

SOLANGE CARVALHO DE SOUSA

**“ANÁLISE DE LIGAÇÃO EM EPILEPSIA MESIAL TEMPORAL FAMILIAR,
UTILIZANDO A ESTRATÉGIA DO GENE E/OU *LOCI* CANDIDATO”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de mestre em Ciências Biomédicas.

Orientação: Profa. Dra. Iscia T. Lopes Cendes

FCM-UNICAMP

Outubro de 2000

Apoio: FAPESP

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL**

SOLANGE CARVALHO DE SOUSA

**“ANÁLISE DE LIGAÇÃO EM EPILEPSIA MESIAL TEMPORAL FAMILIAR,
UTILIZANDO A ESTRATÉGIA DO GENE E/OU *LOCI* CANDIDATO”**

FCM-UNICAMP

Outubro de 2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

DADE Re
CHAMADA UNICAMP
So85a
EX
MBO BCI 49850
OC 16.837/00
DX
NEÇO R\$ 11,00
ATA 04/06/00
CPD

CM00168290-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

310 242728

So85a Sousa, Solange Carvalho de
 Análise de ligação em epilepsia temporal mesial utilizando
a estratégia do gene e/ou *Loci* candidato / Solange Carvalho de Sousa.
Campinas, SP : [s.n.], 2000.

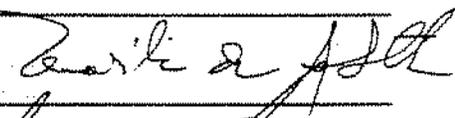
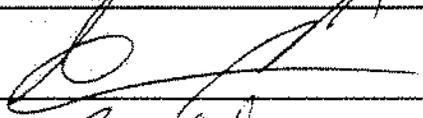
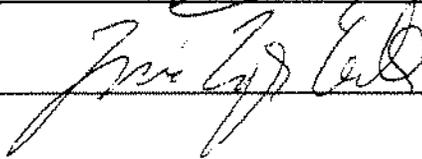
 Orientador : Iscia Lopes Cendes
 Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas.

 1. Epilepsia . 2. *Lobo temporal - Epilepsia. I. Iscia Lopes Cendes
. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Profa. Dra. Íscia Lopes Cendes

Membros:

1. Profa. Dra. Múrcia de Almeida C. Smith - 
2. Prof. Dr. Carlos Alberto M. Queiroz - 
3. Profa. Dra. Íscia Lopes Cendes - 

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 16.10.00

200224624

Agradeço a Deus, por tudo.

Dedico

Aos meus pais, Edgar e Inácia,
por me darem equilíbrio e discernimento em todos
os momentos da minha vida

Ofereço

Aos meus irmãos e cunhado (Edwardo, Ewerton, Soraya e David)
pelo carinho e incentivo de todos os momentos
Aos meus sobrinhos, Ricardo e Rhayssa pelo carinho, e pelo amor

AGRADECIMENTOS

A Profa Dra Iscia Lopes Cendes pela oportunidade e pela orientação durante a realização deste trabalho

A Profa Dra Carmen Silvia Bertuzzo, pela oportunidade nos primeiros momentos e pelas sugestões nos momentos mais oportunos

A Profa Dra Christinne Hackel (Chris), pelo carinho e pela grande orientação quanto coordenadora do curso de Pós-Graduação

Ao Prof Dr César Autran, pelos ensinamentos, incentivo, carinho e amizade (UFRN)

A Dr Tarcisio pela amizade e incentivo (UFRN)

A Heliane Serra pelas lições de vida

A Milena, pela amizade sempre

A Tereza, pela contribuição na minha formação profissional, pelas sugestões e críticas quanto à dissertação, pelo incentivo e amizade

A Flávia, pelas horas de desabafo..... por tudo

A Maria Francisca, sempre junto em tantas extrações de DNA, protocolos...

A Maria Eugenia e Marilza , pela agradável convivência e momentos de descontração

A Leonardo Chagas, por toda parte de programação do Linkage e editoração

Aos Colegas do departamento de Genética Médica

A Cristina Rosa e as Profas Dras Shirley e Hiedi do departamento de Biologia Celular (IB/UNICAMP), meu muito obrigada

A Eliane Kobayash e Fernando Cendes pelo empenho e dedicação, com todos os detalhes clínicos indispensáveis à realização desse trabalho (Depto.de Neurologia)

Em especial, aos pacientes e seus respectivos familiares, sem os quais esse trabalho jamais teria sido realizado

A Marcinha e a Carmen, secretarias do curso de Pós-Graduação, sempre ajudando, mais que possível

A Fundação de amparo a Pesquisa do estado de São Paulo/ **FAPESP** pelo apoio financeiro para realização desse projeto

PESQUISA

Palavra pequena com a característica de ser insinuante, penetrante, como o olhar do pesquisador que se assemelha ao da águia, capaz de enxergar o mais profundo à procura de sua presa que tenta de todas as maneiras fugir

Assim é a pesquisa, uma busca, uma caça, onde a presa se camufla para despistar sua presença, seu rastro, deixando o caçador numa estrada com várias opções a seguir na busca da verdade, não a verdade momentânea que muda com a moda da ciência, a verdade única e imutável

A pesquisa muito se assemelha a uma jornada, com início, meio e fim e os instrumentos a nos auxiliar. E como em uma jornada, crêem que o sucesso será alcançado quando cruzamos a linha de chegada e formos aplaudidos pelos que nos esperavam; sinto muito desapontar quem pensa assim, mas o sucesso esta na jornada, que ao iniciarmos trazemos a imaturidade da falta de conhecimento, nos deixando por vezes sem rumo, e nos sentimos pequenos perante o mundo

Ao terminarmos não só realizamos um trabalho, mas sim tivemos toda uma aprendizagem que nos tira da posição de aluno e nos coloca na de mestre; não do que já aprendeu tudo, mas sim do mestre que sempre terá algo a ensinar e muito mais a aprender

Parabéns Solange, do seu irmão e família que te amam muito

Rio, Natal e Campo Grande (MS)

Ewerton Carvalho de Sousa

INDICE

ABREVIACOES.....	xiii
SUMMARY.....	xv
RESUMO.....	xvi
1.INTRODUÇAO E REVISÃO DA LITERATURA.....	17
1.1 Histórico:.....	18
1.2 Definio.....	19
1.3 A epilepsia de lobo temporal.....	20
1.4 Mecanismos de epileptogênese na epilepsia de lobo temporal.....	21
1.5 Métodos de investigao genética.....	25
1.6 Estudos genéticos nas epilepsias.....	28
2-ASPECTOS TICOS.....	31
3-OBJETIVO.....	33
4- CASUÍSTICA.....	35
5- MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
5.1 Análise molecular	39
5.1.1: Extrao de DNA.....	39
5.1.2 Seleo dos genes e/ou loci candidatos.....	40
5.1.3 Genotipagem dos marcadores selecionados.....	40
5.2 Análise de ligao.....	41
6- RESULTADOS.....	43
7- DISCUSSÃO.....	47

8- CONCLUSÃO.....	51
9- PESRPECTIVAS FUTURAS.....	53
10- ANEXO.....	55
11- FIGURA 1.....	59
12- FIGURA 2.....	68
13- TABELAS DE LOD SCORES.....	73
14- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

ABREVIACÕES

EP – Epilepsia parcial

ELT – Epilepsia de Lobo Temporal

ELTM - Epilepsia de Lobo Temporal Mesial

ILAE – Liga Internacional contra Epilepsia

Ach – Acetilcolina

SNC – Sistema nervoso central

GABA - Receptor para o ácido gama-amino-butírico.

CHRNA₄ . Subunidade α_4 do receptore nicotínico

PIC – *Polymorphism Information Content*

PCR – Reação em cadeia da polimerase

Taq – DNA polimerase extraída da bactéria *Termophilus aquaticus*

DNA –  cido desoxirribonucléico

RNA –  cido ribonucléico

TRIS – Tris (hidroximetil) aminometano

KCl – Cloreto de potássio

M - Molar

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

rpm - rotações por minuto

ml - Mililitro

 l - Microlitro

SDS - Lauril sulfato de sódio

RSB – Tampão a base de cloreto de magnésio e cloreto de potássio

mg - Miligrama

°C – Grau celsius

mM - Milimolar

dNTP – Deoxi nucleotídeo trifosfato

dATP– Deoxi adenosina trifosfato

dCTP– Deoxi citosina trifosfato

dGTP– Deoxi guanina trifosfato

μCi - microcurie

\square **³³P dATP** - Deoxi adenosina trifosfato marcado radioativamente com fósforo 33

U - Unidade

pb – Pares de base

SUMMARY

Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most common form of epilepsy in adults. TLE has been recently described in 25 pedigree of Brazilian origin. Detail clinical histories and pedigrees from all families identified were obtained. All families reported showed an autosomal dominant inheritance with incomplete penetrance. Epilepsy was classified according to the ILAE. We selected 14 of these families for linkage studies. We tested 70 polymorphic microsatellite markers in candidate regions on chromosome (ch) 4, 6, 7, 8, 10, 11, 15, 19, 20, 21, 22. Lod scores were obtained combined for all families and excluded linkage to all candidate regions.

Keywords: Temporal lobe epilepsy, linkage, microsatellite markers, lod score.

RESUMO

As epilepsias formam um grupo de síndromes neurológicas crônicas, com aspectos heterogêneos.

Atualmente as epilepsias são vistas como doenças de herança genética complexa não apresentando total correspondência entre o genótipo e o fenótipo.

Esse trabalho teve como objetivo, investigar a existência ou não de ligação genética entre genes e/ou *loci* candidatos em 14 famílias que segregam ELT familiar mesial, a partir de 18 *loci* candidatos que foram selecionados por possuírem algum significado biológico a patogênese das epilepsias: receptores GABA, receptores nicotínicos, receptores adrenérgicos, receptores para o glutamato e receptores NMDA e AMPA. Além disso, incluímos 2 *loci* candidatos previamente mapeados em famílias com epilepsia parcial: nos cromossomos 20q e 10q. Um total de 14 famílias foi genotipada para 70 marcadores polimórficos de DNA, flanqueando as regiões candidatas descritas acima. *Lod scores* de dois pontos foram calculados para todas as 14 famílias combinadas, assumindo um padrão de herança autossômico dominante com 75% de penetrância. Encontramos *lod scores* negativos para todos os 70 marcadores genotipados. Desses, excluimos ligação entre o gene para ELT mesial em nossas famílias e os 18 *loci* candidatos pesquisados em nosso trabalho. Tal exclusão corresponde a 25% do genoma autossômico humano para epilepsia.

1 – INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 - Histórico

As epilepsias, assim como as doenças mentais, são descritas desde a antiguidade.

Concepções relacionadas à causa, ao tratamento e à cura, vêm se alterando com o decorrer dos séculos. As mais antigas descrições sobre epilepsia datam de 3500 a.c. em povos egípcios e sumérios, porém tais relatos estavam diretamente associados com religião e superstição. A Epilepsia foi também denominada Doença Sagrada, onde várias hipóteses sobre a origem dessa denominação foram estabelecidas (YACUBIAN, 2000).

O primeiro a afirmar, aproximadamente em 400 a.c., que a causa da epilepsia não tinha ligação com fenômenos sobrenaturais foi Hipócrates (Pai da Medicina). Foi na Idade Média, que todos os tabus que vigoram até hoje sobre as epilepsias tiveram início (YACUBIAN, 199). Nesta época, estabeleceu-se uma forte relação da epilepsia com a deficiência mental (YACUBIAN, 1999). Há informações de que várias celebridades históricas foram acometidas de epilepsia, entre outros, Aristóteles, Sócrates, Phitagoras, Ludwing van Bethoven, Lewis Carrol, Gustave Flaubert e Dostoievski (YACUBIAN e PINTO, 1998). Entre nós, encontramos relatos sobre Machado de Assis, o qual apresentava epilepsia localizada sintomática com crises parciais complexas secundariamente generalizadas e etiologia desconhecida (GUERREIRO, 1992, YACUBIAN e PINTO, 1998).

1.2- Definição

As epilepsias formam um grupo de síndromes neurológicas crônicas, com aspectos heterogêneos, caracterizadas por disfunções das descargas neuronais, que ocorrem de forma sincrônica e desorganizada. Segundo os estudos de Jackson, que datam do século passado, a epilepsia é definida como uma descarga nervosa temporária e excessiva de poucas células, onde o nível de tensão e instabilidade fica acima do resto das células nervosas (JACKSON, 1931). Atualmente sabe-se que esse distúrbio passageiro da função neuronal leva à crise epiléptica, que é a manifestação clínica característica desse grupo de doenças (ENGEL e PREDLEY,1997). As crises são geradas por descargas paroxísticas anormais de neurônios cerebrais em processos que afetam a excitabilidade cortical. As epilepsias são uma das condições neurológicas mais comuns, ocorrendo em aproximadamente 1.0% a 1.5% da população geral (HAUSER,1997). A Classificação das Epilepsias e Síndromes Epilépticas, proposta pela *International League Against Epilepsy* (ILAE), divide as epilepsias em generalizadas e parciais (COMMISSION on Classification and Terminology of the International League against Epilepsy,1989). Nas epilepsias generalizadas, a descarga epiléptica envolve todas as regiões do córtex cerebral, enquanto que, nas epilepsias parciais, são acometidas inicialmente áreas circunscritas do córtex, geralmente, áreas sensoriais, onde um foco epileptogênico distinto pode ser identificado. Por sua vez, as epilepsias parciais são divididas em: idiopáticas, sintomáticas e criptogênicas (ENGEL,1989), de acordo com fatores etiológicos de base.

O grupo das epilepsias idiopáticas corresponde a aproximadamente 50% do total das epilepsias humanas (ENGEL, 1989), possuindo uma predisposição genética bastante evidente.

