

**ATRÍCIA ALINE OLIVEIRA RIBEIRO DE AGUIAR ARAUJO**

**ANÁLISE DE LIGAÇÃO E ASSOCIAÇÃO EM FAMÍLIAS COM  
EPILEPSIA MIOCLÔNICA JUVENIL E OUTRAS FORMAS  
DE EPILEPSIA GENERALIZADA IDIOPÁTICA**

200407869

**Apoio CAPES**

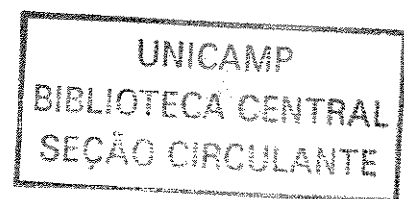
Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica, Área Neurociências.

Campinas, 16 de fevereiro de 2004.

**CAMPINAS**

Prof. Dr. Iscia Teresinha Lopes Mendes  
Orientadora

**2004**



**PATRÍCIA ALINE OLIVEIRA RIBEIRO DE AGUIAR ARAUJO**

**ANÁLISE DE LIGAÇÃO E ASSOCIAÇÃO EM FAMÍLIAS COM  
EPILEPSIA MIOCLÔNICA JUVENIL E OUTRAS FORMAS  
DE EPILEPSIA GENERALIZADA IDIOPÁTICA**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação  
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre  
em Fisiopatologia Médica, área de Neurociências*

***Orientadora: Prof. Dra. Iscia Lopes Cendes***

***Coorientador: Prof. Dr. Fernando Cendes***

***Apoio CAPES***

**CAMPINAS**

**2004**

UNIDADE	90
Nº CHAMADA	UNICAMP
	ANISA
V	EX
TOMBO BCI	58077
PROC.	16 P1117104
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	26/5/04
Nº CPD	

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP**

CM00197683-2

BIB ID 316339

Ar 15a      Araújo, Patricia Aline Oliveira Ribeiro de Aguiar  
Análise de ligação e associação em famílias com epilepsia  
mioclônica juvenil e outras formas de epilepsia generalizada idiopática  
/ Patricia Aline Oliveira Ribeiro de Aguiar Araújo . Campinas, SP :  
[s.n.], 2004.

Orientadores : Iscia Lopes Cendes, Fernando Cendes  
Dissertação ( Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Genética. 2. Neurociências. 3. Mutação – Biologia. I. Iscia  
Lopes Cendes. II. Fernando Cendes. III. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

---

# **Banca examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

---

**Orientador(a): Prof(a). Dr(a).**

**Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes**

---

---

## **Membros:**

---

**1. Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes**

---

**2. Prof. Dr. Luiz Eugênio Mello**

---

**3. Profa. Dra. Christine Hackel**

---

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data: 16/02/2004**

---

***DEDICATÓRIA***

*Aos meus pais e  
ao meu esposo.*

À professora Iscia pela resposta do primeiro e-mail que trocamos, me dando a oportunidade de realização desse trabalho; pelo grande exemplo de professora, pesquisadora e chefe.

Ao Luiz Betting e Suzana Mory por todo esforço clínico para obtenção dos pacientes para esse estudo.

Aos Drs. Fernando Cendes, Marilisa Guerreiro, Carlos Guerreiro, Li Min e seus alunos pelos pacientes encaminhados para essa pesquisa.

Às meninas do ambulatório de Neurologia: Rute, Solaine, Edna e Leda, pela paciência com as bagunças das pastas e pelos sangues colhidos.

À Teresa da Fisiopatologia por sempre se preocupar com minhas papeladas.

A todos os amigos e colegas do laboratório que aturaram minha chatice de segunda-feira longe de casa (não só a de segunda...) e pelo carinho com que sempre me acolheram.

Aos mais que amigos Marilza e Rodrigo, por todos os galhos quebrados.

Ao amigo Fábio por ser quem ele é.

À Neide pela ajuda essencial na realização desse trabalho.

Ao Vinícius por todo trabalho e dedicação, sem os quais essa tese não teria sido realizada.

Às meninas do café, pelos momentos de descontração.

Aos meus pais pelos maiores incentivos aos estudos e à pesquisa.

Ao João Henrique, meu marido, por tudo.

À CAPES pelo apoio financeiro.

*Pois eu, o Senhor teu Deus,  
eu te seguro pela mão e te digo:  
“Nada temas, eu venho em teu auxílio.”*

***Isaías 41, 13***

---

	<b>PÁG.</b>
<b>RESUMO</b> .....	xxxi
<b>ABSTRACT</b> .....	xxxv
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	39
1.1- Aspectos gerais.....	41
1.2- Aspectos clínicos.....	42
1.3- Aspectos genéticos.....	43
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	51
<b>3- JUSTIFICATIVA</b> .....	55
<b>4- PACIENTES, MATERIAIS E METODOLOGIA</b> .....	59
4.1- Aspectos éticos.....	61
4.2- Pacientes.....	61
4.2.1- Famílias efetivamente utilizadas para os estudos de ligação.....	63
4.2.2- Pacientes utilizados para o estudo de associação.....	65
4.2.3- Pacientes utilizados para o estudo de mutação.....	66
4.3- Extração de DNA genômico.....	67
4.4- Estudo de ligação e associação.....	67
4.4.1- Seleção dos marcadores de DNA.....	68
4.4.2- Genotipagem dos marcadores por PCR.....	69
4.4.3- Análise dos dados.....	70
4.4.3.1- Análise dos resultados para o estudo de ligação.....	70
4.4.3.2- Análise dos resultados para o estudo de associação.....	72



4.5- Análise de mutação.....	76
4.5.1- Seleção dos <i>primers</i> .....	76
4.5.2- Genotipagem do exon 9 do gene <i>GABRA1</i> .....	77
4.5.3- Detecção de mutação.....	77
<b>5- RESULTADOS.....</b>	<b>79</b>
5.1- Estudos de ligação.....	81
5.1.1- Simulação de ligação.....	81
5.1.2- Análise de dois pontos.....	82
5.1.2.1- Região 6p21.....	82
5.1.2.1.1- Teste de heterogeneidade.....	83
5.1.2.2- Região 6p12.....	84
5.1.2.2.1- Teste de heterogeneidade.....	85
5.1.2.3- Região 5q34.....	86
5.1.2.3.1- Teste de heterogeneidade.....	87
5.1.3- Análise de múltiplos pontos.....	88
5.1.3.1- Região 6p21 e 6p12.....	88
5.1.3.2- Região 5q34.....	89
5.2- Estudo de associação.....	90
5.2.1- Região 6p21.....	90
5.2.2- Região 6p12.....	92
5.2.3- Região 5q34.....	94
5.3- Análise de mutação.....	96
5.3.1- Região 5q34.....	96

<b>6- DISCUSSÃO</b> .....	99
6.1- Região 6p21.....	101
6.2- Região 6p12.....	102
6.3- Região 5q34.....	103
6.4- Considerações finais.....	105
<b>7- CONCLUSÕES</b> .....	107
<b>8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	111
<b>9- ANEXOS</b> .....	127

<i>ARC</i>	gene que codifica proteína reguladora de atividade citoesqueleto-associada
CF	crise febril
<i>CHRNA4</i>	gene receptor colinérgico, nicotínico, alfa polipeptídeo 4
<i>CHRNA7</i>	gene receptor colinérgico, nicotínico, alfa polipeptídeo 7
<i>CLCN2</i>	gene canal clorídrico 2
<i>CLIC5</i>	gene canal intracelular clorídrico 5
CTCG	crise tônico-clônica generalizada
dATP	adenina deoxinucleotídeo trifosfato
dCTP	citossina deoxinucleotídeo trifosfato
dGTP	guanina deoxinucleotídeo trifosfato
<i>DQB1</i>	gene principal complexo de histocompatibilidade, classe II, DQ beta 1
dTTP	timina deoxinucleotídeo trifosfato
EAI	epilepsia ausência infantil
EAJ	epilepsia ausência juvenil
EEG	eletrencefalograma
<i>EFHC1</i>	gene contendo um domínio EF-hand (C-terminal)
EGI	epilepsia generalizada idiopática
EMA	epilepsia ausência do adulto
EMJ	epilepsia mioclônica juvenil
GABA <sub>A</sub>	ácido gama-aminobutírico subtipo A

<i>GABRA1</i>	gene receptor de ácido gama-aminobutírico A, subunidade alfa 1
<i>GABRA5</i>	gene receptor de ácido gama-aminobutírico A, subunidade alfa 5
<i>GABRB3</i>	gene receptor de ácido gama-aminobutírico A, subunidade beta 3
<i>GABRG2</i>	gene receptor de ácido gama-aminobutírico A, subunidade gama 2
<i>GCLC</i>	gene glutamato-cisteína ligase, subunidade catalítica
<i>GRIK1</i>	gene receptor de glutamato, ionotrópico, cainato 1
<i>GRM4</i>	gene receptor de glutamato, metabotrópico 4
<i>HLA</i>	principal complexo de histocompatibilidade
IC	intervalo de confiança
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
<i>KCC3</i>	gene carreador solúvel da família 12 (transportadores de potássio/cloro), membro 6 ( <i>SLC12A6</i> )
<i>KCNJ3</i>	gene canal repositivo interno de potássio, subfamília J, membro 3
<i>KCNJ6</i>	gene canal repositivo interno de potássio, subfamília J, membro 6
<i>KCNK9</i>	gene canal de potássio, subfamília K, membro 9
<i>KCNQ2</i>	gene canal de potássio voltagem-dependente, subfamília KQT, membro 2
<i>KCNQ3</i>	gene canal de potássio voltagem-dependente, subfamília QT, membro 3
<i>KCNV1</i>	gene canal de potássio, subfamília V, membro 1
<i>KIAA0057</i>	gene que codifica proteína de membrana associada a translocação 2 ( <i>TRAM2</i> )
<i>mGluR7</i>	gene receptor de glutamato, metabotrópico 7 ( <i>GRM7</i> )
<i>OPRM1</i>	gene receptor de opióide, mu 1
OR	<i>odds ratio</i>

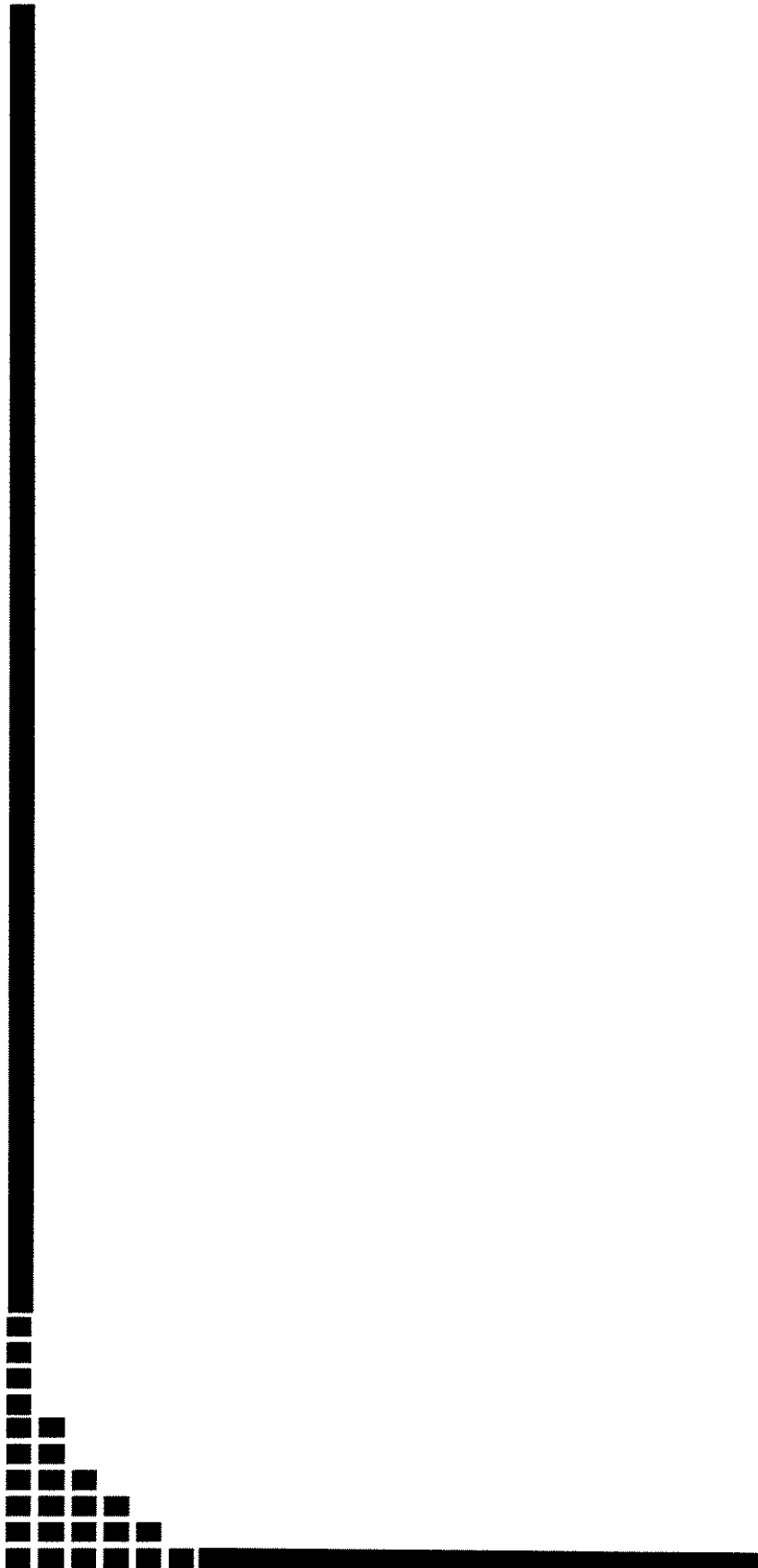
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
rf	<i>reference sequence</i>
<i>RING3</i> ou <i>BRD2</i>	gene contendo um bromodomínio
<i>SCN1A</i>	canal de sódio, voltagem-dependente, tipo I, alfa
<i>SCN1B</i>	canal de sódio, voltagem-dependente, tipo I, beta
<i>SCN2A</i>	gene canal de sódio, voltagem-dependente, tipo II, alfa 1
SDS	dodecilsulfato de sódio
<i>SLC4A3</i>	gene carreador solúvel da família 4, de troca iônica, membro3
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SSCP	<i>single-strand conformation polymorphism</i>
Ta	temperatura de anelamento
<i>T-STAR</i>	gene contendo domínio KH, ligante de RNA, associado a sinal de transdução 3 ( <i>KHDRBS3</i> )

		<b>PÁG.</b>
<b>Tabela 1-</b>	Principais <i>loci</i> descritos para EGI (excluindo regiões 5q e 6p).....	45
<b>Tabela 2-</b>	Principais estudos das regiões 5q e 6p em EGI.....	48
<b>Tabela 3-</b>	Caracterização das síndromes classificadas como outras EGI.....	63
<b>Tabela 4-</b>	Marcadores microssatélites genotipados e suas características.....	68
<b>Tabela 5-</b>	Exemplo de tabulação dos alelos para o estudo de associação.....	73
<b>Tabela 6-</b>	Exemplo de reagrupamento dos alelos após colapso de dados.....	73
<b>Tabela 7-</b>	Exemplo de tabela para o teste Qui-quadrado 2X2.....	74
<b>Tabela 8-</b>	<i>Primers</i> utilizados para a amplificação do gene <i>GABRA1</i> .....	76
<b>Tabela 9-</b>	Simulação dos valores de <i>lod score</i> para as seis famílias estudadas.....	81
<b>Tabela 10-</b>	Valores de <i>lod score</i> da análise de dois pontos para as seis famílias combinadas em 6p21.....	82
<b>Tabela 11-</b>	Teste de heterogeneidade das seis famílias genotipadas para os quatro marcadores da região 6p2.....	83
<b>Tabela 12-</b>	Valores de <i>lod score</i> da análise de dois pontos para as seis famílias combinadas em 6p12.....	84
<b>Tabela 13-</b>	Teste de heterogeneidade das seis famílias genotipadas para os quatro marcadores da região 6p12.....	85
<b>Tabela 14-</b>	Valores de <i>lod score</i> da análise de dois pontos para as seis famílias combinadas em 5q34.....	86
<b>Tabela 15-</b>	Testes de heterogeneidade das seis famílias genotipadas para os marcadores da região 5q34.....	87

<b>Tabela 16-</b>	Análises estatísticas para os marcadores do estudo de associação da região 6p21.....	91
<b>Tabela 17-</b>	Análises estatísticas para os marcadores do estudo de associação da região 6p12.....	93
<b>Tabela 18-</b>	Análises estatísticas para os marcadores do estudo de associação da região 5q34.....	95
<b>Tabela 19-</b>	Porcentagem de ocorrência dos três tipos de padrões de migração encontrados na análise de SSCP para os <i>primers</i> GAB91 e GAB93.....	96

		<b>PÁG.</b>
<b>Figura 1-</b>	Heredograma das seis famílias estudadas.....	65
<b>Figura 2-</b>	Esquema das regiões cromossômicas estudadas.....	69
<b>Figura 3-</b>	Gel de eletroforese do marcador D6S276.....	70
<b>Figura 4-</b>	Fórmula para o cálculo de <i>lod score</i> .....	71
<b>Figura 5-</b>	Fórmula para cálculo do <i>odds ratio</i> .....	75
<b>Figura 6-</b>	Fórmula para cálculo do intervalo de confiança.....	75
<b>Figura 7-</b>	Gráfico da análise de múltiplos pontos para os oito marcadores da região 6p21 e 6p12.....	88
<b>Figura 8-</b>	Gráfico da análise de múltiplos pontos para os quatro marcadores da região 5q34.....	89
<b>Figura 9-</b>	Exemplo dos três padrões de migração encontrados na análise de SSCP.....	96
<b>Figura 10-</b>	Seqüenciamento manual para os <i>primers</i> GAB91 e GAB93.....	97





***RESUMO***

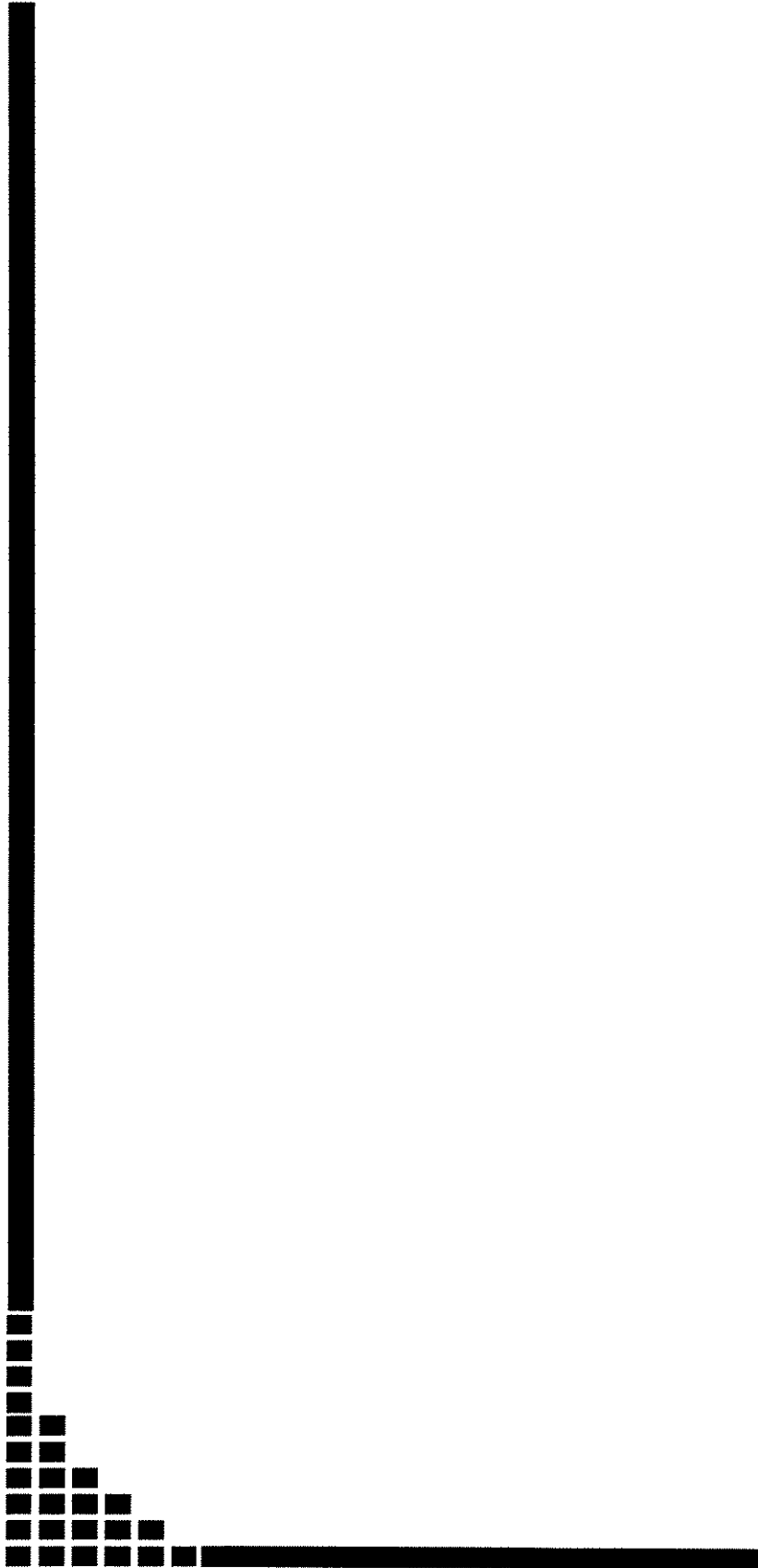
As epilepsias generalizadas idiopáticas (EGI) perfazem aproximadamente 50% de todas as epilepsias e possuem em sua etiologia fatores genéticos envolvidos. A epilepsia mioclônica juvenil (EMJ), uma das formas mais comuns de EGI, foi a primeira síndrome epiléptica a ter um *locus* mapeado, em 1988 e, desde então, vários estudos foram realizados mas a localização de um ou mais *loci* para a EMJ e outras formas de EGI permanece ainda uma questão aberta e muito atual.

O objetivo deste projeto foi mapear *loci* envolvidos na predisposição para a EMJ e outras formas de EGI por estudos de ligação e associação em pacientes brasileiros.

Os estudos de ligação foram realizados utilizando-se seis famílias não relacionadas, com pelo menos dois pacientes com EGI, sendo o probando com EMJ. Para os estudos de associação foram utilizados 44 pacientes com EMJ, não relacionados e, como grupo controle, 63 indivíduos sem história pessoal ou familiar de epilepsia. Para ambos os estudos foram genotipados oito marcadores microssatélites nas regiões cromossômicas 6p21 e 6p12 e quatro marcadores que flanqueassem o *locus* 5q34. Para o estudo de ligação foram realizadas as análises de dois pontos e de múltiplos pontos com o aplicativo LINKAGE. Para a análise de associação foram utilizados os testes Qui-quadrado e exato de Fisher, quando indicado, e o cálculo de *odds ratio* com intervalo de confiança de 95%. Também foi realizada uma pesquisa direta de mutação do exon 9 do gene *GABRA1*, localizado em 5q34, pela análise de SSCP em 71 pacientes e 82 controles e subsequente sequenciamento das variantes encontradas.

Os nossos resultados do estudo de ligação não evidenciaram a presença de um gene principal nas regiões 6p21, 6p12 ou 5q34. No entanto, a análise de associação demonstrou a possível presença de genes de suscetibilidade (menor efeito) ou genes modificadores, nos pacientes com EMJ estudados, nas três regiões. A análise de mutação do exon 9 do gene *GABRA1* não revelou qualquer variante potencialmente patológica.

Em conclusão, os nossos dados vêm contribuir para o melhor entendimento da EMJ e das EGI em geral, reforçando o conceito de doenças complexas, nas quais existe possivelmente uma herança poligênica e a presença de heterogeneidade genética.



***ABSTRACT***

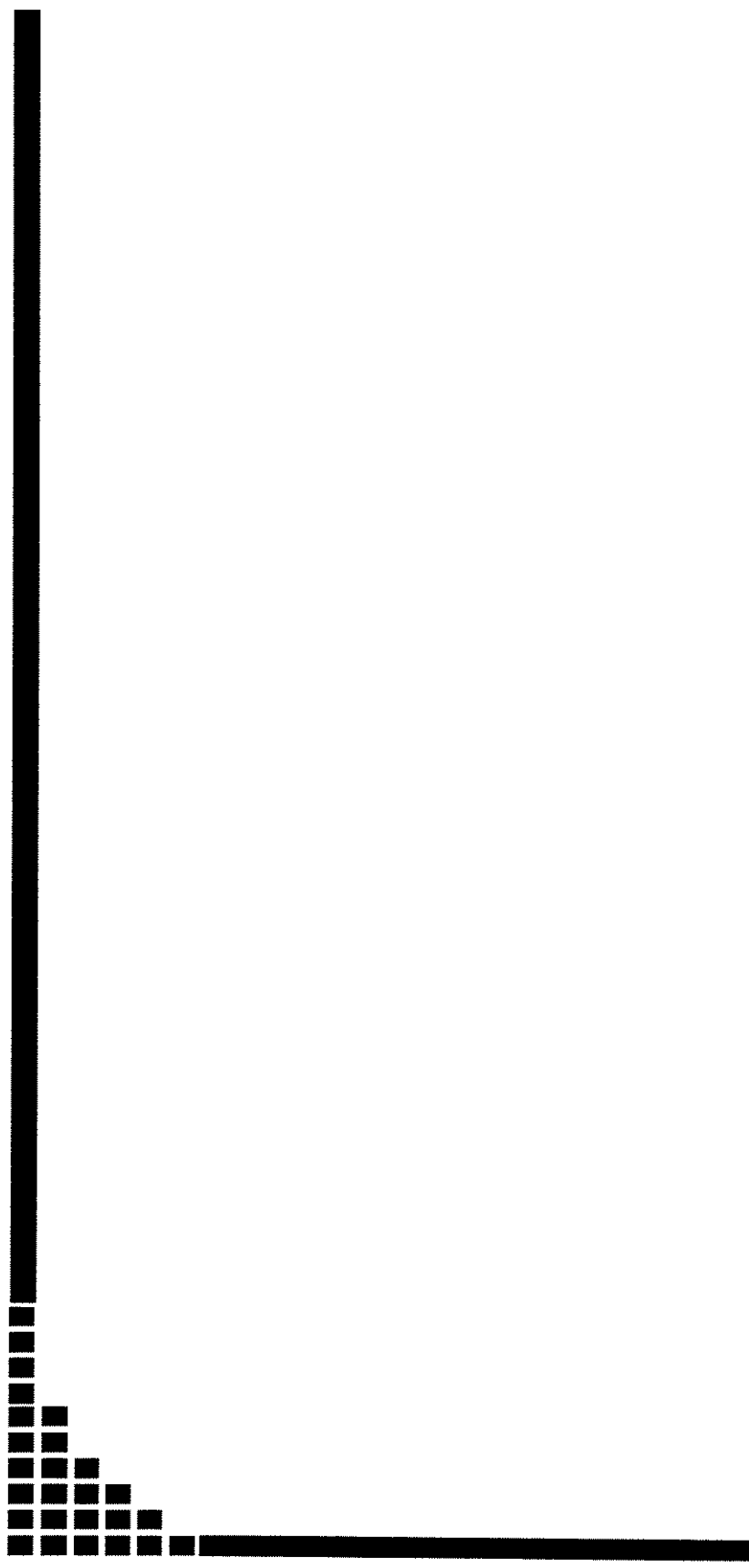
The idiopathic generalized epilepsies (IGE), for which a genetic cause is widely accepted, account for approximately 50% of all epilepsies. Juvenile myoclonic epilepsy (JME), one of the most common forms of IGE, was the first epileptic syndrome to be mapped to a chromosome (ch) region, in 1988, and since then, although several studies were carried out, the localization of one or more *loci* for the JME and other forms of IGE remains still an open and very current question.

The objective of this project was to map *loci* involved in the predisposition for JME and other forms of IGE, using linkage and association studies, in Brazilian patients.

Linkage studies were carried out using six non-related families, with at least two patients with IGE, with the proband having JME. For the association studies 44 non-related individuals were genotyped. In addition, 63 normal controls without epilepsy, were studied. For both studies we genotyped eight microsatellite markers in ch 6p21 and ch 6p12 and four markers in ch 5q34. For linkage studies we used the *LINKAGE* software to calculate two-point and multipoint lod scores. For the association analyses, we used qui-square and Fisher's exact tests, when it was indicated, and odds ratio with 95% confidence interval. We also performed a mutation screening on exon 9 of the *GABRA1* gene, on ch 5q34, for 71 patients and 82 controls using SSCP analysis and, subsequently, sequencing of the variants found.

Our linkage results showed no evidence of a major locus on cromossomal regions 6p21, 6p12 or 5q34. However, association studies found some evidence for susceptibility genes (minor effect) or modifier genes in all three regions. Mutation screening of exon 9 of the *GABRA1* gene did not identify any potential pathological variant.

In conclusion, our data contribute for the general view of JME and other forms of IGE as complex trait, in which polygenic inheritance and genetic heterogeneity are probably present.



## *1- INTRODUÇÃO*

## 1.1- ASPECTOS GERAIS

As epilepsias formam um grupo de síndromes neurológicas crônicas, decorrentes de alterações das funções cerebrais, associadas ou não a outras condições patológicas. Possuem grande variedade de manifestações clínicas, etiologias, graus variados de morbidade e prognóstico. No entanto, a característica comum a todas as síndromes epiléticas é a ocorrência de crises. A crise epilética é causada por descargas neuronais anormais que ocorrem de forma passageira, sincrônica e desorganizada (ZIELINSKI, 1988).

A prevalência das epilepsias é alta, atingindo aproximadamente 1 a 1,5% da população geral, fazendo da epilepsia uma das alterações neurológicas mais comuns (ZIELINSKI, 1988).

Vários estudos epidemiológicos já foram realizados no Brasil (MARINO et al., 1986; FERNANDES et al., 1992). Um estudo recente, realizado na população urbana da cidade de São José do Rio Preto (SP), encontrou uma prevalência de epilepsia de 18,6 em 1000 habitantes. Destes 8,2 por 1000 eram ativos, ou seja, tiveram pelo menos uma crise nos últimos dois anos (BORGES et al., *in press*). Além disso, esse trabalho demonstrou que a prevalência de epilepsia não está distribuída de forma uniforme entre os quatro diferentes grupos de idades estudados: 4,9 (0-4 anos), 11,7 (5-14 anos), 20,3 (15-64 anos) e 32,8 (65 anos ou acima); sendo estes dados cumulativos (BORGES et al., *in press*). Tal observação já havia sido descrita anteriormente em populações de outras origens étnicas e geográficas (HAUSER et al., 1990a; 1991; OLAFSSON et al., 1996), demonstrando que, apesar de algumas diferenças nas etiologias, as epilepsias se distribuem mundialmente com uma alta frequência.

A classificação das epilepsias e síndromes epiléticas, proposta pela ILAE (*International League Against Epilepsy*, 1989) dividia as epilepsias em generalizadas e parciais. Uma proposta para mudança na atual classificação das epilepsias já está em adiantado nível de discussão pela ILAE (ENGEL, 2001), porém por não estar ainda finalizada e validada pela comunidade científica internacional, o presente trabalho se baseou na classificação de 1989.

Nas epilepsias generalizadas a descarga epiléptica envolve todas as regiões do córtex cerebral, enquanto que nas epilepsias parciais um foco epileptogênico distinto pode ser identificado. Estima-se que aproximadamente 50% das epilepsias sejam generalizadas (DELGADO-ESCUETA et al., 1999).

