

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

BRUNA PRISCILA DOS SANTOS

**DISTÚRBIOS DO SONO E CRNOTIPOS EM PACIENTES COM EPILEPSIA
MIOCLÔNICA JUVENIL: AVALIAÇÃO CLÍNICA E GENÉTICA**

**MACEIÓ- AL
2013**

BRUNA PRISCILA DOS SANTOS

**DISTÚRBIOS DO SONO E CRONOTIPOS EM PACIENTES COM EPILEPSIA
MIOCLÔNICA JUVENIL: AVALIAÇÃO CLÍNICA E GENÉTICA**

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
2013**

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

S237d Santos, Bruna Priscila dos.
Distúrbios do sono e cronotipos em pacientes com epilepsia mioclônica
juvenil : avaliação clínica e genética / Bruna Priscila dos Santos. – 2013.
109 f. : il.
Orientador: Daniel Leite Góes Gitaf.
Coorientadora: Lívia Leite Góes Gitaf.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de
Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2013.
Bibliografia: f. 86-106.
Apêndices: f. 107-112.
Anexos: f. 113-125.
1. Epilepsia mioclônica juvenil. 2. Sono – Distúrbios. 3. Cronotipos.
4. Estudo de associação. 5. Genes relógio. I. Título.

CDU: 616.8-009.836:575

Folha de Aprovação



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

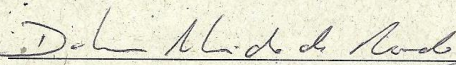
ICBS - UFAL - Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária - Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

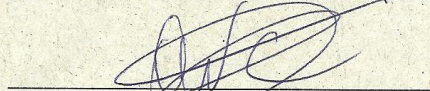
Defesa da Dissertação de Mestrado da mestranda Bruna Priscila dos Santos, intitulada: "Distúrbios do sono e cronotipos em pacientes com Epilepsia Mioclônica Juvenil: avaliação clínica e genética", orientada pelo Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitai, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 29 de agosto de 2013.

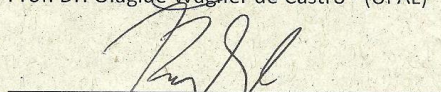
Os membros da Banca Examinadora consideraram a candidata

Aprovada

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Dalmo Almeida de Azevedo - (UFAL)


Prof. Dr. Olagide Wagner de Castro - (UFAL)


Prof. Dr. Raphael de Souza Pinto - (CESMAC)

Dedico as minhas avós, Maria do Amparo e Vandete Albuquerque (in memoriam) pelo carinho que me ofereceram e por terem me ensinado a dar valor as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

A execução deste trabalho não foi o resultado do empenho isolado de uma pessoa, mas sim a decorrência de um esforço coletivo. Assim, manifesto minha gratidão e admiração a todos que fizeram parte desta construção. E de modo especial:

A Deus, por ter me presenteado com saúde, força e perseverança, e por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho.

A meus pais, José Petrucio e Claudia Lécia, pelo amor e compreensão, sem eles eu não seria capaz de conquistar o que conquistei até hoje.

A minhas irmãs, Juliana Lécia e Lousana Lécia, pelo incentivo, carinho e compreensão. Tenho um imenso orgulho de vocês.

Meu tio Edvaldo Albuquerque, minha inspiração. Um exemplo de educador, obrigado por tudo.

A minha conquista preciosa, Raphael, por todo amor, dedicação e compreensão. Com você tudo se tornou mais fácil. Além de Cynara, Fátima e Matheus, que recarregavam minhas energias sempre.

Minha família, meu alicerce. Agradeço por compreenderem minha ausência.

Meus amigos Thalita, Maísa, Tay, Helo, Aline, Myka, Evelin, Diego, João Born, Delma (obrigado por tudo que me ensinou), João Pedro, Jordana, Isabelle, Mayara, Dandara, Rebeka e Altair, um imenso obrigado pela amizade, momentos de descontração, paciência, conselhos, companheirismo e pelas palavras de apoio e conforto durante os momentos mais difíceis.

Ao Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitaí que inspirou este projeto desde o começo, guiando meus passos e me estimulando sempre a buscar fazer o melhor. Reconheço nele um excelente orientador que soube cobrar e motivar na medida certa. Obrigado pela oportunidade concedida e pela confiança em mim depositada.

A Prof. Dra. Livia Leite Góes Gitaí pelo carinho, estímulo e orientação.

Ao Dr. Fernando Tenório Gameleira, pela atenção e colaboração. Sua participação foi essencial na inclusão dos pacientes neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade por todos os conselhos, que certamente contribuíram muito para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas da Pós-graduação em Ciências da Saúde da UFAL.

Aos pacientes.

Aos membros do Serviço de Neurologia do HUPAA-UFAL.

A Universidade Federal de Alagoas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pela oportunidade de qualificação.

“Porque cada um, independente das habilitações que tenha, ao menos uma vez na vida fez ou disse coisas muito acima da sua natureza e condição, e se a essas pessoas pudéssemos retirar do quotidiano pardo em que vão perdendo os contornos, ou elas a si próprias se retirassem de malhas e prisões, quantas mais maravilhas seriam capazes de obrar, que pedaços de conhecimento profundo poderiam comunicar, porque cada um de nós sabe infinitamente mais do que julga e cada um dos outros infinitamente mais do que neles aceitamos reconhecer.”

SARAMAGO, José. A JANGADA DE PEDRA

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

ROOSEVELT, Theodore

RESUMO

A Epilepsia Mioclônica Juvenil (EMJ) é responsável por 10% de todas as epilepsias e é a forma mais frequente de epilepsia idiopática generalizada. As manifestações surgem tipicamente na adolescência, principalmente entre 12 a 18 anos, e caracterizam-se por crises mioclônicas ao despertar associadas ou não a crises tônico-clônicas generalizadas (CTCG) e/ou crises de ausência. De acordo com observações clínicas, esta síndrome está associada com características do ciclo sono-vigília. Neste sentido, investigamos a ocorrência de distúrbios do sono e preferência circadiana em pacientes do Estado de Alagoas com diagnóstico de EMJ, buscando identificar possíveis correlações genéticas entre polimorfismos nos genes *Clock*, *Per2* e *Per3* sabidamente envolvidos na geração e regulação dos ritmos circadianos. Assim, exploramos o Banco de DNA de indivíduos com Epilepsia e controles do Estado de Alagoas para avaliar se os polimorfismos T3111C do gene *Clock*, C111G do gene *Per2* e VNTR (4 e 5 repetições) do gene *Per3* estão associados à EMJ. Para investigar o sono e preferência diurna os pacientes foram submetidos ao seguinte protocolo: aplicação do Índice de Qualidade de Sono *Pittsburgh* (IQSP), Escala de Sonolência de *Epworth* (ESE), Questionário de *Horne-Ostberg* (Cronotipo) e uma entrevista clínica sobre a presença de critérios clínicos dos principais distúrbios. A genotipagem dos pacientes e controles foi realizada através de PCR e/ou PCR-RFLP. Análises clínicas, realizadas em 74 pacientes e 76 controles, detectaram alterações no sono dos pacientes como: insônia ($p < 0,001$), má qualidade do sono ($p = 0,006$), roncos moderados e graves ($p = 0,012$), cansaço ao acordar ($p = 0,007$) e cefaleia matinal ($p = 0,008$). Os pacientes também apresentaram associação à preferência diurna vespertina (0,021). Quanto à análise genética, 97 pacientes e 212 indivíduos controle foram genotipados para cada polimorfismo estudado. Nenhuma associação foi detectada entre os polimorfismos do gene *Per2* ($p = 0,60$), *Per3* ($p = 0,94$) e *Clock* ($p = 0,15$) e a EMJ, tanto em análise individual quanto em interação ($p = 0,67$). Portanto, este estudo sugere que os pacientes com EMJ possuem uma maior prevalência de distúrbios do sono e apresentam tendência a vespertinidade em suas atividades diárias. Além disso, sugerimos que os polimorfismos estudados não estão associados à EMJ na população Alagoana, mas que possivelmente estejam associados à preferência diurna na população geral.

Palavras-chave: Epilepsia Mioclônica Juvenil. Sono – Distúrbios. Cronotipos. Estudo de associação. Genes relógio.

ABSTRACT

Juvenile myoclonic epilepsy (JME) is responsible for 10% of all epilepsies and is the most common form of idiopathic generalized epilepsy. Symptoms typically emerge in adolescence, especially between 12-18 years and are characterized by myoclonic seizures on awakening associated or not with tonic-clonic (CTCG) and / or absence seizures. According to clinical observations, this syndrome is associated with characteristics of the sleep-wake cycle. Therefore, we investigated the occurrence of sleep disorders and circadian preference in patients from the State of Alagoas diagnosed with JME, seeking to identify possible correlations between genetic polymorphisms in the genes *Clock*, *Per2* and *Per3* known to be involved in the generation and regulation of circadian rhythms. Thus, we explored the DNA bank of patients with epilepsy and controls from the state of Alagoas to evaluate if the gene polymorphisms T3111C in *Clock*, C111G in *Per2* gene and VNTR (4 and 5 repetitions) in *Per3* gene are associated with JME. To investigate sleep and diurnal preference patients were submitted to the following protocol: application of Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI), Epworth Sleepiness Scale (ESS), Morningness-Eveningness Questionnaire (MEQ) and a clinical interview about the presence of clinical criteria for the most important disturbances. Genotyping of patients and controls was performed by PCR and / or PCR-RFLP. Clinical analysis, performed in 74 patients and 76 controls, detected changes in patients' sleep as: insomnia ($p < 0,001$), poor sleep quality ($p = 0,006$), moderate and severe snoring ($p = 0,012$), tiredness on waking ($p = 0,007$) and morning headache ($p = 0,008$). Patients also were associated with diurnal evening preference ($p=0,021$). As for genetic analysis, 97 patients and 212 control subjects were genotyped for each polymorphism. No association was found between polymorphisms of *Per2* ($p = 0,60$), *Per3* (0,94) and *Clock* ($p=0,15$) genes and JME, both individually and in interaction analysis ($p = 0,67$). Therefore, this study suggests that patients with JME have a higher prevalence of sleep disturbances and have a tendency to eveningness. Moreover, we suggest that the studied polymorphisms are not associated with JME in the patients from Alagoas, but are possibly associated with diurnal preference in the general population.

Keywords: Juvenile Myoclonic Epilepsy. Sleep - Disorders. Chronotypes. Association study. *Clock* genes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	A maquinaria molecular básica do relógio biológico consiste em alças de retroalimentação negativa e positiva	33
Figura 2 -	Representação esquemática do delineamento experimental	41
Figura 3 -	Perfil eletroforético do DNA genômico de 12 amostras provenientes de pacientes com EMJ	44
Figura 4 -	Produtos de amplificação do fragmento do gene <i>Clock</i> que contém o polimorfismo T3111C	47
Figura 5 -	Produtos de amplificação do fragmento do gene <i>Per2</i> que contém o polimorfismo C111G	48
Figura 6 -	Produtos de amplificação do fragmento do gene <i>Per3</i> que contém o polimorfismo VNTR (4 e 5 repetições).....	48
Figura 7 -	Perfil de restrição dos produtos de PCR referentes ao fragmento do gene <i>Clock</i>	51
Figura 8 -	Perfil de restrição dos produtos de PCR referentes ao fragmento do gene <i>Per2</i>	51
Figura 9 -	Resumo das etapas envolvidas na execução do método de MDR	53
Figura 10 -	Gráficos com análises de distribuição dos dados para idade e escore do questionário de Horne-Ostberg, para o grupo de pacientes (n=74) e controles (n=76)	62
Figura 11 -	Gráficos com análises de distribuição dos dados para idade e escore do grupo de pacientes (n=75) e indivíduos controles (n=116) que responderam ao questionário HO	71

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição da preferência diurna entre pacientes e controles	63
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Polimorfismos analisados para os genes <i>Clock</i> , <i>Per2</i> e <i>Per3</i>	45
Tabela 2 -	Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação dos fragmentos genômicos contendo os polimorfismos de interesse	45
Tabela 3 -	Condições para amplificação dos fragmentos genômicos de interesse	46
Tabela 4 -	Condições da reação de restrição para os diferentes produtos de amplificação	49
Tabela 5 -	Composição da reação de restrição usando as enzimas de restrição SduI e HpyCH4V para determinação do genótipo dos genes <i>Clock</i> e <i>Per2</i> , respectivamente	49
Tabela 6 -	Critérios para genotipagem com base no perfil eletroforético após a PCR ou PCR-RFLP	50
Tabela 7 -	Dados sócio-demográficos dos pacientes e controles	55
Tabela 8 -	Perfil clínico de todos os pacientes com EMJ e em monoterapia com VPA..	56
Tabela 9 -	Distúrbios do sono em pacientes e controles, considerados a partir das respostas obtidas através do protocolo do sono.....	57
Tabela 10 -	Características sobre a quantidade de sono dos pacientes e controles.....	58
Tabela 11 -	Comparação do IQSP e ESE entre pacientes e controles	58
Tabela 12 -	Dados sócio-demográficos dos pacientes em monoterapia com VPA e controles	59
Tabela 13 -	Características habituais do sono dos pacientes em monoterapia com VPA e indivíduos controles	60
Tabela 14 -	Distúrbios do sono em pacientes em monoterapia com VPA e controles, considerados a partir das respostas da aplicação do protocolo do sono.....	60
Tabela 15 -	Comparação do IQSP e ESE entre pacientes em uso de monoterapia com VPA e controles	61
Tabela 16 -	Distribuição da preferência diurna entre pacientes e controles	63
Tabela 17 -	Dados sócio-demográficos e média do escore do HO para os grupos analisados	64
Tabela 18 -	Frequências alélicas e genotípicas para o VNTR (4 e 5 repetições) do gene	

	<i>Per3</i> , para cada grupo analisado (n=309)	65
Tabela 19 -	Teste de equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> (n=309) para o polimorfismo VNTR (4 e 5 repetições) do gene <i>Per3</i>	65
Tabela 20 -	Análise comparativa entre as frequências genotípicas obtidas do polimorfismo VNTR (4 e 5 repetições) do gene <i>Per3</i> , para os grupos de pacientes e controles da população alagoana (n=309, análise ajustada para sexo + etnia)	66
Tabela 21 -	Frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo C111G do gene <i>Per2</i> , para cada grupo analisado (n=309)	66
Tabela 22 -	Teste de equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> (n=309) para o polimorfismo C111G do gene <i>Per2</i>	67
Tabela 23 -	Análise comparativa entre as frequências genotípicas obtidas para o polimorfismo C111G do gene <i>Per2</i> , para os grupos de pacientes e controles da população alagoana (n=309, análise ajustada para sexo + etnia)	67
Tabela 24 -	Frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo T3111C na região 3'UTR do gene <i>Clock</i> , para cada grupo analisado.....	68
Tabela 25 -	Teste de equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> (n=309) para o polimorfismo T3111C do gene <i>Clock</i>	68
Tabela 26 -	Análise comparativa entre as frequências genotípicas do polimorfismo T3111C do gene <i>Clock</i> , para os grupos de pacientes e controles da população alagoana e os grupos com epilepsia e controle da população alagoana (n=309, análise ajustada para sexo + etnia)	69
Tabela 27 -	Análise do MDR para os polimorfismos	70
Tabela 28 -	Perfil circadiano e dados demográficos para os grupos analisados	70
Tabela 29 -	Análises estatísticas para idade, sexo e média do escore do Questionário de <i>Horne-Ostberg</i> , entre pacientes e controles	72
Tabela 30 -	Distribuição das frequências alélicas e genotípicas nos grupos de pacientes, controles e preferências diurnas para os três polimorfismos estudados	73
Tabela 31 -	Análises comparativas das frequências genotípicas dos polimorfismos entre os grupos Matutino (59), Vespertino (n=18) e Intermediário (n=92) para o grupo total de indivíduos (pacientes e controles) (n= 191, análises ajustadas para sexo e etnia)	74
Tabela 32 -	Análises comparativas das frequências genotípicas dos polimorfismos entre os grupos Matutino (n=15), Vespertino (n=22) e Intermediário (n=38) apenas para o grupo de pacientes (n= 75, análises ajustadas para sexo e	

etnia)	75
Tabela 33 - Análises comparativas das frequências genotípicas dos polimorfismos entre os grupos Matutino (n=44), Vespertino (n=18) e Intermediário (n=54) apenas para o grupo controle (n= 116, análises ajustadas para sexo e etnia)	76
Tabela 34 - Análises comparativas entre endofenótipos apresentados pelos pacientes com EMJ (n=74) e frequências genotípicas para os polimorfismos estudados	77

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	<i>Loci</i> cromossômicos e genes identificados em EMJ.....	30
Quadro 2 -	Estudos de associação com EMJ disponíveis no epiGAD.....	31

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

Asp	Ácido Aspártico
BRD2	<i>bromodomain containing 2</i>
BMAL1	brain and muscle-Arnt-like protein-1
CACNB4	<i>Calcium channel beta 4</i>
CASR	<i>calcium-sensing receptor</i>
CCG	<i>clock-controlled gene</i>
CIA	Critério de informação de Akaike
CIB	Critério de Informação Bayesiano
CIDS-2	<i>Classificação Internacional dos distúrbios do sono – 2ª edição</i>
CHRNA4	<i>cholinergic receptor, nicotinic, alpha 4 (neuronal)</i>
Clock	<i>Circadian locomotor output cycles kaput</i>
CTCG	Crises Tônico-Clônicas Generalizadas
CLCN2	<i>Chloride channel protein 2</i>
CNS	Conselho Nacional de Saúde
Cry1	<i>Cryptochrome1</i>
Cry2	<i>Cryptochrome2</i>
CVC	<i>cross validation consistency</i>
CX36	<i>Connexin 36</i>
DAE	Droga Anti-Epiléptica
DAM	Dieta de Atikins
DBP	<i>D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein</i>
DC	Dieta cetogênica
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DE	Descargas epileptiformes
dNTP	<i>deoxyribonucleotide triphosphates</i>
EEG	Eletroencefalograma
EFHC1	<i>EF-hand domain-containing protein 1</i>
EFHC2	<i>EF-hand domain-containing protein 2</i>
EGI	Epilepsia Generalizada Idiopática
EMJ	Epilepsia Mioclônica Juvenil.
ELF	Epilepsia do Lobo Frontal
ELT	Epilepsia do Lobo Temporal
epiGAD	<i>Epilepsy Genetic Association Database</i>

ENV	Estimulação do nervo vago
ESSE	Escala de Sonolência de <i>Epworth</i>
FAPEAL	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas
FG1	<i>lysis buffer</i>
FG2	<i>denaturation buffer</i>
FG3	<i>hydration buffer</i>
GABRA1	<i>gamma-aminobutyric acid A receptor alpha 1</i>
GABRD	<i>gamma-aminobutyric acid receptor subunit delta</i>
GABRA5	<i>gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-5</i>
GABRB2	<i>gamma-aminobutyric acid A receptor beta 2</i>
Gly	<i>Glicina</i>
GRM4	<i>glutamate receptor, metabotropic 4</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HLF	<i>hepatic leukemia fator</i>
HO	Questionário Horne-Ostberg
HPP	Hiperidrose palmoplantar primária
HUPAA	Hospital Universitário Professor Alberto Antunes
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
Ile	Isoleucina
IMC	Índice de Massa Corpórea
IQSP	Índice de Qualidade de Sono de <i>Pittsburgh</i>
JRK	<i>jerky protein homolog</i>
LB	<i>Loading buffer</i>
LEV	Levetiracetam
LTG	Lamotrigina
MDR	<i>Multifactor Dimensionality Reduction</i>
ME2	<i>malic enzyme 2</i>
MEQ	<i>Morningness–eveningness Questionnaire</i>
NREM	<i>Non rapid eye movement</i>
NSQ	Núcleo supraquiasmático
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
PAR bZIP	<i>PAR subfamily of mammalian bZIP transcription</i>
Per2	<i>Period2</i>
Per3	<i>Period3</i>

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PPR	<i>photoparoxysmal response</i>
Rev-erb	<i>nuclear receptor Rev-ErbA-alpha</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RORA	<i>RAR-related orphan receptor A</i>
REM	<i>Rapid Eye Movement</i>
RNA_m	RNA Mensageiro
SFAS	Síndrome da Fase Atrasada do Sono
SFAVS	Síndrome da Fase Avançada do Sono
SDE	Sonolência diurna excessiva
SNC	Sistema Nervoso Central
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SPI	Síndrome das Pernas Inquietas
TAP-1	<i>transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)</i>
TBE	<i>Tris/Borate/EDTA</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEF	<i>hepatic leukemia fator</i>
TPM	Topiramato
Val	Valina
VNTR	<i>Variable Number Tandem Repeat</i>
VPA	Valproato de sódio
ZNS	Zanisamida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Epilepsia Mioclônica Juvenil	21
2.1.1	Definição	21
2.1.2	Epidemiologia	21
2.1.3	Fatores clínicos, diagnóstico e tratamento	22
2.2	EMJ e comorbidades	25
2.3	EMJ e distúrbios do sono	25
2.4	EMJ e ritmo circadiano	27
2.5	Aspectos genéticos da EMJ	28
2.6	Os genes relógio	32
2.6.1	Gene <i>Clock</i> (OMIM 601851)	34
2.6.2	Gene <i>Per2</i> (OMIM 603426)	35
2.6.3	Gene <i>Per3</i> (OMIM 603427)	36
3	OBJETIVOS	38
3.1	Geral	38
3.2	Específicos	38
4	METODOLOGIA	39
4.1	Delineamento	39
4.2	Pacientes e controles	39
4.3	Aspectos éticos	40
4.4	Procedimentos	40
4.4.1	Avaliação clínica	40
4.4.1.1	Instrumentos	42
4.4.1.1.1	Ficha clínica sobre distúrbios do sono	42
4.4.1.1.2	Escala de Sonolência de <i>Epworth</i> (ESE-BR)	42
4.4.1.1.3	Índice de qualidade do sono de <i>Pittsburgh</i> (IQSP-BR)	42
4.4.1.1.4	Questionário de matutuidade/vespertinidade de <i>Horne-Ostberg</i>	42
4.4.2	Avaliação Genética	43
4.4.2.1	Extração de DNA genômico	43
4.4.2.1.1	Visualização do material genético extraído	44
4.4.2.2	Reações de PCR	45
4.4.2.2.1	Visualização dos produtos de PCR	46
4.4.2.3	Reações de restrição	49
4.4.2.3.1	Visualização dos produtos das reações de restrição	50
4.4.2.4	Genotipagem	50
4.5	Análises estatísticas	52
4.5.1	Dados clínicos	52
4.5.2	Dados genéticos	52
4.5.2.1	Análise por MDR (<i>Multifactor Dimensionality Reduction</i>)	53
5	RESULTADOS	55
5.1	Avaliação Clínica	55
5.1.1	Perfil clínico dos pacientes e indivíduos controles	55
5.1.2	Avaliação dos Distúrbios do sono para pacientes e controles	56
5.1.3	Perfil clínico dos pacientes em monoterapia apenas com VPA e controles	58
5.1.4	Avaliação da preferência diurna entre pacientes e controles	61
5.2	Análise genética	64

5.2.1	Genotipagem dos indivíduos quanto ao polimorfismo VNTR do gene <i>Per3</i> ..	65
5.2.2	Genotipagem dos indivíduos quanto ao polimorfismo C111G do gene <i>Per2</i> .	66
5.2.3	Genotipagem dos indivíduos quanto ao polimorfismo T3111G do gene <i>Clock</i>	68
5.2.4	Análise de interação entre os três polimorfismos pelo método MDR	69
5.2.5	Análises comparativas entre cronotipos e frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos estudados nos grupos de pacientes e controles	70
5.2.6	Análise de endofenótipos com os polimorfismos estudados	76
6	DISCUSSÃO	78
6.1	Perfil clínico dos pacientes	78
6.2	Distúrbios do sono em pacientes com EMJ	78
6.3	Perfil diurno dos pacientes com EMJ	80
6.4	Análise genética	81
	CONCLUSÃO	85
	REFERÊNCIAS	86
	APÊNDICES	107
	ANEXOS	113

1 INTRODUÇÃO

A epilepsia é um distúrbio causado pela predisposição persistente do cérebro a gerar crises epiléticas e por suas consequências neurobiológicas, cognitivas e psicossociais. As crises epiléticas refletem atividade elétrica neuronal hipersincrônica e paroxística que pode ser decorrente de várias patologias estruturais ou neuroquímicas (GITAI et al., 2008). Devido a sua natureza complexa e multifatorial, a epilepsia apresenta diferentes etiologias, sejam associadas a lesões cerebrais específicas, como no caso das epilepsias sintomáticas; ou a alterações genéticas, como as epilepsias idiopáticas (CHANG, 2003; FICHER et al., 2005).

A epilepsia mioclônica juvenil (EMJ) é o tipo mais comum de epilepsia generalizada idiopática (EGI) e representa cerca de 10% de todas as epilepsias. As manifestações surgem tipicamente na adolescência, principalmente entre 12 a 18 anos, e caracterizam-se por crises mioclônicas ao despertar associadas ou não a crises tônico-clônicas generalizadas (CTCG) e/ou crises de ausência. Além disso, as crises apresentam uma distribuição diurna e possuem como principal fator precipitante a privação do sono, revelando influência do ciclo sono-vigília (PEDERSEN; PETERSEN, 1998; ZAROWSKI et al., 2011, PUNG; SCHMITZ, 2006; HOFSTRA et al., 2010; RENGANATHAN; DELANTY, 2003; BEGHI et al., 2006).

Apesar da influência do ciclo sono-vigília observado em pacientes com EMJ, apenas recentemente, três grupos de pesquisadores buscaram identificar sistematicamente, através de questionários esta relação entre sono e epilepsia (PUNG; SCHMITZ, 2006; HOFSTRA et al., 2010; KRISHNAN et al., 2012; RAMACHANDRAIAH et al., 2012). Conhecer a relação entre ciclo sono-vigília, do ponto de vista clínico e molecular, pode contribuir para otimizar o diagnóstico e possibilitar o tratamento, melhorando as condições de saúde e qualidade de vida dos pacientes com EMJ.

Assim, a proposta deste estudo foi avaliar a presença de distúrbios do sono e preferência diurna (cronotipo) em pacientes com EMJ do Estado de Alagoas, investigando se polimorfismos (T3111C no gene *Clock*, C111G no gene *Per2* e VNTR de 4 e 5 repetições no gene *Per3*) presentes em diferentes genes que atuam na geração e regulação dos ritmos circadianos estão associados a EMJ ou a endofenótipos apresentados por estes pacientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epilepsia Mioclônica Juvenil

2.1.1 Definição

A primeira descrição precisa da EMJ foi realizada por Janz e Christian (1957), ao publicaram suas observações clínicas e eletroencefalográficas sobre 47 pacientes, e que atribuíram-lhe o nome de "pequeno mal impulsivo". O termo "impulsivo" foi um tributo a Herpin que, no tratado sobre "crises epiléticas incompletas" publicado em 1867, descreveu casos clínicos típicos de EMJ. Após o trabalho de Janz e Christian, seguiram-se várias publicações de séries de casos até que, em 1975, Lund introduziu o termo "epilepsia mioclônica juvenil" e, em 1989, a *International League Against Epilepsy* (ILAE) a inseriu no sistema internacional de classificação das síndromes epiléticas, onde permanece como uma síndrome bem definida (RENGANATHAN; DELANTY, 2003; CAVAZOS, 2007; THOMAS et al., 2002).

A Comissão de Classificação e Terminologia da ILAE (1989) classificou a EMJ como uma EGI sob a seguinte definição: A EMJ inicia em torno da puberdade e caracteriza-se por abalos mioclônicos bilaterais, únicos ou repetidos, arrítmicos e irregulares predominantes nos membros superiores. Os abalos podem provocar queda súbita em alguns pacientes. Não se associam a alterações da consciência. O distúrbio pode ser hereditário e tem distribuição igual entre os sexos. Comumente, há crises tônico-clônicas generalizadas e, menos frequentemente, crises de ausência. Geralmente as crises ocorrem após o despertar e são frequentemente precipitadas pela privação do sono. O eletroencefalograma (EEG) ictal e interictal apresentam surtos breves de ponta-onda e poliponta-onda, generalizadas e irregulares. Os pacientes são frequentemente fotossensíveis e possuem boa resposta aos medicamentos (ILAE, 1989).

2.1.2 Epidemiologia

Com prevalência de 5% a 10% de todos os casos de epilepsia, a EMJ representa a forma mais comum de EGI, correspondendo a cerca de 26% dos casos (JALLON; LATOUR, 2005; MARTINEZ-JUAREZ et al, 2006; GUARANHA et al, 2011). A incidência tem sido estimada em torno de 1 a cada 100.000 indivíduos, enquanto que a prevalência varia entre 10 e 20 a cada 100.000 (LOISEAU et al., 1990; JOENSEN, 1986; SIDENVALL et al., 1993;

HAUSER; KURLAND, 1975; JALLON; LATOUR, 2005). No entanto, devido aos atrasos frequentes no diagnóstico e não reconhecimento dos sintomas, a síndrome pode ser subdiagnosticada e os números descritos subestimados (THOMAS et al., 2002; JALLON; LATOUR, 2005; ZIFKIN, 2005). Alguns estudos têm demonstrado prevalência semelhante entre homens e mulheres (DELGADO-ESCUETA et al., 1984; JANZ, 1985; PANYIOTOPOULOS et al., 1994; JAYALAKSHMI et al., 2006) entretanto, outros demonstram maior prevalência em mulheres (GELISSE et al., 2001; PRASAD et al., 2003; MONTALENTI et al., 2001).

No Brasil, há poucos estudos que revelam o perfil epidemiológico da EMJ. Em Santa Catarina, Tensini (2007) analisou os registros médicos de pacientes atendidos no ambulatório de Neurologia do Hospital Santa Teresa em São Pedro de Alcântara (HST) entre 1986 e 2007 e observou que dos 1657 prontuários relatando diagnóstico de epilepsia, 72 (4,35%) correspondiam a EMJ. Figueredo et al. (1999) relataram uma prevalência de 2,8% também em Santa Catarina. Em Alagoas, ainda não existem dados epidemiológicos sobre EMJ, há apenas um estudo epidemiológico, que mostra a prevalência das epilepsias em geral na cidade de Maceió, 2,42% (CALVANO et al., 2010).

2.1.3 Fatores clínicos, diagnóstico e tratamento

As manifestações clínicas da EMJ surgem tipicamente na adolescência e caracterizam-se por crises mioclônicas ao despertar associadas ou não a CTCG e/ou crises de ausência (MONTALENTI et al., 2001; RENGANATHAN; DELANTY, 2003;). A idade de início é relatada entre 12-18, com média de 15 anos (MURTHY et al., 1998; ATAKLI et al., 1998 ; GELISSE et al., 2001; BEGHI et al., 2006).

As crises mioclônicas ocorrem em todos os casos e é a condição mais importante no diagnóstico. As mioclonias são caracterizadas por curtas contrações musculares, bilaterais e geralmente simétricas envolvendo os ombros e braços. Ocorrem após o despertar (geralmente entre 30 min a 1 h). O paciente mantém a consciência e, às vezes, as crises mioclônicas são percebidas apenas como uma sensação de “choque elétrico” no interior do corpo (MANTOAN; WALKER, 2011).

As CTCG acometem cerca de 90 a 95% dos pacientes com EMJ (MONTALENTI et al., 2001; PANAYIOTOPOULOS et al., 1991; MURTHY et al., 1998; ATAKLI et al., 1998). São frequentemente caracterizadas pela falta de aura sensorial, pela simetria e longa duração da fase tônica. Ocorrem predominantemente após o despertar e podem ser precedidas por

várias mioclonias (MANTOAN; WALKER, 2011; RENGANATHAN; DELANTY, 2003). Como são as crises mais facilmente reconhecidas, normalmente, somente quando ocorre uma CTCG o diagnóstico e o tratamento são iniciados em indivíduos com EMJ.

Crises de ausência ocorrem em 10 a 40% dos pacientes. Estes ataques são pouco frequentes, breves e não associado a automatismos, podendo ocorrer várias vezes ao dia e sem predomínio de horário (JANZ, 1985; OBEID; PANAYIOTOPOULOS, 1988; KLEVELAND; ENGELSEN, 1998; MURTHY et al., 1998; MONTALENTI et al., 2001; VIJAI et al., 2003).

Os fatores precipitantes das crises características da EMJ são normalmente privação do sono, fadiga, ingestão excessiva de álcool, stress emocional, fotoestimulação e menstruação (MARTINOVIC, 2001; MONTALENTI et al., 2001; SOKIC et al., 2007; GUARANHA et al., 2011). As crises mostram um predomínio de horário tipicamente relacionado ao despertar, uma das características clínicas mais importantes da EMJ. Observada desde a primeira descrição por Janz e Christian (1957) e mais tarde por Touchon et al. (1982), onde notaram a ocorrência de um pico de crises ao despertar e outro no período vespertino (MOSCHETTA, 2010).