1.3 - A Epilepsia de lobo temporal (ELT)

As epilepsias caracterizam-se por crises epilépticas recorrentes, que correspondem à expressão clínica de um distúrbio cerebral funcional, podendo se correlacionar, em alguns casos, com alterações anatômicas envolvendo a córtex cerebral (tumores, alterações displásicas ou outras anormalidades histológicas) (JASPER, 1941). As crises parciais simples (CPS), que se caracterizam pelo não comprometimento da consciência do lobo temporal, envolvem geralmente manifestações vegetativas/autonômicas, com mal estar epigástrico e/ou fenômenos psíquicos intelectuais, como medo súbito imotivado. Já as crises parciais complexas (CPC), que ocorrem na ELT, levam a alterações da responsividade, com automatismo simples e complexo e posturas distônicas. São as mais freqüentes em adultos, tendo uma porcentagem correspondente a mais de 50% dos casos (FISHER, 1989). As crises parciais na ELT podem evoluir para a crise tônico-clônica-generalizada (CGTC), principalmente em pacientes não tratados com medicamentos (CENDES, KOBAYASH, 2000).

A epilepsia de lobo temporal familiar possui características heterogêneas, tanto nos aspectos clínicos como nos aspectos genéticos. Até o momento, duas formas de epilepsia de lobo temporal foram caracterizadas, sendo elas a epilepsia de lobo temporal lateral (ELTL) e a epilepsia de lobo temporal mesial (ELTM). Recentemente, Ottman e colaboradores descreveram uma família com epilepsia de lobo temporal lateral, a qual apresentou ligação no cr 10q; Poza e colaboradores descreveram uma família de origem Basca, com epilepsia de lobo temporal lateral, a qual apresentou ligação no cr 10q, entretanto Berkovic descreveu um grupo de famílias com focus de ELTM, as quais não estavam ligadas ao cr 10q.

A epilepsia de lobo temporal mesial possui perfil clínico bem definido. Geralmente a primeira crise se manifesta entre a primeira infância e início da adolescência, sendo a primeira manifestação ictal CTCG e/ou CPC.

Há controvérsias sobre evidências de que a epilepsia mesial temporal familiar esteja associada a distúrbios de memória, tais como a psicose e a depressão, que são características maiores em outras formas de epilepsia (ENGEL, BRANDLER GRIFFITH *et al*, 1993). Pouco se sabe sobre a história natural da ELTM, uma vez que apenas pacientes com crises resistentes a tratamento medicamentoso se submetem à cirurgia, possibilitando com isso que se estabeleça o diagnóstico anatomopatológico definitivo.

Algumas formas de epilepsias parciais já foram descritas, entre elas temos: a epilepsia parcial com sintomas auditivo autossômico dominante, descrita em apenas uma família, a qual apresentou ligação no cr 10q (OTTMAN, RISCH, HAUSER *et al*, 1995); a epilepsia frontal autossômico dominante, com ligação no cr 20q em uma família australiana, cujo gene codifica a subunidade α^4 do receptor nicotínico da acetilcolina, mapeado na mesma região do cr 20q (PHILLIPS; SCHEFFER; BERKOVIC *et al* 1995) e a epilepsia parcial familiar com focos variáveis autossômico dominante, mapeada no cr 22q (XIONG, LABUDA, LI *et al*, 1999).

1.4 Mecanismos de epileptogênese na epilepsia de lobo temporal

A partir dos anos 40, as epilepsias foram associadas a fatores genéticos (LENNOX, 1951). Entretanto, apenas nos anos de 70 (ANDERMANN, 1972 e 1982), foi proposto o modelo multifatorial para as epilepsias, onde fatores genéticos e ambientais interagem

na determinação do fenótipo. Atualmente as epilepsias são reconhecidas como doenças de herança genética complexa (LEPPERT, McMAHON, QUATTLEBAUM, *et al* 1993), onde podemos citar, entre outras doenças com padrão genético complexo, a esquizofrenia, a psicose maníaco-depressiva e a hipertensão arterial.

Doenças com padrão de herança complexa são definidas como aquelas que não apresentam total correspondência entre o genótipo e o fenótipo. Os fatores que podem ser responsáveis por essa complexidade são: presença de fenocópias (imitação de fenótipo que é geralmente determinado por genótipo específico), penetrância incompleta (não manifestação do genótipo em todas as gerações), heterogeneidade genética (ocorrência dos mesmos fenótipos ou similares a partir de mecanismos genéticos diferentes), alta prevalência na população e padrão de herança multifatorial ou poligênica (combinação de fatores genéticos e possivelmente ambientais) (KING e STANSSFIELD, 1997; THOMPSON, McINES e WILLARD, 1993).

A predisposição genética é mais evidente nas epilepsias idiopáticas (LENNOX, 1951 e McKHAM e SHOOTER, 1969).

No princípio, acreditava-se que somente as epilepsias generalizadas idiopáticas apresentavam um forte componente genético e que as formas parciais eram predominantemente causadas por fatores ambientais (LENNOX, 1951 e METRAKOS e METRAKOS, 1961). Contudo, os estudos clínicos e eletrencefalográficos realizados por Andermann (ANDERMANN, 1972) e colaboradores foram incipientes no que diz respeito ao envolvimento de fatores genéticos também nas epilepsias parciais idiopáticas, as quais contribuem para a etiologia em 40% dos pacientes acometidos por essa patologia.

Os recentes avanços no entendimento das bases genéticas para a herança das epilepsias têm se dado a nível molecular. Com o desenvolvimento da biologia molecular, as teorias sobre genes implicados na transmissão das epilepsias estão sendo finalmente comprovadas experimentalmente (STEILEIN e EMULLER, 1995 e LEPPERT, McMAHON, QUATTLEBAUM, *et al* 1993).

Alterações nos mecanismos de regulação, exercidas por receptores neuronais específicos, podem ocasionar uma descarga sincrônica de neurônios, sendo esta a característica neurofisiológica dos mecanismos epileptogênicos. Uma alteração genética que esteja ligada a qualquer um desses mecanismos pode ocasionar a epilepsia (WATSON, GILMAN, WITKOWSKI, *et al*, 1997 e LOPES-CENDES, 1995).

Os estudos em modelos experimentais para epilepsia têm possibilitado uma grande ferramenta para o entendimento da fisiopatologia desta doença, sobretudo os modelos animais que reproduzem ELT em humanos.

O aumento da predisposição do tecido nervoso a crises epiléticas está relacionada a anormalidades no sistema de neurotransmissão do sistema nervoso central, onde há um aumento na transmissão excitatória e/ou uma diminuição na transmissão inibitória (MELDRUM, 1984).

O glutamato é o mais comum sistema de transmissão excitatória no SNC dos vertebrados. Suas ações como transmissor sináptico produzem longas mudanças na excitabilidade neuronal, estrutura, função e viabilidade da migração neuronal sináptica/neuronal. Esses efeitos são produzidos pela ativação de classes de receptores (e análogos), os quais formam os canais iônicos ou ionotrópicos, sendo eles: Cainato (KA), AMPA (D-amino-3-hidroxi-5-metil-4-

isoxalepropionato), NMDA (N-metil-D-aspartato) e o receptor metabotrópico (ACPD 1-aminociclopentano-trans-dicarboxilato) (MELDRUM, 1991 e MICHAELIS, 1998).

Estudos demonstraram que, no hipocampo, córtex e/ou estriato, a ativação do receptor NMDA produz um padrão de disparos intermitentes com uma conseguinte despolarização no potencial de membrana (HERRLING, MORRIS e SALT, 1983). Estudos *in vitro* demonstram um padrão de atividade semelhante ao observado no foco ictal, onde há descargas epiléticas induzidas por agentes convulsivantes (DINGLELINE, RYNES, KING, 1986).

Ainda são controversas as questões quanto à concentração de neurotransmissores no tecido epilético humano.

Atualmente, existem os modelos experimentais genéticos, dentre os quais citamos o modelo do rato de Lhara, linhagem genética de ratos epiléticos denominados IGER (*Lhara's genetically epileptic rats*) e os modelos criados por indução farmacológica, como o modelo experimental induzido por pilocarpina, o qual evidencia um aumento na concentração de GABA no hipocampo, durante o estado de mal epilético e também durante o período de crises espontâneas e recorrentes. Já a fase silenciosa apresenta uma grande diminuição na concentração de GABA no hipocampo (CAVALHEIRO, 1990).

No modelo de epilepsia induzido por ácido caínico, evidenciou-se haver uma associação na redução do GABA com o efeito epileptogênico desta toxina (BEN-ARI., 1985).

1.5 Métodos de investigação genética

No início deste século, Thomas Hunt Morgan deu início aos estudos de ligação para o mapeamento genético, estabelecendo o fenômeno de ligação genética, onde dois pares de genes estariam localizados no mesmo par de cromossomos homólogos. Morgan sugeriu que, quando há pareamento de cromossomos homólogos na meiose, ocorre ocasionalmente uma troca física de partes desses cromossomos durante o processo de *crossing-over* ou recombinação. De outra forma, não havendo recombinação entre dois genes, dizemos que são transmitidos juntos “ligados” ao longo de gerações (OTT,1989). Quando a localização de um desses genes é conhecida, a posição do segundo pode ser inferida. A porcentagem de recombinação entre dois genes localizados no mesmo cromossomo é diretamente proporcional à distância física entre eles; quanto maior a distância entre os genes ligados, maior é a chance de haver uma recombinação entre eles e assim maior a proporção de meioses com *crossing* (MORGAN,1928). A unidade de medida dessa distância genética é chamada centimorgan (cM), nome dado em homenagem a Morgan, onde 1 cM corresponde a 1% de recombinação e a aproximadamente 1 milhão de pares de bases aminadas (OTT,1989 e BOTSTEIN, WHITE, SKOLNICK, e DAVIS, 1980).

Existem dois tipos abordagens básicas para o mapeamento de genes humanos que causam doenças: o primeiro deles é a clonagem posicional ou mapeamento físico, onde não se têm disponíveis alterações metabólicas e/ou os processos fisiopatológicos de base. O segundo é o teste de genes candidatos os quais estão relacionados com a alteração metabólica ou com mecanismos fisiopatológicos da doença (LEPPERT,1990 e ROSEMBERG,1990). Este último é um método

rápido e que levou à localização de quase todos os genes responsáveis pelas doenças do metabolismo intermediário (ROSEMBERG,1990).

A partir da utilização de polimorfismos (alterações pequenas em sequências de DNA entre diferentes indivíduos as quais não resultam em alterações fenotípicas), como marcadores genéticos para estudos em análise de ligação, a genética humana entrou na era molecular (BOTSTEIN, WHITE, SKOLNICK, *et al*, 1980).

Dispomos de duas classes de polimorfismos: os polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e os polimorfismos por números variáveis de sequências de DNA repetidas em tandem (VNTR).

Para a realização do mapeamento genético, é importante que os marcadores utilizados sejam bastante informativos. Esse alto grau de informação é característica de um tipo de marcador conhecido como microssatélite que são múltiplas cópias de seqüências curtas de DNA em tandem (dinucleotídeos, trinucleotídeos e/ou tetranucleotídeos), entre dois sítios de restrição. Com isso, os microssatélites (dinucleotídeos ou repetições CA) mostraram-se excelentes marcadores para análise de ligação genética, uma vez que o número de cópias de cada unidade de repetição em uma região do genoma pode ser significativamente diferente entre indivíduos na população (GUYER, e COLLINS, 1993).

A existência de ligação entre o marcador genético e o gene causador da doença deve ser testada estatisticamente. Existem dois métodos estatísticos para se testar a presença de ligação:

1) O método da verossemelhança (maximum likelihood) que utiliza o *lod score* -logaritmo de base decimal da proporção: probabilidade de ligação / probabilidade da ausência de ligação. Quando se tem um lod score maior ou igual a 3,00 (probabilidade de 1000:1 em favor de ligação)

a ligação é declarada estatisticamente significativa. Contudo, um lod score menor que -2,00 (probabilidade de 1:100 contra ligação) é suficiente para que a ligação seja excluída (OTT, 1989 e TERWILLIGER, e OTT, 1994). Nos casos mais simples, o *lod score* pode ser calculado manualmente, uma vez que, para situações mais complexas ou para famílias numerosas existem softwares [LIPED (OTT, 1984, LINKAGE (LATHROP, LALOUEL, LULIER., *et al.*, 1984)] que, a partir das informações de genótipo, fenótipo e estrutura da família, fazem o cálculo do *lod score* para valores diferentes da fração de recombinação. Além disso, outros parâmetros, incluindo modo de herança, penetrância, frequência gênica e frequência dos alelos dos marcadores, devem ser fornecidos ao programa para que os cálculos possam ser efetuados. As bases teórica e funcional desses programas (softwares) são semelhantes (OTT, 1989 e TERWILLIGER, e OTT, 1994). Esse método tem sido aplicado com muito sucesso em várias doenças que demonstram padrão de herança monogênico (ROSEMBERG, 1990; OTT, 1989 e GUSELLA, WEXLER, CONNEALLY, 1983).