As epilepsias generalizadas e as parciais são divididas em três categorias de acordo com a provável etiologia: idiopáticas, sintomáticas e criptogênicas (ILAE, 1989). É nas epilepsias idiopáticas que a predisposição genética se apresenta de maneira mais marcante (ILAE, 1989), perfazendo 39 – 59% de todas as epilepsias (HAUSER e HESDORFFER, 1990b).

## 1.2- ASPECTOS CLÍNICOS

As formas de epilepsia generalizada idiopática (EGI) mais comuns são: epilepsia mioclônica juvenil (EMJ), epilepsia ausência infantil (EAI) e crises tônico-clônicas generalizadas (CTCG) ao despertar, perfazendo respectivamente 10 - 30%, 5 – 15% e 22 – 37%, entre todas epilepsias (DELGADO-ESCUETA et al., 1999).

A EMJ tem o início das manifestações clínicas entre os 9 e 27 anos de idade, sendo os abalos mioclônicos, geralmente durante o despertar, o tipo de crise característico e necessário para seu diagnóstico (YACUBIAN, 2000). Além disso, os pacientes podem apresentar crises tônico-clônicas generalizadas e crises de ausência (LEPPIK, 2003). O padrão eletrencefalográfico registrado durante as mioclônias é representado por descargas de complexos de multispícula-onda, generalizados, bilaterais e simétricos (JANZ, 1957).

A EAI tem o início das manifestações clínicas entre os 3 e 12 anos de idade, sendo características as crises de ausência de curta duração (2 a 3 s) e início súbito (SAKAMOTO, 2000). As crises de ausência podem ser acompanhadas por breves componentes clônicos, mioclônicos ou tônicos e cerca de 40% dos casos têm associação com CTCG (LOISEAU et al., 1983). O eletrencefalograma (EEG) interictal revela

descargas generalizadas do tipo ponta-onda 3 Hz, geralmente predominantes nas regiões frontais (LENNOX, 1951).

A síndrome de CTCG ao despertar tem o início das manifestações clínicas entre os 6 e 25 anos de idade, podendo ocorrer outros tipos de crises além da CTCG: crises de ausência ou mioclônicas (SILVA e GUERREIRO, 2000). Os achados mais comuns nessa síndrome são anormalidades inespecíficas. Os complexos ponta-onda e poliponta-onda podem variar entre 2,5–4 Hz (SAKAMOTO, 2000).

### 1.3- ASPECTOS GENÉTICOS

Nos anos 1950, os estudos pioneiros de LENNOX (1951,1960) e METRAKOS (1961) identificaram o componente de predisposição genética nas EGI. Nesses trabalhos iniciais se observou que o risco de desenvolver epilepsia era 1,5 a 5 vezes maior nos indivíduos com antecedente familiar da doença do que na população geral e que o risco para familiares de pacientes com EGI era aproximadamente duas vezes maior do que o risco para indivíduos com história de epilepsia parcial (METRAKOS, 1961; NEWMARK, 1984; ANDERMANN, 1985). KJELDEN et al. (2001), em estudo com 11.900 gêmeos dinamarqueses, encontraram uma taxa de concordância de 37% em gêmeos monozigóticos contra 8% em dizigóticos, confirmando o impacto substancial de fatores genéticos na etiologia das epilepsias.

A primeira mutação descrita relacionada com uma epilepsia idiopática, do tipo parcial, foi em uma subunidade de um receptor acetilcolínico (*CHRNA4*), em uma família com epilepsia do lobo frontal noturna autossômica dominante, em 1995 (STEILEIN et al., 1995). Nas epilepsias generalizadas, os primeiros genes com mutação descrita foram *KCNQ2* (SINGH et al, 1998) e *KCNQ3* (CHARLIER et al., 1998), que codificam subunidades do canal iônico de potássio, voltagem-dependente, em famílias com convulsão neonatal familiar benigna. Assim como nesses estudos, outras epilepsias Mendelianas raras tiveram algumas mutações descritas, como por exemplo na epilepsia generalizada idiopática com crises febris “*plus*” cujos genes identificados foram: *SCN1B* (WALLACE



et al., 1998), *SCN1A* (ESCAYG, et al., 2000) e *SCN2A* (SUGAWARA et al., 2001), todos codificando subunidades do canal iônico de sódio.

A maioria dos genes descritos relacionados às diferentes síndromes epiléticas, até o momento, codifica componentes moleculares da sinalização neuronal: canais iônicos controlados por voltagem ou por transmissores (MEISLER et al., 2001; SCHEFFER e BERKOVIC, 2003). A exceção aos canais iônicos foi a identificação de mutações no gene *LGII* em famílias com epilepsia do lobo temporal com sintomas auditivos (KALACHIKOV et al., 2002; KOBAYASHI et al., 2003). Esse gene foi descrito como um possível supressor tumoral, mas não se sabe sua função exata.

Apesar de muitos estudos e diversas descobertas a respeito dos aspectos genéticos das epilepsias, pouco se conhece dos genes envolvidos em epilepsias idiopáticas comuns, como as clássicas EGI (SCHEFFER e BERKOVIC, 2003).

Vários *loci* para diferentes formas comuns de EGI já foram localizados, mas pequeno é número de genes já identificados (Tabelas 1 e 2). A identificação desses genes tem sido dificultada pelo fato das epilepsias, particularmente, as idiopáticas, serem doenças complexas (LEPPER et al., 1993). As doenças complexas são definidas como condições nas quais a correspondência entre o genótipo e fenótipo não é completa (LANDER e SCHORK, 1994).

Os maiores problemas associados com estudos genéticos de doenças complexas são: penetrância incompleta (presença do alelo que predispõem à doença, mas sem manifestação clínica), fenocópias (manifestação da doença como resultado de fatores ambientais, sem a presença de alelos que predispõem à doença), heterogeneidade genética (mutações em genes diferentes resultando em um mesmo fenótipo), herança poligênica (para a manifestação da doença necessita-se da presença de mutações em múltiplos genes) ou multifatorial (fatores genéticos e ambientais influenciando a manifestação clínica da doença) e alta prevalência na população geral (LANDER e SCHORK, 1994; SERRATOSA, 1999).

**Tabela 1-** Principais *loci* descritos para EGI (excluindo regiões 5q e 6p, que serão detalhadas mais à frente).

<i>Locus</i> estudado	Síndrome epiléptica	Tipo de estudo	Resultado	Gene estudado	Referência bibliográfica
2q11.1	EMA	lig	+		DE FALCO et al., 02
2q23-24.3	EMJ	mut	-	<i>KCNJ3</i>	HALLMANN et al., 00
	EGI	mut	-	<i>SCN2A</i>	HAUG et al., 01
	EGI	ass	+	<i>KCNJ3</i>	CHIOZA et al., 02
2q36	EGI	lig	+		SANDER et al., 00a
	EGI	ass	+	<i>SLC4A3</i>	SANDER et al., 02a
3p14-12	EGI	lig	+		ZARA et al., 98
3q26	EGI	lig	+		SANDER et al., 00a
	EGI	ass	-	<i>mGluR7</i>	GOODWIN et al., 00
	EGI	mut	+	<i>CLCN2</i>	HAUG et al., 03
6q24	EAI e EAJ	ass	+	<i>OPRM1</i>	SANDER et al., 00b
	EGI	ass	+	<i>OPRM1</i>	WILKIE et al., 02
8p11-12	EGI s/ EMJ	lig	+		DURNER et al., 99
	EGI	lig	-		SANDER et al., 03
8q24	EAI	lig	+		FONG et al., 98
	EGI	lig	-		SANDER et al., 98
	EMA	lig	+		MIKAMI et al., 99
	EAI	lig	+		SUGIMOTO et al., 00
	EGI	mut	-	<i>ARC</i>	HAUG et al., 00
	EAI	mut	-	<i>T-STAR</i>	SUGIMOTO et al., 01
	EMA	mut	-	<i>KCNV1</i>	SANO et al., 02
	EMA	lig	-		DE FALCO et al., 02
	EAI	mut	-	<i>KCNK9</i>	KANANURA et al., 02
14q23	EGI	lig	+		SANDER et al., 00a
15q11-14	EMJ	lig	+		ELMSLIE et al., 97
	EGI	lig	-		SANDER et al., 97a
	EMJ	ass	-	<i>GABRA5, GABRB3</i>	GUIPPONI et al., 97
	EGI	mut	-	<i>KCC3</i>	STEINLEIN et al., 01
	EMJ	mut	-	<i>CHRNA7</i>	TASKE et al., 02
15q	EGI	lig	-		SANDER et al., 99
	EMJ	lig	-		DURNER et al., 00
16p13	EMIF	lig	+		ZARA et al., 00
18q21.1	EGI	lig	+		DURNER et al., 01
	EGI	lig	-		SANDER et al., 02b
21q22	EMJ	lig	-		REES et al., 94
	EAJ	ass	+	<i>GRIK1</i>	SANDER et al., 97b
	EMJ	mut	-	<i>KCNJ6</i>	HALLMANN et al., 00
	EAJ	mut	-	<i>GRIK1</i>	IZZI et al., 02

EMA: epilepsia mioclônica do adulto; EAJ: epilepsia ausência juvenil; lig: ligação; ass: associação; mut: mutação.

Os recentes avanços em biologia molecular e genética molecular tem sido de grande importância para a identificação dos genes envolvidos nas doenças complexas. Desta forma, o mapeamento e a identificação de alguns genes responsáveis por diferentes formas de epilepsia têm ocorrido nos últimos anos através da utilização de duas estratégias básicas para a localização e identificação de genes implicados em doenças humanas: o estudo de genes candidatos e a clonagem posicional (LOPES-CENDES, 2000).

A clonagem posicional, ao contrário dos estudos de genes candidatos, não requer o conhecimento *a priori* das alterações metabólicas e/ou dos processos fisiopatológicos de base envolvidos na doença em questão. Isso a torna uma estratégia interessante para o estudo das epilepsias, cujos mecanismos são muito complexos e provavelmente envolvem interações em vários níveis moleculares (ROWLAND, 1992). Os estudos de ligação e associação são estratégias utilizadas para a clonagem posicional.

A análise de ligação se baseia na tendência de que alelos próximos no mesmo cromossomo segreguem juntos durante a meiose (THOMPSON et al., 1993). Quanto menor a distância entre estes dois alelos, menor a frequência de recombinação entre eles. A ligação é detectada quando estes alelos são transmitidos de uma geração a outra de uma mesma família sem que ocorra uma grande frequência de recombinação meiótica entre eles (menor que 50%). Portanto, se dois genes estão ligados, significa que estão próximos entre si e, conhecendo a posição cromossômica de um desses genes, a posição cromossômica do segundo gene pode ser inferida (LOPES-CENDES, 1998).

Diferente do estudo de ligação que é realizado com famílias, o estudo de associação é do tipo caso-controle, no qual a frequência dos alelos nos indivíduos afetados é comparada com a frequência nos controles (LANDER e SCHORK, 1994). Neste caso assumimos uma certa relação causal entre os alelos pesquisados e a doença.

O estudo de ligação, pelo cálculo do *lod score*, é dito paramétrico porque exige um modelo genético preciso, que especifique o modo de herança, as frequências gênicas e a penetrância dos genótipos (STRACHAN e READ, 2002). Essas especificações não seriam problema para caracteres Mendelianos, mas como as formas de epilepsia mais comuns, principalmente as EGI, são consideradas doenças complexas e podem não seguir um padrão

Mendeliano clássico de herança (SERRATOSA, 1999; ANDERSON et al., 2002), tal estratégia (estudo de ligação) pode não ser sensível o suficiente para identificar *loci* de predisposição, nesses casos mais complexos.

Já o estudo de associação tem a vantagem de ser um método que não exige o conhecimento de um modelo de herança preciso. Desse modo, apesar de menos robusto para identificar resultados estatisticamente significativos, teria a vantagem de ser mais flexível, permitindo que, apesar da existência de fatores de variabilidade (herança poligênica, heterogeneidade genética), *loci* de predisposição (ou menores) possam ser identificados.

Fica claro portanto, que esses dois estudos se complementam pois a análise de ligação procura por *loci* que são possivelmente os principais contribuidores para a expressão da doença (*loci* “necessários”), já a existência de uma associação indica a presença de um *locus* de “suscetibilidade” que aumenta a probabilidade de se ter a doença, mas não é necessário para a expressão desta (GREENBERG et al., 1996a).

O primeiro *locus* mapeado em uma síndrome epiléptica foi na EMJ na região 6p21 por estudos de ligação em 1988 (GREENBERG et al., 1988) e, desde então, essa síndrome tem sido uma das formas de epilepsia mais amplamente estudadas do ponto de vista molecular.

Dos *loci* já identificados para a EMJ, os mais explorados são os que envolvem o braço curto do cromossomo 6 (Tabela 2) entretanto, apesar de mais de uma década de estudos, até muito recentemente nenhum gene havia sido identificado nesta região como o responsável pela EMJ ou outras EGI.

Tabela 2- Principais estudos das regiões 5q e 6p em EGI.

<i>Locus</i> estudado	Síndrome epiléptica	Tipo de estudo	Resultado	Gene estudado	Referencia bibliográfica
5q32-34	EGI	lig	-		SANDER et al., 96
	EMJ	mut	+	<i>GABRA1</i>	COSSETTE et al., 02
	EAI c/ CF	mut	+	<i>GABRG2</i>	MARINI et al., 03
5q	EMJ	mut	-	<i>GABRA1</i>	KAPOOR et al., 03
	EGI	lig	-		WINDEMUTH et al., 02
6p21	EMJ	lig	+		GREENBERG et al., 88
	EMJ	lig	+		DURNER et al., 91
	EMJ	lig	+		WEISSBECKER et al., 91
	EMJ	ass	+	<i>HLA</i>	OBEID et al., 94
	EMJ	lig	-		LIU et al., 95
	EMJ	ass	+	<i>HLA</i>	GREENBERG et al., 96b
	EMJ	lig	-		SERRATOSA et al., 96
	EMJ	lig	-		LIU et al., 96
	EMJ	lig/ass	+/-	<i>HLA</i>	SANDER et al., 97c
	EMJ	ass	-	<i>HLA</i>	LE HELLARD et al., 99
	EMJ	lig/ass	+/+	<i>DQB1 e RING3</i>	GREENBERG et al., 00
	EMJ	lig	-		BAI et al., 02
	EMJ	ass	+	<i>BRD2</i>	PAL et al., 03
	EMJ	ass	-	<i>GRM4</i>	IZZI et al., 03
	6p12	EMJ	lig	+	
EMJ		lig	+		LIU et al., 96
EMJ		lig	+		SERRATOSA et al., 96
EMJ		lig	+		BAI et al., 02
EMJ		mut	-	<i>CLIC5, KIAA0057,</i> <i>GCLC</i>	SUZUKI et al., 02
6p	EMJ	lig	-		WHITEHOUSE et al., 93
	EMJ	lig	-		ELMSLIE et al., 96

EAI c/ CF: epilepsia ausência infantil com crise febril; lig: ligação; ass: associação; mut: mutação.

Em 2003, PAL et al. apresentaram evidências de que o gene *BRD2*, localizado no cromossomo 6p21, poderia estar relacionado com a EMJ. Esse gene pertence a uma família de genes que são expressos durante o desenvolvimento e é um possível regulador da transcrição nuclear. Foram identificados dois SNP (*single nucleotide polymorphism*) associados nesse gene, no entanto ainda não se conhece a relevância desses polimorfismos.

Também em 2003, um grupo de pesquisadores encontrou uma relação entre mutações no gene *EFHC1*, gene envolvido no transporte de cálcio, localizado na região 6p12.3, e o fenótipo da EMJ em algumas famílias estudadas (SUZUKI et al., 2003; DELGADO-ESCUETA et al., 2003). Infelizmente, esses dados foram apresentados

DELGADO-ESCUETA et al., 2003). Infelizmente, esses dados foram apresentados somente na forma de resumos em congressos científicos, ainda não estando a publicação completa disponível.

Apesar de nenhum gene ter sido identificado como o responsável pela EMJ na região 6p, COSSETTE et al. (2002) identificaram uma mutação (Ala322Asp) no exon 9 do gene *GABRA1* nos indivíduos afetados de uma família franco-canadense segregando uma forma autossômica dominante de EMJ. Este gene está localizado na região 5q34 e codifica a subunidade  $\alpha 1$  do receptor do GABA<sub>A</sub> (ácido  $\gamma$ -aminobutírico subtipo A), principal transmissor inibitório do sistema nervoso central.

Nesse estudo também realizaram estudos fisiológicos *in vitro*: investigando a possível repercussão funcional dessa mutação. Esses autores demonstraram que os receptores GABA<sub>A</sub> que continham a subunidade mutada apresentava uma diminuição da amplitude de correntes ativadas por GABA, indicando que as crises poderiam estar sendo causadas por perda de função desse receptor.

Ainda hoje, apesar de muitos esforços realizados pela comunidade científica em várias partes do mundo, a localização de um ou mais *loci* para a EMJ e outras formas de EGI permanece uma questão aberta e muito atual.



## ***2- OBJETIVO***

O objetivo principal deste projeto foi mapear *loci* envolvidos na predisposição para a EMJ e outras formas de EGI por estudos de ligação e associação na nossa amostra de pacientes.

Os objetivos específicos foram:

- testar por estudos de ligação e associação os *loci* candidatos:
  - 6p21
  - 6p12
  - 5q34
- fazer pesquisa de mutação do exon 9 do gene *GABRA1* (5q34).



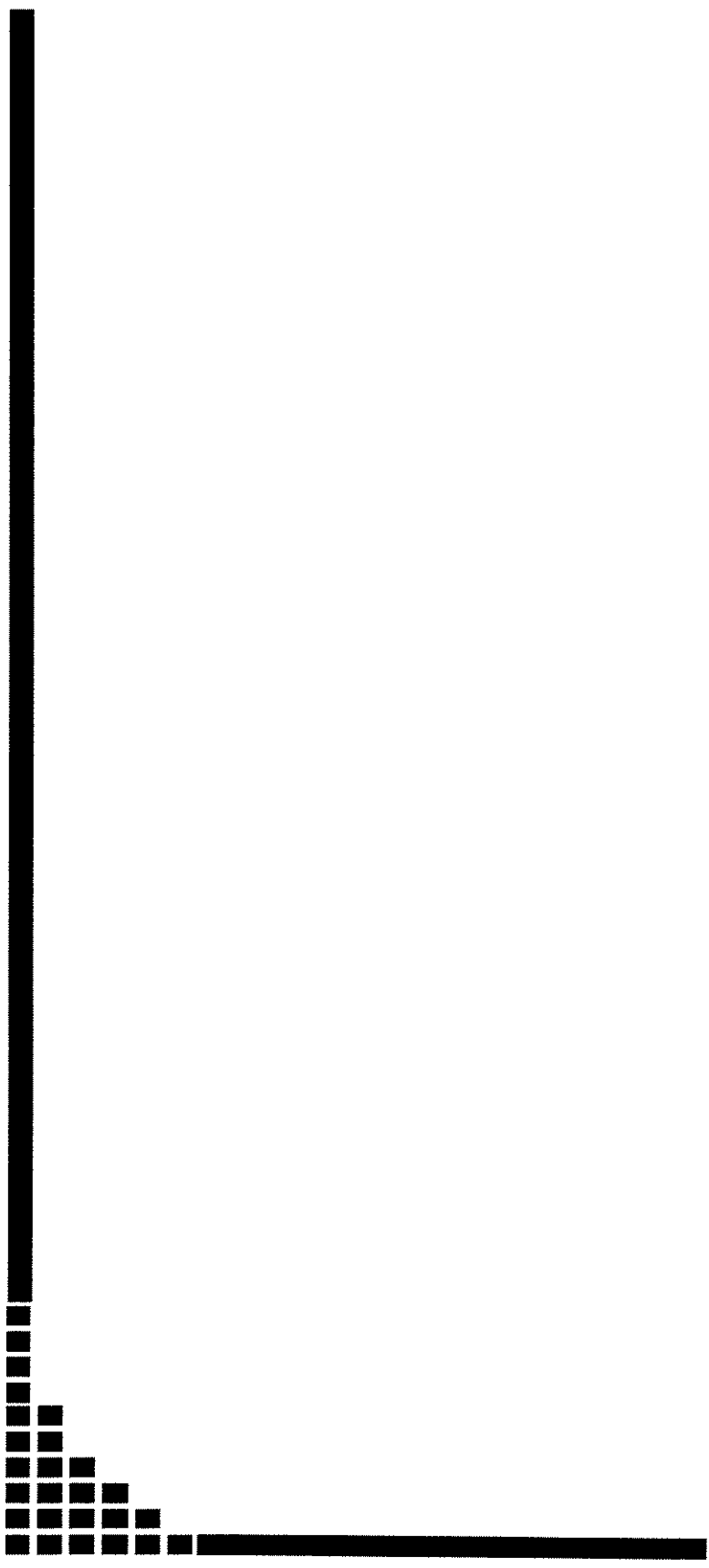


***3- JUSTIFICATIVA***

Até o momento, existe somente tratamento sintomático para a disfunção cerebral que causa epilepsia. As crises podem ser controladas em vários pacientes com o uso de drogas antiepilépticas. O mecanismo exato pelo qual neurônios iniciam espontaneamente descargas sincronizadas resultando numa crise generalizada ou parcial não é completamente conhecido. A maior parte das drogas antiepilépticas causa uma depressão generalizada da atividade elétrica cerebral o que resulta em efeitos colaterais significativos, tais como alterações cognitivas importantes, principalmente em crianças em idade escolar.

A identificação do(s) defeito(s) genéticos nas epilepsias idiopáticas afetará diretamente o tratamento e diagnóstico dessas síndromes através de um melhor conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos básicos responsáveis pela atividade epiléptica. Assim, uma terapêutica mais específica e eficiente poderá ser desenvolvida, melhorando muito a qualidade de vida de um grande número de indivíduos afetados pela doença.

É também importante citar que organizações científicas internacionais ligadas a Epilepsia, como a ILAE, estão desenvolvendo projetos no sentido de coordenar os esforços internacionais para a) a identificação de famílias que segregam epilepsia, b) definição do fenótipo nessas famílias, e c) identificação de genes que predisõem as diferentes formas de epilepsia. Com este projeto de pesquisa, nós estamos participando ativamente desses esforços científicos internacionais e contribuindo de maneira significativa para a geração de conhecimento científico inédito em nosso país.



***4- PACIENTES,  
MATERIAIS E  
METODOLOGIA***

#### **4.1- ASPECTOS ÉTICOS**

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM-UNICAMP (protocolo 006/98) (Anexo 1). Os indivíduos selecionados participaram do projeto somente após a assinatura de um formulário de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2). Para assegurar que toda a manipulação de informação clínica e molecular fosse confidencial, questionários clínicos e amostras de sangue e DNA foram identificados por um código comum designado no momento em que o indivíduo entrou no estudo. Informações geradas durante o nosso projeto e que possam ter implicações na confirmação diagnóstica de indivíduos sintomáticos, serão comunicadas aos profissionais responsáveis pelo acompanhamento dos pacientes nos ambulatórios de epilepsia. Dados para serem usados em diagnóstico preditivo não foram gerados por este projeto.

#### **4.2- PACIENTES**

A participação no estudo foi proposta a todos os casos familiares (pelo menos dois indivíduos afetados na família) e esporádicos (apenas um indivíduo afetado na família) de EGI identificados nos ambulatórios de Epilepsia, Epilepsia Infantil e Neurogenética do HC-UNICAMP sob a responsabilidade dos Drs: Fernando Cendes, Marilisa Guerreiro e Iscia Lopes Cendes, respectivamente.

O objetivo e os procedimentos envolvidos no projeto foram explicados aos pacientes e a seus familiares, quando presentes. O formulário de consentimento livre e esclarecido foi apresentado aos indivíduos e quando obtida a concordância em participar do projeto, este formulário era assinado pelo participante ou pelo seu responsável.

Um formulário de encaminhamento de amostras de sangue (Anexo 3) foi preenchido, onde o heredograma detalhado de cada uma das famílias, inclusive dos casos esporádicos, foi elaborado para a identificação de todos os possíveis afetados.

Um questionário semi-estruturado foi utilizado para obter informações detalhadas sobre a história clínica e exames neurológicos do paciente e de todos os participantes (Anexo 3). Esse protocolo de avaliação clínica tinha como objetivo a uniformidade na obtenção dos dados clínicos e uma avaliação detalhada do fenótipo em cada família, assegurando um diagnóstico mais acurado possível da síndrome epiléptica. Esse diagnóstico foi realizado de acordo com as recomendações da ILAE (1989).

Sessões de revisão e discussão dos dados clínicos obtidos para todos os pacientes avaliados foram realizadas pelo grupo de neurologistas e geneticista: Drs. Fernando Cendes, Luiz Betting e Iscia Lopes Cendes, a fim de obter uma melhor definição do fenótipo em cada caso.

Foram coletadas amostras de sangue periférico para extração de DNA genômico dos probandos (o paciente com EGI primeiramente identificado no serviço de Neurologia do HC-UNICAMP) e de seus pais e familiares, afetados ou não, quando disponíveis.

Para todos os tipos de estudos (ligação, associação e análise de mutação) foi necessário um grupo controle composto por indivíduos sem história pessoal ou familiar de epilepsia. Para isso foram recrutados indivíduos casados dentro das famílias (mas não aparentados) e pacientes do próprio HC sem histórico pessoal ou familiar de epilepsia, possibilitando assim um grupo mais representativo da origem geográfica dos pacientes.

Foi coletado sangue de um total de 250 indivíduos, incluindo probandos, familiares afetados e não afetados. O número de indivíduos probandos (caso índice) que tiveram amostra de sangue coletada para esse estudo foi 79: 54 pacientes com EMJ, desses 41 eram casos familiares; e 25 pacientes com outros tipos de EGI (Tabela 3), todos com antecedentes familiares. Para o grupo controle foram selecionados 104 indivíduos casados dentro das famílias estudadas (mas não aparentados) e pacientes do próprio HC, todos sem histórico pessoal ou familiar de epilepsia.

**Tabela 3-** Caracterização das síndromes classificadas como outras EGI.

Síndrome epiléptica	Nº de probandos
CTCG ao despertar	8
EAI	2
EAJ	7
EAI → EAJ	4
EGI	3
EGI ?	1

EAJ: epilepsia ausência juvenil; EAI → EAJ: epilepsia ausência infantil que evolui para epilepsia ausência juvenil.

Dos probandos que apresentavam outros tipos de EGI, foram identificados três indivíduos cujas características clínicas, apesar de apontarem definitivamente para uma EGI, não se enquadravam em nenhuma das subsíndromes existentes, necessitando talvez de um maior tempo de seguimento clínico para sua caracterização. Portanto, para esses pacientes mantivemos o diagnóstico de EGI, apenas. Além disso, um paciente foi excluído do estudo pois, apesar de ter sido diagnosticado inicialmente como portador de EGI, durante o acompanhamento em nosso ambulatório o paciente apresentou crises tipicamente parciais complexas. Esse fato ilustra bem a importância da avaliação clínica continuada dos pacientes envolvidos em estudos de mapeamento gênico.

#### **4.2.1- Famílias efetivamente utilizadas para os estudos de ligação**

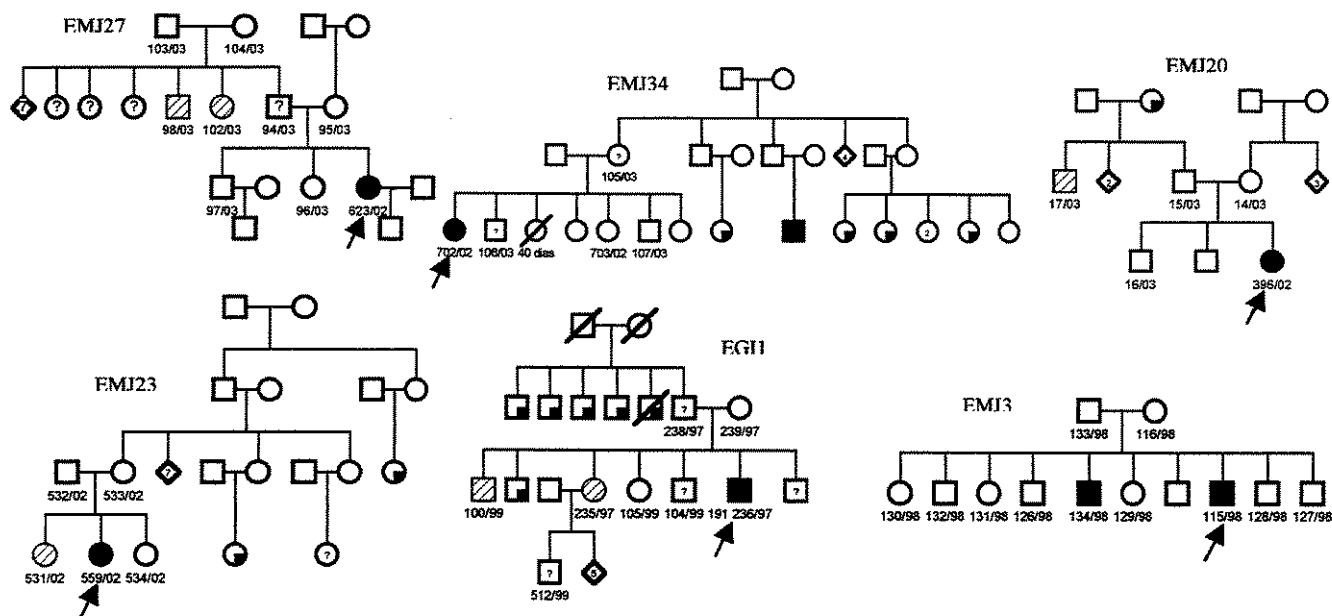
Apesar de possuímos 41 probandos com EMJ e 25 com outros tipos de EGI colhidos, todos com antecedentes familiares, não foi possível a utilização de todas elas para o estudo de ligação. Isso ocorreu, principalmente, devido a dois motivos: a não disponibilidade dos pais para coleta (falecidos, ou não vieram para coleta) e falhas na estrutura da família (todos os filhos afetados ou ambos os pais afetados).

Para o estudo de ligação a participação daqueles que não são afetados é imprescindível, assim como a participação dos pais e irmãos. São necessárias informações e amostra de sangue do maior número possível de indivíduos da família: tios, primos, avós; quanto maior o número de gerações participantes (no mínimo duas), maior poder a família tem para detectar ligação, quando ela existir, uma vez que toda a análise se baseia no padrão de segregação dos alelos do marcador em relação ao fenótipo da doença.

Desta forma, algumas famílias foram excluídas *a priori* do estudo por terem um potencial de informação nulo, para os estudos de ligação.

Além disso, convém esclarecer que dentre as famílias utilizadas para a análise de ligação, existiram alguns familiares que apresentaram apenas crise febril ou uma única CTCG, sendo assim considerados possivelmente afetados (ou seja, uma probabilidade de apenas 50% de possuírem o gene para epilepsia) .

Portanto, foram utilizadas efetivamente apenas seis famílias para as análises de ligação. O número de indivíduos estudados, incluindo pacientes e parentes não afetados, foi 43 (Figura 1). Todas essas famílias possuíam, no mínimo, dois indivíduos com EGI, sendo pelo menos um deles portador de EMJ (indivíduo probando). Aqui cabe um comentário a respeito da inclusão de pacientes com outras formas de EGI, ou ainda sem a confirmação do diagnóstico de EMJ, como “afetados” em nossas famílias. O estudo de famílias exclusivamente com indivíduos com EMJ ou de famílias *multiplex* (vários tipos de EGI), tem sido bastante controverso na literatura (WHITEHOUSE et al., 1993; GREENBERG et al., 1996; LIU et al., 1996). Na nossa casuística identificamos apenas uma família (EMJ3) na qual todos os indivíduos com epilepsia puderam ser inequivocamente identificados como portadores de EMJ. Nossa decisão de adotar um critério de inclusão mais aberto, ou seja, consideramos essencial apenas que o probando possuísse EMJ, se baseou na disponibilidade dessas famílias e na constatação da literatura de que famílias segregando apenas EMJ são extremamente raras (SERRATOSA et al., 1996; COSSETTE et al., 2002). Além disso, nos parece intuitivo aceitar que os demais casos de EGI presentes em uma família cujo probando apresenta EMJ resultam, provavelmente, de uma mesma predisposição genética. Sendo assim, consideramos que as famílias por nós estudadas representam as formas mais comuns de EMJ familiar.



