et al., 1999) e 40,4% no estado de Kerala, sul da Índia (VIJAI et al., 2003). Se, de uma forma geral, estima-se que CTCG e crises de ausência ocorram em, respectivamente, 90% e 30% dos pacientes com EMJ, em nossos pacientes encontramos uma frequência maior desses tipos de crises, principalmente de crise de ausência. Essas diferenças podem refletir variações na apresentação clínica da EMJ em diferentes populações, mas podem se decorrentes de diferenças metodológicas na avaliação dos pacientes ou na capacidade dos pacientes e familiares de reconhecer e relatar adequadamente suas manifestações. Por outro lado, avaliamos, em sua maioria,

pacientes referidos para um centro terciário e que, portanto, podem ser os que apresentam maior variedade de manifestações clínicas.

A grande maioria dos pacientes, então, apresenta os três tipos de crises epiléticas característicos da EMJ, o que difere de grande parte dos dados publicados, segundo os quais a maioria dos pacientes apresentam apenas crises mioclônicas e CTCG. No quadro 1 estão descritas as combinações de crises epiléticas apresentadas por pacientes com EMJ descritas por alguns autores e encontradas em nosso estudo.

Quadro 1 – Tipos de crises epiléticas em diferentes séries de pacientes com EMJ.

Estudos	Mioclonias associadas a:			
	Isoladas	Ausências	CTCG	CTCG e ausências
Alagoas	2	1	37,8	59,2
Carolina do Norte (ASCONAPE e PENRY, 1984).	17	0	58	25
Los Angeles (DELGADO-ESCUETA e ENRILE-BACSAL, 1984).	2,3	2,3	62,8	37,2
Arábia Saudita (OBEID e PANAYIOTOPOULOS, 1988).	2	12	80	6%
Telengana (MURTHY <i>et al.</i> , 1998)	12,2	3	67,2	17,6
Noruega (KLEVELAND e ENGELSEN, 1998).	12	2	56	30
Sri Lanka (GUNATILAKE e SENEVIRATNE, 2000).	Sem dado	0	Sem dado	0
Itália (MONTALENTI <i>et al.</i> , 2001).	4,8	4,8	61,9	28,5
Kerala (VIJAI <i>et al.</i> , 2003).	5,5	1,6	54,1	38,8

Fonte- arquivo pessoal.

A idade média de início das crises epiléticas, 12,7 anos, foi semelhante, embora inferior à idade média relatada em outros estudos, 13 a 16,4 anos (ASCONAPE e PENRY, 1984; DELGADO-ESCUETA e ENRILE-BACSAL, 1984; OBEID e PANAYIOTOPOULOS, 1988; KLEVELAND e ENGELSEN, 1998; MURTHY *et al.*, 1998; FIGUEREDO *et al.*, 1999; GUNATILAKE e SENEVIRATNE, 2000; MONTALENTI *et al.*, 2001; VIJAI *et al.*, 2003). Em parte, esse achado pode ser

devido à alta frequência de crises de ausência, 60,2%, geralmente o tipo de crise de início mais precoce (ASCONAPE e PENRY, 1984; VIJAI et al., 2003). No grupo de pacientes com idade média de início da epilepsia, por exemplo, de 16,4 anos, nenhum apresentava crise ausência (GUNATILAKE e SENEVIRATNE, 2000) e na maioria dos grupos com idade média em torno de 13 anos, a frequência de pacientes com crises de ausência foi de 19 a 40%. (DELGADO-ESCUETA e ENRILE-BACSAL, 1984; MURTHY et al., 1998; FIGUEREDO et al., 1999; MONTALENTI et al., 2001).

As crises de ausência geralmente são as crises de início mais precoce, em média aos 7 anos de idade, pois cerca de 16% dos casos de EMJ evoluem a partir de um quadro de epilepsia ausência da infância (MARTINEZ-JUAREZ et al., 2006). Já nos casos de EMJ do tipo clássico, as ausências podem iniciar mais tardiamente, mesmo após as CTCG e mioclonias (MARTINEZ-JUAREZ et al., 2006). Entre nossos pacientes, 15,4% referiram que as ausências foram o primeiro tipo de crise epiléptica apresentado, o que pode indicar que apresentaram EAI antes do quadro de EMJ. Por outro lado, 61,5% dos pacientes afirmaram que a primeira crise apresentada foi uma CTCG. Kleveland e colaboradores, Gunatilake e colaboradores e Delgado-Escueta e colaboradores encontraram a CTCG como o primeiro tipo de crise em, respectivamente, 74,4%, 70% e 46,5% dos pacientes (DELGADO-ESCUETA e ENRILE-BACSAL, 1984; KLEVELAND e ENGELSEN, 1998; GUNATILAKE e SENEVIRATNE, 2000). A maior parte dos autores, entretanto, refere que o início das mioclonias costuma preceder o início das CTCG (ASCONAPE e PENRY, 1984; DURON et al., 2005; MARTINEZ-JUAREZ et al., 2006). A maioria dos nossos pacientes, entretanto, não sabiam informar a idade de início das mioclonias o que pode ser devido ao fato de que esse tipo de crise é frequentemente negligenciado pelos pacientes e familiares, que ignoram seu caráter patológico e epiléptico.

Fatores precipitantes das crises bem estabelecidos são umas das características comuns na EMJ (DELGADO-ESCUETA e ENRILE-BACSAL, 1984; JANZ, 1985; MURTHY et al., 1998; GUNATILAKE e SENEVIRATNE, 2000; DHANUKA et al., 2001; MONTALENTI et al., 2001; VIJAI et al., 2003). Cerca de 64,3% dos nossos pacientes afirmaram apresentar ao menos um fator precipitante de crise, proporção semelhante à descrita em Telengana, sul da Índia, 61%

(MURTHY et al., 1998), Kerala, sul da Índia, 89% (VIJAI et al., 2003) e Punjab, Índia, 87% (DHANUKA et al., 2001). Quase metade dos pacientes referiram ocorrência ou piora das crises após privação do sono, assim como 50% dos pacientes estudados em Telengana, sul da Índia (MURTHY et al., 1998) 52% dos estudados na Itália (MONTALENTI et al., 2001) 68% no Sri Lanka (GUNATILAKE e SENEVIRATNE, 2000) 73% dos estudados em Punjab, Índia (DHANUKA et al., 2001) 83,7% na Noruega (KLEVELAND e ENGELSEN, 1998) e 84% no estado de Andhra Pradesh, Índia (JAYALAKSHMI et al., 2006). Estresse também foi o segundo fator precipitante de crises mais comum descrito no grupo de pacientes da Noruega, 46,5% (KLEVELAND e ENGELSEN, 1998). Poucos pacientes referiram influência do ciclo menstrual como precipitante de crises, 7,9%, assim como no estudo em Kerala, sul da Índia, 7,9% (VIJAI et al., 2003). Entretanto, entre os pacientes avaliados em Telengana, sul da Índia, 20% das mulheres referiram menstruação como fator precipitante de crises epiléticas, proporção que chegou a 47,4% entre as pacientes da Itália (MONTALENTI et al., 2001).

Antecedente pessoal de convulsão febril não é uma variável pesquisada na maioria dos estudos sobre EMJ e estima-se que esteja presente em cerca de 3 a 13% desses pacientes.(DURON et al., 2005). Encontramos uma proporção bem superior à relatada por autores como Kleveland e colaboradores (9,3%) e Vijai e colaboradores (9,8%).(KLEVELAND e ENGELSEN, 1998; MURTHY et al., 1998; VIJAI et al., 2003).