2) Métodos não paramétricos: Segregação de alelos ("allele-sharing methods"). Este método tem o intuito de provar que o padrão de herança de uma região cromossômica não é consistente com segregação Mendeliana ao acaso (LANDER, e SCHORK, 1994). Seu mecanismo no estudo de indivíduos afetados, pertencentes a uma mesma família, tem o objetivo de determinar a frequência com que uma determinada cópia de uma região cromossômica é herdada a partir de um ancestral comum (KRUGLYAK, e LANDER, 1995). Assim, a proporção de alelos compartilhados por pares de indivíduos afetados, dentro de uma mesma família, é comparada com o valor esperado na segregação ao acaso; se existe um desvio significativo com relação ao valor esperado, a ligação é detectada (LANDER, e SCHORK, 1994 e KRUGLYAK e LANDER, 1995). Ainda não existem

parâmetros bem estabelecidos para determinar a significância estatística dos testes não paramétricos, contudo valores de $p \leq 0.0001$ são em geral considerados significativos, já que este é o valor associado ao lod score de 3,00 (RISCH, 1990). Existem alguns programas de computador que podem ser utilizados para os cálculos não paramétricos, entre eles: SAGE (ELSTON, BAILEY-WATSON, BONNEY, 1986, APM (WEEKS, e LANGE, 1988) e ESPA (SANDKUYL, 1989). Esses programas foram desenvolvidos mais recentemente e não estão tão bem validados como aqueles utilizados para testes paramétricos (*lod score*). Por este motivo, recomenda-se utilizar pelo menos dois deles para a análise do mesmo conjunto de dados (THOMSON, 1994). Para os cálculos não paramétricos, as informações a respeito do modo de herança e penetrância não são necessárias. Assim, estes métodos são ideais para o estudo de características fenotípicas complexas, nas quais o padrão de herança genética não é monogênico (DAVIES, KAWAGUCHI, BENNETT, *et al.*, 1994 e GENETIC SUSCEPTIBILITY & COMPLEX TRAITS, 1996).

1.6 Estudos genéticos nas epilepsias

Segundo os estudos de Lennox, que datam dos anos de 1950 e 1960, as epilepsias foram evidenciadas cientificamente a partir de uma predisposição genética (LENNOX, 1960; METRAKOS e METRAKOS 1961). Ficou demonstrado que o risco de desenvolver epilepsia era de 1.5 a 5 vezes maior em indivíduos com história familiar de epilepsia, que em outros indivíduos da população em geral (ANDERMAN, 1982).

Estudos observaram que o risco de recorrência para familiares de pacientes com quadro clínico de epilepsia generalizada idiopática era aproximadamente duas vezes maior que o risco apresentado em pacientes com história de epilepsia parcial (ANDERMAN 1972).

Entretanto, atualmente, vários genes relacionados a formas distintas de epilepsia têm sido identificados, incluindo mutações que causam anormalidades no desenvolvimento cerebral, neurodegeneração progressiva, distúrbios no metabolismo energético e anormalidades funcionais dos canais iônicos, onde estão envolvidos genes de canais iônicos, nas subunidades dos receptores nicotínicos e também os canais de sódio e potássio voltagem-dependente (GARDINER,1999).

Recentemente, um novo *locus* para epilepsia generalizada foi encontrado no cromossomo 2q23 (LOPES-CENDES, SCHEFFER, BERKOVIC., *et. al.*2000).

Evidenciamos, na tabela I, os genes já identificados para algumas formas de epilepsias idiopáticas .

Tabela I: Genes já identificados para formas de epilepsias idiopáticas

Forma de Epilepsia	Loci	Gene	Herança
Convulsão neonatal familiar benigna	8q	KCNQ3	AD
Epilepsia generalizada idiopática com crises febris	19q	SNC1B	AD
Epilepsia de lobo frontal	20q	CHRNA4	AD
Convulsão neonatal familiar benigna	20q	KCNQ2	AD

Legenda:

KCNQ3: gene que codifica um tipo de canal iônico de potássio voltagem-dependente.

KCNQ2: gene que codifica um tipo de canal iônico de potássio voltagem-dependente.

SNC1B: gene que codifica a subunidade β_1 de um canal de sódio voltagem-dependente.

CHRNA4: gene que codifica a subunidade α_4 de um receptor colinérgico nicotínico.

2- ASPECTOS ÉTICOS

2- ASPECTOS ÉTICOS

Para assegurarmos um total sigilo quanto a todas as informações obtidas no nosso estudo, os questionários clínicos e as amostras de sangue e DNA recebiam uma identificação com apenas um código, atribuído logo no início da pesquisa. A associação entre o código e o nome do paciente era restrita à equipe de pesquisadores responsáveis. Um formulário de consentimento informativo para participação em pesquisa médica foi assinado por todos os participantes ou responsáveis (**ver anexo**). Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, parecer N° 006/98.

3– OBJETIVO

3 - OBJETIVO

O objetivo deste projeto foi investigar a existência ou não de ligação genética entre 18 genes e/ou *loci* candidatos em 14 famílias com a epilepsia de lobo temporal mesial identificadas em nosso serviço.

4- CASUÍSTICA

4- CASUÍSTICA

A identificação e seleção das famílias foram realizadas nos ambulatórios de epilepsia (adulto e infantil) do Departamento de Neurologia da FCM-UNICAMP, com a colaboração dos docentes responsáveis: Profa. Dra. Marilisa M. Guerreiro, Prof. Dr. Carlos A.M. Guerreiro e Prof. Dr. Fernando Cendes. O diagnóstico específico da síndrome epiléptica foi efetuado de acordo com os critérios estabelecidos pela Classificação das Epilepsias e Síndromes Epilépticas, proposta pela ILAE (ENGEL J JR, 1989). Foram colhidas amostras de todos os indivíduos afetados na família, de ambos os pais, irmãos (ãs) não afetados (as) e indivíduos que estabelecem a conexão familiar entre todos os indivíduos afetados dentro da mesma família.

Durante o nosso estudo, foram identificadas 22 famílias, segregando ELT, associada com semiologia ictal de início temporal mesial e anormalidades estruturais nas estruturas mesiais. Nós selecionamos 14 dessas famílias que apresentaram 2 ou mais indivíduos com o diagnóstico clínico de ELTM e cuja história de epilepsia está presente em apenas 1 ramo do casal fundador, perfazendo um total de 143 indivíduos selecionados para o nosso estudo, sendo 73 indivíduos afetados (51.3%). Foram considerados afetados todos os indivíduos com episódios recorrentes de crises.

Dentre as famílias selecionadas, entre os indivíduos afetados, todos possuem história de epilepsia na primeira infância, a partir dos 4 meses de idade, com episódios recorrentes de crises, as quais na grande maioria são controladas com o uso de drogas terapêuticas. Observamos, ainda, a ocorrência dos vários fenômenos que comprovam a complexidade das epilepsias, onde

podemos associar nas famílias de números 02, 03, 08, 10, 25 e na família de número 26, a possível presença dos fenômenos de fenocópia bem como penetrância incompleta (**Figura 1**).

5- MATERIAIS E MÉTODOS

5 - MATERIAS E MÉTODOS

5.1 - Análise molecular

5.1.1 - Extração de DNA

20 a 30 ml de sangue venoso foram colhidos de todos indivíduos recrutados para o estudo, os quais, na sua grande maioria, são provenientes da região sul do estado de Minas Gerais. As amostras foram centrifugadas a 1900 rpm por 10 minutos e a parte intermediária, onde estão localizados os leucócitos, foi transferida para um tubo de fundo cônico de polipropileno. Em seguida, foram adicionadas as soluções de RSB 1× (até completar um volume de 11ml) e 60µl de Nonidet. A solução foi então centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Três ml de solução SDS a 10% e 60µl de proteinase K (100 mg/ml) foram adicionados e as amostras incubadas a 37°C por 24 h. Após a incubação foram acrescentados 3 ml de fenol, seguido de centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos 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. A escolha desse protocolo, em nosso laboratório, foi efetuada pela sua capacidade de propiciar a extração de quantidade abundante de DNA, requerida para a genotipagem de um grande número de marcadores.

5.1.2 - Seleção dos genes e/ou loci candidatos

Nós selecionamos, para esse estudo, um total de 18 loci candidatos que possuíam algum significado biológico para a patogênese das epilepsias, são eles: receptores GABA, receptores nicotínicos, receptores adrenérgicos, receptores para o glutamato, receptores NMDA e receptores AMPA (PHILLIPS, SCHEFFER, BERKOVIC, *et al*, 1995, STEILEN, MULLERR, PROPPING, *et al*, 1995 e OTTMAN, RISCH, HAUSER, *et al*, 1995). Além disso, incluímos 2 loci candidatos previamente mapeados em famílias com epilepsia parcial (cromossomos 20q e 10q) (PHILLIPS, SCHEFFER, BERKOVIC, *et al*, 1995, e OTTMAN, RISCH, HAUSER, *et al*, 1995), (ver figura 2).

A seleção dos marcadores de DNA ou microssatélites (dinucleotídeos de repetições CA), para a genotipagem, flanqueando os genes e/ou loci candidatos descritos acima, foi feita a partir do mapa *genethon* (NIH/CEPH COLLABORATIVE MAPPING GROUP, 1992, WEISSENBACH, GAYAPAY, DIB, *et al* 1992), onde levamos em conta seu PIC ("polymorphism information content"), selecionando marcadores com $PIC \geq 0.75$, assegurando assim uma maior probabilidade de meioses informativas no nosso estudo.

5.1.3 - Genotipagem dos marcadores selecionados

Os fragmentos de DNA a serem genotipados foram obtidos a partir da amplificação do DNA *in vitro*, pela técnica da PCR ("Polymerase Chain Reaction"), a qual se baseia na amplificação enzimática de um fragmento de DNA, o qual é flanqueado por dois primers

(oligonucleotídeos sintéticos), que se hibridizam aos filamentos opostos da seqüência alvo, desencadeando a síntese da fita de DNA complementar. A amplificação exponencial da seqüência de DNA desejada é obtida a partir de ciclos repetidos de desnaturação pelo calor, hibridização dos primers e síntese enzimática desse DNA pela enzima *Taq* DNA polimerase. A reação de PCR foi composta de 40ng de DNA genômico; 125 ng de cada primer; 200 μ M de dGTP, dCTP e dTTP; 25 μ M dATP, 1.5 μ Ci [P33] dATP; 0.5unidades de *Taq* DNA polymerase (GIBCO®), 1.5mM de MgCl₂ e 2.0 μ l de tampão 10x. As amostras foram processadas durante 30 a 35 ciclos de desnaturação, anelamento e alongação a diferentes temperaturas otimizadas para cada marcador, em condições ideais de temperatura para cada primer selecionado nesse trabalho.

Os produtos da PCR foram, a partir de então, submetidos à eletroforese em géis de uréia 6% desnaturantes por aproximadamente 3 horas. Os géis foram secados a vácuo a 80°C por 2 horas e a leitura dos alelos foi feita por auto-radiografia após 48 horas de exposição a filmes de raio-X, em temperatura ambiente. Totalizando assim 10.010 reações de PCR e 140 géis para os 143 indivíduos estudados nas 14 famílias selecionadas.

5.2- Análise de ligação

Para a análise estatística dos dados obtidos, nós utilizamos o programa de computador LINKAGE, versão 5.1, com informações inseridas nos arquivos programados (PRE, PED e DAT). Ao diretório PRE, adicionamos as informações para o cálculo de ligação genética, referentes à disposição do indivíduo na genealogia (heredograma), filiação (pai e mãe), status clínico e a genotipagem dos marcadores em questão. Em seguida, passamos ao diretório PED,

onde, a partir dessas informações, um arquivo completo do heredograma é compilado. As informações relativas à frequência alélica dos marcadores e *Locus* da doença são então registradas na forma do arquivo DAT, utilizando o programa PREPLINK. Finalmente, utilizamos o diretório LCP (Linkage control program), para efetuar o cálculo do *Lod Score* para diferentes frações de recombinação. Os limites são 3.00 e -2.00 .

6- RESULTADOS

6 – RESULTADOS

Em nosso estudo, dentre as 14 famílias selecionadas, todos os dois pontos de *lod scores*, para os 70 marcadores genotipados, demonstraram resultados negativos (ver tabelas de *Lod Scores*). Com isso, nós excluimos ligação entre o gene para ELT mesial e 18 loci candidatos. Tal exclusão corresponde a aproximadamente 25% do genoma autossômico humano para epilepsia. Isto evidencia a grande heterogeneidade genética existente entre as formas de ELT, nas famílias analisadas em nosso estudo.

De acordo com os resultados demonstrados nos cálculos dos *lod scores*, observamos valores menores que -2 , a partir de diferentes frações de recombinação θ (0.0, 0.5, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40 e 0.45), entre os marcadores testados em relação ao *locus* para ELTMF. Considerando, ainda, que a distância flanqueante para todos os marcadores em nenhum caso superou 20 cM.

Assim, no cromossomo 4, selecionamos nove marcadores, para os receptores do glutamato e AMPA, na posição 4q25-q34.3. Os valores dos *lod scores* sempre se apresentaram negativos e exclusivos, de acordo com todas as regiões flanqueantes entre os marcadores.

No cromossomo 6, pesquisamos os *loci* para o braço longo e também para o braço curto, dos receptores do cainato (posições 6p12-q12). Os valores encontrados nos 16 marcadores selecionados foram sempre negativos. Nos marcadores D6S260, D6S291, D6S271, D6S422, D6S460, D6S283, D6S275 e D6S300, a 20cM, os valores se apresentaram negativos, entretanto maiores que -2 . Consideramos portanto, não significativos para esse intervalo. Excluimos no cromossomo 6, quase a totalidade dos marcadores existentes até o momento.

Para o cromossomo 7, nos *locus* candidatos dos receptores metabotrópicos, em 5 marcadores testados, apenas o marcador D7S669 apresentou um valor negativo não significativo, sendo portanto maior que -2. Considerando sempre uma distância de até 20cM, todos os valores foram de exclusão.

No cromossomo 8, para 9 marcadores testados, encontramos valores de exclusão até o intervalo de 15cM, entretanto a 20cM, para os marcadores D8S261, D8S505, D8S550, D8S560, D8S279, D8S272, os valores se mostraram entre o intervalo maior que -2 e menor que 3, não significativo.