**Figura 1-** Heredograma das seis famílias estudadas. Os símbolos ■ e ● representam pacientes com EMJ. Os símbolos ▨ e ⊗ representam indivíduos que tiveram apenas CTGG, classificados como afetados mas sem o diagnóstico definido de EMJ. Indivíduos que tiveram qualquer história de convulsão, mas não foram avaliados clinicamente e, portanto, não foram incluídos na pesquisa, estão indicados por □ e ○. O símbolo ? representa crises febris ou uma única CTGG. Os probandos estão indicados por ➔.

#### 4.2.2- Pacientes utilizados para o estudo de associação

Para o estudo de associação, além dos casos familiares, também utilizamos os casos esporádicos. Nos casos familiares foi utilizado apenas o paciente probando de cada família, garantindo que os indivíduos estudados não fossem relacionados.

No total, foram genotipados 44 pacientes com EMJ, dos quais 10 eram esporádicos e 63 indivíduos controles.



Nos estudos de associação, a maior possibilidade de se ter resultados falso-positivos se dá na escolha errada do grupo controle (LANDER e SCHORK, 1994; ANDERSON et al., 2002). Se o grupo controle e os pacientes não forem da mesma etnia, existe a possibilidade de se detectar diferenças significativas nas frequências alélicas relacionadas às diferenças étnicas. Para exemplificar essa situação: um pesquisador está estudando a habilidade de se comer com *chopsticks* na população de São Paulo utilizando um estudo de associação com o complexo HLA. O alelo *HLA-A1* terá uma associação positiva com a habilidade de se usar os *chopsticks* - não porque fatores imunológicos determinem qualquer habilidade manual, mas simplesmente porque o alelo *HLA-A1* é mais freqüente entre os asiáticos do que entre os caucasóides (LANDER e SCHORK, 1994).

Por esse motivo, para a população controle tivemos o cuidado de recrutar indivíduos da mesma origem geográfica dos pacientes, utilizando indivíduos casados dentro das famílias (mas não aparentados) e pacientes do próprio HC sem histórico pessoal ou familiar de epilepsia, o que, ainda assim, não garante uma homogeneidade étnica, visto a miscigenação da nossa população.

#### **4.2.3- Pacientes utilizados para o estudo de mutação**

Para a análise direta de mutação foram estudados 71 pacientes com EGI, dos quais 43 tinham o diagnóstico de EMJ, 9 de EAJ, 2 de EAI, 13 de CTCG e 4 indivíduos tinham epilepsia generalizada não classificada.

Todos os pacientes tinham história familiar para epilepsia, com exceção de nove indivíduos com EMJ.

Também foram utilizados 82 controles sem história pessoal ou familiar para epilepsia.

### 4.3- EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

As amostras de DNA genômico foram extraídas a partir de sangue periférico segundo protocolo de extração com fenol-clorofórmio descrito abaixo.

Vinte ml de sangue venoso foram colhidos de cada indivíduo recrutado para o estudo. As amostras foram centrifugadas à 1900rpm por 10min e a parte intermediária, onde se localizam os leucócitos, foi transferida para um tubo de fundo cônico de polipropileno. Em seguida, foram adicionadas as soluções de RSB 1×<sup>1</sup> (até completar um volume de 11ml) e 60µl de Nonidet®. Tal solução, então, foi levada ao agitador por 10min e centrifugada à 2500rpm por 10min, sendo o sobrenadante descartado. Três ml de solução SDS a 10% e 60µl de proteinase K (100 mg/ml) foram adicionados e as amostras incubadas à 37°C por 24h. Após a incubação foi acrescentado 3ml de fenol, seguido de agitação dos tubos gentilmente por 10min, centrifugação à 2500rpm por 10min e descarte da parte orgânica da solução. Esse processo foi repetido com 1,5ml de fenol e 1,5ml de uma solução de álcool isoamílico e clorofórmio (1:24), seguido de 3ml de uma solução de álcool isoamílico e clorofórmio (1:24). O DNA genômico foi então precipitado com 6ml de etanol absoluto. Este protocolo de extração de DNA foi o escolhido porque além de obtermos DNA em alta concentração, o custo da extração é baixo. Esse método propicia a extração de aproximadamente 700µg de DNA genômico a partir de 20ml de sangue venoso, quantidade requerida para a genotipagem de um grande número de marcadores nos projetos de pesquisa genômica.

### 4.4- ESTUDO DE LIGAÇÃO E ASSOCIAÇÃO

Os estudos de ligação e de associação utilizam a mesma metodologia de genotipagem, como se segue, diferindo na estratégia para a análise dos dados como será referido na sessão correspondente.

---

<sup>1</sup> RSB 10X: 50mL Tris (pH 7,6; 0,1M); 25mL KCl (0,1M); 50mL MgCl (0,1M); H<sub>2</sub>O qsp 500mL  
RSB 1X: 50mL RSB 10X; H<sub>2</sub>O qsp 500mL

#### 4.4.1- Seleção dos marcadores de DNA

Os marcadores microssatélites utilizados para genotipagem dos estudos de ligação e associação foram selecionados através de mapas genéticos detalhados dos cromossomos 5 e 6, presentes no *site* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (MAP VIWER)<sup>2</sup>, levando em consideração a heterozigose dos marcadores, que deveria ser maior ou igual a 0,70. Desse modo, asseguramos que o máximo de informação poderia ser extraído de indivíduos heterozigotos para tais marcadores.

Foram escolhidos 12 marcadores do tipo microssatélites, constituídos de repetições de dinucleotídeos polimórficos na população geral, que flanqueassem os *loci* 5q34, 6p21 e 6p12 (Tabela 4 e Figura 2).

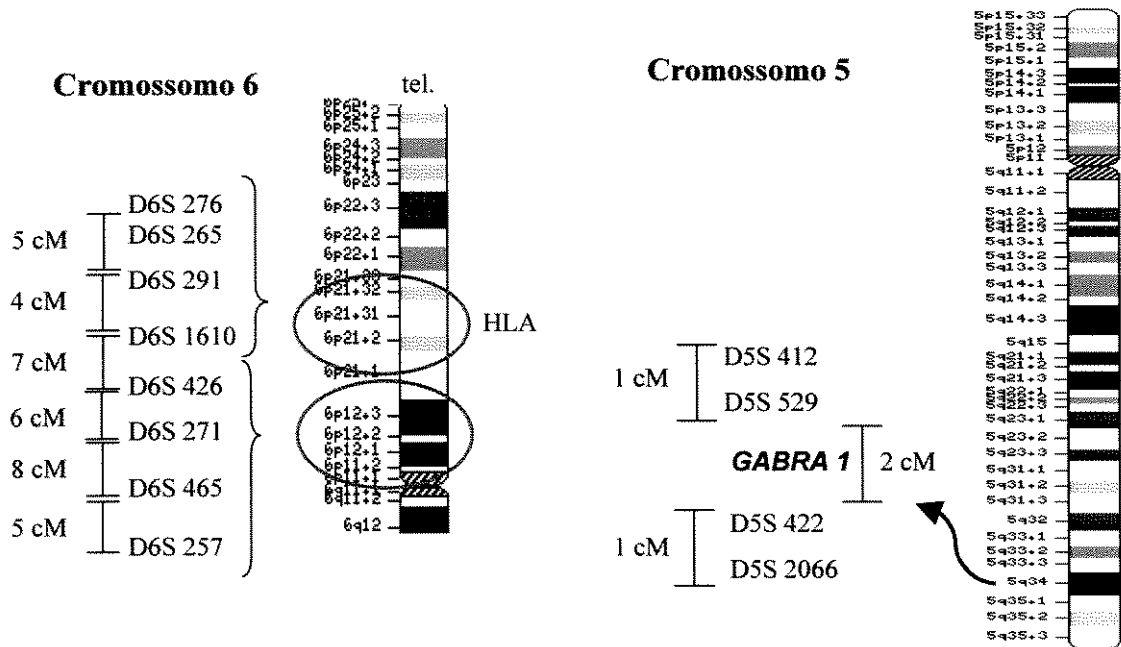
**Tabela 4-** Marcadores microssatélites genotipados e suas características

Marcadores	Região estudada	Posição (cM)*	Ta (°C)	Heterozigose
<i>D6S276</i>		44,41	57	0,83
<i>D6S265</i>	6p21	44,41	60	0,79
<i>D6S291</i>		49,50	58	0,70
<i>D6S1610</i>		53,81	59	0,84
<i>D6S426</i>		60,44	57	0,85
<i>D6S271</i>	6p12	66,37	58	0,86
<i>D6S465</i>		74,28	57	0,74
<i>D6S257</i>		79,92	57	0,87
<i>D5S412</i>		161,40	60	0,84
<i>D5S529</i>	5q34	162,47	58	0,72
<i>D5S422</i>		164,19	61	0,84
<i>D5S2066</i>		165,13	60	0,71

Ta= temperatura de anelamento para a reação da PCR (veja descrição abaixo).

\* segundo Marshfield em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi>

<sup>2</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi>



**Figura 2-** Esquema das regiões cromossômicas estudadas indicando a posição dos marcadores.

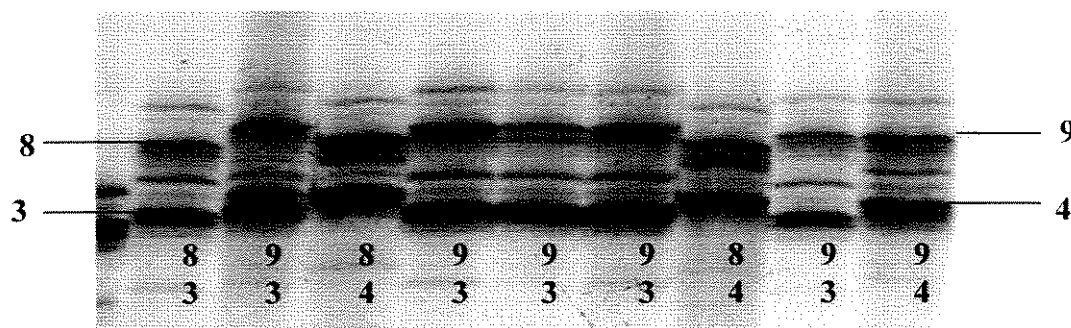
#### 4.4.2- Genotipagem dos marcadores por PCR

Os marcadores microssatélites escolhidos foram genotipados pela reação da polimerase em cadeia (PCR). As amostras para PCR foram preparadas em placas contendo um volume final de 12,5µl, composto de: 40ng de DNA genômico; 100ng de cada seqüência iniciadora (*primers forward e reverse*); 200µM dGTP, dCTP e dTTP; 25µM de dATP; 1,5µCi [<sup>33</sup>P] dATP; 0,5 unidade de *Taq* DNA polimerase; 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>.

As reações da PCR foram conduzidas nas seguintes condições: 94°C por 3min; 35 ciclos de: 94°C por 45s, Ta por 30s e 72°C por 1min, sendo que a Ta (temperatura de anelamento) foi específica para cada um dos marcadores genotipados e é dependente da seqüência dos fragmentos iniciadores específicos (*primers*).

Os produtos da PCR foram então submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 6% a 55W e 1500V por aproximadamente duas horas. Os géis foram secos à vácuo à 80°C por 1h e expostos a filmes sensíveis a raios-X por 24h à temperatura ambiente. Após isso, os filmes foram revelados e analisados.

Após a genotipagem dos marcadores foi realizada a leitura dos alelos, O fragmento de menor tamanho foi “arbitrariamente” numerado como 1 e os outros sucessivamente de forma crescente pelo tamanho (Figura 3).



**Figura 3-** Gel de eletroforese do marcador D6S276: cada coluna representa um indivíduo, nas extremidades da foto estão as amostras dos pais e no meio, os filhos da família EMJ 03.

#### 4.4.3- Análise dos dados

##### 4.4.3.1- Análise dos resultados para o estudo de ligação

Para calcular a probabilidade de dois genes (nesse caso, o marcador microsatélite e um possível *locus* para a doença) estarem ligados, utilizamos o cálculo do *lod score* (OTT, 1991). O *lod score* é calculado a partir da relação entre a probabilidade de ligação gênica, definida por  $L(\theta)$ , e a probabilidade de não ligação, definida por  $L(0,5)$ , sendo que  $L(0,5)$  é definida como a frequência de recombinação entre dois genes situados em cromossomos diferentes e, portanto, não ligados entre si (TERWILLINGER e OTT, 1993). Este conceito se resume na figura 4.

$$\text{lod score (Z)} = \log_{10} \frac{L(\theta)}{L(0,5)} \rightarrow \text{probabilidade de ligação}$$
$$L(0,5) \rightarrow \text{probabilidade de não ligação}$$

Figura 4- Fórmula para o cálculo de *lod score*

O uso de logaritmos é interessante pois permite que os dados calculados para famílias diferentes sejam combinados por soma simples dos *lod scores* individuais. Por convenção, é estabelecido que *lod scores* maiores que +3,00 indicam ligação e menores que -2,00 indicam recombinação aleatória ou não ligação (MORTON, 1955). Valores entre esse intervalo são considerados *lod scores* não significativos, ou seja, inconclusivos (TERWILLINGER e OTT, 1993). O valor de *lod score* +3,00 equivale a um  $p = 0,001$  (OTT, 1991).

Nossa escolha sobre esse método de análise se justifica pela sua ampla utilização na literatura e pela sua robustez na identificação ou exclusão de ligação (LOPES-CENDES et al., 2000; SANDER et al., 2000a; COSSETTE et al., 2002).

Para o cálculo de *lod score* foi utilizado um conjunto de programas de computador chamado *LINKAGE* (LATHROP et al., 1984). Dois tipos de análises foram realizados: dois pontos e múltiplos pontos.

A análise de dois pontos se refere a análise entre o *locus* de um marcador e o possível *locus* da doença (OTT, 1991). Já a análise de múltiplos pontos se refere a análise de dois ou mais marcadores e o *locus* da doença, ao mesmo tempo (OTT, 1991). Esta última estratégia é capaz de fornecer maior informação sobre ligação, uma vez que tira partido da informação contida nos haplótipos formados a partir dos marcadores genotipados.

Os parâmetros assumidos para os cálculos de *lod score* foram: herança autossômica dominante, penetrância igual a 70% para indivíduos afetados e 50% para indivíduos classificados como possivelmente afetados e frequência alélica para a doença de 0,021. Esses parâmetros foram obtidos da literatura (DURNER et al., 1991; SERRATOSA,

1996; SANDER et al., 1997c) e pela própria análise dos heredogramas colhidos em nosso estudo.

Anteriormente a análise dos dados propriamente dita, foi realizada uma simulação de ligação das seis famílias a serem estudadas com o aplicativo *LINKAGE*. Essa simulação utilizou dados ideais de segregação de alelos para analisar o poder estatístico de gerar *lod scores* dessas famílias.

Como referido anteriormente, o estudo de ligação foi realizado para as seis famílias em conjunto, pois nenhuma família foi capaz de gerar *lod scores* significativos individualmente. Por isso, para avaliar uma possível existência de heterogeneidade genética, ou seja, algumas famílias ligadas ao *locus* testado e outras não, foram realizados testes com o programa HOMOG (TERWILLINGER e OTT, 1993). Esse programa utiliza os valores de *lod score* da análise de dois pontos calculados para cada marcador para testar a significância de três hipóteses:  $H_0$  = hipótese de não ligação em todas as famílias;  $H_1$  = hipótese de ligação nas famílias;  $H_2$  = hipótese de ligação em algumas famílias, ou seja, presença de heterogeneidade (TERWILLINGER e OTT, 1993). O valor de  $p$  considerado significativo foi  $p \leq 0,001$ , equivalente ao “valor de corte” do *lod score* +3,00. No entanto, mesmo com esse cuidado, não eliminamos totalmente a possibilidade de que uma porcentagem das nossas famílias seja ligada a um dos *loci* testados e outra porcentagem, não. Essa é uma das grandes limitações do presente estudo e pôde ser apenas minimizada pela realização dos estudos de associação, que tem a capacidade de identificar sinais positivos de associação, mesmo em presença de heterogeneidade genética.

#### **4.4.3.2- Análise dos resultados para o estudo de associação**

Após a leitura dos filmes, os alelos são anotados, tanto para o grupo controle como para o grupo dos afetados e então tabulados (Tabela 5).

Os testes estatísticos escolhidos para a análise dos dados da associação foram: Qui-quadrado, ou teste exato de Fisher, quando apropriado (presença de caselas vazias ou com frequência menor que 5%), e *odds ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95% (BLAND, 1995).

**Tabela 5-** Exemplo de tabulação dos alelos para o estudo de associação

<i>Alelos</i>	<i>Nº de alelos</i>	
	<i>Afetados</i>	<i>Controle</i>
1	5	7
2	17	25
3	10	19
4	23	18
5	2	12
6	12	32
7	4	5
8	0	1
9	4	7
10	0	2
11	1	0
<b>Total</b>	<b>78</b>	<b>128</b>
<b>5%</b>	<b>3,9</b>	<b>6,4</b>

Para o teste Qui-quadrado optamos ainda por duas estratégias: o cálculo do Qui-quadrado *multiplex* e do Qui-quadrado 2x2.

O teste Qui-quadrado *multiplex* utilizou a distribuição de todos os alelos conjuntamente e foi calculado com a utilização do programa Systat 5.0. Em algumas situações fomos obrigados a colapsar caselas para evitar valores iguais a zero ou que representassem uma frequência menor que 5%, já que esses não são valores permitidos no cálculo de Qui-quadrado (Tabela 6). Esse teste resultou em um único *p* valor para cada marcador, já que os alelos foram analisados de forma agrupada.

**Tabela 6-** Exemplo de reagrupamento dos alelos após colapso de dados para o teste Qui-quadrado *multiplex*

<i>Alelos</i>	<i>Alelos colapsados</i>	<i>Nº de alelos</i>	
		<i>Afetados</i>	<i>Controle</i>
1	1 + 5	7	19
2	2	17	25
3	3 + 8	10	20
4	4 + 11	24	18
5	6	12	32
6	7 + 10	4	7
7	9	4	7
	<b>Total</b>	<b>78</b>	<b>128</b>



A segunda estratégia utilizada para os testes Qui-quadrado foi o cálculo em tabelas 2x2 (Tabela 7). Nesses casos, quando apropriado, o mesmo foi substituído pelo teste exato de Fisher (presença de valores iguais a zero ou que representassem uma frequência menor que 5%). Devido à realização de comparações múltiplas para cada marcador, fizemos correções para evitar a presença de associações falso-positivas. Essa correção consistiu na multiplicação do valor  $p$  encontrado para cada alelo pelo número de alelos existentes, tanto para o teste Qui-quadrado 2x2 como para o exato de Fisher (SVEJGAARD e RYDER, 1994).

**Tabela 7-** Exemplo de tabela para o teste Qui-quadrado 2X2

<b>Alelo 1</b>	<b>n</b>	<b>Total - n</b>
<b>Afetado</b>	5	73
<b>Controle</b>	7	121

Foram considerados significativos valores em que o  $p \leq 0,01$ . Tal decisão se baseou em recomendações recentes na literatura, amparadas pelo argumento de que tal medida diminui o risco de se encontrar resultados espúrios (BIRD, 2001).

O *odds ratio* (OR) foi desenvolvido por epidemiologistas para medir a relação entre duas características nominais, examinando riscos que possam resultar em doenças (DAWSON-SAUNDERS e TRAPP, 1994). Desta forma, o OR é utilizado em estudos do tipo caso-controle, comparando a probabilidade de desenvolvimento da doença por um paciente exposto a um fator de risco com a probabilidade de um controle exposto, a esse mesmo fator, em desenvolver a doença (DAWSON-SAUNDERS e TRAPP, 1994). No nosso estudo de associação, o fator de risco foram os alelos de cada marcador, analisados individualmente (Figura 5).

$$\text{OR} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de afetados com alelo A (A)}}{\text{n}^\circ \text{ total de afetados (B)}} \bigg/ \frac{\text{n}^\circ \text{ de controles com alelo A (C)}}{\text{n}^\circ \text{ total de controles (D)}}$$

**Figura 5-** Fórmula para cálculo do *odds ratio*.

Para se determinar a significância dos OR foram calculados intervalos de confiança (IC) de 95%, utilizando-se a fórmula apresentada na figura 6 (DAWSON-SAUNDERS e TRAPP, 1994). O IC é interpretado da seguinte forma: ele contém o valor da verdadeira probabilidade com 95% de confiança (DAWSON-SAUNDERS e TRAPP, 1994). O valor de OR é considerado significativo quando o IC não passa pelo valor 1, pois nesse caso temos que a ocorrência do alelo analisado é igual entre o grupo dos afetados e dos controles.

$$\text{IC} = \text{Exp} \left[ \ln(\text{OR}) \pm 1,96 \sqrt{\left(\frac{1}{A}\right) + \left(\frac{1}{B}\right) + \left(\frac{1}{C}\right) + \left(\frac{1}{D}\right)} \right]$$

**Figura 6-** Fórmula para cálculo do intervalo de confiança de 95% do OR.

Os cálculos de OR e de IC foram realizados com a utilização do programa MS Excel 2000. Para ambos os cálculos, foram considerados valores indeterminados quando houve a presença de valores iguais a zero nos denominadores da fórmula.

O OR é um teste estatístico interessante porque além de revelar se existe uma relação causal significativa, ele também estabelece o **quanto** ela é significativa, pelo cálculo do IC. Ainda assim, o teste Qui-quadrado é um importante complemento nas nossas análises, pois o OR avalia uma relação de causa que pode não estar presente nos nossos dados, uma vez que estamos estudando alelos de marcadores microsatélites (se for encontrada associação, não quer dizer necessariamente que esse marcador esteja causando a doença, mas pode haver algum gene próximo responsável por essa associação).

## 4.5- ANÁLISE DE MUTAÇÃO

### 4.5.1- Seleção dos *primers*

Para a pesquisa de mutação do exon 9 do gene *GABRA1* (na região 5q34) foram desenhados dois pares de *primers* que amplificassem todo exon e suas vizinhanças (Tabela 8), utilizando o programa computacional GENE RUNNER 3.0. Esses *primers* foram desenhados a fim de que os produtos de amplificação não ultrapassassem 300 pares de base para que a técnica de triagem de mutação, o SSCP, fosse mais eficiente

**Tabela 8-** *Primers* utilizados para a amplificação do gene *GABRA1*

<i>Primers</i>	Seqüência	Produto de PCR (pb)	Ta (°C)
<b>GAB91</b>	5' GCCAGAACTCCCTCCCTAAG 3'	254	57
<b>GAB93</b>	5' ACTCCATCCAATACCACAGGC 3'		
<b>GAB94</b>	5' TGTTCAAGTAGGCTGTCCCATC 3'	220	59
<b>GAB95</b>	5' TGGCAAACCTCAATCAGAGCTG 3'		

Ta= temperatura de anelamento

O gene *GABRA1* possui 10 exons (ENSEMBL - NCBI)<sup>3</sup>, mas preferimos fazer a triagem de mutação apenas no exon 9, onde foi identificada a mutação na família franco-canadense (COSSETTE et al., 2003). Para complementar tal análise, realizamos os estudos de ligação e associação na região onde está localizado o gene. Se houvesse evidência de ligação e/ou associação, aí então partiríamos para a análise de mutação de todos os exons do gene. Preferimos essa estratégia, ao invés da busca direta por mutações em todo o gene, na tentativa de otimizar o tempo gasto no estudo da região e devido ao fato de possuímos material de pacientes informativos para realizar as análises de ligação e associação.

<sup>3</sup> [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/exonview?transcript=ENST00000023897&db=core](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/exonview?transcript=ENST00000023897&db=core)

#### 4.5.2- Genotipagem do exon 9 do gene *GABRA1*

As amostras para PCR foram preparadas em placas contendo um volume final de 12,5µl, composto de: 40ng de DNA genômico; 100ng de cada *primer*; 200µM dGTP, dCTP e dTTP; 25µM de dATP; 1,5 µCi [<sup>33</sup>P] dATP; 0,5 unidades de *Taq* DNA polimerase; 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>.

As reações da PCR foram conduzidas nas seguintes condições: 94°C por 5min; 35 ciclos de: 94°C por 30s, Ta por 30s e 72°C por 1min; 72°C por 7min.

#### 4.5.3- Detecção de mutação

A procura por mutações no exon 9 do gene *GABRA1* foi realizada pela análise do SSCP (*single-strand conformation polymorphism*). Esta técnica se baseia no fato de que moléculas de DNA simples fita em eletroforese de gel não-desnaturante tem seu padrão de migração influenciado pela sua seqüência de bases e por interações intermoleculares entre as mesmas. Desta forma, qualquer diferença na seqüência de nucleotídeos resultará em uma alteração de mobilidade da banda no gel.

Os produtos da PCR foram então submetidos à eletroforese em gel não-desnaturante de poliacrilamida 6% e volume final contendo 5% de glicerol, a 30W e 700V. Os géis foram secos à vácuo à 80°C por 1h e expostos a filmes sensíveis a raios-X por 24h à temperatura ambiente. Após isso, os filmes foram revelados e analisados.

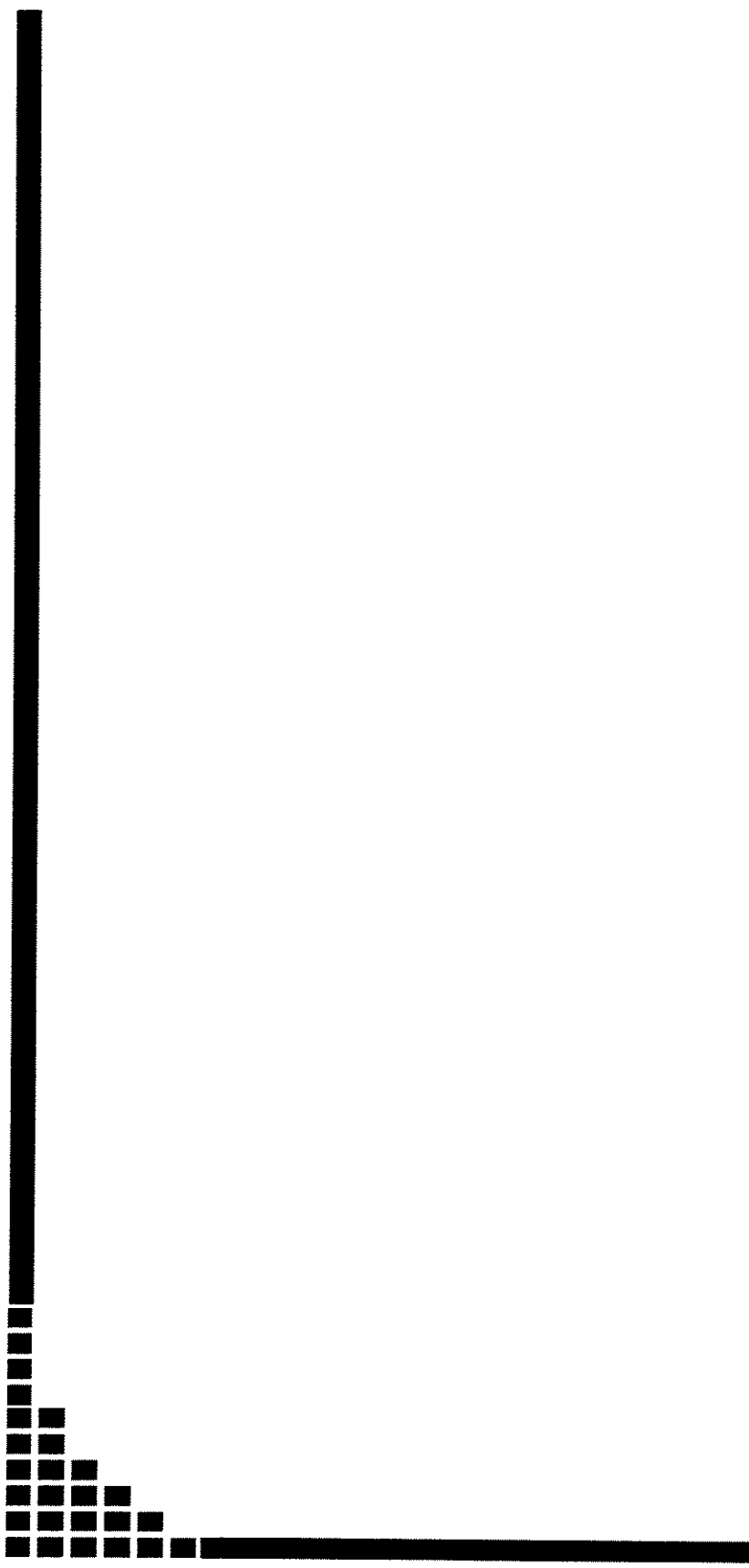
Depois de detectada uma alteração de migração no gel de SSCP, foi realizado o seqüenciamento manual para confirmação e conhecimento de tal alteração. Os *primers* utilizados na reação de seqüenciamento foram os mesmos utilizados na PCR para a análise de SSCP. As reações foram conduzidas nas seguintes condições: 94°C por 3min; 40 ciclos de: 94°C por 30s, Ta por 30s e 72°C por 1min; 72°C por 3min.

A eletroforese foi realizada em gel desnaturante de poliacrilamida 6% a 55W e 1500V. Os géis foram secos à vácuo à 80°C por 1h e expostos a filmes sensíveis a raios-X por 24h à temperatura ambiente. Após isso, os filmes foram revelados e analisados.

As alterações encontradas foram comparadas com os bancos de dados do NCBI referentes a polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP - NCBI)<sup>4</sup>.

---

<sup>4</sup> [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=2279020](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=2279020)



***5- RESULTADOS***

## 5.1- ESTUDO DE LIGAÇÃO

### 5.1.1- Simulação de ligação

A simulação de ligação realizada para as seis famílias resultou em  $Z = 5,09$  (Tabela 9), demonstrando que a análise conjunta dessas famílias tem poder de detecção de um *locus* candidato ( $Z > 3,0 =$  ligação).

**Tabela 9-** Simulação dos valores de *lod score* para as seis famílias estudadas

Família	$Z_{\max}$ a $\theta$ (frequência de recombinação) =								
	0,0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4
EMJ 34	0,67	0,59	0,52	0,43	0,35	0,27	0,19	0,12	0,06
EMJ 27	0,94	0,82	0,70	0,58	0,45	0,33	0,21	0,12	0,05
EMJ 23	0,18	0,15	0,13	0,1	0,08	0,05	0,04	0,02	0,01
EMJ 20	0,39	0,32	0,25	0,19	0,14	0,09	0,05	0,03	0,01
EMJ 3	0,31	0,16	1,00	0,84	0,58	0,52	0,35	0,22	0,10
EGI 1	1,60	1,45	1,29	1,13	0,96	0,78	0,59	0,41	0,23
<b>Total</b>	<b>5,09</b>	<b>4,50</b>	<b>3,89</b>	<b>3,28</b>	<b>2,65</b>	<b>2,04</b>	<b>1,45</b>	<b>0,91</b>	<b>0,46</b>

## 5.1.2- Análise de dois pontos

### 5.1.2.1- Região 6p21

Os quatro marcadores genotipados na região 6p21 resultaram em *lod scores* negativos para a análise de dois pontos. Destes, dois marcadores obtiveram exclusão significativa ( $Z < -2$ ): D6S276 e D6S1610 (Tabela 10).