No nosso grupo de pacientes com EMJ, 64,3% apresentavam história familiar de epilepsia, número superior ao relatado na maioria das séries: Arábia Saudita, 48,7% (OBEID e PANAYIOTOPOULOS, 1988), Carolina do Norte, 50% (ASCONAPE e PENRY, 1984), Telengana, 23,6% (MURTHY et al., 1998), Noruega, 28% (KLEVELAND e ENGELSEN, 1998), Itália, 25,4% (MONTALENTI et al., 2001), Los Angeles, 39,5% (DELGADO-ESCUETA e ENRILE-BACSAL, 1984), Santa Catarina, 53,8% (FIGUEREDO et al., 1999) e Kerala, 46% (VIJAI et al., 2003). Sabe-se, desde os primeiros relatos da síndrome, que história familiar de epilepsia é comum na EMJ, (ASCONAPE e PENRY, 1984; DELGADO-ESCUETA e ENRILE-BACSAL, 1984; JANZ, 1985; OBEID e PANAYIOTOPOULOS, 1988) a ponto de alguns autores já terem sugerido padrões de herança autossômico dominante, autossômico recessivo e poligênico (TSUBOI e CHRISTIAN, 1973;

PANAYIOTOPOULOS e OBEID, 1989; GARDINER, 2005). Os familiares podem apresentar EMJ ou outras formas de epilepsia como epilepsia ausência infantil, epilepsia ausência juvenil ou epilepsia com crises de grande mal ao despertar (WINAWER et al., 2005; JAYALAKSHMI et al., 2006). Mesmo familiares sem histórico de crises epilépticas podem mostrar alterações típicas de EGI ao exame de EEG (JAYALAKSHMI et al., 2006; MARTINEZ-JUAREZ et al., 2006). Em nossa pesquisa, procuramos assegurar que a história familiar realmente referia-se a epilepsia – crises epilépticas recorrentes não-provocadas – e não a crises sintomáticas agudas ou convulsões febris. Não foi possível, entretanto, caracterizar sistematicamente o tipo de epilepsia apresentado pelos familiares dos pacientes.

Apenas 12,6% dos pacientes apresentavam EEG persistentemente normal, o que pode ocorrer em 6 a 20 % dos casos (DHANUKA et al., 2001; MONTALENTI et al., 2001). Três pacientes (3%) não apresentavam mais crises na ausência do uso de DAE, uma proporção ainda inferior à relatada na literatura. Há referências de que cerca de 80 a 85% ficam sem crises epilépticas mediante uso de valproato de sódio em monoterapia (DELGADO-ESCUETA e ENRILE-BACSAI, 1984; PANAYIOTOPOULOS et al., 1994; GELISSE et al., 2001). Entre nossos pacientes encontramos uma baixa taxa de controle das crises e ainda uma alta frequência de uso de fenobarbital, o que pode ser devido a questões socioeconômicas, inclusive às dificuldades de acesso aos serviços de saúde.

6.2 Expansão do banco de DNA de pacientes com epilepsia da Universidade Federal de Alagoas.

Expandimos o nosso banco de DNA para 98 amostras de pacientes com epilepsia mioclônica juvenil provenientes do estado de Alagoas e 129 amostras de indivíduos controles. Todas as amostras de DNA apresentam-se adequadas para análises moleculares, conforme avaliação realizada através de eletroforese em gel de agarose 0,7% (figura 19).

Bancos de DNA tem se tornado um dos mais importantes recursos em instituições acadêmicas para identificação de genes envolvidos tanto na susceptibilidade a doenças quanto na resposta ao tratamento farmacológico. De fato, a demanda aumentada por quantidade de amostras e a tecnologia disponível

para genotipagem mais rápida e fácil tem levado a um interesse enorme em bancos genéticos (STEINBERG et al., 2002; HIRTZLIN et al., 2003).

O delineamento experimental utilizado para construção de bancos de DNA deve contemplar diferentes parâmetros técnicos e éticos, de acordo com a finalidade do projeto. De uma maneira geral, os principais elementos técnicos considerados são: a) tipo de amostra biológica, b) método de transporte, processamento e estocagem do material genético.

Uma variedade de amostras biológicas está sendo armazenadas em bancos para análises genéticas, tais como sangue total, líquido ou seco, células epiteliais da mucosa bucal, folículo piloso, linfócitos imortalizados (THORNTON et al., 2005). A escolha do tipo de amostra biológica que será coletada depende de muitos fatores, incluindo: a) quantidade de DNA necessária (que por sua vez, depende do número de alterações genéticas que serão estudadas e da metodologia que será utilizada); b) recursos disponíveis para obter, processar e estocar as amostras biológicas; c) condições para coleta das amostras no campo (STEINBERG et al., 1997). Considerando esses elementos, cada método de coleta apresenta vantagens e desvantagens.

Para a construção e expansão dos bancos de DNA utilizados neste estudo, optamos pelo uso de sangue total periférico. Neste sentido, uma alíquota das amostras era mantida a -4°C e processadas até 24 horas depois e o restante estocado a -20°C .

Sangue total periférico é adequado para um transporte rápido dos pontos de coleta para o laboratório. Além do mais, possibilita a obtenção de uma grande quantidade de DNA. A purificação adequada de material genético a partir de sangue total, entretanto, requer que as amostras sejam rapidamente processadas para evitar degradação do DNA (WRIGHT e WYNFORD-THOMAS.,1990). Alternativamente, as amostras de sangue podem ser estocadas a -20°C até o momento do uso. Em estudo avaliando os efeitos da temperatura e tempo de estocagem de sangue total na qualidade do DNA purificado, foi observado que todas as temperaturas de estocagem analisadas (-20°C , 4°C , 23°C , e 37°C) resultaram em DNA de alta qualidade e adequado para análises de PCR e restrição. Isto também foi constatado para os diferentes tempos de estocagem analisados (3, 7, 14, e 28 dias) (CUSHWA e MEDRANO, 1993).

Quando a finalidade do banco de DNA for a realização de estudos genéticos que visam a identificação de fatores de riscos a patologias geneticamente complexas, torna-se necessário levar também em consideração os seguintes elementos: a) quantidade suficiente de amostras, b) definição estridente de fenótipos ou endofenótipos que serão analisados, c) disponibilidade de novas tecnologias, tais como as que permitem análises em larga-escala, por exemplo (MOLNAR e BENCSIK, 2006).

A maioria dos estudos de associação em epilepsia tem utilizado bancos de DNA com quantitativo de amostras que varia entre 4 a 1.361 sendo a mediana de 115 amostras. De uma maneira geral, quanto maior o N amostral, maior é a chance de identificar uma associação genética real. Isto se torna ainda mais evidente quando se investiga polimorfismos mais raros na população. Entretanto, é importante considerar que este componente deve está vinculado a uma definição estrigente de fenótipos. De fato, a heterogeneidade fenotípica da população representada nos bancos de DNA constitui um enorme estorvo para as análises genéticas em patologias geneticamente complexas. Uma boa definição de fenótipo através do uso de critérios clínicos consistentes é portanto, essencial. Todo paciente que será incluído no estudo deve ser diagnosticado através de um rígido protocolo que assegure a estringência e consistência da definição de fenótipo. Esta estratégia muitas vezes vai de encontro a crença de que “tamanho amostral é o mais importante”, que tem levado a construção de bancos de DNA enormes (contendo mais de 1000 amostras) e de alto custo, mas que em decorrência da heterogeneidade fenotípica, não são adequados em estudos de associação.