No cromossomo 10, testamos 4 *locus* para epilepsia do lobo temporal lateral, para os quais foi encontrada ligação significativa em estudo feito numa família de origem Basca (POZA, SAENZ, MARTINEZ-GIL *et. al.*, 1999). Nossos valores excluíram ligação para os marcadores selecionados e o *locus* para ELTMF, uma vez que a distância máxima entre os marcadores foi de 5cM.

No cromossomo 11, testamos no braço longo 6 marcadores dos receptores AMPA. As frações de recombinação se mostraram sempre negativas e as distâncias entre os marcadores variaram entre 12 a 15cM. Entretanto, no intervalo de 20cM de fração de recombinação, apenas o marcador D11S927 foi significativo para excluir ligação nesse intervalo.

No cromossomo 15, testamos para o braço longo, na porção 15q11-q13, 9 marcadores para o gene que codifica a subunidade α_7 (CHRNA₇) dos receptores nicotínicos. Dentre esses, não foi possível excluir ligação em apenas dois marcadores, os quais se mostraram sempre inconclusivos, são eles os marcadores D15S126 e D15S205. Entretanto, percebemos que os

marcadores que flanqueiam as regiões acima e abaixo desses marcadores, excluem esses intervalos intermediários.

No cromossomo 19, pesquisamos 3 marcadores, no seu braço longo, nos quais excluímos ligação, flanqueando os intervalos estudados.

No cromossomo 20, testamos o gene que codifica a subunidade α_4 (CHRNA₄) dos receptores nicotínicos, o qual evidenciou ligação em uma família australiana, para a forma de epilepsia do lobo frontal autossômica dominante. Em nossa amostra de estudo, para ELTMF, excluímos também esse *locus*.

No cromossomo 21, testamos quatro marcadores para *locus* dos receptores do cainato. Obtivemos valores negativos para a exclusão no intervalo analisado.

Finalmente para o cromossomo 22, testamos 3 marcadores nos receptores para somastatina, excluindo ligação entre a ELTMF e os *loci* candidatos testados .

7- DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, houve um grande avanço no entendimento dos mecanismos básicos que envolvem a grande maioria das doenças acometidas por herança genética. Este fato se deu, a partir do desenvolvimento da genética molecular, respaldado pelos novos métodos e técnicas que levaram à identificação de um grande número de genes responsáveis por várias dessas doenças. Atualmente, conhecemos duas estratégias para chegarmos à localização de genes que causam doenças; uma delas é testar genes candidatos relacionados com alterações metabólicas ou com mecanismos fisiopatológicos da doença. Este método levou à localização de quase a totalidade dos genes responsáveis pelas doenças do metabolismo intermediário (ROSEMBERG, 1990). A outra é a clonagem posicional, onde não se tem o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos e/ou das alterações metabólicas da patologia em questão. Na clonagem posicional, utilizam-se técnicas de manipulação de DNA para o posterior mapeamento genético, que têm importância significativa no mapeamento genético de várias doenças neurológicas que possuem mecanismos complexos e pouco conhecidos (LEPPERT, McMAHON, QUATTLEBAUM, *et al*, 1993). Vale ressaltar a diferença entre mapeamento genético (de um *locus*) para a doença e a clonagem de um gene. Para o mapeamento de *locus*, utilizamos o estudo de ligação genética, por ser esse o passo inicial para a identificação de um gene que causa a doença, (OTT, 1989). Entretanto, muitas patologias, atribuídas por herança genética, continuam ainda obscuras. Este trabalho teve como principal meta a identificação de genes responsáveis pela forma idiopática de epilepsia parcial, a partir da seleção de genes candidatos, flanqueados com marcadores polimórficos (VNTRs).

É importante perceber que, apesar de já terem sido identificadas algumas formas de epilepsia familiar, a grande maioria das síndromes epilépticas e dos genes envolvidos nessa patologia permanecem ainda desconhecidas, embora vários estudos de mutações e também de expressão de proteínas em modelos animais experimentais estejam em desenvolvimento (BLUMCKE, BECKER, KLEIN, *et al.*, 2000).

O mapeamento de *loci*, a partir dos estudos de ligação genética, é o ponto inicial para se identificar genes que causam doenças. Os estudos de ligação são feitos em famílias que manifestam o fenótipo da doença em vários membros, ao longo de várias gerações. Percebemos que dois *loci*, quando se encontram próximos entre si, tendem a segregar juntos (ligados), de uma geração a outra, enquanto que dois *loci* distantes entre si, ao longo do mesmo cromossomo ou em cromossomos distintos, tendem a se separar por recombinação (*crossing-over*), durante a transmissão genética dos pais aos filhos (OTT, 1989).

Dessa forma, estudos de ligação envolvem a comparação da segregação da doença com a segregação dos marcadores genéticos espalhados no genoma e que possuem a localização bem definida. Logo, quando se detecta ligação entre a doença e o marcador, não havendo portanto recombinação genética, a localização do gene para a doença pode ser inferida, partindo-se do princípio de que já possuímos a localização do marcador estudado.

Em nosso estudo, as análises de segregação se mostraram como herança classicamente mendeliana autossômica dominante para todas as famílias estudadas. Todavia, a heterogeneidade genética tornou-se evidente em nossos resultados, obtidos a partir das análises estatísticas dos cálculos dos *lod scores*.

De acordo com os valores encontrados em nossos resultados, podemos excluir ligação genética para todas as regiões estudadas, uma vez que foi considerado sempre um intervalo máximo de 20cM entre os marcadores que flanquearam tais regiões.

Em conclusão, devido à grande complexidade presente nas diversas formas de epilepsia conhecidas, e devido a grande heterogeneidade genética, nossos resultados excluem ligação para as famílias selecionadas nesse estudo. A partir da seleção de 18 genes e/ou *loci* candidatos, e também da seleção do *loci* para epilepsia parcial de lobo temporal, sendo essa a forma mais comum de epilepsia evidenciada em adultos. Contudo, sugerimos que um estudo mais amplo e detalhado, havendo intervalos menores aos estabelecidos neste estudo, para todos os cromossomos autossômicos, efetuados de forma randômica, evidenciará ligação genética, propiciando a inclusão de vários outros genes responsáveis por formas diversas de epilepsia idiopática, conhecidas em nossa população.

Apesar das dificuldades em se estabelecer um estudo molecular para doenças humanas hereditárias, quando não há informações fisiopatológicas disponíveis, a análise de ligação ainda é um método eficaz para se localizar genes envolvidos em doenças complexas, tendo em vista o número de genes identificados até hoje em patologias de mecanismos complexos.

8 – CONCLUSÕES

8 – CONCLUSÕES

- 1- Excluímos ligação genética entre Epilepsia de Lobo Temporal Mesial Familiar e os 18 loci candidatos testados;
- 2- A Epilepsia de Lobo Temporal Mesial Familiar, em nossa amostra, não é uma forma alélica de outras epilepsias parciais idiopáticas: ELTFL (10q) e ELFAD (20q);
- 3- Demonstramos a existência de heterogeneidade genética entre as formas de epilepsias parciais idiopáticas, em conjunto com a literatura estudada;
- 4- Com a ausência de ligação ilustrada a partir da estratégia da pesquisa por genes candidatos, o próximo passo na tentativa de mapear o(s) gene (s) que predispõe(em) a ELTMF será a utilização da estratégia da busca genômica randômica (clonagem posicional). Confirmamos a complexidade nos mecanismos envolvidos na epileptogênese no homem.

9- PERSPECTIVAS FUTURAS

9- PERSPECTIVAS FUTURAS:

O entendimento de mecanismos neurofisiológicos das doenças genéticas ditas complexas tem possibilitado a utilização da análise de ligação genética, a partir do uso de genes candidatos, como ferramenta básica para a identificação molecular da grande maioria dessas patologias, sobretudo das epilepsias, onde várias formas de epilepsias parciais foram identificadas a partir de estudos de ligação.

Tendo em vista a grande dificuldade na identificação de famílias geneticamente informativas para um real estudo de ligação, partimos do princípio que neste estudo, uma vez selecionadas 14 famílias com detalhes de informações bastante relevantes para o entendimento da herança genética, devido à ausência de ligação evidenciada a partir da estratégia de pesquisa para genes candidatos, o próximo passo traçado pelo grupo de epilepsia do Laboratório de Genética Molecular, coordenado pela Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes, na tentativa de mapear o(os) gene (es) que predispõe (em) a ELTMF, será a utilização da estratégia da busca genômica randômica (clonagem posicional).

10- ANEXO



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.

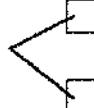
Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado

data

11- FIGURA 1

Legenda das Famílias com Epilepsia

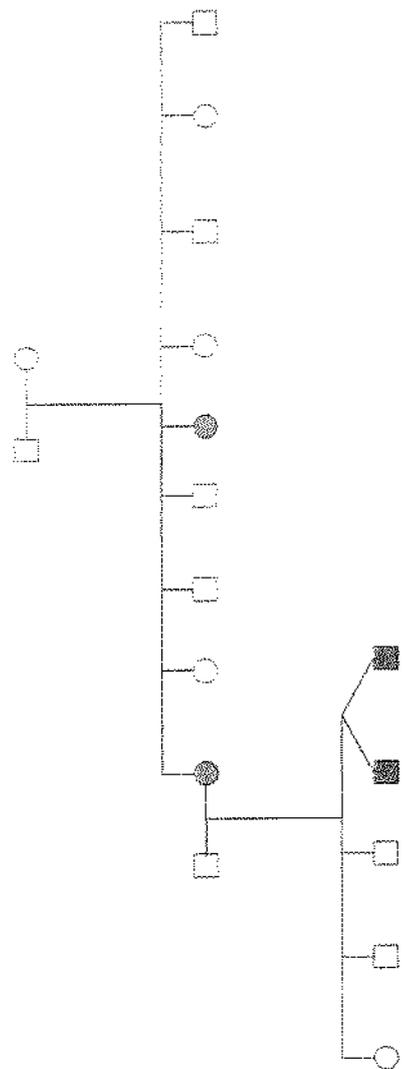
	Indivíduo do sexo masculino	
	Indivíduo do sexo feminino	
	Indivíduo do sexo masculino falecido	I - 1.....I n = Irmandade da primeira geração
	Indivíduo do sexo feminino falecido	II - 1.....In = Irmandade da segunda geração
	Indivíduo do sexo masculino afetado	III - 1...In = Irmandade da terceira geração
	Indivíduo do sexo feminino afetado	IV - 1...In = Irmandade da quarta geração
	Gêmeos do sexo masculino	V - 1...In = Irmandade da quinta geração
	Gêmeos do sexo feminino	
	Aborto	
	Indivíduo com sexo indeterminado	

Legenda

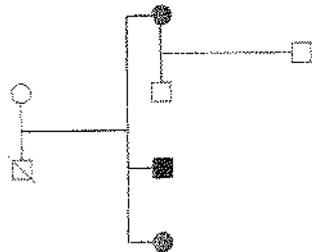
-   BTLE / Benigna TLE
-   BTLE / Benigna TLE com remissão
-   RTLE / Refratária TLE
-   RTLE / Refratária TLE com cirurgia
-   CF / convulsão febril
-   GTCS
-   Epilepsia parcial simples
-   Epilepsia generalizada simples
-   Possivelmente afetado
-   Não afetado
-  Afetado