O diagnóstico desta patologia é classicamente baseado nas características clínicas das crises e aspectos eletroencefalográficos. O EEG com privação do sono é normalmente utilizado para confirmar o diagnóstico clínico, com registro mais prolongado que o habitual do período seguinte ao despertar e com procedimentos ativadores, como hiperventilação e estimulação luminosa (CAVAZOS, 2007; LABATE et al., 2007). No entanto, o EEG de rotina pode ser normal em até 70% dos casos, enquanto o restante dos pacientes apresentam anormalidades focais no EEG. (GENTON et al., 1995; MONTALENTI et al., 2000; DHANUKA et al., 2001; SOUSA et al., 2005; JALLON; LATOUR, 2005; ZIFKIN, 2005). As falhas em obter uma história de mioclonias e a presença de componente epileptiforme focal no EEG conduzem frequentemente a um diagnóstico equivocado de epilepsia focal (MANTOAN; WALKER, 2011)

O tratamento consiste em drogas antiepilépticas (DAE) que geralmente são administradas por toda a vida do paciente (MOTIKA; BERGEN, 2010). Aproximadamente 90% dos pacientes com EMJ respondem apropriadamente ao tratamento com DAEs e permanecem sem crises, embora 10% deles sejam intratáveis. Valproato de sódio (VPA), levetiracetam (LEV), topiramato (TPM), lamotrigina (LTG) e zonisamida (ZNS) são usados como primeira linha terapêutica para o tratamento deste tipo de epilepsia (AFRA; ADAMOLEKUN, 2012).

A monoterapia com VPA tem boa resposta no tratamento da EMJ (CALLEJA et al., 2001; AUVIN, 2008; MARSON et al., 2007). Este medicamento controla todas as crises em até 97% dos pacientes (JANZ; DURNER, 1997; PANAYIOTOPOULOS, 1997; JANZ, 2000). Os efeitos colaterais mais comuns para o uso desta medicação são: tremores, queda de cabelo, ganho de peso e irregularidades menstruais. Além disso, está relacionado a malformações fetais, principalmente na formação do tubo neural, quando administrados em gestantes (SUNDQVIST, 1990; BATTINO; TONSOM, 2007; AUVIN 2008, HARDEN et al., 2009;). As DAEs também podem exercer diversos efeitos indesejáveis sobre o sono (BAZIL, 2003). Para o VPA, a maioria dos estudos mostra efeitos nulos ou leves sobre os padrões de sono e nenhuma mudança no tempo de sono quando administrado em doses terapêuticas (SCHMITT et al., 2009).

Os dados existentes sugerem uma condição permanente ao tratamento, pois a retirada da DAE leva a recorrência das crises, embora alguns pacientes apresentem períodos longos de remissão ou melhora das crises com a idade (GENTON et al., 1995; MANTOAN; WALKER, 2011).

Além do tratamento com DAEs, vários estudos têm demonstrado outras opções de tratamento para as EGI refratárias, como: dieta, estilo de vida, procedimento intervencionistas (estimulação do nervo vago), cirurgia e terapias emergentes como a estimulação cerebral profunda (MANTOAN; WALKER, 2011).

A dieta cetogênica (DC) e a dieta de Atkins modificada (DAM) têm sido relatadas como eficazes no tratamento de EIG de difícil controle, sendo utilizada cada vez mais em adolescentes e adultos. Após um mês de uso da DAM, pacientes com EMJ resistente aos medicamentos, relataram diminuição em mais de 50% na frequência das crises (KOSSOFF et al., 2012; THAMMONGKOL et al., 2012).

O estilo de vida dos pacientes com EMJ é um aspecto fundamental, pois muitos podem sofrer crises se expostos a fatores precipitantes como: privação do sono, ingestão de álcool, fotossensibilidade, estresse entre outros. O aconselhamento adequado pode melhorar o controle das crises e evitar a necessidade de aumentar a medicação. (MANTOAN; WALKER, 2011).

Além disso, alguns procedimentos intervencionistas têm sido citados como possíveis alternativas para o tratamento de pacientes com EMJ refratários as DAEs. A estimulação do nervo vago (ENV) que reduz a frequência de crise mioclonicas, em pacientes com EGI refratária (KOSTOV et al., 2007) e procedimentos paliativos como calosotomia, que tem sido utilizada apenas em pacientes com graves epilepsias sintomáticas com tipos de crises

múltiplas, devendo ser uma opção de última escolha (JENSSEN et al., 2006; NEI et al., 2007; GREWAL et al., 2007).

2.2 EMJ e comorbidades

A EMJ tem sido frequentemente associada a um bom prognóstico e as comorbidades não são comuns, no entanto alguns estudos têm demonstrado a ocorrência simultânea com outras doenças. Janz e Christian, em 1957, já relatavam alterações na personalidade destes pacientes, confirmadas mais tarde por outros estudos (REINTOFT et al., 1976; PERINI et al., 1996). Devinsky et al. (1997) sugeriram que a EMJ não é uma condição benigna e que déficits frontais adaptativos podem ter consequências comportamentais sugestivas de disfunção de personalidade. Outros pesquisadores também observaram desordens psiquiátricas e de personalidade em pacientes com EMJ (GELISSE et al., 2000, 2001, 2007; TRINKA et al., 2006; FILHO et al., 2008, 2011; MOSCHETTA; VALENTE, 2013).

Outra condição relatada em alguns estudos é a enxaqueca, sugerindo mecanismo fisiopatológico em comum com a EMJ (SCHANKIN et al., 2011; KELLEY et al., 2012; KASTELEIJN-NOLST et al., 2013). Katshu et al. (2011), relataram pela primeira vez um dado interessante de Hiperidrose palmoplantar primária (HPP), uma disfunção da transpiração com causa emocional, sugerindo ainda que a co-ocorrência de HPP e EMJ parece ter uma associação com alguns mecanismos comuns do lobo frontal que precisam ser melhor explorados.

A EMJ desde sua primeira descrição apresenta relação com alterações no sono como fator precipitante para suas crises. Contudo, apenas recentemente foi demonstrado distúrbios do sono em comorbidade com EMJ (KRISHNAN et al., 2011; RAMACHANDRAIAH et al., 2012).

2.3 EMJ e distúrbios do sono

Distúrbios do sono são descritos em pacientes com epilepsia e podem contribuir para sua intratabilidade (FOLDVARY-SCHAEFER; GRIGG-DAMBERGER, 2006). Sono e epilepsia possuem uma complexa relação fisiopatológica. O sono quando adequado possui papel protetor na ocorrência das crises da epilepsia. No entanto, quando ocorrem alterações no sono as crises podem ser precipitadas. Da mesma forma, a ocorrência das crises pode provocar alterações no sono. Sono inadequado ou insuficiente é comum em pessoas com

epilepsia e pode exacerbar SDE, causar déficits de memória, contribuir para refratariedade ao tratamento e pior qualidade de vida (BAZIL et al., 2000; BAZIL, 2003; KRISHNAN et al., 2012).

São vários os mecanismos perturbadores do sono nesses pacientes. O efeito direto das crises na arquitetura do sono, a má qualidade de sono exacerbando a frequência das crises, além dos efeitos das DAEs sobre o sono, independente da sua ação no controle das crises (BAZIL; WALCZAK, 1997; CRESPEL; BALDY-MOULINIER; COUBES, 1998; HERMAN; WALCZAK; BAZIL, 2001; BAZIL, 2003).

De fato, as drogas frequentemente usadas para o tratamento da epilepsia causam efeitos deletérios no sono, como: diminuição da latência do sono, da quantidade de sono REM e N-REM, além de aumentar a sonolência diurna (BAZIL, 2003). No entanto, o VPA, medicamento mais indicado para tratamento da EMJ, tem pouco ou nenhum efeito sobre a arquitetura do sono, de acordo com os dados existentes na literatura (ALMEIDA et al., 2003; KRISHNAN et al., 2012).

Na EMJ são bem estabelecidos o papel da privação de sono como fator precipitante de crises e predomínio de horário das crises (PEDERSEN; PETERSEN, 1998; ZAROWSKI et al., 2011). Apesar da ligação da EMJ com alterações no ciclo sono-vigília, relatadas desde sua primeira descrição, alguns estudos objetivaram caracterizar melhor e elucidar os mecanismos envolvidos nesta relação (PUNG; SCHMITZ, 2006; HOFSTRA et al., 2010; GIGLI et al., 1992; BONAKIS; KOUTROUMANIDIS, 2009; KRISHNAN et al., 2012; RAMACHANDRAIAH et al., 2012).

Vários instrumentos têm sido padronizados para otimizar o diagnóstico de distúrbios do sono. A escala de sonolência de *Epworth* (ESE) é um questionário autoaplicável no qual ao graduar sua probabilidade de adormecer em oito situações corriqueiras durante o período diurno, o paciente obtém um escore de 0 a 24. Escores superiores a 10 sugerem SDE. O Índice de Qualidade de Sono de *Pittsburgh* (IQSP) avalia a qualidade do sono no último mês, classificando os indivíduos como “bons e maus dormidores”. Recentemente, esses instrumentos foram validados para o português falado no Brasil (BERTOLAZI, 2009, 2011). Neste último ano, estes questionários foram utilizados na investigação de alterações no sono em pacientes com EMJ (KRISHNAN et al., 2012; RAMACHANDRAIAH et al., 2012).

Estes estudos ressaltam alterações significativas na qualidade do sono e prevalência de distúrbios de sono nestes pacientes. Eles destacam também a natureza persistente da associação desta síndrome com o sono e reforçam que mais estudos devem ser realizados com

o objetivo de revelar as reais implicações entre estas condições, onde alterações no ciclo sono-vigília parecem ter um papel importante.

2.4 EMJ e ritmo circadiano

Os ritmos circadianos são ritmos biológicos que variam em torno de 24h e podem ser eventos bioquímicos, fisiológicos ou comportamentais importantes para sobrevivência. É gerado por vários osciladores biológicos endógenos e modulados por sincronizadores externos como a luz, a alimentação, entre outros (EBISAWA et al., 2001; HASTINGS; HERZOG, 2004; PEREIRA et al., 2009; CHOUB et al., 2011). Em humanos, o ritmo circadiano pode coordenar vários processos moleculares, bioquímicos e fisiológicos regulados pela luz, mudanças de temperatura ao longo do dia e estação do ano, resultando na adaptação do ciclo sono-vigília, temperatura corporal, metabolismo energético, ciclo celular, secreção hormonal e etc (EBISAWA et al., 2001; RESZKA et al., 2012). Alterações no ritmo circadiano podem tornar o indivíduo mais suscetível à ocorrência de doenças ou intensificar os sintomas de uma doença já existente (GREEN et al., 2008; SCHEEN et al., 2009; GIMBLE et al., 2011; ANTUNES et al., 2010; BASS et al., 2010).

Diversos estudos têm mostrado distribuição diurna das crises em diferentes tipos de síndrome epiléptica, revelando uma possível relação do ritmo circadiano (ciclo sono-vigília) com a epilepsia (PAVLOVA et al., 2004; DURAZZO et al., 2008; HOFSTRA et al., 2010). Além disso, existem evidências que os ritmos circadianos podem desempenhar um papel sobre a epilepsia e que a epilepsia e o horário das crises podem influenciar o período de atividades diária do indivíduo, como o padrão do ciclo sono-vigília (PAVLOVA et al., 2009).

Ao longo dos anos, estudos clínicos tem descrito a ocorrência da maioria das crises com predomínio de horário, sugerindo a influência do ciclo sono-vigília na EMJ (JANZ; CRISTIAN, 1957; CLEMENT; WALLACE, 1988; PANAYIOTOPOULOS; TAHAN; OBEID,1991; MURTHY; RAO; MEENA, 1998; PUNG; SCHMITZ, 2006; HOFSTRA et al., 2010).

A preferência diurna (ou cronotipo), condição normal de sincronização circadiana, caracteriza o horário preferido do dia para realizar atividades e pode ser do tipo matutino, intermediário e vespertino. O questionário de *Horne-Ostberg* é o instrumento mais frequentemente utilizado para avaliar cronotipos (PAINE; GANDER; TRAVIER, 2006). Alguns estudos têm utilizado este instrumento para avaliar a preferência diurna em pacientes com EMJ, demonstrando que são vespertinos, pois preferem dormir mais tarde e acordar tarde

pela manhã, e suas atividades diárias frequentemente adiadas para períodos vespertinos e noturnos (PUNG; SCHMITZ, 2006; HOFSTRA et al., 2010).

Esta característica vespertina dos pacientes com EMJ pode estar relacionada com a distribuição circadiana das crises, que ocorrem predominantemente pela manhã deixando o paciente mais disposto neste caso, no período vespertino (THOMAS et al., 2002; PANAYIOTOPOULOS, 2005; BEGHI et al., 2006). Badawy et al. (2009) investigaram, através de estimulação magnética transcraniana, o efeito da variabilidade diurna na excitabilidade cortical em pacientes com EGI, particularmente na EMJ, salientando um aumento da excitabilidade cortical no início da manhã nestes pacientes, o que pode explicar a suscetibilidade maior de crises neste momento do dia.

Em estudos de epilepsia com humanos e animais, variações diurnas nos fenômenos de crise sugerem o envolvimento de um sinal biológico tempo-dependente (STEWART, 2001). Há alguns anos, foi descoberto um grande número de genes importantes para a geração e regulação dos ritmos circadianos, denominados genes do relógio, entre eles *Clock* e *Period* (1, 2 e 3), que recentemente têm sido associados à preferência diurna e transtornos do sono (CERMAKIAN; BOIVIN, 2003; KATZENBERG et al., 1998). Todavia, nenhum estudo em humanos foi publicado com genes do relógio e epilepsia até o momento.

Apesar de apresentar influência do ritmo circadiano é importante ressaltar que são escassos os estudos sobre esse aspecto da EMJ. Portanto, investigações mais detalhadas desta influência circadiana poderão contribuir para elucidar alguns dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da EMJ.

2.5 Aspectos genéticos da EMJ

Na década de 50 e 60 os primeiros estudos desenvolvidos por Lennox (1951,1960) e Metrakos (1961) revelaram a predisposição genética nas EIGs, observando que o risco de desenvolver epilepsia era de 1,5 a 5 vezes maior nos indivíduos com antecedente familiar de epilepsia do que na população em geral e 2 vezes maior para os familiares de pacientes com EIG do que para indivíduos com história de epilepsia parcial (BERKOVIC et al., 1998; MILLER et al., 1998; COREY et al., 2011).

A EMJ, a mais comum EIG, apresenta, particularmente, uma forte influência do componente genético, onde aproximadamente 25 a 50% dos pacientes possuem história familiar positiva (LIU et al., 1996; GELISSE et al., 2001; SALAS-PUIG et al., 2001; SCHANKIN et al., 2011). Devido a essa característica, tem sido amplamente estudada do ponto de

vista genético-molecular. Neste contexto, estudos indicam que a maioria dos casos de EMJ possui um modelo de herança complexo e apenas 2% apresentam um modelo de herança monogênico, em que a alteração genética segue um padrão de segregação autossômica dominante ou recessiva (COSSETE et al., 2002; MARINI et al., 2004; DELGADO-ESCUETA, 2007; WEBER; LERCHE, 2008; LU; WANG, 2009; MACDONALD et al., 2010; RUPPERT et al., 2012).

A investigação de genes que contribuam para a predisposição a EMJ tem sido realizada basicamente através de dois tipos de desenho experimental: estudos de ligação e análise de associação. A escolha de um dos tipos de desenho deve ser feita com base no tipo de efeito genético que influencia a epilepsia. Assim, quando a herança é monogênica, ou seja, um único gene é responsável pela condição, é mais comum o encontro de recorrência familiar, sendo neste caso, o estudo de ligação mais adequado. No entanto, quando o modelo de herança é complexo, onde múltiplos genes e fatores ambientais influenciam nas características clínicas da doença, existe a necessidade do estudo de pacientes isolados e não relacionados, realizado por meio de estudos de associação (OTTMAN, 2005; BIRD et al., 2001).

Através dos estudos de ligação, 22 *loci* cromossômicos envolvidos com EMJ foram identificados até o momento, destacando mutações em dez genes diferentes como: Myoclonin1, BRD2, CX36, CACNB4, GABRA1, CLCN2, ME2, EFHC1, CASR, GABRD, conforme mostrado no **quadro 1** (DELGADO-ESCUETA, 2007; DE NIJS et al., 2012; NOEBELS et al., 2012).

A maior parte dos genes relatados codificam componentes moleculares de sinalização neuronal: canais iônicos controlados por voltagem ou por transmissores (MEISLER et al., 2001; SCHEFFER; BERKOVIC, 2003). No entanto, alguns genes que não participam diretamente do processo de transmissão sináptica, tem apresentado mutações ligadas a EMJ, como o gene EFHC1, BDR2 e ME2.

Nos últimos anos, o número de publicações com estudos de associação aumentou consideravelmente. Nas epilepsias, um grande número de genes candidatos foi relatado (OTTMAN, 2005).

O epiGAD (*Epilepsy Genetic Association Database*), um banco de dados disponível online (<http://www.epigad.org>) agrega informações provenientes de estudos de associação com epilepsia publicados desde 1985 (TAN; BERKOVIC, 2010). De acordo com este banco de dados, vinte e seis estudos de associação com EMJ foram publicados até hoje. Onze genes diferentes foram estudados e apenas 8 apresentaram polimorfismos associados a EMJ, entre

eles: HLA, BRD2, Cx36, EFHC2, GABRA1, CHRNA4, GRM4 e TAP-1, conforme o quadro 2.

Quadro 1 - Loci cromossômicos e genes identificados em EMJ.

<i>Locus</i>	Nome do <i>Locus</i> ou fenótipo	Gene	Modelo de Herança	Referência
1p36.33	EMJ7	GABRD ^a	AD	Dibbens et al., 2004
2q22-2q23	EJM4	CACNB4 ^a	AD	Escayg et al., 2000.
2q33-q36	EMJ9	--		Ratnapriya et al., 2010
3q21.1	JME	CASR ^a	AD	Kappor et al., 2008
3q26	EJM6	CLCN2 ^a	AD	Haug et al., 2003.
5q12-q14	EJM4	--	AD	Kappor et al., 2007
5q34	EJM5	GABRA1 ^a	AD	Cossete et al., 2002
5q35.3	JME/PPR	--	AD	de Kovel et al., 2010
				Bai et al., 2002
6p12	EJM1a	Myoclonin1	AD	Ma et al., 2006
6p12	EJM1e	Myoclonin1 /EFHC1 ^a	AD	Pinto et al., 2006.
6p20	EJM1c	BRD2 ^b	AD	Sander et al., 1997
6p21.2	EJM1d	BRD2 ^b	AR	Tauer et al., 2005
6p21.3	EJM1b	BRD2 ^b	AD	Pal et al., 2003.
6q24	EJM3	Cx36 ^b	AR	Bate et al., 2004.
7q32	EJM8	ME2 ^b	AD	Pinto et al., 2005.
8q21.13	JME/PPR	JRK ^a	AD	Moore et al., 2001
10q25-q26	EJM7	ME2 ^b	AD	Puranam et al., 2005.
13q31.3	EJM10	ME2 ^b	AR	Tauer et al., 2005.
15q14	EJM2	Cx36 ^b	AR	Elmslie et al., 1997
16p13	EJM9	ME2 ^b	AD	Pinto et al., 2005
18q21	JME	ME2 ^b	AR	Greenberg et al., 2005
19q13	EJM11	ME2 ^b	AR	Hempelmann et al., 2006.
Xp11.4-11.3	JME	EFHC2 ^b	--	Gu et al., 2005

^a Mutações; ^b Variantes associadas com SNP; AD (autossômico dominante); AR (autossômico recessivo); JME (*Juvenile Myoclonic Epilepsy*).

Fonte: Adaptada de Delgado-Escueta, 2007, 2013.

Quadro 2 - Estudos de associação com EMJ disponíveis no epiGAD.

Nº	Fenótipo	Gene	Alelo	Nº casos/ controles	Pais de origem	Autor	Valor de P
1	JME	HLA	Alelos múltiplos	24/24	Estados Unidos	Greenberg et al., 1996	0,017
2	JME	GABRB2	Alelos múltiplos	88/100	França	Guipponi et al., 1997	>0,05
3	JME	GABRA5	Alelos múltiplos	88/100	França	Guipponi et al., 1997	>0,05
4	JME	HLA	Alelos múltiplos	93/93	França	Le Hallard et al., 1999	>0,05
5	JME	GRM4	T1455C	144/144	Alemanha	Izzi et al., 2003	0,84
6	JME	BRD2	rs3918149	20/64	Estados Unidos	Pal et al., 2003	0,028
7	JME	Connexin 36	C588T	169/123	Reino Unido, Dinamarca, França, Grécia, Portugal e Suécia	Mas et al., 2004	0,026
8	Male JME	EFHC2	S430Y	97/305	Alemanha	Gu et al., 2005	0,03
9	JME	Connexin 36	C588T	247/621	Alemanha	Hempelmann et al., 2006	0,016
10	JME	GABRA1	D5S422	35/100	Índia	Kapoor et al., 2003	0,0007
11	JME	GABRA1	D5S2118	35/100	India	Kapoor et al., 2003	>0,35
12	JME	BRD2	rs3918149	531/1390	Alemanha, Reino Unido, Irlanda, Austrália e Índia	Lorenz et al., 2007	0,33
13	JME	BRD2	rs3918149	34/256	Reino Unido	Cavalleri et al., 2007	0,001
14	JME	BRD2	rs3918149	57/227	Irlanda	Cavalleri et al., 2007	0,043
15	JME	BRD2	rs3918149	48/144	Índia	Cavalleri et al., 2007	1
16	JME	BRD2	rs3918149	146/99	Austrália	Cavalleri et al., 2007	0,22
17	JME	EFHC1	múltiplos SNPs	124/604	México	Bai et al., 2008	>0,05
18	JME	BRD2	múltiplos SNPs	102/360	Holanda	de Kovel et al., 2008	>0,05
19	JME	CHRNA4	C1674T	92/222	Polónia	Rozycka et al., 2009	0,03
20	JME	EFHC1	múltiplos SNPs	124/614	Estados Unidos	Bai et al., 2009	>0,2
21	JME	GRM4	17 SNPs	215/733	Alemanha	Muhle et al., 2010	>0,010
22	JME	TAP-1	333Ile-637Gly	154/159	Tunisia	Layouni et al., 2010	0,02
23	JME	TAP-1	333Val-637Asp	154/159	Tunisia	Layouni et al., 2010	0,007
24	JME	BRD2	múltiplos SNPs	154/159	Tunisia	Layouni et al., 2010	>0,44
25	JME	TAP-1	Ile333Val	154/159	Tunisia	Layouni et al., 2010	0,83
26	JME	TAP-1	Asp637Gly	154/159	Tunisia	Layouni et al., 2010	0,92

Fonte: Adaptada do epiGAD.

Mais recentemente, nosso grupo de pesquisa publicou um estudo de associação com EMJ, onde foi investigada a associação do polimorfismo rs211037 no gene GABRG2. Noventa e oito pacientes e 130 controles da população alagoana foram genotipados, no entanto não houve associação deste polimorfismo com EMJ no estado de Alagoas ($p= 0.21$). Este estudo ainda não foi inserido no banco de dados epiGAD.

É importante notar que os estudos de associação com EMJ têm sido realizados com objetivo de investigar o limiar genético de susceptibilidade e nenhum trabalho, para o nosso conhecimento, foi desenhado para investigar os componentes genéticos subjacentes à interação entre a EMJ e suas comorbidades (endofenótipos). Como a EMJ apresenta um envolvimento com ritmo circadiano, estudos que investigam alterações em genes do relógio são necessários para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na predisposição a EMJ.

2.6 Os genes relógio

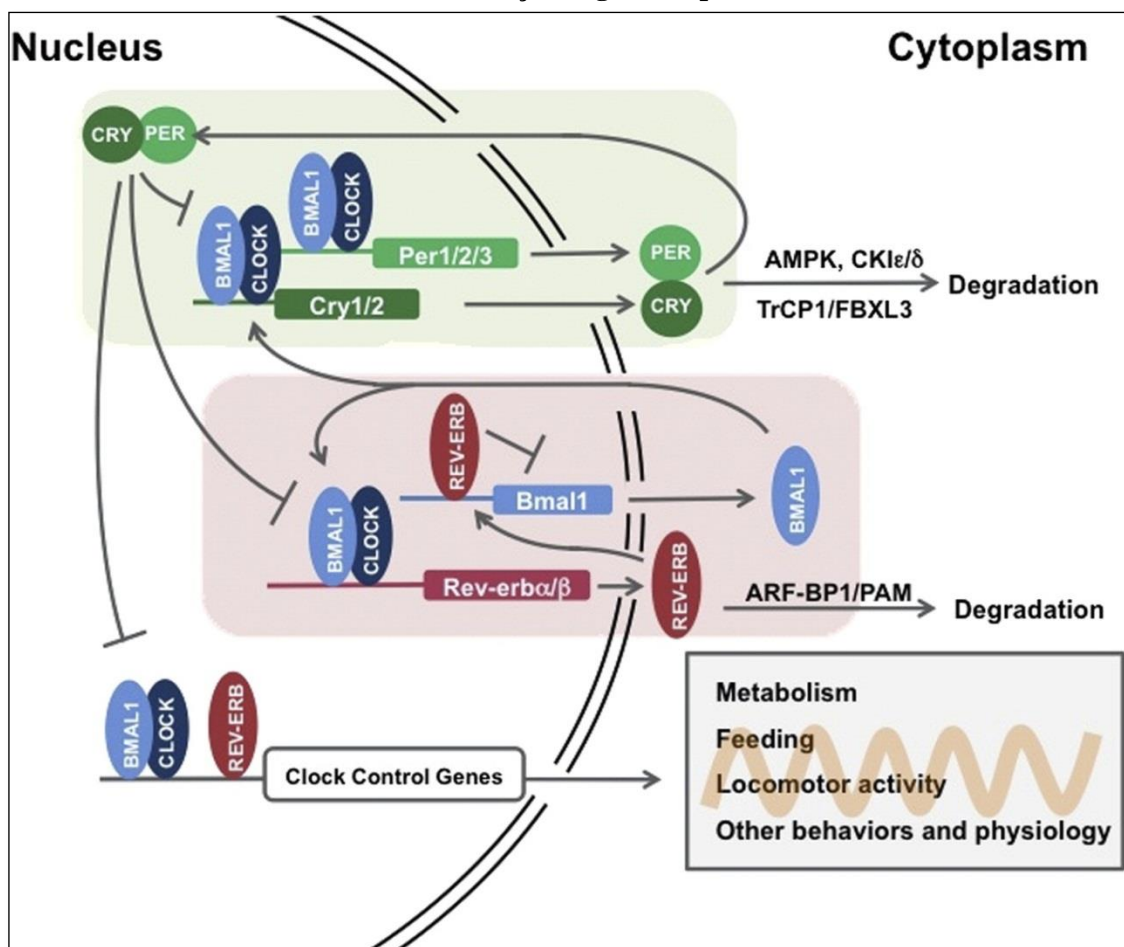
A geração e regulação endógena do ritmo circadiano nos mamíferos é mantida pelo núcleo supraquiasmático (NSQ), localizado no hipotálamo. Considerado o principal oscilador circadiano, o NSQ também é conhecido por oscilador central, marcador circadiano ou relógio biológico. O relógio biológico também coordena osciladores periféricos localizados em outras áreas do SNC e órgãos periféricos (HASTINGS; HERZOG, 2004; CHOUB et al., 2011).

O mecanismo celular oscilatório do relógio biológico é mantido por um conjunto de genes relógio que atuam de forma rítmica nas 24 horas do dia (REPPERT; WEAVER, 2002). O funcionamento do relógio biológico reflete a interação entre alças de retroalimentação positiva e negativa, que resultam na expressão rítmica dos genes do relógio, em que os produtos resultantes da oscilação de genes específicos regulam sua própria expressão. Esta auto-regulação faz com que a proteína sintetizada seja capaz de inibir a transcrição do seu próprio gene e ativar a transcrição do gene que se expressa com alternância de fase. Este ciclo se repete indefinidamente (REPPERT; WEAVER, 2002; RESZKA et al., 2012) (**Figura 1**).

A regulação do relógio biológico, portanto, ocorre da seguinte maneira: as proteínas dos genes *Clock* (*Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*) e *Bmal1* (*brain and muscle Arnt-like protein 1*) formam um heterodímero (CLOCK/BMAL1), funcionando como fator de transcrição para a expressão dos genes *Per* (*period*), *Cry* (*cryptochrome*) e do receptor órfão REV-ERB. PER e CRY formam dímeros que são transportados do citoplasma para o núcleo, inibindo a ação de CLOCK/BMAL1 e bloqueando a sua própria transcrição. Na ausência da proteína REV – ERB, o gene *Bmal1* (e possivelmente o gene *Clock*) é liberado, podendo

formar novamente o fator de transcrição CLOCK/BMAL1, dando início a um novo ciclo. Normalmente, o ciclo circadiano tem início nas primeiras horas da manhã através da ativação da transcrição de *Per* e *Cry* por CLOCK/BMAL1. Os níveis de transcrição atingem seu pico por volta de meio-dia e os níveis de proteína no citoplasma atingem o seu máximo cerca de duas horas mais tarde. Este mecanismo é caracterizado como alça de retroalimentação negativa (ALBRECHT; EICHELE, 2003; DIJK; ARCHER, 2010).

Figura 1 - A maquinaria molecular básica do relógio biológico consiste em alças de retroalimentação negativa e positiva.



Na primeira alça o heterodímero CLOCK/BMAL1 ativa a transcrição de *Per* e *Cry*, enquanto que as proteínas PER e CRY forma dímeros e inibem a atividade transcritora de CLOCK/BMAL1. Na segunda alça, CLOCK/BMAL1 ativa a expressão de REV-ERB, que por sua vez inibe a transcrição de *Bmal1*. Ambos os circuitos são essenciais para a manutenção do ritmo circadiano. Este mecanismo regula atividades rítmicas comportamentais e fisiológicas, como o metabolismo.

Outro mecanismo envolve a regulação da transcrição de *Bmal1* (alça de retroalimentação positiva), induzido pelo heterodímero CLOCK/BMAL1 que ativa a transcrição de receptores nucleares órfãos, Rev-erba e Rora. REV-ERB α competem pela liberação a ROREs (*retinoic acid-related orphan receptor response elements*), presentes no promotor de *Bmal1*. ROR ativa a transcrição de *Bmal1* enquanto REV-ERB (α e β) reprime o processo de transcrição. Assim, a oscilação circadiana de *Bmal1* é tanto positivamente quanto negativamente regulada por RORs e REV-ERBs. (PREITNER et al., 2002; SATO et al., 2004; TRINQUENEUAX et al., 2004; AKASHI; TAKUMI, 2005; GUILLAUMOND et al., 2005).

Nos últimos anos, vários pesquisadores têm investigado alterações em genes envolvidos na regulação do relógio biológico e seus impactos em diversas doenças. Vários estudos de associação tem indicado polimorfismos em genes circadianos relacionados com preferência diurna e sazonalidade, fatores psico-comportamentais, transtornos mentais, obesidade, síndrome metabólica, hipertensão, diabetes tipo 2 e câncer (RESZKA et al., 2012).

A EMJ possui características associadas ao ciclo sono-vigília, relatadas desde sua primeira descrição e observada ao longo dos anos por vários pesquisadores (JANZ; CRISTIAN, 1957; CLEMENT; WALLACE, 1988; PANAYIOTOPOULOS; TAHAN; OBEID,1991; MURTHY; RAO; MEENA, 1998; PUNG; SCHMITZ, 2006; HOFSTRA et al., 2010). Como o ciclo sono-vigília é regulado por genes do relógio e possíveis alterações nestes genes causem mudanças na ritmicidade circadiana, provocando diversas alterações fisiológicas e comportamentais, a hipótese é que alterações nestes genes apresentem um fator de susceptibilidade a EMJ ou a endofenótipos. Dessa forma, três polimorfismos já associados a características circadianas foram escolhidos para análise em pacientes com EMJ, entre eles o VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*) de 4 e 5 repetições do gene *Per3*, C111G do gene *Per2* e T3111C do gene *Clock*.

2.6.1 Gene *Clock* (OMIM 601851)

O primeiro gene relógio de mamíferos a ter sua funcionalidade identificada foi o gene *Clock*. Possui 20 éxons e esta localizado no cromossomo 4. Faz parte da alça de regulação positiva do mecanismo molecular do ritmo circadiano e codifica um fator de transcrição básico (CLOCK), cuja função é ativar os componentes do mecanismo molecular do relógio biológico para geração do ritmo circadiano (DUNLAP, 1999; BARCLAY et al., 2011).

Mutações neste gene podem trazer defeitos funcionais no heterodímero CLOCK-BMAL1 e, como consequência, induzir a um ritmo molecular lento (GEKAKIS et al., 1998). Em camundongos algumas mutações neste gene foram associadas a um período longo em livre-curso (ausência de pistas ambientais), ou seja, os animais apresentaram um período endógeno longo de atividade locomotora, e uma sincronização anormal ao ciclo claro/escuro de 24 horas (ANTOCH et al., 1997; KING et al., 1997; NAYLOR et al., 2000). Devido ao seu papel central na regulação do relógio biológico, o gene *Clock* é um forte candidato a associação com distúrbios relacionados a disfunção do ritmo circadiano (STEEVES et al., 1999).

Polimorfismos neste gene estão associados a alterações comportamentais em certas populações, além de obesidade, síndrome metabólica, distúrbios do humor e comumente associado à preferência diurna e alterações no sono (ALLEBRANDT et al., 2010).