De fato, a maioria dos bancos de DNA de pacientes epilépticos que vem sendo utilizados em estudos de associação foram construídos com base em definições mais amplas de fenótipos. Dos estudos cadastrados no epiGAD, Setenta e nove foram direcionados para Epilepsia idiopática generaliza. Apenas 25 estudos foram realizados em pacientes com EMJ. Mesmos nesses casos, dependendo da definição de fenótipo e endofenótipo utilizada, há possibilidade real de resultar em heterogeneidade fenotípica, principalmente em estudos multicêntricos.

Em nosso estudo estabelecemos como critério de diagnóstico de EMJ, Presença de crises mioclônicas isoladas ou acompanhadas de crises TCG e/ou crises de ausência, idade de início de 4 a 30 anos de idade exame neurológico

normal. Além do mais, para diminuir a chance de erros todos os pacientes foram avaliados de forma independente por 2 neurologistas.

É, portanto, um desafio para a comunidade de geneticista desenvolver um padrão de qualidade apropriado para todos os aspectos da pesquisa genética, principalmente no tocante a construção de banco de DNA.

6.3 Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo SNP211037 do gene GABRG2 na população Alagoana.

Ao considerarmos todos os indivíduos analisados (pacientes e controle), observamos que as frequências alélicas obtidas foram de 63% para o alelo C e de 37% para o alelo T. As frequências genotípicas obtidas foram de 41% para os genótipos homocigoto CC e 45% para o heterocigoto CT. A frequência do genótipo TT foi de 14% (tabela 7).

Esses dados são comparáveis aos obtidos em trabalhos independentes com outras populações. Em estudo realizado com população Indiana, envolvendo pacientes com epilepsia e indivíduos controle, foi observado que o alelo C apresentou uma frequência de 75 %. As frequências genotípicas foram aproximadamente 56 % (CC), 40% (CT) e 4% (TT) (KUMARI, LAKHAN *ET AL.*, 2010.) Em cohort de 752 pacientes com epilepsia provenientes da Europa ocidental, foi observada uma frequência genotípica de aproximadamente 60% (CC), 34% (CT) e 4% (TT) (CAVALLERI, LYNCH *ET AL.*, 2005). Um estudo de caso-controle realizado em indivíduos provenientes da Alemanha mostrou as seguintes frequências genotípicas: 64% (CC), 31% (CT) e 5% (TT) (KANANURA, HAUG *ET AL.*, 2002).

Entretanto, alguns estudos em determinadas populações mostram que o polimorfismo SNP 211037 do gene GABRG2 apresenta frequências alélicas e genotípicas bem diferentes. De fato, ao contrário dos dados supracitados, as análises em populações do Egito e Taiwan mostram que o alelo T é mais frequente do que o C, com proporções variando entre 61 a 62% (SALAM, RAHMAN *ET AL.*; CHOU, LEE *ET AL.*, 2007). Estudo na população japonesa revelou que os alelos T e

C apresentam frequências bastante similares, sendo os genótipos heterozigotos duas vezes mais prevalentes (NAKAYAMA, HAMANO *ET AL.*, 2003).

A análise conjunta desses dados mostra que o polimorfismo SNP 211037 do gene GABRG2 apresenta uma distribuição que varia entre diferentes substratos populacionais. De uma forma geral, podemos perceber dois perfis de frequências alélicas: a) o alelo C é mais frequente em populações colonizadas ou originais da Europa ocidental; b) o alelo C apresenta uma frequência igual ou menor do que o alelo T em populações orientais.

6.4 Análises comparativas das frequências alélicas e genotípicas entre os pacientes com EMJ e indivíduos controle.

Até onde sabemos, esse foi o primeiro estudo que investigou a associação do polimorfismo SNP211037 do gene GABRG2 em pacientes com EMJ. Não observamos diferença estatisticamente significativa nas frequências alélicas ou genotípicas entre os grupos estudados, sugerindo que o polimorfismo SNP211037 do gene GABRG2 não está associado à Epilepsia Mioclônica Juvenil (Tabela 9-11).

Esse dado diverge dos obtidos por Chou et al (2007) em estudo realizado com Epilepsia Idiopática Generalizada. Os autores investigaram 77 pacientes e 83 indivíduos controle provenientes da população Taiwanesa. Eles observaram que o variante C apresenta uma frequência significativamente maior no grupo de pacientes. E que a odds ratio para Epilepsia Idiopática Generalizada em indivíduos com o genótipo CC foi 3,61 vezes maior, se comparada a indivíduos que apresentam o genótipo TT (CHOU et al., 2007). Desde que o polimorfismo SNP211037 (C/T) representa uma alteração genética sinônima ou silente (asn196asn), os autores atribuíram a associação genética observada a um provável desequilíbrio de ligação com outras variantes polimórficas que afetam o limiar genético de susceptibilidade.

Considerando esses dados, a não associação do polimorfismo SNP211037 (Asn196Asn) do gene GABRG2 à EMJ na população Alagoana, aqui relatada, pode ser explicada por diferenças entre os grupos de pacientes epiléticos (tipo de epilepsia) incluídos no estudo. De fato, no referido estudo, o grupo experimental analisado é bastante heterogêneo, abrangendo variadas síndromes epiléticas. Por outro lado, a população de pacientes epiléticos, aqui estudada, consiste apenas de indivíduos com diagnóstico para Epilepsia Mioclônica Juvenil.

Alternativamente, pode-se interpretar essa divergência considerando as especificidades das estruturas populacionais analisadas. De fato, outros estudos envolvendo diferentes substratos populacionais, também não detectaram uma associação genética entre o polimorfismo SNP211037 do gene GABRG2 e epilepsia. Kinorons et al (2006) realizaram um Coorte na população da Irlanda, envolvendo 99 pacientes com epilepsia idiopática generalizada e 364 indivíduos controle. Os autores não observaram associação entre o polimorfismo SNP211037 do gene GABRG2 e susceptibilidade a epilepsia idiopática generalizada (KINIRONS et al., 2006).

Estudos envolvendo outros tipos de epilepsias também falharam em detectar associação genética. Kananura et al (2002) investigaram a associação genética do polimorfismo SNP211037 do gene GABRG2 e epilepsia idiopática de ausência. O estudo foi realizado com 135 pacientes e 154 indivíduos controle, provenientes da Alemanha. Os autores não observaram diferenças significantes nas frequências alélicas e/ou genótípicas entre as populações estudadas (KANANURA et al., 2002). Kumari et al. (2010) realizaram um estudo na população do norte da Índia, envolvendo 199 indivíduos controle e 361 pacientes com epilepsia. Os autores também não observaram associação entre o polimorfismo SNP211037 do gene GABRG2 e susceptibilidade a epilepsia (KUMARI et al *ET AL.*, 2010).