Famílias com epilepsia de lobo temporal mesial

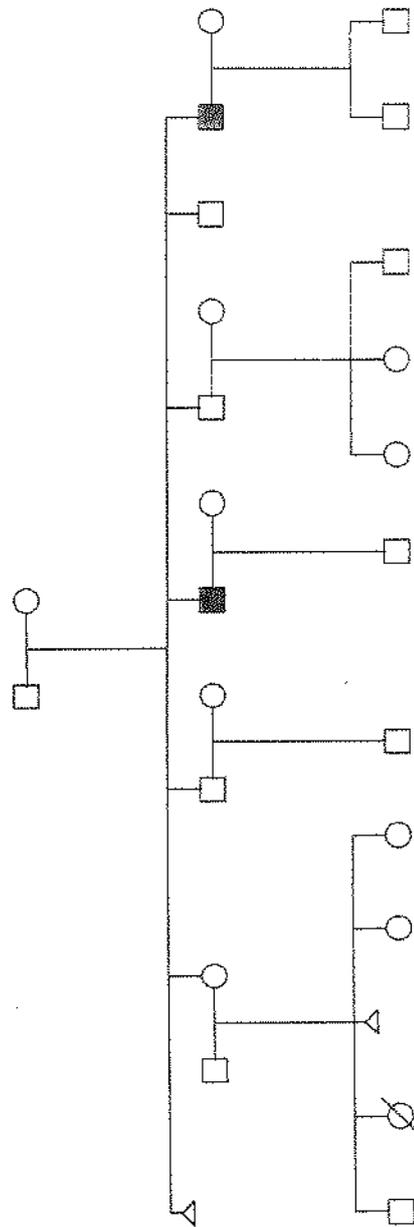
F-04



F-02

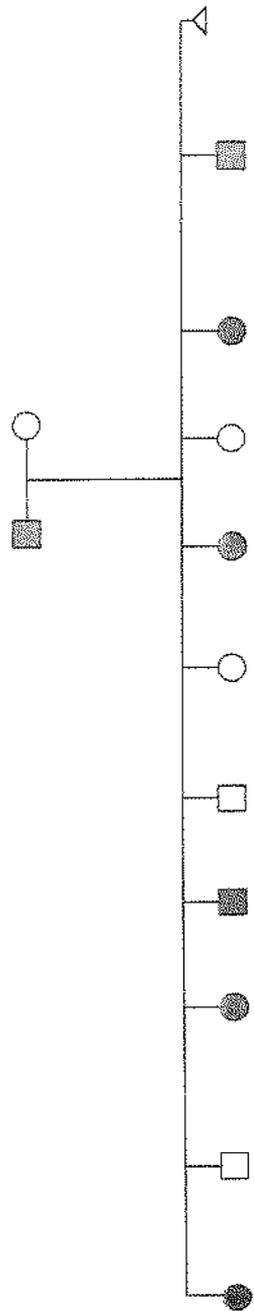


F-03

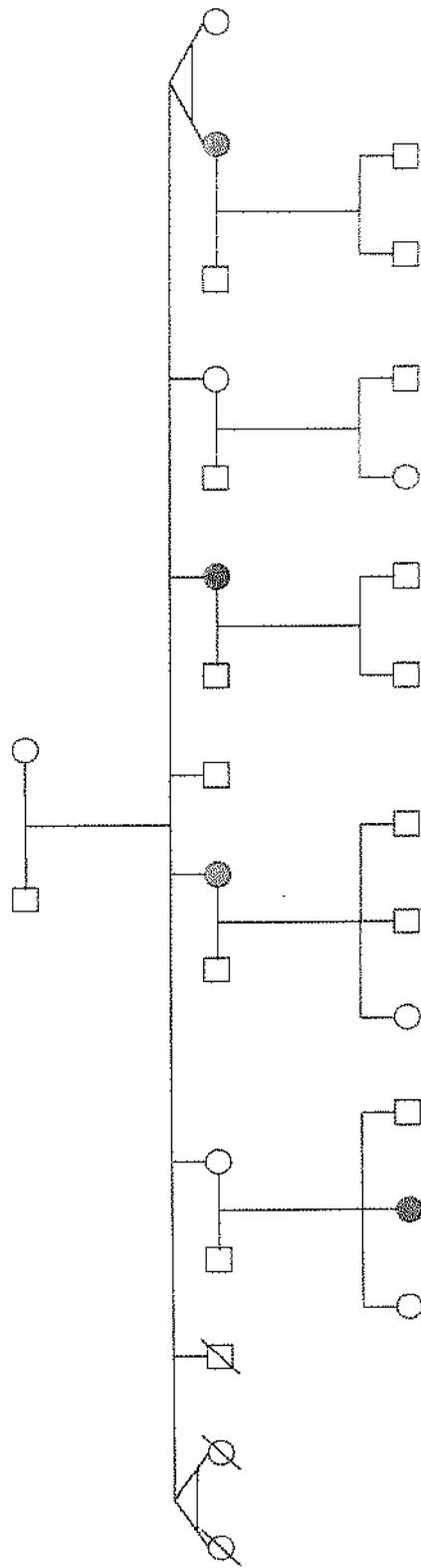


Famílias com epilepsia de lobo temporal mesial

F-07

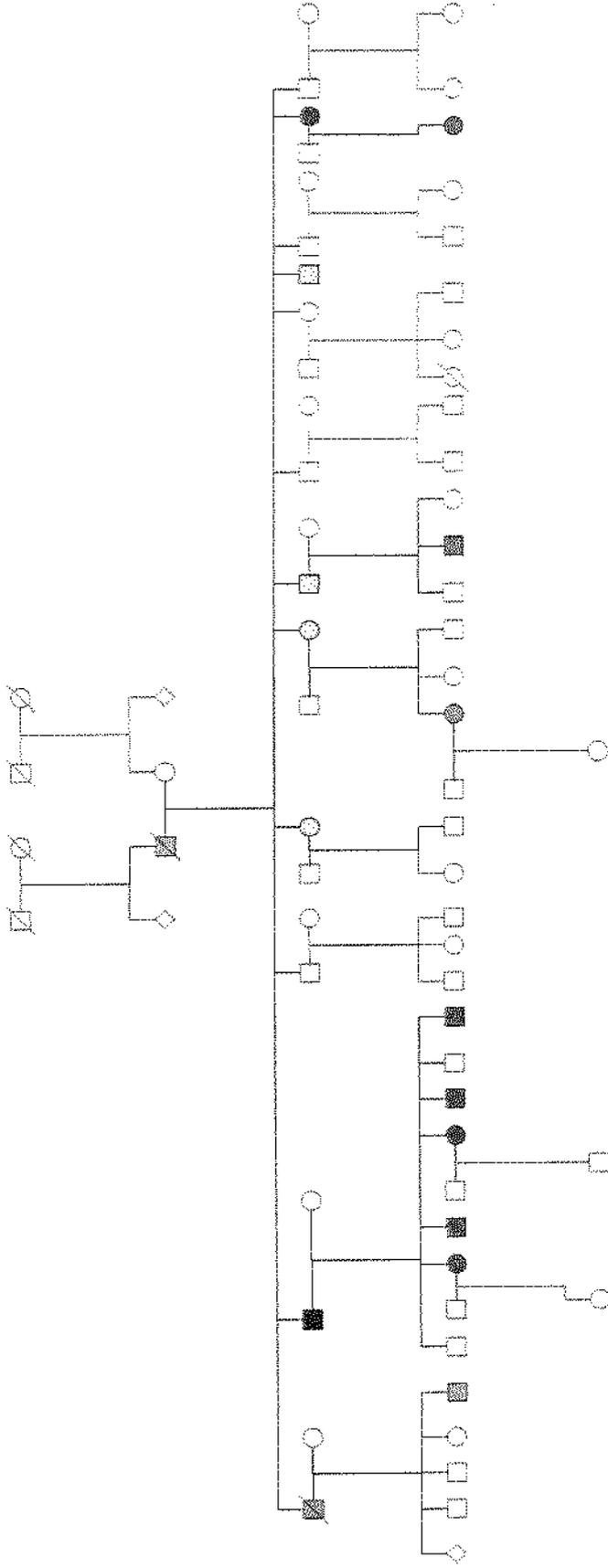


F-08

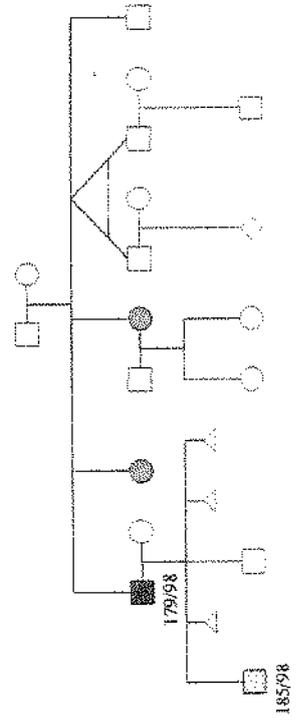


Famílias com epilepsia de lobo temporal mesial

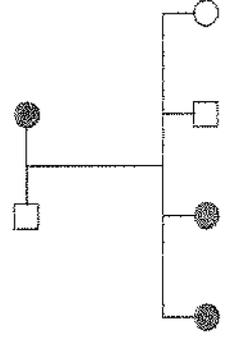
F-10



F-22

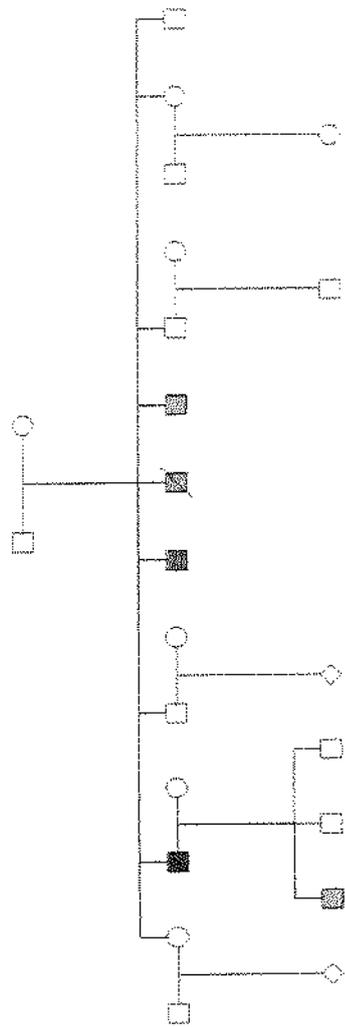


F-11

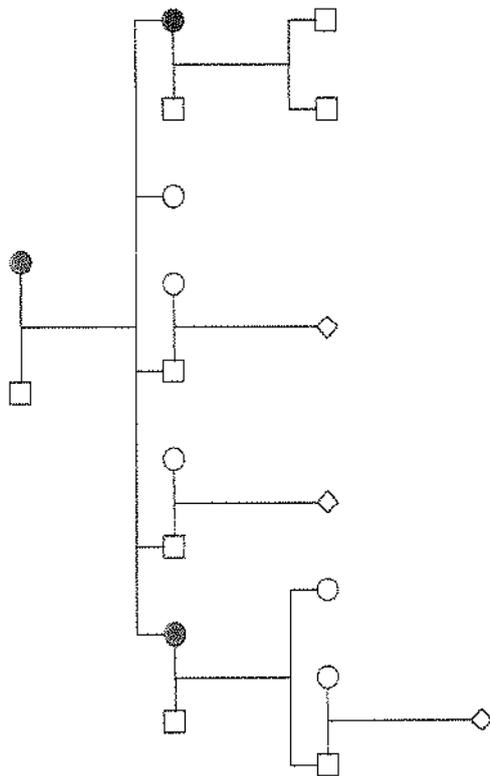


Famílias com epilepsia de lobo temporal mesial

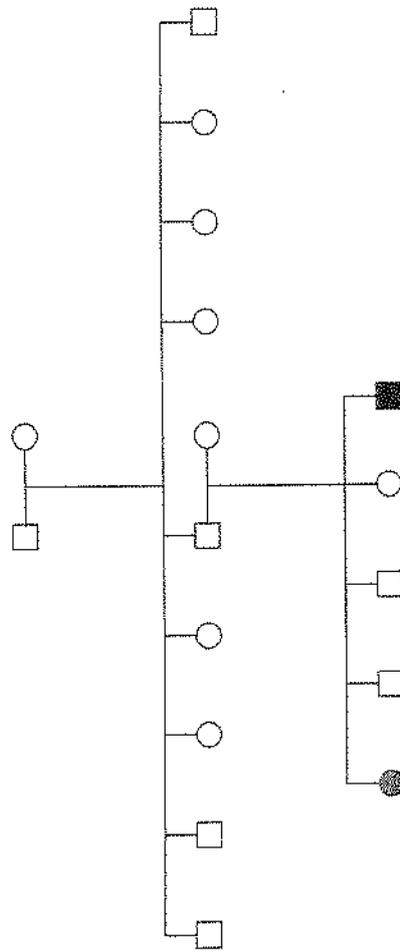
F-14



F-23

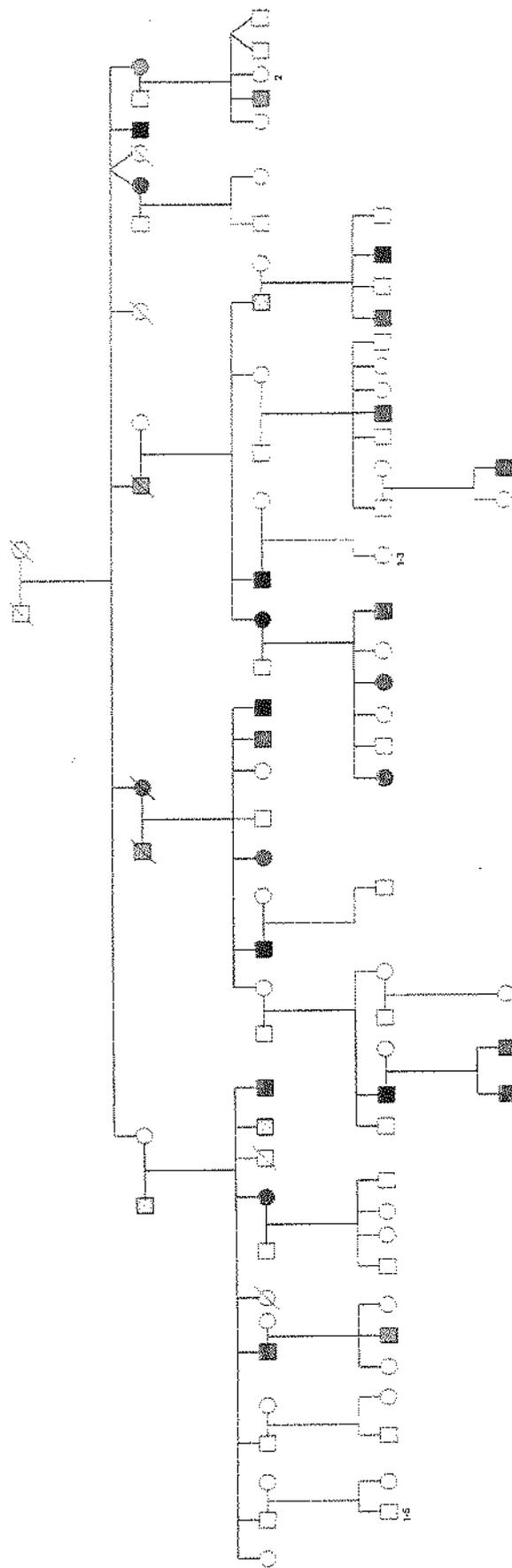


F-25



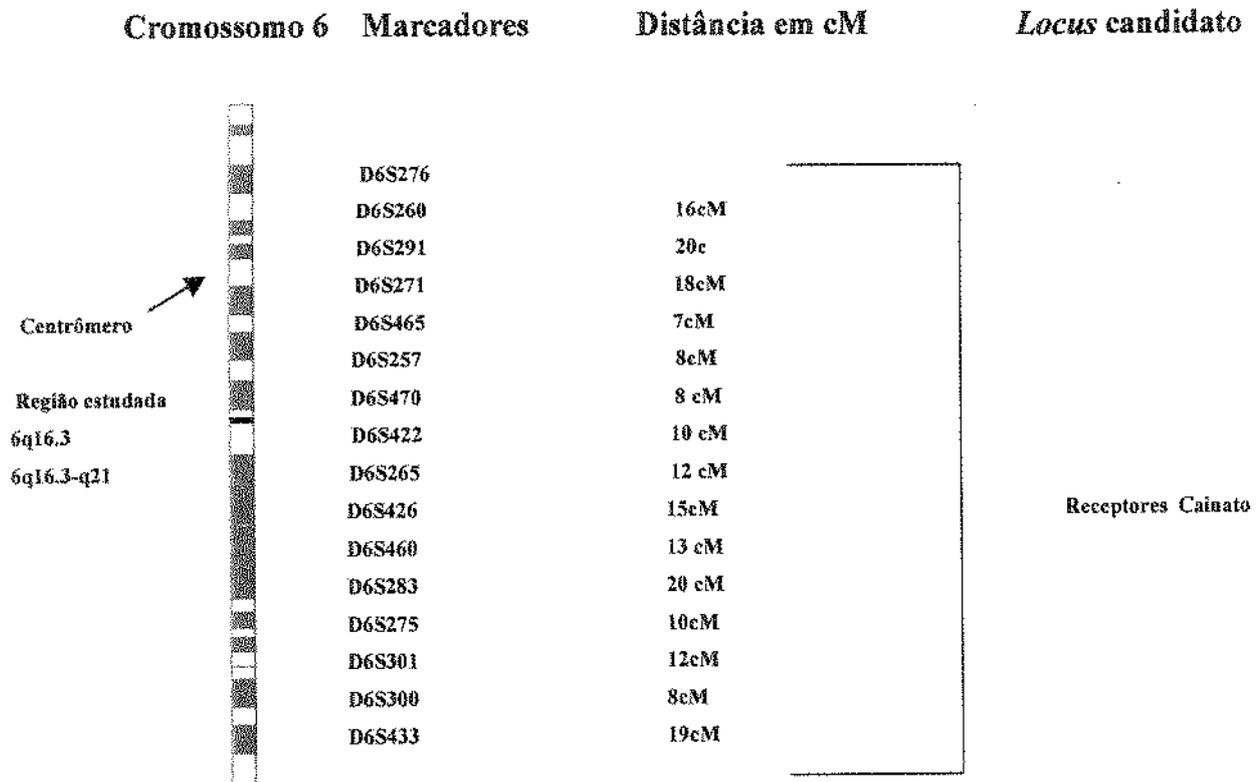
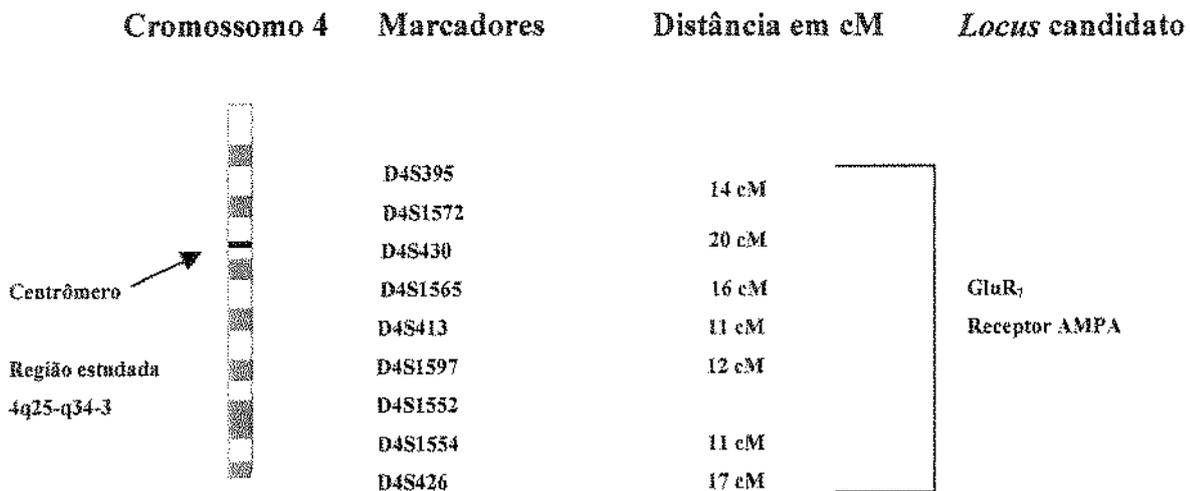
Famílias com epilepsia de lobo temporal mesial

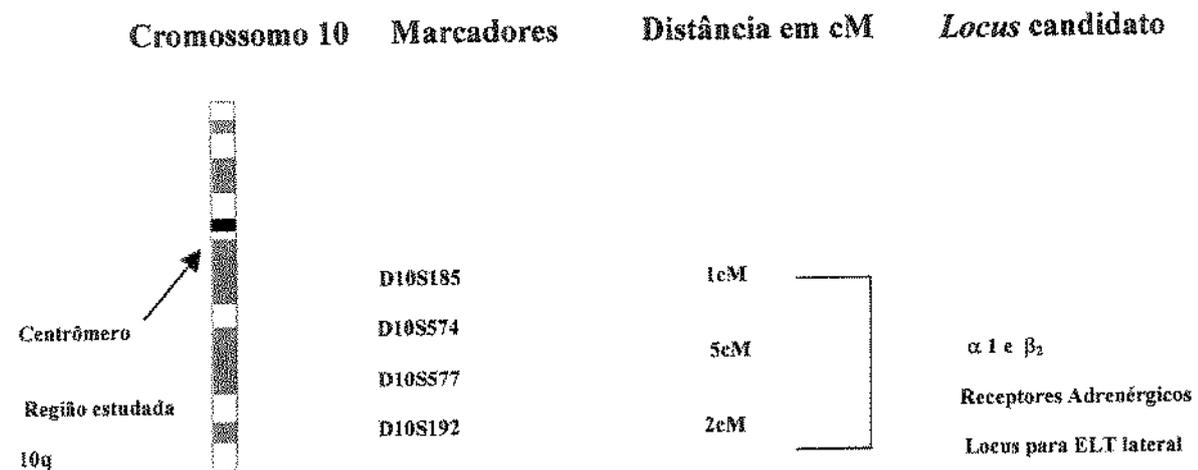
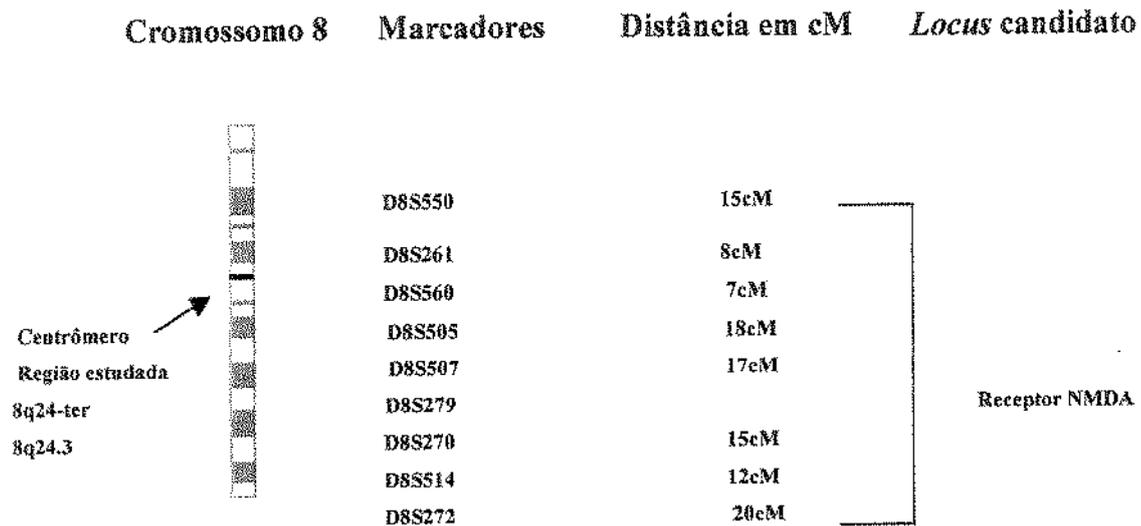
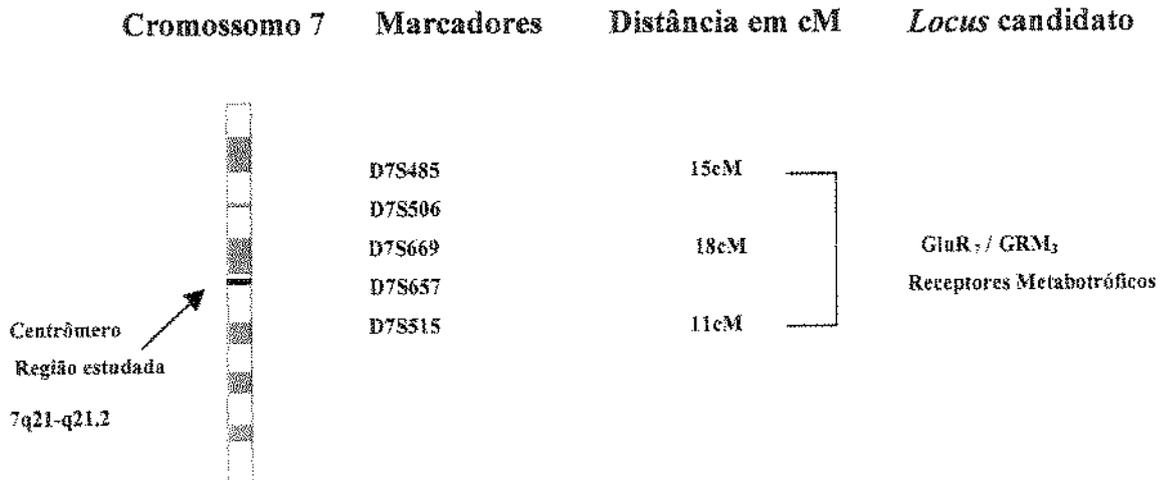
F-26

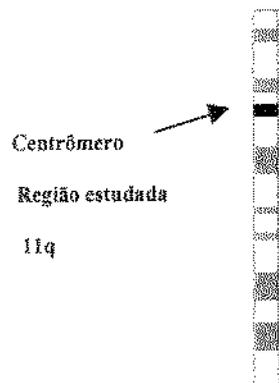


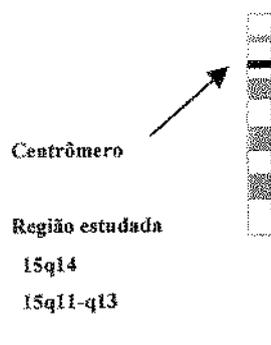
12- FIGURA 2

Figura 2: Esquema de idiograma dos marcadores testados para cada cromossomo neste estudo:

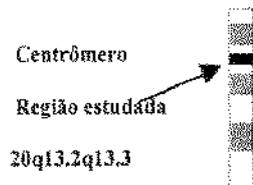




Cromossomo 11	Marcadores	Distância em cM	Locus candidato