**Tabela 10-** Valores de *lod score* da análise de dois pontos para as seis famílias combinadas em 6p21

Marcador	$Z_{\max}$ a $\theta$ (frequência de recombinação) =								
	0.0	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4
D6S276	-7,65	-2,95	-1,91	-1,24	-0,78	-0,46	-0,24	-0,1	-0,02
D6S265	-1,69	-1,19	-0,82	-0,54	-0,35	-0,21	-0,12	-0,06	-0,03
D6S291	-0,11	0,23	0,33	0,35	0,32	0,26	0,20	0,12	0,06
D6S1610	-3,69	0,36	0,64	0,68	0,61	0,48	0,34	0,21	0,10



### 5.1.2.1.1- Teste de heterogeneidade para os marcadores em 6p21

O teste de heterogeneidade utiliza os valores de *lod scores* gerados pela análise de dois pontos e, apesar das famílias terem resultado *lod scores* positivos e negativos para um mesmo marcador, os testes não apontaram para a presença de heterogeneidade no *locus* 6p21, resultando em valores de *p* entre 0,12 e 1 (Tabela 11).

**Tabela 11-** Teste de heterogeneidade das seis famílias genotipadas para os quatro marcadores da região 6p21

Marcador	Teste Hipóteses	Grau de Liberdade	$X^2$	<i>L ratio</i>	<i>p</i>
<b>D6S276</b>	H <sub>2</sub> vs. H <sub>1</sub>	1	0,000	1,0000	1
	H <sub>1</sub> vs. H <sub>0</sub>	1	0,000	1,0000	
	H <sub>2</sub> vs. H <sub>0</sub>	2	0,000	1,0000	
<b>D6S265</b>	H <sub>2</sub> vs. H <sub>1</sub>	1	0,000	1,0000	1
	H <sub>1</sub> vs. H <sub>0</sub>	1	0,000	1,0000	
	H <sub>2</sub> vs. H <sub>0</sub>	2	0,000	1,0000	
<b>D6S291</b>	H <sub>2</sub> vs. H <sub>1</sub>	1	0,000	1,0000	0,13
	H <sub>1</sub> vs. H <sub>0</sub>	1	4,145	7,9433	
	H <sub>2</sub> vs. H <sub>0</sub>	2	4,145	7,9433	
<b>D6S1610</b>	H <sub>2</sub> vs. H <sub>1</sub>	1	0,000	1,0000	0,12
	H <sub>1</sub> vs. H <sub>0</sub>	1	4,237	8,3176	
	H <sub>2</sub> vs. H <sub>0</sub>	2	4,237	8,3176	

H<sub>2</sub> vs. H<sub>1</sub> = heterogeneidade dada ligação,

H<sub>1</sub> vs. H<sub>0</sub> = ligação assumindo homogeneidade,

H<sub>2</sub> vs. H<sub>0</sub> = união dos testes de ligação e heterogeneidade.

Para ser significativo, *L ratio* > 2.000 e para confirmar heterogeneidade, temos que ter um *p* < 0,001.

### 5.1.2.2- Região 6p12

Os quatro marcadores genotipados na região 6p12 resultaram em *lod scores* negativos para a análise de dois pontos. Destes, dois marcadores obtiveram exclusão significativa ( $Z < -2$ ): D6S465 e D6S257 (Tabela 12).

**Tabela 12-** Valores de *lod score* da análise de dois pontos para as seis famílias combinadas em 6p12

Marcador	$Z_{\max}$ a $\theta$ (frequência de recombinação) =									
	0.0	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	
D6S426	-1,08	-0,23	0,07	0,19	0,23	0,21	0,16	0,11	0,05	
D6S271	-1,66	-0,10	0,38	0,57	0,62	0,58	0,49	0,35	0,20	
D6S465	-2,22	-0,91	-0,48	-0,25	-0,11	-0,03	0,01	0,02	0,02	
D6S257	-5,90	-2,36	-1,58	-1,10	-0,78	-0,54	-0,37	-0,23	-0,13	

### 5.1.2.2.1- Teste de heterogeneidade para os marcadores em 6p12

Apesar das famílias terem resultado *lod scores* positivos e negativos para um mesmo marcador na análise de dois pontos, os testes de heterogeneidade não resultaram em valores de *p* significativos (*p* entre 0,33 e 0,8) (Tabela 13).

**Tabela 13-** Teste de heterogeneidade das seis famílias genotipadas para os quatro marcadores da região 6p12

Marcador	Teste Hipóteses	Grau de Liberdade	$X^2$	<i>L ratio</i>	<i>p</i>
<b>D6S426</b>	H <sub>2</sub> vs. H <sub>1</sub>	1	0,000	1,0000	0,33
	H <sub>1</sub> vs. H <sub>0</sub>	1	2,210	3,0200	
	H <sub>2</sub> vs. H <sub>0</sub>	2	2,210	3,0200	
<b>D6S271</b>	H <sub>2</sub> vs. H <sub>1</sub>	1	0,000	1,0000	0,46
	H <sub>1</sub> vs. H <sub>0</sub>	1	6,171	21,8776	
	H <sub>2</sub> vs. H <sub>0</sub>	2	6,171	21,8776	
<b>D6S465</b>	H <sub>2</sub> vs. H <sub>1</sub>	1	0,000	1,0000	0,66
	H <sub>1</sub> vs. H <sub>0</sub>	1	0,829	1,5136	
	H <sub>2</sub> vs. H <sub>0</sub>	2	0,829	1,5136	
<b>D6S257</b>	H <sub>2</sub> vs. H <sub>1</sub>	1	0,030	1,0150	0,86
	H <sub>1</sub> vs. H <sub>0</sub>	1	0,000	1,0000	
	H <sub>2</sub> vs. H <sub>0</sub>	2	0,030	1,0000	

H<sub>2</sub> vs. H<sub>1</sub> = heterogeneidade dada ligação,

H<sub>1</sub> vs. H<sub>0</sub> = ligação assumindo homogeneidade,

H<sub>2</sub> vs. H<sub>0</sub> = união dos testes de ligação e heterogeneidade.

Para ser significativo, *L ratio* > 2.000 e para confirmar heterogeneidade, temos que ter um *p* < 0,001.

### 5.1.2.3- Região 5q34

A análise de dois pontos para a região 5q34 resultou em *lod scores* negativos, mas apenas um marcador obteve exclusão significativa ( $Z < -2$ ) como está indicado na tabela 14.

**Tabela 14-** Valores de *lod score* da análise de dois pontos para as seis famílias

Marcador	$Z_{\max}$ a $\theta$ (frequência de recombinação) =								
	0.0	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4
D5S412	-3,22	-1,84	-1,29	-0,91	-0,64	-0,45	-0,30	-0,19	-0,11
D5S529	-1,74	-1,10	-0,74	-0,49	-0,32	-0,20	-0,11	-0,05	-0,02
D5S422	-1,33	-0,24	-0,00	0,09	0,12	0,11	0,08	0,05	0,02
D5S2066	-1,63	-0,71	-0,44	-0,29	-0,19	-0,12	-0,08	-0,05	-0,02

### 5.1.2.3.1- Teste de heterogeneidade para marcadores em 5q34

O teste de heterogeneidade genética apresentou valores de  $p$  entre 0,34 e 1 para os marcadores dessa região, o que não é estatisticamente significativo para afirmar a presença de heterogeneidade genética (Tabela 15).

**Tabela 15-** Testes de heterogeneidade das seis famílias genotipadas para os marcadores da região 5q34

Marcador	Teste de Hipóteses	Grau de Liberdade	$X^2$	$L\ ratio$	$p$
D5S412	$H_2$ vs. $H_1$	1	0,000	1,0000	1
	$H_1$ vs. $H_0$	1	0,000	1,0000	
	$H_2$ vs. $H_0$	2	0,000	1,0000	
D5S529	$H_2$ vs. $H_1$	1	0,000	1,0000	1
	$H_1$ vs. $H_0$	1	0,000	1,0000	
	$H_2$ vs. $H_0$	2	0,000	1,0000	
D5S422	$H_2$ vs. $H_1$	1	0,000	1,0000	0,34
	$H_1$ vs. $H_0$	1	2,164	2,9512	
	$H_2$ vs. $H_0$	2	2,164	2,9512	
D5S2066	$H_2$ vs. $H_1$	1	0,116	1,0598	0,77
	$H_1$ vs. $H_0$	1	0,414	1,2303	
	$H_2$ vs. $H_0$	2	0,531	1,3038	

$H_2$  vs.  $H_1$  = heterogeneidade dada ligação,

$H_1$  vs.  $H_0$  = ligação assumindo homogeneidade,

$H_2$  vs.  $H_0$  = união dos testes de ligação e heterogeneidade.

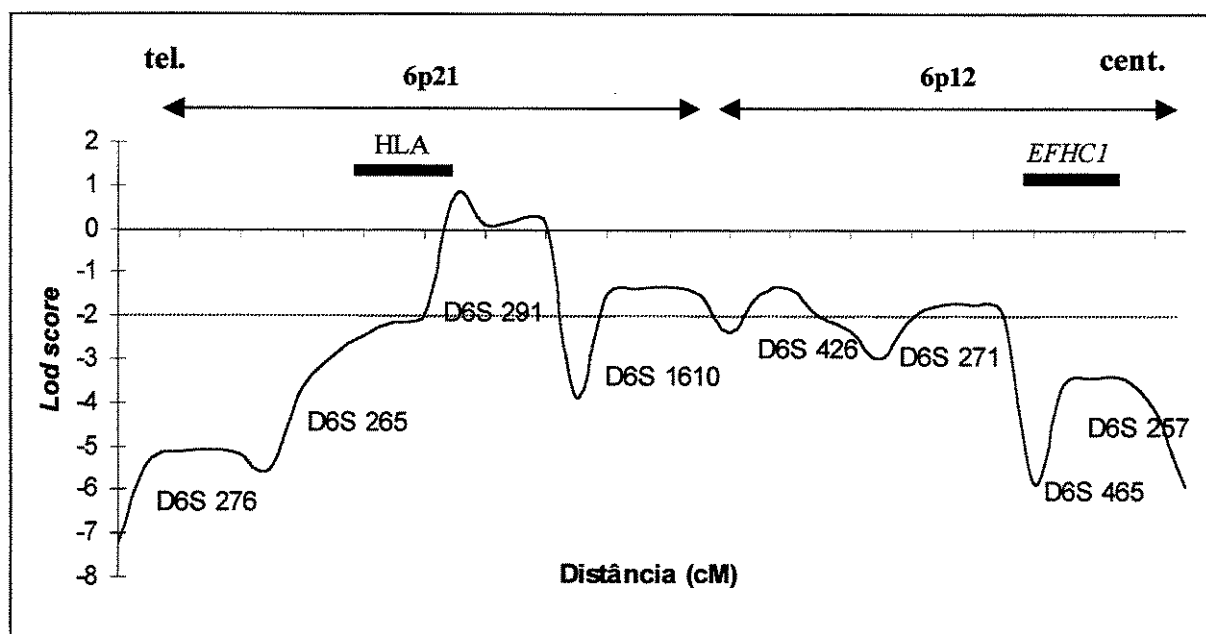
Para ser significativo,  $L\ ratio > 2.000$  e para confirmar heterogeneidade, temos que ter um  $p < 0,001$ .

### 5.1.3- Análise de múltiplos pontos

#### 5.1.3.1- Região 6p21 e 6p12

A análise de múltiplos pontos, por utilizar as informações contidas nos haplótipos formados a partir dos marcadores genotipados, foi realizada com os dados dos oito marcadores em conjunto, tornando-a mais informativa.

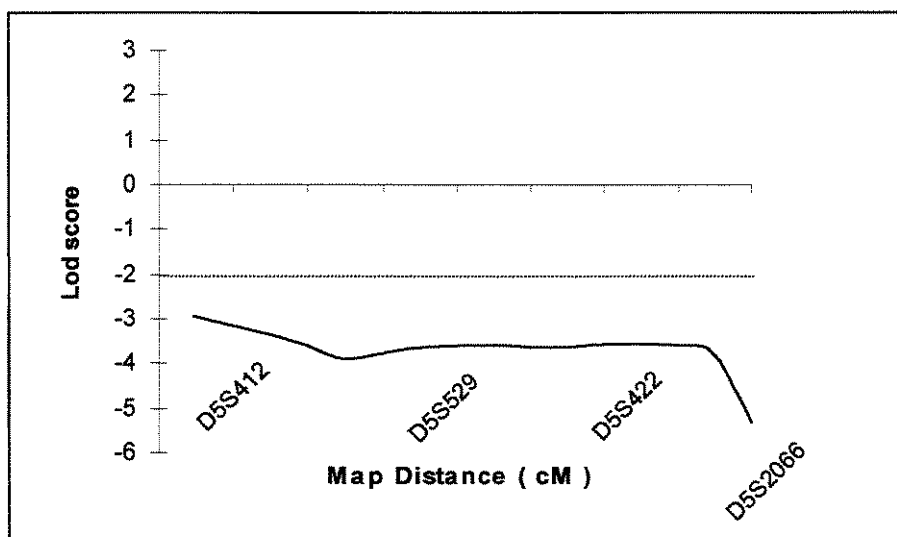
Essa análise resultou em total exclusão das regiões flanqueadas pelos marcadores D6S276, D6S265 (ambos em 6p21), D6S465 e D6S257 (ambos em 6p12). Já as regiões flanqueadas pelos marcadores D6S1610 (6p21), D6S426 e D6S271 (6p12) resultaram em *lod scores* negativos porém não significativos. O marcador D6S291 resultou em valores de *lod scores* não informativos (Figura 7).



**Figura 7-** Análise de múltiplos pontos para os oito marcadores da região 6p21 e 6p12 nas seis famílias. Valores abaixo da linha tracejada (*lod score* < -2.00) indicam exclusão de ligação entre os marcadores e um possível *locus* para EGI.

### 5.1.3.2- Região 5q34

A análise de múltiplos pontos resultou em *lod scores* menores que  $-2$  para todos os marcadores, excluindo toda a região 5q34 de ligação com a EGI nessas famílias estudadas (Figura 8).



**Figura 8-** Análise de múltiplos pontos para os quatro marcadores da região 5q34 nas seis famílias. Valores abaixo da linha tracejada (*lod score* <  $-2.00$ ) indicam exclusão de ligação entre os marcadores e um possível *locus* para EGI.

## 5.2- ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO

### 5.2.1- Região 6p21

Dos 44 indivíduos com EMJ e os 63 controles utilizados para o estudo de associação nessa região, obtivemos genotipagem com sucesso: para o marcador D6S412 41/49 pacientes e controles respectivamente, para D6S265, 43/54, para D6S291, 43/49 e para D5S1610, 43/63.

O teste Qui-quadrado *multiplex* para a região 6p21 não indicou associação de nenhum marcador com o fenótipo, assim como o teste Qui-quadrado 2x2 (assumindo  $p < 0,01$ ) (Tabela 16). Porém, o teste exato de Fisher, calculado para aqueles alelos que tiveram a frequência menor que 5% ou na presença de zero, resultou em dois valores significativos, para os alelos 9 e 11 do marcador D6S1610. O cálculo do OR também resultou em associação do alelo 4 do marcador D6S1610 com a EMJ, indicando que indivíduos que apresentam esse alelo têm um risco aumentado em quase três vezes de ter EMJ, podendo esse risco variar de 1,3 a 5 vezes (Tabela 16).



**Tabela 16-** Análises estatísticas para os marcadores do estudo de associação da região 6p21

alelo	D6S276			D6S265			D6S291			D6S1610		
	$\chi^2$ 2x2/ Fisher*	OR	IC	$\chi^2$ 2x2/ Fisher*	OR	IC	$\chi^2$ 2x2/ Fisher*	OR	IC	$\chi^2$ 2x2/ Fisher*	OR	IC
	$\chi^2$ mult* = 0,15			$\chi^2$ mult* = 0,34			$\chi^2$ mult* = 0,29			$\chi^2$ mult* = 0,04		
1	NS	0,71	0,28 1,80	NS	0,51	0,20 1,30	0,49	ind	ind	NS	0,87	0,20 3,76
2	NS	1,37	0,53 3,56	NS	0,98	0,54 1,78	NS	1,77	0,91 3,43	NS	1,15	0,59 2,24
3	NS	0,58	0,17 1,99	NS	1,74	0,58 5,23	NS	0,73	0,40 1,34	NS	0,81	0,38 1,75
4	NS	0,41	0,12 1,33	NS	0,84	0,41 1,72	NS	0,56	0,10 3,13	NS	2,58	1,32 5,02
5	NS	0,89	0,19 4,11	NS	1,90	0,89 4,06	NS	0,81	0,31 2,12	NS	0,46	0,16 1,31
6	NS	1,20	0,24 6,12	0,85	0,43	ind	NS	1,54	0,34 7,10	NS	0,55	0,27 1,10
7	NS	0,33	0,07 1,61	NS	0,40	ind	NS	1,39	0,61 3,20	NS	1,18	0,31 4,53
8	NS	2,13	0,74 6,14	NS	1,43	0,14 5,10	NS	0,75	0,12 4,62	NS	ind	ind
9	NS	1,92	0,98 3,75	NS	1,19	0,17 3,21	-	-	-	0,0001	ind	ind
10	NS	0,83	0,35 1,99	NS	0,56	ind	-	-	-	NS	ind	ind
11	NS	0,39	0,04 3,83	-	-	-	-	-	-	0,0001	ind	ind

\* Os resultados dos testes Qui-quadrado e exato de Fisher são valores de *p*.

$\chi^2$  mult\*: Qui-quadrado *multiplex*;  $\chi^2$  2x2/ Fisher\*: Qui-quadrado com tabelas 2x2 ou exato de Fisher (freq < 5%) indicado em itálico, ambos corrigidos; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; ind: indeterminado; NS: não significativo, *p* corrigido > 1; "-": alelo não existente

### 5.2.2- Região 6p12

Dos 44 pacientes com EMJ e dos 63 controles utilizados para o estudo de associação na região 6p12, obtivemos genotipagem com sucesso: para o marcador D6S426 40/60 pacientes e controles respectivamente, para D6S271, 41/42, e para D6S257, 38/25.

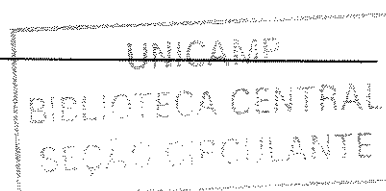
O teste Qui-quadrado *multiplex* indicou associação do marcador D6S426 com a EMJ resultando em um  $p = 0,005$  ( $p$  significativo  $< 0,01$ ), assim como o teste exato de Fisher, que resultou em  $p$  valores significativos para os alelos 4 e 10, e o cálculo do OR que encontrou associação dos alelos 1 e 4, ambos para o marcador D6S426 (Tabela 17).

**Tabela 17-** Análises estatísticas para o estudo de associação da região 6p12

alelo	D6S426			D6S271			D6S257		
	$\chi^2$ mult * = 0,005			$\chi^2$ mult * = 0,97			$\chi^2$ mult * = 0,058		
	$\chi^2$ cor 2x2 *	OR	IC	$\chi^2$ cor 2x2 *	OR	IC	$\chi^2$ cor 2x2 *	OR	IC
1	NS	2,58	1,10 6,09	NS	2,92	0,75 11,42	NS	0,65	0,04 10,69
2	NS	0,63	0,23 1,70	NS	0,33	0,03 3,27	NS	0,65	0,09 4,76
3	NS	1,23	0,32 4,73	NS	1,03	0,06 16,66	NS	0,32	0,03 3,63
4	<i>0,0003</i>	10,59	2,30 48,72	NS	2,08	0,18 23,34	NS	0,64	0,12 3,32
5	NS	0,86	0,34 2,15	NS	1,47	0,56 3,87	<i>0,0195</i>	0,16	0,04 0,63
6	NS	0,86	0,34 2,15	NS	0,56	0,16 2,01	NS	0,54	0,19 1,50
7	NS	1,90	0,56 6,44	NS	0,96	0,46 2,00	NS	0,61	0,22 1,67
8	NS	0,73	0,33 1,59	NS	1,21	0,55 2,68	NS	3,54	0,96 13,02
9	NS	0,45	0,19 1,07	NS	0,69	0,25 1,91	NS	1,27	0,47 3,44
10	<i>0,0044</i>	ind	ind	NS	1,36	0,48 3,83	NS	3,23	0,87 11,99
11	NS	3,10	0,28 34,80	NS	1,03	0,29 3,69	NS	2,01	0,20 19,92
12	-	-	-	NS	ind	ind	NS	ind	ind
13	-	-	-	NS	ind	ind	NS	ind	ind

\* Os resultados dos testes Qui-quadrado e exato de Fisher são valores de *p*.

$\chi^2$  mult: Qui-quadrado *multiplex*;  $\chi^2$  cor 2x2: Qui-quadrado com tabelas 2x2 ou exato de Fisher (freq < 5%) indicado em itálico, ambos corrigidos; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; ind: indeterminado; NS: não significativo, *p* corrigido > 1; "-": alelo não existente



Para os outros marcadores os testes Qui-quadrado *multiplex* e 2x2, o exato de Fisher e o cálculo do OR não resultaram em associação de nenhum marcador ou alelo com a EMJ (Tabela 17).

### 5.2.3- Região 5q34

Dos 44 indivíduos com EMJ e os 63 controles utilizados para o estudo de associação na região 5q34, obtivemos genotipagem com sucesso: para o marcador D5S412 43/53 pacientes e controles respectivamente, para D5S529, 42/57, para D5S422, 43/60 e para D5S2066, 43/61.

O teste Qui-quadrado *multiplex* e 2X2 não revelaram evidência de associação de nenhum marcador e a EMJ. Já o teste exato de Fisher resultou em valores significativos para o alelo 1 do marcador D5S422, e para o alelo 6 do marcador D5S2066. Para esse mesmo marcador D5S2066, o cálculo de OR revelou diferença significativa da presença do alelo 3 entre o grupo dos afetados e dos controles (OR= 1,83 com IC = 1,05 a 3,19) (Tabela 18).

**Tabela 18-** Análises estatísticas para os marcadores do estudo de associação da região 5q34

alelo	D5S412			D5S529			D5S422			D5S2066		
	$\chi^2$ mult* = 0,18			$\chi^2$ mult* = 0,08			$\chi^2$ mult* = 0,74			$\chi^2$ mult* = 0,21		
	$\chi^2$ 2x2/ Fisher*	OR	IC	$\chi^2$ 2x2/ Fisher*	OR	IC	$\chi^2$ 2x2/ Fisher*	OR	IC	$\chi^2$ 2x2/ Fisher*	OR	IC
1	NS	0	ind	NS	0,45	0,05 4,36	<i>0,0001</i>	ind	ind	NS	ind	ind
2	NS	0,74	0,23 2,32	NS	0,68	0,06 7,57	NS	0,68	0,06 7,60	<i>0,41</i>	7,29	0,84 63,53
3	NS	2,32	0,92 5,81	NS	0	ind	NS	1,03	0,46 2,30	NS	1,83	1,05 3,19
4	NS	0,65	0,29 1,46	NS	1,37	0,19 9,90	NS	2,77	0,25 31,01	<i>0,15</i>	0,22	0,06 0,77
5	NS	1,36	0,57 3,26	NS	1,83	0,65 5,14	NS	0,91	0,50 1,65	NS	0,91	0,45 1,83
6	NS	1,84	0,85 4,01	NS	0,43	0,11 1,65	NS	1,02	0,22 4,70	<i>0,0009</i>	ind	ind
7	NS	0,49	0,23 1,03	NS	0,40	0,16 1,0	NS	1,07	0,50 2,30	NS	1,41	0,34 5,78
8	NS	0,72	0,31 1,68	NS	1,43	0,76 2,72	NS	0,68	0,34 1,36	NS	0,47	0,16 1,34
9	NS	2,51	0,61 10,35	NS	1,19	0,52 2,73	NS	1,27	0,51 3,14	NS	0,44	0,12 1,69
10	-	-	-	NS	0,56	0,22 1,42	NS	2,77	0,25 31,01	NS	1,40	0,09 22,54
11	-	-	-	NS	1,97	0,90 4,32	NS	1,37	0,08 22,17	-	-	-

\* Os resultados dos testes Qui-quadrado e exato de Fisher são valores de  $p$ .

$\chi^2$  mult\*: Qui-quadrado *multiplex*;  $\chi^2$  2x2/ Fisher\*: Qui-quadrado com tabelas 2x2 ou exato de Fisher (freq < 5%) indicado em itálico ambos corrigidos; OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; ind: indeterminado; NS: não significativo,  $p$  corrigido > 1; "-": alelo não existente



## ***6- DISCUSSÃO***

## 6.1- REGIÃO 6p21

O primeiro *locus* mapeado em uma síndrome epiléptica foi na EMJ na região 6p21 (HLA-DQ) utilizando marcadores sorológicos (GREENBERG et al., 1988) e desde então, na tentativa de se identificar um gene que esteja relacionado a predisposição da EMJ nessa região, várias pesquisas tem sido realizadas. Dessas, algumas obtiveram resultados positivos semelhantes (DURNER et al., 1991; GREENBERG et al., 2000), outras identificaram um novo *locus*, 6p12, região mais centromérica ao HLA (LIU et al., 1995; BAI et al., 2002), além de algumas pesquisas que excluíram a possibilidade de existência de um gene responsável pela EMJ e outras EGI na região 6p como um todo (WHITEHOUSE et al., 1993; ELMSLIE et al., 1996).

Os nossos resultados, das análises de ligação e de associação, permitiram a exclusão de um gene de maior efeito, para as seis famílias, presente na região flanqueada pelos marcadores D6S276 e D6S265 (região 6p21) *locus* onde estão presentes o gene *BRD2*, proposto como um gene candidato para EGI (PAL et al., 2003), e a região HLA. Apesar de encontrarmos esses resultados negativos para a região HLA, não conseguimos excluir totalmente a possibilidade de ligação do marcador centromérico a essa região, D6S291. A análise de dois pontos para essa região mais centromérica de 6p21, resultou em valores negativos, mas não alcançando valores de *lod scores* menores que  $-2,0$  ( $Z_{\min} = -0,11$  a  $\theta = 0$ ). Além disso, a análise de múltiplos pontos não foi informativa, evidenciando a possibilidade da presença de um gene de suscetibilidade para o fenótipo nessa região. Esse gene, ou genes, possivelmente se encontra próximo, mas não dentro, da região HLA. Resultado semelhante foi obtido por análise de ligação em um outro trabalho, cuja análise de múltiplos pontos obteve o maior pico de *lod score* ( $Z_{\max} = 3,27$ ) em um *locus* 3,3cM centromérico da região HLA-DQ, na região do marcador D6S291; esse dado não foi ressaltado pelos autores (SANDER et al., 1997c). Esses achados do nosso estudo de ligação foram reforçados pelos resultados do estudo de associação, demonstrando associação significativa para marcadores localizados na região de transição entre 6p21 e 6p12.

Uma associação positiva pode ocorrer se um alelo A é de fato a causa da doença a que ele está sendo associado (LANDER e SCHORK, 1994), o que no nosso caso, muito provavelmente, não está ocorrendo, uma vez que o alelo em questão não é de um gene e sim de um marcador microssatélite. Outra explicação para uma associação positiva é o desequilíbrio de ligação, que surge quando dois *loci* estão localizados próximos em regiões do genoma onde a recombinação é rara (WEISSBECKER et al., 1999), portanto o alelo A do exemplo anterior, não seria a causa da doença, mas ele estaria próximo ao gene causador. E ainda, uma associação positiva pode ser um resultado falso-positivo oriundo de uma diferença étnica entre os grupos de pacientes e controles devido a miscigenação ou heterogeneidade da população (WEISSBECKER et al., 1999). Após todas essas considerações, acreditamos que as associações positivas encontradas em nossa amostra de pacientes se deva, muito provavelmente, a um desequilíbrio de ligação, indicando a presença de genes modificadores ou de menor efeito (suscetibilidade) próximos a esses marcadores.

Somando os resultados obtidos pelo nosso estudo e por vários trabalhos apresentados na literatura (DURNER et al., 1991; WEISSBECKER et al., 1991; OBEID et al., 1994; GREENBERG et al., 2000), não podemos excluir a possibilidade de que genes de suscetibilidade para o fenótipo, no caso pelo menos dois, possam estar localizados dentro da região HLA e centromérico a ela em 6p21.

## 6.2- REGIÃO 6p12

A análise de ligação de dois pontos resultou em *lod scores* negativos para todos os marcadores na região 6p12, sendo que para os dois marcadores mais centroméricos, os *lod scores* foram significativamente negativos (para D6S465,  $Z_{\max} = -2,22$  e para D6S257,  $Z_{\max} = -5,90$ , ambos a  $\theta = 0$ ). Além disso, a análise de múltiplos pontos praticamente excluiu toda região 6p12, incluindo a região mais centromérica, onde se localiza o gene *EFHC1*, proposto como candidato para EMJ por SUZUKI et al. (2003). Porém aqui, vale lembrar o alerta de que a metodologia de estudo de ligação utilizada, ou seja, *lod scores* calculados para todas as famílias combinadas, pode não ter detectado a presença de



heterogeneidade genética. Permanecendo, portanto, a possibilidade de algumas famílias ou pacientes terem mutações no gene *EFHC1*.

Apesar desses resultados negativos obtidos pelas análises de ligação, o estudo de associação encontrou uma forte relação entre o marcador D6S426, marcador mais telomérico da região 6p12, e os pacientes estudados com EMJ. O teste Qui-quadrado *multiplex* resultou em um valor de  $p$  de 0,005. Quando analisamos os alelos individualmente, encontramos dois alelos com resultados significativos, alelos 1 e 10 e ainda, o alelo 4, que obteve valores significativos para todos os testes estatísticos (exato de Fisher:  $p = 0,0003$  e OR = 10,59 com IC = 2,30 a 48,72), evidenciando a possível presença de um gene de menor efeito nessa região mais telomérica de 6p12. Fazendo uma busca no banco de genes do NCBI (LocusLink – NCBI)<sup>1</sup>, observamos que essa região é rica em seqüências transcritas, mas não anotadas, indicando uma região candidata a conter novos genes de suscetibilidade para epilepsia.

### 6.3- REGIÃO 5q34

O ácido gama-aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, é um alvo interessante para o estudo das epilepsias, pois se alguma alteração nos seus receptores, efetivos mediadores da inibição sináptica, levar a diminuição de sua atividade, isso pode acarretar uma hiperexcitabilidade neuronal, podendo levar a crises epilépticas (MEISLER, 01).

Desta forma, os genes que codificam as subunidades dos receptores GABA, presentes em diferentes regiões do genoma, têm sido estudados para diferentes síndromes epilépticas, tanto parciais como generalizadas. Uma mutação foi descrita no gene *GABRG2*, localizado no *locus* 5q31-33, em uma família com EAJ associada a crises febris (MARINI et al., 2003) e em uma família segregando epilepsia generalizada com crises febris “*plus*” (BAULAC et al., 2001). Também foi descrito um polimorfismo presente no gene *GABBR1* (6p21) como responsável por aumentar a susceptibilidade a epilepsia do lobo temporal

---

<sup>1</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/locuslink>

(GAMBARDELLA et al., 2003), além do estudo de COSSETTE et al. (2003), que identificou, em uma família franco-canadense com EMJ segregando uma herança autossômica dominante, a mutação Ala322Asp no gene *GABRA1*, localizado no *locus* 5q34, uma das regiões de interesse no presente estudo.