Uma análise conjunta desses dados revela que somente um estudo realizado com a população de Taiwan mostrou a ocorrência de associação genética entre o polimorfismo SNP211037 e epilepsia. Esta constatação sugere um efeito de associação restrito a um determinado substrato populacional. De fato, estudos que investigaram associação genética do SNP21037 em pacientes com convulsão febril corroboram esta hipótese. Chou et al. (2003) realizou estudo de caso-controle na população taiwanesa, envolvendo 104 crianças e 83 indivíduos controle. Os autores observaram que tanto o alelo C quanto o genótipo CC apresentaram um frequência significativamente maior no grupo de pacientes com convulsão febril (CHOU *et al.*, 2003). Entretanto, com exceção de um estudo realizado na população egípcia (SALAM et al.,2011.), esses dados não foram reproduzidos em estudos envolvendo outros substratos populacionais, como os realizados no Japão (NAKAYAMA et al., 2003) e EUA (MA et al., 2006).

Este foi o primeiro estudo relatando a distribuição alélica e genotípica do referido polimorfismo em população Brasileira. Observamos que o alelo C

apresentou uma frequência duas vezes maior do que o alelo T. A similaridade entre as proporções alélicas que observamos e as relatadas para Europa ocidental, pode ser explicada pelo fluxo imigratório durante a colonização do Brasil. Entretanto, como a população brasileira tem uma composição étnica bastante heterogênea (FILHO, LEITE *ET AL.*, 2011), um estudo mais abrangente, envolvendo diferentes regiões do Brasil, torna-se necessário para melhor conhecermos a distribuição do polimorfismo SNP 211037 do gene GABRG2 na miscigenada população brasileira.

Às características clínicas observadas nos pacientes com Epilepsia Mioclônica Juvenil provenientes do estado de Alagoas foram semelhantes às características clínicas descritas na literatura. Exceto para as crises convulsivas Tônico Clônico Generalizadas com cerca de 96% dos pacientes apresentaram este tipo de crise, proporção superior a encontrada em diversos estudos. Quanto a antecedente de convulsão febril foi encontrada uma proporção bem superior à relatada pela literatura.

O Banco de DNA de Pacientes com Epilepsia e Indivíduos Controles Provenientes do Estado de Alagoas foi expandido, contribuindo para a execução do estudo com o polimorfismo SNP211037 como também poderá facilitar posteriores estudos genéticos.

Quanto às análises estatísticas para comparar as frequências alélicas e genotípicas nos grupos de pacientes com EMJ e indivíduos controles para ambos os grupos podemos observar que não foram estatisticamente significante. Sendo Assim, podemos sugerir que o polimorfismo SNP211037 do Gene GABRG2 não está associado à Epilepsia Mioclônica Juvenil em Pacientes provenientes do Estado de Alagoas.

- ALIBERTI, V. et al. Focal electroencephalographic abnormalities in juvenile myoclonic epilepsy. Epilepsia, v.35, n.2, Mar-Apr, p.297-301. 1994.
- APPLETON, R., BEIRNE, M., ACOMB, B. Photosensitivity in juvenile myoclonic epilepsy. Seizure, v.9, n.2, Mar, p.108-11. 2000.
- ASCONAPE, J. e PENRY J. K.. Some clinical and EEG aspects of benign juvenile myoclonic epilepsy. Epilepsia, v.25, n.1, Feb, p.108-14. 1984.
- AUDENAERT, D. *et al.* A novel GABRG2 mutation associated with febrile seizures. Neurology, v.67, n.4, Aug 22, p.687-90. 2006.
- BAI, D. et al. DNA variants in coding region of EFHC1: SNPs do not associate with juvenile myoclonic epilepsy. Epilepsia, v.50, n.5, May, p.1184-90. 2009.
- BERG, A. T. *et al.* Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. Epilepsia, v.51, n.4, Apr, p.676-85. 2010.
- BIANCHI, M. T. et al. Two different mechanisms of disinhibition produced by GABAA receptor mutations linked to epilepsy in humans. J Neurosci, v.22, n.13, Jul 1, p.5321-7. 2002.
- BORGES, M. A. et al. Urban prevalence of epilepsy: populational study in Sao Jose do Rio Preto, a medium-sized city in Brazil. Arq Neuropsiquiatr, v.62, n.2A, Jun, p.199-204. 2004.
- BURNEO, J. G., TELLEZ-ZENTENO, J., WIEBE, S . Understanding the burden of epilepsy in Latin America: a systematic review of its prevalence and incidence. Epilepsy Res, v.66, n.1-3, Aug-Sep, p.63-74. 2005.
- CALVANO, L.A., et al. Epidemiology of Epilepsies in the City of Maceió – Alagoas. Neurobiologia, v.73 n.1.Mar 2010.
- CAMFIELD, C. S. e CAMFIELD, P. R. Juvenile myoclonic epilepsy 25 years after seizure onset: a population-based study. Neurology, v.73, n.13, Sep 29, p.1041-5. 2009.
- CAVALLERI, G. L. et al. Failure to replicate previously reported genetic associations with sporadic temporal lobe epilepsy: where to from here? Brain, v.128, n.Pt 8, Aug, p.1832-40. 2005.
- CAVALLERI, G. L. et al. Multicentre search for genetic susceptibility loci in sporadic epilepsy syndrome and seizure types: a case-control study. Lancet Neurol, v.6, n.11, Nov, p.970-80. 2007.
- CHOU, I. C. et al. Association of GABRG2 polymorphisms with idiopathic generalized epilepsy. Pediatr Neurol, v.36, n.1, Jan, p.40-4. 2007.

- CHOU, I. C. et al. Association analysis of gamma 2 subunit of gamma- aminobutyric acid type A receptor polymorphisms with febrile seizures. *Pediatr Res*, v.54, n.1, Jul, p.26-9. 2003.
- COSSETTE, P. et al. Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet*, v.31, n.2, Jun, p.184-9. 2002.
- CUSHWA, W. T. e MEDRANO, J. F. Effects of blood storage time and temperature on DNA yield and quality. *Biotechniques*, v.14, n.2, Feb, p.204-7. 1993.
- D'AGOSTINO, D. et al. Mutations and polymorphisms of the CLCN2 gene in idiopathic epilepsy. *Neurology*, v.63, n.8, Oct 26, p.1500-2. 2004.
- DELGADO-ESCUETA, A. V. Advances in genetics of juvenile myoclonic epilepsies. *Epilepsy Curr*, v.7, n.3, May-Jun, p.61-7. 2007.
- DELGADO-ESCUETA, A. V. e ENRILE-BACSAI, F. Juvenile myoclonic epilepsy of Janz. *Neurology*, v.34, n.3, Mar, p.285-94. 1984.
- DHANUKA, A. K. et al. Juvenile myoclonic epilepsy: a clinical and sleep EEG study. *Seizure*, v.10, n.5, Jul, p.374-8. 2001.
- DURÓN, R. M. et al. Seizures of idiopathic generalized epilepsies. *Epilepsia*, v.46 Suppl 9, p.34-47. 2005.
- EUGÈNE, E. et al. GABA(A) receptor gamma 2 subunit mutations linked to human epileptic syndromes differentially affect phasic and tonic inhibition. *J Neurosci*, v.27, n.51, Dec 19, p.14108-16. 2007.
- FERNANDES, J. G. et al. Prevalence of epilepsy: the Porto Alegre study. *Epilepsia*, v.33, n.s2, p.132. 1992.
- FIGUEREDO, R.; TREVISOL-BITTENCOURT, P. C.; FERRO, J. B. Clinical-epidemiological study of patients with juvenile myoclonic epilepsy in Santa Catarina State, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*, v.57, n.2B, Jun, p.401-4. 1999.
- FILHO, I. L. et al. Genetic polymorphisms and cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia from Rio de Janeiro, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*, v.69, n.3, Jun, p.431-5. 2011
- FISHER, R. S. et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, v.46, n.4, Apr, p.470-2. 2005.
- GARDINER, M. Genetics of idiopathic generalized epilepsies. *Epilepsia*, v.46 Suppl 9, p.15-20. 2005.
- GELISSE, P. et al. Clinical factors of drug resistance in juvenile myoclonic epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v.70, n.2, Feb, p.240-3. 2001.