 <p>Centrômero</p> <p>Região estudada</p> <p>11q</p>	D11S937	15cM	 <p>GRIA₄</p> <p>Receptores AMPA</p>
	D11S1332	12cM	
	D11S927	16cM	
	D11S925		
	D11S912	14cM	
	D11S968	16cM	

Cromossomo 15	Marcadores	Distância em cM	Locus candidato
 <p>Centrômero</p> <p>Região estudada</p> <p>15q14</p> <p>15q11-q13</p>	D15S128	13cM	 <p>α_5 e β_3</p> <p>Receptores GABRA₅ e GABRB₃</p> <p>α_7 (CHRNA 7)</p> <p>Receptores Nicotínicos</p>
	D15S165		
	D15S118	12cM	
	D15S126	15cM	
	D15S153	17cM	
	D15S205	18cM	
	D15S127	8cM	
	D15S207	16cM	
	D15S120	10cM	

Cromossomo 19	Marcadores	Distância em cM	Locus candidato
 <p>Centrômero</p> <p>Região estudada</p> <p>19q</p>	D19S413	5cM	
	D19S221		
	D19S226	6cM	

Cromossomo 20	Marcador	Distância em cM	Locus candidato
 <p>Centrômero Região estudada 20q13.2q13.3</p>	D20S93	_____	$\alpha 4$ (CHRNA ₄) Receptores Nicotínicos Locus para ELFAD

Cromossomo 21	Marcadores	Distância em cM	Locus candidato
 <p>Centrômero Região estudada 21q21.1-q22.1</p>	D21S1256	12cM	GLUR ₅ Receptores do canato
	D21S265		
	D21S1252	19cM	
	D21S1360	14cM	

Cromossomo 22	Marcadores	Distância em cM	Locus candidato
 <p>Centrômero Região estudada 22q12-q13</p>	D22S421	19cM	Bzrp Receptores para somatostatina
	D22S283		
	D22S274	13cM	

13- TABELAS DE LOD SCORES

Tabelas de Lod score:

Cr 4

Fração de Recombinação

Marcador	.0	.05	.10	.15	.20	.25	.30	.35	.40	.45
D4S430	-33.0026	-7.2884	-4.2454	-2.6102	-1.5878	-0.9200	-0.4865	0.218	-0.070	-0.065
D4S1554	-16.3850	-6.3098	-3.9388	-2.6107	-1.7643	-1.1917	-0.7922	-0.507	-0.298	-0.135
D4S1597	-18.0764	-5.0411	-4.267	-2.7104	-1.492	-1.0134	-0.9654	-0.670	-0.498	-0.125
D4S395	-20.4731	-14.0224	-8.9457	-5.601	-4.8856	-3.1794	-1.534	-0.504	0.415	-0.365
D4S1572	-12.558	-10.6431	-7.987	4.35674	-2.659	-1.0337	0.8764	0.4073	0.2976	-0.172
D4S1565	-19.7619	-12.0453	-8.9547	-6.65487	-4.764	-2.6657	-1.4639	0.1021	0.1046	-0.074
D4S413	-15.384	-13.199	-9.768	-5.471	-3.695	-2.2367	-1.634	1.0498	0.0758	-0.065
D4S1552	-13.022	-10.7459	-7.34785	-4.41257	-2.0114	-1.00365	0.1641	0.0457	0.0027	-0.135
D4S426	-20.5674	-16.7412	-9.534	-6.2388	-4.3257	-3.4769	-2.1735	-1.892	0.273	-0.124

Cr 6

Fração de Recombinação

Marcador	.0	.05	.10	.15	.20	.25	.30	.35	.40	.45
D6S470	-12.692	-3.4571	-1.3055	-0.2677	-0.1257	0.2874	0.3361	0.290	0.05564	0.0225
D6S257	-14.476	-2.6911	-1.4723	-1.7859	-0.2761	0.1360	0.1210	-0.361	-0.02889	0.0227
D6S276	-16.499	-5.0048	-2.6411	-1.7890	-0.3766	0.1274	0.1776	-0.332	-0.2176	-0.048
D6S465	-20.591	-13.192	-9.7810	-7.0519	-6.4213	-5.523	-2.8769	-0.876	-0.54776	0.0997
D6S433	-18.576	-6.1887	-4.9351	-3.4198	-2.6374	-1.9772	-1.2194	-0.687	0.07758	0.0054
D6S260	-15.224	-5.0257	-2.3873	-1.5476	-0.3665	0.1257	0.1114	-0.687	-0.578	-0.011
D6S291	-12.587	-3.3658	-1.4573	-0.3657	-0.1365	0.2254	0.3654	0.285	0.0455	0.0211
D6S271	-13.425	-4.6547	-1.4548	-1.658	-0.2469	0.1245	0.1124	-0.479	-0.0547	0.0337
D6S422	-15.345	-5.0479	-2.3114	-1.6578	-0.3722	0.1346	0.1246	-0.224	-0.2987	-0.024
D6S265	-21.475	-12.112	-9.7453	-7.0570	-6.6587	-5.511	-2.4978	-0.841	-0.5433	0.0229
D6S426	-18.475	-7.7812	-4.9332	-3.5794	-2.2498	-1.852	-1.7748	-0.872	0.08541	0.0547
D6S460	-11.987	-2.8725	-1.5874	-0.3712	-0.2579	-0.175	0.3456	0.272	0.04124	0.0341
D6S283	-13.657	-4.5401	-1.5400	-1.5074	-0.2333	0.1748	0.1972	-0.551	-0.0221	0.0117
D6S275	-14.322	-5.0241	-2.3554	-1.6982	-0.3047	0.1227	0.11102	-0.298	-0.2855	-0.021
D6S301	-20.474	-11.102	-8.5443	-7.0487	-6.6441	-5.032	-2.2544	-0.822	-0.5110	0.0211
D6S300	-15.424	-7.5412	-4.9441	-3.5874	-1.9922	-1.859	-1.7015	-0.844	0.00484	0.0046

Cr 7

Fração de Recombinação

Marcador	.0	.05	.10	.15	.20	.25	.30	.35	.40	.45
D7S657	-22.7634	-8.0123	-5.5142	-3.6508	-2.3976	-1.5110	-0.8782	-0.439	0.1588	0.0166
D7S515	-18.475	-6.3417	-4.235	-3.778	-2.4457	-2.3564	-1.0987	-0.256	-0.2411	-0.087
D7S485	-16.578	-7.5677	-6.4578	-4.651	-3.9348	-2.529	-1.468	-0.875	-0.5798	-0.224
D7S506	-19.487	-9.4687	-7.4683	-5.2247	-3.7519	-2.035	-1.2254	-1.024	-0.4796	-0.254
D7S669	-20.658	-7.3587	-6.4458	-4.7785	-1.2456	-0.786	-0.4365	-0.145	-0.0984	-0.054

Cr 8

Fração de Recombinação

Marcador	.0	.05	.10	.15	.20	.25	.30	.35	.40	.45
D8S261	-12.428	-2.2258	-1.0206	0.2267	-0.12818	0.34269	0.4278	0.3782	0.3604	0.0269
D8S505	-26.2229	-5.00447	-2.7234	-1.44960	-0.77646	0.38491	-0.16157	0.0385	.0297	0.3679
D8S270	-19.5207	-11.822	-9.9797	-7.04895	-5.01154	-3.52341	-2.39901	-1.255	0.7708	0.2795
D8S507	-20.8627	-8.1991	-4.9087	-3.5687	-2.53076	-1.78345	-1.07487	0.7655	0.4677	0.2795
D8S550	-12.854	-2.5412	-1.4123	-0.3887	-0.25412	-0.1554	0.3521	0.2741	0.04110	0.0221
D8S560	-11.633	-4.4911	-1.5225	-1.5411	-0.2214	0.1985	0.19014	-0.365	-0.0211	0.0129
D8S279	-13.374	-5.0241	-2.3854	-1.67742	-0.3135	0.19307	0.1229	-0.220	-0.2351	-0.091
D8S514	-21.473	-10.175	-8.5438	-6.0452	-5.6241	-5.0311	-2.2700	-0.887	-0.5198	0.0341
D8S272	-14.687	-8.5657	-4.875	-3.53610	-1.9002	-1.861	-1.5014	-0.657	0.04733	0.0987

Cr 10

Fração de Recombinação

Marcador	.0	.05	.10	.15	.20	.25	.30	.35	.40	.45
D10S185	-13.278	-3.225	-1.307	-0.3667	0.135	0.376	0.445	0.398	0.2457	0.135
D10S574	-27.0222	-5.005	-2.633	-1.449	-0.776	-0.384	-0.161	-0.038	0.022	0.365
D10S577	-20.520	-13.827	-9.979	-7.048	-5.011	-3.523	-2.339	-1.535	0.872	0.367
D10S192	-18.826	-7.199	-4.908	-3.297	-2.230	-1.523	-1.046	0.714	0.467	0.249

Cr 11

Fração de Recombinação

Marcador	.0	.05	.10	.15	.20	.25	.30	.35	.40	.45
D11S1332	-12.428	-2.225	-1.1064	-0.078	-0.1381	0.3166	0.4258	0.3115	0.340	0.1777
D11S927	-25.232	-6.014	-2.6934	-1.5896	-0.7562	0.28859	0.17857	0.2556	.0225	.0235
D11S925	-19.4707	-11.7852	-9.8579	-7.0579	-4.0225	-3.2564	-2.2280	-1.547	0.667	0.325
D11S912	-34.4871	-7.98784	-4.85399	-3.10020	-1.96246	-1.19288	-0.67268	0.3322	0.125	0.220
D11S986	-16.5337	-6.42605	-4.02799	-2.67732	-1.81222	-1.22447	-0.81285	0.5188	0.303	0.136
D11S927	-17.1276	-5.75850	-3.25866	-1.91483	-1.07421	-0.52776	-0.18110	0.0172	0.099	.0876

Cr 15

Fração de Recombinação

Marcador	.0	.05	.10	.15	.20	.25	.30	.35	.40	.45
D15S118	-24.0850	-7.48558	-4.37330	-2.69964	1.66621	-1.00351	0.58063	0.3184	0.16065	0.064
D15S16	-4.34897	-1.52616	-1.02028	-0.70343	-0.47987	-0.03155	0.193900	0.1059	0.04613	0.011
D15S12	-3.98819	-0.86289	-0.49349	-0.29562	-0.17585	0.10099	0.05443	0.0263	0.01039	-0.002
D15S126	-0.47120	-0.24697	-0.12914	-0.06239	-0.02520	0.006199	.001712	.00339	.002270	0.0006
D15S153	-7.39504	-0.97690	-0.48856	-0.02554	0.128140	0.057961	0.021704	0.0055	0.00037	0.0002
D15S205	-0.36506	-0.143506	-0.144802	0.069988	0.018571	0.011371	0.023155	0.0215	0.01243	0.0037
D15S127	-24.0850	-7.485586	-4.373309	-2.69964	-1.66621	-1.00351	0.058653	0.3184	0.16065	-0.064
D15S207	-18.0014	-9.002568	-5.122250	-3.00145	-1.33002	.22658	.145800	0.0775	0.00569	-0.002
D15S120	-6.12458	-0.985765	-0.857654	0.568322	0.45885	0.22254	0.114587	0.0985	0.00511	0.0009

Cr 19

Fração de Recombinação

Marcador	.0	.05	.10	.15	.20	.25	.30	.35	.40	.45
D19S413	-19.6910	-4.8902	-2.8534	-1.7194	0.9969	0.5284	0.2346	0.0663	.011864	0.0276
D19S221	-12.5589	-2.3365	-1.1079	0.89770	0.36651	0.22511	0.10458	0.0335	0.00788	0.0005
D19S226	-11.6658	-6.30045	-3.88874	-2.77458	-1.66987	0.985500	0.48722	0.3365	0.08774	0.0011

Cr 20

Fração de Recombinação

Marcador	.0	.05	.10	.15	.20	.25	.30	.35	.40	.45
D20S93	-27.475	-7.551	-4.00922	-2.18143	-1.10711	0.47344	0.133901	0.0024	0.013349	0.0165

Cr 21

Fração de Recombinação

Marcador	.0	.05	.10	.15	.20	.25	.30	.35	.40	.45
D21S1256	-26.379	-6.576	-4.421	-3.2970	-2.1062	-1.0046	-0.4357	0.3217	0.029	0.0046
D21S265	-12.449	-2.4790	-1.976	-1.653	-1.0926	-0.3349	-0.10296	0.0975	0.084	0.0046
D21S1252	-20.918	-3.8754	-2.941	-1.726	-1.0452	-0.0297	-0.0194	0.0029	0.0012	.0197
D21S1260	-23.791	-9.0147	-6.617	-4.6504	-3.9768	-2.5102	-1.986	0.6794	0.2154	0.0914

Cr 22

Fração de Recombinação

Marcador	.0	.05	.10	.15	.20	.25	.30	.35	.40	.45
D22S421	-19.261	-8.5472	-5.3511	-2.4710	-1.0245	-0.9874	-0.5471	0.2458	0.0547	0.0221
D22S283	-14.470	-7.1245	-4.2103	-3.0114	-1.0041	-0.9985	-0.0745	-0.421	0.0874	0.0254
D22S274	-12.617	-5.5478	-2.4102	-2.1254	-2.0245	-1.9557	-1.09987	-0.887	-0.6415	-0.012

14 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

14- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERMANN E., (1972). *Parcial Epilepsy and Related Disorders: Genetic, Metabolic and Prognostic Studies*. Ph.D. Thesis, McGill University, Montreal, Canada.
- ANDERMANN E., (1982) Multifactorial inheritance of generalized and partial epilepsy. In: Anderson, V. E., Penry, J.K. and Sing, C.F., (eds.), *Genetics Basis of the Epilepsies*, Raven Press, New York : 355-374
- BEN-ARIY., (1985) Limbic seizure and brain damage produced by Kainic acid: Mechanism and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 14:375-404.
- BERKOVIC S.F.; MCINTOSH A .M.; HOWELL R.A.; MITCHELL A.; SHEFFIELD L.J.; HOPPER J.L., (1996)- Familial Temporal Lobe epilepsy: a common disorder identified in twins. *Ann Neurol*, 40: 227-235.
- BERKOVIC S.F., PHILLIPS H.A., SCHEFFER I.E., ET. AL. (1995), Genetic Heterogeneity in autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Epilepsia* 36 (suppl 4):147.
- BLUMCKE I, BECKER AJ, KLEIN C, SCHEIWE C, LIE AA, BECK H, WAHA A, FRIEDL MG, KUHN REMSON P, ELGER C, WIESTLER OD. (2000) Temporal lobe epilepsy associated up-regulation of metabotropic glutamate receptors: correlated changes in mGluR1

mRNA and protein expression in experimental animals and human patients. *J Neuropathol Exp Neurol.*; 591-10.

BOTSTEIN D., WHITE R., SKOLNICK M. AND DAVIS R., (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*; 32: 314-331.

CAVALHEIRO E., A., (1990) GAD-Immunoreactive neurons are preserved in the hippocampus of rats with spontaneous seizures. *Brazilian J. Biol. Res.*, 23:555-556.

CAVALHEIRO, E.A., FERNANDES, M.J.S., TURSK L., NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G., (1992) Neurochemical changes in the hippocampus of rats with spontaneous recurrent seizures . In: Engel, J.Jr.; Wastelain, C.; Cavalheiro, E.A.; Heinemann, U.; Avanzini, G. (Eds)- *Molecular Neurobiology of epilepsy*. Elsevier, 1992. pp. 239-248.

CENDES F., KOBAYASH E., (2000) In: Guerreiro C.A., Guerreiro M.M., Cendes F., Lopes-Cendes L., (Eds). *Epilepsia*. Epilepsia de lobo Temporal, Lemos Editorial, São Paulo, pp.201-213.

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.