Ao contrário dessas publicações, nossos resultados excluíram a presença de um *locus* principal para EMJ ou outras formas de EGI na região 5q34. Além disso, os resultados da análise de mutação dos 71 pacientes com EGI estudados não revelaram qualquer alteração potencialmente patológica do exon 9 do gene *GABRA1*.

Corroborando nossos dados, em agosto de 2003, KAPOOR et al. publicaram um estudo também realizado com o gene *GABRA1*, utilizando 35 pacientes da Índia com EMJ. Esses autores realizaram a análise da mutação Ala322Asp no exon 9 e genotiparam dois marcadores (D5S2118 e D5S422) que flanqueavam o gene, para os 35 probandos e 100 controles. A análise de mutação também foi negativa para todos os indivíduos estudados, mas a frequência de um dos alelos do marcador D5S422 foi significativamente diferente, entre os afetados e os controles.

Em 1996, SANDER et al. (1996), também excluiu a possibilidade de ligação entre EGI e a região 5q32-35, onde está localizado, além do gene *GABRA1*, o gene *GABRG2*, estudando 63 famílias com EGI, sendo a maioria delas alemãs. Um outro estudo, utilizando 99 famílias com pelo menos um membro que tivesse crises de ausência típicas, genotipou 23 marcadores microssatélites cobrindo todo o cromossomo 5 e não encontrou evidência de um *locus* de suscetibilidade para EGI nesse cromossomo (WINDEMUTH et al., 2002).

Uma hipótese para explicar esses achados opostos consiste na diferença das famílias estudadas. As famílias estudadas, pelo nosso grupo e pelos outros três grupos que excluíram a região onde está localizado o *GABRA1*, são compostas por indivíduos com EMJ e por outras síndromes epilépticas generalizadas, como EAI e EAJ. Já a família franco-canadense analisada por COSSETTE et al. (2003) era composta apenas por pacientes com EMJ, segregando uma herança autossômica dominante com alta penetrância.

Desta forma, esses achados negativos podem ser resultado da existência de heterogeneidade genética presente nas subsíndromes de EGI, ou mesmo dentro da própria EMJ.

Para tentar minimizar o problema da heterogeneidade genética entre os subgrupos de EGI, nós também realizamos estudos de associação utilizando apenas probandos com EMJ. Os resultados obtidos não foram significativos para dois marcadores (D5S412 e D5S529) genotipados, porém encontramos valores significativos, pelo teste exato de Fisher, para um dos alelos do marcador D5S422 e um do marcador D5S2066. Além disso, um outro alelo do marcador D5S2066 foi observado com maior frequência nos indivíduos afetados quando comparado com os controles, indicando associação positiva pelo cálculo de OR. É interessante notar que o grupo que estudou as famílias da Índia, também encontrou associação positiva em um alelo do marcador D5S422 (KAPOOR et al., 2003), reforçando a possível presença de um gene de menor efeito para a EMJ nessa região.

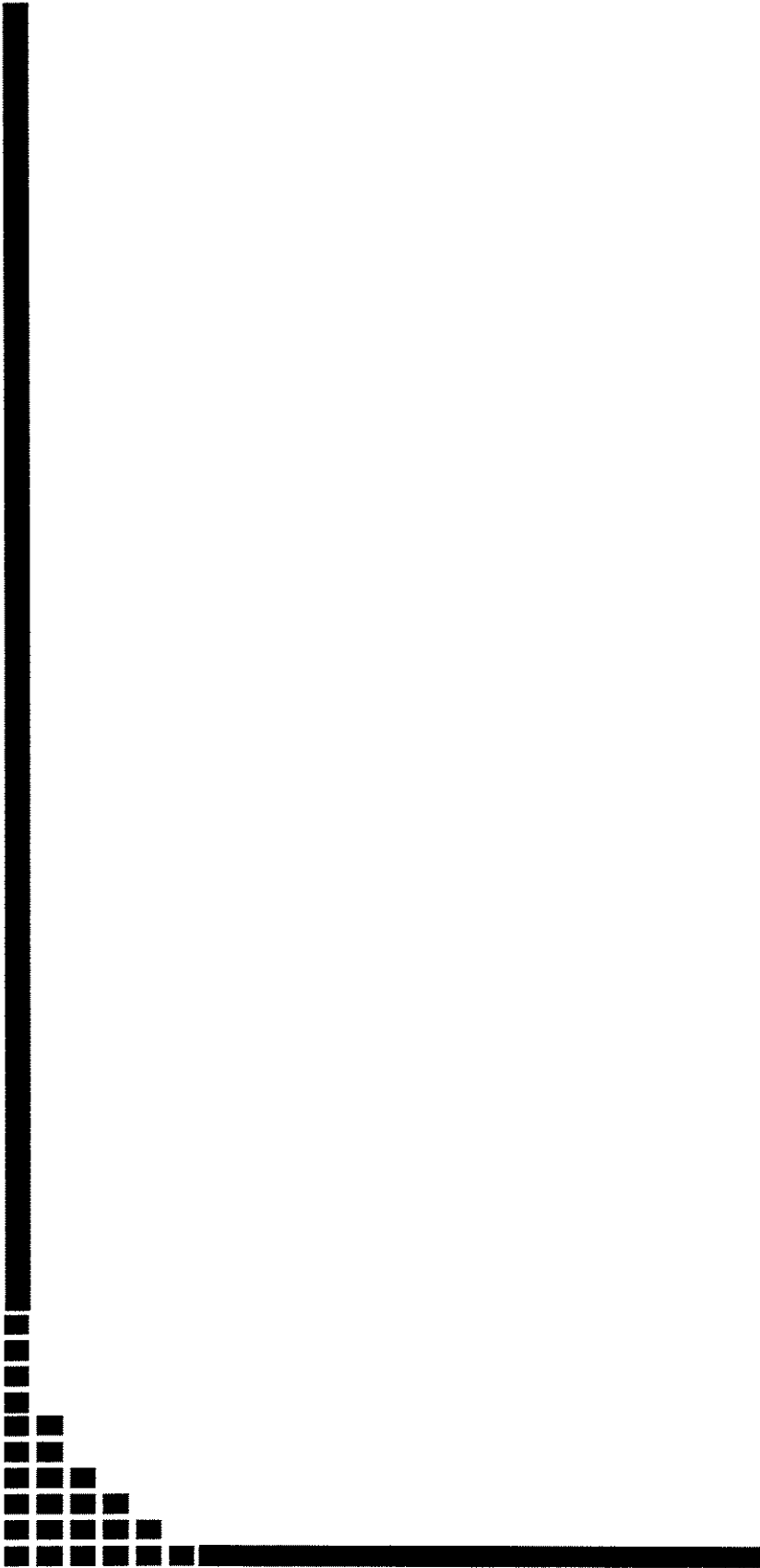
Cabe ressaltar que, apesar de não termos encontrado mutação ou evidência de ligação do gene *GABRA1* com as EGI, os genes que codificam outras subunidades do receptor GABA<sub>A</sub> continuam sendo alvos interessantes, já que mutações em diferentes subunidades do mesmo receptor podem causar um fenótipo idêntico.

#### **6.4- CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os nossos dados vêm contribuir para o entendimento da EMJ e das EGI em geral como doenças complexas, nas quais existe muito provavelmente uma herança poligênica e a presença de heterogeneidade gênica.

As EGI provavelmente sejam resultado da existência de vários genes de pequeno efeito, ou ainda, pequenas variantes com alta frequência na população “normal”, que não apresentam impactos fisiológicos por si só. Porém, uma combinação dessas variantes, em diferentes números, poderiam resultar em alterações fisiológicas significativas, levando a diferentes fenótipos de epilepsia. Isso explicaria a manifestação da suscetibilidade à epilepsia na forma de um contínuo.

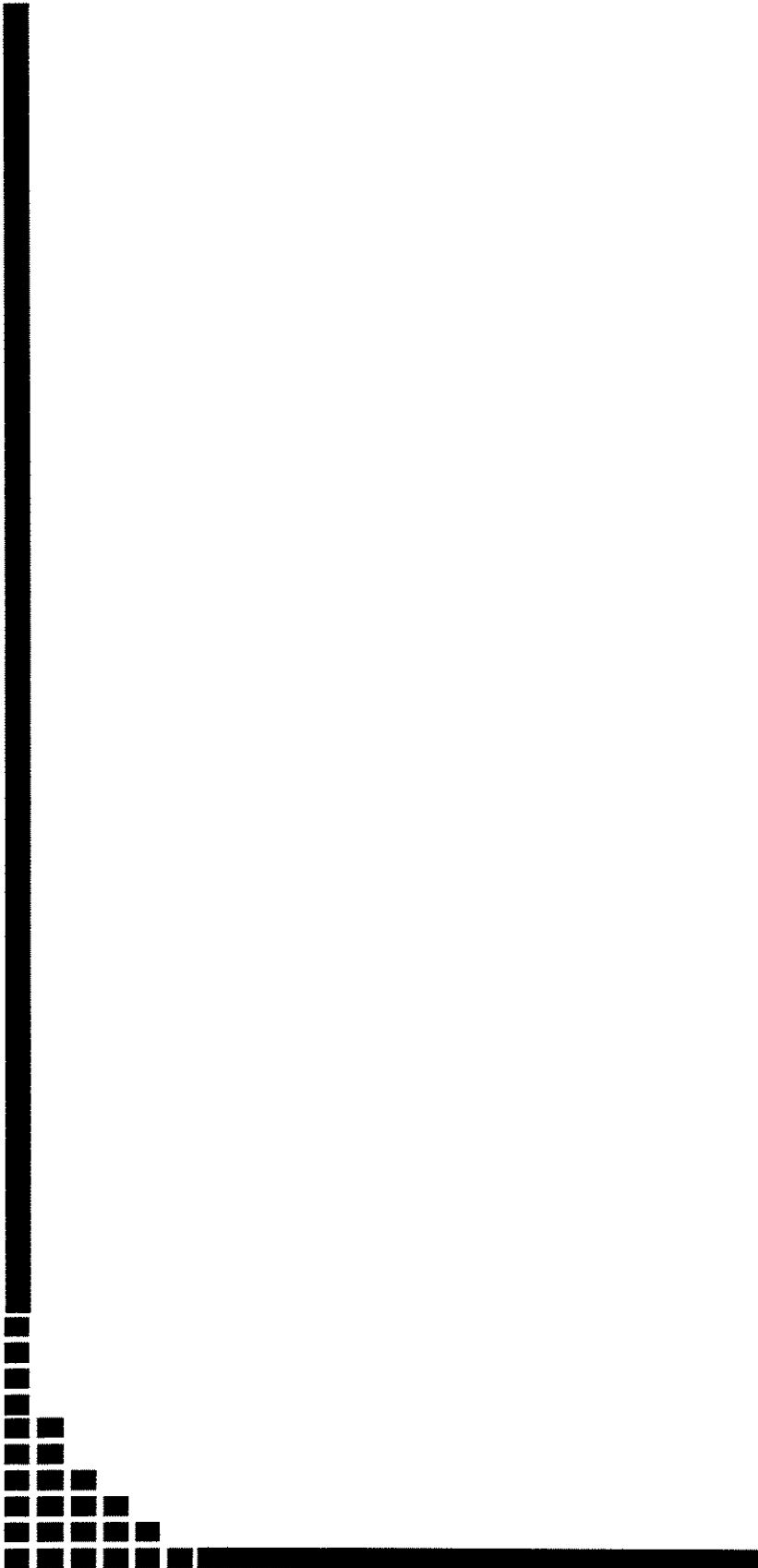
Os genes envolvidos com a etiologia das EGI provavelmente estão relacionados com moléculas da sinalização neuronal, como já vem sido demonstrado: *GABRA1* (COSSETTE et al. 2002), *GABRG2* (MARINI et al., 2003). Outros candidatos são os genes relacionados com o desenvolvimento neural. E ainda existem muitos genes que não foram descritos que poderão se tornar alvos de estudo para epilepsia. Para a identificação desses genes envolvidos nas diferentes formas de EGI, os estudos de ligação e associação continuam sendo ferramentas muito importantes, e que, certamente, no futuro, nos auxiliarão a compreender melhor os mecanismos básicos das EGI.



***7- CONCLUSÕES***

1. Para a região 6p21, excluimos a possibilidade da existência de um gene maior, na região HLA, envolvido com a etiologia das EGI nos pacientes estudados; todavia, não conseguimos excluir totalmente essa possibilidade em uma porção mais centromérica da região do HLA.
2. Não encontramos evidências da presença de um gene maior localizado na região mais centromérica de 6p12.
3. Identificamos um possível *locus* candidato em uma região intermediária entre 6p21 e 6p12, onde encontramos associação positiva entre marcadores anônimos de DNA e o fenótipo em nossos pacientes com EMJ. Isso poderia indicar a presença de um gene, ou genes, de suscetibilidade ou modificador nessa região.
4. Excluimos a possibilidade de existência de um gene principal na região 5q34 responsável pela etiologia da EMJ e outras EGI estudadas, pelas análises de ligação, porém, os estudos de associação indicaram a presença de um possível gene de menor efeito na região.
5. Comprovamos que a mutação Ala322Asp do gene *GABRA1* não está presente nos pacientes estudados, sendo provavelmente, um raro evento, talvez exclusivo da família franco-canadense, portadora desta mutação.

Esse trabalho contribui para a melhor compreensão da biologia da EMJ e das outras formas de EGI, confirmando o conceito de doenças complexas e demonstrando heterogeneidade genética e herança poligênica entre as famílias estudadas.



***8- REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS***

- ANDERMANN, E. Genetic aspects of the epilepsies. In: Sakai, T.; Tsuboi, T. editors. **Genetic Aspects of Human Behavior**. Tokyo: Igaku-Shoin, 1985. p.129-45.
- ANDERSON, E.; BERKOVIK, S.; DULAC, O.; GARDINER, M.; JAIN, S.; LAUE-FRIIS, M. et al. ILAE genetics commission conference report: molecular analysis of complex genetic epilepsies. **Epilepsia**, 43(10): 1262-7, 2002.
- BAI, D.; ALONSO, M. E.; MEDINA, M. T.; BAILEY, J. N.; MORITA, R.; CORDOVA, S. et al. Juvenile myoclonic epilepsy: linkage to chromosome 6p12 in Mexico families. **Am J Med Genet**, 113: 268-74, 2002.
- BARNARD, N. T. J. **Statistical inference**. J R Statist Soc, B11: 115 – 39, 1949.
- BAULAC, S.; HUBERFELD, G.; GOURFINKEL-AN, I.; MITROPOULOU, G.; BERANGER, A.; PRUD'HOMME, J. F. et al. First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. **Nat Genet**, 28(1): 46-8, 2001.
- BIRD, T. D.; JARVIK, G. P.; WOOD, N. W. Genetic association studies: genes in search of diseases. **Neurology**, 57:1153-54, 2001.
- BLAND, M. Choosing the statistical method. In: **An introduction to medical statistics**, second edition. New York: Oxford University Press, 1995. p. 254-64.
- BORGES, M. A.; LI, L. M.; GUERREIRO, C. A. M.; YACUBIAN, E. M.; CORDEIRO, J. A.; TOGNOLA, W. A. et al. Urban Prevalence Of Epilepsy: Populational Study In São José Do Rio Preto - A Medium-Sized City In Brazil (*in press*).
- CHARLIER, C.; SINGH, N. A.; RYAN, S. G.; LEWIS, T. B.; REUS, B. E.; LEACH, R. J. et al. A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. **Nat Genet**, 18(1): 53-5, 1998.
- CHIOZA, B.; OSEI-LAH, A.; WILKIE, H.; NASHEF, L.; MCCORMICK, D.; ASHERSON, P. et al. Suggestive evidence for association of two potassium channel genes with different idiopathic generalised epilepsy syndromes. **Epilepsy Res**, 52(2): 107-16, 2002.



COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*, 30: 389-99, 1989.

COSSETTE, P.; LIU, L.; BRISEBOIS, K.; DONG, H.; LORTIE, A.; VANASSE, M. et al. Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet*, 31(2): 184-9, 2002.

DAWSON-SAUNDERS, B.; TRAPP, R. G. **Basic & Clinical Biostatistics**. Second edition. Connecticut: Appleton & Lange, 1994.

DE FALCO, F. A.; STRIANO, P.; DE FALCO, A.; STRIANO, S.; SANTANGELO, R.; PERRETI, A. et al. Benign adult familial myoclonic epilepsy: genetic heterogeneity and allelism with ADCME. *Neurology*, 60(8): 1381-5, 2003.

DELGADO-ESCUETA, A. V.; MEDINA, M. T.; SERRATOSA, J.M.; CASTROVIEJO, I. P.; GEE, M. N.; WEISSBECKER, K. et al. Mapping and positional cloning of common idiopathic generalized epilepsies: Juvenile Myoclonus Epilepsy and Childhood Absence Epilepsy. In: Delgado-Escueta, A. V.; Wilson, W. A.; Olsen, R. W.; Porter, R. J. editors. **Jasper's Basic Mechanisms of Epilepsies**, third edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 351-74.

DELGADO-ESCUETA, A. An Update on the Genetics of Juvenile Myoclonic Epilepsy. In: International Epilepsy Congress, 25, 2003, Lisboa. *Epilepsia*, 44(suppl 8) 2003, 21p.

DURNER, M.; SANDER, T.; GREENBERG, D. A.; JOHNSON, K.; BECKMANNAGETTA, G.; JANZ, D. Localization of idiopathic generalized epilepsy on chromosome 6p in families of juvenile myoclonic epilepsy patients. *Neurology*, 41(10): 1651-5, 1991.

DURNER, M.; ZHOU, G.; FU, D.; ABREU, P.; SHINNAR, S.; RESOR, S. R. et al. Evidence of linkage of adolescent-onset idiopathic generalized epilepsies to chromosome 8- and genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet*, 64: 1411-19, 1999.

DURNER, M.; SHINNAR, S.; RESOR, S. R.; MOSHE, S. L.; ROSENBAUM, D.; COHEN, J. et al. No evidence for a major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q. **Am J Med Genet**, 96(1): 49-52, 2000.

DURNER, M.; KEDDACHE, M. A.; TOMASINI, L.; SHINNAR, S.; RESOR, S. R.; COHEN, J. et al. Genome scan of idiopathic generalized epilepsy: evidence for major susceptibility gene and modifying genes influencing the seizure type. **Ann Neurol**, 49(3): 328-35. 2001.

ELMSLIE, F. V.; WILLIAMSON, M. P.; REES, M.; KERR, M.; KJELDSEN, M. J.; PANG, K. A. et al. Linkage analysis of juvenile myoclonic epilepsy and microsatellite loci spanning 61 cM of human chromosome 6p in 19 nuclear pedigrees provides no evidence for a susceptibility locus in this region. **Am J Hum Genet**, 59(3): 653-63, 1996.

ELMSLIE, F. V.; REES, M.; WILLIAMSON, M. P.; KERR, M.; KJELDSEN, M. J.; PANG, K. A. et al. Genetic mapping of a major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q. **Hum Mol Genet**, 6(8): 1329-34, 1997.

ENGEL, J. Jr. A proposed Diagnostic Scheme for People with Epileptic Seizures and with Epilepsy: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. **Epilepsia**, 42(6): 1-8, 2001.

ENSEMBL - NCBI - *National Center for Biotechnology Information*. Desenvolvido pela National Institute of Health, NHI in EUA. Disponível em: <[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/exonview?transcript=ENST00000023897&db=core](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/exonview?transcript=ENST00000023897&db=core)> Acesso em 01 ago. 2002.

ESCAYG, A.; MACDONALD, B. T.; MEISLER, M. H.; BAULAC, S.; HUBERFELD, G.; AN-GOURFINKEL, I. et al. Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. **Nat Genet**, 24(4): 343-5, 2000.

FERNANDES, J. G.; SCHMIDT, M. I.; TOZZI, S.; SANDER, J. W. A. S. Prevalence of epilepsy: the Porto Alegre study. **Epilepsia**, 33(3): 132, 1992.

FONG, G. C.; SHAH, P. U.; GEE, M. N.; SERRATOSA, J. M.; CASTROVIEJO, I. P.; KHAN, S. et al. Childhood absence epilepsy with tonic-clonic seizures and electroencephalogram 3-4-Hz spike and multispikes-slow wave complexes: linkage to chromosome 8q24. **Am J Hum Genet**, 63(4): 1117-29, 1998.

GAMBARDELLA, A.; MANNA, I.; LABATE, A.; CHIFARI, R.; LA RUSSA, A.; SERRA, P. et al. GABA(B) receptor 1 polymorphism (G1465A) is associated with temporal lobe epilepsy. **Neurology**, 60(4): 560-3, 2003.

GOODWIN, H.; CURRAN, N.; CHIOZA, B.; BLOWER, J.; NASHEF L.; ASHERSON, P. et al. No association found between polymorphisms in genes encoding mGluR7 and mGluR8 and idiopathic generalised epilepsy in a case control study. **Epilepsy Res**, 39: 27-71, 2000.

GREENBERG, D. A.; DELGADO-ESCUETA, A. V.; WIDELITZ, H.; SPARKES, R. S.; TREIMAN, L.; MALDONADO, H. M. et al. Juvenile myoclonic epilepsy (JME) may be linked to the BF and HLA loci on human chromosome 6. **Am J Med Genet**, 31(1): 185-92, 1988.

GREENBERG, D. A.; DONESHKA, P. Partitioned association-linkage test: distinguishing "necessary" from "susceptibility" loci. **Genetic Epidemiology**, 13(3): 243-52, 1996a.

GREENBERG, D. A.; DURNER, M.; SHINNAR, S.; RESOR, S.; ROSENBAUM, D.; KLOTZ, I. et al. Association of HLA class II alleles in patients with juvenile myoclonic epilepsy compared with patients with other forms of adolescent-onset generalized epilepsy. **Neurology**, 47: 750-5, 1996b.

GREENBERG, D. A.; DURNER, M.; KEDDACHE, M.; SHINNAR, S.; RESOR, S. R.; MOSHE, S. L. et al. Reproducibility and complications in gene searches: linkage on chromosome 6, heterogeneity, association, and maternal inheritance in juvenile myoclonic epilepsy. **Am J Hum Genet**, 66:508-16, 2000

GUIPPONI, M.; THOMAS, P.; GIRARD-REYDET, C.; FEINGOLD, J.; BALDY-MOULINIER, M.; MALAFOSSE, A. Lack of association between juvenile myoclonic epilepsy and GABRA5 and GABRB3 genes. **Am J Med Genet**, 74(2): 150-3, 1997.

HALLMANN, K.; DURNER, M.; SANDER, T.; STEINLEIN, O. K. Mutation analysis of the inwardly rectifying K(+) channels KCNJ6 (GIRK2) and KCNJ3 (GIRK1) in juvenile myoclonic epilepsy. **Am J Med Genet**, 96(1): 8-11, 2000.

HAUG, K.; KREMERSKOTHEN, J.; HALLMANN, K.; SANDER, T.; DULLINGER, J.; RAU, B. et al. Mutation screening of the chromosome 8q24.3-human activity-regulated cytoskeleton-associated gene (ARC) in idiopathic generalized epilepsy. **Mol Cell Probes**, 14(4): 255-60, 2000.

HAUG, K.; HALLMANN, K.; REBSTOCK, J.; DULLINGER, J.; MUTH, S.; HAVERKAMP, F. et al. The voltage-gated sodium channel gene SCN27A and idiopathic generalized epilepsy. **Epilepsy Res**, 47(3): 243-6, 2001.

HAUG, K.; WARNSTEDT, M.; ALEKOV, A. K.; SANDER, T.; RAMIREZ, A.; POSER, B. Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. **Nat Genet**, 33(4): 527-32, 2003.

HAUSER, W.; ORTEGA, R.; ZARELLI, M. The prevalence of epilepsy in a rural Mexican Village. **Epilepsia**, 31: 604, 1990a.

HAUSER, W.; HESDORFFER, D. C. **Epilepsy: frequency, causes and consequence**. New York: Demos, 1990b.

HAUSER, W.; ANNEGERS, J. F.; KURLAND L. T. Prevalence of epilepsy in Rochester, Minnesota, 1940-1980. **Epilepsia**, 32: 429-45, 1991.

IZZI, C.; BARBON, A.; KRETZ, R.; SANDER, T.; BARLATI, S. Sequencing of the GRIK1 gene in patients with juvenile absence epilepsy does not reveal mutations affecting receptor structure. **Am J Med Genet**, 114(3): 354-9, 2002.

IZZI, C.; BARBON, A.; TOLIAT, M. R.; HEILS, A.; BECKER, C.; NURNBERG, P. et al. Candidate gene analysis of the human metabotropic glutamate receptor type 4 (GRM4) in patients with juvenile myoclonic epilepsy. **Am J Med Genet**, 123B(1): 59-63, 2003.

JANZ, D.; CHRISTIAN, W. Impulsiv-Petit mal. **Dtsch Z Nervenheilk**, 176: 348-86, 1957.

KALACHIKOV, S.; EVGRAFOV, O.; ROSS, B.; WINAWER, M.; BAKER-CUMMINGS, C.; BONESHI, F. M. et al. Mutations in *LGII* cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. **Nat Genet**, 30: 335-341, 2002.

KANANURA, C.; SANDER, T.; RAJAN, S.; PREISIG-MULLER, R.; GRZESCHIK, K.H.; DAUT, J. et al. Tandem pore domain K(+)-channel TASK-3 (KCNK9) and idiopathic absence epilepsies. **Am J Med Genet**, 114(2): 227-9, 2002.

KAPOOR, A.; VIJAI, J.; RAVISHANKAR, H. M.; SATISHCHANDRA, P.; RADHAKRISHNAN, K.; ANAND, A. Absence of GABRA1 Ala322Asp mutation in juvenile myoclonic epilepsy families from India. **J Genet**, 82(1-2): 17-21, 2003.

KJELDSEN, M. J.; KYVIK, K. O.; CHRISTENSEN, K.; FRIIS, M. L. Genetic and environmental factors in epilepsy: a population-based study of 11900 Dani+3,00 sh twin pairs. **Epilepsy Res**, 44(2-3): 167-78, 2001.

KOBAYASHI, E.; SANTOS, N. F.; TORRES, F. R.; SECOLIN, R.; SARDINHA, L. A. et al. Magnetic resonance imaging abnormalities in familial temporal lobe epilepsy with auditory auras. **Arch Neurol**, 60 (11): 1546-1551, 2003.

LANDER, E. S.; SCHORK, N. J. Genetic dissection of complex traits. **Science**, 256: 2037-48, 1994.

LATHROP, G. M.; LALOUEL, J. M.; JULIER, C.; OTT, J. Strategies for multilocus linkage analysis in humans. **Proc Natl Acad Sci**, 81(11): 3443-6, 1984.

LE HELLARD, S.; NEIDHART, E.; THOMAS, P.; FEINGOLD, J.; MALAFOSSE, A.; TAFTI, M. Lack of association between juvenile myoclonic epilepsy and HLA-DR13. **Epilepsia**, 40(1):117-19, 1999.

LENNOX, W. G. Heredity of epilepsy as told by relatives and twins. **JAMA**, 146: 529-36, 1951.

LENNOX, W. G. **Epilepsy and related disorders**. Boston: Little Brown Company, 1960. v.1 e 2.

LEPPIK, I. O. Classification of the Myoclonic Epilepsies. **Epilepsia**, 44(suppl.11): 2-6, 2003.

LIU, A. W.; DELGADO-ESCUETA, A. V.; SERRATOSA, J. M.; ALONSO, M. E.; MEDINA, M. T.; GEE, M. N. et al. Juvenile myoclonic epilepsy locus in chromosome 6p21.2-p11: linkage to convulsions and electroencephalography trait. **Am J Hum Genet**, 57(2): 368-81, 1995.

LIU, A. W.; DELGADO-ESCUETA, A. V.; GEE, M. N.; SERRATOSA, J. M.; ZHANG, Q. W.; ALONSO, M. E. et al. Juvenile myoclonic epilepsy in chromosome 6p12-11: locus heterogeneity and recombinations. **Am J Med Genet**, 63: 438-46, 1996.

LOCUS LINK – NCBI - *National Center for Biotechnology Information*. Desenvolvido pela National Institute of Health, NHI in EUA. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/>> Acesso em 26 jan. 2004.

LOISEAU, P.; PESTRE, M.; DARTIGUES, J. F.; COMMENGES, D.; BARBEGER-GATEAU, C.; COHADON, S. Long term prognosis in two forms of childhood epilepsy: typical absence seizures and epilepsy with rolandic (centrotemporal) EEG foci. **Ann Neurol**, 13: 642-8, 1983.

LOPES-CENDES, I. Bases Genéticas e Moleculares das Epilepsias. In: Costa, J. C.; Palmira, A.; Yacubian, E. M. T. **Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias**. São Paulo: Lemos Editorial, 1998. p. 481-94.

LOPES-CENDES, I. Genética e Síndromes Epilépticas Familiares. In: Guerreiro, C. A. M.; Guerreiro, M. M.; Cendes, F.; Lopes-Cendes, I. **Epilepsia**, terceira edição. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. p. 71-4.

MAP VIEWER - NCBI - *National Center for Biotechnology Information*. Desenvolvido pela National Institute of Health, NHI in EUA. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi>>. Acesso durante os anos de 2002 e 2003.

MARINO, J. R. R.; CUKIERT, A.; PINHO, E. Aspectos epidemiológicos da epilepsia em São Paulo. **Arq Neuropsiquiatr**, 44: 243-54, 1986.

MARINI, C.; HARKIN, L. A.; WALLACE, R. H.; MULLEY, J. C.; SCHEFFER, I. E.; BERKOVIC, S. F. Childhood absence epilepsy and febrile seizures: a family with a GABA(A) receptor mutation. **Brain**, 126(pt 1): 230-40, 2003.

MEISLER, H. M.; KEARNEY, J.; OTTMAN, R.; ESCAYG, A. Identification of epilepsy genes in human and mouse. **Annu Rev Genet**, 35: 567-88, 2001.

METRAKOS, J. D.; METRAKOS, K. Genetics of convulsive disorders: II-Genetic and electroencephalographic studies in centrencephalic epilepsy. **Neurology**, 11: 474-83, 1961.

MIKAMI, M.; YASUDA, T.; TERAQ, A.; NAKAMURA, M.; UENO, S.; TANABE, H. et al. Localization of a gene for benign adult familial myoclonic epilepsy to chromosome 8q23.3-q24.1. **Am J Hum Genet**, 65(3): 745-51, 1999.

MORTON, N. E. Sequential tests for the detection of linkage. **Am J Hum Genet**, 7: 277-318, 1955.

NEWMARK, M. E.; PENRY, J. K. editors. **Genetics of epilepsy: a review**. New York: Raven Press, 1984. p. 122.

OBEID, T.; EL RAB, M. O.; DAIF, A. K.; PANAYIOTOPOULOS, C. P.; HALIM, K.; BAHAKIM, H. et al. Is HLA-DRW13 (W6) associated with juvenile myoclonic epilepsy in arab patients? **Epilepsia**, 35(2): 319-21, 1994.

OLAFSSON, E.; HAUSER, W.; LUDVIGSSON, P.; GUDMUNDSSON, G. Incidence and prevalence of epilepsy in rural Iceland. **Epilepsia**, 37(10): 951-5, 1996.

OTT, J. **Analysis of human genetic linkage**. Rev. ed. Maryland: Johns Hopkins, 1991. p. 54 – 108.

PAL, D. K.; EVGRAFOV, O. V.; TABARES, P.; ZHANG, F.; DURNER, M.; GREENBERG, D. A. BRD2 (RING3) is a probable major susceptibility gene for common juvenile myoclonic epilepsy. **Am J Hum Genet**, 73(2): 261-70, 2003.

REES, M.; CURTIS, D.; PARKER, K.; SUNDQVIST, A.; BARALLE, D.; BESPALOVA, I. N. et al. Linkage analysis of idiopathic generalised epilepsy in families of probands with Juvenile Myoclonic Epilepsy and marker loci in the region of EPM 1 on chromosome 21 q: Unverricht-Lundborg disease and JME are not allelic variants. **Neuropediatrics**, 25(1): 20-5, 1994.

ROWLAND, L. P. The first decade of molecular genetics in neurology: changing clinical thought and practice. **Ann Neurol**, 32: 207-14, 1992.

SAKAMOTO, A. C.; GARZON, E.; FERNANDES, R. M. F. EEG nas epilepsias e síndromes epilépticas. In: Guerreiro, C. M.; Guerreiro, M. M.; Cendes, F.; Cendes, I. L., editores. **Epilepsia**, terceira edição. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. p. 81-104.

SANDER, T.; HILDMANN, T.; JANZ, D.; WIENKER, T. F.; BIANCHI, A.; BAUER, G. et al. Exclusion of linkage between idiopathic generalized epilepsies and the GABAA receptor alpha 1 and gamma 2 subunit gene cluster on chromosome 5. **Epilepsy Res**, 23(3): 235-44, 1996.

SANDER, T.; KRETZ, R.; WILLIAMSON, M. P.; ELMSLIE, F.V.; REES, M.; HILDMANN, T. et al. Linkage analysis between idiopathic generalized epilepsies and the GABA(A) receptor alpha5, beta3 and gamma3 subunit gene cluster on chromosome 15. **Acta Neurol Scand**, 96(1): 1-7, 1997a.

SANDER, T.; HILDMANN, T.; KRETZ, R.; FURST, R.; SAILER, U.; BAUER, G. et al. Allelic association of juvenile absence epilepsy with a GluR5 kainate receptor gene (GRIK1) polymorphism. **Am J Med Genet**, 74(4): 416-21, 1997b.

SANDER, T.; BOCKENKAMP, B.; HILDMANN, T.; BLASCZYK, R.; KRETZ, R.; WIENKER, T. F. et al. Refined mapping of the epilepsy susceptibility locus EJM1 on chromosome 6. **Neurology**, 49(3): 842-7, 1997c.

SANDER, T.; KRETZ, R.; SCHULZ, H.; SAILER, U.; BAUER, G.; SCARAMELLI, A. et al. Replication analysis of a putative susceptibility locus (EGI) for idiopathic generalized epilepsy on chromosome 8q24. **Epilepsia**, 39(7): 715-20, 1998.



SANDER, T.; SCHULZ, H.; VIEIRA-SAEKER, A. M.; BIANCHI, A.; SAILER, U.; BAUER, G. et al. Evaluation of a putative major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q14. **Am J Med Genet**, 88(2): 182-7, 1999.

SANDER, T.; SCHULZ, H.; SAAR, K.; GENNARO, E.; RIGGIO, M. C.; BIANCHI, A. et al. Genome search for susceptibility loci of common idiopathic generalised epilepsies. **Hum Mol Genet**, 9(10): 1465-72, 2000a.

SANDER, T.; BERLIN, W.; GSCHEIDEL, N.; WENDEL, B.; JANZ, D.; HOEHE, M. R. et al. Genetic variation of the human  $\mu$ -opioid receptor and susceptibility to idiopathic absence epilepsy. **Epilepsy Res**, 39: 57-61, 2000b.

SANDER, T.; TOLIAT, M. R.; HEILS, A.; LESCHIK, G.; BECKER, C.; RUSCHENDORF, F. et al. Association of the 867Asp variant of the human anion exchanger 3 gene with common subtypes of idiopathic generalized epilepsy. **Epilepsy Res**, 51(3): 249-55, 2002a.

SANDER, T.; WINDEMUTH, C.; SCHULZ, H.; SAAR, K.; GENNARO, E.; BIANCHI, A. et al. No evidence for a susceptibility locus for idiopathic generalized epilepsy on chromosome 18q21.1. **Am J Med Genet**, 114(6): 673-8, 2002b.

SANDER, T.; WINDEMUTH, C.; SCHULZ, H.; SAAR, K.; GENNARO, E.; RIGGIO, C. et al. Exploration of a putative susceptibility locus for idiopathic generalized epilepsy on chromosome 8p12. **Epilepsia**, 44(1): 32-9, 2003.

SANO, A.; MIKAMI, M.; NAKAMURA, M.; UENO, S.; TANABE, H.; KANEKO, S. Positional candidate approach for the gene responsible for benign adult familial myoclonic epilepsy. **Epilepsia**, 43(suppl 9): 26-31, 2002.

SCHEFFER, I. E.; BERKOVIC, S. F. The genetics of human epilepsy. **Trends Pharmacol Sci**, 24(8): 428-33, 2003.

SERRATOSA, J. M.; DELGADO-ESCUETA, A. V.; MEDINA, M. T.; ZHANG, Q.; IRANMANESH, R.; SPARKES, R. S. Clinical and genetic analysis of a large pedigree with juvenile myoclonic epilepsy. **Ann Neurol**, 39(2): 187-95, 1996.

SERRATOSA, J. M. Idiopathic epilepsies with a complex mode of inheritance. **Epilepsia**, 40(suppl 3): 12-6, 1999.

SHEFFIELD, V. C.; BECK, J. S.; KWITEK, A. E.; SANDSTROM, D. W.; STONE, E. M. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. **Genomics**, 16(2): 325-32, 1993.

SILVA, A. E. S. M.; GUERREIRO, M. M. Epilepsias benignas da infância. In: Guerreiro, C. A. M.; Guerreiro, M. M.; Cendes, F.; Lopes-Cendes, I. **Epilepsia**, terceira edição. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. p. 183-92.

SINGH, N. A.; CHARLIER, C.; STAUFFER, D.; DUPONT, B. R.; LEACH, R. J.; MELIS, R. et al. A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. **Nat Genet**, 18(1): 25-9, 1998.

SNP - NCBI - *National Center for Biotechnology Information*. Desenvolvido pela National Institute of Health, NHI in EUA. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=2279020](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=2279020)> Acesso em 18 ago. 2003.

STEINLEIN, O. K.; MULLEY, J. C.; PROPPING, P.; WALLACE, R. H.; PHILLIPS, H. A.; SUTHERLAND, G. R. et al. A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. **Nat Genet**, 11(2): 201-3, 1995.

STEINLEIN, O. K.; NEUBAUER, B. A.; SANDER, T.; SONG, L.; STOODT, J.; MOUNT, D. B. Mutation analysis of the potassium chloride cotransporter KCC3 (SLC12A6) in rolandic and idiopathic generalized epilepsy. **Epilepsy Res**, 44(2-3): 191-5, 2001.

STRACHAN, T.; READ, A. R. Mapeamento genético de caracteres complexos. In: STRACHAN, T.; READ, A. R. **Genética Molecular Humana**, segunda edição. Porto Alegre: Artmed Editora, 2002. p. 283-94.

SUGAWARA, T.; MAZAKI-MIYAZAKI, E.; ITO, M.; NAGAFUJI, H.; FUKUMA, G.; MITSUDOME, A. et al. Nav1.1 mutations cause febrile seizures associated with afebrile partial seizures. **Neurology**, 57(4): 703-5, 2001.

SUGIMOTO, Y.; MORITA, R.; AMANO, K.; FONG, C. Y.; SHAH, P. U.; CASTROVIEJO, I. P. et al. Childhood absence epilepsy in 8q24: refinement of candidate region and construction of physical map. **Genomics**, 15; 68(3): 264-72, 2000.

SUGIMOTO, Y.; MORITA, R.; AMANO, K.; SHAH, P. U.; PASCUAL-CASTROVIEJO, I.; KHAN, S. et al. T-STAR gene: fine mapping in the candidate region for childhood absence epilepsy on 8q24 and mutational analysis in patients. **Epilepsy Res**, 46(2): 139-44, 2001.

SUZUKI, T.; DELGADO-ESCUETA, A. V.; ALONSO, M. A.; MORITA, R.; MEDINA, M. T.; GANESH, S. et al. Juvenile Myoclonic Epilepsy: Mutations and Variants in a Gene That Encodes a Protein with EF-Hand. In: Annual Meeting of the American Academy of Neurology, 21, 2003, Honolulu. **Neurology**, 60 (suppl. 1) 2003, A91-92p.

SVEJGAARD, A.; RYDER, L. P. HLA and disease associations: detecting the strongest association. **Tissue Antigens**, 43: 18-27, 1994.

TASKE, N. L.; WILLIAMSON, M. P.; MAKOFF, A.; BATE, L.; CURTIS, D.; KERR, M. et al. Evaluation of the positional candidate gene CHRNA7 at the juvenile myoclonic epilepsy locus (EJM2) on chromosome 15q13-14. **Epilepsy Res**, 49(2): 157-72, 2002.

TERWILLINGER, J. D.; OTT, J. **Handbook of human genetic linkage**. Maryland: Johns Hopkins, 1993.

THOMPSON, M. W.; McINNES R. R.; HUNTINGTON F. W. O mapa de genes humanos: mapeamento gênico e análise de ligações. In: THOMPSON, M. W.; McINNES R. R.; HUNTINGTON F. W. **Genética Médica**, quinta edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p. 115-37.

WALLACE, R. H.; WANG, D. W.; SINGH, R.; SCHEFFER, I. E.; GEORGE, A. L. Jr.; PHILLIPS, H. A. et al. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na<sup>+</sup>-channel beta1 subunit gene SCN1B. *Nat Genet*, 19(4): 366-70, 1998.

WEISSBECKER, K. A.; DURNER, M.; JANZ, D.; SCARAMELLI, A.; SPARKES, R. S.; SPENCE, M. A. Confirmation of linkage between juvenile myoclonic epilepsy locus and the HLA region of chromosome 6. *Am J Med Genet*, 38(1): 32-6, 1991.

WEISSBECKER, K. A.; ELSTON, R. C.; GREENBERG, D.; DELGADO-ESCUETA, A. V. Genetic epidemiology and the search for epilepsy genes. *Adv Neurol*, 79: 323-40, 1999.

WHITEHOUSE, W. P.; REES, M.; CURTIS, D.; SUNDQVIST, A.; PARKER, K.; CHUNG, E. et al. Linkage analysis of idiopathic generalized epilepsy (IGE) and marker loci on chromosome 6p in families of patients with juvenile myoclonic epilepsy: no evidence for an epilepsy locus in the HLA region. *Am J Hum Genet*, 53(3): 652-62, 1993.

WILKIE, H.; OSEI-LAH, A.; CHIOZA, B.; NASHEF, L.; MCCORMICK, D.; ASHERSON, P. et al. Association of mu-opioid receptor subunit gene and idiopathic generalized epilepsy. *Neurology*, 59(5): 724-8, 2002.

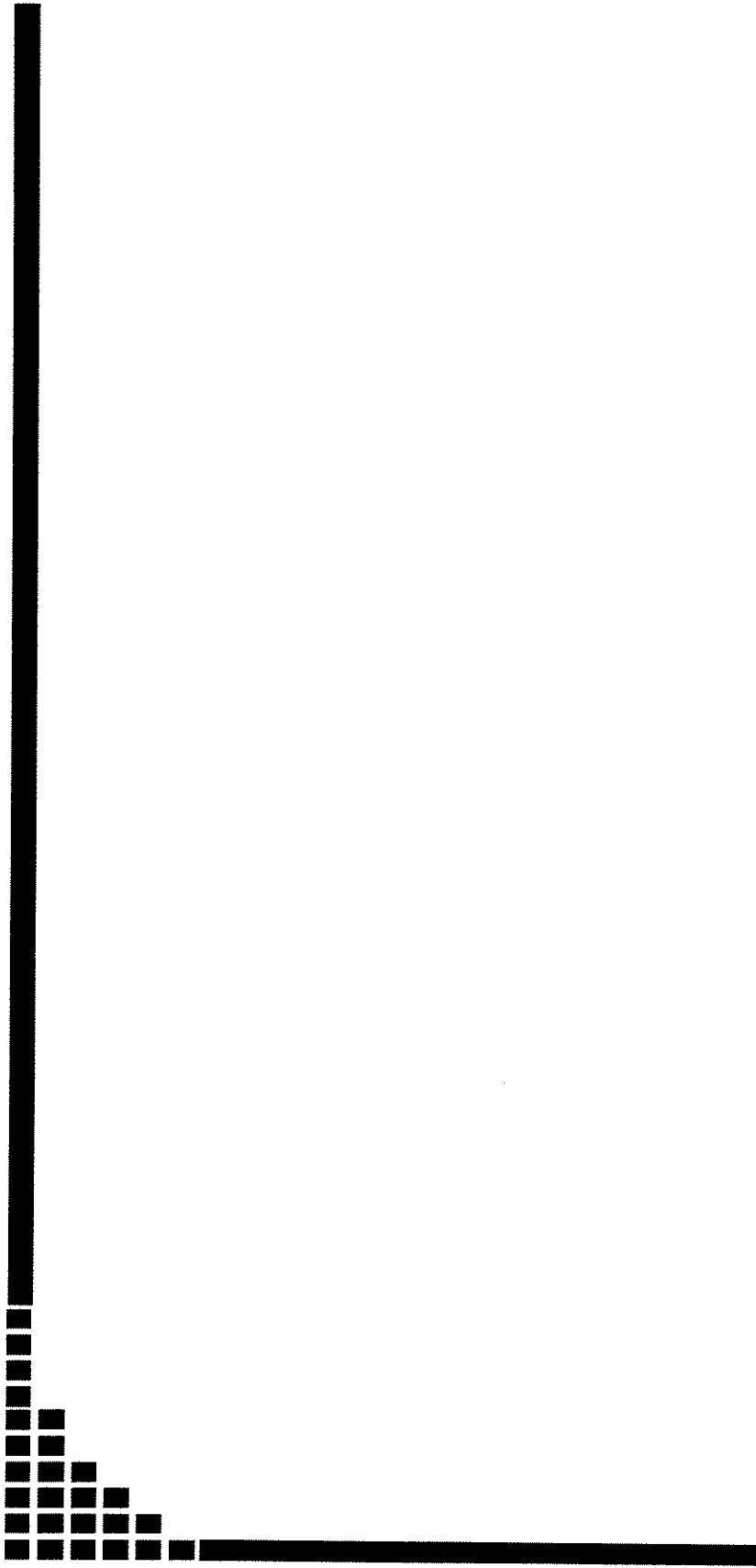
WINDEMUTH, C.; SCHULZ, H.; SAAR, K.; GENNARO, E.; BIANCHI, A.; ZARA, F. et al. No evidence for a susceptibility locus for idiopathic generalized epilepsy on chromosome 5 in families with typical absence seizures. *Epilepsy Res*, 51(1-2): 23-9, 2002.

YACUBIAN, E. M. T. Epilepsia mioclônica juvenil. In: Guerreiro, C. A. M.; Guerreiro, M. M.; Cendes, F.; Lopes-Cendes, I. *Epilepsia*, terceira edição. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. p. 215-22.

ZARA, F.; LABUDA, M.; GAROFALO, P. G. et al. Unusual EEG pattern linked to chromosome 3p in a family with idiopathic generalized epilepsy. *Neurology*, 51(2): 493-8, 1998.

ZARA, F.; GENNARO, E.; STABILE, M.; CARBONE, I.; MALACARNE, M.; MAJELLO, L. et al. Mapping of a locus for a familial autosomal recessive idiopathic myoclonic epilepsy of infancy to chromosome 16p13. **Am J Hum Genet**, 66(5): 1552-7, 2000.

ZIELINSKI, J. J. Epidemiology of epilepsy. In: Laidlaw, J.; Richens, A.; Oxley, J. (editors) **A Textbook of Epilepsy**, third edition. New York: Churchill Livingstone, 1988. p. 21-48.



**9- ANEXOS**

***ANEXO 1***

***Aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da FCM – UNICAMP***



---

**PARECER N° 006/98 - CEP/FCM**

**PESQUISA:** LOCALIZAÇÃO DE GENES QUE PREDISPÕEM A EPILEPSIA  
IDIOPÁTICA GENERALIZADA E PARCIAL

**PESQUISADOR:** Iscia Lopes Cendes

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores, aprova a Pesquisa supracitada por estarem contempladas as Resoluções 196/96 e 251/97.

CEP/FCM, 06/02/98.



PROF. DR. FORTUNATO ANTONIO BADAN PALHARES  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP



## ***ANEXO 2***

***Termo de consentimento livre e esclarecido para coleta de sangue e  
realização da pesquisa***



## FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 1 de 3

Título do projeto: Estudos Genéticos em Epilepsia

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

### OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidado (a) a participar em um projeto de pesquisa envolvendo pacientes e famílias de indivíduos com epilepsia. O objetivo geral do estudo é o de isolar genes responsáveis por essa doença através de métodos de genética molecular. A identificação desses genes pode eventualmente melhorar o diagnóstico e levar a um melhor tratamento dessa doença. Tanto as amostras de DNA, de linhas celulares e a informação médica a meu respeito bem como a respeito de minha família que forem obtidas para esse estudo, poderão ser compartilhadas com outros pesquisadores que trabalham com epilepsia. Podendo assim ser utilizadas eventualmente para outros fins de pesquisa sobre as epilepsias. O sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

### PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e familiares. Eu serei submetido a um exame físico neurológico para estabelecer meu estado clínico. Além disso, poderei ser submetido a um eletroencefalograma (EEG) e talvez uma tomografia computadorizada ou uma ressonância magnética de crânio. Uma amostra de sangue venoso será colhida (20 a 30 ml, o equivalente a duas colheres de sopa). Hospitalização não será necessária. Os procedimentos mencionados acima, com exceção da coleta da amostra de sangue, fazem parte dos cuidados médicos de rotina para um paciente com epilepsia. Os procedimentos mencionados acima serão realizados dentro dos primeiros 6 meses após o meu consentimento em participar no estudo, porém a pesquisa laboratorial utilizando as amostras de sangue poderão ser feitas durante um período máximo de 30 anos após a coleta. As células que por ventura forem isoladas do meu sangue serão preservadas para utilização durante todo o estudo e depois que ele se completar serão destruídas.

### RISCO E DESCONFORTO:

Uma coleta de 20 a 30 ml de sangue venoso será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizada por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.



## FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 2 de 3

Título do projeto: Estudos Genéticos em Epilepsia

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

### VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação nesse estudo e que o meu diagnóstico e o meu tratamento provavelmente não serão modificados. Contudo, os resultados desse estudo podem, a longo prazo, oferecer vantagens para os indivíduos com epilepsia e suas famílias, possibilitando um melhor diagnóstico e tratamento mais adequado. É importante notar que o diagnóstico pré-sintomático não faz parte dessa pesquisa, mas se eu desejar obter orientação genética, ela será oferecido nos ambulatórios do serviço de genética clínica do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), tel. (019) 788-8908.

### SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, mas não os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, farão parte do meu prontuário médico e serão submetidos aos regulamentos do HC- UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica.

Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

### FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Eu entendo que posso requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. A Dra. Iscia Lopes Cendes, tel (019) 788-8907 estará disponível para responder minhas questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contactar a secretaria da comissão de ética da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (019) 788-7232.

### RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue) sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC- UNICAMP. Eu reconheço também que a Dra. Iscia Lopes Cendes pode interromper a minha participação nesse estudo a qualquer momento que julgar apropriado.



**FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 3 de 3**

Título do projeto: Estudos Genéticos em Epilepsia

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

Eu confirmo que o(a) Dr(a). \_\_\_\_\_  
me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos, desconforto e possíveis vantagens advindas desse projeto de pesquisa. Eu li/e ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

\_\_\_\_\_  
Nome do participante ou responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante ou responsável

\_\_\_\_\_  
data

\_\_\_\_\_  
Nome da testemunha

\_\_\_\_\_  
Assinatura da testemunha

\_\_\_\_\_  
data

**RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:**

Eu expliquei a \_\_\_\_\_  
o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador ou associado

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador ou associado

\_\_\_\_\_  
data

### ***ANEXO 3***

***Formulários de encaminhamento de amostras de sangue e clínico para  
avaliação dos pacientes***



**ENCAMINHAMENTO DE AMOSTRAS DE SANGUE PARA O LABORATÓRIO DE  
GENÉTICA MOLECULAR**

**Seguir as instruções para coleta de amostras de sangue para extração direta de DNA e contactar o laboratório de genética molecular para obter autorização para a coleta (ramal: 88902).**

Data da coleta: \_\_\_\_\_ Nome do paciente: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Filho de consanguíneos: ( ) sim ( ) não

Origem étnica dos avós: Maternos: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_ Paternos: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_

HC: \_\_\_\_\_

Registro no Dep. de Genética Médica (DGM): \_\_\_\_\_

Ambulatório: \_\_\_\_\_

Docente Responsável: \_\_\_\_\_

Diagnóstico Clínico: \_\_\_\_\_

Resumo da história clínica e exame físico (incluir idade de início dos sintomas):

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Heredograma: Sexo feminino  Sexo masculino

Clinicamente afetado   Possivelmente afetado

Indivíduo cuja amostra foi colhida →



UNICAMP

**Universidade Estadual de Campinas**  
Departamento de Genética Médica

**FORMULÁRIO PARA AVALIAÇÃO CLÍNICA DE PACIENTES COM EPILEPSIA GENERALIZADA  
IDIOPÁTICA**

Centro clínico: \_\_\_\_\_ HC: \_\_\_\_\_  
 Nome: \_\_\_\_\_ Data da consulta: \_\_\_\_\_  
 Data de nascimento: \_\_\_\_\_ Número no heredograma: \_\_\_\_\_  
 Origem étnica dos quatro avós: Maternos: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ Paternos: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
 Status clínico: \_\_\_\_\_ (afetado, possivelmente afetado, não afetado)

Classificação da síndrome epiléptica\*: \_\_\_\_\_

**Interrogatório complementar (se "positivo", informe a idade na qual ocorreu)**

- Crises febris: \_\_\_\_\_ Trauma de crânio: \_\_\_\_\_
- Outras condições neurológicas: \_\_\_\_\_
- Outras condições médicas: \_\_\_\_\_

**Medicação :**

- Drogas anticonvulsivantes: (informe dose diária e por quanto tempo o paciente vem tomando) \_\_\_\_\_
- Outras: \_\_\_\_\_

**Características clínicas da epilepsia:**

- Idade do início das crises (afebris): \_\_\_\_\_
- Tipos de crise:
 

	Não	Sim
2.1. Ausências:	_____	_____
2.2. Mioclônias:	_____	_____
2.3. Tônico-clônicas generalizadas:	_____	_____
2.4. Outras:	_____	

**Exame neurológico:** Normal: \_\_\_\_\_ Anormal: \_\_\_\_\_ Especificar a anormalidade: \_\_\_\_\_

**EEG inter-ictal:**

- Normal: \_\_\_\_\_
- Ponta-onda generalizada entre 2.5 - 3.5 Hz: \_\_\_\_\_
- Ponta-onda generalizada < 2.5 Hz: \_\_\_\_\_
- Ponta-onda generalizada > 3.5 Hz: \_\_\_\_\_
- Outras anormalidades epileptiformes: Generalizadas: \_\_\_\_\_ Focais: \_\_\_\_\_
- Alterações do ritmo de base: Difusas: \_\_\_\_\_ Focais: \_\_\_\_\_

**EEG Ictal (se disponível):**

- Generalizado: \_\_\_\_\_
- Focal: \_\_\_\_\_ Localização: \_\_\_\_\_

**CT ou RM:** Normal: \_\_\_\_\_ Anormal: \_\_\_\_\_ Especificar a anormalidade: \_\_\_\_\_

\* De acordo com: Commission on Classification and Terminology of the International League against Epilepsy (1989) Proposal for revised classification of epilepsy and epileptic syndromes. *Epilepsia* 30, 389-399.

## ***ANEXO 4***

***Artigos trabalhos ou em elaboração durante a realização desse trabalho***



***ARTIGO 1***

***Aspectos Genéticos da Epilepsia Mioclônica Juvenil: Consenso e  
Controvérsia***

Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology

(no prelo)

## Aspectos Genéticos da Epilepsia Mioclônica Juvenil: Consenso e Controvérsia

Patrícia Aline Oliveira Ribeiro\*, Neide Ferreira dos Santos\*\*, Fernando Cendes\*\*\*,  
Ischia Lopes-Cendes\*\*\*\*

Departamento de Genética Médica – Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil

### RESUMO

A Epilepsia Mioclônica Juvenil (EMJ) é uma das formas mais comuns de epilepsia generalizada e representa 10 a 30% de todas as epilepsias. Embora o reconhecimento de que fatores genéticos estão envolvidos nas epilepsias, a identificação de genes que predis põem a doença tem sido dificultada pelo fato destas serem doenças complexas, ou seja a correspondência entre o genótipo e fenótipo não é completa. Apesar da EMJ ter sido a primeira síndrome epiléptica a ter um *locus* mapeado, a localização de um ou mais *loci* para a EMJ permanece ainda uma questão controversa. Até o momento, foram mapeados três principais *loci* candidatos para EMJ: 15q14, 6p21, 6p12-p11; no entanto, nenhum gene nestas regiões foi identificado como o responsável pela doença. Além desses *loci*, foi identificada uma mutação no gene *GABRA1* localizado na posição 5q34, em uma única família franco-canadense com EMJ. Os diferentes *loci* encontrados e as várias contradições entre as publicações, provavelmente, se devem a fatores, tais como: diferença nos parâmetros adotados para o cálculo do *lod score*, a provável presença de heterogeneidade genética, as diferenças étnicas entre os grupos estudados e a própria complexidade genética da doença, que provavelmente não obedece a um modelo monogênico de herança.

**Unitermos:** epilepsia familiar, estudos de ligação, estudos de associação, genes candidatos.

### ABSTRACT

#### *Genetic aspects of juvenile myoclonic epilepsy: consensus and controversy*

Juvenile myoclonic epilepsy (JME) is one of the most common forms of generalized epilepsy, being responsible for 10 to 30% of all epilepsy patients. It is well known that genetic predisposition plays an important role in the development of all idiopathic generalized epilepsy syndromes. However, the identification of specific genes for epilepsy has been difficult due to the complex mode of inheritance of these disorders. JME was the first form of epilepsy to be mapped to a chromosome (ch) region (ch 6p), but the exact location of this *locus* (JME 1) is still controversial. To date, there are at least three candidate *loci* for JME localized on chs: 15q14, 6p21 and 6p12-p11. However, no gene mutation have been identified in any of these locations. More recently, a mutation on *GABRA1* gene (localized on ch 5q34) was identified in a single French-Canadian family with JME. In conclusion, it is very likely that all the controversy surrounding the location of JME *loci* and specific genes are due to the genetic complexity of this epilepsy syndrome, including: the presence of genetic heterogeneity, and polygenic or multifactorial inheritance.

**Key words:** familial epilepsy, linkage analysis, association analysis, candidate genes.

\* Doutoranda. Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP – E-mail: p015313@dac.unicamp.br

\*\* Pós-Doutoranda. Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP – E-mail: neide@fcm.unicamp.br

\*\*\* Professor Doutor. Departamento de Neurologia, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas-SP – E-mail: fcendes@unicamp.br

\*\*\*\* Professora Associada, Livre Docente em Genética Médica. Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP – E-mail: icendes@unicamp.br

Received Aug. 26, 2003; accepted Oct. 18, 2003.

## INTRODUÇÃO

A Epilepsia Mioclônica Juvenil (EMJ) é uma das formas mais comuns de epilepsia generalizada, representando 10 a 30% de todas as epilepsias<sup>(1)</sup>. O início das manifestações clínicas se dá entre os 9 e 27 anos de idade, sendo os abalos mioclônicos, geralmente durante o despertar, o tipo de crise característico e necessário para o diagnóstico da EMJ<sup>(2)</sup>. Além disso, os pacientes podem apresentar crises tônico-clônicas generalizadas e crises de ausência<sup>(2)</sup>. O padrão eletroencefalográfico interictal consiste de descargas ponta-onda ou poliponta-onda generalizadas, rápidas, com 4 a 6 Hz de frequência, comumente irregulares, com pontas que variam em números (5-20), precedendo ou sobrepondo-se a onda lenta<sup>(3)</sup>.

Nos anos 1950, os estudos pioneiros de Lennox<sup>(4,5)</sup> e Metrakos<sup>(6)</sup> identificaram o componente de predisposição genética nas epilepsias generalizadas idiopáticas (EGIs). Nesses trabalhos iniciais se observou que o risco de desenvolver epilepsia era 1.5 a 5 vezes maior nos indivíduos com antecedente familiar da doença do que na população geral e que o risco para familiares de pacientes com EGI era aproximadamente 2 vezes maior do que o risco para indivíduos com história de epilepsia parcial<sup>(6,7,8)</sup>. Kjeldsen e colaboradores<sup>(9)</sup>, em estudo recente com 11.900 gêmeos dinamarqueses, confirmaram o impacto substancial de fatores genéticos na etiologia das epilepsias.

Apesar do reconhecimento de que fatores genéticos estão envolvidos nas EGIs, a identificação de genes que predisõem a doença tem sido dificultada pelo fato das epilepsias, particularmente, as idiopáticas, serem doenças complexas. As doenças complexas são definidas como condições nas quais a correspondência entre o genótipo e fenótipo não é completa<sup>(10)</sup>.

Os maiores problemas associados com estudos genéticos de doenças complexas são: penetrância incompleta (presença do alelo que predisõem à doença, mas sem manifestação clínica), fenocópias (manifestação da doença como resultado de fatores ambientais, sem a presença de alelos que predisõem à doença), heterogeneidade genética (mutações em genes diferentes resultando em um mesmo fenótipo), herança poligênica (para a manifestação da doença necessita-se da presença de mutações em múltiplos genes) ou multifatorial (fatores genéticos e ambientais influenciando a manifestação clínica da doença) e alta prevalência na população geral<sup>(10,11)</sup>.

Na EMJ, estudos familiares têm resultado em dados conflitantes com relação ao modo de herança. Modelos poligênicos, digênicos (recessivo-dominante ou recessivo-recessivo), monogênicos autossômico dominante e autossômico recessivo foram propostos. Provavelmente isto se deve à diversas interpretações do que, na verdade, é uma doença complexa<sup>(11)</sup>.

O primeiro *locus* mapeado em uma síndrome epiléptica foi na EMJ na região HLA-DQ (6p21) em 1987<sup>(12)</sup>, nomeado *EMJ1*. Desde então a EMJ tem sido uma das formas de epilepsia mais amplamente estudadas do ponto de vista molecular.

Até o momento, foram mapeados três principais *loci* candidatos para EMJ, incluindo *EMJ1*: 15q14<sup>(13)</sup>, 6p21<sup>(14,15,16,17,18)</sup>, 6p12-p11<sup>(19,20,21)</sup>, no entanto, nenhum gene nestas regiões foi identificado como o responsável pela doença. Além desses *loci*, em 2002, Cossette et al.<sup>(22)</sup> identificaram uma mutação no gene *GABRA1* localizado na posição 5q34, em uma única família franco-canadense com EMJ.

Apesar de mais de uma década de estudos, a localização de um ou mais *loci* para a EMJ permanece ainda uma questão controversa. Neste artigo procuramos discutir dados relacionados aos *loci* para EMJ já mapeados, além de discutir as razões das possíveis controvérsias que cercam a identificação do *locus* (ou *loci*) para a EMJ.

## LOCUS 6p – EMJ1

Dos *loci* já identificados para EMJ, o braço curto do cromossomo 6 tem sido a região mais exaustivamente estudada no mundo todo. As primeiras publicações desse *locus* foram realizadas por Greenberg et al.<sup>(14,23)</sup> no final da década de 80 e até hoje ainda permanece uma questão não resolvida, como será detalhado a seguir.

Greenberg et al.<sup>(14,23)</sup>, estudando 24 famílias com EMJ, sugeriram a presença de ligação da EMJ nas regiões BF e HLA presentes em 6p21. O *lod score* excedeu 3.0 quando BF e HLA foram analisados juntos, como um haplótipo comum. Esses resultados foram confirmados por dois outros trabalhos estudando famílias alemãs, com *lod score* 3,11<sup>(16)</sup> e 3,27<sup>(18)</sup>, e também por um estudo realizado com famílias na sua maioria de origem europeia, com *lod score* 3,97<sup>(17)</sup>.

Além dos resultados de ligação positiva na região do HLA, estudos de associação (uma outra metodologia de análise genética, que utiliza um desenho tipo caso-controle) também encontraram resultados positivos significativos nessa mesma região<sup>(15,24)</sup>.

Apesar de vários estudos confirmarem a relação da EMJ com a região do HLA, outros trabalhos encontraram evidências de ligação da EMJ com uma região mais centromérica do cromossomo 6p<sup>(19,20,21)</sup>. Assim, Liu et al.<sup>(20)</sup>, utilizando uma grande família de origem em Belize (na América Central) e algumas outras pequenas famílias, encontraram um *lod score* máximo de 14,6 e restringiu a região candidata a um intervalo de 7 cM entre os marcadores D6S272 e D6S257 na região 6p11-p12. Neste mesmo trabalho uma considerável proporção de famílias não apresentou ligação na região 6p evidenciando assim,

pela primeira vez, a ocorrência de heterogeneidade genética (fenômeno pelo qual a mesma doença é causada por alteração em genes diferentes). Bai et al.<sup>(21)</sup>, em dezembro de 2002, estudando 31 famílias do México, também encontraram um *lod score* positivo 3,7 na região 6p12 e reduziram a região candidata a 3,5 cM.

A despeito de tantas evidências em favor da localização do gene para EMJ no cromossomo 6, pelo menos três trabalhos não conseguiram reproduzir esse resultado: Whitehouse et al.<sup>(25)</sup>, estudando 25 famílias do Reino Unido e da Suécia, obtiveram exclusão significativa da região do HLA e da região 10 a 30 cM telomérica desta. Elmslie et al.<sup>(26)</sup>, estudando 19 famílias européias, excluiu a região 6p, utilizando 7 marcadores microssatélites. No terceiro trabalho, utilizando a estratégia de associação, diferenças significativas nas frequências alélicas entre a população e os afetados não foram observadas em 93 pacientes europeus<sup>(27)</sup>. Mais recentemente, foram realizadas análises de mutação em quatro genes candidatos na região 6p11-p12: *LRRCL1*, *GCLC*, *KIAA0057* e *CLIC5*, as quais

não fornecem evidências de que esses genes são responsáveis pela EMJ em 20 famílias de Belize, Califórnia e México<sup>(28)</sup>.

As várias contradições entre as publicações provavelmente se devem a alguns fatores, tais como: diferença nos parâmetros adotados para o cálculo do *lod score* (penetrância, tipo de herança, frequência de recombinação), utilização de diferentes padrões para se considerar um indivíduo afetado (manifestação clínica ou apenas EEG alterado) e a provável presença de heterogeneidade genética. Um outro fator, que pode estar contribuindo para a heterogeneidade genética, são as diferenças étnicas entre os grupos estudados: a ligação entre EMJ e HLA pode representar um fenômeno europeu, enquanto a região 6p11-p12 (mais centromérica) pode estar ligada ao locus da EMJ somente em famílias hispânicas.

Muito recentemente, o gene *EFHC1*, localizado na região 6p12.3 foi implicado na etiologia da EMJ em algumas famílias com EMJ (Suzuki et al. resumo apresentado no Congresso da American Academy of Neurology, abril, 2003).

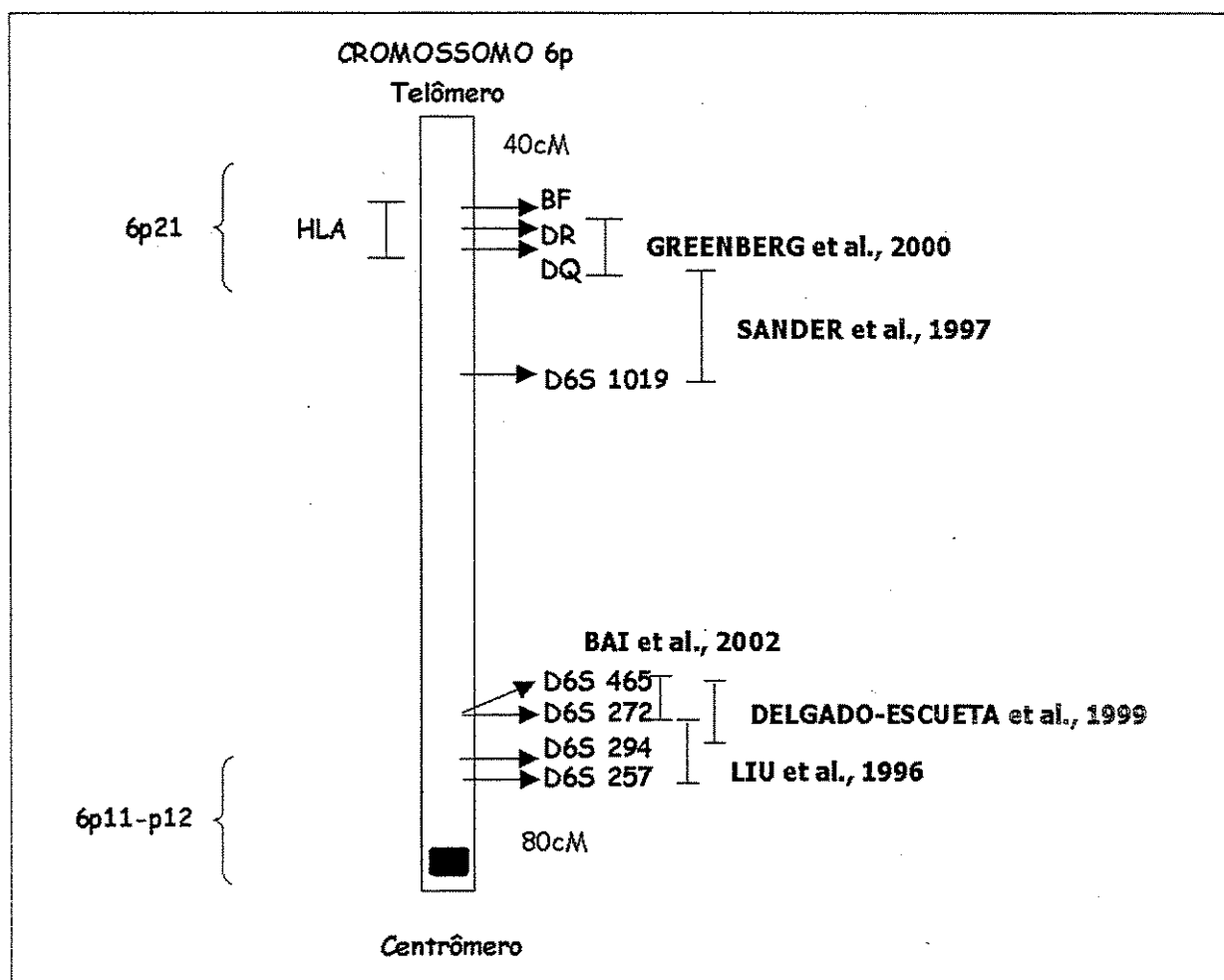


Figura 1. Regiões candidatas para EMJ no cromossomo 6p.

Infelizmente, até o momento, o artigo completo relatando os detalhes desse achado não foi ainda publicado. Neste momento, é prudente aguardar a publicação completa para poder avaliar o real impacto deste achado na determinação da etiologia da EMJ.

#### LOCUS 15q14

Devido a uma mutação no gene *CHRNA4*, codificador da subunidade  $\alpha 4$  do receptor neuronal nicotínico acetilcolínico (nAChR), identificada em Epilepsia do Lobo Frontal Noturna Autossômica Dominante<sup>(29)</sup>, Elmslie et al.<sup>(30)</sup> pesquisaram regiões onde estavam localizados genes que codificam subunidades de nAChRs (1q, 8p, 15q14, 15q24 e 20q). Nas 34 famílias européias com EMJ estudadas, o *lod* score obtido foi negativo para todos os *loci*, exceto para 15q14, onde está localizado o gene *CHRNA7*. O *lod* score máximo encontrado nessa região foi 4,4, sugerindo a presença de um *locus* principal de susceptibilidade a EMJ na maioria das famílias estudadas. Esse *locus* ficou conhecido como EMJ2. No entanto, estudos posteriores não confirmaram esse achado, tanto por análise de ligação<sup>(31,32)</sup> como de associação<sup>(33,31)</sup>. Além disso, análises de mutação nos genes candidatos *KCC3*<sup>(34)</sup> e *CHRNA7*<sup>(35)</sup>, localizados nessa região, não identificaram alterações estruturais que pudessem ser implicadas na patogênese da EMJ.

#### LOCUS 5q34

Em maio de 2002, Cossette et al.<sup>(22)</sup> identificaram uma mutação (Ala322Asp) no gene *GABRA1*, codificador de uma subunidade do receptor GABA<sub>A</sub>, nos indivíduos afetados de uma família franco-canadense com EMJ. Além disso, corroborando os estudos moleculares, foram realizados estudos fisiológicos *in vitro*, os quais demonstraram diminuição da amplitude de correntes ativadas por GABA, indicando que as crises podem ser causadas por perda de função do receptor GABA.

Entretanto, em 1996, essa região já havia sido estudada por Sander et al.<sup>(36)</sup>, utilizando 32 famílias com EMJ, na sua maioria famílias alemãs, resultando em exclusão desse *locus* para as epilepsias generalizadas, incluindo a EMJ.

Os resultados obtidos por Cossette et al. também não foram confirmados por uma pesquisa realizada em nosso laboratório, onde a análise da mutação Ala322Asp foi negativa em 77 indivíduos afetados com EMJ (Ribeiro et al., 2004, submetido para publicação). Até o momento foram encontrados apenas polimorfismos presentes tanto em indivíduos afetados como em controles (68 indivíduos controles), indicando que essas alterações não estão relacionadas ao fenótipo de EMJ nas famílias participantes no nosso estudo. Com as evidências disponíveis até o momento, podemos concluir que a mutação no gene *GABRA1* é, mais provavelmente, um evento raro, talvez exclusivo da

família franco-canadense, e não representa uma causa frequente de EMJ.

#### CONCLUSÃO

A EMJ foi a primeira síndrome epiléptica que teve um *locus* identificado em 1987<sup>(23)</sup>, antes mesmo do uso de marcadores de DNA nos estudos de ligação. Naquela época, a heterogeneidade genética era ainda considerada um fenômeno raro, esperava-se que a cada fenótipo correspondessem mutações em um único gene. Com o progresso do mapeamento de genes responsáveis por doenças, na década de 1990, percebeu-se que a heterogeneidade genética era regra e não exceção. Nas doenças neurológicas, tal fenômeno está presente na quase totalidade das doenças mapeadas, incluindo neuropatias hereditárias<sup>(37,38)</sup>, ataxia espinocerebelares<sup>(39)</sup>, esclerose tuberosa<sup>(40,41,42,43)</sup> entre outras. Mesmo em outras síndromes epilépticas específicas é muito comum a identificação de mais de um *locus* responsável, tal como na epilepsia com crises febris plus<sup>(44,45)</sup>, convulsão neonatal benigna familiar<sup>(46,47)</sup>, convulsão infantil benigna familiar<sup>(48,49,50)</sup>, epilepsia do lobo frontal noturna autossômica dominante<sup>(51,52,53)</sup>. Desse modo, não é surpresa encontramos grupos de famílias com EMJ ligadas a diferentes *loci*.

Apesar de mais de uma década de estudos genéticos em EMJ, ainda não se identificou um gene responsável pela doença (com exceção da mutação em *GABRA1*) essa dificuldade advém principalmente da própria complexidade genética da doença, que provavelmente não obedece a um modelo monogênico (autossômico dominante ou recessivo) de herança.

Portanto, os resultados controversos até o momento, ao invés de desencorajar os estudos moleculares na EMJ devem estimulá-los, pois a busca pela base genética dessa síndrome epiléptica deverá resultar em descobertas muito interessantes que provavelmente levarão a um melhor entendimento dos mecanismos epileptogênicos nas epilepsias generalizadas e ao mesmo tempo avançará nosso entendimento da genética das doenças complexas.

#### AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer os Neurologistas: Prof. Dr. Carlos Guerreiro, Profa. Dra. Marilisa Guerreiro, Dra. Lia Fiore, Dra. Laura Guilhotto que enviaram amostras de pacientes com EMJ para nossos estudos moleculares.

#### REFERÊNCIAS

1. Delgado-Escueta AV, Medina MT, Serratosa JM, Castroviejo IP, Gee MN, Weissbecker K, et al. Mapping and positional cloning of common idiopathic generalized epilepsies: Juvenile Myoclonus Epilepsy and Childhood Absence Epilepsy. In: Delgado-Escueta AV, Wilson WA, Olsen RW, Porter RJ, editors. Jasper's Basic Mechanisms of Epilepsies. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999, p. 351-374.

2. Yacubian EMT. Epilepsia mioclônica juvenil. In: Guerreiro CM, Guerreiro MM, Cendes F, Cendes IL, editores. *Epilepsia*. São Paulo: Lemos Editorial; 2000, p. 215-222.
3. Sakamoto AC, Garzon E, Fernandes RMF. EEG nas epilepsias e síndromes epilépticas. In: Guerreiro CM, Guerreiro MM, Cendes F, Cendes IL, editores. *Epilepsia*. São Paulo: Lemos Editorial; 2000, p. 81-104.
4. Lennox WG. Heredity of epilepsy as told by relatives and twins. *JAMA* 1951; 146: 529-536.
5. Lennox WG. *Epilepsy and related disorders*. Vols. 1 and 2. Boston: Little Brown Company; 1960.
6. Metrakos JD, Metrakos K. Genetics of convulsive disorders: II-Genetic and electroencephalographic studies in centrencephalic epilepsy. *Neurology* 1961; 11: 474-483.
7. Newmark ME, Penry JK, editors. *Genetics of epilepsy: a review*. New York: Raven Press; 1984, p. 122.
8. Andermann E. Genetic aspects of the epilepsies. In: Sakai T, Tsuboi T, editors. *Genetic Aspects of Human Behavior*. Tokyo: Igaku-Shoin; 1985, p. 129-145.
9. Kjeldsen MJ, Kyvik KO, Christensen K, Friis ML. Genetic and environmental factors in epilepsy: a population-based study of 11900 Danish twin pairs. *Epilepsy Res* 2001; 44(2-3): 167-178.
10. Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994; 256: 2037-2048.
11. Serratosa JM. Idiopathic epilepsies with a complex mode of inheritance. *Epilepsia* 1999; 40(Suppl. 3): 12-16.
12. Delgado-Escueta AV, Serratosa JM, Liu A, Weissbecker K, Medina MT, Gee M, et al. Progress in human epilepsy genes. *Epilepsia* 1994; 35(Suppl 1): S29-40. Review.
13. Sander T, Kretz R, Williamson MP, Elmslie FV, Rees M, Hildmann T, et al. Linkage analysis between IGE and the GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha_5$ ,  $\beta_3$  and  $\gamma_3$  subunit gene cluster on chromosome 15. *Acta Neurol Scand* 1997; 96: 1-7.
14. Greenberg DA, Delgado-Escueta AV, Wideltz H, Sparkes RS, Treiman L, Maldonado HM, et al. Juvenile myoclonic epilepsy (JME) may be linked to the BF and HLA loci on human chromosome 6. *Am J Med Genet* 1988; 31(1): 185-192.
15. Greenberg DA, Durner M, Shinnar S, Resor S, Rosenbaum D, Klotz I, et al. Association of HLA class II alleles in patients with juvenile myoclonic epilepsy compared with patients with other forms of adolescent-onset generalized epilepsy. *Neurology* 1996; 47: 750-755.
16. Weissbecker KA, Durner M, Janz D, Scaramelli A, Sparkes RS, Spence MA. Confirmation of linkage between juvenile myoclonic epilepsy locus and the HLA region of chromosome 6. *Am J Med Genet* 1991; 38: 32-36.
17. Greenberg DA, Durner M, Keddache M, Shinnar S, Resor SR, Moshe SL, et al. Reproducibility and complications in gene searches: linkage on chromosome 6, heterogeneity, association, and maternal inheritance in juvenile myoclonic epilepsy. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 508-516.
18. Sander T, Bockenkamp B, Hildmann T, Blasczyk R, Kretz R, Wienker TF, et al. Refined mapping of the epilepsy susceptibility locus EJM1 on chromosome 6. *Neurology* 1997; 49: 842-847.
19. Liu AW, Delgado-Escueta AV, Serratosa JM, Alonso ME, Medina MT, Gee MN, et al. Juvenile myoclonic epilepsy locus on chromosome 6p21.2-p11: linkage to convulsions and electroencephalography trait. *Am J Hum Genet* 1995; 57(2): 368-381.
20. Liu AW, Delgado-Escueta AV, Gee MN, Serratosa JM, Zhang QW, Alonso ME, et al. Juvenile myoclonic epilepsy in chromosome 6p12-11: locus heterogeneity and recombinations. *Am J Med Genet* 1996; 63: 438-446.
21. Bai D, Alonso ME, Medina MT, Bailey JN, Morita R, Cordova S, et al. Juvenile myoclonic epilepsy: linkage to chromosome 6p12 in Mexico families. *Am J Med Genet* 2002; 113: 268-274.
22. Cossette R, Liu L, Brisebois K, Dong H, Lortie A, Vanasse M, et al. Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet* 2002; 31(2): 184-189.
23. Greenberg DA, Delgado-Escueta AV, Wideltz H, Sparkes RS, Treiman L, Maldonado HM, et al. *Cytogenetics And Cell Genetics* 1987; 46(1-4): 623.
24. Obeid T, el Rab MO, Daif AK, Panayiotopoulos CP, Halim K, Bahakim H, et al. Is HLA-DRW13 (W6) associated with juvenile myoclonic epilepsy in arab patients? *Epilepsia* 1994; 35(2): 319-321.
25. Whitehouse WP, Rees M, Curtis D, Sundqvist A, Parker K, Chung E, et al. Linkage analysis of idiopathic generalized epilepsy (IGE) and marker loci on chromosome 6p in families of patients with juvenile myoclonic epilepsy: no evidence for an epilepsy locus in the HLA region. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 652-662.
26. Elmslie FV, Williamson MP, Rees M, Kerr M, Kjeldsen MJ, Pang KA, et al. Linkage analysis of juvenile myoclonic epilepsy and microsatellite loci spanning 61cM of human chromosome 6p in 19 nuclear pedigrees provides no evidence for a susceptibility locus in this region. *Am J Hum Genet* 1996; 59(3): 653-663.
27. Le Hellard S, Neidhart E, Thomas P, Feingold J, Malafosse A, Tafti M. Lack of association between juvenile myoclonic epilepsy and HLA-DR13. *Epilepsia* 1999; 40(1): 117-119.
28. Suzuki T, Morita R, Sugimoto Y, Sugawara T, Bai DS, Alonso ME, et al. Identification and mutational analysis of candidate genes for juvenile myoclonic epilepsy on 6p11-p12: LRR1, GCLC, KIAA0057 and CLIC5. *Epilepsy Res* 2002; 50: 265-275.
29. Steinlein OK, Mulley JC, Propping P, Wallace RH, Phillipps HA, Sutherland GR, et al. A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet* 1995; 11(2): 201-203.
30. Elmslie FV, Rees M, Williamson MP, Kerr M, Kjeldsen MJ, Pang KA, et al. Genetic mapping of a major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q. *Hum Mol Genet* 1997; 6(8): 1329-1334.
31. Sander T, Schulz H, Vieira-Saeker AM, Bianchi A, Sailer U, Bauer G, et al. Evaluation of a putative major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q14. *Am J Med Genet* 1999; 88(2): 182-187.
32. Durner M, Shinnar S, Resor SR, Moshe SL, Rosenbaum D, Cohen JC, et al. No evidence for a major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q. *Am J Med Genet* 2000; 96: 49-52.
33. Guiopponi M, Thomas P, Girard-Reydet C, Feingold J, Baldy-Moulinier M, Malafosse A. Lack of association between juvenile myoclonic epilepsy and GABRA5 and GABRA3 genes. *Am J Med Genet* 1997; 74: 150-153.
34. Steinlein OK, Neubauer BA, Sander T, Song L, Stoodt J, Mount DB. Mutation analysis of the potassium chloride cotransporter KCC3 (SLC12A6) in rolandic and idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsy Res* 2001; 44: 191-195.
35. Taske NL, Williamson MP, Makoff A, Bate L, Curtis D, Kerr M, et al. Evaluation of the positional candidate gene CHRNA 7 at the juvenile myoclonic epilepsy locus (EJM 2) on chromosome 15q13-14. *Epilepsy Res* 2002; 49(2): 157-172.
36. Sander T, Hildmann T, Janz D, Wienker TF, Bianchi A, Bauer G, et al. Exclusion of linkage between idiopathic generalized epilepsies and the GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha 1$  and  $\gamma 2$  subunit gene cluster on chromosome 5. *Epilepsy Res* 1996; 23: 235-244.
37. Bird TD, Ott J, Giblett ER. Evidence for linkage of Charcot-Marie-Tooth neuropathy to the Duffy locus on chromosome 1. *Am J Hum Genet* 1982; 34: 388-394.
38. Vance JM, Nicholson GA, Yamaoka LH, Stajich J, Stewart CS, Speer MC, et al. Linkage of Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1<sup>a</sup> to chromosome 17. *Exp Neurol* 1989; 104: 186-189.
39. Lopes-Cendes I, Andermann E, Rouleau GA. Evidence for the existence of a fourth dominantly inherited spinocerebellar ataxia locus. *Genomics* 1994; 21: 270-274.
40. Fryer AE, Chalmers A, Connor JM, Fraser I, Povey S, Yates AD, et al. Evidence that the gene for tuberous sclerosis is on chromosome 9. *Lancet* 1987; 1: 659-661.

41. Smith M, Smalley S, Cantor R, Pandolfo M, Gomez MI, Baumann R, et al. Mapping of a gene determining tuberous sclerosis to human chromosome 11q14-11q23. *Genomics* 1990; 6: 105-114.
42. Fahsold R, Rott H, Lorenz P. A third gene locus for tuberous sclerosis is closely linked to the phenylalanine hydroxylase gene locus. *Hum Genet* 1991; 88: 85-90.
43. Kandt RS, Haines JL, Smith M, Northrup H, Gardner RJM, Short MP, et al. Linkage of a important gene locus for tuberous sclerosis to chromosome 16 marker for polycystic kidney disease. *Nat Genet* 1992; 2: 37-41.
44. Wallace RH, Wang DW, Singh R, Scheffer IE, George AL Jr, Phillips HA, et al. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na<sup>+</sup> channel  $\beta$ 1 subunit gene SCN1B. *Nature Genet* 1998; 19: 366-370.
45. Lopes-Cendes I, Scheffer IE, Berkovic SF, Rousseau M, Andermann E, Rouleau GA. A new locus for generalized epilepsy with febrile seizures plus maps to chromosome 2. *Am J Hum Genet* 2000; 66(2): 698-701.
46. Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, et al. A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet* 1998; 18(1): 25-29.
47. Charlier C, Singh NA, Ryan SG, Lewis TB, Reus BE, Leach RJ, et al. A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet* 1998; 18(1): 53-55.
48. Guipponi M, Rivier F, Vigeveno F, Beck C, Crespel A, Echenne B, et al. Linkage mapping of benign familial infantile convulsions (BFIC) to chromosome 19q. *Hum Mol Genet* 1997; 6(3): 473-477.
49. Szepeutowski P, Rochette J, Berquin P, Piussan C, Lathrop GM, Monaco AP. Familial infantile convulsions and paroxysmal choreoathetosis: a new neurological syndrome linked to the pericentromeric region of human chromosome 16. *Am J Hum Genet* 1997; 61(4): 889-898.
50. Malacarne M, Gennaro E, Madia F, Pozzi S, Vacca D, Barone dalla Bernardina B, Bianchi A, Bonanni P, De Marco P, Gambardella A, Giordano L, et al. Benign familial infantile convulsions: mapping of a novel locus on chromosome 2q24 and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 2001;68(6):1521-1526.
51. Phillips HA, Scheffer IE, Berkovic SF, Hollway GE, Sutherland G, Mulley JC. Localization of a gene for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy to chromosome 20q 13.2. *Nat Genet* 1999; 10(1): 117-118.
52. Gambardella A, Annesi G, De Fusco M, Patrignani A, Aguglia U, Annesi F, et al. A. A new locus for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy maps to chromosome 1. *Neurology* 2000; 55(10): 1467-1471.
53. Phillips HA, Scheffer IE, Crossland KM, Bhatia KP, Fish DE, Marsden CD, et al. Autosomal dominant nocturnal frontal-lobe epilepsy: genetic heterogeneity and evidence for a second locus on 15q24. *Am J Hum Genet* 1998; 63(4): 1108-1116.

**Endereço para correspondência:**

Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes  
 Departamento de Genética Médica - FCM - UNICAMP  
 Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Distrito de Barão Geraldo  
 CEP 13084-971, Campinas, SP, Brasil  
 Fone: (19) 3788-8907 - Fax: (19) 3788-8909  
 E-mail: icendes@unicamp.br

***ARTIGO 2***

**The relevance of *GABRA1* gene in idiopathic generalized epilepsies**

(submetido para *Neurology*)



## THE RELEVANCE OF THE *GABRA1* GENE IN THE ETIOLOGY OF IDIOPATHIC GENERALIZED EPILEPSIES

Patrícia A O Ribeiro MSc<sup>1</sup>, Luiz E Betting MD<sup>2</sup>, Vinícius P Bittencourt BSc<sup>1</sup>, Neide F Santos PhD<sup>1</sup>, Rodrigo Secolin BSc<sup>1</sup>, Susana B Mory MD, MSc<sup>2</sup>, Eliane Kobayashi, MD, PhD<sup>2</sup>, Carlos AM Guerreiro MD, PhD<sup>2</sup>, Marilisa M Guerreiro MD, PhD<sup>2</sup>, Fernando Cendes MD, PhD<sup>2</sup>, Iscia Lopes-Cendes MD, PhD<sup>1</sup>.

From The Departments of Medical Genetics <sup>1</sup> and Neurology <sup>2</sup>, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, BRAZIL.

**Running titles:** Ribeiro et al.

The relevance of *GABRA1* in IGE

**Key words:** Juvenile myoclonic epilepsy, mutation analysis, linkage studies, association studies, genetics.

**Correspondence to:** Iscia Lopes Cendes, MD, PhD.

Department of Medical Genetics,

University of Campinas - UNICAMP

Campinas, SP Brazil, 13084-971

TEL: +55 19 3788 8907

FAX: +55 19 3788 8909

Email: icendes@unicamp.br

## **Abstract**

We performed mutation analysis in exon 9 of the *GABRA1* gene and linkage and association studies with markers flanking the candidate region on chromosome 5q34, in patients with juvenile myoclonic epilepsy and other forms of idiopathic generalized epilepsy. We found only an intronic substitution already reported as a common polymorphism. Linkage analysis excluded a 4 cM region flanking the *GABRA1* gene. However, a significant association was found between alleles of two microsatellite markers tightly linked to the *GABRA1* gene.

## Introduction

Although genetic studies of juvenile myoclonic epilepsy (JME) dates back almost 20 years and many loci have been studied, only three putative candidate genes have been identified<sup>1</sup>. One of these candidates, mapped on chromosome (ch) 5q34, was recently identified as the *GABRA1* gene<sup>2</sup>. A single nucleotide substitution, in exon 9 (Ala322Asp) of *GABRA1*, was identified in a large French-Canadian family segregating an autosomal dominant form of JME<sup>2</sup>. *GABRA1* encodes the  $\alpha 1$  subunit of  $\gamma$ -aminobutyric acid subtype A (GABA<sub>A</sub>) receptor, and in its mutated form shows a lesser amplitude of GABA-activated currents, indicating that seizures may result from loss of function of this inhibitory ligand-gated ion channel<sup>2</sup>. The aim of our study was to investigate the relevance of *GABRA1* gene mutations in patients with JME and other forms of IGE.

## Subjects and methods

All patients were diagnosed according to the ILAE classification of epilepsies and epileptic syndromes<sup>3</sup>. This project was approved by the Ethics Committee of the UNICAMP Medical School.

We recruited a total of 197 individuals for the study, including 82 unrelated subjects with no personal or family history of epilepsy, who were genotyped as part of the control group. All patients, and family members, were evaluated by experienced epileptologists and re-interviewed specifically for this study by two of us (LEB and FC). Most patients (72/84) were also submitted to at least one routine scalp EEG using the International 10-20 System for electrode placement.

Genomic DNA was obtained from peripheral blood. All affected individuals (n=71) and a control group (n=82) were genotyped by the polymerase chain reaction (PCR) using two pairs of primers (GAB 91: 5'GCCAGAACTCCCTCCCTAAG3' and GAB93:5'ACTCCATCCAATACCACAGGC3'; GAB94: 5'TGTTCAAGTAGGCTGTCCCATC3' and GAB 95: 5'TGGCAAACCTCAATCAGAGCTG3') that amplified the entire coding region and adjacent exon/intron boundaries of exon 9 of the *GABRA1* gene. PCR products were

analyzed by the single strand conformation polymorphism (SSCP) in order to screen for the presence of mutations. The nucleotide sequence of all fragments showing a band shift was determined by standard manual sequencing techniques.

Linkage studies were carried out using six non-related families (Figure 1). A total of 43 family members were genotyped, including 13 affected individuals.

We genotyped four microsatellite markers (centromer D5S412 – 1cM – D5S529 – 1cM – *GABRA1* – 0.8 cM – D5S422 – 1cM – D5S2066 – telomere) spanning a 4 cM region flanking the *GABRA1* on ch 5q34. Linkage between ch 5q34 locus and each of the markers was analyzed by the maximum likelihood method using the LINKAGE package<sup>4</sup>. Frequency for each marker allele was calculated from unrelated individuals married into the pedigrees and controls. Two-point and multipoint lod scores were calculated assuming autosomal dominant inheritance and two classes of incomplete penetrance: 70% for affected individuals (JME and other IGE) and 50% for those characterized as possibly affected (febrile seizures only or a single generalized tonic-clonic seizure). Lod-scores were calculated for the six families combined.

Association analysis was carried out for 43 unrelated individuals with JME, 33 (77%) of whom referred a positive family history of epilepsy. In addition, we genotyped 54 normal control subjects. Significance of association was ascertained by chi-square or Fisher exact test, when appropriated. In addition, we calculated odds ratio (OR) with 95% confidence interval (CI). We implemented a correction for multiple comparisons<sup>5</sup> and considered significant *p* values less than 0.01<sup>6</sup>.

## Results

For the mutation analysis we studied 71 patients with different types of IGE: 43 with JME, 12 with generalized tonic-clonic seizures, nine with juvenile absence epilepsy, two with childhood absence epilepsy, four patients with unclassified IGE and one with a single generalized tonic-clonic seizure. All, but nine patients with JME, referred a positive family history of epilepsy (87%).

In the linkage analysis we included six families, all ascertained through a proband with JME. All six probands have myoclonic seizures in the upper limbs occurring in the morning. In addition, generalized tonic-clonic and rare absence seizures were reported by all of them. Optimal seizure control was achieved with valproate on monotherapy. Interictal scalp EEG was performed in all six probands and at least one exam showed bilateral synchronous generalized spike and wave or polyspike and wave at 3-4 Hz. Of the six families studied only two had a second patient with confirmed JME (Figure 1, families 2 and 6). In the remaining four families the other affected or possibly affected family members had other types or unclassified IGE.

We found three different patterns of migration in the SSCP analysis: types A, B and C. Type A was identified in 20% of patients with JME, in 10% of patients with other types of IGE and in 13% of controls. Type B was identified in 37.5% of patients with JME, in 35% of patients with other types of IGE and in 43% of controls. Type C was observed in 42.5% of patients with JME, in 55% of patients with other types of IGE and in 44% of controls. Sequencing analysis of subjects with type A migration pattern revealed a G→A substitution in the 11<sup>th</sup> intron of the *GABRA1* gene. Type B sequencing showed the wild type allele and type C showed both variants. This DNA variation has already been described in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database as a frequently found single nucleotide polymorphism (SNP) named rs = 2279020<sup>7</sup>. The frequency of this SNP in our control group was 0.35 and 0.5 in the NCBI database<sup>7</sup>.

Two-point linkage analysis resulted in negative lod scores for all four markers tested. However, significant results were achieved only for the most centromeric marker D5S412 ( $Z = -3.22$  at  $\theta = 0.0$ ). Multipoint analysis significantly excluded the entire candidate region containing the *GABRA1* gene on ch 5q34 (Figure 2).

We found significant association between allele 1 of microsatellite marker D5S422 ( $p < 0.00001$ , Fisher exact test); allele 3 (OR = 1.83, 95% CI = 1.05 – 3.19); and allele 6 ( $p = 0.0009$ , Fisher exact test) of microsatellite marker D5S2066.

## Discussion

GABA has always been an inviting target in the etiology of epilepsy because it is the major inhibitory neurotransmitter in the central nervous system. Genes encoding GABA receptor subunits have been studied in different epilepsy syndromes, such as childhood absence epilepsy associated with febrile seizures, generalized epilepsy with seizure plus (GEFS+) and JME patients<sup>1</sup>.

We did not confirm the presence of mutations in exon 9 of the *GABRA1* gene in our large group of patients with JME and other forms of IGE. In addition, linkage analysis significantly excluded the *GABRA1* gene as candidate for JME in the families studied. Very recently, a study by Kapoor et al.<sup>8</sup> also failed to find mutations in exon 9 of the *GABRA1* gene in patients with JME. Interestingly, two previous studies excluded linkage between IGE and the same candidate region on ch 5q<sup>9,10</sup>. However, our results revealed significant association with three alleles of two microsatellite markers mapped within the 5q34 region, in 43 unrelated patients with JME. Therefore, we cannot exclude a role of *GABRA1*, or other candidate gene, mapping at ch 5q34 as a susceptibility gene or a genetic modifier in JME patients.

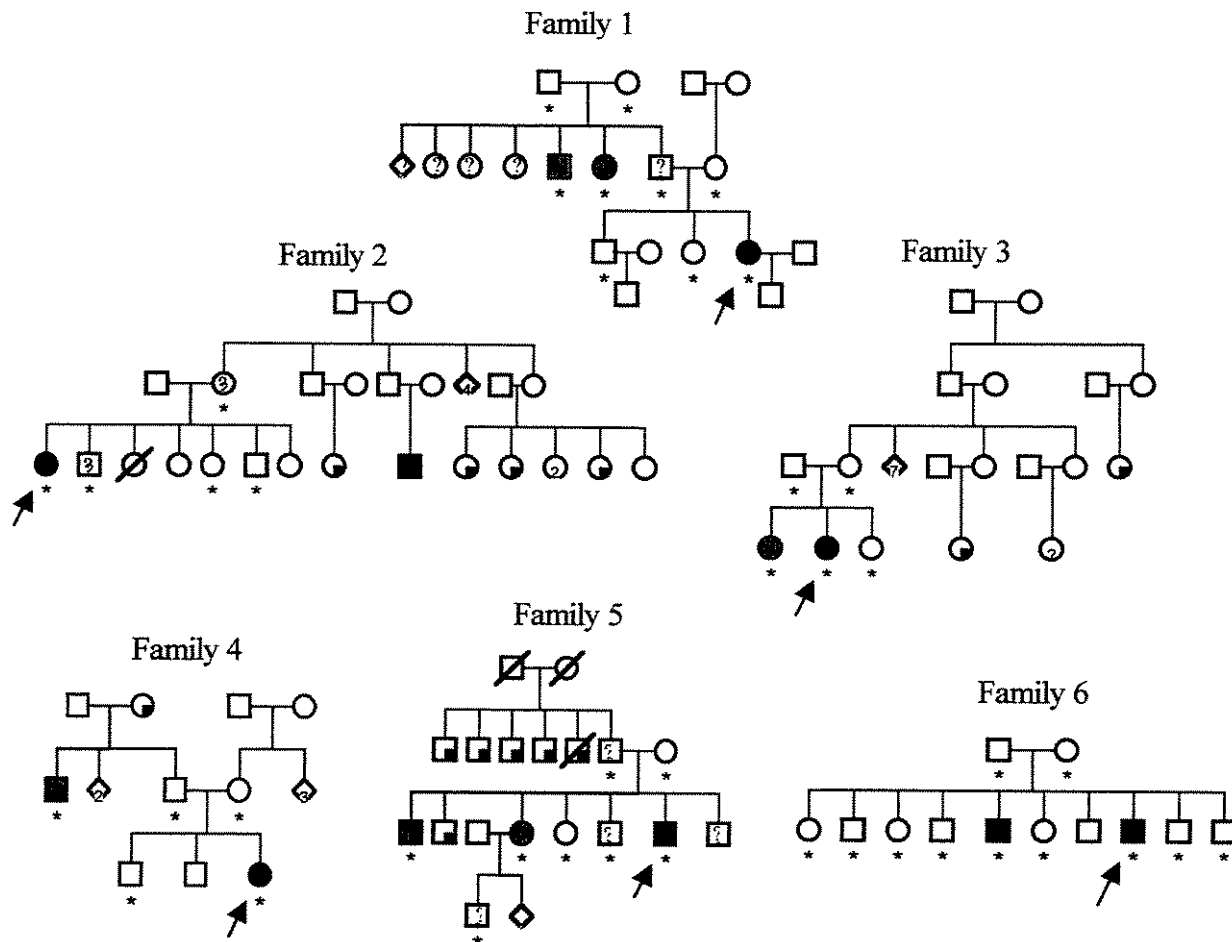
We conclude that the mutation Ala322Asp in exon 9 of the *GABRA1* gene is probably a rare event and does not represent a frequent major cause of JME or other forms of IGE. In addition, the presence of the *GABRA1* mutation may be related to a specific rare monogenic JME phenotype<sup>2</sup>. However, we also found evidence that the ch 5q34 region probably contains a gene of minor effect involved in the etiology of JME. Other GABA<sub>A</sub> receptor subunits are still interesting candidates, since mutations in different subunits of the same receptor may cause similar epilepsy phenotype.

## Acknowledgments

We thank all patients and their families who participated in this study. PAOR received a scholarship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Brazil. VPB, Dr. NFS and RS received scholarships from FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), SP Brazil. Drs. FC and ILC are supported, in part, by CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), Brazil. This work was supported by grants from FAPESP, SP Brazil to Drs. FC and ILC.

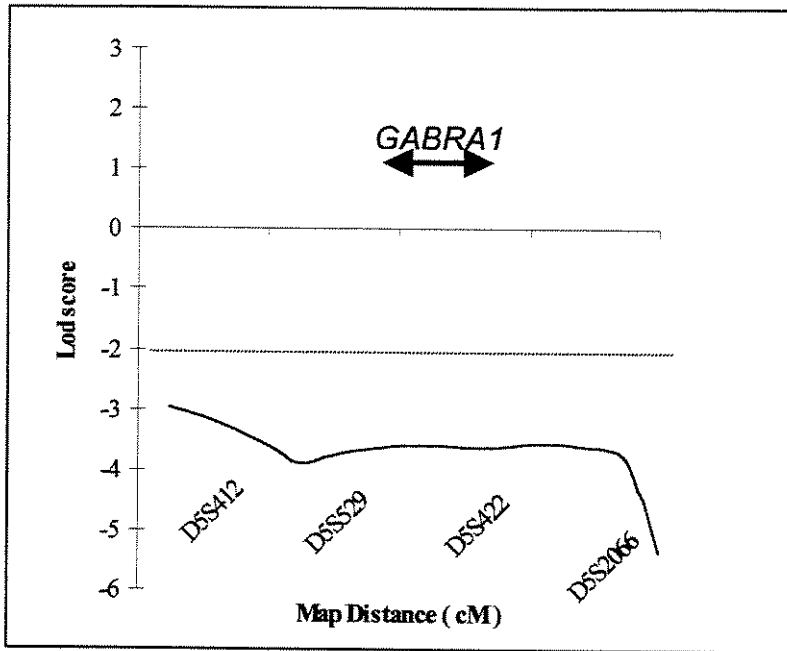
## References

1. Scheffer IE, Berkovic SF. The genetics of human epilepsy. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 2003;24(8):428-433.
2. Cossette P, Liu L, Brisebois K, et al. Mutation of *GABRA1* in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet*. 2002;31(2):184-189.
3. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* 1989;30: 389-399.
4. Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J. Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc Natl Acad Sci* 1984;81(11): 3443-3446.
5. Svejgaard A, Ryder LP. HLA and disease associations: detecting the strongest association. *Tissue Antigens*. 1994;43:18-27.
6. Bird TD, Jarvik GP, Wood NW. Genetic association studies: genes in search of diseases. *Neurology* 2001;57:1153-1154.
7. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=2279020](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=2279020). Accessed August 8<sup>th</sup>, 2003.
8. Kapoor, A.; Vijai, J.; Ravishankar, H. M.; Satishchandra, P.; Radhakrishnan, K.; Anand, A. Absence of *GABRA1* Ala322Asp mutation in juvenile myoclonic epilepsy families from India. *J Gene*. 2003;82(1-2): 17-21.
9. Sander T, Hildmann T, Janz D, Wienker TF, Bianchi A, Bauer G, et al. Exclusion of linkage between idiopathic generalized epilepsies and the GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha 1$  and  $\gamma 2$  subunit gene cluster on chromosome 5. *Epilepsy Res*. 1996;23:235-244.
10. Windemuth C, Schulz H, Saar K, et al. No evidence for a susceptibility locus for idiopathic generalized epilepsy on chromosome 5 in families with typical absence seizures. *Epilepsy Res*. 2002;51(1-2):23-29.



**Legend for figure 1:** Pedigree of the six families studied. Dark symbols represent patients with confirmed JME. Grey filled symbols indicate individuals who had multiple generalized tonic-clonic seizures and were considered affected in the linkage studies. Partially filled symbols represent individuals who had a history of seizures, but were not clinically evaluated, these individuals were not included in the molecular studies. A question mark indicates patients who had febrile seizures only or a single generalized tonic-clonic seizure, and were considered possibly affected in the linkage analysis. Proband is marked by an arrow. An asterisk below symbols indicates individuals included in the linkage analysis.





**Legend for figure 2:** Results for multipoint linkage analysis for markers on ch 5q34 in six families segregating JME. The horizontal dotted line indicates values below which significant negative lod score were achieved ( $Z < -2.00$ ) excluding linkage.

***ARTIGO 3***

***The role of chromosome 6p in JME and other forms of IGE***

(em preparação)

## **The role of chromosome 6p in JME and other forms of IGE**

Patrícia AO Ribeiro<sup>1</sup>, Vinícius DB Pascoal<sup>1</sup>, Luiz GG Betting<sup>2</sup>, Neide F Santos<sup>1</sup>, Rodrigo Secolin<sup>1</sup>, Susana B Mory<sup>2</sup>, Carlos Guerreiro<sup>2</sup>, Marilisa Guerreiro<sup>2</sup>, Fernando Cendes<sup>2</sup>, Iscia Lopes-Cendes<sup>1</sup>.

Departments of Medical Genetics<sup>1</sup> and Neurology<sup>2</sup> FCM – UNICAMP.

Departments of Medical Genetics <sup>1</sup> and Neurology <sup>2</sup>

### **Running titles:**

**Key words:** Idiopathic generalized epilepsies, genetics, linkage study, association study.

**Correspondence to:** Iscia Lopes-Cendes,

Medical Genetics, FCM – UNICAMP

TEL: +55 19 3788 8905

FAX: +55 19 3788 8909

e-mail: [icendes@unicamp.br](mailto:icendes@unicamp.br)

## Abstract

The first *locus* for IGE was mapped on chromosome (ch) 6p, in families segregating juvenile myoclonic epilepsy (JME), a common type of IGE. Additional linkage and association studies were performed in many IGE families leading to conflicting results. One hypothesis to explain these results is the presence of genetic heterogeneity, which may be related to differences in ethnic origin of the families studied. The aim of the present study was to investigate linkage and/or association between the gene(s) predisposing to IGE, and the candidate *loci* on ch 6p in Brazilian patients. It was done linkage analysis using the software LINKAGE to calculate two-point and multipoint lod scores. For the association study we calculated the chi-square test using the Systat 5,0 software ( $p < 0.01$ ). We performed linkage analysis of 6 unrelated families, with at least two IGE cases. For the association study we analyzed 44 unrelated patients with JME and 54 normal controls. For both studies we genotyped four microsatellite markers flanking the HLA region on ch 6p21: tel D6S276, D6S265, D6S291 and D6S1610 cent. To study the ch 6p12 we performed linkage analysis of 6 unrelated families using four microsatellite markers: tel D6S426, D6S271, D6S465, D6S257 cent. Linkage simulation analysis of these 6 families combined yield a  $Z_{max} = 5.09$ .

RESULTS: Lod-scores were negative for all eight markers. There was no significant association between EMJ and any of the eight microsatellite markers genotyped ( $p$  ranging between 0.15 and 0.23).

Accordingly, we failed to support previous evidence for IGE *locus* on ch 6p21 in Brazilian patients, confirming the hypothesis of genetic heterogeneity among IGE.

## 1. Introduction

The idiopathic generalized epilepsies (IGE), for which a genetic cause is widely accepted<sup>(1,2,3)</sup>, account for 39 to 59% of all epilepsies<sup>(4)</sup>. The most common forms of IGE are: juvenile myoclonic epilepsy (JME), childhood absence epilepsy (CAE), juvenile absence epilepsy (JAE) and epilepsy with generalized tonic-clonic seizures only.

In 1988, the first epilepsy *locus* was mapped in an IGE subtype (JME) on chromosome (ch) 6p21<sup>(5)</sup>, where is located the HLA region, and ever since, in spite of almost two decades of study, the results are still conflicting.

One difficulty in studying the genetics of IGE is the variability of the epilepsy phenotype and the substantial overlap that these syndromes show in seizure types<sup>(6)</sup>. Another difficulty is the mode of inheritance of these types of epilepsies that follows a complex pattern of inheritance<sup>(7)</sup>, so these syndromes are called complex diseases.

The complex diseases are defined as conditions in which the correspondence between the genotype and phenotype is not complete<sup>(8)</sup>. The largest problems associated with genetic studies of complex diseases are incomplete penetrance, fenocopies, genetic heterogeneity, polygenic or multifactorial inheritance and high prevalence in the population<sup>(7,8)</sup>.

Linkage and association analysis have been widely used for mapping *loci* and discovering genes of complex diseases, like occurred with the *locus* 5q34, which was mapped by linkage analysis for JME in a French-Canadian family and then it was identified a mutation on exon 9 of *GABRA1* gene, localized in this region<sup>(9)</sup>.

Sander *et al*, studying different IGE all together, have found a significant linkage in ch 3q26<sup>(10)</sup> and, looking for genes in this *locus*, identified three different heterozygous mutations in the chloride-channel gene *CLCN2* in three unrelated families with IGE<sup>(11)</sup>.

Among all the *loci* identified for JME and other IGE, the ch 6p has been the most studied *locus*. After the first research published proposing the HLA region (ch 6p21) as the JME *locus*<sup>(5)</sup>, another linkage and association analysis were realized and positive results were obtained from studies, most of them, using families of German or other

European origin<sup>(12,13,14,15,16,17)</sup>. In 2003, Pal *et al* found two JME-associated SNP variants in the promoter region of the gene *BRD2*, localized in the 6p21 region<sup>(18)</sup>.

Negative results for the 6p21 region were obtained using families from Central America, however it was reported linkage of these families to markers on a region more centromeric to HLA, on ch 6p12<sup>(19,20)</sup>. (FALAR DA 6p12: EF HAND)<sup>(21)</sup>

In spite of all the evidences in favor of the JME gene localization on ch 6p, at least three papers could not reproduce these results, studying families from Sweden, United Kingdom, Denmark, Greece and France.<sup>(22,23,24)</sup>

One hypothesis to explain these conflicting results is the presence of genetic heterogeneity, which may be related to differences in ethnic origin of the families studied.

The aim of the present study was to investigate linkage and/or association between the gene(s) predisposing to JME and other forms of IGE, and the candidate *locus* on ch 6p in Brazilian patients.

## **2.Subjects and methods**

Studies were performed on patients and families ascertained from the University Hospital of UNICAMP, in Campinas (São Paulo, Brazil). All individuals were diagnosed according to the ILAE classification of epilepsies and epileptic syndromes (ILAE, 1989). Written informed consent, which the ethics committee of Medicine School of UNICAMP approved, was obtained from all participants.

It was done linkage and association analysis and for both studies we genotyped eight microsatellite markers flanking the ch 6p. For the ch 6p21: tel. D6S276, D6S265, D6S291, D6S1610 cent. and for the ch 6p12 tel. D6S426, D6S271, D6S465, D6S257 cent.

### **2.1. Linkage analysis**

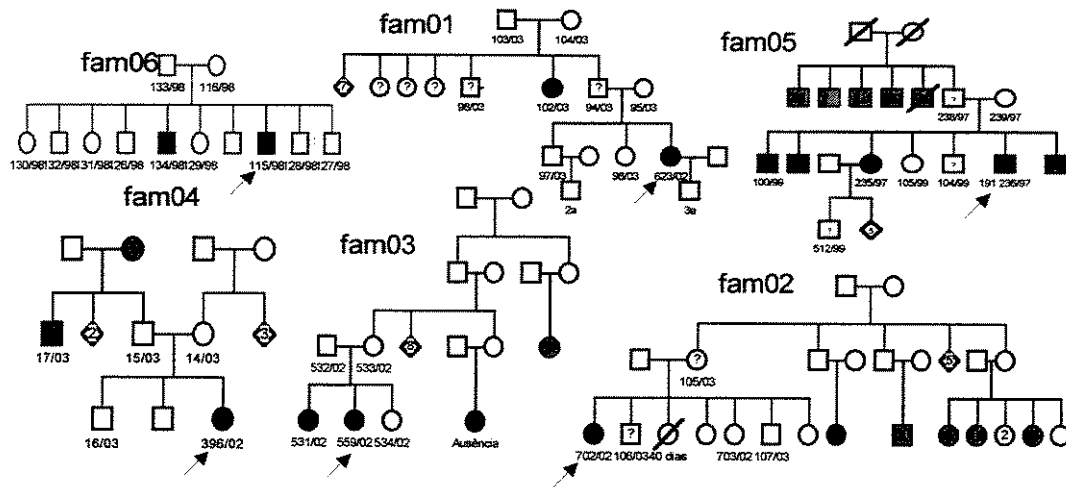
It was ascertained through a proband affected by JME, 10 families with at least another individual affected by IGE, for linkage study (Figure 1). We studied 43 members of these families (Table 1).

All the probands had myoclonic seizures on awakening and mainly in the upper limbs. The patients also had absence and tonic-clonic seizures (TCS) but with a smaller frequency. All the probands are taking valproate with a good seizure control. EEG was performed in all the probands and at least one exam showed bilateral, synchronous generalized spike and wave or polyspike and wave pattern at a frequency of 3-4 Hz with normal background.

**Table 1:** Clinical characteristics of the six families studied in linkage analysis.

<b>Family</b>	<b>Proband's age</b>	<b>Seizure's onset (years)</b>	<b>Nº of relatives with single seizures</b>	<b>Nº of Relatives with epilepsy</b>	<b>Nº of individuals genotyped</b>
<b>1</b>	20	14	4	1	9
<b>2</b>	29	13	1	5	5
<b>3</b>	32	14	1	3	5
<b>4</b>	22	4	0	2	5
<b>5</b>	30	14	3	4	8
<b>6</b>	25	16	0	1	11
					<b>Total 43</b>

Two-point and multipoint lod scores were calculated using LINKAGE software, assuming autosomal dominant inheritance with 70% penetrance for affected individuals and 50% for those characterized as possible affected. A disease allele frequency of 0,021 was assumed.



**Figure 1:** Pedigrees of the studied families. The symbols ■ and ● represent EMJ patients. The symbols ■ and ● represent individuals who had only CTGs. Individuals who have any history of convulsion and have not been clinically evaluated, were not included in our study and were represented by ■ and ●.

The symbol ? represents febril convulsion or a unique TCS. The proband is represented with ↗.



## 2.2. Association analysis

Association analysis was carried out by studying 43 unrelated patients with JME, 33 of whom referred a positive family history of epilepsy. In addition we genotyped 54 normal control subjects, with no history of epilepsy in the family, ascertained from the University Hospital of UNICAMP.

For statistic analysis we used the Systat 5,0 software. It was calculated chi-square and Fisher's exact test, the last one was used when the allelic frequency was less than 5%. It was considered significant when  $p$  values was less than 0.01<sup>(25)</sup>.

## 3. Results

### 3.1. Linkage analysis

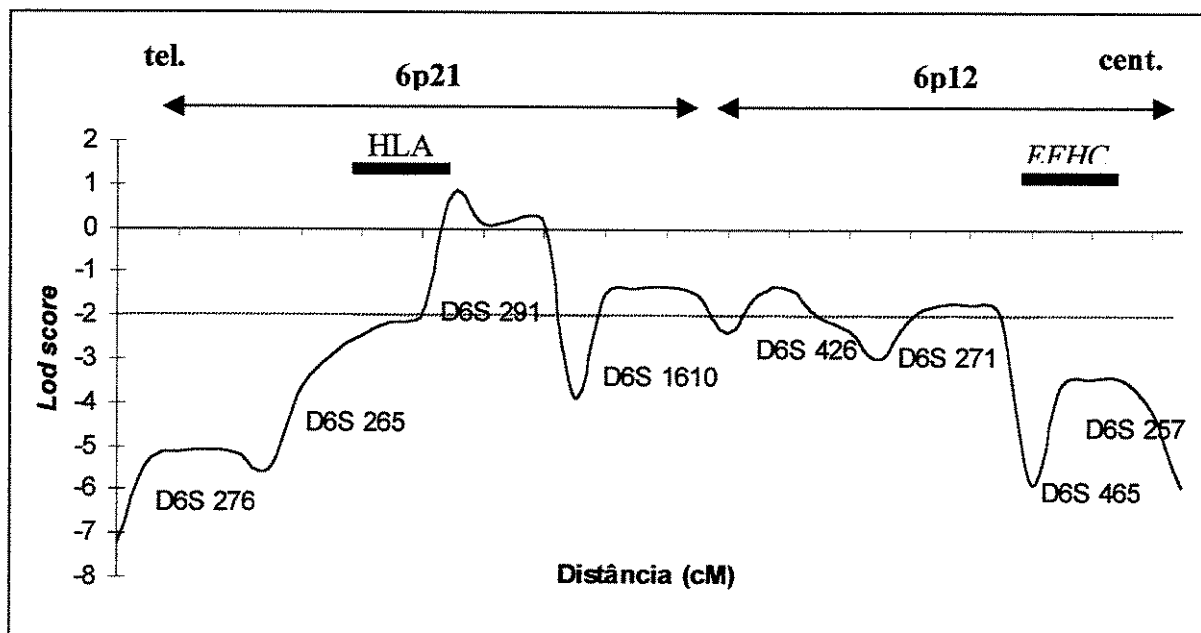
A linkage simulation analysis of the 6 families combined was performed yielding a  $Z_{max} = 5.09$ .

The two-point analysis result in negative lod scores, but two of the markers (D6S265 and D6S291) did not had a significant lod score (Table 2), seeing that it is considered significant lod scores  $\leq -2$  or  $\geq 3$ . Our results are still interesting, since the microsatellite D6S276 resulted in lod scores less than  $-2$  until  $\theta = 0.05$ , covering a total of 10 cM.

Lod scores were also negative for all three markers genotyped in multipoint analysis (for  $\theta = 0$ : D6S276,  $Z = -7.22$ ; D6S265,  $Z = -4.16$ ; D6S291,  $Z = -1.23$ ), corroborating the two-point data (Figure 2).

**Table 2:** Two-point lod scores for IGE and three markers on ch 6p21.

Marcador	$Z_{\max}$ a $\theta$ (frequência de recombinação) =									
	0.0	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	
D6S276	-7,65	-2,95	-1,91	-1,24	-0,78	-0,46	-0,24	-0,1	-0,02	
D6S265	-1,69	-1,19	-0,82	-0,54	-0,35	-0,21	-0,12	-0,06	-0,03	
D6S291	-0,11	0,23	0,33	0,35	0,32	0,26	0,20	0,12	0,06	
D6S1610	-3,69	0,36	0,64	0,68	0,61	0,48	0,34	0,21	0,10	
D6S426	-1,08	-0,23	0,07	0,19	0,23	0,21	0,16	0,11	0,05	
D6S271	-1,66	-0,10	0,38	0,57	0,62	0,58	0,49	0,35	0,20	
D6S465	-2,22	-0,91	-0,48	-0,25	-0,11	-0,03	0,01	0,02	0,02	
D6S257	-5,90	-2,36	-1,58	-1,10	-0,78	-0,54	-0,37	-0,23	-0,13	



**Figure 2:** Multipoint linkage analysis for IGE and three markers on ch 6p21.

### 3.2. Association analysis

The number of the subjects successfully genotyped for each marker and the number of the alleles identified are presented in Table 3.

**Table 3:** Numbers of the affected and control individuals successfully genotyped and total number of alleles produced by the each marker.

Markers	N <sup>o</sup> of affected subjects	N <sup>o</sup> of controls subjects	N <sup>o</sup> of alleles
D6S276	42	49	11
D6S265	44	54	10
D6S291	44	49	8

There was no significant association between JME and any of the three microsatellite markers genotyped ( $p$  ranging between 0,15 and 0,23).

### 4. Conclusion

Linkage results excluded the presence of a major *locus* predisposing to IGE in the HLA region (ch 6p21). However, association studies found some evidence for susceptibility genes (minor effect) or modifier genes in this region. These results confirm the hypothesis of genetic heterogeneity and polygenic inheritance among IGE.

## 5. References

1. Lennox WG. Heredity of epilepsy as told by relatives and twins. *JAMA* 1951;146:529-536.
2. Metrakos JD, Metrakos K. Genetics of convulsive disorders: II-Genetic and electroencephalographic studies in centrencephalic epilepsy. *Neurology* 1961;11:474-483.
3. Kjeldsen MJ, Kyvik KO, Christensen K, Friis ML. Genetic and environmental factors in epilepsy: a population-based study of 11900 Danish twin pairs. *Epilepsy Res.* 2001;44(2-3):167-178.
4. Hauser WA, Hesdorffer DC, editors. *Epilepsy: frequency, causes and consequences.* New York: Demos, 1990.
5. Greenberg DA, Delgado-Escueta AV, Widelitz H, et al. Juvenile myoclonic epilepsy (JME) may be linked to the BF and HLA *loci* on human chromosome 6. *Am. J. Med. Genet.* 1988;31:185-192.
6. Durner M, Keddache MA, Tomasini L, et al. Genome scan of idiopathic generalized epilepsy: evidence for major susceptibility gene and modifying genes influencing the seizure type. *Ann Neurol.* 2001;49:328-335.
7. Serratosa JM. Idiopathic epilepsies with a complex mode of inheritance. *Epilepsia* 1999;40(Suppl. 3):12-16.
8. Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994;256:2037-2048.
9. Cossette P, Liu L, Brisebois K, et al. Mutation of *GABRA1* in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet.* 2002;31(2):184-189.
10. Sander T, Schulz H, Saar K, et al. Genome search for susceptibility loci of common idiopathic generalised epilepsies. *Hum Mol Genet.* 2000;9(10):1465-1472.
11. Haug K, Warnstedt M, Alekov AK, et al. Mutations in *CLCN2* encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. *Nat Genet.* 2003;33(4):527-32.

12. Greenberg DA, Durner M, Shinnar S, Resor S, Rosenbaum D, Klotz I, et al. Association of HLA class II alleles in patients with juvenile myoclonic epilepsy compared with patients with other forms of adolescent-onset generalized epilepsy. *Neurology* 1996;47:750-55.
13. Weissbecker KA, Durner M, Janz D, Scaramelli A, Sparkes RS, Spence MA. Confirmation of linkage between juvenile myoclonic epilepsy locus and the HLA region of chromosome 6. *Am J Med Genet.* 1991;38:32-36.
14. Greenberg DA, Durner M, Keddache M, Shinnar S, Resor SR, Moshe SL, et al. Reproducibility and complications in gene searches: linkage on chromosome 6, heterogeneity, association, and maternal inheritance in juvenile myoclonic epilepsy. *Am J Hum Genet.* 2000;66:508-16.
15. Sander T, Bockenkamp B, Hildmann T, Blasczyk R, Kretz R, Wienker TF, et al. Refined mapping of the epilepsy susceptibility locus EJM1 on chromosome 6. *Neurology* 1997;49:842-47.
16. Liu AW, Delgado-Escueta AV, Serratos JM, Alonso ME, Medina MT, Gee MN, et al. Juvenile myoclonic epilepsy locus in chromosome 6p21.2-p11: linkage to convulsions and electroencephalography trait. *Am J Hum Genet.* 1995;57(2):368-81.
17. Obeid T, el Rab MO, Daif AK, Panayiotopoulos CP, Halim K, Bahakim H, et al. Is HLA-DRW13 (W6) associated with juvenile myoclonic epilepsy in arab patients? *Epilepsia* 1994;35(2):319-21.
18. Pal DK, Evgrafov OV, Tabares P, Zhang F, Durner M, Greenberg DA. *BRD2* (RING3) Is a Probable Major Susceptibility Gene for Common Juvenile Myoclonic Epilepsy. *Am J Hum Genet.* 2003;73(2):261-270.
19. Liu AW, Delgado-Escueta AV, Gee MN, Serratos JM, Zhang QW, Alonso ME, et al. Juvenile myoclonic epilepsy in chromosome 6p12-11: locus heterogeneity and recombinations. *Am J Med Genet.* 1996;63: 438-46.
20. Bai D, Alonso ME, Medina MT, Bailey JN, Morita R, Cordova S, et al. Juvenile myoclonic epilepsy: linkage to chromosome 6p12 in Mexico families. *Am J Med Genet* 2002;113:268-74.

21. RESUMO EF-HAND

22. Whitehouse WP, Rees M, Curtis D, Sundqvist A, Parker K, Chung E, et al. Linkage analysis of idiopathic generalized epilepsy (IGE) and marker loci on chromosome 6p in families of patients with juvenile myoclonic epilepsy: no evidence for an epilepsy locus in the HLA region. *Am J Hum Genet.* 1993;53:652-62.
23. Elmslie FV, Williamson MP, Rees M, Kerr M, Kjeldsen MJ, Pang KA, et al. Linkage analysis of juvenile myoclonic epilepsy and microsatellite loci spanning 61cM of human chromosome 6p in 19 nuclear pedigrees provides no evidence for a susceptibility locus in this region. *Am J Hum Genet.* 1996;59(3):653-63.
24. Le Hellard S, Neidhart E, Thomas P, Feingold J, Malafosse A, Tafti M. Lack of association between juvenile myoclonic epilepsy and HLA-DR13. *Epilepsia* 1999;40(1):117-19.
25. Bird TD, Jarvik GP, Wood NW. Genetic association studies: genes in search of diseases. *Neurology* 2001;57:1153-1154.