GITAÍ, D. L. et al. Genes and epilepsy I: epilepsy and genetic alterations. Rev Assoc Med Bras, v.54, n.3, May-Jun, p.272-8. 2008.

GOMES, Md Mda M. et al. A house-to-house survey of epileptic seizures in an urban community of Rio de Janeiro, Brazil. Arq Neuropsiquiatr, v.60, n.3-B, Sep, p.708-11. 2002.

GREENBERG, D. A. e SUBARAN, R. Blinders, phenotype, and fashionable genetic analysis: a critical examination of the current state of epilepsy genetic studies. Epilepsia, v.52, n.1, Jan, p.1-9.2011.

GU, W. et al. A new EF-hand containing gene EFHC2 on Xp11.4: tentative evidence for association with juvenile myoclonic epilepsy. Epilepsy Res, v.66, n.1-3, Aug-Sep, p.91-8. 2005.

GUARANHA, M. S. et al. Prognosis of juvenile myoclonic epilepsy is related to endophenotypes. Seizure, v.20, n.1, Jan, p.42-8, 2011.

GUILHOTO, L. M. F. F. et al. Consenso Terminológico da Associação Brasileira de Epilepsia. J Epilepsy Clin Neurophysiol, v.12, n.3, p.175-177. 2006.

GUNATILAKE, S. B. e SENEVIRATNE, S. L. Juvenile myoclonic epilepsy: a study in Sri Lanka. Seizure, v.9, n.3, Apr, p.221-3. 2000.

HALES, T. G. et al. An asymmetric contribution to gamma-aminobutyric type A receptor function of a conserved lysine within TM2-3 of alpha1, beta2, and gamma2 subunits. J Biol Chem, v.281, n.25, Jun 23, p.17034-43. 2006.

HALES, T. G. et al. The epilepsy mutation, gamma2(R43Q) disrupts a highly conserved inter-subunit contact site, perturbing the biogenesis of GABAA receptors. Mol Cell Neurosci, v.29, n.1, May, p.120-7. 2005.

HARKIN, L. A. et al. Truncation of the GABA(A)-receptor gamma2 subunit in a family with generalized epilepsy with febrile seizures plus. Am J Hum Genet, v.70, n.2, Feb, p.530-6. 2002.

HAUG, K. et al. Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. Nat Genet, v.33, n.4, Apr, p.527-32. 2003.

HAUSER, W. A. e KURLAND, L. T. The epidemiology of epilepsy in Rochester, Minnesota, 1935 through 1967. Epilepsia, v.16, n.1, Mar, p.1-66. 1975.

HEMPELMANN, A. et al. Lack of evidence of an allelic association of a functional GABRB3 exon 1a promoter polymorphism with idiopathic generalized epilepsy. Epilepsy Res, v.74, n.1, Apr, p.28-32. 2007.

HIRSCHHORN, J. N. e DALY, M. J. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. Nat Rev Genet, v.6, n.2, Feb, p.95-108. 2005.

HIRTZLIN, I. et al. An empirical survey on biobanking of human genetic material and data in six EU countries. Eur J Hum Genet, v.11, n.6, Jun, p.475-88. 2003.

IBGE. Síntese de indicadores sociais. Informação demográfica e socioeconômica. 2012 2010.

ILAE. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Epilepsia, v.30, n.4, Jul-Aug, p.389-99. 1989.

ILAE Commission Report. The epidemiology of the epilepsies: future directions. International League Against Epilepsy. Epilepsia, v.38, n.5, May, p.614-8. 1997.

IZZI, C. et al. Candidate gene analysis of the human metabotropic glutamate receptor type 4 (GRM4) in patients with juvenile myoclonic epilepsy. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, v.123B, n.1, Nov 15, p.59-63. 2003.

JALLON, P. Epilepsy and epileptic disorders, an epidemiological marker? Contribution of descriptive epidemiology. Epileptic Disord, v.4, n.1, Mar, p.1-13. 2002.

JALLON, P. e LATOUR, P. Epidemiology of idiopathic generalized epilepsies. Epilepsia, v.46 Suppl 9, p.10-4. 2005.

JANZ, D. Epilepsy with impulsive petit mal (juvenile myoclonic epilepsy). Acta Neurol Scand, v.72, n.5, Nov, p.449-59. 1985.

JANZ, D. e MATTHES, A.. Propulsive petit mal epilepsy; clinical aspects and pathogenesis of the so-called akinetic seizures, nodding convulsions and Salaam convulsions. Bibl Paediatr, v.60, p.5-60. 1955.

JAYALAKSHMI, S. S. et al. Clinical and electroencephalographic study of first-degree relatives and probands with juvenile myoclonic epilepsy. Seizure, v.15, n.3, Apr, p.177-83. 2006.

JOENSEN, P. Prevalence, incidence, and classification of epilepsy in the Faroes. Acta Neurol Scand, v.74, n.2, Aug, p.150-5. 1986.

KANANURA, C. et al. A splice-site mutation in GABRG2 associated with childhood absence epilepsy and febrile convulsions. Arch Neurol, v.59, n.7, Jul, p.1137-41. 2002.

KINIRONS, P., et al. Examining the role of common genetic variation in the gamma2 subunit of the GABA(A) receptor in epilepsy using tagging SNPs. Epilepsy Res, v.70, n.2-3, Aug, p.229-38. 2006.

KLEVELAND, G. e ENGELSEN, B. A. Juvenile myoclonic epilepsy: clinical characteristics, treatment and prognosis in a Norwegian population of patients. Seizure, v.7, n.1, Feb, p.31-8. 1998.

KUMARI, R., *et al.* Association of alpha subunit of GABAA receptor subtype gene polymorphisms with epilepsy susceptibility and drug resistance in north Indian population. Seizure, v.19, n.4, May, p.237-41. 2010.

LACHANCE-TOUCHETTE, P. *et al.* Novel alpha1 and gamma2 GABAA receptor subunit mutations in families with idiopathic generalized epilepsy. Eur J Neurosci, v.34, n.2, Jul, p.237-49. 2011.

LAYOUNI, S., *et al.* Dimorphism of TAP-1 gene in Caucasian with juvenile myoclonic epilepsy and in Tunisian with idiopathic generalized epilepsies. Int J Immunogenet, v.37, n.2, Apr, p.117-23, 2010.

LOISEAU, J. *et al.* A survey of epileptic disorders in southwest France: seizures in elderly patients. Ann Neurol, v.27, n.3, Mar, p.232-7. 1990.

LOMBROSO, C. T. Consistent EEG focalities detected in subjects with primary generalized epilepsies monitored for two decades. Epilepsia, v.38, n.7, Jul, p.797-812. 1997.

LORENZ, S. *et al.* Allelic association of a truncation mutation of the KCNMB3 gene with idiopathic generalized epilepsy. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, v.144B, n.1, Jan 5, p.10-3. 2007.