- DAVIES J.L., KAWAGUCHI J, BENNETT S.T. ET AL (1994). A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* 371:130-135.
- DINGLELINE R., RYNES M.,A., KING G.,L.,(1986) Involvement of N-Metyl-D-Aspartate receptors in epileptiforms bursting in the hippocampal slice. *J. Physiol*, 380:175-189
- ENGEL J.JR., EPILEPTIC SYNDROMES. IN: ENGEL J.JR.(Ed) (1989) Seizures and Epilepsy, F.A. Davis, New York, pp:183-190.
- ENGEL J.J., PEDLEY T. A . ,(1997) What is Epilepsy?. In: Engel J.J., Pedley T.A . (Eds). *Epilepsy a Comprehensive Texthook*, Lippincott Raven Publishers, Philadelphia, pp. 1-10.
- ENGEL J. Jr., BRANDLER R., GRIFFITH N.C, CALDECOTT-HAZARDS., (1993) Neurobiologicalevidence for epilepsy-induced interictal disturbances. In:Smith D., Treiman D.M., Trimble M., eds *Advances in Neurology*. New York: Raven Press: 23-24.
- ELSTON R.C., BAILEY-WATSON J.E., BONNEY G.E. (1986), A package of computer programs to perform statistical analysis for genetic epidemiology. Presented at the Seventh International Congress of Human Genetics, Berlin.

EPILEPSIA SAINDO DA OBSCURIDADE (1999), Liga Internacional contra Epilepsia. *Epilepsia CD-ROM- Neuromidia*. Um aplicativo multimídia voltado à desmistificação e ao estudo da epilepsia.

FISHER R. S., (1989) Animal models of the epilepsies . *Brain Research Reviews*, 14:245-278.

GENETIC SUSCEPTIBILITY & COMPLEX TRAITS. (1996) The Fourth International Nature Genetics Conference, Vancouver, Canada, April 17-19.

GUERREIRO C. A. M. (1992) Machado de Assis's Epilepsy. *Arq Neuro-Psiquiat*. 50(3): 378-382

GUIPPONI M.; THOMAS P.; REYDET C.G.; FEINGOLD J.; MOULINIER M.B.; MALAFOSSE A.(1997) Lack of Association Between Juvenile Mioclonic Epilepsy and GABRA5 and GABRB3 Genes. *Am J Med Genetics*, 74: pp 150-153.

GUYER M.,S., e COLLINS F.,S., (1993). The human genome project and the future of medicine. *Am. J. Dis. Child.*, 147:1145-1152.

GUSELLA JF, WEXLER NS, CONNEALLY PM, NAYLOR SL, ANDERSON MA, TANZI RE, WATKINS PC, OTTINA K, WALLACE MR, SAKAGUCHI AY WEXLER N.S., CONNEALLY P.M. , (1983) A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*; 306:234-238,.

HAUSER W.A., (1997) Overview: epidemiology, pathology and genetics. In: Engel J.J., Pedley T.A. (Eds). *Epilepsy a Comprehensive Textbook*, Lippincott Raven Publishers, Philadelphia, pp. 11-14.

HERRLING P.L., MORRIS R., SALT F.E., (1983) Effects of excitatory amino acids in their antagonists on membrane and action potentials of cats caudate neurones. *J. Physiol.*, 339:207-222.

JACKSON J.H., (1931) On convulsive seizures (Lumleian Lectures) in J. Taylor (Ed.), selected Writings of John Hughlings Jackson, vol 1, Hodder and Stoughton, London.

JASPER H., (1941) Eletroencephalography. In: Penfield W., Erickson T.C., eds. *Epilepsy and cerebral localization*. Springfield, III: Charles C. Thomas:380-454.

KRUGLYAK L. AND LANDER E.S., (1995) High-resolution genetic mapping of complex traits. *Am J Hum Genet* 56:1212-1223.

LATHROP G.M, LALOUEL J.M., JULEIR C. ET AL., (1984) Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:3443-3446.

LANDER E.S., AND SCHORK N.J. (1994) Genetic dissection of complex traits. *Science*, 256:2037-2048,.

- LENNOX W.G., (1960) *Epilepsy and Related Disorders*. Vols.1 e 2, Little Brown Company, Boston.
- LEPPERT M., MCMAHON W. M, QUATTLEBAUM T.G., BJERRE I., ZONANA J., SHEVELL M.I., ANDERMANN E, ROSALES T.O., RONEN G.M., CONNOLLY M., (1993) Searching for human epilepsy genes: a progress report. *Brain Pathol.* 3:357-69.
- LEPPERT M.F., (1990) Gene mapping and other tools for discovery. *Epilepsia*; 31:Suppl 3:11-18.
- LOPES-CENDES I.; PHILLIPS H.A .; SCHEFFER I.E.; MULLEY J.C.; DESBIENS R.; ANDERMANN E.; CENDES F.; VERRET S.; ANDERMANN F.; BERKOVIC S.F.; ROULEAU G.A. (1995)- Genetics linkage studies in familial frontal epilepsy: exclusion of the human chromosome regions homologous to the *EL-1* mouse locus . *Epilepsy Research* 22:227-233.
- LOPES-CENDES I. (1995) Aspectos genéticos das epilepsias: Estudos de Genética Molecular. *Jornal da Liga Brasileira de Epilepsia* 8 (1): 7-14.
- LOPES-CENDES I., SCHEFFER I.E., BERKOVIC S.F., ROUSSEAU M., ANDERMANN E., ROULEAU G.A., (2000) A New Locus for Generalized Epilepsy with Febrile Seizures Plus Maps to chromosome 2. *Am.J. Hum. Genet.*66: 698-701.

- MANIATIS T., FRITSCH E.F., AND SAMBROOK J. (1989) Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory, 2nd edition.
- McKHAM G.M. AND SHOOTER E.M., (1969) Genetics of seizure susceptibility. In: Jasper H.H. et al. (Eds.). Basic Mechanisms of the Epilepsies, Little Brown Company, Boston, pp.689-699.
- MELDRUM B.S., (1984) Amino acid neurotransmitters in new approaches to anticonvulsant drug action. *Epilepsia*, 22:140-149.
- MELDRUM B.S., (1991) Excitatory amino acid transmitters in epilepsy. *Epilepsia*, 32(suppl 2): S1-S3.
- METRAKOS J.D. and METRAKOS K., (1961) Genetics of convulsive disorder: II- Genetic and electroencephalographic studies in centrencephalic epilepsy, *Neurology*;11:474-483.
- MICHAELIS E. K., (1998) Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous systems and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging, *Progress in Neurobiology*; 54:396-415.
- MORGAN T.H. (1928) The Theory of Genes, Yale University Press, New Haven.
- NAKAMURA Y., LEPPERT M.F., O'CONNELL P. ET AL.. (1987) Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*; 235:1616-1622.

NIH/CEPH (1992.) Collaborative Mapping Group. A comprehensive genetic linkage map of the human genome. *Science*; 258:67-87.

OTT J., (1974) Estimation of the recombination fraction in human pedigrees: efficient computation of the likelihood for human linkage studies. *Am J Hum Genet* 26:588-597.

OTT J., (1989) Analysis of Human Genetic Linkage. Baltimore, Johns Hopkins University Press.

OTTMAN R., RISCH N., HAUSER W.A., PEDLEY T.A., LEE J.H., CUMMINGS-BARKER C., LUSTENBERGER A., NAGLE K., J., LEE K., S., SCHEUER M., L., NEYSTAT M., SUSSER M. e WILHELMSSEN K. C., (1995) Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q. *Nat Genet*, 10: 56-60.

PANDOLFO M. (1999) Mapping of a gene determining familial partial epilepsy with variable foci to chromosome 22q11-q12. *Am J Hum Genet*. 65: 1698-710.

PHILLIPS HA, SCHEFFER IE, CROSSLAND KM, BHATIA KP, FISH DR, MARSDEN CD, HOWELL SJ, STEPHENSON JB, TOLMIE J, PLAZZI G, EEG-OLOFSSON O, SINGH R, LOPES-CENDES I, ANDERMANN E, ANDERMANN F, BERKOVIC SF, MULLEY JC. (1998) Autosomal dominant nocturnal frontal-lobe epilepsy: genetic heterogeneity and evidence for a second locus at 15q24. *Am J Hum Genet*. 63:1108-16.

- PHILLIPS H. A.; SCHEFFER I. E.; BERKOVIC S.F.; HOLLWAY G.E.; SURTHERLAND G.R.;
MULLEY J.C. (1995) Localization of a gene for autosomal dominant nocturnal frontal lobe
epilepsy to chromosome 20q13.2. *Nat Genet* 10: 117-118.
- POZA J.J, SÁENZ A., MARTINEZ-GIL A., CHERON N., COBO A.M, URTASUN M., MARTÍ-
MASSÓ J.,F., GRID D., BECKMANN J.S., PRUD'HOMME J.F., and LÓPEZ DE MUNAIN A.
(1999) Autosomal Dominant Lateral Temporal Epilepsy: Clinical and Genetic study of a large
Basque Pedigree linked to Chromosome 10q. *Ann Neurol*, 45:182-188.
- RISCH N., (1990) Linkage strategies for genetically complex traits. I) Multilocus models. *Am J Hum
Genet* 54: 222-228.
- ROSEMBERG, R.N., (1990) The triumph of linkage analysis. *Ann Neurol*. 32:113.
- SANDKUYL L. (1989) Analysis of affected sib-pairs using information from extended families. In:
Elston R.C., Spence M.A., Hodge S.E. et al. (eds) Multipoint Mapping and Linkage Based Upon
Affected Pedigree Members: *Genetic Analysis Workshop 6*, Alan R. Liss, New York.
- SHEFFER I.E.; BHADIA K.; LOPES CENDES I; FISH D.R.; MARSDEN D. C; ANDERMANN F.;
ANDERMANN E.; DESBINENS R.; CENDES F.; MANSON J.L; BERKOVIC S.F (1994).-
Autosomal dominant frontal epilepsy: a new syndrome misdiagnose as a sleep disorder. *Lancet*
343 : 515-517.

SHEFFER I.E.; BHADIA K.; LOPES-CENDES I.; FISH R.D.; MARSDEN D.; ANDERMANN E.; ANDERMANN F.; DESBIENS R.; KEENE D.; CENDES F.; MANSON J.I.; CONSTATINOU J.E.C.; MCINTOSH A.; BERKOVIC S.F. (1995)- Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy: a distinctive clinical disorder. *Brain* 118, 61-73.

STEINLEIN O.K.; MULLER J. C.; PROPPING P.; WALLACE R.H.; PHILLIPS H.A.; SUTHERKAND G. R.; SCHEFFER I.E.; BERKOVIC S.F.- (1995) A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor α 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet*, pp.201-203.

TERWILLIGER J.D. AND OTT J (eds). (1994) Handbook of Human Genetic Linkage, The Johns Hopkins University Press, Baltimore.

THOMSON G., (1994) Identifying complex disease genes; progress and paradigms. *Nat Genet* 8, 108-110.

WATSON J.D., GILMAN M., WITKOWSKI J., ZOLLER M., (1997) *O DNA Recombinate*- Ouro Preto, MG. Ed. UFOP, 646p.

WEBER J. AND MAY P., (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*; 44:388-396.

WEISSENBACH J., GYAPAY G., DIB C. ET AL., (1992) A second-generation linkage map of the human genome. *Nature*; 359:794-801.

XIONG L, LABUDA M, LI DS, HUDSON TJ, DESBIENS R, PATRY G, VERRET S, LANGEVIN P, MERCHO S, SENI MH, SCHEFFER I, DUBEAU F, BERKOVIC SF, ANDERMANN F, ANDERMANN E, LEPPERT, M. MCMAHON, W. M, QUATTLEBAUM, T.G., BJERRE, I. ,ZONANA, J., SHEVELL, M.I., ANDERMANN, E, ROSALES, T.O., RONEN, G..M., CONNOLLY, M., (1999) Searching for human epilepsy genes: a progress report. *Brain Pathol.* 3:357-69.

YACUBIAN, E., M., T., (2000) *Epilepsia- Da Antiguidade ao segundo milênio: saindo das sombras.* São Paulo: Lemos Editorial.

YACUBIAN, E., M., T.,; PINTO, G., R., C., (1998) *Arte Poder Epilepsia.* São Paulo: Lemos Editorial.

A Genética e a Mente Humana

Sendo a mente humana um universo infinito e quase inexplorado, podemos encontrar em seu interior verdadeiro e puros diamantes, como também enormes buracos negros.

Os diamantes se mostram quando mentes como as de Albert Einstein, Leonardo Da Vincin e Wolfgang Amadeus Mozart deixam fluir tudo de bom com a simplicidade e a beleza da brisa do mar.

Já os buracos negros dragam as luzes ao redor através de atitudes como as de Adolf Hitler, Jack o estripador e Calígula.

Onde estará a origem, a causa que gera abissais diferenças ?

Diferenças que podem passar despercebidas, como um episódio de ausência, uma crise epiléptica focal e restrita ou; visível como o sol num dia de verão, como na loucura total.

Já dizia Erasmo de Roterdam que se excluir a loucura da sociedade “o homem se tornará intolerante ao homem”, enquanto que o ditado popular diz que “de louco todos nós temos um pouco”.

Tendo as sociedades passado por varias fazes, desde o tempo onde a epilepsia foi considerada loucura e ate hoje quando se gosta muito de algo se diz que alguém é louco por aquilo.

Lutamos, estudamos, pesquisamos, para crescermos como seres humanos e aprendemos segundo Sidarta Gautama (Buda) a “dar o verdadeiro valor às coisas certas”, e sabermos discernir desde a insignificante variação da saúde normal ate a mais horrenda, mesmo que esteja disfarçada.

Enquanto não dispormos de naves que nos levem ao mais longínquo ponto da mente humana, estudamos o universo da genética, e quem sabe assim consigamos descobrir outros caminhos que nos levem à **RESPOSTA**