Em humanos, o polimorfismo T3111C (rs1801260) do gene localizado na região 3' não-traduzida (3'UTR) do gene *Clock*, consistindo na substituição de uma citosina por uma timina na posição 3111, tem sido frequentemente associado à preferência diurna (KATZENBERG et al., 1998; MISHIMA et al., 2005) e com suscetibilidade ao desenvolvimento de SFAS (síndrome da fase atrasada do sono) (IWASE et al., 2002; KATZENBERG et al., 1998; MISHIMA et al., 2005).

O alelo 3111C tem sido associado com vespertinidade (KATZENBERG et al., 1998; MISHIMA et al., 2005), alterações no sono como SFAS (IWASE et al., 2002) e insônia em pacientes afetados por depressão e transtorno bipolar (SERRETTI et al., 2003), além de Transtorno do déficit de atenção com hiperatividade e distúrbios do sono em crianças chinesas (CAO et al., 2012).

2.6.2 Gene *Per2* (OMIM 603426)

O gene *Period 2* (*Per2*) é um componente chave do mecanismo molecular que regula o ritmo circadiano em mamíferos (GARAULET et al., 2010). Localiza-se no cromossomo 2 (TOH et al., 2001) e faz parte da alça de retroalimentação negativa, na qual sua proteína (PER2) forma um dímero no citoplasma com CRY, retornam ao núcleo e bloqueiam a ação do heterodímero CLOCK/BMAL1 na transcrição de seus próprios genes (LOWREY et al., 2000; PEREIRA et al., 2009).

Mutações em *Per2* diminuem a frequência fundamental das oscilações circadianas e causa a perda eventual de ritmos comportamentais (ZHENG et al., 1999; BAE et al., 2001;

XU et al., 2007). Nos seres humanos, as mutações em *Per2* estão associadas com alterações na duração do ciclo sono-vigília (TOH et al., 2001; VANSELOW et al., 2006; XU et al., 2007).

Além das associações com alterações no ciclo sono-vigília, o gene *Per2* tem sido associado a outras condições, como câncer (YANG et al., 2009; WINTER et al., 2007; CHEN et al., 2005), variações de humor, comportamento e depressão (PARTONEN et al., 2007; MANSOUR et al., 2009), obesidade (GARAULET et al., 2010) e síndrome metabólica (GARCIA-RIOS et al., 2012).

Dentre os polimorfismos mais estudados neste gene, destaca-se o polimorfismo C111G (rs2304672) localizado na região 5' não-traduzida (5'-UTR). Comumente associado com preferência diurna, onde a presença do alelo G esta frequentemente relacionado a matutuidade (CARPEN et al., 2005). Este polimorfismo pode alterar a estrutura secundária do RNAm transcrito e, como o alelo 111G está associado a matutuidade, alguns estudos mostram a sua forte relação com SFAVS (CARPEN et al., 2005; SATOH et al., 2003; RESZKA et al., 2012). O alelo 111G, além de apresentar associação com cronotipo matutino, também foi relatada associação com variação sazonal no humor e depressão (PARTONEN et al., 2007; LAVEBRATT et al., 2010), transtorno bipolar (KRIPKE et al., 2009) e recentemente obesidade (GARAULET et al., 2010).

2.6.3 Gene *Per3* (OMIM 603427)

O *Period 3* (*Per3*), componente da alça de retroalimentação negativa do relógio biológico, é membro da família de proteínas *Period* (*PER*), descrito pela primeira vez em *Drosophila* (REDDY et al., 1984). Está localizado em humanos no cromossomo 1, possui 23 éxons e codifica um fator de transcrição (ARCHER et al., 2003; LIPKOVA et al., 2012).

De acordo com estudos funcionais, a deleção de *Per3* em camundongos tem uma influência na atividade circadiana (SHEARMAN et al., 2000; VAN DER VEEN; ARCHER, 2010). Em humanos, existe um polimorfismo de repetição neste gene (VNTR – *Variable Number of Tandem Repeats*) que é caracterizado por uma sequência de 54pb que se repete quatro ou cinco vezes dependendo do genótipo do indivíduo, um alelo longo com 5 repetições e um alelo curto com 4 repetições (EBISAWA et al., 2001; ARCHER et al., 2003). Este polimorfismo está localizado no éxon 18 e um indivíduo com 4 repetições de 54pb possui 18 aminoácidos a menos na proteína do que um indivíduo com 5 repetições (EBISAWA et al., 2001). Sua função ainda não é conhecida, mas diversos grupos de pesquisadores têm

investigado seu papel no sistema de temporização circadiano (EBISAWA et al., 2001; ARCHER et al., 2003; 2010).

O alelo longo tem sido associado com preferência matutina (ARCHER et al., 2003; PEREIRA et al., 2005; JONES et al., 2007; ELLIS et al., 2009) e o alelo curto associado com preferência vespertina e SFAS (ARCHER et al., 2003). Recentemente, alguns pesquisadores tem revelado também relação com: dependência a opióides (ZOU et al., 2007; SUROVTSEVA et al., 2012); insônia em pacientes álcool-dependentes (BROWER et al., 2012); resistência neurocomportamental aguda e privação de sono (RUPP et al., 2012); álcool e stress (WANG et al., 2012); transtorno bipolar (BENEDETTI et al., 2008; DALLASPEZIA et al., 2011); alterações no sono (VIOLA et al., 2007; 2011); câncer (ZHU et al., 2005).

Contudo, apesar do número crescente de estudos envolvendo polimorfismos dos genes do relógio e doenças neurológicas que apresentam características circadianas subjacentes a seus fenótipos, nenhum estudo neste sentido foi descrito em relação à EMJ. Dessa forma, este trabalho propôs a investigação de polimorfismos nestes genes, buscando explicar a ligação entre EMJ e ritmo circadiano, já que apresenta nítida influência do ciclo sono-vigília em seu fenótipo.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a ocorrência de distúrbios do sono e preferência circadiana em pacientes com EMJ do Estado de Alagoas, buscando identificar possíveis correlações genéticas com endofenótipos apresentados por estes pacientes quanto aos distúrbios do sono.

3.2 Específicos

- Avaliar a ocorrência de distúrbios do sono em pacientes com EMJ;
- Avaliar a frequência de cronotipos dos pacientes com EMJ;
- Obter as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos genéticos C111G do gene *Per2*, T3111C do gene *Clock* e VNTR do gene *Per3* em indivíduos com EMJ;
- Avaliar se as frequências obtidas dos polimorfismos são significativamente diferentes entre os grupos (pacientes e controles) analisados;
- Avaliar se interações entre estes polimorfismos estão associados à EMJ;
- Avaliar uma possível associação entre os polimorfismos e os endofenótipos apresentados pelos pacientes com EMJ, quanto aos distúrbios do sono.

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento

Estudo retrospectivo do tipo caso-controle realizado com pacientes diagnosticados com EMJ comparados ao grupo controle, composto por indivíduos voluntários. Os grupos foram selecionados obedecendo a critérios de inclusão e exclusão. Todos os pacientes foram submetidos à avaliação clínica (diagnóstico para EMJ e reavaliação clínica), neurológica (EEG), entrevista sobre distúrbios do sono e cronotipos, e investigação genética. O grupo controle foi submetido a entrevista sobre distúrbios do sono e cronotipos, além da investigação genética.

4.2 Pacientes e grupo controle

O grupo de pacientes (n=97) foi composto por indivíduos com diagnóstico de EMJ atendidos no ambulatório de epilepsia do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas (HUPAA-UFAL) e em clínicas particulares localizadas na cidade de Maceió. Os pacientes foram diagnosticados por dois neurologistas especialistas em epilepsia segundo os critérios para a classificação de síndromes epiléticas da *International League Against Epilepsy* (ILAE, 1989).

- Critérios de inclusão dos pacientes:
 - Presença de crises mioclônicas com ou sem CTCG e/ou crises de ausência;
 - Idade de início das crises entre 4 e 30 anos;
 - Desenvolvimento neuropsicomotor e exame neurológico normal.

- Critérios de exclusão dos pacientes:
 - Negar-se a participar da pesquisa;
 - Presença de retardo no desenvolvimento neuropsicomotor;
 - Pacientes que não compareceram ao retorno ambulatorial ou mudaram de endereço e telefone.

O grupo controle (n=212) foi composto por indivíduos voluntários provenientes do Estado de Alagoas, sendo alunos e funcionários da UFAL, pacientes atendidos em outros

ambulatórios do HUPAA e voluntários de vários bairros da cidade de Maceió de forma a compor um grupo com idade média e proporção de gêneros semelhantes ao grupo de pacientes.

- Critérios de exclusão dos indivíduos do grupo controle:
 - Negar-se a participar da pesquisa;
 - Presença de retardo no desenvolvimento neuropsicomotor;
 - Diagnóstico prévio de doença neurológica ou psiquiátrica;
 - Diagnóstico atual ou prévio de epilepsia;
 - Antecedentes familiares de epilepsia (em até terceiro grau).

Todos os pacientes e indivíduos controle foram cadastrados no banco de DNA de pacientes com Epilepsia e indivíduos controles do estado de Alagoas.

O Banco de DNA referido nesta pesquisa foi estabelecido pelo Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) da UFAL em 2006 (projeto financiado pelo Fundo de Apoio à Pesquisa do Estado de Alagoas/FAPEAL – edital Auxílio à recém-doutor/2005), com o objetivo principal de fornecer subsídios para a investigação de polimorfismos genéticos associados principalmente a EMJ, que representa cerca de 35% dos pacientes incluídos no banco. Além disso, sua criação permitiu a sistematização no atendimento destes pacientes e possibilidades de estudos clínicos. Atualmente, possui 97 pacientes com EMJ e 212 controles cadastrados, além de outros tipos de epilepsia.

4.3 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas, processo nº 004660/2011-71 (anexo 1), com base no item VIII.13, b, da Resolução nº196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Pacientes e controles foram devidamente esclarecidos sobre os objetivos e riscos em participar do estudo através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, apêndice 1).

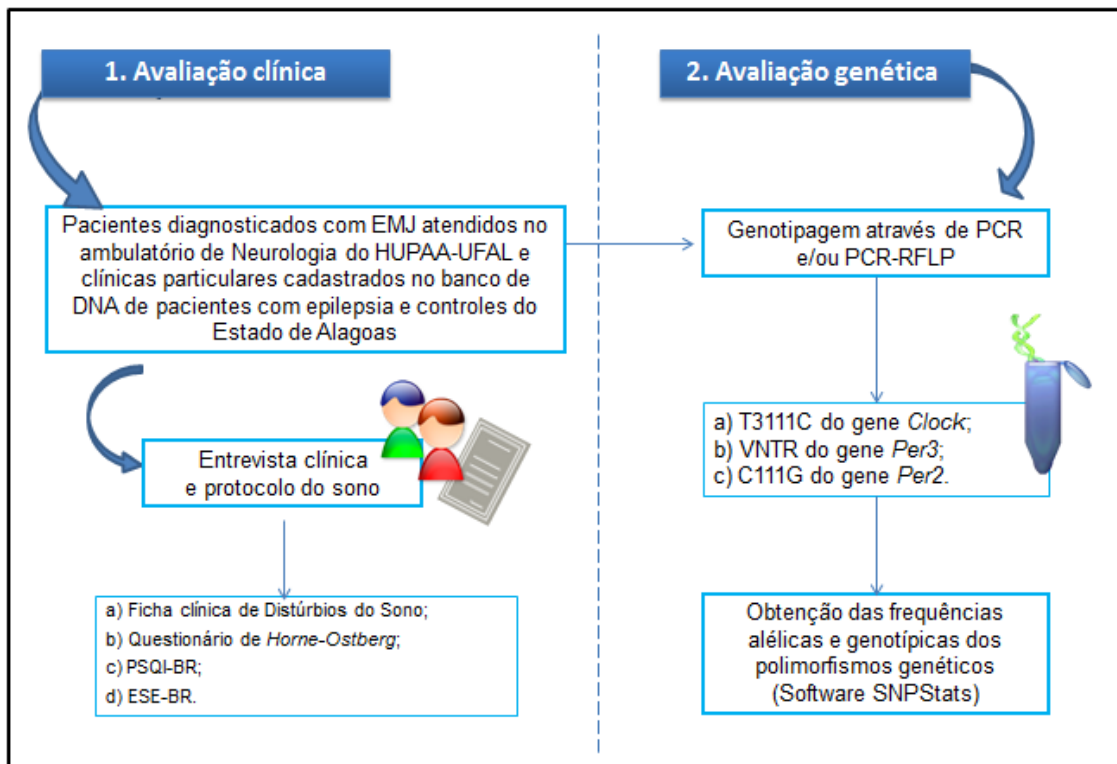
4.4 Procedimentos:

4.4.1 Avaliação clínica sobre distúrbios do sono

Os pacientes com EMJ foram abordados pelos pesquisadores no dia do retorno ambulatorial regular e esclarecidos segundo o TCLE (Figura 2). Os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa foram submetidos ao seguinte protocolo:

- 1) Avaliação das características do sono:
 - a) Entrevista clínica sobre distúrbios do sono (apêndice 2);
 - b) Aplicação da Escala de Sonolência de *Epworth* (anexo 2);
 - c) Aplicação do Índice de qualidade do sono de *Pittsburgh* (anexo 3).
- 2) Avaliação da preferência diurna (cronotipo):
 - a) Aplicação do questionário de *Horne-Ostberg* (anexo 4).

Figura 2 - Representação esquemática do delineamento experimental.



Fonte: Autora, 2013.

4.4.1.1 Instrumentos

4.4.1.1.1 Ficha clínica sobre distúrbios do sono

A ficha clínica sobre distúrbios do sono é um questionário semiestruturado sobre critérios clínicos para distúrbios do sono, baseado na segunda edição da Classificação Internacional de Distúrbios do Sono (CIDS-2). O instrumento foi desenvolvido por um neurologista com formação em Medicina do Sono com o objetivo de orientar a entrevista clínica de avaliação das principais alterações relacionadas ao sono (Anexo 5). A ficha é dividida em dados sobre: identificação do indivíduo; ambiente do sono; características do ciclo sono-vigília (último mês e ano); antecedentes pessoais sobre doenças crônicas; medidas antropométricas; medicações em uso; crises epiléticas atuais e períodos de ocorrência (específica para pacientes).

4.4.1.1.2 Escala de Sonolência de *Epworth* (ESE)

A escala de sonolência de *Epworth* (ESE-BR) é um questionário autoaplicável em que o paciente gradua sua probabilidade de adormecer em oito situações corriqueiras. Trata-se de um escore de 0 a 24, que, quando maior que 10, sugere sonolência diurna excessiva (SDE). Este instrumento foi validado para o português falado no Brasil por Bertolazi et al. (2009).

4.4.1.1.3 Índice de qualidade do sono de *Pittsburgh* (IQSP-BR)

O índice de qualidade do sono de *Pittsburgh* (IQSP-BR), validado para português por Bertolazi e colaboradores (2010), avalia qualidade do sono em relação ao mês anterior, classificando os entrevistados como bons ou maus “dormidores”. Composto por 19 itens agrupados em 7 componentes, pontuados 0 a 3. Os componentes são respectivamente: (1) a qualidade subjetiva do sono; (2) a latência do sono; (3) a duração do sono; (4) a eficiência habitual do sono; (5) as alterações do sono; (6) o uso de medicações para o sono; e (7) a disfunção diurna. Os escores dos sete componentes são somados para conferir uma pontuação global do IQSP, a qual varia de 0 a 21. Uma pontuação ≥ 5 indica qualidade ruim de sono (BERTOLAZI et al., 2011).

4.4.1.1.4 Questionário de matutinidadade/vespertinidade de *Horne-Ostberg*

O questionário de *Horne-Ostberg* (HO) ou questionário de identificação do caráter de matutividade e vespertividade (MEQ) (HORNE et al., 1976), foi validado para o português por Benedito-Silva et al. (1990). Este instrumento é composto por 19 questões a respeito de situações corriqueiras da vida diária, onde o indivíduo deve registrar os seus horários preferenciais para estas situações. O resultado do questionário é um valor numérico que varia entre 16 e 86 pontos. De acordo com a pontuação, cada indivíduo pode ser classificado em: vespertino extremo (16-30), moderadamente vespertino (31-41), indiferente (42-58), moderadamente matutino (59-69) e matutino extremo (70-86).

Baseado no escore do HO, os sujeitos deste estudo foram reclassificados para os cinco tipos de cronotipos de acordo com o método de gradiente de 5 pontos (7%–24%–38%–24%–7%) (CAROJI, 1915): vespertinos extremos (26-39), vespertinos moderados (40-48), intermediários (49-63), matutinos moderados (64-71) e matutinos extremos (71-77). Para as análises estatísticas, os sujeitos foram agrupados em três cronotipos: vespertinos (26–46), intermediários (47–63) e matutinos (64–77).

4.4.2 Avaliação Genética

A avaliação genética dos pacientes e controles quanto a associação com os polimorfismos T3111C do gene *Clock* e C111G do gene *Per2* foi realizada através da técnica de PCR-RFLP e para o polimorfismo VNTR (4 e 5 repetições) do gene *Per3*, através da técnica de PCR.

4.4.2.1 Extração de DNA genômico

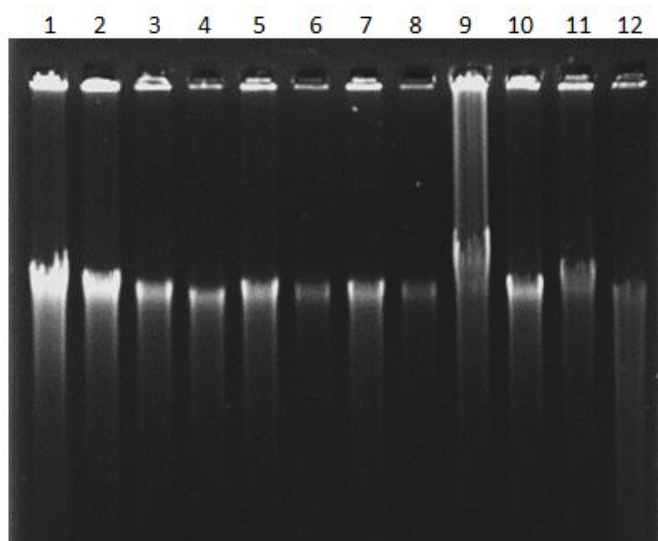
A extração do DNA dos indivíduos com EMJ e indivíduos controles foi realizada a partir de 300µl de sangue total, de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante do *Kit Genomic Blood DNA Purification* (QIAGEN). Inicialmente, o sangue foi incubado em banho-maria, a 37°C até descongelar, em seguida foi transferido para tubos de 1,5mL contendo 750µl de FG1 (tampão de lise) e centrifugado por 2 minutos a 10.000rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, ao *pellet* foi adicionado 150µL de FG2 (tampão desnaturante) + 1,5µL de protease e homogeneizados com vórtex. Em seguida, a solução foi centrifugada brevemente (3-5 segundos) e incubada a 65°C, por 5 minutos. Posteriormente, adicionava-se 150µL de isopropanol (100%) e logo depois foi misturada levemente por imersão até a formação do precipitado de DNA. As amostras foram centrifugadas por 5

minutos, o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* de DNA foi adicionado 150 μ L de etanol 70%. Após esta etapa de lavagem, as amostras foram centrifugadas por mais 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de DNA foi seco a temperatura ambiente. Para ressuspensão do DNA, foi adicionado 200 μ L de tampão FG3 (tampão de hidratação) e incubado a 65°C até o *pellet* de DNA ser dissolvido (10-30min). As soluções de DNA foram armazenadas em freezer -20°C, até o momento de uso.

4.4.2.1.1 Visualização do material genético extraído

Para visualizar a integridade da extração de DNA, alíquotas de 4 μ L de DNA foram misturadas a 1 μ L de água ultrapura e 1 μ L de *Loading buffer* 6X (LB 6X) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) em tubos de 1,5mL. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,7% (100V; 300mA; 36W). Após a eletroforese, os géis foram corados durante 10 minutos com brometo de etídio (0,5 μ g/mL), descorados em água destilada e fotografados sob luz ultravioleta com auxílio de um sistema de captura de imagem Vilber Lourmat (ECX-20.M, Vilber Lourmat, France).

Figura 3 - Perfil eletroforético do DNA genômico de 12 amostras provenientes de pacientes com EMJ.



Fonte: Autora, 2013.

Na **figura 3**, observa-se o perfil eletroforético de 12 amostras de DNA. Podemos observar a presença de uma única banda com intensidade relativamente forte. Padrão de intensidade que indica que o DNA genômico extraído possui 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.

4.4.2.2 Reações de PCR

Para amplificação dos fragmentos genômicos contendo os polimorfismos de interesse (**tabela 1**) foram utilizados diferentes pares de iniciadores (**tabela 2**).

Tabela 1 - Polimorfismos analisados para os genes *Clock*, *Per2* e *Per3*.

Gene	Polimorfismo	Localização no gene
<i>Clock</i>	T3111C	região 3'-UTR
<i>Per2</i>	C111G	região 5'-UTR
<i>Per3</i>	VNTR (4-5 repetições)	éxon 18

Fonte: Autora, 2013.

As reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições: DNA 40ng, tampão 1X, MgCl₂ 1,5mM, dNTP (desorribonucleotídeo trifosfatado) 0,5mM, *primers* F e R (iniciadores, 0,2µM de cada), enzima *Taq* polimerase 0,5U (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e H₂O ultrapura para um volume final de 25µL.

Tabela 2 - Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação dos fragmentos genômicos contendo os polimorfismos de interesse.

Gene	Polimorfismo	Amplicon	Sequência dos iniciadores
<i>Clock</i>	T3111C	221pb	F: 5'TCCAGCAGTTTCATGAGATGC3'
			R: 5'GAGGTCATTTTCATAGCTGAGC3'
<i>Per2</i>	C111G	114pb	F: 5'GTGCGTGTGCTTGTTAATGC3'
			R: 5'TCCTTGGTGGGGTTACTGG3'
<i>Per3</i>	VNTR (4-5 repetições)	635pb	F: 5'CAAATTTTATGACACTACCAGAATGGCTGAC3'
			R: 5'AACCCTTGTACTTCCACATCAGTGCCTGG3'

Fonte: Autora, 2013.

A amplificação de cada fragmento com os polimorfismos referidos na **tabela 1** se desenvolveu no termociclador (*Biocycler MJ96G*) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C durante 4 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação (tabela 3). Na etapa de extensão final a reação era incubada a 72°C por 10 minutos e permaneceu a 4°C até o momento do uso.

Tabela 3 – Condições para amplificação dos fragmentos genômicos de interesse.

Gene	Desnaturação	Anelamento	Extensão
<i>Clock</i>	94°C, 40 seg.	57°C, 30 seg.	72°C, 40 seg.
<i>Per2</i>	94°C, 45 seg.	55°C, 45 seg.	72°C, 50 seg.
<i>Per3</i>	94°C, 45 seg.	58°C, 1 min	72°C, 1 min

Fonte: Autora, 2013.

4.4.2.2.1 Visualização dos produtos de PCR

Os produtos de amplificação para o polimorfismo T3111G do gene *Clock* e C111G do gene *Per2* foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 2%, utilizando-se uma alíquota de 5µL da reação de PCR. As alíquotas foram misturadas a 1µL de *loading buffer* 6X (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e em seguida, a solução foi aplicada em gel de agarose 2% (TBE 0,5X). Após migração eletroforética (100V; 300mA; 36W), o gel foi corado por 10 minutos em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL), fotografado sob luz ultravioleta e devidamente documentado através do sistema de captura de imagem Vilber Lourmat (ECX·20.M, Vilber Lourmat, France) (ver **figuras 4 e 5**).

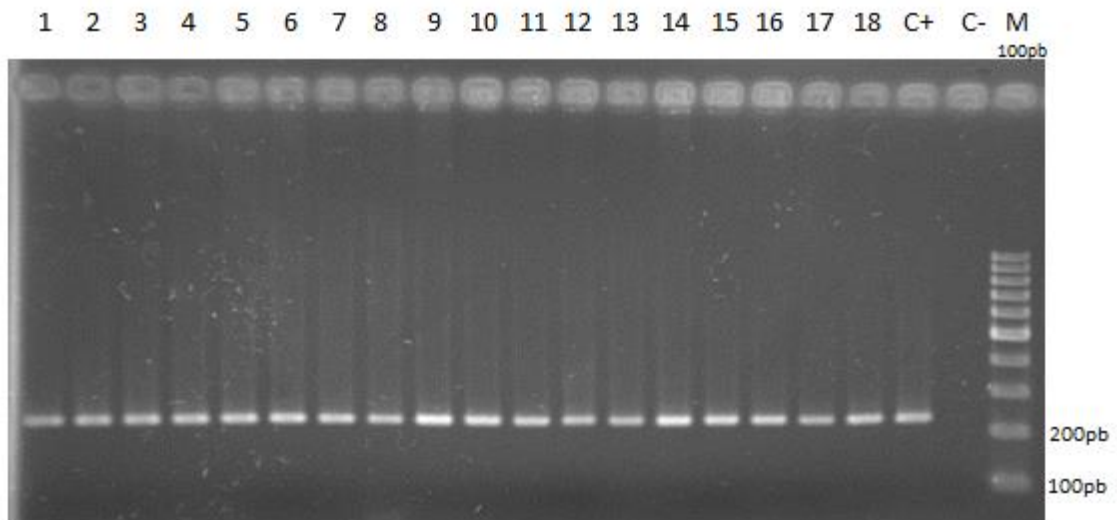
O produto de amplificação do VNTR (4 e 5 repetições) do gene *Per3* foi visualizado através de eletroforese em gel de poliacrilamida 6% (TBE1X). Em um tubo de 1,5mL foram adicionados 10µL do produto da PCR e 2µL de LB 6X (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Em seguida, a solução foi aplicada no gel e submetida à migração eletroforética (145V; 75mA; 36W). Após a migração o gel foi corado por 10 minutos em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL), fotografado sob luz ultravioleta e devidamente documentado através do sistema de captura de imagem Vilber Lourmat (ECX·20.M, Vilber Lourmat, France) (ver **figura 6**).

Em relação ao polimorfismo T3111C do gene *Clock* temos na **figura 4**, o perfil do produto de amplificação de 18 amostras do grupo controle, representativa para os demais. Podemos observar a presença de uma única banda um pouco maior que 200pb, compatível com o tamanho esperado (221pb) para o produto de amplificação produzido com os *primers*

utilizados (ver tabela 2). A não detecção de banda espúria nas amostras e no controle negativo (reação sem DNA) indica, respectivamente, uma amplificação específica e sem contaminação.

Na **figura 5**, observa-se o perfil de amplificação do fragmento de 114pb contendo o polimorfismo C111G em 12 amostras do grupo de pacientes, representativa das demais. Através de uma análise visual, observa-se que as raias de 1 a 13 e C+, apresentam uma única banda acima de 100pb padrão compatível com o esperado na amplificação do fragmento do gene *Per2* com os *primers* utilizados. A não detecção de bandas no controle negativo, reação sem DNA (raia C-) indica uma amplificação específica e sem contaminação.

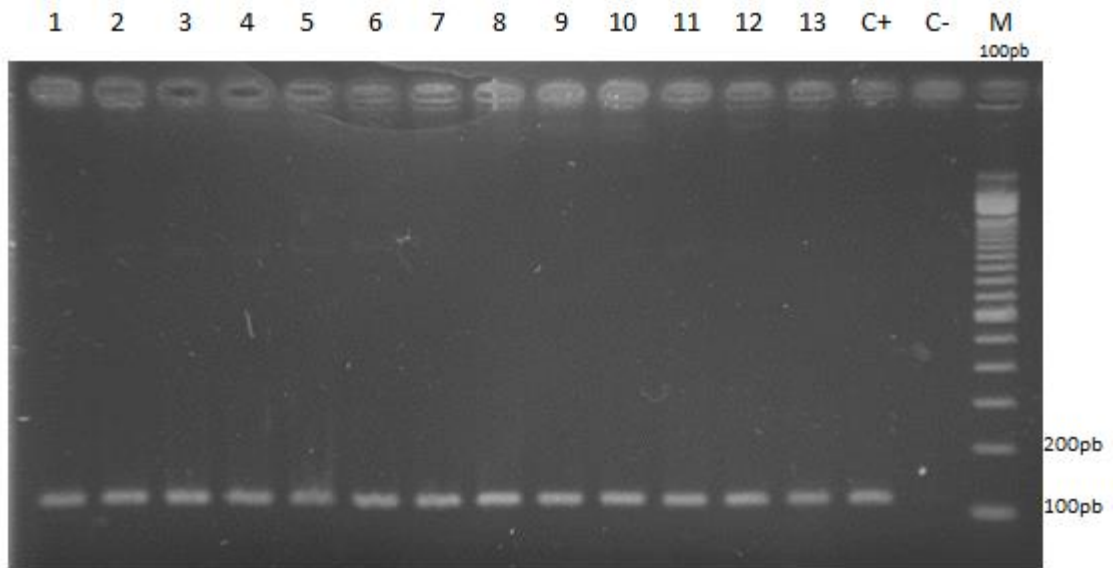
Figura 4 - Produtos de amplificação do fragmento do gene *Clock* que contém o polimorfismo T3111C.



Eletroforese em gel de agarose 2,0%. Raias 1-18: Produtos da reação de PCR para diferentes amostras de indivíduos do grupo controle; Raia C+: controle positivo; Raia C-: controle negativo; Raia M: marcador de peso molecular 100pb.

Fonte: Autora, 2013.

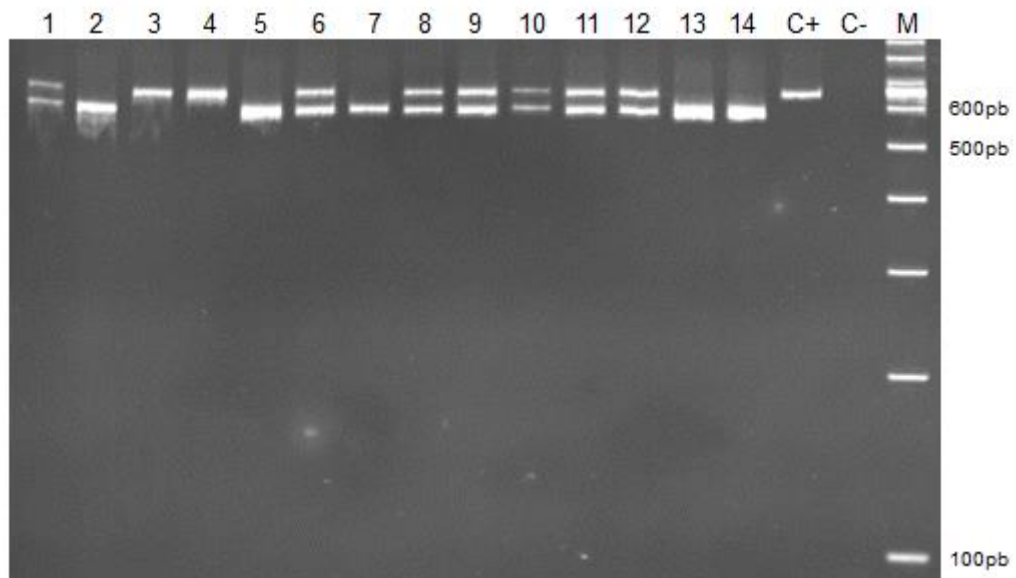
Figura 5 - Produtos de amplificação do fragmento do gene *Per2* que contém o polimorfismo C111G.



Eletroforese em gel de agarose 2,0%. Raias 1-13: Produtos da reação de PCR para diferentes amostras do grupo de pacientes; Raia C+: controle positivo; Raia C-: controle negativo. Raia M: marcador de peso molecular 100pb.

Fonte: Autora, 2013.

Figura 6 - Produtos de amplificação do fragmento do gene *Per3* que contém o polimorfismo VNTR (4 e 5 repetições).



Eletroforese em gel poliacrilamida 6%. Raias 1-14: Produtos da reação de PCR para diferentes amostras de indivíduos do grupo controle; Raia C+: controle positivo 5/5; Raia C-: controle negativo. Raia M: marcador de peso molecular 100pb.

Fonte: Autora, 2013.

Na **figura 6**, observa-se o perfil do produto de amplificação contendo o VNTR (4 e 5 repetições) do gene *Per3* em 14 amostras do grupo controle, representativa das demais. Para esse polimorfismo, especificamente, a genotipagem foi baseada neste perfil eletroforético. Podemos observar através de uma análise visual, três padrões distintos de bandas. Para as amostras nas raias 1, 6, 8, 9, 10, 11 e 12 observa-se dois fragmentos (635 e 581pb), indicando a presença de dois alelos diferentes (com 4 e 5 repetições), compatível com o genótipo heterozigoto. Para as amostras nas raias 2, 5, 7, 13 e 14 observa-se um único fragmento de 581pb, compatível com o esperado para o genótipo homozigoto referente ao alelo com 4 repetições. Para as amostras nas raias 3, 4 e C+, a presença de uma única banda acima de 600pb, compatível com o esperado para o genótipo homozigoto referente ao alelo com 5 repetições.

4.4.2.3 Reações de restrição

Para as reações de restrição dos polimorfismos dos genes *Clock* e *Per2* foram utilizados, respectivamente, 20µL e 10µL da reação de PCR e submetidos à reação de restrição em volume final de 30µL (**tabela 4**), conforme recomendações do fabricante das enzimas de restrição (**tabela 5**).