MA, S. *et al.* Mutations in GABRA1, GABRA5, GABRG2 and GABRD receptor genes are not a major factor in the pathogenesis of familial focal epilepsy preceded by febrile seizures. Neurosci Lett, v.394, n.1, Feb 6, p.74-8. 2006.

MACDONALD, R. L. e KANG, J. Q. Molecular pathology of genetic epilepsies associated with GABAA receptor subunit mutations. Epilepsy Curr, v.9, n.1, Jan-Feb, p.18-23. 2009.

MACDONALD, R. L.; KANG, J. Q.; GALLAGHER, M. J. Mutations in GABAA receptor subunits associated with genetic epilepsies. J Physiol, v.588, n.Pt 11, Jun 1, p.1861-9.2010.

MARINO JUNIOR, R.; CUKIERT, A.; PINHO, E. Aspectos epidemiológicos da epilepsia em São Paulo. Arq Neuropsiquiatr, v.44, p.243-254. 1986.

MARTINEZ-JUAREZ, I. E. *et al.* Juvenile myoclonic epilepsy subsyndromes: family studies and long-term follow-up. Brain, v.129, n.Pt 5, May, p.1269-80. 2006.

MAS, C. *et al.* Association of the connexin36 gene with juvenile myoclonic epilepsy. J Med Genet, v.41, n.7, Jul, p.e93. 2004.

MEDINA, M. T. *et al.* Novel mutations in Myoclonin1/EFHC1 in sporadic and familial juvenile myoclonic epilepsy. Neurology, v.70, n.22 Pt 2, May 27, p.2137-44. 2008.

MOLNAR, M. J. e BENCSIK, P.. Establishing a neurological-psychiatric biobank: banking, informatics, ethics. Cell Immunol, v.244, n.2, Dec, p.101-4. 2006.

MONTALENTI, E. et al. Clinical features, EEG findings and diagnostic pitfalls in juvenile myoclonic epilepsy: a series of 63 patients. J Neurol Sci, v.184, n.1, Feb 15, p.65-70. 2001.

MUHLE, H. et al. Role of GRM4 in idiopathic generalized epilepsies analysed by genetic association and sequence analysis. Epilepsy Res, v.89, n.2-3, May, p.319-26, 2010.

MURTHY, J. M.; RAO, C. M.; MEENA, A. K. Clinical observations of juvenile myoclonic epilepsy in 131 patients: a study in South India. Seizure, v.7, n.1, Feb, p.43-7. 1998.

NAKAYAMA, J. et al. Failure to find causal mutations in the GABA(A)-receptor gamma2 subunit (GABRG2) gene in Japanese febrile seizure patients. Neurosci Lett, v.343, n.2, Jun 5, p.117-20. 2003.

OBEID, T. e PANAYIOTOPOULOS, C. P. Juvenile myoclonic epilepsy: a study in Saudi Arabia. Epilepsia, v.29, n.3, May-Jun, p.280-2. 1988.

OLSEN, R. W. et al. GABA receptor function and epilepsy. Adv Neurol, v.79, p.499-510. 1999.

OTTMAN, R. Analysis of genetically complex epilepsies. Epilepsia, v.46 Suppl 10, p.7-14. 2005.

PANAYIOTOPOULOS, C. P. e OBEID, T. Juvenile myoclonic epilepsy: an autosomal recessive disease. Ann Neurol, v.25, n.5, May, p.440-3. 1989.

PANAYIOTOPOULOS, C. P.; OBEID, T.; TAHAN, A. R. Juvenile myoclonic epilepsy: a 5-year prospective study. Epilepsia, v.35, n.2, Mar-Apr, p.285-96. 1994.

PANDOLFO, M. Genetics of epilepsy. Semin Neurol, v.31, n.5, Nov, p.506-18. 2011

Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Epilepsia, v.30, n.4, Jul-Aug, p.389-99. 1989.

REID, C. A.; BERKOVIC, S. F.; PETROU, S. Mechanisms of human inherited epilepsies. Prog Neurobiol, v.87, n.1, Jan 12, p.41-57. 2009.

ROZYCKA, A.; STEINBORN, B.; TRZECIAK, W. H. The 1674+11C>T polymorphism of CHRNA4 is associated with juvenile myoclonic epilepsy. Seizure, v.18, n.8, Oct, p.601-3. 2009.

SALAM, S. M.; RAHMAN, H. M.; KARAM. R. A. GABRG2 Gene Polymorphisms in Egyptian Children with Simple Febrile Seizures. Indian J Pediatr, Oct 8 2011.

SCOTT, R. A.; LHATOO, S. D.; SANDER, J. W. The treatment of epilepsy in developing countries: where do we go from here? Bull World Health Organ, v.79, n.4, p.344-51. 2001.

- SIDENVALL, R. et al. A community-based prospective incidence study of epileptic seizures in children. Acta Paediatr, v.82, n.1, Jan, p.60-5. 1993.
- SOUSA, N. A. et al. EEG recording after sleep deprivation in a series of patients with juvenile myoclonic epilepsy. Arg Neuropsiquiatr, v.63, n.2B, Jun, p.383-8. 2005.
- STEINBERG, K. et al. DNA banking for epidemiologic studies: a review of current practices. Epidemiology, v.13, n.3, May, p.246-54. 2002.
- STEINBERG, K. K. et al. DNA banking in epidemiologic studies. Epidemiol Rev, v.19, n.1, p.156-62. 1997.
- SUZUKI, T. et al. Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. Nat Genet, v.36, n.8, Aug, p.842-9. 2004.
- TAN, N. C. e BERKOVIC, S. F. The Epilepsy Genetic Association Database (epiGAD): analysis of 165 genetic association studies, 1996-2008. Epilepsia, v.51, n.4, Apr, p.686-9. 2010
- TAN, N. C.; MULLEY, J. C.; BERKOVIC, S. F. Genetic association studies in epilepsy: "the truth is out there". Epilepsia, v.45, n.11, Nov, p.1429-42. 2004.
- THORNTON, M., *et al.* Automation and validation of DNA-banking systems. Drug Discov Today, v.10, n.20, Oct 15, p.1369-75. 2005.
- TSUBOI, T. e CHRISTIAN, W. On the genetics of the primary generalized epilepsy with sporadic myoclonias of impulsive petit mal type. A clinical and electroencephalographic study of 399 probands. Humangenetik, v.19, n.2, Jul 20, p.155-82. 1973.
- VAN ENDERT, P. M. et al. Genomic polymorphism, recombination, and linkage disequilibrium in human major histocompatibility complex-encoded antigen-processing genes. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.23, Dec 1, p.11594-7. 1992.
- VIJAI, J. et al. Clinical characteristics of a South Indian cohort of juvenile myoclonic epilepsy probands. Seizure, v.12, n.7, Oct, p.490-6. 2003.
- WALLACE, R. H. et al. Mutant GABA(A) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. Nat Genet, v.28, n.1, May, p.49-52. 2001.
- WINAWER, M. R. Phenotype definition in epilepsy. Epilepsy Behav, v.8, n.3, May, p.462-76. 2006.
- WINAWER, M. R. et al. Familial clustering of seizure types within the idiopathic generalized epilepsies. Neurology, v.65, n.4, Aug 23, p.523-8. 2005.
- WRIGHT, P. A. e WYNFORD-THOMAS, D. The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. J Pathol, v.162, n.2, Oct, p.99-117. 1990.