Tabela 4 - Condições da reação de restrição para os diferentes produtos de amplificação.

Gene	Enzima	Condições
<i>Clock</i>	SduI (Bsp1286I) (1U)*	37°C, 16 horas
<i>Per2</i>	HpyCH4V (1U)**	37°C, 16 horas

* Fermentas, Life science. ** *New England Biolabs, Beverly, MA, USA*.

Fonte: Autora, 2013.

Tabela 5 - Composição da reação de restrição usando as enzimas de restrição SduI e HpyCH4V para determinação do genótipo dos genes *Clock* e *Per2*, respectivamente.

Genes	Reagentes	Volume (µL)
T311C <i>Clock</i>	Produtos de PCR	20µL
	H ₂ O ultrapura	6,9µL
	Tampão da enzima (10x)	3µL (1X)
	Enzima SduI (Bsp1286I) (10U/µL)	0,1µL (1U)
	<i>Volume final</i>	30µL
C111G <i>Per2</i>	Produtos de PCR	10µL
	H ₂ O ultrapura	16,8µL
	Tampão da enzima (10x)	3µL (1X)
	Enzima HpyCH4V (5U/µL)	0,2µL (1U)
	<i>Volume final</i>	30µL

Fonte: Autora, 2013.

4.4.2.3.1 Visualização dos produtos das reações de restrição

A visualização dos produtos das reações de restrição foi obtida através de eletroforese em gel de poliacrilamida 6% (*Clock*) e 8% (*Per2*). Para isso, foi utilizado o volume total (30µl) da reação de restrição, misturados a 5µL LB 6X. Em seguida, as amostras foram aplicadas em seus respectivos géis conforme citado acima e submetidas à eletroforese. Após migração das amostras (fonte: 145V; 75mA; 36W), os géis foram corados em brometo de etídeo (0,5µg/mL), e fotografados sob luz ultravioleta com o auxílio de um sistema digital de captura de imagem Vilber Lourmat (ECX•20.M, *Vilber Lourmat, France*) e as imagens devidamente documentadas.

4.4.2.4 Genotipagem

A genotipagem das diferentes amostras para os três polimorfismos analisados (ver tabela 1) foi baseada nos critérios apresentados no delineamento experimental adotado (**tabela 6**).

Tabela 6 - Critérios para genotipagem com base no perfil eletroforético após a PCR ou PCR-RFLP.

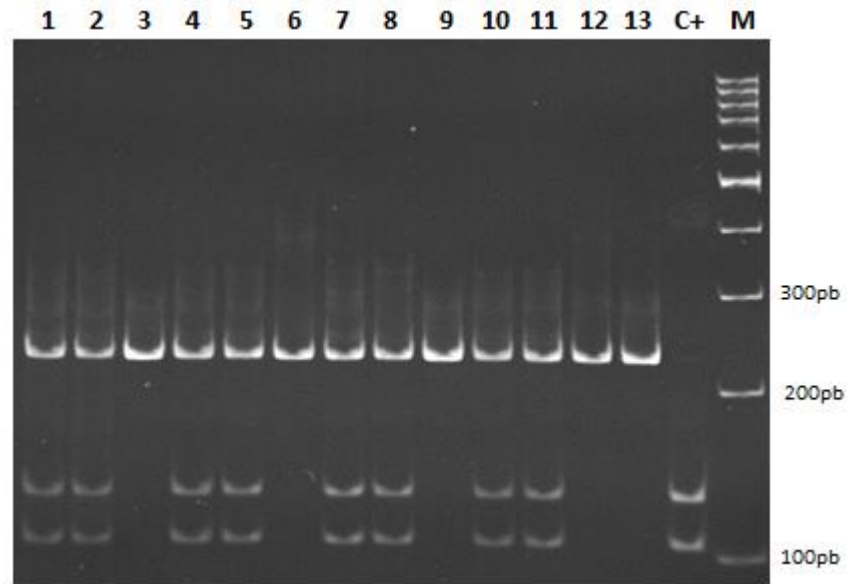
Gene	Genótipo	Perfil eletroforético
<i>Clock</i>	T/T	221pb
	T/C	221 + 125pb + 96pb
	C/C	125pb + 96pb
<i>Per2</i>	C/C	114pb
	C/G	114 + 61pb + 53pb
	G/G	61pb + 53pb
<i>Per3</i>	4/4	581pb
	4/5	581pb + 635pb
	5/5	635pb

Fonte: Autora, 2013.

O perfil eletroforético da restrição para polimorfismo T3111C do gene *Clock* apresenta 3 padrões diferentes (ver tabela 6), conforme observado na **figura 7**, onde 13 amostras da população controle foram analisadas. Podemos notar que as amostras das raias 3, 6, 9, 12 e 13 apresentam um único fragmento um pouco acima de 200pb como produto da restrição, perfil compatível com o genótipo homozigoto T/T; as raias 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 e 11, apresentam 3 fragmentos (221pb; 125pb e 96pb), representando o genótipo heterozigoto T/C;

a amostra na raia C+ apresenta 2 fragmentos como produto de restrição, perfil compatível com o esperado para o genótipo homozigoto C/C (125pb e 96pb), já que o alelo C apresenta sítio de restrição para SduI (*Fermentas, Life Science*).

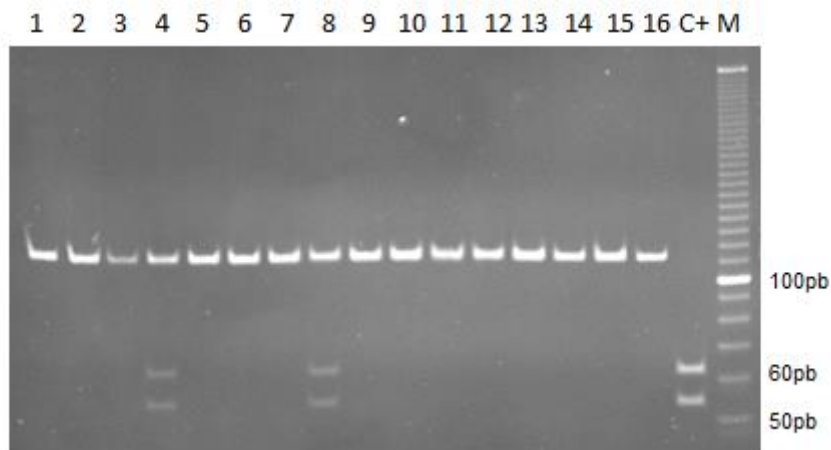
Figura 7 - Perfil de restrição dos produtos de PCR referentes ao fragmento do gene *Clock*.



Eletroforese em gel de poliacrilamida 6%. Raias 1-13: produtos de PCR de diferentes amostras submetidos à restrição. Raia C+: controle positivo; Raia M: Marcador de peso molecular 100pb.

Fonte: Autora, 2013.

Figura 8 - Perfil de restrição dos produtos de PCR referentes ao fragmento do gene *Per2*.



Amostras referentes à população de pacientes. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%. Raias 1-16: produtos de PCR de diferentes amostras submetidos à restrição. Raia C+: controle positivo; Raia M: Marcador de peso molecular 10pb.

Fonte: Autora, 2013.

O polimorfismo C111G do gene *Per2*, possui 3 padrões distintos de restrição, conforme a tabela 5. Na **figura 8**, observa-se o perfil de restrição de 16 amostras do grupo de pacientes, representativa das demais reações. A amostra da raia C+ apresenta dois fragmentos (61pb e 53pb) como produto da restrição, perfil compatível com o genótipo homozigoto G/G, uma vez que o alelo G apresenta sítio de restrição para HpyCH4V (*New England Biolabs, Beverly, MA, USA*); as amostras nas raias 1, 2, 3, 5, 6, 7 e 9 a 16, apresentam 1 fragmento como produto de restrição, perfil compatível com o esperado para o genótipo homozigoto C/C (114pb) e as raias 4 e 8, apresentam 3 fragmentos (114pb; 61pb e 53pb), representando o genótipo heterozigoto C/G.

4.5 Análises estatísticas

4.5.1 Dados clínicos

Os dados clínicos coletados foram armazenados em software de planilha eletrônica (Microsoft Excel) e sua análise descritiva e inferencial desenvolvida pelo programa estatístico SPSS® (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 15.0.

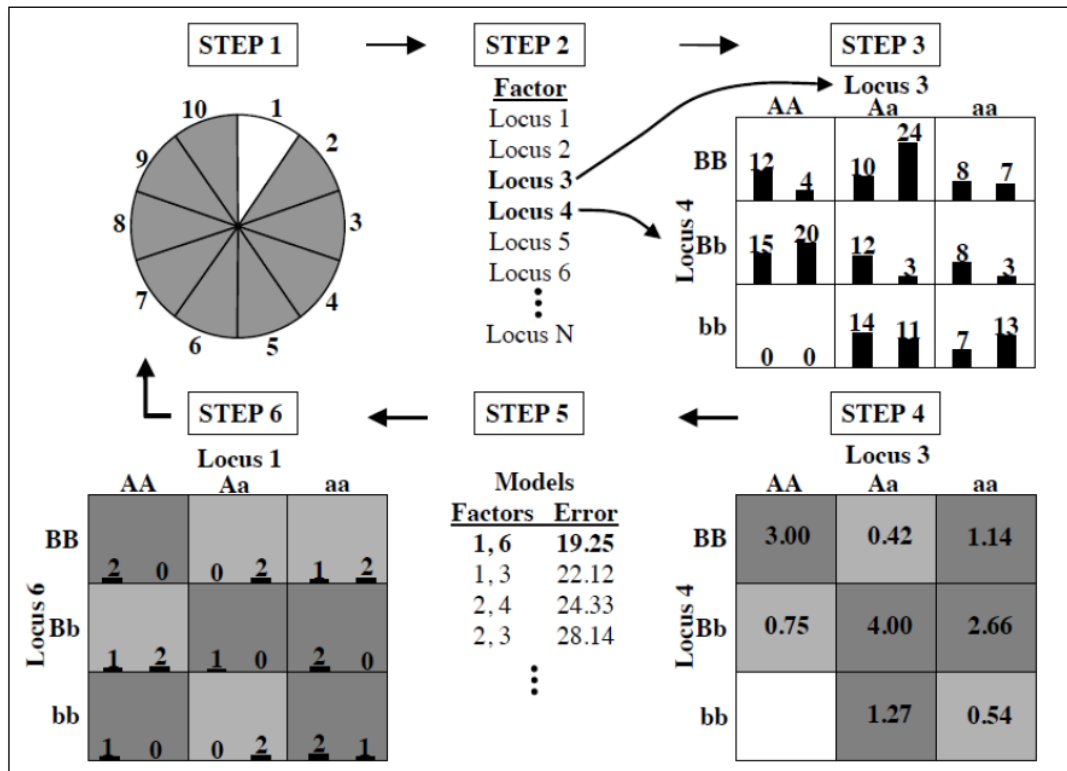
4.5.2 Dados genéticos

Quanto a análise estatística do estudo de associação, foram realizadas através do software online SNPstats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>) disponibilizado pelo Instituto Catalão de Oncologia (ICO, Barcelona, Espanha) e software MDR (*Multifactor Dimensionality Reduction*), desenvolvido pelo *National Institutes of Health* (NIH, Maryland, USA), disponibilizado em <http://www.multifactor dimensionality reduction.org>. Onde, os seguintes parâmetros foram analisados: frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos estudados, teste para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizando o teste do qui-quadrado; análise de associação com epilepsia baseada em regressão logística, *Odds ratio* (OR) com intervalo de confiança de 95% e interação gênica pelo método MDR com valor de p determinado pelo MDR *Permutation Testing Software* (beta 0.4.5). Para calcular o tamanho da amostra e analisar o poder do teste estatístico, foi utilizado o software G*POWER 3.1.7, disponibilizado pelo Instituto de Psicologia Experimental da *Heinrich-Heine University*, Alemanha (<http://www.psych.uni-duesseldorf.de/abteilungen/aap/gpower3/download-and-register>).

4.5.2.1 Análise por MDR (*Multifactor Dimensionality Reduction*)

A identificação de interações gênicas é um difícil desafio para doenças complexas e multifatoriais. Estas interações são difíceis de detectar e caracterizar usando métodos paramétricos tradicionais. Dessa forma, pensando em parâmetros acurados e com melhor poder de detecção de interações, Hahn e colaboradores (2003) desenvolveram um método livre de modelo genético e não paramétrico chamado MDR (*Multifactor Dimensionality Reduction*). Método utilizado para detectar e caracterizar interações gene-gene e gene-ambiente em estudos caso-controle com amostras relativamente pequenas (RITCHIE et al., 2001). A **figura 9** ilustra as etapas envolvidas na execução do método MDR para estudos caso-controle.

Figura 9 - Resumo das etapas envolvidas na execução do método de MDR



Na etapa 1, os dados são divididos em grupos de treino (9/10 dos dados) e um grupo teste (1/10 dos dados). Na etapa 2, um conjunto de fatores genéticos ou ambientais são selecionados dentre os dados gerais. Na etapa 3, os N fatores e suas possíveis células multifatoriais são apresentadas em um espaço N dimensional. Na etapa 4, cada célula de multifatores é classificada em alto risco, quando a razão de casos/controles ultrapassa o limiar ($T=1$) e como de baixo risco, quando a razão de casos/controle é menor que o limiar ($T<1$). Nas etapas 5 e 6, o modelo com menor erro de predição é adotado. As etapas de 1 a 6 são repetidas para cada teste de validação cruzada possível. Células cinza-escuras: combinação de genótipos de alto risco; células cinza-claras: combinação de genótipos de baixo risco; células em branco: combinações de genótipos nas quais nenhum dado foi observado. Distribuição dos casos (barras à esquerda) e controles (barras da direita).

Fonte: Adaptada de Hahn et al., 2003.

Na **etapa 1**, é realizada randomicamente a divisão dos dados em 10 partes iguais para a validação cruzada (*cross-validation*), onde 9/10 desta divisão representa o conjunto de treino (*training test*) e 1/10 o conjunto de teste (*testing set*). Na **etapa 2**, cada décima parte desta divisão é disposta em uma lista com todas as variáveis a serem analisadas (por exemplo, fatores genéticos e/ou ambientais). Em seguida, na **etapa 3**, o programa explora estes dados à procura de padrões consistentes para detectar relacionamentos sistemáticos entre variáveis, detectando assim as possíveis combinações, então estes fatores são representados em um espaço tridimensional (figura genótipo-fenótipo), onde cada célula representa a quantidade de pacientes e controles para cada combinação de genótipos, por exemplo, 2 polimorfismos com 3 genótipos cada, formam nove combinações de genótipos. Na próxima etapa (**4**), cada célula representada no espaço tridimensional (figura genótipo-fenótipo) é rotulada em alto e baixo risco de acordo com a razão entre casos e controles do estudo, que para este exemplo atende ou excede um limite $T=1,0$. As células são classificadas em Baixo risco quando a razão entre casos e controles (casos/controles) é $<1,0$ e Alto risco, quando esta razão for $>1,0$. Este processo reduz as diversas variáveis em um modelo de uma dimensão com duas classes: alto-risco e baixo-risco. Na **etapa 5**, os passos 2 a 4 foram repetidos para todas as outras combinações e o modelo escolhido foi aquele que possuía o menor número de indivíduos mal classificados no conjunto de treino, sendo considerado o “melhor” modelo. Na **etapa 6**, o conjunto de teste (1/10) é utilizado para calcular o erro de predição, ou seja, o modelo que tiver o menor número de indivíduos erroneamente identificados quando comparado ao melhor modelo selecionado no conjunto de treino.

As etapas de 1 a 6 são repetidas 10 vezes e os resultados para o conjunto de treino e teste de cada repetição são separados, obtendo-se 10 erros de predição para cada conjunto. Outras medidas de avaliação do modelo geradas pela validação cruzada são o teste de acurácia balanceado para os conjuntos de treino (*training balance accuracy*) e teste (*testing balance accuracy*), que representa a média das taxas de acerto de cada conjunto; a outra medida é a Consistência da Validação Cruzada (CVC), medida do número de vezes em que o modelo gerado pelo algoritmo é identificado em cada uma das 10 fatias possíveis contendo 9/10 da amostra. Finalmente, pode-se fazer um teste estatístico do modelo escolhido através da CVC e erro preditivo, usando uma estratégia de teste de permutação.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação Clínica

Setenta e quatro pacientes com EMJ e 76 controles com distribuição semelhante entre idade e sexo foram submetidos ao protocolo para avaliação das características do sono e preferência diurna (ver metodologia). As análises estatísticas foram realizadas com o grupo total de pacientes e indivíduos controles, e com um subgrupo destes pacientes em uso de monoterapia com VPA (n=36).

5.1.1 Perfil clínico dos pacientes e indivíduos controles

As características sócio-demográficas referentes ao grupo total de pacientes (n=74) e indivíduos controles (n=76) que foram submetidos ao protocolo do sono estão descritas na **tabela 7**. As características apresentadas foram semelhantes para pacientes e controles, sem qualquer diferença significativa.

Tabela 7 - Dados sócio-demográficos dos pacientes e controles.

Características	Pacientes (n=74)	Controles (n=76)	Valor de p
Sexo			
Feminino	48 (64,9,5%)	49 (64,5%)	0,960 ^b
Masculino	26 (35,1%)	27 (35,5,9%)	
IMC	24,4±4,5	24,5±4,6	0,944 ^a
Idade	25,7±8,5	28,2±8,9	0,084 ^a
Raça			
Branco	13 (17,6%)	16 (21,1%)	0,115 ^b
Pardo	59 (79,7%)	52 (68,4%)	
Negro	2 (2,7%)	8 (10,5%)	
Estado civil			
Solteiro	44 (59,5%)	44 (57,9%)	0,851 ^b
Casado	29 (39,2%)	30 (39,5%)	
Divorciado	1 (1,4%)	2 (2,6%)	
Renda familiar	405,9±336,9	524,54±430,2	0,069 ^a
Escolaridade			
Ensino fundamental	24 (32,4%)	22 (47,8%)	0,122 ^b
Ensino médio	32 (43,2%)	24 (31,6%)	
Ensino superior	18 (24,3%)	30 (39,5%)	

^aTeste T; ^b Teste Qui-quadrado; IMC (Índice de Massa Corpórea).

Na **tabela 8**, observam-se os dados sobre o perfil clínico dos pacientes que responderam a entrevista sobre distúrbios do sono (Apêndice B), onde os parâmetros sobre crises para o grupo total de paciente e grupo de pacientes em monoterapia com VPA foram detalhados.

Tabela 8 - Perfil clínico de todos os pacientes com EMJ e em monoterapia com VPA.

Parâmetros	n= 74 (100%)
Idade média de início das crises (\pm DP)	12,57 \pm 4,5
Crises mioclônicas	74 (100%)
Crises de ausência	46 (62,2%)
CTCG	70 (94,6%)
Parâmetros	monoterapia com VPA (n=36)
Idade média de início das crises	14,74 \pm 5,4
Crises mioclônicas	36 (100%)
Crises de ausência	19 (52,8%)
CTCG	28 (77,8%)

CTCG (Crise Tônico-Clônico Generalizada); DP (Desvio Padrão); VPA (Valproato de sódio).

Fonte: Autora, 2013.

Em relação ao predomínio de horário das crises, trinta e sete (50%) pacientes relataram que as crises mioclônicas possuíam horário preferencial de ocorrência. Destes pacientes, vinte e nove (78,4%) pacientes apresentaram as crises pela manhã, 2 (5,4%) pacientes apresentaram as crises a tarde, 4 (10,8%) apresentaram as crises a noite e 2 (5,4%) pacientes relataram predomínio de horário, mas não informaram o período do dia. Quanto as CTCG, 33 pacientes (44,6%) apresentaram predomínio de horário. Destes pacientes, 29 (87,9%) apresentaram as crises no período matutino e 4 (12,1%) no período noturno.

Quanto ao tratamento medicamentoso, sessenta e cinco pacientes (87,9%) estavam em uso de DAE, 3 (4%) não estavam usando nenhum medicamento e 6 (8,1%) não informaram a DAE usada. Dos 65 pacientes que usavam DAE, 46 (70,8%) faziam uso de monoterapia e 19 (29,2%) de politerapia. Dos pacientes em uso de monoterapia, 36 (78,3%) usavam VPA e 10 (21,7%) outros tipos de DAEs.

5.1.2 Avaliação dos Distúrbios do sono para pacientes e controles

Os dados relacionados com os principais distúrbios de sono apresentados pelos pacientes com EMJ e indivíduos controles, obtidos através do protocolo sobre os hábitos e alterações no sono estão descritos na **tabela 9**.

Os pacientes com EMJ apresentaram maior prevalência de insônia ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle. Pacientes também apresentaram maior prevalência de roncos moderados e graves ($p = 0,012$), cansaço ao acordar mais que três vezes por semana ($p = 0,007$) e cefaleia matinal mais que três vezes por semana ($p = 0,008$). A prevalência de SDE mostrou uma tendência à significância ($p = 0,091$).

Tabela 9 - Distúrbios do sono em pacientes e controles, considerados a partir das respostas obtidas através do protocolo do sono.

Parâmetros	Pacientes (n=74)	Controles (n=76)	p^a
Insônia	35 (47,3%)	14 (18,4%)	<0,001
Parassonias	29 (39,2%)	28 (50,9%)	0,867
SPI	4 (5,4%)	2 (2,6%)	0,439
Pausas respiratórias	14 (18,9%)	10 (13,2%)	0,379
Roncos	34 (45,9%)	28 (36,8%)	0,320
Roncos moderados e graves	14 (18,9%)	4 (5,3%)	0,012
Cansado ao acordar >3x/s	29 (39,2%)	14 (18,4%)	0,007
Cefaleia matinal >3x/s	13 (17,6%)	3 (3,9%)	0,008
SDE	33 (44,6%)	23 (30,3%)	0,091
Qualidade do sono ruim	33 (44,6%)	26 (34,2%)	0,242

SPI (Síndrome das Pernas Inquietas), SDE (Sonolência Diurna Excessiva); $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. ^a Qui-quadrado foi o teste estatístico utilizado para análise.

Fonte: Autora, 2013.

A **tabela 10** mostra as características sobre a quantidade do sono dos pacientes e controles. A latência do sono corresponde ao tempo que os indivíduos levam para adormecer após deitar na cama e a eficiência do sono corresponde à relação entre tempo deitado na cama e o tempo de sono expressa em porcentagem. Observa-se que, durante a semana, o tempo na cama e tempo de sono foram maiores nos pacientes quando comparados ao grupo controle. Quanto à latência do sono durante a semana, apesar de não haver diferença entre os grupos ($p = 0,099$), nota-se que os pacientes demoram em média mais tempo para dormir ($36,78 \pm 47,6$). Quanto à eficiência e latência do sono no fim de semana, nenhuma diferença significativa foi detectada entre os grupos.

Tabela 10 - Características sobre a quantidade de sono dos pacientes e controles

Parâmetros	Pacientes (n=74)	Controles (n=76)	p *
Semana			
Tempo na cama (min, ±DP)	511,96 (±111,2)	453,75 (±90,1)	0,001
Tempo de sono (min, ±DP)	458,22 (±111,8)	413,33 (±86,2)	0,007
Eficiência do sono (%)	89,60 (±10,7)	91,30 (±8,0)	0,272
Latência do sono (min±DP)	36,78 (±47,6)	25,68 (±33,3)	0,099
Fim de semana			
Tempo na cama (min, ±DP)	566,01(±110,0)	537,57 (±108,6)	0,113
Tempo de sono (min, ±DP)	516,39 (±105,1)	490,72 (±100,0)	0,113
Eficiência do sono (%)	91,41 (±8,6)	91,71 (±9,1)	0,834
Latência do sono (min±DP)	28,14 (±32,96)	22,76 (±35,2)	0,337

DP (Desvio padrão); min (minutos); * Teste qui-quadrado.

Fonte: Autora, 2013.

Presença de SDE definida por escore >10 na ESE, foi vista em 33 (44,6%) pacientes e má qualidade do sono, definida por pontuação no IQSP ≥ 6 , foi observada em 33 (44,6%) pacientes. Quando comparados aos controles (**tabela 11**), no entanto, nenhuma diferença significativa foi detectada. A média do escore da ESE foi semelhante entre os grupos. A pontuação média do IQSP foi significativamente elevada em pacientes ($p=0,006$).

Tabela 11 - Comparação do IQSP e ESE entre pacientes e controles.

Parâmetros	Pacientes (n=74)	Controles (n=76)	p
ESE escore ≥ 11	33 (44,6%)	23 (30,3%)	0,091 ^a
ESE média (DP)	9,89 (±4,8)	9,17(±3,7)	0,306 ^b
IQSP ≥ 6	33 (44,6%)	26 (34,2%)	0,242 ^a
IQSP média (DP)	6,28(±3,9)	4,75(±2,7)	0,006

ESE (Escala de Sonolência de Epworth), IQSP (Índice de Qualidade do Sono de Pittsburgh); ^a Teste Qui-quadrado; ^b Teste T.

Fonte: Autora, 2013.

5.1.3 Perfil clínico dos pacientes em monoterapia apenas com VPA e controles

As características sócio-demográficas apresentadas pelos pacientes em monoterapia com VPA (n=36) e indivíduos controle (n=76) estão representadas na **tabela 12**. Os dados para este subgrupo de pacientes foram semelhantes quando comparados ao grupo controle,

exceto quanto à idade ($p=0,040$), revelando indivíduos controle com maior idade média que os pacientes.

Tabela 12 - Dados sócio-demográficos dos pacientes em monoterapia com VPA e controles.

Características	Pacientes (n=36)	Controles (n=76)	Valor de p
Sexo			
Feminino	22 (61,1%)	49 (50,5%)	0,834 ^b
Masculino	14 (38,9%)	27 (50,9%)	
IMC	24,7±4,4	24,5±4,6	0,862 ^a
Idade	24,61±7,7	28,2±8,9	0,040^a
Raça			
Branco	7 (19,4%)	16 (21,1%)	
Pardo	29 (80,6%)	52 (68,4%)	0,115 ^b
Negro	0 (0%)	8 (10,5%)	
Estado civil			
Solteiro	22 (61,1%)	44 (57,9%)	
Casado	14 (38,9%)	30 (39,5%)	0,690 ^b
Divorciado	0 (0%)	2 (2,6%)	
Renda familiar	532,9±366,6	524,54±430,2	0,922 ^a
Escolaridade			
Ensino fundamental	10 (27,8%)	22 (28,9%)	
Ensino médio	14 (38,9%)	24 (31,6%)	0,725 ^b
Ensino superior	12 (28,6%)	30 (39,5%)	

^a Teste T; ^b Teste Qui-quadrado; IMC (Índice de Massa Corpórea)

Fonte: Autora, 2013.

Quando analisamos as características da quantidade do sono apenas nos pacientes em uso de monoterapia com VPA (**tabela 13**), observamos as mesmas características apresentadas quando foi analisado o grupo total de pacientes (ver tabela 10). O tempo na cama ($p<0,001$) e tempo de sono durante a semana ($p<0,001$) foi significativamente maior nos pacientes quando comparados ao grupo controle, embora a eficiência do sono não apresente diferença ($p=0,240$). Quanto à latência do sono durante a semana e fim de semana, apesar de não haver diferença entre os grupos, há uma tendência ($p=0,077$) dos pacientes apresentarem maior dificuldade em adormecer em relação ao grupo controle. Em relação à eficiência e latência do sono no fim de semana, nenhuma diferença entre os grupos foi observada.

Tabela 13 - Características habituais do sono dos pacientes em monoterapia com VPA e indivíduos controles

Parâmetros	Pacientes (n=36)	Controles (n=76)	p
Semana			
Tempo na cama (min±DP)	520,00 (±92,4)	453,75 (±90,1)	p<0,001
Tempo de sono (min±DP)	463,33 (±96,2)	413,33 (±86,2)	p<0,001
Eficiência do sono (%)	89,60 (±10,7)	91,30 (±8,0)	0,240
Latência do sono (min±DP)	38,61±40,8	25,68±33,3	0,077
Fim de semana			
Tempo na cama (min±DP)	554,86 (±111,3)	537,57 (±108,6)	0,436
Tempo de sono (min ±DP)	499,58 (±107,6)	490,72 (±100,0)	0,670
Eficiência do sono (%)	90,12 (±9,7)	91,71 (±9,1)	0,399
Latência do sono (min±DP)	32,22 (±34,7)	22,76 (±35,22)	0,185

DP (Desvio padrão); min (minutos); * Teste qui-quadrado.

Fonte: Autora, 2013.

Os distúrbios do sono identificados nos pacientes em monoterapia com VPA estão descritos na **tabela 14**. Este subgrupo também apresentou diferença significativa quando investigados sobre insônia ($p<0,001$) em relação ao grupo controle. Quanto às outras alterações no sono, nenhuma diferença foi detectada.

Tabela 14 - Distúrbios do sono em pacientes em monoterapia com VPA e controles, considerados a partir das respostas da aplicação do protocolo do sono.

Parâmetros	Pacientes (n=36)	Controles (n=76)	p ^{a,b}
Insônia	19 (52,8%)	14 (18,4%)	<0,001
Parassonias	10 (27,8%)	28 (50,9%)	0,398
SPI	1 (2,8%)	2 (2,6%)	0,964
Pausas respiratórias	3 (8,3%)	10 (13,2%)	0,544
Roncos moderados e graves	4 (11,1%)	4 (5,3%)	0,262
Roncos	19 (52,8%)	28 (36,8%)	0,110
Cansado ao acordar >3x/s	12 (18,4%)	14 (18,4%)	0,081
Cefaleia matinal >3x/s	4 (11,1%)	3 (3,9%)	0,144
SDE	15 (41,7%)	23 (30,3%)	0,234
Qualidade do sono ruim	12 (33,3%)	26 (34,2%)	1,00

SPI (Síndrome das Pernas Inquietas), SDE (Sonolência Diurna Excessiva), $P<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. ^a Qui-quadrado e Teste T^b foram os testes estatísticos utilizados para análise.

Fonte: Autora, 2013.

Os resultados dos escores do IQSP e ESE para o grupo de pacientes em uso de monoterapia com VPA em comparação com o grupo controle estão descritos na **tabela 15**. Nesta tabela, observa-se a frequência e a média dos escores de cada instrumento e o valor de *p* obtido através da comparação entre os grupos, para qual nenhuma diferença significativa foi encontrada.

Tabela 15 - Comparação do IQSP e ESE entre pacientes em uso de monoterapia com VPA e controles.

Parâmetros	Pacientes (n=36)	Controles (n=76)	<i>p</i>
ESE escore ≥ 11	15 (41,7%)	23 (30,3%)	0,234 ^a
ESE média (DP)	9,22 ($\pm 4,9$)	9,17($\pm 3,7$)	0,951 ^b
IQSP ≥ 6	12 (33,3%)	26 (34,2%)	1,000 ^a
IQSP média (DP)	5,33 ($\pm 3,2$)	4,75($\pm 2,7$)	0,316 ^b

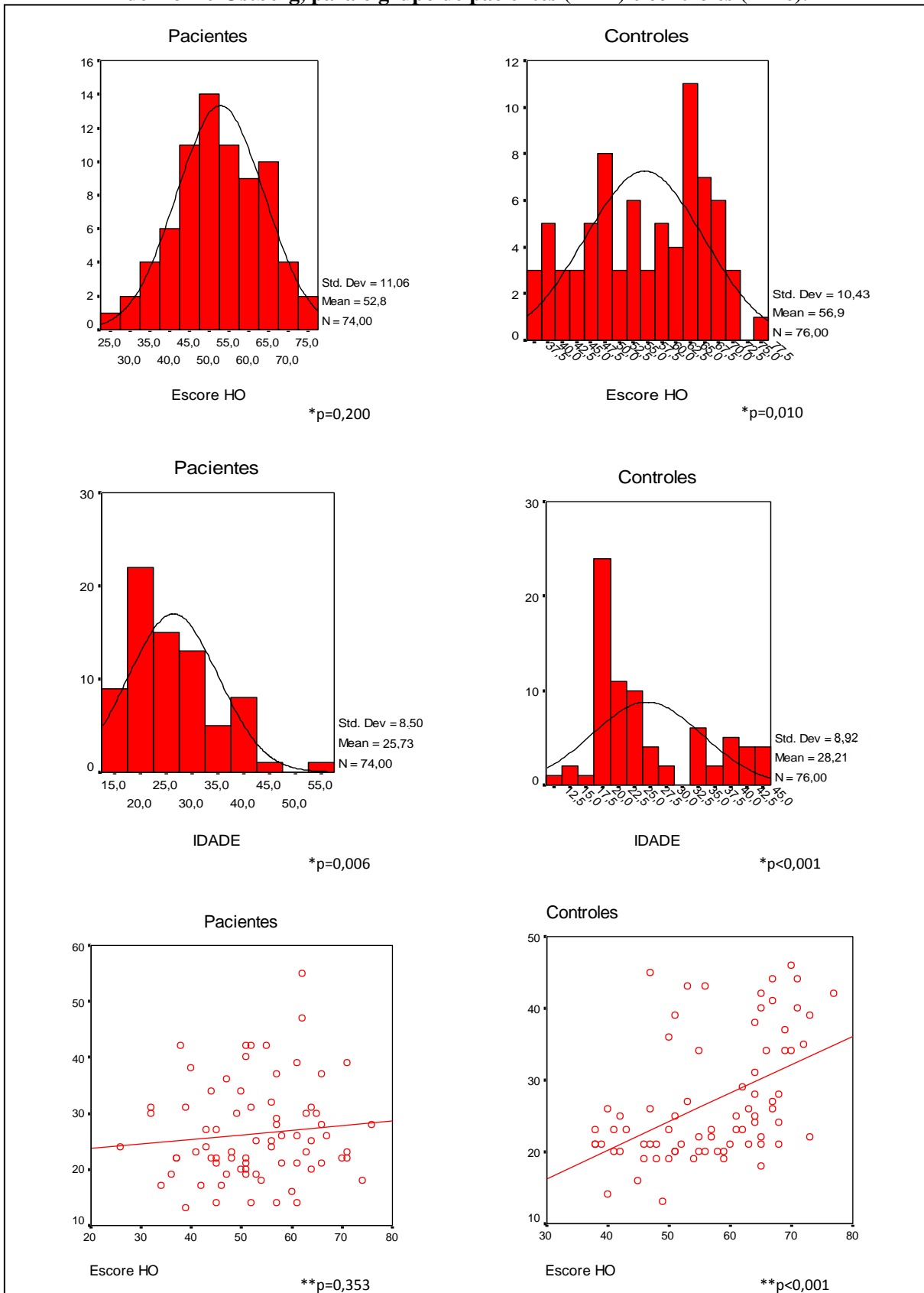
ESE (Escala de Sonolência de *Epworth*), IQSP (Índice de Qualidade do Sono de *Pittsburgh*); ^a Teste Qui-quadrado; ^b Teste T.

Fonte: Autora, 2013.

5.1.4 Avaliação da preferência diurna entre pacientes e controles

Na **figura 10**, estão dispostas as análises estatísticas realizadas para avaliar a distribuição dos escores do questionário *Horne-Ostberg* (HO) e idade dos grupos analisados, pacientes (n=74) e controles (n=76). Foram realizados testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para avaliar se o escore do questionário HO e idade dos grupos analisados apresentavam distribuição normal. Foi observado que os dados do escore do questionário HO apresentou distribuição normal para pacientes ($p=0,200$) e não normal para os indivíduos controles ($p=0,010$). Quanto a distribuição da idade para pacientes ($p=0,006$) e controles ($p<0,001$) foi observado distribuição não normal para ambos os grupos. Além disso, foi realizado o teste de correlação de Spearman para avaliar se havia relação entre escore do questionário HO e idade, para os dois grupos (pacientes e controles). Foi observado que há uma correlação positiva entre o escore e a idade para o grupo controle ($p<0,001$), onde se observa que quanto maior a idade, maior o escore do HO. Quanto ao grupo de pacientes, não foi observado correlação entre idade e escore ($p=0,353$).

Figura 10 - Gráficos com análises de distribuição dos dados para idade e escore do questionário de Horne-Ostberg, para o grupo de pacientes (n=74) e controles (n=76).



* Teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov; ** Coeficiente de correlação de Spearman

A preferência diurna observada no grupo total de pacientes e indivíduos controles obtida através do questionário de matutuidade e vespertinidade de *Horne-Ostberg* (HO) está descrita na **tabela 16**. Nenhuma diferença significativa foi encontrada quando as frequências de cada perfil diurno foram comparadas entre casos e controles ($p=0,065$). No **gráfico 1** observamos os dados apresentados na tabela 16.

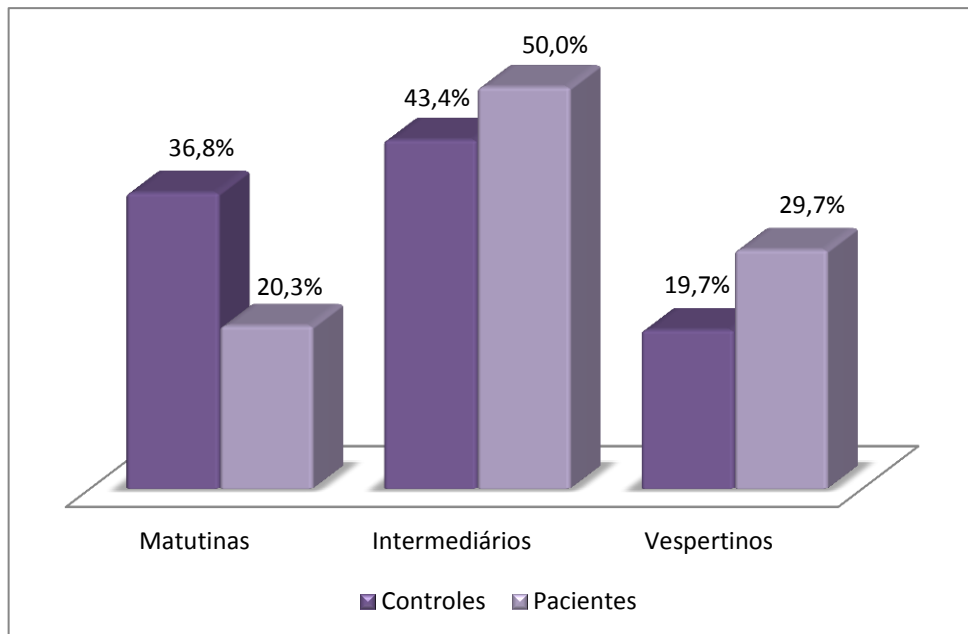
Tabela 16 - Distribuição da preferência diurna entre pacientes e controles.

Preferência diurna	Pacientes (n=74)	Controles (n=76)	p^*
Matutino	15 (20,3%)	28 (36,8%)	0,065
Intermediário	37 (50,0%)	33 (43,4%)	
Vespertino	22 (29,7%)	15 (19,7%)	

* Teste Qui-quadrado.

Fonte: Autora, 2013.

Gráfico 1 - Distribuição da preferência diurna entre pacientes e controles.



Fonte: Autora, 2013.

A **tabela 17** mostra as médias do escore para o Questionário de matutividade e vespertinidade de *Horne-Ostberg* (HO) para cada grupo analisado (todos os pacientes, pacientes em monoterapia com VPA e indivíduos controles). As análises estatísticas foram realizadas comparando as médias ou frequências entre pacientes (total e monoterapia com VPA) e grupo controle. Nota-se que tanto para o grupo com todos os pacientes ($n=74$, $p=0,021$), como para o grupo com monoterapia ($n=36$, $p=0,044$) houve diferença significativa entre os escores do HO quando comparados ao grupo controle.

Tabela 17 - Dados sócio-demográficos e média do escore do HO para os grupos analisados.

Grupos	Escore HO (média±DP)	p^a
Pacientes (n=74)	52,84±11,0	0,021
Pacientes em monoterapia com VPA (n=36)	52,56±11,8	0,044
Grupo controle (n=76)	56,95±10,43	---

^a Teste T; HO (Questionário de matutividade e vespertinidade de Horne-Ostberg); F (Feminino); M (Masculino); DP (Desvio Padrão); VPA (Valproato de sódio).

Fonte: Autora, 2013.

5.2 Análise genética

Para análise genética dos polimorfismos VNTR (4 e 5 repetições) do gene *Per3*, C111G do gene *Per2* e T3111C do gene *Clock*, foram utilizadas amostras de pacientes e controles armazenadas no banco de DNA de pacientes com Epilepsia do Estado de Alagoas. Para cada polimorfismo citado acima, foram genotipados 97 pacientes com EMJ e 212 indivíduos controles. As análises estatísticas para os polimorfismos estudados foram realizadas através do teste qui-quadrado e regressão logística (*software SNPStats*), interação gênica (*software MDR*) e o poder de detecção para o teste estatístico (*software GPOWER*).

A análise *a priori* do poder estatístico para o estudo foi realizada usando os seguintes parâmetros: teste de regressão logística; análise bicaudal; OR = 1,5; nível de significância $\alpha = 0,05$, $n = 309$. Apresentando um poder estatístico de 80%. A análise *post hoc* do poder estatístico para cada polimorfismo apresentou um valor inferior: 58% para o polimorfismo T3111C do gene *Clock* (parâmetros: teste de regressão logística; análise bicaudal; OR = 0,73; nível de significância $\alpha = 0,05$, $n = 309$); 19% para o VNTR 4 e 5 repetições do gene *Per3* (parâmetros: teste de regressão logística; análise bicaudal; OR = 1,17; nível de significância α

= 0,05, n = 309); 6% para o C111G do gene *Per2* parâmetros: teste de regressão logística; análise bicaudal; OR = 0,95; nível de significância $\alpha = 0,05$, n = 309).

5.2.1 Genotipagem dos indivíduos para o polimorfismo VNTR do gene *Per3*

Na **tabela 18**, observa-se as frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo VNTR (4 e 5 repetições) do gene *Per3* na população de pacientes e controle. No total foram 309 indivíduos genotipados, sendo 97 pacientes com EMJ e 212 indivíduos controle.

Tabela 18 - Frequências alélicas e genótípicas para o VNTR (4 e 5 repetições) do gene *Per3*, para cada grupo analisado (n=309).

	Grupo Epiléptico (n= 97)	Grupo Controle (n= 212)
Alelos		
4	127 (65%)	282 (67%)
5	67 (35%)	142 (33%)
Genótipos		
4/4	42 (43%)	95 (45%)
4/5	43 (45%)	92 (43%)
5/5	12 (12%)	25 (12%)

Fonte: Autora, 2013.

Para verificar se as populações estudadas estavam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi realizado o teste estatístico qui-quadrado (**tabela 19**). Observa-se que a distribuição genotípica nos grupos estudados não é estatisticamente diferente para uma população em equilíbrio *Hardy-Weinberg*. Além disso, o equilíbrio ainda permanece quando todos os indivíduos são analisados em conjunto, indicando que os grupos estudados são amostras representativas de suas populações.

Tabela 19 - Teste de equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (n=309) para o polimorfismo VNTR (4 e 5 repetições) do gene *Per3*.

	4/4	4/5	5/5	4	5	Valor de p
Todos os sujeitos	137	135	37	409	209	0,70
Controles	95	92	25	282	142	0,76
Pacientes	42	43	12	127	67	0,82

Fonte: Autora, 2013.

Tabela 20 - Análise comparativa entre as frequências genotípicas obtidas do polimorfismo VNTR (4 e 5 repetições) do gene *Per3*, para os grupos de pacientes e controles da população alagoana (n=309, análise ajustada para sexo + etnia).

VNTR (4 e 5 repetições) do gene <i>Per3</i> associação com STATUS (n= 309, ajustado para sexo e etnia)							
	Genótipo	Controles	Pacientes	OR (95% IC)	Valor de p*	CIA	CIB
Codominante	4/4	95 (44,8%)	42 (43,3%)	1,00			
	4/5	92 (43,4%)	43 (44,3%)	1,02 (0,61-1,71)	1,00	393,9	416,3
	5/5	25 (11,8%)	12 (12,4%)	1,03 (0,47-2,27)			
Dominante	4/4	95 (44,8%)	42 (43,3%)	1,00	0,94	391,9	410,6
	4/5-5/5	117 (55,2%)	55 (56,7%)	1,02 (0,62-1,67)			
Recessivo	4/4-4/5	187 (88,2%)	85 (87,6%)	1,00	0,96	391,9	410,6
	5/5	25 (11,8%)	12 (12,4%)	1,02 (0,48-2,14)			
Sobredominante	4/4-5/5	120 (56,6%)	54 (55,7%)	1,00	0,96	391,9	410,6
	4/5	92 (43,4%)	43 (44,3%)	1,01 (0,62-1,65)			
Aditivo	---	---	---	1,01 (0,71-1,46)	0,94	391,9	410,6

OR (*Odds Ratio*); CIA (Critério de Informação de Akaike); CIB (Critério de Informação Bayesiano); STATUS (Pacientes e Controles); * Regressão logística.

Fonte: Autora, 2013.

As frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo VNTR (4 e 5 repetições) do gene *Per3* obtidas foram comparadas entre os grupo de pacientes e controles, utilizando diferentes modelos de herança (**tabela 20**). A análise mostra que não houve diferença estatisticamente significativa nas frequências genotípicas entre os grupos estudados em todos os modelos de herança utilizados (codominância, dominância, recessivo, sobredominante e aditivo).

5.2.2 Genotipagem dos indivíduos para o polimorfismo C111G do gene *Per2*

Para o polimorfismo C111G do gene *Per2*, trezentos e nove indivíduos tiveram os genótipos determinados, destes 97 foram pacientes e 212 indivíduos do grupo controle. Na **tabela 21**, observam-se as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo para o grupo de pacientes e controles.

Tabela 21 - Frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo C111G do gene *Per2*, para cada grupo analisado (n=309).

	Grupo Epiléptico (n= 97)	Grupo Controle (n= 212)
Alelos		
C	183 (94%)	396 (93%)
G	11 (6%)	28 (7%)
Genótipos		
C/C	86 (89%)	184 (87%)
C/G	11 (11%)	28 (13%)
G/G	0 (0%)	0 (0%)

Fonte: Autora, 2013.

Para a população de pacientes, nota-se que o alelo 111C apresentou uma frequência de 94% (183 alelos) e o alelo 111G 6% (11 alelos). As frequências genóticas dos homocigotos C/C e G/G e do heterocigoto C/G foram, respectivamente: 89%, 0% e 11%. Já para o grupo controle, o alelo 111C apresentou uma frequência de 93% (396) e o alelo 111G 7% (28 alelos). As frequências genóticas para os homocigotos C/C e G/G e o heterocigoto C/G foram, respectivamente: 87%, 0% e 13%.

Tabela 22 - Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (n=309) para o polimorfismo C111G do gene *Per2*.

	C/C	C/G	G/G	C	G	Valor de p*
Todos os sujeitos	270	39	0	579	39	0,62
Controles	184	28	0	396	28	0,61
Pacientes	86	11	0	183	11	1

*Teste Qui-quadrado.

Fonte: Autora, 2013.

Como observado na **tabela 22**, as populações estudadas encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, indicando que os grupos estudados são representativos de suas populações.

Tabela 23 - Análise comparativa entre as frequências genóticas obtidas para o polimorfismo C111G do gene *Per2*, para os grupos de pacientes e controles da população alagoana (n=309, análise ajustada para sexo + etnia).

C111G do gene <i>Per2</i> associação com STATUS (n= 309, ajuste para sexo e etnia)							
Modelo	Genótipo	Controles	Pacientes	OR (95% IC)	Valor de p*	CIA	CIB
---	C/C	184 (86,8%)	86 (88,7%)	1,00	0,60	391,7	410,3
	C/G	28 (13,2%)	11 (11,3%)	0,82 (0,39-1,73)			

OR (*Odds Ratio*); CIA (Critério de Informação de Akaike); CIB (Critério de Informação Bayesiano); STATUS (Pacientes e Controles); * Regressão logística.

Fonte: Autora, 2013.

Na **tabela 23**, observa-se a análise comparativa entre as frequências genóticas obtidas do polimorfismo C111G do gene *Per2*, entre os grupos estudados, mostrando que não houve diferença estatisticamente significativa. No entanto, não houve comparação entre modelos de herança, porque os dados analisados não apresentaram o genótipo G/G, impossibilitando a comparação entre as frequências genóticas e modelos de herança.

5.2.3 Genotipagem dos indivíduos para o polimorfismo T3111C do gene *Clock*

As frequências alélicas e genóticas para o polimorfismo T3111C do gene *Clock*, tanto para o grupo de pacientes (n=97), quanto para o grupo controle (n=212) estão descritas na **tabela 24**. No grupo de pacientes, o alelo 3111T apresentou uma frequência de 75% (145 alelos) e o alelo 3111C de 25% (49 alelos). As frequências genóticas dos homozigotos T/T e C/C e do heterozigoto T/C foram, respectivamente: 56%, 6% e 38%. No grupo de indivíduos controle, o alelo 3111T apresentou uma frequência de 80% (340 alelos) e o alelo 3111C de 20% (84 alelos). As frequências genóticas dos homozigotos T/T e C/C e do heterozigoto T/C foram, respectivamente: 65%, 5% e 30%.

Tabela 24 - Frequências alélicas e genóticas para o polimorfismo T3111C na região 3'utr do gene *Clock*, para cada grupo analisado.

	Grupo Epiléptico (n= 97)	Grupo Controle (n= 212)
Alelos		
T	145 (75%)	340 (80%)
C	49 (25%)	84 (20%)
Genótipos		
T/T	54 (56%)	138 (65%)
T/C	37 (38%)	64 (30%)
C/C	6 (6%)	10 (5%)

Fonte: Autora, 2013.

As populações estudadas foram submetidas ao teste de equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, realizado através do teste estatístico qui-quadrado (**tabela 25**). Observa-se que a distribuição genotípica nas populações estudadas está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, demonstrando que os grupos estudados são representativos de suas populações.

Tabela 25 - Teste de equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (n=309) para o polimorfismo T3111C do gene *Clock*.

	T/T	T/C	C/C	T	C	Valor de p*
Todos os sujeitos	192	101	16	485	133	0,61
Controles	138	64	10	340	84	0,51
Pacientes	54	37	6	145	49	1

*Teste Qui-quadrado.

Fonte: Autora, 2013.

Tabela 26 - Análise comparativa das frequências genotípicas do polimorfismo T3111C do gene *Clock*, para os grupos de pacientes e controles da população alagoana (n=309, análise ajustada para sexo + etnia).

T3111C do gene <i>Clock</i> associação com STATUS (n= 309, ajuste para sexo e etnia)							
	Genótipo	Controles	Pacientes	OR (95% IC)	Valor de p*	CIA	CIB
Codominante	T/T	138 (65,1%)	54 (55,7%)	1,00			
	T/C	64 (30,2%)	37 (38,1%)	1,43 (0,85-2,40)	0,35	391,9	414,3
	C/C	10 (4,7%)	6 (6,2%)	1,52 (0,52-4,40)			
Dominante	T/T	138 (65,1%)	54 (55,7%)	1,00			
	T/C-C/C	74 (34,9%)	43 (44,3%)	1,44 (0,88-2,37)	0,15	389,9	408,5
Recessivo	T/T-T/C	202 (95,3%)	91 (93,8%)	1,00			
	C/C	10 (4,7%)	6 (6,2%)	1,34 (0,47-3,81)	0,59	391,7	410,3
Sobredominante	T/T-C/C	148 (69,8%)	60 (61,9 %)	1,00			
	T/C	58 (30,2%)	37 (38,1%)	1,38 (0,83-2,30)	0,22	390,4	409,1
Aditivo	---	---	---	1,33 (0,89-1,99)	0,17	390,0	408,7

OR (*Odds Ratio*); CIA (Critério de Informação de Akaike); CIB (Critério de Informação Bayesiano); STATUS (Pacientes e Controles); * Regressão logística.

Fonte: Autora, 2013.

As frequências alélicas e genotípicas obtidas para o polimorfismo em questão foram comparadas entre as populações (pacientes e controles), utilizando diferentes modelos de herança (**tabela 26**), entretanto nenhuma associação foi detectada entre os grupos estudados.

5.2.4 Análise de interação entre os três polimorfismos pelo método MDR

Com o intuito de avaliar se interações entre os polimorfismos estudados estão associadas à EMJ, os dados obtidos através da genotipagem foram analisados pelo método *Multifactor Dimensionality Reduction* (MDR), utilizado para detectar e caracterizar interações gene-gene e gene-ambiente em estudos caso-controle com amostras relativamente pequenas.

A análise de interação para este estudo foi realizada em 97 pacientes e 212 indivíduos controles. A **tabela 27** mostra, para cada número de interação avaliada (2 e 3 polimorfismos), a média dos valores de *training balance accuracy*, *testing balance accuracy*, CVC e os valores de *p* obtidos a partir do teste de permutação. Os melhores resultados são aqueles que apresentam valores de *training balance accuracy* muito próximos dos valores de *testing balance accuracy* (combinação P1*P2), bem como aqueles que possuem a maior CVC, que em todos os casos foi 10/10 (ou seja, consistência máxima de 100%). Nota-se ainda nesta tabela que as interações entre os polimorfismos resultaram em valores de $p > 0,05$, não sendo

estatisticamente significativa, como já havia sido observado pelas análises individuais dos polimorfismos.

Tabela 27 - Análise do MDR para os polimorfismos.

Modelo	Training balance accuracy	Testing balance accuracy	CVC	Valor de p*
P1*P2	0,5549	0,5614	10/10	0,6751
P1*P2*P3	0,5082	0,4976	10/10	0,7560

CVC= *cros-validation consistency*; *= p valor obtido de 10.000 testes de permutação. Abreviações: P1 (rs1801260, T3111C do gene *Clock*); P2 (rs57875989, VNTR 4-5 repetições do gene *Per3*); P3 (rs2304672, C111G do gene *Per2*).

Fonte: Autora, 2013.

5.2.5 Análises comparativas entre cronotipos e frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos estudados nos grupos de pacientes e controles.

A preferência diurna (cronotipos) entre pacientes e controles foi obtida através do questionário de *Horne-Ostberg* (HO). No entanto, as análises foram realizadas apenas com os indivíduos que responderam ao questionário, neste caso 75 pacientes e 116 controles. A distribuição de cronotipos para o grupo total (n=191), pacientes (n=75) e controles (n=116) estão representados na **tabela 28**.

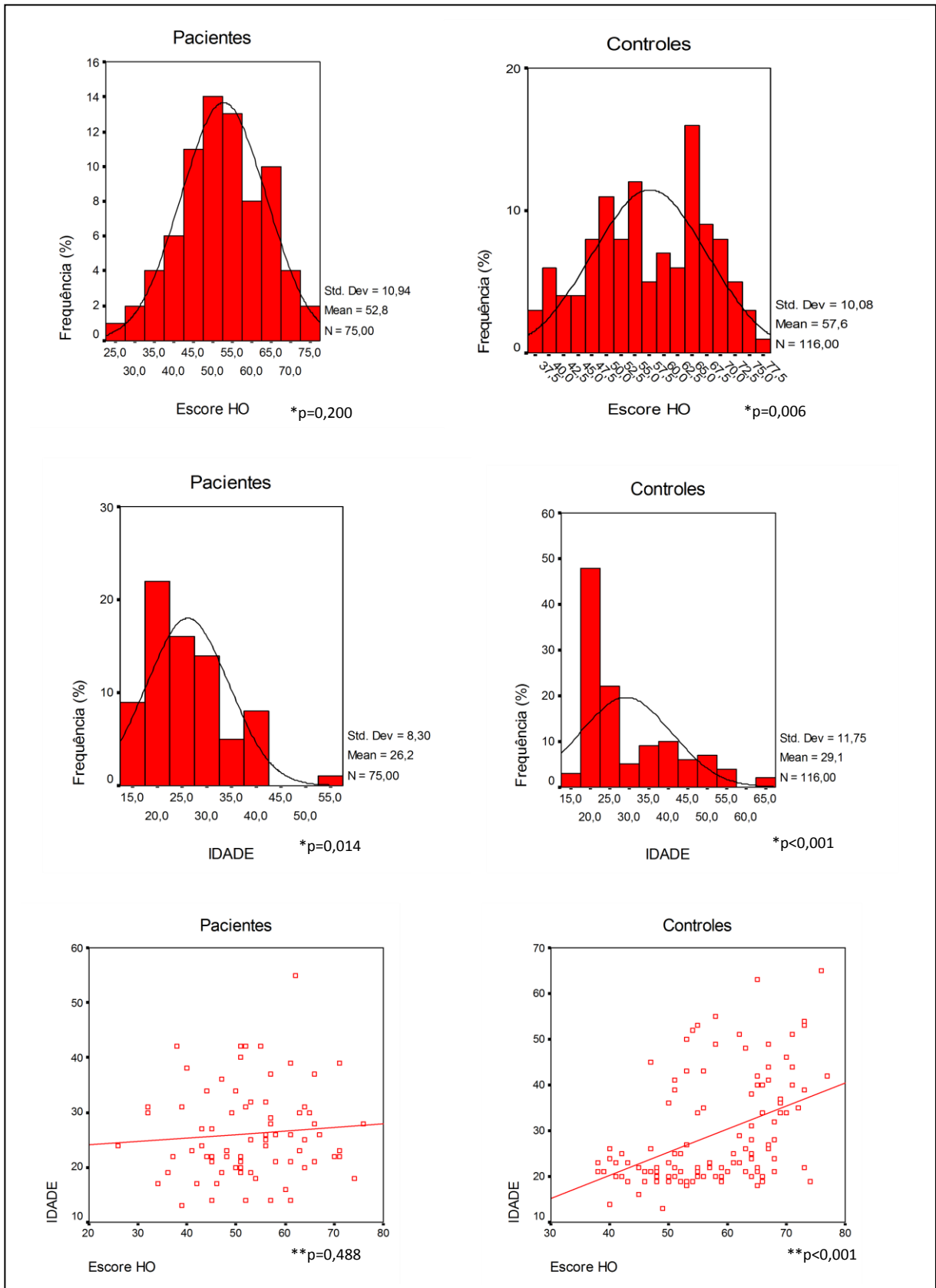
Tabela 28 - Perfil circadiano e dados demográficos para os grupos analisados.

Grupo total (n=191)	Escore HO (média±DP)	Sexo (F:M)	Idade (média±DP)
Matutino (n=59)	67,6±4,0	36:23	31,7±11,7
Intermediário (n=92)	54,3±4,8	58:34	27,6±10,5
Vespertino (n=40)	41,0±6,7	28:12	23,3±6,6
Todos	55,7±10,6	122:69	28,0±10,6
Grupo de pacientes (n=75)			
Matutino (n=15)	67,7±4,3	7:8	25,7±6,6
Intermediário (n=38)	54,5±4,6	24:14	27,4±9,3
Vespertino (n=22)	39,7±5,3	17:5	24,4±7,5
Todos	52,8±10,9	48:27	26,2±8,3
Grupo controle (n=116)			
Matutino (n=44)	67,5±4,0	29:15	33,7±12,4
Intermediário (n=54)	54,2±5,0	34:20	27,7±11,4
Vespertino (n=18)	43,3±7,9	11:7	22,1±5,1
Todos	57,6±10,1	74:42	29,1±11,8

DP (Desvio padrão); HO (Questionário de *Horne-Ostberg*); F (Feminino); M (Masculino).

Fonte: Autora, 2013.

Figura 11 - Gráficos com análises de distribuição dos dados para idade e escore do grupo de pacientes (n=75) e indivíduos controles (n=116) que responderam ao questionário HO.



* Teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov; ** Coeficiente de correlação de Spearman

Na **figura 11**, estão dispostas as análises estatísticas realizadas para avaliar a distribuição dos dados para o escore do questionário *Horne-Ostberg* (HO) e idade dos grupos analisados, pacientes (n=75) e controles (n=116). Foram realizados testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para avaliar se o escore do questionário HO e idade dos grupos analisados possuíam distribuição normal. Foi observado que os dados do escore do questionário HO apresentou distribuição normal para os pacientes (p=0,200) e não normal para os indivíduos controles (p<0,006). Quanto a distribuição da idade, tanto para pacientes (p=0,014) quanto para controles (p<0,001) apresentou distribuição não normal. Para avaliar se havia relação entre escore do questionário HO e idade foi realizado o teste de correlação de Spearman. Observou-se que há uma correlação positiva entre o escore e a idade para o grupo controle (p<0,001), onde se observa que quanto maior a idade, maior o escore do HO. Quanto ao grupo de pacientes, não foi observado correlação entre idade e escore (p=0,488)

A seguir (**tabela 29**), estão descritos os dados sobre idade e sexo dos grupos analisados, além da média dos escores obtidos através do questionário HO. Estas variáveis foram submetidas a testes estatísticos para verificar se havia diferença entre os grupos.

Tabela 29 - Análises estatísticas para idade, sexo e média do escore do Questionário de *Horne-Ostberg*, entre pacientes e controles.

Características	Pacientes (n=75)	Controles (n=116)	Valor de p
Sexo			
Feminino	48 (64,0%)	74 (63,8%)	0,977 ^b
Masculino	27 (36,0%)	42 (36,2%)	
Idade (média ±DP)	26,2±8,3	29,1±11,8	0,062 ^a
HO (média ±DP)	52,76±10,9	57,59±10,1	0,002^a

^a Teste T; ^b Teste Qui-quadrado; HO (Questionário *Horne-Ostberg*); DP (Desvio Padrão).

Fonte: Autora, 2013.

Na **tabela 30**, observa-se as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos T3111C do gene *Clock*, C111G do gene *Per2* e VNTR (4 e 5 repetições) do gene *Per3*, para os grupos de pacientes, controles e preferência diurna (matutino, intermediário e vespertino).

Tabela 30 - Distribuição das frequências alélicas e genótípicas nos grupos de pacientes, controles e preferências diurnas para os três polimorfismos estudados.

	Frequências alélicas								
	<i>Clock</i>		<i>Per2</i>		<i>Per3</i>				
	T3111C		C111G		VNTR 4 e 5 repetições				
	T	C	C	G	4	5			
Pacientes (n=75)	0,75	0,25	0,95	0,05	0,68	0,32			
Matutino	0,73	0,27	0,97	0,03	0,70	0,30			
Intermediário	0,74	0,26	0,96	0,05	0,72	0,28			
Vespertino	0,77	0,23	0,93	0,07	0,59	0,41			
Controles (n=116)	0,81	0,19	0,88	0,12	0,69	0,31			
Matutino	0,74	0,26	0,97	0,03	0,72	0,28			
Intermediário	0,87	0,13	0,94	0,06	0,70	0,30			
Vespertino	0,83	0,17	0,89	0,11	0,58	0,42			
Todos os indivíduos	0,79	0,21	0,95	0,05	0,69	0,31			
Matutino	0,74	0,26	0,97	0,03	0,71	0,29			
Intermediário	0,82	0,18	0,95	0,05	0,71	0,29			
Vespertino	0,80	0,20	0,91	0,09	0,59	0,41			
	Frequências genótípicas								
	T3111C			C111G			VNTR 4 e 5 repetições		
	T/T	T/C	C/C	C/C	C/G	G/G	4/4	4/5	5/5
Pacientes (n=75)	0,53	0,43	0,04	0,95	0,05	0	0,47	0,43	0,11
Matutino	0,53	0,40	0,07	0,93	0,07	0	0,47	0,47	0,07
Intermediário	0,53	0,42	0,05	0,92	0,08	0	0,50	0,45	0,05
Vespertino	0,55	0,45	0	0,86	0,14	0	0,41	0,36	0,23
Controles (n=116)	0,67	0,30	0,03	0,94	0,06	0	0,47	0,45	0,09
Matutino	0,55	0,39	0,07	0,93	0,07	0	0,50	0,43	0,07
Intermediário	0,76	0,22	0,02	0,87	0,13	0	0,48	0,44	0,07
Vespertino	0,67	0,33	0	0,78	0,22	0	0,33	0,50	0,17
Todos os indivíduos	0,61	0,35	0,04	0,89	0,11	0	0,47	0,44	0,09
Matutino	0,54	0,39	0,07	0,93	0,07	0	0,49	0,44	0,07
Intermediário	0,66	0,30	0,03	0,89	0,11	0	0,49	0,45	0,06
Vespertino	0,60	0,40	0	0,82	0,18	0	0,38	0,42	0,20

Fonte: Autora, 2013.

Para avaliar se estes polimorfismos estavam associados à preferência diurna independente da população (pacientes e controles) foram realizadas análises estatísticas de regressão logística através do software *SNPStats*. Os grupos considerados para a análise foram: grupo total de indivíduos (n=191, pacientes + controles), grupo de pacientes (n=75, apenas indivíduos com EMJ) e grupo de indivíduos controle (n=116). As frequências genótípicas para cada polimorfismo foram comparadas entre os cronotipos (matutino,

vespertino e intermediário) utilizando diferentes modelos de herança. O teste estatístico foi realizado através das seguintes combinações binárias: M x I; V x I; V x M, com todos os indivíduos, ou seja, um grupo sem distinguir pacientes e controles (**tabela 31**), um grupo apenas com os pacientes (**tabela 32**) e um grupo apenas com indivíduos controles (**tabela 33**).

Tabela 31 - Análises comparativas das frequências genótípicas dos polimorfismos entre os grupos Matutino (59), Vespertino (n=18) e Intermediário (n=92) para o grupo total de indivíduos (pacientes e controles) (n= 191, análises ajustadas para sexo e etnia).

Polimorfismo	Modelo de herança	Genótipo	Matutino	Vespertino	OR (95% IC)	Valor de p*	CIA	CIB
		T/T-T/C	55 (93,2%)	40 (100%)	1,00			
T3111C (Clock)	Recessivo	C/C	4 (6,8%)	0 (0%)	1,00 (0,00-NA)	0,058	132,4	145,3
		C/C	55 (93,2%)	33 (82,5%)	1,00			
C111G (Per2)	----	C/G	4 (6,8%)	7 (17,5%)	2,90 (0,76-11,07)	0,11	133,4	146,4
VNTR 4 e 5 repetições (Per3)	Recessivo	4/4-4/5	55 (93,2%)	32 (80%)	1,00			
		5/5	4 (6,8%)	8 (20%)	3,36 (0,91-12,37)	0,06	132,4	145,4
Polimorfismo	Modelo de herança	Genótipo	Intermediário	Matutino	OR (95% IC)	Valor de p*	CIA	CIB
T3111C (Clock)	Aditivo	----	---	----	1,57 (0,89-2,78)	0,12	208,9	223,9
		C/C	82 (89,1%)	55 (93,2%)	1,00			
C111G (Per2)	----	C/G	10 (10,9%)	4 (6,8%)	0,59 (0,17-1,97)	0,37	210,5	225,6
VNTR 4 e 5 repetições (Per3)	Sobredominante	4/4-5/5	51 (55,4%)	33 (55,9 %)	1,00			
		4/5	41 (44,6%)	26 (44,1%)	0,96 (0,49-1,88)	0,91	211,3	226,4
Polimorfismo	Modelo de herança	Genótipo	Intermediário	Vespertino	OR (95% IC)	Valor de p*	CIA	CIB
		T/T-T/C	89 (96,7%)	40 (100%)	1,00			
T3111C (Clock)	Recessivo	C/C	3 (3,3%)	0 (0%)	1,00 (0,00-NA)	0,15	161,3	175,8
		C/C	82 (89,1%)	33 (82,5%)	1,00			
C111G (Per2)	----	C/G	10 (10,9%)	7 (17,5%)	1,74 (0,59-5,11)	0,32	162,4	176,8
VNTR 4 e 5 repetições (Per3)	Recessivo	4/4-4/5	86 (93,5%)	32 (80 %)	1,00			
		5/5	6 (6,5%)	8 (20%)	3,58 (0,83-2,30)	0,027	161	166,8

*Teste estatístico Regressão Logística (*SNPStats*); M (Matutino); I (Intermediário); V (Vespertino). OR (*Odds Ratio*); IC (Intervalo de Confiança); CIA (Critério de Informação de Akaike); CIB (Critério de Informação Bayesiano).

Fonte: Autora, 2013.

Na **tabela 31**, observa-se uma diferença significativa ($p=0,027$) quando comparados os cronotipos vespertino e intermediário no grupo total de indivíduos. Há uma chance maior ($OR=3.58$) do genótipo 5/5 ocorrer em indivíduos vespertinos do que em indivíduos intermediários, no grupo total de indivíduos. Na **tabela 32**, nota-se que o grupo de pacientes também um número maior de indivíduos vespertinos com o genótipo 5/5, apresentando uma tendência a diferença significativa entre indivíduos vespertinos e intermediários ($p=0,067$).

Tabela 32 - Análises comparativas das frequências genóticas dos polimorfismos entre os grupos Matutino (n=15), Vespertino (n=22) e Intermediário (n=38) apenas para o grupo de pacientes (n= 75, análises ajustadas para sexo e etnia).

Polimorfismo	Modelo de herança	Genótipo	Matutino	Vespertino	OR (95% IC)	Valor de p*	CIA	CIB	
T3111C (Clock)	Recessivo	T/T-T/C	14 (93,3%)	22 (100%)	1,00	0,13	51,2	57,6	
		C/C	1 (6,7%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)				
		C/C	14 (93,3%)	19 (82,5%)	1,00				
C111G (Per2)	----	C/G	1 (6,7%)	3 (13,6%)	3,89 (0,30-50,2)	0,27	52,3	58,8	
VNTR 4 e 5 repetições (Per3)	Aditivo	---	----	----	1,76 (0,60-5,15)	0,29	52,4	58,9	
Polimorfismo	Modelo de herança	Genótipo	Intermediário	Matutino	OR (95% IC)	Valor de p*	CIA	CIB	
T3111C (Clock)	Codominante	T/T	20 (52,6%)	8 (53,3%)	1,00	0,93	71,4	83,2	
		T/C	16 (42,1%)	6 (40%)	0,78 (0,22-2,81)				
		C/C	2 (5,3%)	1 (6,7%)	1,00 (0,07-13,45)				
C111G (Per2)	-----	C/C	35 (92,1%)	14 (93,3%)	1,00	0,87	69,5	79,3	
		C/G	3 (7,9%)	1 (6,7%)	0,81 (0,07-9,50)				
VNTR 4 e 5 repetições (Per3)	Sobredominante	4/4-5/5	21 (55,3%)	8 (53,3%)	1,00	0,68	69,3	79,2	
VNTR 4 e 5 repetições (Per3)	Sobredominante	4/5	17 (44,7%)	7 (46,7%)	0,76 (0,21-2,76)	0,68	69,3	79,2	
		4/5	17 (44,7%)	7 (46,7%)	0,76 (0,21-2,76)	0,68	69,3	79,2	
Polimorfismo	Modelo de herança	Genótipo	Intermediário	Vespertino	OR (95% IC)	Valor de p*	CIA	CIB	
T3111C (Clock)	Recessivo	T/T-T/C	36 (94,7%)	22 (100%)	1,00	0,22	83	94,7	
		C/C	2 (5,3%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)				
		C/C	35 (92,1%)	19 (86,4%)	1,00				
C111G (Per2)	----	C/G	3 (7,9%)	4 (13,6%)	1,69 (0,30-9,59)	0,56	84,2	94,2	
VNTR 4 e 5 repetições (Per3)	Recessivo	4/4-4/5	36 (94,7%)	17 (77,3%)	1,00	4,85 (0,82-28,81)	0,067	81,1	91,6
VNTR 4 e 5 repetições (Per3)	Recessivo	5/5	2 (5,3%)	5 (22,7%)	4,85 (0,82-28,81)	0,067	81,1	91,6	

*Teste estatístico Regressão Logística (*SNPStats*); M (Matutino); I (Intermediário); V (Vespertino). OR (*Odds Ratio*); IC (Intervalo de Confiança); CIA (Critério de Informação de Akaike); CIB (Critério de Informação Bayesiano).

Fonte: Autora, 2013.

Na **tabela 33**, observa-se que houve diferença significativa ($p=0,026$) entre indivíduos matutinos e intermediários para o polimorfismo T3111C no gene *Clock* quando o grupo com apenas indivíduos controle foi avaliado. Neste caso, a presença do genótipo T/C ou C/C apresenta uma chance maior ($OR=2,67$) de ocorrer em indivíduos matutinos que intermediários. Quando o grupo total de indivíduos foi avaliado (tabela 31), houve uma tendência a significância estatística ($p=0,058$) entre indivíduos matutinos e vespertinos, onde se observa uma maior frequência do genótipo C/C em matutinos.

Tabela 33 - Análises comparativas das frequências genótípicas dos polimorfismos entre os grupos Matutino (n=44), Vespertino (n=18) e Intermediário (n=54) apenas para o grupo controle (n= 116, análises ajustadas para sexo e etnia).

Polimorfismo	Modelo de herança	Genótipo	Matutino	Vespertino	OR (95% IC)	Valor de p*	CIA	CIB
		T/T-T/C	41 (93,2%)	18 (100%)	1,00			
T3111C (Clock)	Recessivo	C/C	3 (6,8%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)	0,24	78,5	89,2
		C/C	41 (93,2%)	14 (77,8%)	1,00			
C111G (Per2)	----	C/G	3 (6,8%)	4 (22,2%)	3,15 (0,59-16,74)	0,18	78,1	88,7
		4/4-4/5	41 (93,2%)	15 (83,3%)	1,00			
VNTR 4 e 5 repetições (Per3)	Recessivo	5/5	3 (6,8%)	3 (16,7%)	2,44 (0,40-15,01)	0,34	79	89,7
Polimorfismo	Modelo de herança	Genótipo	Intermediário	Matutino	OR (95% IC)	Valor de p*	CIA	CIB
		T/T	41 (75,9%)	24 (54,5%)	1,00			
T3111C (Clock)	Dominante	T/C-C/C	13 (24,1%)	20 (45,5%)	2,67 (1,11-6,42)	0,026	139,4	152,3
		C/C	47 (93,2%)	41 (93,2%)	1,00			
C111G (Per2)	-----	C/G	3 (6,8%)	3 (6,8%)	0,46 (0,11-1,94)	0,28	143,2	156,1
		4/4	26 (48,1%)	22 (50%)	1,00			
VNTR 4 e 5 repetições (Per3)	Codominante	4/5	24 (44,4%)	19 (43,2%)	0,97 (0,42-2,26)	0,99	146,4	161,9
		5/5	4 (7,4%)	3 (6,8%)	0,89 (0,17-4,58)			
Polimorfismo	Modelo de herança	Genótipo	Intermediário	Vespertino	OR (95% IC)	Valor de p*	CIA	CIB
		T/T-T/C	53 (98,2%)	18 (100%)	1,00			
T3111C (Clock)	Recessivo	C/C	1 (1,8%)	0 (0%)	1,00 (0,00-NA)	0,43	86	97,4
		C/C	47 (87%)	14 (77,8%)	1,00			
C111G (Per2)	----	C/G	7 (13%)	4 (22,2%)	1,94 (0,47-7,95)	0,36	85,8	97,2
		4/4-4/5	53 (98,2%)	18 (100%)	1,00			
VNTR 4 e 5 repetições (Per3)	Aditivo	----	----	----	1,67 (0,72-3,86)	0,23	85,2	96,6

*Teste estatístico Regressão Logística (*SNPStats*); M (Matutino); I (Intermediário); V (Vespertino). OR (*Odds Ratio*); IC (Intervalo de Confiança); CIA (Critério de Informação de Akaike); CIB (Critério de Informação Bayesiano).

Fonte: Autora, 2013.

5.2.6 Análise de endofenótipos com os polimorfismos estudados

Para avaliar se os endofenótipos apresentados pelos pacientes com EMJ estavam associados aos polimorfismos investigados, foi realizado o teste qui-quadrado, onde foram comparadas as frequências genótípicas dos polimorfismos (T3111C do gene *Clock*, C111G do gene *Per2* e VNTR - 4 e 5 repetições do gene *Per3*) entre pacientes e indivíduos controles

que apresentaram o endofenótipo. Os valores obtidos a partir do teste estatístico estão representados na **tabela 34**.

Tabela 34 - Análises comparativas entre endofenótipos apresentados pelos pacientes com EMJ (n=74) e frequências genótípicas para os polimorfismos estudados.

Endofenótipos	Valor de p*		
	<i>Clock</i> (T3111C)	<i>Per2</i> (C111G)	<i>Per3</i> (VNTR 4 e 5 repetições)
Insônia	0,600	1,0	0,434
Parassonias	0,179	0,253	0,495
SPI	---	---	1,0
Pausas respiratórias	1,0	1,0	0,262
Roncos	0,208	1,0	0,844
Roncos moderados e graves	1,0	0,405	0,428
Cansado ao acordar >3x/s	0,339	0,539	0,435
Cefaléia matinal >3x/s	0,884	1,0	0,768
SDE	0,329	0,220	0,662

*Teste qui-quadrado; SPI (Síndrome das pernas inquietas); SDE (Sonolência diurna excessiva); 3x/s (três vezes por semana).

Fonte: Autora, 2013.

6 DISCUSSÃO

A relação entre sono e epilepsia vem sendo amplamente estudada (KRISHNAN et al., 2012). Algumas síndromes epiléticas caracterizam-se pela ocorrência das crises epiléticas no período do sono, tais como epilepsia do lobo frontal e epilepsia benigna da infância ou após o despertar, como no caso da EMJ. Distúrbios do sono em pacientes com epilepsia podem ser secundários às DAEs utilizadas, crises noturnas ou a um distúrbio do sono coexistente. Estudos que investigam distúrbios do sono em pacientes com EMJ são escassos, apesar da sua clara relação com o sono (KRISHNAN et al., 2012).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de distúrbios do sono e preferência circadiana em pacientes com EMJ do Estado de Alagoas através de questionários validados. Além disso, buscou identificar se polimorfismos em genes envolvidos na geração e regulação do sistema de temporização circadiano estão associados a EMJ ou a endofenótipos apresentados pelos pacientes em relação aos distúrbios do sono.

6.1 Perfil clínico dos pacientes

A maioria dos pacientes era do sexo feminino, com idade média de $25,7 \pm 8,5$ anos. A idade média de início das crises foi de $12,6 \pm 4,5$. Todos os pacientes apresentaram crises mioclônicas, 94,6% relataram CTCGs e 62,2% crises de ausência (tabela 8). As características clínicas apresentadas pelos pacientes com EMJ são consistentes com as apresentadas pela literatura (MURTHY et al., 1998; FIGUEREDO et al., 1999; MONTALENTI et al., 2001; VIJAI et al., 2003). A maioria das crises mioclônicas e CTCG relatadas pelos pacientes possuíam predomínio de horário. Em relação às crises mioclônicas, 50% dos pacientes relataram horário preferencial de ocorrência das crises, sendo matutinas em 39,2%. Dos 44,6% dos pacientes que relataram predomínio de horário para as CTCG, 39,2% eram matutinas, dados que estão de acordo com os descritos na literatura (ZAROWSKI et al., 2011; KASTELEIJN-NOLST et al., 2013). Quanto ao tratamento medicamentoso, a maioria dos pacientes faziam uso de monoterapia (70,8%) e destes pacientes 78,3% usavam VPA, dados que corroboram com os observados por Figueredo et al. (1999) e Vijai et al. (2003).

6.2 Distúrbios do sono em pacientes com EMJ

Neste estudo, nós avaliamos o grupo total de pacientes com EMJ independente da DAE usada e o subgrupo em uso de monoterapia com VPA. Quando o grupo total de pacientes foi avaliado em comparação ao grupo controle, observamos maior prevalência de insônia ($p < 0,001$), roncos moderados e graves ($p = 0,012$), cansaço ao acordar ($p = 0,007$), cefaleia matinal ($p = 0,008$), má qualidade de sono ($p = 0,006$) e uma tendência a SDE ($p = 0,091$) (tabela 9). Achados semelhantes foram relatados por Krishnan e colaboradores (2012) em pacientes com EMJ e por Carrion et al. (2010), em pacientes com epilepsia do lobo temporal.

Quanto à eficiência e à latência do sono, para os dois grupos de pacientes (total e pacientes em monoterapia com VPA) em relação ao grupo controle, nenhuma associação foi encontrada (tabela 10 e 13). No entanto, observamos que os dois grupos de pacientes total e monoterapia com VPA, respectivamente, apresentaram tempo na cama ($p < 0,001$; $p < 0,001$) e tempo de sono durante a semana ($p = 0,007$; $p < 0,001$), significativamente maior nos pacientes quando comparados ao grupo controle, embora a eficiência do sono não apresente significância estatística ($p = 0,272$; $p = 0,240$). Quanto à latência do sono durante a semana e fim de semana, apesar de não haver diferença entre os grupos, há uma tendência ($p = 0,099$; $p = 0,077$) dos pacientes apresentarem maior dificuldade em adormecer em relação ao grupo controle. Dados similares aos descritos por Ramachandraiah et al. (2012).

Outros tipos de epilepsia foram estudados quanto a distúrbios do sono através de questionários e alguns achados divergiram dos nossos dados. Maganti e colaboradores (2006) investigaram 26 crianças com epilepsia generalizada e descreveram a presença de SDE ($p < 0,001$), distúrbios respiratórios do sono ($p < 0,001$) e parassonias ($p < 0,001$). Diferente do apresentado em nosso estudo, onde não houve diferença significativa de parassonias nos pacientes quando comparados ao grupo controle ($p = 0,867$). Outro estudo, realizado na população brasileira, investigou 39 pacientes com ELT através de questionários e mostrou que a queixa mais frequentemente referida pelos pacientes foi SDE (85%), seguida por despertares noturnos (69%), crises epiléticas durante o sono (69%), insônia inicial (26%), parassonias (67%) entre as mais frequentes foram sonilóquios, pesadelos, bruxismo e despertar confusional, além de síndrome da apnéia obstrutiva do sono (13%) e síndrome das pernas inquietas (15%) (ALMEIDA et al., 2003).

Nós também investigamos os distúrbios do sono apresentados pelo subgrupo de pacientes em monoterapia com VPA comparados ao grupo controle. Diferente do que foi detectado no grupo total de pacientes, onde apresentaram maior prevalência de insônia, roncos moderados e graves, cansaço ao acordar, cefaleia matinal, má qualidade de sono. Este subgrupo (monoterapia com VPA) apresentou apenas maior prevalência para insônia

($p < 0,001$). As diversas alterações apresentadas pelo primeiro grupo (todos os pacientes, sem distinção do uso de DAE) podem ser explicadas pelo uso de outras drogas no controle das crises.

A literatura disponível sugere que o VPA tem pouco ou nenhum efeito na arquitetura do sono (SCHMITT et al., 2009). Uma vez que todos os pacientes deste subgrupo estavam em uso de VPA, a prevalência de insônia precisa ser melhor investigada, pois nenhuma diferença foi notada para SDE ($p = 0,234$) e má qualidade do sono ($p = 1,0$) quando comparada ao grupo controles (tabela 14).

No estudo realizado por Ramachandraiah e colaboradores (2012) foram investigados 40 pacientes com EMJ, dividido em 2 grupos, além do grupo controle. O primeiro grupo estava em uso monoterapia com VPA e o segundo grupo não estava em uso de medicação. Através de questionários, EEG e polissonografia (PSG) avaliaram os efeitos da "epilepsia no sono e sua arquitetura" e do "sono sobre a ocorrência e distribuição de descargas epileptiformes interictais (DE)". Concluíram que os pacientes apresentaram má qualidade do sono em relação aos controles, especialmente naqueles pacientes do grupo do VPA, que apresentaram alterações na arquitetura do sono. Além disso, a atividade epileptiforme foi observada mais frequentemente em sono do que em vigília nos pacientes sem uso de medicação quando comparados aos que usavam VPA. Estes achados podem indicar que as DE possam ser a causa da má qualidade de sono relatada pelos pacientes estudados por Ramachandraiah et al. (2012) e insônia relatada por nosso estudo e verificada por um estudo anterior ao de Ramachandraiah et al. (2012) com o mesmo grupo de pacientes (KRISHNAN et al., 2012).

Até o momento, apenas dois trabalhos desenvolvidos por um grupo de pesquisadores indianos (KRISHNAN et al., 2012; RAMACHANDRAIAH et al., 2012) que investigaram distúrbios do sono em pacientes com EMJ foram publicados. Para nosso conhecimento, este é o terceiro estudo que investiga distúrbios do sono em pacientes com EMJ e o primeiro desenvolvido no Brasil.

6.3 Perfil diurno dos pacientes com EMJ

Em 1957, Janz e Christian já haviam descrito que os pacientes com EMJ tendiam a ficar até mais tarde na cama pela manhã e eram mais ativos à tarde e à noite, indo para cama mais tarde. Posteriormente, questionários sobre os horários preferenciais de atividades ao longo do dia (24 horas), que caracterizam os indivíduos em cronotipos (preferência diurna),

foram desenvolvidos e validados em grandes estudos populacionais (HORNE; OSTBERG, 1976; ROENNENBERG et al., 2007).

Nós investigamos o cronotipo dos pacientes com EMJ através do questionário de matutividade e vespertividade de *Horne-Ostberg* (HO), que classifica simplificadaamente os indivíduos em matutinos, vespertinos e intermediários. Para o nosso estudo, a distribuição de pacientes matutinos foi de 20,3%, vespertinos 29,7% e intermediários 50%. O grupo controle apresentou uma distribuição de 36,8% de indivíduos matutinos, 19,7% vespertinos e 43,4% intermediários (gráfico 1). Quando comparamos as frequências entre os cronotipos dos pacientes e controles, nenhuma diferença estatística foi detectada ($p=0,065$) (tabela 16), apesar de haver uma frequência maior de indivíduos vespertinos no grupo de pacientes e mais matutinos no grupo controle. Quando avaliamos a média dos escores do questionário HO houve diferença ($p=0,021$) entre pacientes ($52,84\pm 11,0$) e controles ($56,95\pm 10,43$) (tabela 17). Escores menores indicam tendência à vespertividade enquanto escores maiores à matutividade. Neste caso, os pacientes apresentaram uma tendência à vespertividade, dado que corrobora com os encontrados na literatura (PUNG; SCHMITZ, 2006).

O estudo desenvolvido por Pung e Schmitz (2006) comparou pacientes com epilepsia do lobo temporal (ELT, $n=20$) e EMJ ($n=20$) com idade média de 35 anos e distribuição de sexo feminino de 60% para ambos os grupos, os pacientes com EMJ apresentaram maior tendência a vespertividade do que os pacientes com ELT. No entanto, este achado pode não ser consistente, devido à idade dos pacientes com EMJ que são frequentemente adolescentes ou jovens adultos. De fato, em um estudo com vários tipos de epilepsia (EMJ=38; ELT=46; ELF=30) em que todos os grupos apresentavam idade média de 40 anos, não foi encontrada diferença significativa entre os cronotipos dos três grupos (HOFSTRA et al., 2010). Uma possível explicação para os resultados opostos apresentados pelos estudos citados acima seria a diferença de idade dos pacientes nos três estudos citados (JANZ; CHRISTIAN, 1957; PUNG; SCHMITZ, 2006; HOFSTRA et al., 2010). Segundo alguns pesquisadores que investigam a relação da idade e cronotipos em indivíduos saudáveis, as crianças e os idosos tendem a ser mais matutinos, enquanto os adolescentes são muitas vezes mais vespertinos, mulheres tendem à matutividade e homens à vespertividade (RANDLER, 2008; ROENNENBERG et al., 2004 e 2007).

6.4 Análise genética

Alguns estudos em humanos e animais tem investigado a relação entre ritmo circadiano e epilepsia (MATOS et al., 2011; ZAROWSKI et al., 2011; RAMGOPAL et al., 2012). No entanto, apenas dois estudos, em modelo animal, investigaram a relação entre genes envolvidos na geração e regulação do sistema de temporização circadiano e epilepsia (GACHON, 2004; EUN et al., 2011). Como a EMJ apresenta desde suas primeiras descrições características circadianas (JANZ; CHRISTIAN, 1957), nós investigamos se polimorfismos (T3111C do gene *Clock*, C111G do gene *Per2* e VNTR de 4 e 5 repetições do gene *Per3*) em genes envolvidos na geração e regulação no sistema de temporização circadiano estavam associados a EMJ.

A análise individual dos polimorfismos estudados não apresentou nenhuma diferença estatística entre as frequências alélicas e genótípicas para casos e controles (tabelas 20, 23 e 26), mesmo quando analisamos a interação entre os genes (tabela 27), sugerindo que estes polimorfismos não estão associados à EMJ na população alagoana. Para nosso conhecimento este é o primeiro trabalho que analisa o envolvimento destes polimorfismos com este tipo de epilepsia. Estudos semelhantes foram relatados em outros tipos de doenças que afetam o SNC (BENEDETTI et al., 2003, 2007; SERRETI et al., 2003; DALLASPEZIA et al., 2011; PARTONEN et al., 2007; MANSOUR et al., 2009).

Quando investigamos o polimorfismo T3111C no gene *Clock*, as frequências alélicas e genótípicas entre pacientes e controles não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p=0,15$, tabela 26). Este polimorfismo tem sido bastante investigado em pacientes com transtornos do humor. Benedetti e colaboradores (2003) investigaram o polimorfismo T3111C do gene *Clock* em pacientes com transtorno bipolar e verificaram um aumento da frequência do homocigoto C/C.

Nossos dados mostram que este polimorfismo T3111C no gene *Clock* não está associado a EMJ, no entanto, outra análise realizada para este polimorfismo na nossa população foi quanto sua associação a preferência diurna (tabelas 31, 32 e 33), mostrando que os genótipos T/C ou C/C estão associados a matutuidade ($p=0,026$, tabela 33) quando os indivíduos controles são avaliados sem a presença do grupo de pacientes. Quando o grupo total de indivíduos é avaliado (pacientes + controles) há uma tendência estatístico a matutuidade ($p=0,058$, tabela 31), achado que pode representar uma associação dos genótipos T/C-C/C com indivíduos matutinos na população geral estudada e não especificamente com a EMJ em nossa população, divergindo dos achados de Katzenberg et al. (1998) e Mishima et al. (2005), que descreveram associação do alelo C com vespertinidade em indivíduos na população europeia e japonesa, respectivamente. Além disso, outros estudos com indivíduos

com depressão e transtorno bipolar, verificaram que os pacientes que apresentaram insônia eram homozigotos C/C (SERRETI et al., 2003; 2005).

O polimorfismo C111G do gene *Per2* também não apresentou nenhuma associação com a EMJ ($p=0,60$, tabela 23) em nosso estudo. Além disso, quando investigamos a associação deste polimorfismo quanto a preferência diurna, nenhuma associação foi encontrada (tabelas 31, 32 e 33). Dados que corroboram com o estudo de Choub e colaboradores (2011) na população italiana. Diferente dos os achados de Carpen e colaboradores (2005), que relataram associação do alelo G com matutividade na população holandesa.

Em relação ao VNTR de 4 e 5 repetições do gene *Per3* observamos que a as frequências alélicas e genotípicas também não diferiram entre pacientes e controles ($p=0,94$, tabela 20). Quando este polimorfismo foi investigando quanto a associação a preferência diurna, nossos dados apresentaram associação do homozigoto 5/5 com vespertinidade no grupo total de indivíduos ($p=0,027$, tabela 31). Proporções diferentes para as frequências alélicas e genotípicas encontradas em nossa população (tabela 18) foram observadas em um estudo com indivíduos normais na população brasileira, que relatou a associação do alelo com 5 repetições a matutividade e o de 4 repetições a vespertinidade (PEREIRA et al., 2005), dados que foram replicados em outras populações (ARCHER et al., 2003; JOHANSSON et al., 2003; ELLIS et al., 2009; JONES et al., 2007). Estes achados divergentes podem ser explicados pela origem étnica e influencia da localização geográfica da nossa população (BARBOSA et al., 2010; NADKARNI et al., 2005).

Quanto as análises de correlação genética entre os endofenótipos apresentados pelos pacientes e as frequências genotípicas para os polimorfismos T3111C do gene *Clock*, C111G do gene *Per2* e VNTR (4 e 5 repetições) do gene *Per3*, nenhuma associação foi observada (tabela 34). Nenhum estudo, até o momento, foi publicado com este tipo de investigação com epilepsia.

Neste trabalho, investigamos apenas três polimorfismos em diferentes genes envolvidos no mecanismo molecular do ritmo circadiano, não excluindo a possibilidade de que outras alterações genéticas nos mesmos genes ou em outros que participam deste processo estejam associados a EMJ. Diversos componentes estão envolvidos na regulação do sistema de temporização circadiano, entre eles os *Clock Controlled Genes* (CCGs), genes que não participam diretamente da regulação molecular, mas que sua transcrição está sob o comando da maquinaria do relógio. Estes genes (CCGs) constituem o mecanismo molecular de eferência do relógio biológico, através do qual todo o organismo pode estar conectado.

Gachon et al. (2004), investigando a função de alguns genes considerados CCGs, como os genes DBP (*albumin D-site-binding protein*), HLF (*hepatic leukemia factor*) e TEF (*thyrotroph embryonic factor*), membros da família de fatores de transcrição PAR bZip (*proline and acidic amino acid-rich basic leucine zipper*), realizou um estudo funcional em que animais *knockouts* para estes três genes (*Hlf^{-/-}/Dbp^{-/-}/Tef^{-/-}*) apresentaram crises audiogênicas letais e espontâneas, sugerindo o envolvimento dos CCGs com a epilepsia.

Os resultados do estudo citado acima indicam que a epilepsia possui de fato um envolvimento com genes que participam do mecanismo molecular circadiano, no entanto em nosso trabalho investigamos apenas polimorfismos em três genes diretamente relacionados a este mecanismo e a não associação com a EMJ não descartaria a possibilidade de alterações nestes mesmos genes ou outros envolvidos neste processo, façam parte do complexo mecanismo envolvido na fisiopatologia da EMJ. Até onde conhecemos, este é o primeiro estudo envolvendo genes do relógio e EMJ e que mais estudos precisam ser desenvolvidos para elucidar a interação entre o mecanismo molecular do ritmo circadiano e epilepsia.

7 CONCLUSÃO

- ✓ Os pacientes com EMJ apresentaram alterações significantes na qualidade e prevalência de distúrbios do sono;
- ✓ Pacientes com EMJ apresentaram uma tendência a preferência diurna vespertina;
- ✓ Quanto ao estudo de associação, nenhuma diferença estatística foi verificada entre as frequências alélicas e genotípicas para os polimorfismos T3111C do gene *Clock*, C111G do gene *Per2* e VNTR (4 e 5 repetições) do gene *Per3* em relação à EMJ, mesmo quando a interação entre estes polimorfismos é avaliada, o que sugere que os polimorfismos T3111C do gene *Clock*, C111G do gene *Per2* e VNTR (4 e 5 repetições) do gene *Per3* não estão associados a EMJ na população alagoana;
- ✓ Os polimorfismos T3111C no gene *Clock* e VNTR (4 e 5 repetições) no gene *Per3* estão associados à preferência diurna em indivíduos da população alagoana, independente do grupo estudado;
- ✓ Os endofenótipos apresentados pelos pacientes não apresentaram nenhuma correlação genética com os polimorfismos investigados.

REFERÊNCIAS

AFRA, P.; ADAMOLEKUN, B. Lacosamide treatment of juvenile myoclonic epilepsy. **Seizure**, v. 21, n. 3, p. 202-204, apr. 2012.

AKASHI, M.; TAKUMI, T. The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. **Nat Struct Mol Biol**, v.12, n. 5, p. 441-448, may 2005.

ALBRECHT, U.; EICHELE, G. The mammalian circadian clock. **Curr Opin Genet Dev**, v. 13, n.3, p. 271-277, jun. 2003.

ALLEBRANDT, K.V. et al. CLOCK gene variants associate with sleep duration in two independent populations. **Biol Psychiatry**, v. 67, n. 11, p. 1040-1047, jun. 2010.

ALMEIDA, C.A.V. et al. Distúrbios do sono na epilepsia do lobo temporal. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 61, n. 4, p. 979-987, 2003.

ANTOCH, M.P. et al. Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. **Cell**, v. 89, n. 4, p. 655-667, may 1997.

ANTUNES, L.C. et al. Obesity and shift work: chronobiological aspects. **Nutr. Res. Rev.** v. 23, p. 155-168, 2010.

ARCHER, S.N. et al. A length polymorphism in the circadian clock gene Per3 is linked to delayed sleep phase syndrome and extreme diurnal preference. **Sleep**, v. 26, p. 413-415, 2003.

_____. Polymorphism in the PER3 promoter associates with diurnal preference and delayed sleep phase disorder. **Sleep**, v. 33, n. 5, p. 695-701, may 2010.

ARTIOLI, P. et al. How do genes exert their role? Period 3 gene variants and possible influences on mood disorder phenotypes. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 17, n. 9, p. 587-594, sep. 2007.

ATAKLI, D. et al. Misdiagnosis and treatment in juvenile myoclonic epilepsy. **Seizure**, v. 7, n. 1, p. 63-66, feb. 1998.

AUVIN, S. Treatment of juvenile myoclonic epilepsy. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 14, n. 3, p. 227-233, 2008.

BAE, K. et al. Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. **Neuron**, v. 30, n. 2, p. 525-536, may 2001.

BADAWY, R.A. et al. Why do seizures in generalized epilepsy often occur in the morning?. **Neurology**, v. 73, n. 3, p. 218-222, jul. 2009.

BAI, D. et al. Juvenile myoclonic epilepsy: linkage to chromosome 6p12 in Mexico families. **Am J Med Genet**, v. 113, p. 268–274, 2002.

BAI, D. et al. DNA variants in coding region of EFHC1: SNPs do not associate with juvenile myoclonic epilepsy. **Epilepsia**, v.50, n.5, p. 1184-1190, may 2009.

BARCLAY, N.L. et al. Sleep quality and diurnal preference in a sample of young adults: associations with 5HTTLPR, PER3, and CLOCK 3111. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 156B, n. 6, p. 681-690, 2011.

BARBOSA, A.A. et al. Do Caucasian and Asian clocks tick differently? **Braz J Med Biol Res**, v. 43, n. 1, p. 96-99, jan. 2010.

BASS, J.; TAKAHASHI, J.S. Circadian integration of metabolism and energetics. **Science**, v. 330, p. 1349–1354, 2010.

BATTINO, D.; TOMSON, T. Management of epilepsy during pregnancy. **Drugs**, v. 67, n. 18, p. 2727-2746, 2007.

BAZIL, C.W. Sleep and epilepsy. **Curr Opin Neurol**, v. 13, n. 2, p. 171-175, apr. 2000.

_____. Epilepsy and sleep disturbance. **Epilepsy Behav**, v. 4, p. 39-45, oct. 2003.

BAZIL, C.W.; WALCZAK, T.S. Effects of sleep and sleep stage on epileptic and nonepileptic seizures. **Epilepsia**, v. 38, n. 1, p. 56-62, jan. 1997.

BEGHI, M. et al. Idiopathic generalized epilepsies of adolescence. **Epilepsia**, v. 47, n. 2, p. 107-110, 2006.

BENEDETTI, F. et al. Influence of CLOCK gene polymorphism on circadian mood fluctuation and illness recurrence in bipolar depression. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 123B, n. 1, p. 23-26, nov. 2003.

_____. Clock genes beyond the clock: CLOCK genotype biases neural correlates of moral valence decision in depressed patients. **Genes Brain Behav**, v. 7, n. 1, p. 20-25, feb. 2008.

_____. A length polymorphism in the circadian clock gene Per3 influences age at onset of bipolar disorder. **Neurosci Lett**, v. 445, n. 2, p. 184-187, nov. 2008.

BENEDITO-SILVA, A.A. et al. A self-assessment questionnaire for the determination of morningness-eveningness types in Brazil. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 341B, p. 89-98, 1990.

BERKOVIC, S.F. et al. Epilepsies in twins: genetics of the major epilepsy syndromes. **Ann Neurol**, v. 43, n. 4, p. 435-445, apr. 1998.

BERTOLAZI, A.N. et al. Portuguese-language version of the Epworth sleepiness scale: validation for use in Brazil. **J Bras Pneumol**, v. 35, n. 9, p. 877-883, sep. 2009.

_____. Validation of the Brazilian Portuguese version of the Pittsburgh Sleep Quality Index. **Sleep medicine**, v. 12, n. 1, p.70-75, jan. 2011.

BIRD, T.D.; JARVIK, G.P.; WOOD N.W. Genetic association studies: genes in search of diseases. **Neurology**, v. 9, n. 57, p. 1153-1154, oct. 2001.

BONAKIS, A.; KOUTROUMANIDIS, M. Epileptic discharges and phasic sleep phenomena in patients with juvenile myoclonic epilepsy. **Epilepsia**, v. 50, n. 11, p. 2434-2445, nov. 2009.

BROWER, K.J. et al. PER3 polymorphism and insomnia severity in alcohol dependence. **Sleep**, v. 35, n. 4, p. 571-577, apr. 2012.

CAJORI, F. A new marking system and means of measuring mathematical abilities. **Science**, v. 39, p. 874-881, 1914.

CALLEJA S. et al. Evolution of juvenile myoclonic epilepsy treated from the outset with sodium valproate. **Seizure**, v. 10, p. 424-427, 2001.

CALVANO, L.A., et al. Epidemiology of Epilepsies in the City of Maceió – Alagoas. **Neurobiologia**, v. 73, n. 1, mar. 2010.

CAO, Y.L. et al. Association of CLOCK gene T3111C polymorphism with attention deficit hyperactivity disorder and related sleep disturbances in children. **Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi**, v.14, n. 4, p. 285-288, apr. 2012.

CARPEN, J. D. et al. A single-nucleotide polymorphism in the 5'-untranslated region of the hPER2 gene is associated with diurnal preference. **Journal of sleep research**, v.14, n. 3, p. 293-297, sep. 2005.

CARRION, M.J. et al. Evaluation of sleep quality in patients with refractory seizures who undergo epilepsy surgery. **Epilepsy Behav**, v. 17, n. 1, p. 120-123, jan. 2010.

CERMAKIAN, N.; BOIVIN, D.B. A molecular perspective of human circadian rhythm disorders. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 42, n. 3, p. 204-220, jun. 2003.

CHEN, S.T. Deregulated expression of the PER1, PER2 and PER3 genes in breast cancers. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 7, p. 1241-1246, jul. 2005.

CHANG, B.S.; LOWENSTEIN, D.H. Epilepsy. **The New England journal of medicine**, v. 349, n.13, p. 1257-1266, sep. 2003.

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, p.970-980, nov. 2007.

CAVAZOS, J. Epilepsy, Juvenile Myoclonic, 2007. Disponível em:
<<http://www.emedicine.com/neuro/topic416.htm>>. Acesso em: abr. 2012.

CHOUB, A. et al. Clock T3111C and Per2 C111G SNPs do not influence circadian rhythmicity in healthy Italian population. **Neurol Sci**, v.32, n. 1, p. 89-93, feb. 2011.

COSSETTE, P. et al. Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. **Nat Genet**, v.31, n.2, p.184-189, jun 2002.

COREY, L.A. et al. Importance of genetic factors in the occurrence of epilepsy syndrome type: a twin study. **Epilepsy Res**, v.97, n.1-2, p.103-111, nov. 2011.

CRESPEL, A.; BALDY-MOULINIER, M.; COUBES, P. The relationship between sleep and epilepsy in frontal and temporal lobe epilepsies: practical and physiopathologic considerations. **Epilepsia**, v. 39, n. 2, p. 150-157, feb. 1998.

DALLASPEZIA, S. et al. Circadian clock gene Per3 variants influence the postpartum onset of bipolar disorder. **Eur Psychiatry**, v. 26, n. 3, p. 138-40, apr. 2011.

DHANUKA, A. K. et al. Juvenile myoclonic epilepsy: a clinical and sleep EEG study. **Seizure**, v.10, n.5, p.374-378, jul. 2001.

DELGADO-ESCUETA, A.V.; ENRILE-BACSA, F. Juvenile myoclonic epilepsy of Janz. **Neurology**, v.34, n.3, p. 285-294, mar. 1984.

DELGADO-ESCUETA, A.V. Advances in genetics of juvenile myoclonic epilepsies. **Epilepsy Curr**, v.7, n.3, p. 61-67. may-jun. 2007.

DELGADO-ESCUETA, A.V. et al. The quest for juvenile myoclonic epilepsy genes. **Epilepsy Behav**, v. 28, n.1, jul. 2013.

DE KOVEL, C.G. et al. Association analysis of BRD2 (RING3) and epilepsy in a Dutch population. **Epilepsia**, v. 48, n. 11, p. 2191-2192, nov. 2007.

_____. Whole-genome linkage scan for epilepsy-related photosensitivity: a mega-analysis. **Epilepsy Res**, v. 89, n. 2-3, p. 286-294, may 2010.

DE NIJS, L. et al. Mutations of EFHC1, linked to juvenile myoclonic epilepsy, disrupt radial and tangential migrations during brain development. **Hum Mol Genet**, v. 21, n. 23, p. 5106-5117, dec. 2012.

DEVINSKY, O. et al. Frontal functions in juvenile myoclonic epilepsy. **Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol**, v. 10, n. 4, p. 243-247, oct. 1997.

DIBBENS, L.M. et al. GABRD encoding a protein for extra- or peri-synaptic GABAA receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies. **Hum Mol Genet**, v. 13, n. 13, p. 1315-1319, 2004.

DIJK, D.J.; ARCHER S.N. PERIOD3, circadian phenotypes, and sleep homeostasis. **Sleep Med Rev**, v. 14, n. 3, p. 151-160, jun. 2010.

- DURAZZO, T.S. et al. Temporal distributions of seizure occurrence from various epileptogenic regions. **Neurology**, v. 70, p. 1265–1271, 2008.
- DUNLAP, J. C. Molecular basis for circadian clocks. **Cell**, v. 96, n. 2, p. 271-290, 1999.
- EBISAWA, T. et al. Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome. **EMBO reports**, v. 21, p. 342, 2001.
- ELLIS, J. et al. Association between specific diurnal preference questionnaire items and PER3 VNTR genotype. **Chronobiol Int**, v. 26, p. 464-473, 2009.
- ELMSLIE, F.V. et al. Genetic mapping of a major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q. **Hum Mol Genet**, v. 6, p. 1329-1333, 1997.
- ESCAYG, A. et al. Mutations of SCN1A encoding a neuronal sodium channel in two families with GEFS+2. **Nat Genet**, v. 24, p. 343–345, 2000.
- EUN, B. et al. Induction of Per1 expression following an experimentally induced epilepsy in the mouse hippocampus. **Neurosci Lett**, v. 498, n. 2, p. 110-113, jul. 2011.
- FENG, D.; LAZAR, M.A. Clocks, metabolism, and the epigenome. **Mol Cell**, v. 47, n. 2, p. 158-167, jul. 2012.
- 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, p. 470-472, apr. 2005.
- 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, p.401-404, jun. 1999.
- FILHO, G.M. et al. Psychiatric comorbidity in epilepsy: a study comparing patients with mesial temporal sclerosis and juvenile myoclonic epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 13, n. 1, p. 196-201, jul. 2008.
- 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, p. 431-435, jun. 2011.

FOLDVARY-SCHAEFER N.; GRIGG-DAMBERGER M. Sleep and epilepsy: what we know, don't know, and need to know. **J Clin Neurophysiol**, v. 23, n. 1, p. 4-20, feb. 2006.

GACHON, F. The loss of circadian PAR bZip transcription factors results in epilepsy. **Genes Dev**, v. 18, n. 12, p. 1397-1412, jun. 2004.

GEKAKIS, N. et al. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. **Science**, v. 280, p. 1564-1569, 1998.

GELISSE, P. et al. Structural brain lesions do not influence the prognosis of juvenile myoclonic epilepsy. **Acta Neurol Scand**, v. 102, p. 188-191, 2000.

_____. Clinical factors of drug resistance in juvenile myoclonic epilepsy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v.70, n.2, p.240-243, feb. 2001.

_____. Psychiatric disorders in juvenile myoclonic epilepsy. **Epilepsia**, v. 48, n. 5, p. 1032-1033, may 2007.

GARAULET, M. et al. PERIOD2 variants are associated with abdominal obesity, psycho-behavioral factors, and attrition in the dietary treatment of obesity. **J Am Diet Assoc**, v. 110, p. 917-921, 2010.

GARAULET, M.; MADRID, J. A. Chronobiological aspects of nutrition, metabolic syndrome and obesity. **Advanced Drug Delivery Review**, 2010.

GARAULET, M.; GÓMEZ-ABELLÁN, P.; MADRID, J.A. Chronobiology and obesity: the orchestra out of tune. **Clin Lipidol**, v. 5, p. 181-188, 2010.

GARCIA-RIOS, A. et al. A Period 2 genetic variant interacts with plasma SFA to modify plasma lipid concentrations in adults with metabolic syndrome. **J Nutr**, v. 142, n. 7, p. 1213-1218, jul. 2012.

GENTON, P. et al. Juvenile myoclonic epilepsy and related syndromes: clinical and neurophysiological aspects. In: **Idiopathic generalized epilepsies: clinical, experimental and genetic aspects**, London, p. 538, 1995.

GENTON, P.; GELISSE, P. The history of juvenile myoclonic epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 28, n.1, p. S2-S7, jul 2013.

GITAÍ, D. L. et al. Genes and epilepsy I: epilepsy and genetic alterations. **Rev Assoc Med Bras**, v.54, n.3, p.272-278, may-jun. 2008.

GIGLI, G.L. et al. Sleep microstructure and EEG epileptiform activity in patients with juvenile myoclonic epilepsy. **Epilepsia**, v.33, n. 5, p. 799-804, sep. - oct. 1992.

GIMBLE, J.M. et al. Prospective influences of circadian clocks in adipose tissue and metabolism. **Nat Rev Endocrinol**, v.7, p. 98–107, 2011.

GITAÍ, D. L. et al. Genes and epilepsy I: epilepsy and genetic alterations. **Rev Assoc Med Bras**, v.54, n.3, p.272-278, may-jun. 2008.

GITAÍ, L.L. et al. Lack of association between rs211037 of the GABRG2 gene and juvenile myoclonic epilepsy in Brazilian population. **Neurol India**, v. 60, n. 6, p. 585-588, nov-dec. 2012.

GREEN, C.B.; TAKAHASHI, J.S.; BASS, J. The meter of metabolism. **Cell**, v.134, p. 728–742, 2008.

GREENBERG, D.A. et al. Association of HLA class II alleles in patients with juvenile myoclonic epilepsy compared to patients with other forms of adolescent onset generalized epilepsy. **Neurology**, v. 47, p.750–755, 1996.

_____. Malic enzyme 2 may underlie susceptibility to adolescent-onset idiopathic generalized epilepsy. **Am J Hum Genet**, v. 76, n. 1, p. 139–46, 2005.

GREWAL, H.K. et al. Partial agenesis of the corpus callosum in a patient with juvenile myoclonic epilepsy. **Epileptic Disord**, v. 9, n. 4, p. 461-464, dec. 2007.

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, p.91-98, aug-sep. 2005.

GUARANHA, M. S. et al. Prognosis of juvenile myoclonic epilepsy is related to endophenotypes. **Seizure**, v.20, n.1, p.42-48, jan. 2011.

GUILLAUMOND, F. et al. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. **J Biol Rhythms**, v. 20, n. 5, p. 391-403, oct. 2005.

GUIPPONI, M. et al. Linkage mapping of benign familial infantile convulsions (BFIC) to chromosome 19q. **Hum Mol Genet**, v. 6, p. 473–477, 1997.

HAHN, L.W.; RITCHIE, M.D.; MOORE, J.H. Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions. **Bioinformatics**, v. 19, n. 3, p. 376-382, feb. 2003.

HARDEN, C.L. et al. Practice Parameter update: Management issues for women with epilepsy-focus on pregnancy (an evidence-based review): Teratogenesis and perinatal outcomes. Report of the Quality Standards Subcommittee and Therapeutics and Technology Subcommittee of the American Academy of Neurology and American Epilepsy Society. **Neurology**, apr. 2009.

HASTINGS, M. H.; HERZOG, E. D. Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei. **Journal Of Biological Rhythms**, v. 19, n. 5, p. 400-413, 2004.

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, p. 527-32, apr. 2003.

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

HEMPELMANN, A.; ARMIN, H.; SANDER, T. Confirmatory evidence for an association of the connexin-36 gene with juvenile myoclonic epilepsy. **Epilepsy Research**, 2006.

HERMAN, S.T; WALCZAK, T.S; BAZIL, C.W. Distribution of partial seizures during the sleep--wake cycle: differences by seizure onset site. **Neurology**, v. 56, n. 11, p. 1453-1459, jun. 2001.

HERPIN, T.H. Des ascès incomplets de l'épilepsie. **J Balliere et Fils**, 1867.

HOFSTRA, W.A. et al. Chronotypes and subjective sleep parameters in epilepsy patients: a large questionnaire study. **Chronobiol Int**, v. 27, n. 6, p. 1271-1286, jul. 2010.

HORNE, J.A.; OSTBERG, O. A self-assessment questionnaire to determine morningness eveningness in human circadian rhythms. **Int J Chronobiol**, v. 4, p. 97–110, 1976.

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, p. 389-399, jul-aug. 1989.

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, p. 59-63, nov. 2003.

IWASE, T. et al. Mutation screening of the human Clock gene in circadian rhythm sleep disorders. **Psychiatry Res**, v. 109, n. 2, p. 121-128, 2002.

JALLON, P.; LATOUR, P. Epidemiology of idiopathic generalized epilepsies. **Epilepsia**, v.46 Suppl 9, p.10-14, 2005.

JANZ, D.; CHRISTIAN, W. Impulsiv petit mal. **Dtsch Z Nervenheik**, v. 176, p. 346-86, 1957.

JANZ, D.; DURNER, M. Juvenile Myoclonic Epilepsy. In: Engel JJ, Pedley TA (eds). *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Philadelphia: **Lippincott-Raven**, p. 2389- 400, 1997.

JANZ, D. Epilepsy with grand mal on awakening and sleep-waking cycle. **Clin Neurophysiol**, v. 111, n. 2, p. S103-10, sep. 2000.

JAYALAKSHMI, S. S. et al. Clinical and electroencephalographic study of first-degree relatives and probands with juvenile myoclonic epilepsy. **Seizure**, v.15, n. 3, p. 177-183, apr. 2006.

JENSSEN, S. et al. Corpus callosotomy in refractory idiopathic generalized epilepsy. **Seizure**, v. 15, n. 8, p. 621-629, dec. 2006.

JOENSEN, P. Prevalence, incidence, and classification of epilepsy in the Faroes. **Acta Neurol Scand**, v. 74, n. 2, p.150-155, aug. 1986.

JOHANSSON, C. et al. Circadian clock-related polymorphisms in seasonal affective disorder and their relevance to diurnal preference. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 4, p. 734-739, apr. 2003.

- JONES, K.H.S. et al. Age-related change in the association between a polymorphism in the PER3 gene and preferred timing of sleep and waking activities. *J. Sleep Res*, v. 16, p. 12–16, 2007.
- KAPOOR, A. et al. Absence of GABRA1 Ala322Asp mutation in juvenile myoclonic epilepsy families from India. *J Genet*, v. 82, n. 1-2, p. 17-21, apr-aug. 2003.
- _____. A novel genetic locus for juvenile myoclonic epilepsy at chromosome 5q12-q14. *Hum Genet*, v. 121, p. 655–662, 2007.
- _____. An idiopathic epilepsy syndrome linked to 3q13.3-q21 and missense mutations in the extracellular calcium sensing receptor gene. *Ann Neurol*, v. 64, n. 2, p. 158-167, aug. 2008.
- KASTELEIJN-NOLST, T.D.G. et al. Consensus on diagnosis and management of JME: From founder's observations to current trends. *Epilepsy Behav*, v. 28, n. 1, p. 87-90, jul. 2013.
- KATSHU, M.Z.; BHATTACHARYA, A.; NIZAMIE, S.H. Efficacy of paroxetine in primary palmoplantar hyperhidrosis occurring with juvenile myoclonic epilepsy. *Dermatology*, v. 223, n. 3, p. 193-195, 2011.
- KATZENBERG, D. et al. A CLOCK polymorphism associated with human diurnal preference. *Sleep*, v. 21, n. 6, p. 569-576, sep. 1998.
- KELLEY, S.A.; HARTMAN, A.L.; KOSSOFF, E.H. Comorbidity of migraine in children presenting with epilepsy to a tertiary care center. *Neurology*, v. 79, n. 5, p. 468-473, jul. 2012.
- KING, D.P. et al. The mouse clock mutation behaves as an antimorph and maps within the W19H deletion, distal of Kit. *Genetics*, v. 146, p.1049 –1060, 1997.
- KLEVELAND, G.; ENGELSEN, B. A. Juvenile myoclonic epilepsy: clinical characteristics, treatment and prognosis in a Norwegian population of patients. *Seizure*, v.7, n.1, p.31-38, feb. 1998.
- KOSSOFF, E.H.; HENRY, B.J.; CERVENKA, M.C. Efficacy of dietary therapy for juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy Behav*, v. 26, n. 2, p. 162-164, feb. 2013.
- KOSTOV, H.; LARSSON, P.G.; ROSTE, G.K. Is vagus nerve stimulation a treatment option for patients with drug-resistant idiopathic generalized epilepsy? *Acta Neurol Scand Suppl*, v. 187, p. 55-58, 2007.

KRIPKE, D.F. et al. Circadian polymorphisms associated with affective disorders. **J Circadian Rhythms**, v. 7, n. 2, jan. 2009.

KRISHNAN, P. et al. Sleep disturbances in juvenile myoclonic epilepsy: a sleep questionnaire-based study. **Epilepsy Behav**, v. 23, n. 3, p. 305-309, mar. 2012.

LAVEBRATT, C. et al. PER2 variantion is associated with depression vulnerability. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 153B, p. 570–581, 2010.

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, p.117-23, apr. 2010.

LE HELLARD, S. et al. Lack of association between juvenile myoclonic epilepsy and HLA-DR13. **Epilepsia**, v. 40, n. 1, p. 117-119, jan. 1999.

LENNOX, W.G. Heredity of epilepsy as told by relatives and twins. **JAMA**, v. 146, p. 529-536, 1951.

_____. Epilepsy and Related Disorders. **Little Brown Company**, Boston, 1960.

LIU, A.W. et al. Juvenile myoclonic epilepsy in chromosome 6p12-p11: locus heterogeneity and recombinations. **Am J Med Genet**, v. 63, n. 3, p. 438–446, jun. 1996.

LIPKOVA, J. et al. Per3 VNTR polymorphism and chronic heart failure. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 153, oct. 2012.

LOISEAU, J. et al. A survey of epileptic disorders in southwest France: seizures in elderly patients. **Ann Neurol**, v. 27, n. 3, p. 232-237, mar. 1990.

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, p. 10-13, jan. 2007.

LOWREY, P. L. et al. Positional synteniccloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. **Science**, v. 288, n. 5465, p. 483-491, 2000.

LU, Y.; WANG, X. Genes associated with idiopathic epilepsies: a current overview. **Neurol Res**, v. 31, n. 2, p. 135-143, mar. 2009.

LUND, M.; REINTFOLD, M.; SIMONSEN, N. Eine kontrollierte soziologische und psychologische Untersuchung con Patienten mit juvenile myoklonischer Epilepsie. **Nervenarzt**, v. 47, p. 708-712, 1976.

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, p.74-78, feb. 2006.

MACDONALD, R. L.; KANG, J. Q.; GALLAGHER, M. J. Mutations in GABAA receptor subunits associated with genetic epilepsies. **J Physiol**, v. 588, n. 11, p. 1861-1869, jun. 2010.

MAGANTI, R. et al. Excessive daytime sleepiness and sleep complaints among children with epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 8, p. 272-277, 2006.

MANTOAN, L.; WALKER, M. Treatment options in juvenile myoclonic epilepsy. **Curr Treat Options Neurol**, v. 13, n. 4, p. 355-370, aug. 2011.

MARINI, C. et al. Genetic architecture of idiopathic generalized epilepsy: clinical genetic analysis of 55 multiplex families. **Epilepsia**, v. 45, n. 5, p. 467-478, may 2004.

MARSON, A.G. et al. The SANAD study of effectiveness of valproate, lamotrigine, or topiramate for generalised and unclassifiable epilepsy: an unblinded randomised controlled trial. **Lancet**, v. 369, n. 9566, p. 1016-1026, mar. 2007.

MANSOUR, H.A. et al. Association study of 21 circadian genes with bipolar I disorder, schizoaffective disorder, and schizophrenia. **Bipolar Disord**, v. 11, n. 7, p. 701-710, nov. 2009.

MARTINEZ-JUAREZ, I. E. et al. Juvenile myoclonic epilepsy subsyndromes: family studies and long-term follow-up. **Brain**, v.129, n. 5, p.1269-1280, may 2006.

MARTINOVIĆ, Z. Adjunctive behavioural treatment in adolescents and young adults with juvenile myoclonic epilepsy. **Seizure**, v. 10, n. 1, p. 42-47, jan. 2001.

MATOS, G. et al. The sleep-wake cycle in adult rats following pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 17, n. 3, p. 324-331, mar. 2010.

MAS, C. et al. Association of the connexin36 gene with juvenile myoclonic epilepsy. **J Med Genet**, v. 41, n. 7, p. 93, jul. 2004.

MEISLER, M.H. et al. Identification of epilepsy genes in human and mouse. **Annu Rev Genet**, v. 35, p. 567-588, 2001.

METRAKOS, J.D.; METRAKOS, K. Genetics of convulsive disorder: II-Genetic and electroencephalographic studies in centrencephalic epilepsy. **Neurology**, v. 11, p. 474-483, 1961.

MILLER, L.L. et al. Univariate genetic analyses of epilepsy and seizures in a population-based twin study: the Virginia Twin Registry. **Genet Epidemiol**, v. 15, n. 1, p. 33-49, 1998.

MISHIMA, K. et al. The 311T/C polymorphism of hClock is associated with evening preference and delayed sleep timing in a Japanese population sample. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 133, n. 1, p. 101-104, 2005.

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, 65-70, feb. 2001.

MOSCHETTA, S.; VALENTE, K.D. Impulsivity and seizure frequency, but not cognitive deficits, impact social adjustment in patients with juvenile myoclonic epilepsy. **Epilepsia**, v. 54, n. 5, p. 866-870, may 2013.

MOTIKA, P.; BERGEN, D.C. Juvenile Myoclonic Epilepsy. **The Encyclopedia of Movement Disorders**. San Diego, Elsevier, v. 1, n. 1, p. 95-97, 2010. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=9OMOfuKosgC&printsec=frontcover&hl=pt-BR#v=onepage&q&f=false>>. Acesso em: jan. 2013.

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, p. 43-7, feb. 1998.

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, p. 319-326, may 2010.

NADKARNI, N.A. et al. Evolution of a length polymorphism in the human PER3 gene, a component of the circadian system. **J Biol Rhythms**, v. 20, n. 6, p. 490-499, dec. 2005.

NAYLOR, E. et al. The circadian clock mutation alters sleep homeostasis in the mouse. **J Neurosci**, v. 20, n. 21, p. 8138-8143, nov. 2000.

NEI, M. et al. Refractory generalized seizures: response to corpus callosotomy and vagal nerve stimulation. **Epilepsia**, v. 47, n. 1, p. 115-122, jan. 2006.

NOEBELS, J.L. et al. The next decade of research in the basic mechanisms of the epilepsies. In Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies, Oxford University Press, Epilepsy Genes and Brain Development [Internet]. 4th edition. **Bethesda** (MD): National Center for Biotechnology Information (US), p. 3-11, 2012.

OBEID, T.; PANAYIOTOPOULOS, C. P. Juvenile myoclonic epilepsy: a study in Saudi Arabia. **Epilepsia**, v. 29, n. 3, p. 280-282, may-jun. 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, n. 10, p.7-14, 2005.

PAINE, S.J; GANDER, P.H; TRAVIER, N. The epidemiology of morningness/eveningness: influence of age, gender, ethnicity, and socioeconomic factors in adults (30-49 years). **Journal of biological rhythms**, v. 21, n. 1, p. 68-76, feb. 2006.

PAL, D.K. et al. BRD2 (RING3) is a probable major susceptibility gene for common juvenile myoclonic epilepsy. **Am J Hum Genet**, v. 73, p. 261-270, 2003.

PANAYIOTOPOULOS, C.P; TAHAN R.; OBEID T. Juvenile myoclonic epilepsy: factors of error involved in the diagnosis and treatment. **Epilepsia**, v. 32, p. 672-6, 1991.

_____. Juvenile myoclonic epilepsy: a 5-year prospective study. **Epilepsia**, v. 35, n. 2, , p. 285-96, mar-apr. 1994.

PANAYIOTOPOULOS, C.P. et al. Idiopathic generalised epilepsy in adults manifested by phantom absences, generalised tonic-clonic seizures, and frequent absence status. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 63, p. 622-627, 1997.

_____. Juvenile myoclonic epilepsy (Janz syndrome). In: Panayiotopoulos CP, editor. The epilepsies: seizures, syndromes and management based on the ILAE classifications and

practice parameter guidelines. **Oxfordshire: Blandon Medical Publishing**, p. 308—21, 2005.

PARTONEN, T. et al. Three circadian clock genes *Per2*, *Arntl*, and *Npas2* contribute to winter depression. **Ann Med**, v. 39, p. 229–238, 2007.

PAVLOVA, M.K.; SHEA S.A; BROMFIELD E.B. Day/night patterns of focal seizures. **Epilepsy Behav**, v. 5, p. 44–49, 2004.

PAVLOVA, M.K. et al. Is there a circadian variation of epileptiform abnormalities in idiopathic generalized epilepsy? **Epilepsy Behav**, v. 16, n. 3, p. 461-467, nov. 2009.

PEREIRA, D.S. et al. Association of the Length Polymorphism in the *Per3* Gene with Phase Delayed Sleep Syndrome: Does latitude have an influence upon it?. **Sleep**, v. 28, n. 1, p. 29-32, 2005.

PEREIRA, D.S; TUFIK, S.; PEDRAZZOLI, M. Timekeeping molecules: implications for circadian phenotypes. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 31, n. 1, p. 63-71, mar. 2009.

PERINI, G.I.; TOSIN, C.; CARRARO, C. et al. Interictal mood and personality disorders in temporal lobe epilepsy and juvenile myoclonic epilepsy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 61, p. 601-605, 1991.

PEDERSEN, S.B.; PETERSEN, K.A. Juvenile myoclonic epilepsy: clinical and EEG features. **Acta Neurol Scand**, v. 97, p. 160–163, 1998.

PINTO, D. et al. Genome-wide linkage scan of epilepsy-related photoparoxysmal electroencephalographic response: evidence for linkage on chromosomes 7q32 and 16p13. **Hum Mol Genet**, v. 14, n. 1, p. 171-178, jan. 2005.

_____. Heterogeneity at the JME 6p11-12 locus: absence of mutations in the *EFHC1* gene in linked Dutch families. **Epilepsia**, v. 47, p.1743–1746, 2006.

PRASAD, A. et al. Evolving Antiepileptic Drug Treatment in Juvenile Myoclonic Epilepsy. **Arch Neurol**, v. 60, p. 1100-1105, 2003.

PREITNER, N. et al. The orphan nuclear receptor REV-ERB alpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. **Cell**, v. 110, p. 251-260, 2002.

PUNG, T.; SCHMITZ B. Circadian rhythm and personality profile in Juvenile Myoclonic Epilepsy. **Epilepsia**, v. 47, n. 2, p. 111–114, 2006.

PURANAM, R.S. et al. A locus for generalized tonic-clonic seizure susceptibility maps to chromosome 10q25-q26. **Ann Neurol**, v. 58, p. 449-58, 2005.

RAMACHANDRAIAH, C.T. et al. Interrelationship of sleep and juvenile myoclonic epilepsy (JME): a sleep questionnaire, EEG, and polysomnography (PSG) based prospective case-control study. **Epilepsy Behav**, v. 25, n. 3, p. 391-396, nov. 2012.

RAMGOPAL, S. et al. Diurnal and sleep/wake patterns of epileptic spasms in different age groups. **Epilepsia**, v. 53, n. 7, p. 1170-1177, jul. 2012.

RANDLER, C. Morningness-eveningness comparison in adolescents from different countries around the world. **Chronobiol Int**, v. 25, n. 6, p. 1017-1028, nov. 2008.

RATNAPRIYA, R, et al. A locus for juvenile myoclonic epilepsy maps to 2q33-q36. **Hum Genet**, v. 128, n. 2, p. 123-30, aug. 2010.

REDDY, P. et al. Molecular analysis of the period locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms. **Cell**, 38, n. 3, p. 701–710, oct. 1984.

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

RENGANATHAN, R.; DELANTY, N. Juvenile myoclonic epilepsy: under-appreciated and under-diagnosed. **Postgraduate medical journal**, v. 79, n. 928, p. 78-80, feb. 2003.

REPPERT, S.M; WEAVER, D.R. Coordination of circadian timing in mammals. **Nature**, v. 418, n. 6901, p. 935-941, aug. 2002.

ROENNEBERG, T. et al. A marker for the end of adolescence. **Curr. Biol.** v.14, p. 1038–1039, 2004.

_____. Epidemiology of the human circadian clock. **Sleep Medicine Reviews**, p. 429–438, 2007.

RESZKA, E. et al. Rotating night shift work and polymorphism of genes important for the regulation of circadian rhythm. **Scand J Work Environ Health**, v. 39, n. 2, p. 178-186, mar. 2013.

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, p. 601-603, oct. 2009.

RUPP, T.L. et al. PER3 and ADORA2A polymorphisms impact neurobehavioral performance during sleep restriction. **J Sleep Res**, v. 22, n. 2, p. 160-165, apr. 2013.

SALAS-PUIG, J. et al. Epilepsia mioclónica juvenil. **Rev Neurol**, v. 32, n. 10, p. 957-961, 2001.

SANDER, T. et al. Refined mapping of the epilepsy susceptibility locus EJM1 on chromosome 6. **Neurology**, v. 49, p. 842-847, 1997.

SATO, T.K. et al. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. **Neuron**, v.43, n. 4, p. 527-537, 2004.

STEFFENS, M. Genome-wide association analysis of genetic generalized epilepsies implicates susceptibility loci at 1q43, 2p16.1, 2q22.3 and 17q21.32. **Hum Mol Genet**, v. 15, n. 21, p. 5359-5372, dec. 2012.

STEEVES, T.D. et al. Molecular cloning and characterization of the human CLOCK gene: expression in the suprachiasmatic nuclei. **Genomics**, v. 57, p. 189-200, 1999.

SATOH, K. et al. Two pedigrees of familial advanced sleep phase syndrome in Japan. **Sleep**, v. 26, n. 4, 416-417, jun. 2003.

SCHEFFER, I.E, BERKOVIC, S.F. The genetics of human epilepsy. **Trends Pharmacol Sci**, v. 24, n. 8, p. 428-433, aug. 2003.

SCHEER, F.A. et al. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA**, v.106, p. 4453-4458, 2009.

SCHMITT, B. et al. Effects of valproic acid on sleep in children with epilepsy. **Epilepsia**, v. 50, n. 8, p. 1860-1867, aug. 2009.

SERRETTI, A. et al. Genetic dissection of psychopathological symptoms: insomnia in mood disorders and CLOCK gene polymorphism. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 121, n. 1, p. 35-38, 2003.

_____. Insomnia improvement during antidepressant treatment and CLOCK gene polymorphism. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 137B, n. 1, p. 36-39, aug. 2005.

SHEARMAN, L.P. et al. Targeted disruption of the mPer3 gene: subtle effects on circadian clock function. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 17, p. 6269-6275, 2006.

SIDENVALL, R. et al. A community-based prospective incidence study of epileptic seizures in children. **Acta Paediatr**, v. 82, n. 1, p. 60-65, jan. 1993.

SHIROMANI P.J. et al. Sleep rhythmicity and homeostasis in mice with targeted disruption of mPeriod genes. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 287, n. 1, p. 47-57, jul. 2004.

SCHANKIN, C.J. et al. Headache in juvenile myoclonic epilepsy. **J Headache Pain**, v. 12, n. 2, p. 227-233, apr. 2011.

SOKIC, D. et al. Frequency, causes, phenomenology of late seizure recurrence in patient with juvenile myoclonic epilepsy after a long period of remission. **Seizure**, v. 16, p. 533-537, 2007.

SOUSA, N. A. et al. EEG recording after sleep deprivation in a series of patients with juvenile myoclonic epilepsy. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 63, n. 2B, p. 383-388, jun. 2005.

STEWART, L.S. Endogenous melatonin and epileptogenesis: facts and hypothesis. **The International journal of neuroscience**, v. 107, n. 1-2, p. 77-85, mar. 2001.

SUNDQVIST, A. Epilepsy: a clinical diagnostic overview. **Eur J Pain**, v. 6, p. 21-25, 2002.

SUROVTSEVA, M.N. et al. Association of the 54-nucleotide repeat polymorphism of hPer3 with opioid dependence in residents of the West Siberian region. **Psychiatr Genet**, v. 22, n. 6, p. 309-310, dec. 2012.

TAUER, U. et al. Genetic Dissection of photosensitivity and its relation to idiopathic generalized epilepsy. **Ann Neurol**, v. 57, p. 866–873, 2005.

THAMMONGKOL, S. et al. Efficacy of the ketogenic diet: which epilepsies respond? **Epilepsia**, v. 53, n. 3, p. 55-59, mar. 2012.

TAN, N.C.; BERKOVIC, S.F. The Epilepsy Genetic Association Database (epiGAD): analysis of 165 genetic association studies, 1996-2008. **Epilepsia**, v. 51, n. 4, p. 686-689, apr. 2010.

TENSINI, F. **Epidemiologia da epilepsia mioclônica juvenil**: variação entre gêneros e prevalência. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, Florianópolis, 2007. Disponível em: <<http://www.bibliomed.ccs.ufsc.br/CM0634.pdf>>. Acesso em: 23 nov. 2012.

TERZANO, M.G. et al. Modulation of generalized spike-and-wave discharges during sleep by cyclic alternating pattern. **Epilepsia**, v. 30, n. 6, p. 772-781, nov-dec. 1989.

THOMAS, P. et al. Juvenile Myoclonic Epilepsy. In: *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescents*. **Jonh Libbey & Co LTDA**, v. 3, p. 335-356, 2002.

TOH, K.L. et al. An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. **Science**, v. 291, n. 5506, p. 1040–1043, 2001.

TOUCHON, J. et al. Effects of spontaneous and provoked awakening on the frequency of polyspike and wave discharges in “bilateral massive epileptic myoclonus”. In: **Advances in epileptology**, p. 269-272, New York, 1982.

TRINKA, E. et al. Psychiatric Comorbidity in Juvenile Myoclonic Epilepsy. **Epilepsia**, v. 47, n. 12, p. 2086-2091, 2006.

TRIQUENEAUX, G. et al. The orphan receptor Rev-erbalpha gene is a target of the circadian clock pacemaker. **J Mol Endocrinol**, v. 33, n. 3, p. 585-608, dec. 2004.

VAN DER VEEN D.R.; ARCHER, S.N. Light-dependent behavioral phenotypes in PER3-deficient mice. **J Biol Rhythms**, v. 25, n. 1, p. 3-8. Erratum in: *J Biol Rhythms*, v. 25, n. 2, p. 150, 2010.

VANSELOW, K. et al. Differential effects of PER2 phosphorylation: molecular basis for the human familial advanced sleep phase syndrome (FASPS). **Genes Dev**, v. 20, n. 19, p. 2660–2672, 2006.

VIJAI, J. et al. Clinical characteristics of a South Indian cohort of juvenile myoclonic epilepsy probands. **Seizure**, v.12, n.7, p. 490-496, oct. 2003.

VIOLA, A. U. et al. PER3 Polymorphism Predicts Sleep Structure and Waking Performance. **Current Biology**, v. 17, p. 613–618, 2007.

XU, Y. et al. Modeling of a human circadian mutation yields insights into clock regulation by PER2. **Cell**, v. 128, n. 1, p. 59–70, 2007.

ZAROWSKI M. et al. Circadian distribution and sleep/wake patterns of generalized seizures in children. **Epilepsia**, v. 52, n. 6, p. 1076-1083, jun. 2011.

ZHENG, B. et al. The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. **Nature**, v. 400, n. 6740, p. 169–173, 1999.

ZHU, Y. et al. Period3 Structural Variation: A Circadian Biomarker Associated with Breast Cancer in Young Women. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 14, n. 1, p. 268-270, 2005.

ZIFKIN B.; ANDERMANN E.; ANDERMANN F. Mechanisms, genetics, and pathogenesis of juvenile myoclonic epilepsy. **Current Opinion in Neurology**, v. 18, n. 2, p. 147-153, apr. 2005.

ZOU Y. et al. Association of the 54-nucleotide repeat polymorphism of hPer3 with heroin dependence in Han Chinese population. **Genes Brain Behav**, v. 7, n. 1, p. 26-30, feb. 2008.

WANG, X. et al. A promoter polymorphism in the Per3 gene is associated with alcohol and stress response. **Transl Psychiatry**, v. 2, n. 73, jan. 2012.

WEBER, Y.G.; LERCHE, H. Genetic mechanisms in idiopathic epilepsies. **Dev Med Child Neurol**, v. 50, n. 9, p. 648-654, sep. 2008.

WINTER, S.L. et al. Expression of the circadian clock genes Per1 and Per2 in sporadic and familial breast tumors. **Neoplasia**, v. 9, n. 10, p. 797-800, oct. 2007.

YANG, S. et al. The role of mPer2 clock gene in glucocorticoid and feeding rhythm. **Endocrinology**, v. 150, p. 2153–2160, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A

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

Eu, _____, tendo sido convidad(o,a) a participar como voluntári(o,a) do estudo “**DISTÚRBIOS DO SONO, CRONOTIPOS E ALTERAÇÕES COGNITIVAS EM PACIENTES COM EPILEPSIA MIOCLÔNICA JUVENIL: AVALIAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR**”, recebi das alunas Bruna Priscila dos Santos (Mestranda em Ciências da Saúde), Gabriele Teles Chaves e Jeannette Barros Ribeiro Costa (Acadêmicas de Medicina) da Universidade Federal de Alagoas - UFAL, responsáveis por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- Que o estudo se destina a avaliar a frequência de distúrbios do sono e alterações cognitivas em pessoas com epilepsia mioclônica juvenil.
- Que a importância deste estudo é a de demonstrar se os distúrbios do sono e as alterações cognitivas são frequentes nessas pessoas, quais os tipos mais frequentes e em qual gravidade e assim, indicar qual a melhor forma de pesquisá-los para o diagnóstico e tratamento.
- Que esse estudo começará em abril e terminará em outubro de 2011.
- Que o estudo será feito através de entrevistas e questionários sobre distúrbios do sono e de uma avaliação neuropsicológica.
- Que não existem outros meios para obter os mesmos resultados.
- Que os incômodos que poderei sentir com a minha participação são os seguintes: informar dados pessoais.
- Que a participação no estudo não trará nenhum risco à minha saúde física ou mental.
- Que em qualquer etapa do estudo, terei acesso ao profissional responsável pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas, sendo os responsáveis: Profa. Lívia Leite Góes Gitaí e os alunos Bruna Priscila dos Santos, Gabriele Teles Chaves e Jeannette Barros Ribeiro Costa.
- Que os benefícios que deverei esperar com a minha participação são: avaliação da possibilidade de ter distúrbios do sono e alterações cognitivas com orientação sobre como confirmar o diagnóstico e a garantia de poder se manter atualizado (a) sobre os resultados da pesquisa que sejam do conhecimento dos pesquisadores
- Que, sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.
- Que, a qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo.

- Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.
- Que os resultados deste estudo serão divulgados no meio científico.

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-voluntári(o,a)

Domicílio: (rua, praça, conjunto):

Bloco: /Nº: /Complemento:

Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:

Ponto de referência:

Contato de urgência: Sr(a). Bruna Priscila dos Santos/Gabriele Teles Chaves/Jeanette Barros Ribeiro Costa

Domicílio: (rua, praça, conjunto): Cidade Universitária

Bloco: /Nº: /Complemento: s/n

Bairro:/CEP/Cidade:/Telefone: Cidade Universitária/CEP:57072-010/Maceió-AL/(82) 3322-2432

Ponto de referência:

Endereço das responsáveis pela pesquisa (OBRIGATÓRIO): Profa.Dra. Lívia Leite Góes Gitai

Instituição: Universidade Federal de Alagoas – Campus A.C. Simões

Endereço: Av. Lourival Melo Mota

Bloco: /Nº: /Complemento: sem número

Bairro: /CEP/Cidade: Tabuleiro dos Martins, CEP 57072-900, Maceió-AL

Telefones p/contato:

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: 3214-1041

	-
	-
	-

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

APÊNDICE B

Entrevista clínica sobre distúrbios do sono

Examinador: _____ Data: _____

IDENTIFICAÇÃO

NOME: _____

REGISTRO: _____ **D.N.:** _____ **IDADE:** _____

SEXO: (M) (F) **COR:** (B) (N) (P) (O) **EST. CIVIL:** (C) (S) (D) (V)

ESCOLARIDADE: () analf () FI () FC () MI () MC () SI () SC / () Ainda estuda. Anos de estudo: _____ **NATURAL:** _____ **PROCEDÊNCIA:** _____

ENDEREÇO: _____ **TELEFONES:** _____

PROFISSÃO: _____ **Nº DE PESS NA CASA:** _____ **R.FAMILIAR:** _____

AMBIENTE DE SONO

Dorme no quarto: () Sozinho () Acompanhado. Quem: _____ Está presente na entrevista: (N) (S) **Quarto:** Temp. adequada: (N) (S) Silencioso: (N) (S)

CARACTERÍSTICAS DO CICLO SONO-VIGÍLIA

Horário regular para dormir: (N) (S)

Horário habitual:

PERÍODO	DEITAR	DORMIR	ACORDAR	LEVANTAR
Semana				
FDS				

() Uso de cafeína > 16h. Tipo, quant. e hora: _____

() Uso de medicação para dormir Tipo, quantidade e horário: _____

() Dificuldade para iniciar o sono Tempo de evolução: _____ Frequência: _____

() Acorda à noite: N: na noite: _____; na semana: _____

Se acorda durante a noite, demora a voltar a dormir? (N) (S). Quanto tempo? _____

Causas dos despertares: () diurese () pesadelos () dor. tipo: _____. () Outro: _____

Sente-se cansado ao acordar? (N) (S). Tempo evolução: _____ Frequência: _____

Cochila durante o dia? (N) (S) Frequência por semana: _____ Tempo: _____

Durante o dia, no último ano, tem apresentado:

CLÍNICA	FREQUÊNCIA / SEMANA		
	N	<1x	1-2x
Ataques de sono			
Cataplexia			
Sonolência			
Cansaço			

Durante o sono, no último ano, tem apresentado:

CLÍNICA	FREQUÊNCIA / SEMANA				CLINICA	FREQUÊNCIA / SEMANA			
	N	<1XS	1-2XS	≥3X		N	<1xs	1-2x	≥3x
Roncos					Chuta				
Pausas respiratórias					Fala				
Sensação de sufocamento					Acorda parecendo confuso				
Sensação de engasgo					Cai da cama				
Dispneia					Pesadelos				
Respiração bucal					Range/aperta os dentes				
Diurese (número)					Mioclônias iniciais				
Sudorese					Cãimbras				
Tosse					Movimentos intensos				

Sono agitado					Movimentos rítmicos da cabeça e/ou tronco				
Grito e choro incontroláveis					Crises epiléticas				
Anda					Outro:				

Se roncos, são audíveis: () Somente no quarto () No cômodo ao lado () Toda casa

Durante o início ou fim do período de sono, no último ano, tem apresentado:

CLÍNICA	FREQUÊNCIA / SEMANA				CLÍNICA	FREQUÊNCIA / SEMANA			
	N	<1x	1-2x	≥3x		N	<1x	1-2x	≥3x
Alucinações hipnagógicas					Cefaléia matinal				
Alucinações hipnopômicas					Boca seca ao acordar				
Paralisia do sono					Congestão nasal ao acordar				

No último ano, tem apresentado:

- () Desconforto ou agonia nas pernas
 () O desconforto ou agonia melhora durante movimentos
 () Início ou piora em repouso
 () Início ou piora à noite

ANTECEDENTES PESSOAIS

Diagnóstico prévio de:

() Diabetes mellitus () HAS () Hipotireoidismo () Outro: _____

MEDIDAS

Peso: _____ Altura: _____ CA: _____ CC: _____ Q: _____

MEDICAÇÕES – em uso de (Todas):

DROGA	POSOLOGIA	EFEITOS COLATERAIS

CRISES EPILÉPTICAS:

Ocorrência	Mioclônias	Ausência	TCG
Vida	(N) (S)	(N) (S)	(N) (S)
Último ano	(N) (S)	(N) (S)	(N) (S)
Últimos 6 m	(N) (S)	(N) (S)	(N) (S)
Último mês			
Última semana			
Horário preferencial			

ANEXOS

ANEXO A**CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA**



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

Maceió – AL, 02/04/2012

Senhor (a) Pesquisador (a), Daniel Leite Góes Gitaí, Livia Leite Góes Gitaí
Katiúscia Karine Martins da Silva, Fernando Tenório Gameleira
Bruna Priscila dos Santos, Gabriele Teles Chaves
Jeannette Barros Ribeiro Costa

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), em 29/03/2012 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo nº 004660/2011-71 sob o título, **Distúrbios do sono, cronotipos e alterações cognitivas em pacientes com epilepsia mioclônica juvenil: avaliação clínica e molecular**, 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

Válido até: Abril de 2013

[Assinatura]
Prof. Dr. Daniel Tenório Gameleira
Coordenadora do Comitê de
Ética em Pesquisa -UFAL

ANEXO B

ESCALA DE SONOLÊNCIA DE EPWORTH (ESS-BR)

Nome: _____

Data: _____ Idade (anos): _____ Sexo: _____

Qual a probabilidade de você cochilar ou dormir, e não apenas se sentir cansado, nas seguintes situações? Considere o modo de vida que você tem levado recentemente. Mesmo que você não tenha feito algumas destas coisas recentemente, tente imaginar como elas o afetariam. Escolha o número mais apropriado para responder cada questão:

0 = nunca cochilaria

1 = pequena probabilidade de cochilar

2 = probabilidade média de cochilar

3 = grande probabilidade de cochilar

Situação	Probabilidade de cochilar			
	0	1	2	3
Sentado e lendo	0	1	2	3
Assistindo TV	0	1	2	3
Sentado , quieto, em um lugar público (por exemplo, em um teatro, reunião ou palestra)	0	1	2	3
Andando de carro por uma hora sem parar, como passageiro	0	1	2	3
Ao deitar-se à tarde para descansar, quando possível	0	1	2	3
Sentado conversando com alguém	0	1	2	3
Sentado quieto após o almoço sem bebida de álcool	0	1	2	3
Em um carro parado no trânsito por alguns minutos	0	1	2	3

Obrigado por sua cooperação.

ANEXO C

ÍNDICE DE QUALIDADE DE SONO DE PITTSBURGH (PSQI-BR)

Nome: _____

Instruções:

As seguintes perguntas são relativas aos seus hábitos de sono durante o **último mês somente**. Suas respostas devem indicar a lembrança mais exata da maioria dos dias e noites do último mês. Por favor, responda a todas as perguntas.

- 1) Durante o último mês, quando você geralmente foi para a cama à noite?
Hora usual de deitar _____
- 2) Durante o último mês, quanto tempo (em minutos) você geralmente levou para dormir à noite?
Número de minutos _____
- 3) Durante o último mês, quando você geralmente levantou de manhã?
Hora usual de levantar _____
- 4) Durante o último mês, quantas horas de sono você teve por noite? (Este pode ser diferente do número de horas que você ficou na cama)
Horas de sono por noite _____

Para cada uma das questões restantes, marque a melhor (uma) resposta. Por favor, responda a todas as questões.

- 5) Durante o último mês, com que frequência você teve dificuldade de dormir porque você...
 - a) Não conseguiu adormecer em até 30 minutos

Nenhuma no último mês _____	Menos de 1 vez/semana _____
1 ou 2 vezes/semana _____	3 ou mais vezes/semana _____
 - b) Acordou no meio da noite ou de manhã cedo

Nenhuma no último mês _____	Menos de 1 vez/semana _____
1 ou 2 vezes/semana _____	3 ou mais vezes/semana _____
 - c) Precisou levantar para ir ao banheiro

Nenhuma no último mês _____	Menos de 1 vez/semana _____
1 ou 2 vezes/semana _____	3 ou mais vezes/semana _____
 - d) Não conseguiu respirar confortavelmente

Nenhuma no último mês _____	Menos de 1 vez/semana _____
1 ou 2 vezes/semana _____	3 ou mais vezes/semana _____
 - e) Tossiu ou roncou forte

Nenhuma no último mês _____	Menos de 1 vez/semana _____
1 ou 2 vezes/semana _____	3 ou mais vezes/semana _____
 - f) Sentiu muito frio

Nenhuma no último mês ____ Menos de 1 vez/sem. ____
 1 ou 2 vezes/sem. ____ 3 ou mais vezes/sem. ____

g) Sentiu muito calor

Nenhuma no último mês ____ Menos de 1 vez/sem. ____
 1 ou 2 vezes/sem. ____ 3 ou mais vezes/sem. ____

h) Teve sonhos ruins

Nenhuma no último mês ____ Menos de 1 vez/sem. ____
 1 ou 2 vezes/sem. ____ 3 ou mais vezes/sem. ____

i) Teve dor

Nenhuma no último mês ____ Menos de 1 vez/sem. ____
 1 ou 2 vezes/sem. ____ 3 ou mais vezes/sem. ____

j) Outra(s) razão (ões), por favor descreva _____

Com que frequência, durante o último mês, você teve dificuldade para dormir devido a essa razão?

Nenhuma no último mês ____ Menos de 1 vez/sem. ____
 1 ou 2 vezes/sem. ____ 3 ou mais vezes/sem. ____

6) Durante o último mês, como você classificaria a qualidade do seu sono de uma maneira geral?

Muito boa ____ Boa ____ Ruim ____ Muito ruim

7) Durante o último mês, com que frequência você tomou medicamento (prescrito ou “por conta própria”) para lhe ajudar a dormir?

Nenhuma no último mês ____ Menos de 1 vez/sem. ____
 1 ou 2 vezes/sem. ____ 3 ou mais vezes/sem. ____

8) No último mês, com que frequência você teve dificuldade de ficar acordado enquanto dirigia, comia ou participava de uma atividade social (festa, reunião de amigos, trabalho, estudo)?

Nenhuma no último mês ____ Menos de 1 vez/sem. ____
 1 ou 2 vezes/sem. ____ 3 ou mais vezes/sem. ____

9) Durante o último mês, quão problemático foi para você manter o entusiasmo (ânimo) para fazer as coisas (suas atividades habituais)?

Nenhuma dificuldade ____
 Um problema leve ____
 Um problema razoável ____
 Um grande problema ____

10) Você tem um(a) parceiro [esposo(a)] ou colega de quarto?

Não ____
 Parceiro ou colega, mas em outro quarto ____
 Parceiro no mesmo quarto, mas não na mesma cama ____
 Parceiro na mesma cama ____

11) Se você tem um parceiro ou colega de quarto, pergunte a ele/ela com que frequência, no último mês, você teve...

a) Ronco forte

Nenhuma no último mês ____ Menos de 1 vez/sem. ____
 1 ou 2 vezes/sem. ____ 3 ou mais vezes/sem. ____

b) Longas paradas na respiração enquanto dormia

Nenhuma no último mês ____ Menos de 1 vez/sem. ____
 1 ou 2 vezes/sem. ____ 3 ou mais vezes/sem. ____

c) Contrações ou puxões nas pernas enquanto dormia

Nenhuma no último mês ____ Menos de 1 vez/sem. ____
 1 ou 2 vezes/sem. ____ 3 ou mais vezes/sem. ____

d) Episódios de desorientação ou confusão durante o sono

Nenhuma no último mês ____ Menos de 1 vez/sem. ____
 1 ou 2 vezes/sem. ____ 3 ou mais vezes/sem. ____

e) Outras alterações (inquietações) enquanto você dorme: por favor, descreva

Nenhuma no último mês ____ Menos de 1 vez/sem. ____
 1 ou 2 vezes/sem. ____ 3 ou mais vezes/sem. ____

ANEXO D

Questionário *Horne-Ostberg* (Tipos Matutinos – Vespertinos)

Instruções:

1. Leia com atenção cada questão antes de responder.
2. Responda todas as questões.
3. Responda as questões na ordem numérica.
4. Cada questão deve ser respondida independentemente das outras, não volte atrás e nem corrija suas respostas anteriores.
5. Para cada questão coloque apenas uma resposta (um X no local correspondente); algumas questões tem uma escala, nestes casos coloque um X no ponto apropriado da escala.
6. Responda cada questão com toda a honestidade possível. Suas respostas e os resultados são confidenciais.
7. Se você quiser, pode escrever algum comentário abaixo de cada pergunta.

Questões:

1. Considerando apenas seu bem-estar pessoal e com liberdade total de planejar seu dia, a que horas você se levantaria?

 Entre 5:00 e 6:30hs.
 Entre 6:30 e 8:00hs.
 Entre 8:00 e 9:30hs.
 Entre as 9:30 e 11:00hs
 Entre as 11:00 e as 12:00hs.
2. Considerando apenas seu bem-estar pessoal e com liberdade total de planejar sua noite, a que horas você se deitaria?

 20-21hs
 21-22:30hs.
 22:30-00:30hs.
 00:30-1:30hs.
 1:30-3:00hs.
3. Até que ponto você depende do despertador para acordar de manhã?

 Nada dependente
 Não muito dependente
 Razoavelmente dependente
 Muito dependente
4. Você acha fácil acordar de manhã?

 Nada fácil.
 Não muito fácil.
 Razoavelmente fácil.

- 4 Muito fácil.
5. Você se sente alerta durante a primeira meia hora depois de acordar?
- 1 Nada alerta.
2 Não muito alerta.
3 Razoavelmente alerta.
4 Muito alerta.
6. Como é seu apetite durante a primeira meia hora depois de acordar?
- 1 Muito ruim.
2 Não muito ruim.
3 Razoavelmente bom.
4 Muito bom.
7. Durante a primeira meia hora depois de acordar você se sente cansado?
- 1 Muito cansado.
2 Não muito cansado.
3 Razoavelmente em forma.
4 Em plena forma.
8. Se você não tem compromisso no dia seguinte e comparando com sua hora habitual, a que horas você gostaria de ir deitar?
- 4 Nunca mais tarde.
3 Menos de 1 hora mais tarde.
2 Entre 1 a 2 horas mais tarde.
1 Mais do que 2 horas mais tarde.
9. Você decidiu fazer exercícios físicos. Um amigo sugeriu o horário das 7:00 às 8:00 horas da manhã, duas vezes por semana. Considerando apenas seu bem-estar pessoal, o que você acha de fazer exercícios nesse horário?
- 4 Estaria em boa forma.
3 Estaria razoavelmente em forma.
2 Acharia isso difícil.
1 Acharia muito difícil.
10. A que horas da noite você se sente cansado e com vontade de dormir?
- 5 20:00-21:00hs.
4 21:00-22:30hs.
3 22:30-00:30hs.

2 1:00-2:00hs.

1 2:00-3:00hs.

11. Você quer estar no máximo de sua forma para fazer um teste que dura duas horas e que você sabe que é mentalmente cansativo. Considerando apenas o seu bem-estar pessoal, qual desses horários você escolheria para fazer o teste?

6 Das 8:00 às 10:00hs.

4 Das 11:00 às 13:00hs.

2 Das 15:00 às 17:00hs.

1 Das 19:00 às 21:00hs.

12. Se você fosse deitar às 23:00 horas, em que nível de cansaço você se sentiria?

0 Nada cansado.

2 Um pouco cansado.

3 Razoavelmente cansado.

5 Muito cansado.

13. Por alguma razão você foi dormir várias horas mais tarde do que é de seu costume. Se no dia seguinte você não tiver hora certa para acordar, o que aconteceria com você?

4 Acordaria na hora normal, sem sono

3 Acordaria na hora normal, com sono.

2 Acordaria na hora normal e dormiria novamente.

1 Acordaria mais tarde do que o costume.

14. Se você tiver que ficar acordado das 4:00 às 6:00 horas da manhã para realizar uma tarefa e não tiver compromissos no dia seguinte, o que você faria?

1 Só dormiria depois de fazer a tarefa.

2 Tiraria uma soneca antes da tarefa e dormiria depois.

3 Dormiria bastante antes e tiraria uma soneca depois.

4 Só dormiria antes de fazer a tarefa.

15. Se você tiver que fazer duas horas de exercício físico pesado e considerando apenas o seu bem-estar pessoal, qual destes horários você escolheria

4 Das 8:00 às 10:00hs.

3 Das 11:00 às 13:00hs.

2 Das 15:00 às 17:00hs.

1 Das 19:00 às 21:00hs.

16. Você decidiu fazer exercícios físicos. Um amigo sugeriu o horário das 22:00 às 23:00 horas, duas vezes por semana. Considerando apenas seu bem-estar pessoal, o que você acha de fazer exercícios nesse horário?

1 Estaria em boa forma.

- 2 Estaria razoavelmente em forma.
- 3 Acharia isso difícil.
- 4 Acharia isso muito difícil.

17. Suponha que você possa escolher o seu próprio horário de trabalho e que você deva trabalhar cinco horas seguidas por dia. Imagine que seja um serviço interessante e que você ganhe por produção. Qual o horário que você escolheria? Marque às cinco horas consecutivas.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	0

Considere o quadrante marcado mais à direita para escolher entre as seguintes opções:

- 1 Entre 0:00-3:00hs.
- 5 Entre 3:00-7:00hs
- 4 7:00hs.
- 3 Entre 8:00-13:00hs.
- 2 Entre 13:00-17:00hs.
- 1 Entre 17:00-0:00.

18. A que horas do dia você atinge seu melhor momento de bem-estar?

- 1 Entre 0:00 e 4:00hs.
- 5 Entre 4:00 e 7:00hs.
- 4 Entre 7:00 e 9:00hs.
- 3 Entre 9:00 e 16:00hs.
- 2 Entre 16:00 e 21:00hs.
- 1 Entre 21:00hs e 0:00hs.

19. Fala-se em pessoas matutinas e vespertinas (as primeiras gostam de acordar cedo e dormir cedo, as segundas de acordar tarde e dormir tarde). Com qual desses tipos você se identifica?

- 6 Tipo matutino.
- 4 Mais matutino que vespertino.
- 2 Mais vespertino que matutino.
- 0 Tipo vespertino.

20. Marque o seu período habitual de trabalho ou estudo.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	0

ANEXO E

**Classificação Internacional dos Distúrbios do Sono – Segunda edição (CIDS-2)
(AASS, 2005)**

I. Insônias

- Insônia de Ajuste (Insônia aguda)
- Insônia Psicofisiológica
- Insônia Psicofisiológica
- Insônia Paradoxal
- Insônia Idiopática
- Insônia causada por Doença Mental
- Higiene Inadequada do Sono
- Insônia Comportamental da Infância
- Insônia causada por Drogas ou Substâncias
- Insônia causada por Condições Médicas
- Insônia não causada por Substâncias ou Condição Fisiológica conhecida; inespecífica (Insônia não-orgânica; não especificada de outra forma)
- Insônia Fisiológica (orgânica); inespecífica

II. Distúrbios Respiratórios Relacionados ao Sono

- ✓ Síndromes da Apnéia Central do Sono
 - Apnéia Central do Sono: Primária
 - Apnéia Central do Sono causada pelo Padrão de Respiração de Cheyne-Stokes
 - Apnéia Central do Sono causada pela Respiração Periódica da Alta Altitude
 - Apnéia Central do Sono causada por Condições Médicas que não Cheyne-Stokes
 - Apnéia Central do Sono causada por Drogas ou Substâncias
 - Apnéia do Sono Primária da Infância (do recém-nascido)
- ✓ Síndromes da Apnéia Obstrutiva do Sono
 - Apnéia Obstrutiva do Sono, adulto
 - Apnéia Obstrutiva do Sono, pediátrica
- ✓ Síndromes da Hipoventilação/Hipoxemia relacionadas ao Sono
 - Hipoventilação Alveolar não-obstrutiva relacionada ao sono, idiopática
 - Síndrome da Hipoventilação Alveolar Central Congênita
- ✓ Síndromes da Hipoventilação/Hipoxemia relacionadas ao Sono causadas por Condições Médicas
 - Síndromes da Hipoventilação/Hipoxemia relacionadas ao Sono causadas doenças do parênquima e vasculatura pulmonar
 - Síndromes da Hipoventilação/Hipoxemia relacionadas ao Sono causadas por obstrução das vias aéreas inferiores
 - Síndromes da Hipoventilação/Hipoxemia relacionadas ao Sono causadas por doenças neuromusculares e da caixa torácica
 - Outros Distúrbios Respiratórios relacionados ao Sono
 - Apnéia do Sono/ Distúrbios Respiratórios relacionados ao Sono, inespecíficos

III. Hipersonias de Origem Central não causadas pelos Distúrbios do Ritmo Circadiano do Sono, Distúrbios Respiratórios relacionados ao Sono, ou outras causas de sono noturno interrompido

- ✓ Narcolepsia com cataplexia
- ✓ Narcolepsia sem cataplexia

- ✓ Narcolepsia causada por Condições Médicas
- ✓ Narcolepsia, inespecífica
- ✓ Hipersonia Recorrente
- ✓ Síndrome de Kleine-Levin
- ✓ Hipersonia relacionada à menstruação
- ✓ Hipersonia Idiopática com tempo de sono prolongado
- ✓ Hipersonia Idiopática sem tempo de sono prolongado
- ✓ Síndrome do Sono Insuficiente induzido comportamentalmente
- ✓ Hipersonia causada por Condições Médicas
- ✓ Hipersonia causada por Drogas ou Substâncias
- ✓ Hipersonia não causada por Substâncias ou Condição Fisiológica conhecida (Hipersonia não-orgânica; não especificada de outra forma)
- ✓ Hipersonia Fisiológica (orgânica), inespecífica (Hipersonia Orgânica, não especificada de outra forma)

IV. **Distúrbios do Ritmo Circadiano do Sono**

- ✓ Distúrbios do Ritmo Circadiano do Sono, tipo fase do sono atrasada (Distúrbio da Fase do Sono Atrasada)
- ✓ Distúrbios do Ritmo Circadiano do Sono, tipo fase do sono avançada (Distúrbio da Fase do Sono Avançada)
- ✓ Distúrbios do Ritmo Circadiano do Sono, tipo sono-vigília irregular (Ritmo Irregular do Sono-Vigília)
- ✓ Distúrbios do Ritmo Circadiano do Sono, tipo livre-curso (Tipo não sincronizado)
- ✓ Distúrbios do Ritmo Circadiano do Sono, tipo Jet Lag (Distúrbio de Jet Lag)
- ✓ Distúrbios do Ritmo Circadiano do Sono, tipo trabalho de turno (Distúrbio do Trabalho de Turno)
- ✓ Distúrbios do Ritmo Circadiano do Sono causado por condições médicas
- ✓ Outros Distúrbios do Ritmo Circadiano do Sono (Distúrbios do Ritmo Circadiano, não especificado de outra forma)
- ✓ Outros Distúrbios do Ritmo Circadiano do Sono causado por drogas ou substâncias

V. **Parassonias**

- ✓ Distúrbios do Despertar (do sono NREM)
 - Despertar confusional
 - Sonambulismo
 - Terror Noturno
- ✓ Parassonias usualmente relacionadas ao sono REM
 - Distúrbio Comportamental do sono REM
 - Paralisia do sono isolada e recorrente
 - Distúrbios de pesadelos
- ✓ Outras Parassonias
 - Distúrbios dissociativo relacionado ao sono
 - Enurese do sono
 - Gemido relacionado ao sono
 - Síndrome da explosão da cabeça
 - Alucinações relacionadas ao sono
 - Distúrbio do comer relacionado ao sono

- Parassonias, inespecíficas
- Parassonias causadas por drogas ou substâncias
- Parassonias por condições médicas

VI. Distúrbios do Movimento relacionados ao sono

- ✓ Síndrome das Pernas Inquietas
- ✓ Distúrbio dos Movimentos Periódicos dos Membros
- ✓ Cãimbras de pernas relacionadas ao sono
- ✓ Bruxismo relacionado ao sono
- ✓ Distúrbio de Movimentos rítmicos relacionados ao sono
- ✓ Distúrbio de Movimento relacionado ao sono inespecífico
- ✓ Distúrbio de Movimento relacionado ao sono causado por drogas ou substâncias
- ✓ Distúrbio de Movimento relacionado ao sono causado por condições médicas

VII. Sintomas isolados, variantes aparentemente normais e de importância não resolvida

- ✓ Dormidor longo
- ✓ Dormidor curto
- ✓ Ronco
- ✓ Sonilóquio
- ✓ Mioclonias do início do sono
- ✓ Mioclonia benigna do sono da infância
- ✓ Tremor dos pés hipnagógicos e alternância de ativação dos músculos das pernas durante o sono
- ✓ Mioclonia proprioespinal no início do sono
- ✓ Mioclonia fragmentária excessiva

VIII. Outros Distúrbios do Sono

- ✓ Outros distúrbios do sono fisiológicos (orgânicos)
- ✓ Outros distúrbios do sono não causados por substância ou condição fisiológica conhecida
- ✓ Distúrbios do sono ambientais