Apêndice 1

Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Maceió – AL, 19-11-2009

Senhor (a) Pesquisador (a), DANIEL LEITE GOES GITAI

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), em 19-11-2009, e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo nº 0900-2005-11, com parecer para o seguinte sub-projeto com protocolo 025445-2009-90 sob o título **Estudo de polimorfismos Genéticos em pacientes epiléticos do Estado de Alagoas**, vem por meio deste instrumento comunicar a aprovação do processo supra citado, com base no item VIII.13, b, da Resolução nº 196/96.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 196/96, item V.4).

É papel do(a) pesquisador(a) assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

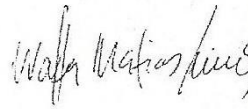
Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e sua justificativa. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o(a) pesquisador(a) ou patrocinador(a) deve enviá-los à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem incluídas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item IV. 2.e).

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos no Cronograma do Protocolo e na Res. CNS, 196/96.

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais, este Comitê coloca-se a disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra - referidas.

Esta aprovação não é válida para subprojetos oriundos do protocolo de pesquisa acima referido.

(*) Áreas temáticas especiais


 Prof. Dr. Walter Matias Lima
 Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Apêndice 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (T.C.L.E.)

Eu,, tendo sido convidad(o,a) a participar como voluntári(o,a) do estudo “Criação de banco de DNA de pacientes epiléticos e indivíduos controle atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Alagoas”, recebi do Dr. Fernando Tenório Gameleira, do Ambulatório de Epilepsia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Alagoas, responsável por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

A epilepsia é uma doença que pode ter várias causas. Uma das causas mais importantes é a genética. Doença genética é aquela que passa de pais para os filhos pelos genes. Os genes estão no DNA, que contém toda a minha informação genética, e são responsáveis pela formação e funcionamento do nosso corpo. Às vezes, têm algum fator no DNA que favorece o aparecimento de alguma doença, como a epilepsia. Como os genes estão em todo o nosso corpo, a forma mais fácil de estudá-los é através do exame de sangue.

Esse estudo se destina a guardar um pouco de sangue de pessoas que têm epilepsia e de pessoas que não têm epilepsia para depois poder estudar os genes dessas pessoas e descobrir se existe alguma diferença nos genes das pessoas que possuem epilepsia e as que não possuem epilepsia. Do sangue será obtido o DNA, que será guardado para estes estudos, criando, portanto, um banco de DNA. Isso é importante porque descobrir diferenças entre os genes de pessoas com ou sem epilepsia pode ajudar muito a, no futuro, desenvolver novas formas de tratamento e prevenção da doença. O DNA armazenado neste banco será utilizado somente para fins de pesquisa em epilepsia.

Eu participarei do estudo passando por uma consulta com perguntas sobre minha saúde e exame clínico geral e neurológico e, logo depois, um pouco do meu sangue (10 ml) será coletado através de punção com seringa descartável em veia de um de meus braços.

Atualmente, essa é a melhor maneira que a Medicina dispõe para coletar e armazenar os genes e estudar as causas genéticas da epilepsia. Como minha participação será no próprio Hospital Universitário e apenas no dia de minha consulta ou retorno normal agendado, não me trará nenhum custo adicional. Sofrerei apenas o incômodo da coleta de sangue, com leve dor local no momento da punção. A pessoa que fará a punção é um profissional treinado, todo o material utilizado será descartável, e contarei com a assistência do Dr. Fernando Tenório Gameleira em caso de necessidade.

Sempre que eu desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo. A qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo.

As informações conseguidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Endereço d(o,a) participante-voluntário,(a)

Domicílio: (rua, praça, conjunto):

Bloco: /Nº: /Complemento:

Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:

Ponto de referência:

<p>Contato de urgência: Sr(a). Domicílio: (rua, praça, conjunto): Bloco: /Nº: /Complemento: Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone: Ponto de referência:</p>

<p>Endereço d(os,as) responsável(is) pela pesquisa (OBRIGATÓRIO): Instituição: Universidade Federal de Alagoas- HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. ALBERTO ANTUNES Endereço : Av. Lourival de Melo Mota Bloco: /Nº: /Complemento: S/N Bairro: /CEP/Cidade: Tabuleiro do Martins/57.061-960/Maceió-AL Telefones p/contato: 82-xx-322-2344</p>
--

<p>ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao: Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas: Prédio da Reitoria, sala do C.O.C. , Campus A. C. Simões, Cidade Universitária Telefone: 214-1053</p>
--

Maceió,

<p>(Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) voluntário,(a) ou responsável legal - Rubricar as demais folhas)</p>	<p>Nome e Assinatura do(s) responsável(is) pelo estudo (Rubricar as demais páginas)</p>

Apêndice 3

Termo de Guarda de Material

Termo de Consentimento de Guarda de Material

Eu,, tendo sido convidad(o,a) a participar como voluntári(o,a) do estudo “Criação de banco de DNA de pacientes epilépticos e indivíduos controle atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Alagoas”, sob coordenação da professora Dra. Luciana Claudia Herculano Machado Gitaí, DOU MEU CONSENTIMENTO para a guarda de meu sangue e DNA para que possa ser utilizado em estudos referentes a pesquisa sobre bases genéticas da epilepsia. De acordo com o responsável por esta pesquisa, a minha identidade será mantida em segredo. Se houver a possibilidade de meu sangue ou DNA participar de outra pesquisa, eu serei informado antes que isso aconteça e poderei autorizar ou não.

Sempre que eu desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo. A qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo.

Endereço d(o,a) participante-voluntário,(a)

Domicílio: (rua, praça, conjunto):
 Bloco: /Nº: /Complemento:
 Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:
 Ponto de referência:

Contato de urgência: Sr(a).

Domicílio: (rua, praça, conjunto):
 Bloco: /Nº: /Complemento:
 Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:
 Ponto de referência:

Endereço d(os,as) responsável(is) pela pesquisa (OBRIGATÓRIO):

Instituição: Universidade Federal de Alagoas - Centro de Ciências Biológicas
 Endereço : Praça Afrânio Jorge
 Bloco: /Nº: /Complemento: S/N
 Bairro: /CEP/Cidade: Prado/57.010-020/Maceió-AL
 Telefones p/contato: 82-xx-3336-3444

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:

**Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas:
 Prédio da Reitoria, sala do C.O.C. , Campus A. C. Simões, Cidade Universitária
 Telefone: 214-1053**

Maceió,

(Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) voluntário,(a) ou responsável legal - Rubricar as demais folhas)	Nome e Assinatura do(s) responsável(is) pelo estudo (Rubricar as demais páginas)

Apêndice 4

Ficha de Epilepsia



FICHA DE EPILEPSIA

DATA: _____ EXAMINADOR: _____

IDENTIFICAÇÃO

COLETOU SANGUE: () 0.Não () 1.Sim [Código: _____]

EM JEJUM: () 0.Não () 1.Sim

NOME: _____

REGISTRO: _____

SEXO: () 1.M () 2.F

D.N.: _____

COR: () 0.Branco () 1.Negro () 2.Pardo () 3.Outra

IDADE: _____

ESTADO CIVIL: () 0.Solteiro () 1.Casado () 2.Divorciado () 3.Viúvo

ESCOLARIDADE: () 0. Analfabeto () 1. Apenas alfabetizado () 2. 1ª a 4ª série () 3. 5ª a 8ª série () 4. Ensino médio () 5. Ensino Superior

RENDA FAMILIAR: () 0. Sem renda fixa () 1. Até R\$ 300 () 2. R\$301 a 600 () 3. R\$601 a 900 () 4. > R\$900

Nº DE PESSOAS NA CASA: () 0. Até 2 () 1. 3 e 4 () 2. 5 e 6 () 3. Acima de 6

NATURALIDADE: _____ PROCEDÊNCIA: _____

PROFISSÃO: _____

ENDEREÇO:

FONE: _____

CARACTERÍSTICAS DAS CRISES

IDADE DE INÍCIO: _____ QUANTIDADE DE TIPOS

DE CRISES: _____

SEMIOLOGIA DAS CRISES:

[1] _____

[2] _____

[3] _____

[4] _____

SINTOMAS PREMONITÓRIOS: () 0.Não () 1.Sim _____

ESTADO DE MAL EPILÉPTICO: () 0.Não () 1.Sim _____

SITUAÇÃO ESPECÍFICA DE OCORRÊNCIA / TIPO DE CRISE:

() 1.Apenas sono / _____ () 2.Predomínio sono / _____ () 3.Ao adormecer / _____ () 4.Sono/Vigília / _____ () 5.Apenas vigília / _____ () 6.Predomínio vigília / _____ () 7.Ao acordar / _____

PADRÃO DOS EVENTOS:

() 1.Isolados () 2.Agrupados _____

FATORES DESENCADEANTES: () 0.Não () 1.Sim; caso sim:

() 1.Fadiga () 2. Álcool () 3. Privação do sono () 4.Estímulos luminosos () 5. Febre () 6.Outro _____

EVOLUÇÃO DA FREQUÊNCIA DE CRISES:

Período máximo sem crises: _____

Frequência antes do tratamento: _____

Frequência atual: _____ Dosagem de DAE: _____

CICLIO MENSTRUAL:

Relação com o ciclo menstrual: () 0.Não () 1.Sim; caso sim: () 1. Aumenta a frequência das crises () 2. Diminui a frequência das crises

GESTAÇÕES:

() 1.Em curso [Semanas de gestação: _____]

() 2.Prévia / Número de filhos: _____ Sexo/Idade: _____

Houve alteração da frequência das crises durante as gestações:

() 0. Não () 1. Sim; caso sim: () 1. Aumenta a frequência das crises () 2. Diminui a frequência das crises

DROGAS ANTI-EPILEPTICAS (DAE)

Uso **prévio** de DAE:

() 0. Não () 1. Sim; caso sim:

() 1. Ácido valpróico/Valproato () 7. Fenitoína

() 2. Carbamazepina () 8. Fenobarbital

() 3. Clobazam () 9. Gabapentina

() 4. Clonazepam () 10. Lamotrigina

() 5. Diazepam () 11. Oxcarbazepina

() 6. Etossuximida () 12. _____

Uso **atual** de DAE: () 0. Não () 1. Sim [Peso: _____]

Esquema: () 0. Monoterapia () 1. Politerapia

Comentários:

DAE atual	mg/dia	mg/kg	Posologia	Efeito adverso
() 1. Ácido Valpróico/ Valproato.				
() 2. Carbamazepina				
() 3. Clobazam				
() 4. Clonazepam				
() 5. Diazepam				
() 7. Fenitoína				
() 8. Fenobarbital				
() 10. Lamotrigina				

() 11. Oxcarbazepina				
() 12.				

ANTECEDENTES

a) PESSOAIS

Condições da gestação:

Condições do parto: () 1.Termo () 2.Pré-termo () 3.Pós-termo

() 1.Normal () 2.Fórceps () 3.Cesáreo

Intercorrências durante o parto:

Desenvolvimento neuropsicomotor:

Rendimento escolar:

Convulsão febril: () 0.Não () 1.Sim

TCE: () 0.Não () 1.Sim

Meningite: () 0.Não () 1.Sim

Doenças sistêmicas: () 0.Não () 1.Sim _____

Alcoolismo: () 0.Não () 1.Sim _____

Tabagismo: () 0.Não () 1.Sim _____

Cefaléia: 0.Não 1.Sim;

caso sim: Tipo de cefaléia:

0.Enxaqueca 1.Tensional 2. Outras

Tipo de relação: 0.Pródromo 1.Aura 2.Pós-ictal 3. Inter-ictal 4. Migralepsia

a) FAMILIARES

Doenças psiquiátricas: _____

Doenças neurológicas:

Doenças sistêmicas:

Convulsão febril:

Epilepsia: 0.Não 1.Sim; caso sim:

Número: _____

Parente atendido neste ambulatório: 0.Não 1.Sim

[Nome: _____]

Grau de parentesco: 0. Gêmeo monozigótico []

1. 1° grau (pais, filhos, irmãos, gêmeo dizigótico) []

2. 2° grau (avôs, netos, tios, sobrinhos, meio-irmãos, primos em 1° grau) []

3. 3° grau (primos em 2° grau, meio-tios, meio-sobrinhos) []

ACHADOS ANORMAIS NO EXAME FÍSICO

Geral: _____

Neurológico: _____

EXAMES COMPLEMENTARES

ELETROENCEFALOGRAMA (Data: _____
Local: _____)

Achados: _____

TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA DE CRÂNIO (Data: ____ Local: _____)

Achados: _____

RESSONÂNCIA MAGNÉTICA (Data: _____ Local: _____)

Achados: _____

VÍDEO-ELETROENCEFALOGRAMA (Data: _____ Local: _____)

Achados: _____

OUTROS: _____

CONTROLE DA DOENÇA:

- () 0. Não houve controle das crises
- () 1. Controle parcial
- () 2. Controle total

INDICAÇÃO PARA NEUROCIRURGIA:

- () 0. Não
- () 1. Sim
- () 3. Já foi submetido à cirurgia (Data: _____ / Local: _____)

Observações gerais: _____ _____ _____ _____
--

TIPOS DE CRISES**() PARCIAL SIMPLES**

() 1. Motora: () 1.1 Sem Marcha 1.2 () Com marcha () 1.3 Versiva () 1.4 Postural () 1.5 Fonatória

() 2. Somato-sensitiva () 3. Sensorial: () 3.1 Visual () 3.2 Auditiva () 3.3 Olfativa () 3.4 Gustativa () 3.5 Vertiginosa () 4. Autonômica () 5. Psíquica

() PARCIAL COMPLEXA

() 1. Sem automatismos () 2. Com automatismos

() GENERALIZADA: () 1. Primária () 2. Secundária

() 1. Tônico-clônica () 2. Tônica () 3. Clônica () 4. Mioclônica () 5. Atônica () 6. Ausência típica () 7. Ausência atípica

() NÃO ESPECIFICADAS:

() 1. Espasmos infantis () 2. Mioclono-astáticas () 3. Hemigeneralizadas

SÍNDROME EPILÉPTICA

() 1. FOCAL [_____]

() 1.1 Idiopática

() 1.2 Sintomática

() 1.3 Provavelmente sintomática

() 2. GENERALIZADA [_____]

2.1. Idiopática

2.2. Sintomática

2.3. Provavelmente sintomática

() 3. INDETERMINADA [_____]

DIAGNÓSTICO TOPOGRÁFICO

CLÍNICO:

EEG:

IMAGEM:

DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO:

DIAGNÓSTICO DEFINITIVO:
