

RITA MARIA ALVES

**Investigações genéticas e familiares em pacientes com epilepsia
no Estado da Bahia**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Processos Interativos dos Órgãos e Sistema da
Universidade Federal da Bahia, como requisito
parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Betânia Pereira Toralles
Co-orientadores: Dr^a Marielza Fernandez Veiga
Dr^o Federico Zara

**Salvador
2015**

RESUMO

A epilepsia é um distúrbio milenar do cérebro causado por persistente predisposição a crises epiléticas, capazes de provocar consequências neurobiológicas, cognitivas e psicossociais. Cerca de 50 milhões de pessoas no mundo têm epilepsia, entretanto, quando tratadas adequadamente, 70% delas conseguem controlar as crises. A Medicina da era pós-genômica tem permitido a compreensão de como os fatores genéticos influenciam, determinam ou causam suscetibilidade para o surgimento das epilepsias através de metodologias que permitem avaliação do inteiro genoma pelas técnicas de sequenciamento de última geração como painéis de genes e CGH-Array. Verificar alterações genéticas em indivíduos com diferentes formas de epilepsia através das ferramentas de última geração, além de verificar recorrência destas alterações no âmbito familiar, discutindo os diferentes impactos causados a nível psicológico, social e econômico nas famílias estudadas constituíram objetivos deste estudo. Foram determinados três grupos de pacientes: 1º composto por pacientes com história de recorrência familiar do fenótipo epilético; 2º pacientes com encefalopatias epiléticas; 3º por indivíduos com forma atípica de Epilepsia Rolândica. Resultados das análises por CGH-Array de 51 pacientes geraram 66 CNV's avaliáveis: 26 >400kb; 16 >100 e <400kb; 24 entre 60 e 100Kb. Painel NGS de 16 pacientes com encefalopatias epiléticas gerou 124 variantes gênicas, sendo 25% dos indivíduos validados para 4 diferentes mutações raras. No grupo 3 não foram encontradas mutações no único gene sequenciado (GRIN2A), sendo revelado polimorfismo não sinônimos em dois dos 11 indivíduos avaliados. A avaliação familiar revelou alto índice de recorrência familiar de epilepsia, tendo uma das famílias segregado 3 tipos de CNV's com fenótipos clínicos associados por 4 gerações. Conclusão: A evolução do conhecimento, tratamento e, em alguns casos, cura da epilepsia seguiu a evolução do conhecimento médico, científico e tecnológico, existindo um real benefício para a população acometida por essa enfermidade em face à rapidez no diagnóstico, o início da terapêutica com consequente melhora no prognóstico, sendo a genética um aspecto importante a ser considerado. Estudar a história familiar de indivíduos com epilepsia possibilita a geração de indicadores que servem para tomadas de políticas públicas em benefício destes pacientes.

Palavras chaves: Epilepsias; Genética; Diagnóstico; Avaliação familiar; Impactos.

ABSTRACT

Epilepsy is an ancient brain disorder caused by persistent predisposition to seizures, which can cause neurobiological, cognitive and psychosocial consequences. About 50 million people worldwide have epilepsy, however, when treated properly, 70% of them are able to control seizures. The Medicine of the post-genomic era has allowed the understanding of how genetic factors influence, determine or cause sensitivity to the emergence of epilepsy, through methodologies that allow evaluation of the entire genome by the latest generation sequencing techniques as gene panels and CGH -Array. To investigate genetic changes in patients with different forms of epilepsy through the latest generation tools, as well as check recurrence of these changes in the family, discussing the different impacts the psychological, social and economic level in the studied families. We determined three groups of patients: 1 consists of patients with a family history of recurrent epileptic phenotype; 2 patients with epileptic encephalopathy; 3rd by individuals with atypical Rolandic epilepsy. Results of CGH 51 where 52% (27) generated 66 NVC's: 26 > 400kb; 16 > 100kb < 400kb; 24 between 60Kb and 100Kb. NGS panel 16 pac. 2nd group generated 124 gene variants, 25% of subjects validated for 4 different rare mutations. In group 3 were not found mutations in one gene sequenced (GRIN2A), being revealed polymorphism not synonymous in two of the 11 individuals assessed. Family assessment revealed high rates of familial recurrence of epilepsy, with one of the families segregated 3 types of CNV's associated with clinical phenotypes. The development of epilepsy knowledge followed the evolution of medical, scientific and technological knowledge, with a benefit for the affected population of this disease, considering the rapid diagnosis, initiation of therapy and therefore the improvement in prognosis, in which genetic one important aspect to be considered.

Key words: Epilepsy; CNV, gene mutations; Family evaluation; impacts

LISTA DE TABELAS

Tabela	Descrição	Página
Tabela 3.1	Classificação das crises epiléticas	11
Tabela 3.2	Síndromes epiléticas	14
Tabela 6.1	Achados Genéticos nas Malformações Cerebrais	30
Tabela 6.2	Incidência da Epilepsia observada em pacientes com diferentes alterações em cromossomos autossômicos	31
Tabela 6.3	Encefalopatia Epilética e genes relacionados	41
Tabela 6.4	Epilepsias benignas e relativos genes candidatos	45
Tabela 6.5	Métodos de investigação genética nas epilepsias	58
Tabela 8.1	Enquadramento sindrômico e genes candidatos dos pacientes para análises por NGS.	69
Tabela 8.2	Preparação da Mix para amplificação da biblioteca NGS para encefalopatia Epilética. Adaptado do protocolo OneTouch, 2014	71
Tabela 9.1	Caracterização das 226 pessoas atendidas no ambulatório de epilepsia do Magalhaes Neto-Complexo HUPES, com indicativo de recorrência familiar quanto ao sexo, idade e procedência.	76
Tabela 9.2	Caracterização dos sujeitos de pesquisa do grupo 1 do estudo “Investigação genéticas e familiar em pacientes com epilepsias no Estado da Bahia”, quanto ao sexo, média de idade e procedência.	77
Tabela 9.3	Tabela 9.3 – Medias, faixas de idade e frequências dos 32 propósitos com relação à media de idade no início das crises e tempo de convívio com as crises.	80
Tabela 9.4	Características clínicas individuais e dados familiares dos 32 propósitos do grupo 1 do estudo “Investigação genéticas e familiar em pacientes com epilepsias no Estado da Bahia”.	82
Tabela 9.5	Resultado da seleção para triagem por CGH dos 29 propósitos pertencentes a 16 famílias do grupo- Epilepsia	84

Família.

Tabela 9.6	Resultados da Análise por Array-CGH em membros da família 11.	89
Tabela 9.7	Descrição de Variações no Número de Cópias > 400kb encontradas em pacientes e familiares com epilepsia do estudo “Investigação genéticas e familiar em pacientes com epilepsias no Estado da Bahia”.	91
Tabela 9.8	Descrição de Variações no Número de Cópias de >100kb e < 400kb encontradas em pacientes e familiares com epilepsia do estudo “Investigação genéticas e familiar em pacientes com epilepsias no Estado da Bahia”	92
Tabela 9.9	Descrição de Variações no Número de Cópias de <100kb encontradas em pacientes e familiares com epilepsia do estudo “Investigação genéticas e familiar em pacientes com epilepsias no Estado da Bahia”	93
Tabela 10	Casos de epilepsia, convulsões febris e distúrbios neuropsiquiátricos em familiares de 17 propósitos do grupo 2.	97
Tabela 11	Tipos e frequências das crises apresentadas pelos pacientes com Encefalopatias Epilépticas-G2.	98
Tabela 12	Caracterização dos pacientes elegíveis para análises por painel de genes- NGS	99
Tabela 13	Polimorfismos resultantes da análises de 21 genes sequenciados com painel-NGS em 16 pacientes com encefalopatia epiléptica pertencentes ao grupo 2.	101
Tabela 14	Características clínicas dos pacientes com Epilepsia Rolândica pertencentes ao grupo 3.	108
Tabela 15	Resultado Sequenciamento do GRIN2A nos pacientes do grupo 3	109

LISTA DE QUADROS

Quadro	Descrição	Página
Quadro 3.1	Classificação das crises epiléticas	10
Quadro 3.2	Classificação Internacional das Epilepsias e Síndromes Epiléticas	11
Quadro 6.1	Metas da iniciativa americana para a saúde familiar	54
Quadro 8.1	Variáveis extraídas dos prontuários dos indivíduos com história familiar para epilepsia	63
Quadro 8.2	As quatro etapas do sequenciamento NGS com a metodologia da Ion AmpliSeq™.	69
Quadro 8.3	Primeres para sequenciamento Sanger do gene GRIN2A	74

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descrição	Página
Figura 5.1	Possíveis rearranjos genômicos, resultantes de recombinações através da formação de LCRs.	22
Figura 5.2	Representação esquemática de rearranjos cromossômicos mediados pelo direcionamento das LCRs em recombinação homóloga não alélica (NAHR).	22
Figura 5.3	Passos geral do reparo do DNA por Junção não homóloga das extremidades.	24
Figura 5.4	Forquilha de replicação e rearranjos cromossômicos por modelos de comutação	25
Figura 8.1	Esquema completo da técnica de Array-CGH.	68
Figura 8.3	Esquema da construção de biblioteca para sequenciamento NGS	70
Figura 8.4	Etapas de trabalho para análises das amostras do grupo 2 por NGS	72
Figura 9.1	Composição amostral e relação de parentesco entre os propósitos do grupo 1.	79
Figura 9.2	Genealogia da família 1	85
Figura 9.3	Genealogia da Família 2.	86
Figura 9.4	Genealogia da família 11	88

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico	Descrição	Página
Gráfico 9.1	Idades categorizadas dos sujeitos do G-1 do estudo “Investigação genéticas e familiar em pacientes com epilepsias no Estado da Bahia”.	77
Gráfico 9.2	Escolaridade dos sujeitos de pesquisa do G-1 do estudo “Investigação genéticas e familiar em pacientes com epilepsias no Estado da Bahia”.	78
Gráfico 9.3	Tempo de convívio com as crises de 29 propósitos do grupo de epilepsia familiar (G-1) do estudo “Investigação genéticas e familiar em pacientes com epilepsias no Estado da Bahia”	81
Gráfico 9.4	Frequências do total de sujeitos do grupo 2 por sexo	94
Gráfico 9.5	Número total de sujeitos do grupo G2 por idade	95
Gráfico 9.6	Frequências das idades por faixa etária	95
Gráfico 9.7	Distribuição das idades dos 20 pacientes do G-2 em ocasião da primeira crise	96
Gráfico 9.8	Frequência de consanguinidade nas famílias de 17 propósitos do G2.	97
Gráfico 9.9	Faixa de idades dos pacientes do grupo 3-Epilepsia Rolândica	107
Gráfico 10	Idade no início das crises dos propósitos do grupo G-3	107

ABREVIATURAS

ADEAF	Epilepsia autossômica dominante com características auditivas
ADNFLE	Epilepsia autossômica-dominante noturna do lobo frontal
ARE	Epilepsia RE típica e variantes atípicas
BECTS	Epilepsia benigna com ponta onda centro-temporais
BFIS	Crises familiares infantis benignas
BFNIS	Crises familiares neonatais infantis benignas
BFNS	Crises familiares neonatais benignas
BMEI	Epilepsia mioclônica benigna da infância
BNS	Crises neonatais benignas
BS	Burst-suppression
CAE	Epilepsia ausência da criança
CBD	Canabidiol
CGH	Hibridação genômica comparativa sobre microarray
CMT1A	Charcot Marie-Tooth
CNPs	Polimorfismos no Número de Cópias
CNV	Variação no numero de cópias
CNVs	Variações no numero de cópias
CSWS, ESES	Epilepsia com ponta-onda contínua no sono ou status epiléticos elétrico em sono
DGV	Genomic Variation Database
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DSB	Quebra da dupla hélice
<i>EE</i>	Encefalopatias epiléticas
EEG	Eletroencefalograma

EIEE	Early Infantile Epileptic Encefalopathy
EJA	Epilepsia mioclônica juvenil
EJI	Epilepsia Juvenil Idiopática
EMA	Epilepsia com ausência mioclônica
EMAS	Epilepsia com crises mioclônicas-astáticas
EME	Encefalopatia mioclônica precoce
FDA	Food and Drug Administration of United States
FoSTeS	Modelo de Troca de Forquilha de Replicação
FS	Convulsões febris
FS+	Convulsões febris plus
GABA	Gene ácido gama-aminobutírico
GABAA-R	Ácido γ -aminobutírico da subunidade tipo A
GEFS+	Epilepsia generalizada com convulsões febris plus
ILAE	Liga Internacional Contra a Epilepsia
JAE	Epilepsia ausência Juvenil
JME	Epilepsia mioclônica juvenil
Kb	Quilobases
LCRs	Low-Copy Repeats
LGS	Síndrome de Lennox-Gastaut
LINEs	Elementos Intercalares Longos
LKS	Síndrome de Landau-Kleffner
LTR	Grandes sequências terminais repetitivas
MEPS	Seguimento mínimo de identidade de sequência
NAHR	Recombinação Homóloga não Alélica
NGS	Sequenciamento de nova geração
NHEJ	União Não-Homóloga das Extremidades

NMDA	N-metil-D-aspartato
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDS	Pparoxysmal depolarization shift
PGH	Projeto Genoma Humano
PLP1	Proteína proteolipídica sensível à dosagem
PMD	Doença de Pelizaeus-Merzbacher
PME	Epilepsias mioclônicas progressivas
POCS	Epilepsias centro-temporais com pico-onda continua de ondas lentas durante o sono
RE	Epilepsia Rolândica
SINE	Elementos Intercalares Curtos
SMEI	Epilepsia mioclônicas severa da infância
SNC	Sistema nervoso central
SO	Síndrome de Ohtahara
SW	Síndrome de West
SYstE	Epilepsias do sistema
TCR	Transcription Coupled Repair
WES	Sequenciamento do inteiro exoma
WGS	Sequenciamento do inteiro genoma

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a epilepsia é o distúrbio neurológico mais comum, afetando cerca de 50 milhões de pessoas em todo mundo, sem distinção de raça ou nível social, apesar de que nos países e regiões subdesenvolvidas ou em desenvolvimento haja um maior número de pessoas com a doença, devido à falta de tratamento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). A maior incidência é nos primeiros anos de vida e em idosos. Um tratamento farmacológico adequado controla o surgimento de novas crises em 70% dos casos, enquanto aproximadamente 30% continuam apresentando crises, não obstante o tratamento. Um correto diagnóstico e a classificação das crises epiléticas é o ponto crucial para a escolha terapêutica apropriada, o que influencia o prognóstico do paciente (FRENCH et al., 2004).

O caráter inexplicável e imprevisível das manifestações epiléticas determinou, durante séculos, que o distúrbio fosse tratado como manifestações malignas causadas por castigo dos deuses ou por força da natureza. Nessa época, os tratamentos para livrar as pessoas dos fenômenos epiléticos seguiam a esfera divina e transcendental (MANFREDI, 2012). A primeira vez que a epilepsia é encarada como sintoma do campo médico foi em 410 a.C. por Hipócrates de Cós, ele questionou o caráter sobrenatural da epilepsia, sugerindo ser essa uma doença do cérebro com possibilidade de ser herdada como qualquer outra.

Durante a história da humanidade, a epilepsia é tema constante, sofrendo interferência de todo os fatores: sociais, culturais, religiosos e filosóficos (GAMBARDELLA, 2009). Na atualidade, os avanços vêm acontecendo de acordo com a evolução da ciência e da tecnologia. A Medicina da era pós-genômica tem permitido a compreensão de como os fatores genéticos influenciam, determinam ou causam suscetibilidade em diferentes patologias. Este cenário vem mudando a perspectiva prognóstica de muitas patologias.

Por muito tempo a genética vem contribuindo com estudos sobre patologias que afetam as famílias. Muitos achados de recorrência familiar da epilepsia foram publicados e, com bases nesses resultados, os pesquisadores usavam a matemática para avaliação do risco familiar de recorrência e incidência de novos casos (BIANCHI, 2002). As pesquisas

familiares serviram de base para a comparação de traços eletroencefalográficos aparentados nas manifestações epilépticas, tendo os estudos conduzidos em gêmeos fornecidos importantes contribuições na definição das epilepsias (BIANCHI, 2002; BERG, 2010).

Recentemente, têm sido lançadas no mercado, inúmeras plataformas para análises de inteiro genoma (*Whole Genome Sequencing*-WGS) seja a nível cromossômico como as plataformas Array-CGH, que utiliza a hibridização comparativa para rastrear alterações de número de cópias de segmentos cromossômicos (“Copy-Number Variation”-CNVs); painéis de genes construídos com finalidades específicas para rastrear mutações gênicas de massa de fenótipo de interesse como os painéis NGS (Next Generation Sequencing), ou ainda sequenciamento de massa das partes codificantes do genoma (Whole Exome Sequencing-WES).

O Presente estudo teve como objetivo rastrear alterações genéticas (cromossômicas e gênicas) em indivíduos com epilepsias atendidos em dois ambulatórios no Estado da Bahia. As análises de biologia molecular foram precedidas por avaliação familiar. Os resultados obtidos demonstram alta recorrência de epilepsia nas famílias estudadas e corrobora descrições na literatura quanto a necessidade de avaliação familiar detalhada.

Os resultados das triagens laboratorial demonstram que os métodos atuais de investigação genética oferecem vantagens adicionais para detectar alterações genéticas em pessoas com epilepsia, embora muitas destas variantes ainda tenham significados incertos. A estratégia metodológica aqui usada (investigação familiar e rastreamento genético) foi fundamental para a geração destes resultados.

Introdução à Epilepsia

2 A EPILEPSIA AO LONGO DA HISTÓRIA

A epilepsia é uma das condições neurológicas mais frequentes, em torno de 1-2% da população e mais prevalente nos países subdesenvolvidos. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a epilepsia afeta cerca de 50 milhões de pessoas no mundo, sem distinção de raça, etnia, gênero ou nível social, sendo a maior incidência nos primeiros anos de vida e em idosos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

Do ponto de vista clínico, a epilepsia é uma condição neurológica crônica caracterizada por crises epiléticas recorrentes e espontâneas com frequência e duração variável (INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY-ILAE, 2010). As crises epiléticas ocorrem por um aumento da excitabilidade de uma população de neurônios. Porém, durante séculos, o caráter inexplicável e imprevisível das manifestações epiléticas determinou que o distúrbio fosse tratado como manifestações, divinas, mágicas ou malignas causadas por castigo dos deuses ou por força da natureza, por este motivo, por muito tempo, os tratamentos para livrar as pessoas dos fenômenos epiléticos seguiam a esfera divina, religiosa e transcendental (SARAPPA, 2010; MANFREDI, 2012).

Em 410 a.C., Hipócrates de Cós descreveu pela primeira vez a epilepsia como uma condição médica no seu tratado denominado “*Morbus sacer*”, e questionou o caráter sobrenatural atribuído às epilepsias, descrevendo-a como uma manifestação “morbose, monstruosa e admirável” (EBERLE, 1831; SARAPPA, A, 2010; MANFREDI, 2012). No tratado de Hipócrates é possível encontrar definições de tipos de crises e manifestações clínicas e ainda sugere que em criança essas manifestações poderiam ser precipitadas por febre ou agente tóxico. O texto propõe ser a epilepsia “uma doença como outra qualquer, com possibilidade de ser herdada, como qualquer outra doença do cérebro” (EBERLE, 1831, CARRIERO, 2010; MANFREDI, 2012).

No século II (130-200 d.C), Galeno, baseado na sua teoria humoral, descreve a epilepsia como um dano provocado por alteração no encéfalo, sendo sua principal causa a obstrução parcial de um ventrículo cerebral. Galeno classificou as epilepsias em três tipos: 1) idiopáticas manifestadas por convulsões generalizadas; 2) parciais derivadas de lesões cerebrais; e 3) simpáticas, provocadas por doenças de outros órgãos e posteriormente transmitidas para o cérebro. Entre erros e acertos, as descrições médicas de Galeno influenciaram a medicina por cerca 1.500 anos e, ainda hoje, podem ser observados termos classificatórios da epilepsia

propostos por ele (ILAE, 2003). Entretanto, a epilepsia só vem a ser completamente entendida no século XIX. Neste século, o neurologista John Hughlings Jackson (1861), demonstrou que as crises epilépticas resultavam de descargas elétricas recorrentes originadas de alguns circuitos nervosos, e assim abre-se um novo e definitivo capítulo sobre esta secular manifestação morbosa que, durante a história da humanidade, foi tema constante, sofrendo interferência de todos os fatores: sociais, culturais, artísticos, religiosos e filosóficos (GAMBARDELLA, 2009, SARAPPA, A , 2010; MANFREDI, 2012). Os estudos de Jackson sobre a epilepsia propuseram um novo modelo organizacional, hierárquico e de localização das funções cerebrais e, algumas das suas descobertas, teorias e termos foram utilizados por clínicos para o diagnóstico e classificação das epilepsias. Diversas tentativas foram feitas para classificar as crises epilépticas até que a Liga Internacional contra Epilepsia em 1969 desenvolveu uma classificação, posteriormente revisada em 1981(ILAE, 1981).

No meio científico, os avanços vêm acontecendo de acordo com a evolução da ciência e da tecnologia, especialmente na genética. A medicina da era pós-genômica tem permitido a compreensão de como os fatores genéticos influenciam, determinam ou causam suscetibilidade em diferentes patologias, em especial nas epilepsias. Este cenário vem mudando a perspectiva prognóstica de muitas doenças, aumentando assim os níveis de conhecimento sobre as suas fisiopatologias. Para muitas morbidades, antes ditas crônicas e incuráveis, abrem-se possibilidades terapêuticas por meio da genômica com isto, alguns tipos de epilepsia vêm se beneficiando (ANDREOZZI et al., 2011, JOHNSON et al., 2011). Principalmente, nas últimas duas décadas, a chamada revolução molecular na medicina vem exercendo um importante impacto também no diagnóstico e no tratamento das epilepsias, com as pesquisas genéticas nas diferentes formas de epilepsias no momento, uma fronteira de estudo altamente sugestiva e promissora (GOBBI, et al., 2014).

3 CONCEITOS, DEFINIÇÕES E CLASSIFICAÇÃO DAS EPILEPSIAS

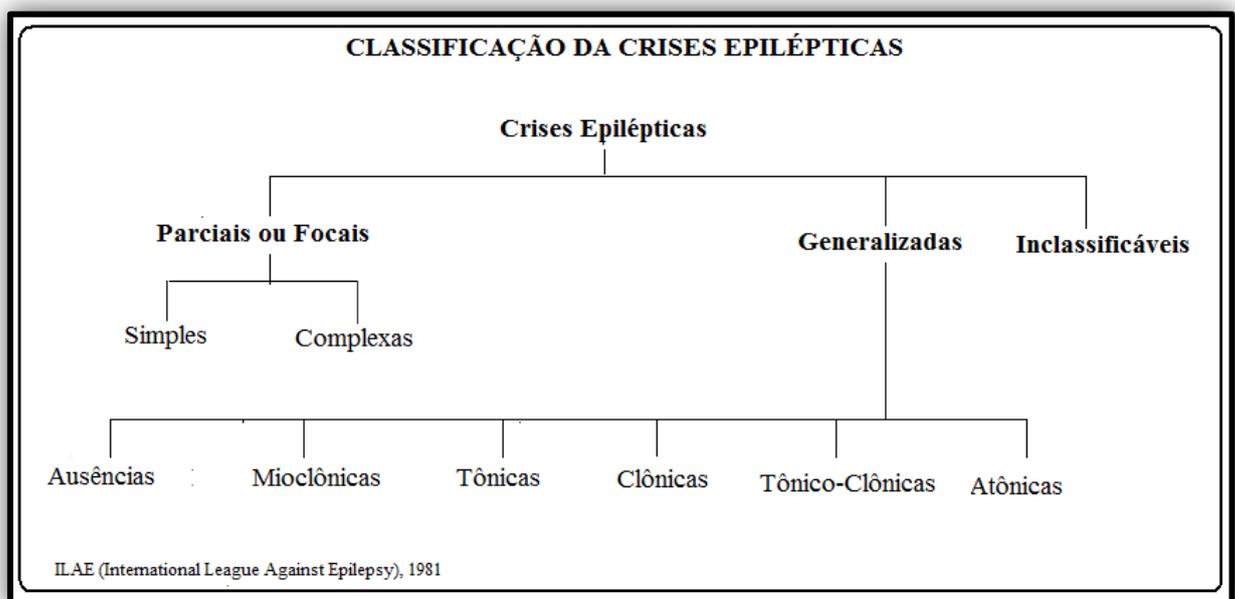
A epilepsia é definida atualmente como uma condição crônica em que o indivíduo apresenta pelo menos uma crise epiléptica decorrente de uma disfunção cerebral duradoura, a qual aumenta a probabilidade da recorrência de novas crises, associado a alterações neurobiológicas, cognitivas e sociais (BLUME et al., 2001; BERG et al, 2010; FISHER et al., 2014), assim é necessário a presença de pelo menos uma crise epiléptica (manifestação clínica) para o diagnóstico de epilepsia (doença crônica), desde que outros fatores indiquem a possibilidade de recorrência, como as alterações eletroencefalográficas (BLUME et al., 2001; FISHER et al., 2005; BERG et al, 2010). A classificação do grau de comprometimento psicossocial das pessoas com epilepsia foi proposta na revisão 2001 pelo então presidente do comitê executivo da Liga Internacional contra Epilepsia, Jerome Engel e está baseada na proposta da Organização Mundial de Saúde (INTERNATIONAL CLASSIFICATION OF FUNCTIONING AND DISABILITY, WHO, 1999; ENGEL J JR, 2001)

As crises epilépticas são resultantes da hiperssincronização da atividade neuronal e ocorrem de forma súbita e transitória, com padrão estereotipado com sinais e sintomas específicos, decorrentes da ativação de uma área mais localizada (crises focais), ou da ativação de redes neurais distribuídas bilateralmente (crises generalizadas) (BLUME et al., 2001; FISHER et al., 2005; CAPOVILLA, 2009).

As crises epilépticas de acordo com a classificação de 1981 da ILAE foram divididas em crises parciais, crises generalizadas ou crises inclassificadas, utilizando os critérios clínicos e eletroencefalográficos (COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE ILAE, 1981). Posteriormente foi publicada a proposta de Classificação das Síndromes Epilépticas da ILAE em 1985, revisada em 1989, na qual dividia as epilepsias em 3 grandes grupos de acordo com a localização (focal, generalizada ou inclassificada) e a etiologia (idiopáticas, criptogênicas e sintomáticas) (COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE ILAE, 1989) . Embora novas propostas venham sendo feitas (2001, 2010) (ENGEL J JR, 2001; BERG et al, 2010), as classificações de crises de 1981(quadro 3.1) e das de síndromes de 1989 (quadro 3.2) ainda são as vigentes, apesar de haver um consenso de que não são suficientes para enquadrar grande número de pacientes, nem determinar a frequência dos diferentes tipos de síndromes epilépticas (NIETO - BARRERA, 2002). Entretanto, estas classificações são mais fáceis de serem utilizadas na

prática clínica, especialmente para os médicos que não dispõem dos exames complementares, bem como para o não especialista em epilepsia (EVERITT et al., 1999).

Várias propostas de classificações para as crises e as epilepsias foram motivadas com os novos conhecimentos advindos do reconhecimento de novos padrões de crises (tabela 3.1), através dos estudos de vídeo-EEG, e com a descoberta de novas etiologias, com os avanços tecnológicos na área da neuroimagem e da genética (SALEK-HADDADI et al., 2009; CAPOVILLA, 2009 CHINCHURE et al., 2010, OTTMAN et al., 2010, SINIATCHKIN et al., 2011)



Quadro 3.1 Classificação das crises epiléticas, segunda a Liga Internacional Contra a Epilepsia em 1981.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
<p>Epilepsias e síndromes de acordo com a localização, parciais ou focais.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Idiopáticas • sintomáticas • criptogênicas 	<p>Epilepsias e síndromes generalizadas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Idiopáticas • criptogênicas ou sintomáticas • sintomáticas: etiologias não específicas etiologias específicas 	<p>Epilepsias e síndromes indeterminadas se focais ou generalizadas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Com sinais e sintomas de crises generalizadas e focais • Sem sinais inequívocos de crises generalizadas ou focais
<p>Grupo 4: Síndromes especiais crises relacionadas à situações</p>		
<p>Fonte ILAE, 1989</p>		

Quadro 3.2- Classificação Internacional das Epilepsias e Síndromes Epilépticas de 1989

Tabela 3.1- Classificação das crises epiléticas

CRISES GENERALIZADAS

Tônico-clônicas

Ausência

Típicas

Atípicas

Ausências com características peculiares

Ausência Mioclônicas

Mioclônicas palpebrais

Miocônicas

Mioclônicas atônicas

Mioclônicas tônicas

Clônicas

Tônicas

Atônicas

CRISES PARCIAIS/FOCAIS

*Semiologia variável de acordo com a área encefálica envolvida

Sensitivas
Motoras
Sensitiva-motoras
Com automatismos motores
Com mioclonias focais negativas
Gelásticas
Hemiclônicas

NÃO DISTINGUIVEL ENTRE GENERALIZADA OU PARCIAL

Espasmos epilépticos

BERG et al, 2010 (adaptado)

A proposta de classificação de 2001 trouxe novos conceitos e modificações, principalmente no reconhecimento e a inclusão de novas síndromes epilépticas, como a síndrome de Ohtahara, a síndrome de Dravet e a epilepsia generalizada idiopáticas com fenótipos variados (proposta de 2001) (OHTAHARA e YAMATOOGI, 2006; PAVONE et al., OTTMAN et al, 2010, GUERRINI e FALCHI, 2011, MASTRANGELO e LEUZZI, 2012, FISHER et al., 2014), assim como propôs que as síndromes epilépticas fossem categorizadas de acordo com a faixa etária, também mantida na proposta de 2010 (ENGEL J JR, 2001; BERG et al, 2010), tabela 3.2. Uma síndrome epiléptica é reconhecida quando é possível identificar uma entidade clínica específica dentro do grande grupo das epilepsias, através de suas características clínicas (tipos de crises, idade de início, evolução, manifestações neurológicas e psicológicas), padrão eletroencefalográfico, exames de neuroimagem, mecanismos fisiopatológicos e bases genéticas (OTTMAN et al, 2010, MASTRANGELO e LEUZZI, 2012, DHINDSA, 2015).

O conceito de encefalopatia epiléptica, proposto na classificação de 2001, agrupa um conjunto de síndromes epilépticas caracterizadas pela presença de crises tão frequentes e/ou pela presença de descargas epileptiformes intensa que levam ao comprometimento cognitivo global ou restrito, como na síndrome de Landau Kleffner (BLUME et al., 2001, OTTMAN et al, 2010, BERG et al, 2010, BEAL et al., 2012)

A Comissão da ILAE responsável pela classificação e terminologia das crises e síndromes epilépticas publicou uma nova revisão em 2010. Outros conceitos foram propostos, principalmente relacionados à etiologia das epilepsias. As epilepsias antes classificadas como

idiopática, criptogênica e sintomáticas foram denominadas como de origem genética, estrutural ou metabólica (sintomática) e de causas desconhecidas (BERG et al, 2010) (Tabela 3.2).

No que diz respeito à origem das epilepsias, os avanços obtidos nos últimos anos são significativos, muitos relacionados às novas descobertas genéticas e aos avanços tecnológicos das ferramentas de investigação e de diagnóstico, principalmente com os novos exames neuroimagem (ENGEL, 2001, BERG, 2010, OTTMAN et al, 2010, MASTRANGELO e LEUZZI, 2012, DHINDSA, 2015).

Algumas epilepsias são causadas por alterações no material genético (gênicas, cromossômicas ou genômicas). Nas alterações cromossômicas que causam epilepsia, geralmente o cromossomo envolvido carrega genes importantes para o desenvolvimento cerebral e/ou para manutenção da sua funcionalidade, podendo ser causa de lesões permanentes no cérebro (SCHINZEL; NIEDRIST, 2001). Mutações em genes que têm importância para o funcionamento das células neurais podem desencadear crises epiléticas de diversas maneiras. Atenção especial vem sendo dada às mutações gênicas que interferem na entrada e saída de íons nas células neurais. Os achados nesta área possibilitaram o enquadramento de um grupo de manifestações epiléticas, denominadas canalopatias, com alusão aos canais iônicos, responsáveis, principalmente, pela entrada e saída de sódio e potássio (GAMBARDELLA, 2009). Além disso, a compreensão das alterações à nível do genoma (apropriadamente chamadas de distúrbios genômicos) vêm incrementando, com grande velocidade, as pesquisas e diagnósticos genéticos das epilepsias (WANG et al, 2015).

À luz das novas aquisições no campo da genética vem sendo demonstrado que síndromes epiléticas podem ter em comum um único substrato genético. Assim, vem sendo proposto um novo conceito em substituição a dicotomia entre epilepsia focal e epilepsia generalizada. Tem sido discutida a ideia de “Epilepsias dos sistemas”, segundo o qual uma crise epilética poderia ser desencadeada por uma sensibilidade específica de um dado sistema neuronal. Este conceito poderia explicar a ativação de diferentes subsistemas envolvidos com a manutenção de consciência, como ocorre nas crises de ausência nas epilepsias generalizadas ou sistemas neuronais mais localizados observados nas epilepsias focais idade-dependente, como ocorre na epilepsia rolândica. Algumas das epilepsias propostas como paradigma de “Epilepsia dos Sistemas” foram identificadas como sendo geneticamente determinado, o que faz pensar que mecanismo genético poderia estar

envolvidos na expressão de determinados sistemas epileptogênicos e obviamente, associados a outras variáveis biológicas e ambientais (AVANZINI et al., 2012; CAPOVILLA et al., 2013)

Tabela 3.2- Síndromes epiléticas

INÍCIO EM ÉPOCA NEONATAL

- Crises familiares neonatais benignas (BFNS)
- Encefalopatia mioclônica precoce (EME)
- Encefalopatia epilética de início infantil precoce (Síndrome de Ohtahara)

INÍCIO EM IDADE INFANTIL

- Crises familiares neonatais infantis benignas (BFNIS)
- Crises familiares infantis benignas (BFIS)
- Epilepsia generalizada com convulsões febris plus (GEFS+)
- Epilepsia mioclônica benigna da infância (BMEI)
- Espasmos infantis (Síndrome de West)
- Epilepsias com crises focais migrantes
- Epilepsia mioclônicas severa da infância (SMEI ou síndrome de Dravet)
- Epilepsia com crises mioclônicas-astáticas (EMAS ou síndrome de Doose)
- Epilepsias mioclônicas progressivas (PME)
- Convulsões febris plus (FS+)

INÍCIO EM IDADE ESCOLAR

- Epilepsia ausência da criança (CAE)
- Epilepsia com ausência mioclônica (EMA)
- Epilepsia ausência com mioclonia palpebrais (síndrome de Jeavons)
- Epilepsia benigna com ponta onda centro-temporais (BECTS ou epilepsia rolândica)
- Epilepsia com paraxismos occipitais de início precoce (síndrome de Panayiotopoulos)
- Epilepsia com paroxismos occipital de início tardio (forma de Gastaut)
- Epilepsia autossômica-dominante noturna do lobo frontal (ADNFLE)
- Síndrome de Lennox-Gastaut (LGS)
- Síndrome de Landau-Kleffner (LKS)
- Epilepsia com ponta-onda contínua no sono ou status epiléticos elétrico em sono (CSWS, ESES)

INÍCIO NA ADOLESCÊNCIA À IDADE ADULTA

- Epilepsias com crises tônico-clônicas generalizadas ao despertar
- Epilepsia mioclônica juvenil (JME ou Síndrome de Janz)
- Epilepsia ausência Juvenil (JAE)
- Epilepsia autossômica dominante com características auditivas (ADEAF)
- Outras epilepsias familiares do lobo temporal

INDEPENDENTE DA IDADE

- Epilepsia familiar focal e focos variáveis
- Epilepsias reflexas

CAUSADAS POR LESÕES ESPECÍFICAS OU OUTRAS CAUSAS

- Epilepsia do lobo temporal mesial com esclerose hipocampal
- Síndrome de Rasmussen
- Crises gelásticas com hamartoma hipotalâmico
- Síndrome hemiconvulsão-hemiplegia-epilepsia

ESTRUTURAIIS/METABÓLICAS

- Malformações do desenvolvimento cortical (hemimegalencefalia, heterotopia...)
- Síndromes neuro-cutâneas (esclerose tuberosas, Sturge-Weber...)
- Tumores
- Infecções
- Traumas
- Angiomas
- Insultos perinatais
- Isquemia

EPILEPSIAS DE CAUSAS DESCONHECIDAS

CONDIÇÕES COM CRISES EPILÉPTICAS TRADICIONALMENTE NÃO DIAGNOSTICADAS COMO FORMA DE EPILEPSIA PROPRIAMENTE DITA

- Crises neonatais benignas (BNS)
- Convulsões febris (FS)

Berg et al., 2010 (adaptado)

4 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico da epilepsia é eminentemente clínico. Os exames complementares são necessários para caracterização do tipo de crise, síndrome epiléptica e sua etiologia. O conhecimento da história clínica do paciente, incluindo o histórico familiar sobre a ocorrência de epilepsia, condições médicas associadas, uso de medicamentos ou outras substâncias, hábitos de vida, entre outros elementos, são fatores importantes para um correto enquadramento diagnóstico (TRICHARD et al., 2012, FISHER et al, 2014).

O eletroencefalograma (EEG), criado em 1929, foi o primeiro instrumento de auxílio diagnóstico nas epilepsias e até hoje é fundamental na caracterização do tipo de crise e síndrome epiléptica, embora um resultado normal não exclua o diagnóstico de epilepsia. O EEG é o exame mais utilizado para detectar a atividade elétrica cerebral. A correlação eletroclínica é fundamental para definir o tipo de crise, parcial ou generalizada. Outros achados clínicos e exame de imagens e/ou laboratorial auxiliam na classificação do tipo de crise e de síndrome epiléptica e na exclusão de outros diagnósticos (BENBADIS; TATUM, 2003).

O diagnóstico do(s) tipo(s) de crise(s) é importante para a escolha do tratamento e o diagnóstico da síndrome epiléptica é necessário para se determinar o prognóstico da epilepsia (FISHER et al, 2014, DHINDSA et al, 2015). Além do mais, algumas drogas antiepilépticas podem ser selecionadas ou excluídas em algumas síndromes, como por exemplo, as drogas que agem nos canais de sódio (carbamazepina, oxcarbazepina) não devem ser prescritas na Síndrome de Dravet ou como outro exemplo a Vigabatrina, a droga de escolha na Síndrome de West secundária a Esclerose Tuberosa (GLAUSER T et al 2006, FAULKNER; SINGH, 2013)

O objetivo do tratamento é o controle das crises epilépticas. Em torno de 50% dos pacientes tem remissão das crises com o uso da primeira droga antiepiléptica e em baixas doses (RASPALL-CHAURE 2008). Entretanto, 20 a 30% dos pacientes não são beneficiados pelo tratamento farmacológico e são considerados farmacoresistentes. Algumas síndromes epilépticas, como a maioria das encefalopatias epilépticas, são farmacoresistentes ou epilepsia refrataria (SANDIPAN; ALEXOPOULOS, 2010, TRICHARD et al., 2012).

Define-se como epilepsia farmacoresistente quando existe ausência de controle das crises com 2 esquemas terapêuticos (monoterapia ou em associação), com drogas indicadas especificamente para o tipo de crise ou epilepsia em doses adequadas. (FRENCH J et al 2010,

ALEXOPOULOS, 2010, GALANOPOULOU et al., 2012). Considera-se poucas as possibilidades de controle das crises nos casos em que existe a falha em dois esquemas terapêuticos e embora tenha surgido um número expressivo de novas drogas nas últimas duas décadas não houve uma mudança neste cenário (LOSCHER W, SCHMIDT D, 2011; GALANOPOULOU et al., 2012, DHINDSA, 2015) .

Além das drogas antiepiléticas, alguns tratamentos não farmacológicos são utilizados em pacientes refratários. Um exemplo é a dieta cetogênica, a estimulação do nervo vago e o tratamento cirúrgico (PAYNE et al., 2011, KOSSOFF et al., 2015)

Os estudos experimentais destinados à transferência de genes ativos que sintetizam proteínas específicas, capazes de sustentar compostos terapêuticos ativos de maneira localizada no sistema nervoso central, vêm sugerindo que a terapia gênica é adequada não só para o controle das crises epiléticas, bem como para a cura, por tratar a doença subjacente. Estudos conduzidos em protótipo de formas graves de epilepsia mioclônica progressiva, desencadeada por uma mutação gênica que impede a síntese de cistatina B, demonstrou que a substituição do gene mutado por um gene ativo pode ser uma abordagem real para curar a doença (BOISON, 2007, GUERRINI e FALCHI, 2011). Outros inúmeros estudos experimentais de terapia gênica em roedores para cura da epilepsia estão sendo testados em todo mundo, a expectativa é que em breve tempo os protocolos experimentais em humanos possam representar uma efetiva resposta (GUERRINI e FALCHI, 2011, JIAO et al, 2013, CHUG et al, 2015).

O Patrimônio Genético

E O Fenótipo Alterado

5 ASPECTO GERAL DO GENOMA HUMANO

O conjunto das funções biológicas dos produtos de milhares de genes e a interação destes com o meio ambiente contribuem para o desenvolvimento harmônico do ser humano na manutenção equilibrada da espécie (PENCHASZADEH, 1996). O patrimônio genético (genoma) do ser humano é constituído por ácido desoxirribonucleico (DNA), organizado em unidades codificantes (gene) e regiões, geralmente não codificantes (introns), ordenados em estruturas complexas (cromossomos), com forma e número característicos (BRICARELLI et al., 2006). No ser humano, o genoma está organizado em 46 cromossomos (22 cópias de autossomos e dois cromossomos sexuais, definidos XY nos homens e XX nas mulheres), presentes no núcleo de todas as células do organismo (CAREY e BAMSHAD, 2004, NUSSBAUM et al, 2008; TURNPENNY e ELLARD, 2009)

Este conjunto cromossomo pode ser distinguível em dois grupos ou linhagens: a linhagem somática, que compõe a maioria das células de diversos tecidos, e a linhagem germinativa, que corresponde às células das gônadas, finalizada especificamente para reprodução, transmitindo o patrimônio hereditário de uma geração para outra. As células da linhagem somática possuem duas cópias idênticas do genoma ($2n$), enquanto que as germinativas possuem somente uma cópia (n) (BRICARELLI et al., 1989, CAREY e BAMSHAD, 2004, TURNPENNY e ELLARD, 2009).

Os genes ocupam posições fixas nos cromossomos, essas posições não variam de uma célula para outra ou de um indivíduo para outro, elas são uma característica comum a todos os indivíduos de uma espécie. A posição que um gene ocupa no cromossomo é denominada *locus*, e os cromossomos que possuem a mesma sequência de *locus*, são denominados de homólogos. Habitualmente, cada indivíduo herda um conjunto cromossômico por parte do pai, outro por parte da mãe. Dessa forma, cada célula somática terá um conjunto de 22 pares de cromossomos -materno e paterno- dispostos em homologia, com o mesmo conjunto de *locus* gênicos representados duas vezes. Esta homologia entre os cromossomos é importante para o pareamento que ocorrerá no processo de divisão celular das células germinativas (meiose I), assim como no processo de recombinação genética. Se para um determinado *locus*, a sequência de nucleotídeos que formam os genes presentes no cromossomo materno for igual à que ocorre no cromossomo paterno, o indivíduo será chamado de homocigoto. Se as informações contidas nos cromossomos materno e paterno forem diferentes, o indivíduo

será heterozigoto. As diferentes sequências de nucleotídeos que podem ser encontradas no mesmo *locus* são chamadas de formas alélicas (CAVANI et al., 2002; CAREY e BAMSHAD, 2004).

As formas alélicas surgem através do processo de mutação. Em sentido amplo, uma mutação é toda e qualquer alteração do material genético transmitida para a descendência. Essa definição inclui as mutações nas células germinativas e nas células somáticas e, em relação ao tamanho, pode se referir tanto as grandes alterações (mutação cromossômicas) quanto às alterações em um número menor de pares de bases (mutações gênicas). Frequentemente, as mutações são fontes de doenças genéticas (CARAKUSHANSKY, 2001; CAREY e BAMSHAD, 2004; PISTOLI, 2008).

5.1 ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DO GENOMA

No início dos anos 90 tornou-se evidente que rearranjos genômicos causavam efeito na dosagem de um gene e que este era responsável pelos traços neurodegenerativos de uma neuropatia autossômica dominante conhecida como Charcot-Marie-Tooth tipo 1A (CMT1A), manifestada em adultos (LUPSKI et al., 1991; 1992). Até aquele momento, o modelo clássico conhecido para desequilíbrio na dosagem de um gene era por meio de alterações na sequência nucleotídica do DNA (RAEYMAEKERS et al., 1991, LUPSKI et al., 1992). Outro conhecimento baseado nas evidências era que a maioria das síndromes cromossômicas conhecidas derivavam de alterações estruturais que envolvem segmentos relativamente grandes (>10 Mb), as quais, poderiam ser visualizadas por técnica de citogenética tradicional (CAREY e BAMSHAD, 2004). Porém, em 2001, um estudo do inteiro genoma, para avaliar causas de dismorfismos em pacientes com retardo mental e outros déficits intelectuais e/ou cognitivos, cujos resultados citogenéticos foram inalterados, revelaram diversos rearranjos genômicos com consequentes alterações fenotípicas (JOLY et al., 2001). Estes rearranjos, de fato, representam alterações cromossômicas segmentares, submicroscópicas, semelhantes às encontradas no gene que causava a neuropatia periférica herdada em adultos, discutidas por Lupski e colaboradores, estas alterações são conhecidas como Variações no Numero de Cópias (CNV) (JENNIFER e LUPSKI, 2006).

Por ser resultado de uma ou mais rupturas do DNA, seguidas por restauração incorreta da continuidade dos fragmentos nucleotídicos envolvidos, as alterações estruturais do genoma podem derivar, seja de um defeito do sistema de recombinação, seja dos erros no processo de reparação. Os principais mecanismos propostos para explicar os rearranjos estruturais são: Recombinação Homóloga não Alélica (“NAHR- *Non Allelic Homologous Recombination*”); União Não-Homóloga das Extremidades (NHEJ -“*Non Homologous Joining*”); Modelo de Troca de Forquilha de Replicação (FoSTeS - “*Fork Stalling and Template Switching*”) (GU et al., 2008; STANKIEWICZ e LUPSKI, 2010; BAILLIE, 2011; DWEPP et al., 2013).

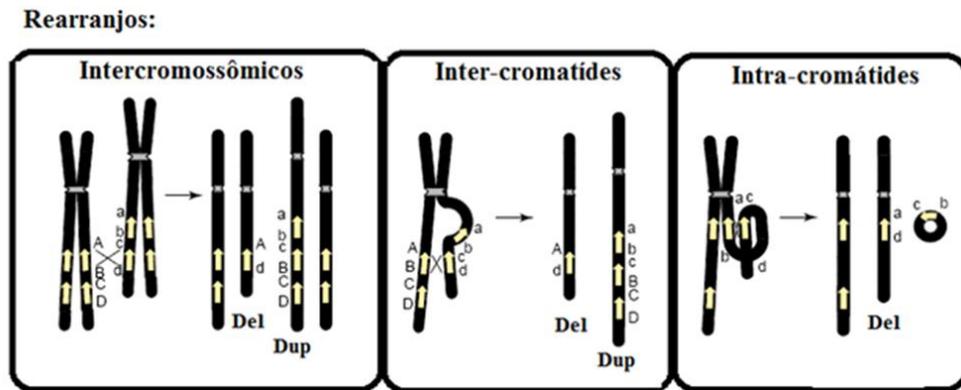
5.1.1 Recombinação homóloga não alélica (NAHR)

Uma propriedade fundamental do DNA é a sua capacidade de sofrer rearranjos que podem ocasionar desde novas combinações entre os genes presentes em qualquer genoma individual, até alterações quantitativas e qualitativas na expressão destes genes. Esses rearranjos são realizados pela recombinação genética e envolvem alinhamento de sequências similares, com formação de zona de cruzamento (Junção de Holliday); quebra e reparo do DNA, a fim de proporcionar uma troca de material entre as cadeias desta molécula. Este é um processo natural que ocorre nos organismos e é denominado de recombinação homóloga (RH) (ZICKLER e KLECKNER, 2015).

A recombinação homóloga não alélica (NAHR) é uma forma de recombinação homóloga que acontece entre duas sequências de DNA com alta afinidade, mas que não são alélicas (CAREY e BAMSHAD, 2004).

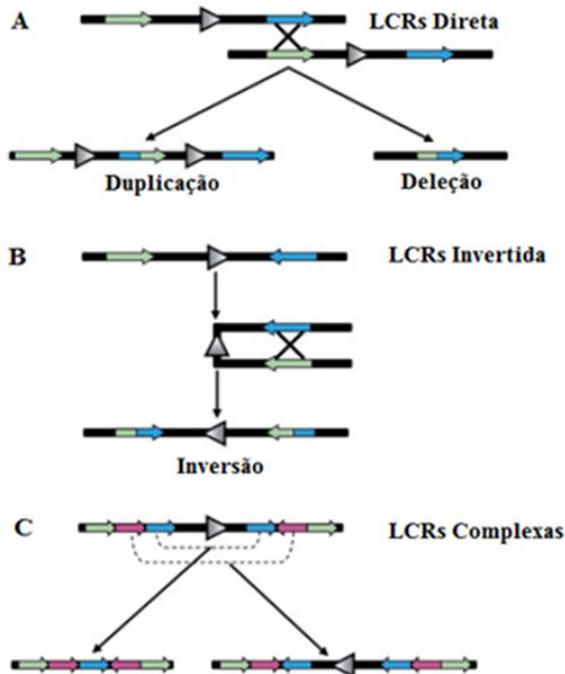
Defeitos no processo de recombinação constituem um dos principais mecanismos responsáveis por alterações estruturais dos cromossomos. Na última década, tem sido comprovado que muitos dos rearranjos encontrados no genoma humano derivam de evento de recombinação homóloga não alélica entre blocos de sequencias repetidas, com dimensões entre 10-300 quilobases (Kb) e com elevada homologia entre elas (> 95% - 97%). Estes blocos de repetições são conhecidos como repetições de poucas cópias (“*Low-CopyRepeats*”- LCRs) ou duplicação segmentar (STANKIEWICZ e LUPSKI, 2002; SHAW, LUPSKI, 2004; BAILEY e EICHLER, 2006). Para que NAHR aconteça é necessária a presença de segmentos de DNA de tamanho mínimo de 300-500pb, com uma identidade de sequência não inferior a 90%. Esta condição é chamada de seguimento mínimo de identidade de sequencia (MEPS do inglês, “*Minimal Efficient Processing Segment*”). O emparelhamento pode acontecer entre LCRs em cromossomos homólogos (intercromossômicos), em cromátides irmãs (inter-cromátides) ou no interior de uma única cromátide (intra-cromátides)

(STANKIEWICZ e LUPSKI, 2002). Com base no mecanismo de emparelhamento, a orientação e a complexidade das LCRs, a NAHR pode resultar em deleção, duplicação, inversão ou outros rearranjos mais complexos, podendo também, envolver cromossomos não homólogos (Figuras 5.1 e 5.2).



Adaptado de:GU et al, 2008. Esquema em preto representa os cromossomos; setas amarelas representam LCRs; Letras(A e a) apontam para as sequencia únicas flanqueadas; os resultados das NAHR entre LCRs, sejam intercromossômicas ou inter cromátides aparecem em forma de Del (deleção) e Dup (duplicação) recíproca. Em intra-cromátides NAHR só cria deleção.

Figura 5.1-Possíveis rearranjos genômicos, resultantes de recombinações através da formação de LCRs.



A) duplicações e deleções são geradas quando NAHR é mediada por LCR diretamente orientadas;(B) As inversões são geradas quando NAHR for mediada por LCRs inversamente orientadas; (C) Diferentes rearranjos complexos são gerados com base na combinação de LCR que participam ao evento de NAHR. As faixas coloridas representam LCR; “X”= recombinações; Flechas grandes cinzas representam única direção de DNA. Um exemplo de CNV de segmento único (gene) é mostrado nos produtos de (A) (Lee e Lupski, 2006).

Figura 5.2- Representação esquemática de rearranjos cromossômicos mediados pelo direcionamento das LCRs em recombinação homóloga não alélica (NAHR).

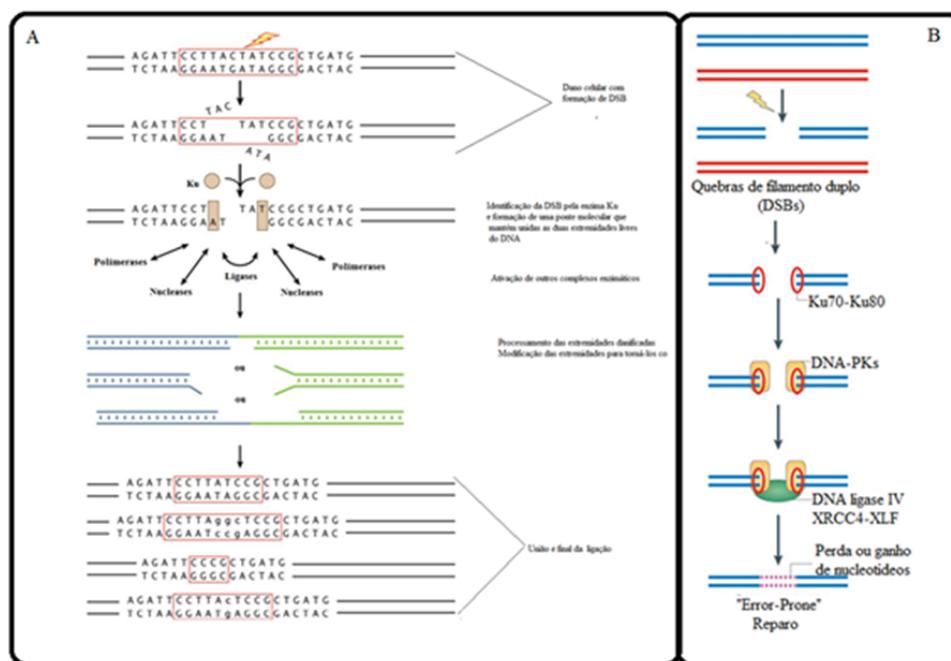
5.1.2 União terminal não homóloga (NHEJ)

O DNA é constantemente exposto a diferentes tipos de fatores que causam danos e estes podem ter origem tanto exógena quanto endógena (DE SILVA et, al., 2000). A união terminal não homóloga é um processo que repara as quebras da cadeia dupla do DNA. Neste tipo de reparo, a união das extremidades quebradas é feita diretamente sem necessitar de homologia das sequencias (MOORE e HABER, 1996).

Entre as diferentes lesões no DNA, a quebra da dupla hélice (DSB, do inglês, “*Double Strand Break*”) é considerada a lesão mais grave para a instabilidade genômica. As DSB’s podem ocorrer após exposição à radiação ionizante e também ser causadas por radicais livres produzidos pelo metabolismo celular (AMENDOLA, et, al., 2005). Em eucariontes, durante a meiose, acontece DSB’s, intencionalmente, por indução enzimática, a fim de promover a recombinação para criação de fontes de diversidades (KLUG et al., 2007; MANSOUR et, al., 2008). Algumas DSB’s já foram reconhecidas após processos de reparação de danos de bases durante a recombinação meiótica e nos rearranjos dos genes da imunoglobulina (GELLERT et al., 2002).

Se não forem reparadas ou se forem reparadas de maneira inadequada, as DSB’s causam múltiplas alterações genéticas como deleções, translocações e até mesmo perda de inteiro cromossomo (BÈTERMIER et, al., 2014; DUEVA e LLIAKIS, 2013; KHANNA e JACKSON, 2001; JACKSON e BARTEK, 2009). Figura 5.3

É possível encontrar na literatura atual comprovação de que as cicatrizes informativas deixadas por NEHJ, com a perda ou adição de nucleotídeos no ponto de junção, assim como os pontos de quebras de rearranjos frequentemente, fazem parte de elementos repetitivos no genoma tais como: as grandes sequências terminais repetitivas (LTR- “*Long Terminal Repeat*”); os Elementos Intercalares Longos (LINEs- “*Long Intersperc edelements*”) e: os Elementos Intercalares Curtos (SINE- “*Short Interspersed Elements*”), especialmente as sequências Alu, principal representante dos elementos transponíveis do genoma de primatas. Todos estes elementos estão associados com desenvolvimento de doenças (GU, et al., 2008).



Adaptado de: LIEBER, 2010; RAM-SHANKAR e CHINNAIYAN, 2010. No processo NHEJ, a extremidade quebrada são reconhecidas pelo heterodínamo Ku70-Ku80 que impede a degradação. O complexo enzimático atrai e ativa a subunidade catalítica de proteína quinase dependente de DNA (DNA-PKcs); o conjunto é levado para a extremidade do DNA quebrado para processamento final, o que envolve as nucleases e polimerases. O complexo DNA ligase IV/XRCC4, na presença de XLF, catalisa a junção do DNA processado. Em (A) detalhes pormenorizados, em (B) desenho esquemático.

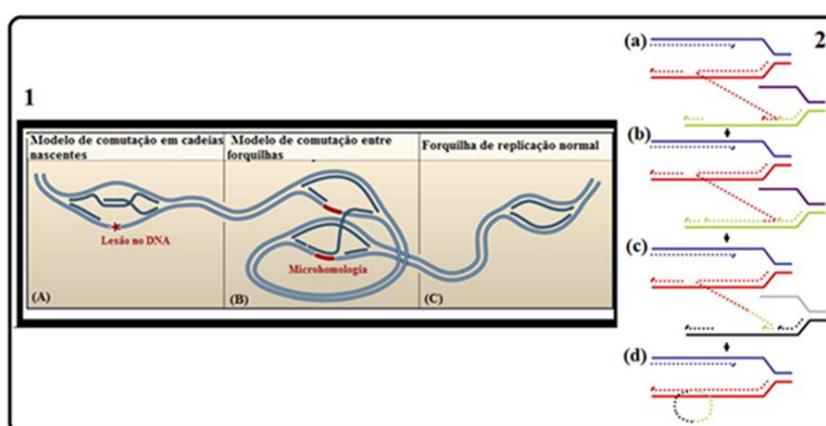
Figura 5.3-Passos geral do reparo do DNA por Junção não homóloga das extremidades.

5.1.3 Modelo de troca de forquilha de replicação (FoSTeS)

Resultados das pesquisas genômicas, na primeira década do ano 2000, revelaram a ocorrência de rearranjos gnômicos complexos associados a doenças que não poderiam ser explicadas pelos mecanismos de NAHR ou NHEJ (LEE, et al., 2006; BRANZEI e FOIANI, 2007). Em 2006, a pesquisadora Lee e seus colaboradores, através de técnica de citogenética molecular analisaram 17 pacientes com apresentação fenotípica de uma forma hipomielinizante de leucodistrofia conhecida como doença de Pelizaeus-Merzbacher (PMD) (LEE et al., 2006). A maioria dos pacientes (60-70%) com este doença apresenta uma duplicação não recorrente do gene codificante da proteína proteolipídica sensível à dosagem (PLP1) (SISTERMANS et al., 1998; INOUE et al., 1999).

Os pesquisadores descobriram que, ao contrário dos resultados moleculares apresentados pelos recém-descobertos distúrbios genômicos, os pontos de quebras das duplicações de PLP1 não se agrupavam, produzindo segmentos genômicos duplicados de

diferentes tamanhos; estes eram interrompidos por segmentos triplicados, deletados ou intactos com microhomologias nas junções. Os achados eram consistentes com o mecanismo de deslizamento serial da cadeia crescente da forquilha de replicação (LEE et al, 2007). Com base nestes achados, os pesquisadores sugeriram haver um mecanismo molecular distinto para o evento de duplicação em PLP1. Chegaram à conclusão que os rearranjos genômicos em pacientes com PMD, provavelmente, ocorreria durante a fase de replicação e levantaram a hipótese que o mecanismo acontecia por falha mecânica no deslizamento da forquilha de replicação, em presença de uma injúria na molécula do DNA. Propuseram, então, o modelo de troca de forquilha de replicação (FoSTeS) para justificar os achados (LEE et al., 2007). (Figura 5.4).



Adaptado de: BRANZEI e FOIANI, 2007; LEE et al., 2007. Em 2, Alinhamento do evento FoSTeS a partir da arquitetura complexa (flanqueadas por LCR) como as que encontradas nos pacientes com PMD: (a) uma forquilha de replicação (linha contínua azul e vermelha) com um filamento retardado (linha pontilhada vermelha) invade uma segunda forquilha (linha contínua roxa e verde), seguida pela síntese de DNA (linha verde pontilhada em (b)); dando continuidade ao processo a forquilha original em (c) (linha contínua azul e vermelho), com o seu filamento retardado (linha vermelha pontilhada) a qual, invade uma terceira forquilha (linha contínua cinza e preto). As linhas pontilhadas representam a síntese do DNA. A forquilha de replicação de série e a invasão do filamento retardado pode ser repetido diversas vezes antes de retomar definitivamente, o modelo original da replicação visto

Figura 5.4- Forquilha de replicação e rearranjos cromossômicos por modelos de comutação.

Achados atuais demonstram que o modelo FoSTeS está associado a rearranjos genômicos não recorrentes que são a base de diversos tipos de doenças (COCQUEMPOT et al., 2009; LIU et al., 2015; ABYZOV et al., 2015; AMBROZIAK et al., 2015), como por exemplo, na duplicação e triplicação do gene MECP2, causadora da síndrome de Rett e outros distúrbios neurodegenerativos (DEL GAUDIO et al., 2006; MEINS et al., 2005; VAN ESCH et al., 2005).

5.1.3.1 *Variações do Número de Cópias (CNV's) e os Distúrbios Genômicos*

As variações no número de cópias (CNV's) são representadas por sequência do DNA encontrada no genoma, diferente da sequência original, resultante de deleções ou duplicações de uma região cromossômica específica, podendo variar de 1 Kb à diversas Mb de dimensão e envolver um ou mais genes (RENDON et al, 2006). Presenças de CNV's com uma frequência maior que 1%, são caracterizadas como Polimorfismos no Número de Cópias (CNPs- "Copy Number Polymorphism") (GU et al., 2008).

Resultados de pesquisas têm demonstrado que, a presença de CNV's em algumas regiões do genoma, não trazem consequências fenotípicas (SHARP et al., 2005; SABAT et al., 2004; IAFRATE et al., 2004; TUZUN et al., 2005). Achados de CNV's em população controle normal, estão incluídos em banco de dados como DGV- "*Genomic Variation Database*" e "*Genomic Structural Variation*" -db Var. As estatísticas dos dados ali depositados apontam que CNV's são encontradas em 35% do genoma humano (CONRAD, 2006; HINDS, 2006; MCCARROL, 2006).

As CNV podem ser classificadas em 5 diferentes grupos: benignas; provavelmente benignas; variantes de significado incerto (*Variant of Unknown Significance, VOUS*); provavelmente patogênicas e patogênicas. Podem ser originada de novo ou segregar de um dos genitores (MILLER et al., 2013)

Atualmente um número sempre crescente de pesquisas, vem demonstrando que CNV's podem influenciar diretamente a dosagem de um gene ou, indiretamente, alterar a expressão gênica por efeito de posição quando incidir em uma região regulatória, sendo esta uma causa frequente de distúrbios genômicos (INOUE et al., 2002; LUPSKI, 2007; AMBROZIAK, 2015).

Quem primeiro cunhou o termo "distúrbios genômicas" foi o pesquisador James Lupski, em 1998, ao afirmar que: "*características estruturais do genoma humano predisõem para rearranjos que resultam em características de doenças humanas*". O mesmo conceituou os distúrbios genômicas como aqueles resultantes de alterações no genoma, capazes de levar a perda completa ou duplicação de um gene (ou genes), sensível (s) a um efeito de dosagem ou, alternativamente, afetarem a integridade estrutural de um gene (LEPSKI, 1998).

Um dos primeiros benefícios do Projeto Genoma Humano (PGH) foi a aplicação de um protocolo para análise de CNV's em pessoas com deficiências, incluindo atraso no

desenvolvimento psicomotor, retardo mental, autismo e epilepsia, grupo que chega a representar 14% da população (BOYLE et al., 2011). Atualmente a estatística demonstra que variação no numero de cópias são cada vez mais frequentes em doenças em todos os tipos de humanos (LANZA, ET AL. 2009).

A análise do genoma com tecnologia de alta resolução tem se tornado um instrumento imprescindível para a medicina atual e sua aplicação tem sido capaz de revelar muitas outras CNV's relacionadas com doenças em humanos, seja ela herdada ou esporádica (LUPSKI, 2007; CHEN et al., 2014).

Genética e Epilepsia

6 EPILEPSIAS GENÉTICAS

Se pensarmos que o primeiro reconhecimento da contribuição genética na gênese das epilepsias data de quatrocentos anos antes de Cristo, diríamos que estamos extremamente defasados no nosso saber. No entanto, a evolução do pensamento médico científico tem o seu próprio tempo de maturação e faz parte do ciclo e reciclo da história, sendo ainda influenciadas pela cultura que compõe a formação dos diferentes profissionais.

As epilepsias genéticas constituem cerca de 30% de todas as epilepsias. Elas podem verificar-se seja em ausência de um dano cerebral demonstrável (epilepsias idiopáticas), em presença de uma lesão cerebral (epilepsias sintomáticas), ter sido geneticamente determinadas (malformações cerebrais, doenças metabólicas etc.) ou ainda estar associada a uma lesão cerebral adquirida, potencialmente epileptogênica ou não, motivo este que nem sempre é possível estabelecer a verdadeira relação causa-efeito (LOUVEL et al., 2009, GUERRINI et al., 2014; WANG et al., 2015).

Por muito tempo a genética vem contribuindo com os estudos sobre patologias que afetam as famílias. Muitos achados de recorrência familiar da epilepsia foram publicados e, com bases nesses resultados, os pesquisadores usavam a matemática para avaliação do risco familiar de recorrência e incidência de novos casos (BIANCHI, 2002). As pesquisas familiares serviram de base para a comparação de traços eletroencefalográficos aparentados nas manifestações epiléticas, tendo os estudos conduzidos em gêmeos fornecidos importantes contribuições na definição das epilepsias, entre as quais, a forma idiopática que, na classificação de 2010, assume o nome de Epilepsia Genética (BIANCHI, 2002; BERG, 2010).

As alterações de base cromossômica há muito representam uma chave de acesso importante para a pesquisa sobre epilepsia. Muitas alterações numéricas e/ou estruturais em cromossomos (autossômicos e/ou sexuais) foram frequentemente associadas com um quadro epilético (SCHINZEL; NIEDRIST, 2001). Isto, em parte, é justificado pelo fato de as anomalias cromossômicas serem a causa de disfunção anatomofuncional do sistema nervoso central, principalmente por falta de uma correta maturação na época da embriogênese (BARKOVICH et al., 2005; LOUVEL et al., 2009, GUERRINI et al., 2014). De fato, os pacientes com cromossomopatias, com frequência, apresentam retardo mental e/ou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, em especial aqueles com alterações estruturais

desbalanceadas de cromossomos autossômicos (SCHINZEL; NIEDRIST, 2001). Vários genes responsáveis por malformações cerebrais já foram mapeados e clonados em diferentes cromossomos, revelando que, a maioria deles, quando não são causa direta de epilepsia, são candidatos a estudos de polimorfismos para verificar suscetibilidade (BIANCHI et al., 2008; JEFFERYS, 2010). (Tabela 6.1).

Schinzel e Niedrist (2001) publicaram uma série de casos de alterações cromossômicas em cromossomos autossômicos (Tabela 6.2), onde a epilepsia foi um dos achados mais expressivos, mesmo que nem sempre os resultados representaram o esperado. Na maioria das vezes, a incidência entre os casos selecionados foi muito variável, sendo encontradas poucas alterações em autossômicos nos pacientes onde a epilepsia se manifestava de forma constante. Foram observadas ainda discordâncias nas manifestações das crises nos pacientes com as mesmas alterações, mesmo nos casos de gêmeos monozigotos. Estes achados levaram os pesquisadores a concluir que as epilepsias causadas por alterações cromossômicas seguem o modelo de herança poligênica (SCHINZEL e NIEDRIST, 2001).

Algumas alterações cromossômicas, cujo aparecimento da epilepsia era uma constante, foram destacadas neste estudo, como por exemplo, os cromossomos em forma de anel, principalmente os anéis dos cromossomos 20 e 14; neste último, 100% dos portadores apresentam epilepsia (PHILLIPS et al, 1995; SCHINZEL; NIEDRIST, 2001; SPECCHIO et al., 2012). A Tabela 6.1 traz as principais alterações cromossômicas com maior ocorrência de crises epiléticas.

Tabela 6.1- Achada Genéticos nas Malformações Cerebrais

Devido à proliferação neonatal anômala	Herança	Locus	Gene	Referência
Esclerose Tuberosa	AD	9q32	TSC1	Dabora et al.,2001
Esclerose Tuberosa	AD	16p13	TSC2	
Devida à migração neonatal anômala				
Lisencefalia Isolada - Heterotopia subcortical	AD	17p13.3	LIS1	Cardoso et al., 2002
Lisencefalia Isolada - Heterotopia subcortical	AD	Xq22.3q23	DCX	Matsumato et al, 2001
Lisencefalia Isolada - Heterotopia subcortical	AD	12q13.12	TUBAIA	Poirier et al.,2007
Síndrome de Miller Dieker	AD	17p.13.3	LIS1+YWHAE	Cardoso et al., 2003
Lisencefalia X-linked+Genitália ambígua	X-linked	Xp21.3	ARX	Kato et al., 2004
Lisencefalia X-linked 2	X-linked	Xp21.3	ARX	Kitamura et al.,2002
Lisencefalia + hiporplasia cerebelar	AR	7q22.1	RELN	Zaki et al.,2007
Lisencefalia + hiporplasia cerebelar	AR	9p24.2	VLDLR	Boycott et al.,2005
Heterotopia Nodular periventricular	X-linked	Xq28	FLNA	Parrini, et al.,2006
Heterotopia Nodular periventricular	AD	5p15.1	-	Sheen et al.,2003
Heterotopia Nodular periventricular+5q del	AD	5q14.3q15	-	Cardoso,et al.,2009
Heterotopia Nodular periventricular	AD	7q11.23	-	Ferland, et al.,2006
Heterotopia Nod. Periventric. + Microcefalia	AR	20q13	ARFGEF 2	Sheen et al.,2004
Distrofia muscular congênita de Fukuyama ou S. de Walker Warburg (WWS)	AR	9q31,2	FCMD	Kondo-lida et al., 1999
Doença de músculo-olho-cérebro ou WWS	AR	19q13.32	FKRP	Beltrán-Valero et al. 2004
Doença de músculo-olho-cérebro	AR	22q12.3	LARGE	Longman et al.,2003
Doença de músculo-olho-cérebro	AR	1p34.1	POMGnT1	Beltrán-Valero et al. 2002
Doença de músculo-olho-cérebro	AR	9q34.13	POMT1	Van Reeuwijk et al., 2006
Doença de músculo-olho-cérebro ou WWS	AR	14.q24.3	POMT2	Van Reeuwijk et al., 2005
Síndrome CEDNIK	AR	22q11.2	SNAP29	Sprecher et al., 2005
Devida à organização cortical anômala				
Polimicrogiria bilateral perisilviana	X-linked	Xq22	SRPX2	Roll et al., 2006
Polimicrogiria bilateral fronto-parietal	AR	16q13	GPR56	Piao et al., 2005
Polimicrogiria com agenesia do corpo caloso e microencefalia	AD	3q21	TBR2	Baala et al., 2007
Polimicrogiria com anidria	AD	11p13	PAXG	Glaser et al., 1994
Polimicrogiria	AD	1p36.3pter	--	Ribeiro et al., 2007
Polimicrogiria com microcefalia	AD	1p44qter	--	Zollino et al., 2003
Polimicrogiria e agenesia do corpo caloso	AD	6q26qter	--	Eash et al., 2005
Polimicrogiria	AD	21q2	--	Yoo et al., 2006
Polimicrogiria e Síndrome Di George	AD	21q11.2	--	Robin et al., 2006
Polimicrogiria e Síndrome de Goldberg-Shprintzen	AR	10q21.3	KIAA1279	Brooks et al., 2005
Polimicrogiria e Síndrome de Warburg Miero	AR	2q21.3	RAB3GAP1	Aligianis et al.,2005
Fonte: Bianchi et al., 2008.				

Tabela 6.2- Incidência da Epilepsia observada em pacientes com diferentes alterações em cromossomos autossômicos

Alteração cromossômica	Incidência de epilepsia	
	N. de casos com epilepsia/ N. de paciente	% com epilepsia
Deleção distal 1p incluindo 1p36.3	13/21	62 [76]
Deleção distal 4p incluindo 4p16.3	121/209	58 [76]
Trissomia 8 a mosaico	17/117	15 [19]
Trissomia 9p	13/111	12 [14]
Trissomia 9 a mosaico	3/44	7[23]
Tetrassomia 12p a mosaico (S. de Pallister-killian)	30/82	36[75]
Deleção 11p13 (S. WAGR)	2/59	3[4]
Deleção 13q(q14)	0/6	0[0]
Duplicação 13q(q14 → qter)	9/23	39[56]
Dissomia uniparental 14 mat	0/18	0[0]
Deleção 15q 11.2→q12 mat (S. Angelman)	70/77	91[92]
Deleção 15q 11.2 q12]pat. (S. Prader-Willi)	3/39	7[10]
Ring cromossoma 15	7/45	15[19]
Tetrassomia 15 pter→q13inv dup(15)(q13)	57/88	65[68]
Dissomia uniparental 15 mat	1/29	3[5]
Dissomia uniparental 15 pat	16/21	76[76]
Deleção 17p 13.3 (S. Miller-Dieker)	7/10	70[100]
Deleção 17p 11.2 (S. Smith-Magenis)	12/81	15[16]
Tetrassomia 18p	15/77	19[25]
Ring Cromossoma 20	14/15	92[92]
Deleção 22q 11.2	19/208	9[13]
Triplificação 22pter → q11 (S.do Olho de gato)	6/86	7[12]
Translocação não-balanceada 11;22 com trissomia 11q23→qter e 22pter→q11	20/128	16[26]
Triploidia	2/104	2[100]

Fonte: Schinzel e Niedrist (2001)

Muitos estudos foram conduzidos em pacientes com alterações cromossômicas, com a finalidade de verificar a concordância do traçado eletroencefalográfico com o evento. Um, em especial, comparou o padrão eletroclínico de dez diferentes alterações cromossômicas. Os resultados demonstraram haver uma notável diversidade de tipos de crises epiléticas, com amplo aspecto de gravidade; no entanto, quando comparado o padrão eletroquímico, foram semelhantes em algumas alterações cromossômicas. Os autores concluíram o trabalho sugerindo que os estudos de comparação entre pacientes com alteração cromossômicas associada à epilepsia são um caminho importante a ser seguido para individualização de genes de suscetibilidade (BATTAGLIA; GUERRINI, 2005).

Outros pesquisadores acreditam ainda que a compreensão da associação existente entre as síndromes cromossômicas e a epilepsia poderá ajudar em novas descobertas neste campo (BAHI-BUISSON, 2005). Existe um consenso no reconhecimento de que estudos de genes localizados nesses cromossomos possam melhor esclarecer os aspectos sobre as respostas terapêuticas evolutivas nas crises epiléticas, contribuindo para a planificação de tratamentos mais racionais, além de possibilitar o aconselhamento genético (SCHINZEL; NIEDRIST, 2001; BAHI-BUISSON, 2005; BATTAGLIA; GUERRINI, 2005; DAVID et al., 2001).

Na década de 1980, a genética molecular se consolidou como uma ferramenta importante no diagnóstico das patologias neurológicas e também da epilepsia. Em 1988, uma localização cromossômica foi identificada como sendo a responsável pelo surgimento da Epilepsia Mioclônica Juvenil (EJA), tida como a mais frequente forma de epilepsia generalizada idiopática (GREENBERG et al., 1988). A partir daí, outros loci cromossômicos foram identificados em diversas formas de epilepsia idiopática; de fato, é neste grupo que vêm sendo encontradas muitas alterações genéticas associadas à epilepsia. É também desta década a identificação e de uma mutação no gene do receptor nicotínico da acetilcolina, na epilepsia autossômica dominante noturna do lobo frontal (STEINLEIN et al, 1995). A clonagem destes genes gerou uma notável vivacidade nas pesquisas e muitas sinalizações de localizações cromossômicas levaram à descoberta de novos genes implicados em diversos tipos de epilepsia (MONTINI et al, 1998; AMIR et al., 1999; ZARA et al., 2000; STROMME et al., 2002; UYANILK et al., 2003; LIN et al, 2005; BATTAGLIA; GUERRINI, 2005; OTSUKA et al., 2010; OTSUKA et al., 2010; CARVILL et al., 2013).

A partir de 2000, as pesquisas genéticas em epilepsia cresceram de forma exponencial. Muitas formas de epilepsia tiveram sua fisiopatologia melhor esclarecida após a descoberta do

seu mecanismo molecular. Famílias numerosas, cujos estudos prévios apresentavam padrão de herança mendeliana, foram reavaliadas com base no perfil gênico (ZARA et al., 2000; SCHINZEL; NIEDRIST, 2001; BAHI-BUISSON, 2005; BATTAGLIA; GUERRINI, 2005; DAVID et al., 2001, JOHNSON et al., 2011). Em famílias que apresentavam genealogias com padrão compatível com herança autossômica dominante foram encontradas mutações gênicas que alteravam canais iônicos, constituindo este um importante grupo para estudo, pois as informações obtidas a partir do conhecimento destes genes trouxeram informações preciosas sobre o mecanismo molecular das epilepsias (ESCAYG et al., 2000; MAZAKI-MIYAZAKI et al., 2001; HERON et al., 2002; MARTIN et al., 2007; MOLINARI, 2010; JOHNSON, 2011).

Avanços como este são importantes não somente para melhorar o conhecimento em um universo ainda muito desconhecido das patogêneses das epileptogêneses em geral, mas, sobretudo, pelas implicações da relevância no diagnóstico, na gestão clínica; na cura dos pacientes com epilepsia; na investigação familiar e no aconselhamento genético, os quais possibilitam, através de identificação precoce de novos casos, a diminuição dos impactos econômicos e psicológicos para a família, oferecendo ainda, através da informação precisa, a possibilidade da família escolher o seu próprio futuro reprodutivo, nos casos comprovados de herança, principalmente das formas graves e intratáveis (BRAICARELLI, 2008; DAVID et al., 2010; ZARA et al., 2010; MILLER et al., 2010;).

Os mecanismos genéticos à base das epilepsias atualmente conhecidos incluem: rearranjos genômicos (cromossoma em anel, translocações, monossomias e trissomias); variação no número de cópias (copy number variation-CNV's); rearranjos submicroscópicos, deleções ou duplicações que envolvem um ou mais genes e alterações de único nucleotídeo que resultam em mutações missenses, frameshift ou nonsenses (MILLER et al., 2010; SPECCHIO et al., 2012; ZARA, et al., 2013;).

Os dados genéticos em uma rara forma monogênica de epilepsia idiopática tem esclarecido o papel patogênico de canais iônicos dependentes de voltagem ou ligando-dependente. Podem ainda ser verificados defeitos de metilação ou dissomia uniparental em determinadas regiões do DNA que provocam aquisição ou perda de função em genes tipicamente expressos só na cópia cromossômica materna ou paterna, como acontece nas síndromes de Angelman e PraderWilli, respectivamente (KATZOS et al., 2004; ZARA, et al., 2010; ZARA, et al., 2013).

6.1 RELAÇÕES GENÓTIPO-FENÓTIPO

A relação entre genótipo-fenótipo epiléptico não é sempre linear. Por exemplo, mutações missense do gene SCN1A se associa a epilepsia com convulsões febris plus (GEFS+) e, ao mesmo tempo, a quadros mais graves como a síndrome de Dravet. Esta expressividade variável poderia ser devida a genes capazes de modificar outro gene principal, amplificando ou reduzindo sua expressividade (genes modificadores), bem como a fatores ambientais e epigenéticos ainda não totalmente conhecidos. Além disso, a mutação pode haver penetrância reduzida: dois indivíduos com a mesma mutação genética podendo haver probabilidade diferente de desenvolver epilepsia, assim como, apresentar o fenômeno da heterogeneidade genética, uma mesma síndrome epiléptica monogênica sendo provocada por mutações em genes diferentes. De fato, por exemplo, muitos genes codificam para diferentes subunidades de um mesmo canal iônico (GARDINER, 2006). No entanto a correlação fenótipo-genótipo se faz necessário. Exemplos atuais revelam essa necessidade.

Mutações nos KCNQ2 e KCNQ3, originalmente descritos em crianças com convulsões neonatais familiares benignas (BFNS), recentemente também têm sido associadas à encefalopatia epiléptica. Allen e colaboradores (2014) descreveram três crianças portadoras de alterações em KCNQ2 e uma criança com uma mutação KCNQ3. As três diferentes mutações em KCNQ2 geraram diferentes fenótipos: na primeira criança, uma duplicação intragênica estava associada à crises benigna neonatais familiares (BFNS); uma deleção de gene contíguos na localização cromossômica 20q13.3 envolvendo KCNQ2, gerou convulsão precoce na segunda criança com 3 meses de idade, e uma mutação de novo tipo missense gerou um quadro de encefalopatia epiléptica em um neonato. Enquanto a mutação em KCNQ3 ocorreu em outra criança com o mesmo fenótipo BFNS (ALLAN et al., 2014). As convulsões geralmente são apresentadas em forma de crises do tipo tônico/ clônicas com manifestação de cianose, apnéia ou estão relacionadas com alterações em canais iônicos, como o canal de potássio voltagem-dependente (KCNQ) acima apresentado. Proteínas que compõem subunidades de um mesmo canal iônico geralmente são associadas a diferentes fenótipos mesmo dentro de um núcleo familiar. Neste sentido as correlações genótipo-fenótipo ajudam a prever o resultado (BEAL et al., 2012; MASTRANGELO e LEUZZI, 2012).

Outro exemplo pode ser dado pela Síndrome de Rett, um raro distúrbio neurodegenerativo, de plasticidade neural que, prevalentemente, afeta indivíduos do sexo

feminino, sendo na sua grande maioria letal em meninos (GOLD e CHRISTODOULO, 2015). As meninas com a Síndrome de Rett geralmente são assintomáticas entre os 6-18 meses de vida, após esta idade, desenvolvem graves e persistentes alterações motoras, cognitivas e comportamentais (NEUL et al., 2010; PANTALEÓN et al., 2015). Uma predominante disfunção neural e simpática, com alteração neuronal das transmissões sinápticas excitatórias-inibitórias e uma plasticidade sináptica são as características gerais desta síndrome nas crianças afetadas e também em modelo animal obtidos em experimentos. Aproximadamente 95% dos casos diagnosticados com Rett são devidos a mutação no gene MECP2 (metil-CpGBinding-Protein2) localizado em Xq28. No entanto outros genes (FOXP1 em 14q13; NTNG1 em 1p13.3; MEF2C em 5q14.3; TCF4 em 18q21.2), estão associados a fenótipos que sobrepõem a síndrome de Rett e geralmente são nomeados como Rett atípica (AMIR et al., 1999; MURPHY et al., 1994; NAKASHIBA et al., 2000). Enquanto que as variantes atípicas da síndrome de Rett são reportadas também em indivíduos do sexo masculino, devido os genes que as precipitam estarem mapeados em cromossomas autossômicos. Os raros casos clássicos com mutação no gene X-link MECP2 relatados em indivíduos do sexo masculino são encontrados em condição de mosaicismos somáticos ou quando acompanhado de alteração de número do cromossômico, quando o indivíduo apresenta um X a mais (47, XXY- Síndrome de Klinefelter) (MOOG et al., 2002).

Em 1984, o médico alemão Hanefeld descreveu uma variante clínica da síndrome de Rett cursando com uma grave encefalopatia em meninos. Em 2004, Weaving e colaboradores descreveram uma família com três membros com fenótipo que sobrepunha a síndrome de Rett, sendo dois meninos e uma menina. Na análise genética não foi encontrada mutação no gene MECP2, mas uma mutação no gene CDKL5, localizado em Xp22 (WEAVING et al., 2004). Em princípio o fenótipo foi considerado como Rett atípica, no entanto, a discordância de alguns aspectos clínicos importantes, tal como a severidade do aparecimento das crises nos primeiros dias de vida, a falta de evolução normal dos 6-18 meses, seguida por involução cognitiva, característicos das fases de desenvolvimento da síndrome de Rett, além da ocorrência da mutação em meninos com cariótipo 46, XY, está direcionando para uma separação em duas síndromes diversas (PANTALEÓN e JUVIER, 2013; ERMEL et al., 2014; GÜRSOY e ERÇAL, 2015). Neste caso, assim como tantos outros, é necessário um acurado detalhamento clínico e a identificação da mutação genética para que se possa estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo e evoluir para as fases de tratamento, previsão do prognóstico e aconselhamento genético.

6.2 IMPACTO DA GENÉTICA SOBRE AS NOVAS AQUISIÇÕES EM EPILEPTOLOGIA

Há tempos estudos experimentais individuaram, na base da epileptogênese, o evento celular conhecido como “*paroxysmal depolarization shift*” (PDS), que se caracteriza pela presença de descargas fásicas intensas de uma população de neurônios, e o papel fundamental das correntes iônicas no curso do seu desenvolvimento, em particular as correntes de sódio, de potássio, de cálcio e de cloro através de canais ativados por neurotransmissores ou variações do potencial de membrana (SZENTE e BODA, 1994). As recentes individualizações de mutações nos genes codificantes de subunidades de canais voltagem-dependentes do sódio, do potássio e do cloro, de receptores de acetilcolina e de GABA em algumas formas de epilepsia têm confirmado os estudos experimentais e permitem, atualmente, inserir algumas formas de epilepsia idiopática entre as canalopatias (HIROSE, 2014). Todavia, a implicação dos canais iônicos em formas muito raras e hereditárias exclusivamente autossômicas dominantes, impõem cautela no ampliar o conceito de canalopatias para todas as epilepsias idiopáticas. Até o momento, de fato, as bases genéticas das formas comuns de epilepsias idiopáticas de herança complexa são desconhecidas (VIITMA et al, 2013).

Dados epidemiológicos revelam que a ocorrência de síndromes clinicamente diversas na mesma família indica a existência de fatores hereditários comuns. A identificação de mutações nos genes SCN1A, SCN1B, GABRG2, associadas a diversos fenótipos dentro da mesma família confirma a observação epidemiológica que as diversas síndromes se desenvolvem pela ação concomitante de fatores hereditários e individuais. Estes achados têm impacto direto na prática clínica cotidiana, assim como no enquadramento diagnóstico (BRAICARELLI, 2008; ZARA et al., 2010; NICITA et al., 2012; BENJAMIN et al., 2012; OLSON et al., 2014; LONG et al., 2015).

6.3 INVESTIGAÇÃO DAS EPILEPSIAS GENÉTICAS

Uma epilepsia genética pode ser suspeitada com base a específicas características clínicas, relatos médicos e familiares e exames instrumentais. As recomendações internacionais indicam alguns sinais e sintomas que devem ser particularmente observados em pacientes com epilepsia a fim de se estabelecer um diagnóstico genético:

- Sinais e sintomas que permitem definir uma específica síndrome epiléptica;
- Dismorfismos faciais ou sintomáticos;
- Anomalias congênitas;
- Parada, regressão ou retardo do desenvolvimento psicomotor;
- Padrão específico de EEG;
- Retardo Mental peculiar
- Resistência ao tratamento
- Observação de recorrência familiar

(ZUPANC, 2010; MASTRANGELO et al., 2011; MASTRANGELO e LEUZZI, 2012; GÜRSOY e ERÇAL, 2015)

Na classificação atual (Berg, 2010), as epilepsias genéticas foram subdivididas em Encefalopatas Epilépticas de Idade Evolutiva e Epilepsia Benigna de Idade Evolutiva.

6.3.1 As encefalopatas epilépticas (EE) de idade evolutiva

As EE são condições nas quais as epilepsias causam ou participam das causas ou agravamento da deterioração cognitivo e/ou comportamental do indivíduo (BERG et al., 2010). Nas EE, muitos genes podem apresentar um quadro epileptológico análogo, associados ou não a sinais e sintomas distintos, seja em nível do sistema nervoso central ou não (ZUPANC, 2010; MASTRANGELO e LUZZI, 2012). Do mesmo modo que, diversas mutações no mesmo gene podem causar formas menos características de epilepsia ou exprimir-se como outros distúrbios do sistema nervoso central tal como retardo mental, déficit de atenção, distúrbios comportamentais entre outros, mas não causando de fato epilepsia (TAVYEV ASHER e SCAGLIA, 2012; OLSON et al., 2014).

As encefalopatias de início neonatal ou precoce se configuram em particular em duas síndromes: a Síndrome de Ohtahara (SO) e a encefalopatia mioclônica precoce (EME), reagrupadas com a sigla EIEE (Early Infantile Epileptic Encefalopathy).

6.3.2 Alterações genéticas na Síndrome de Ohtahara (SO)

A SO é caracterizada por crises tônicas de início extremamente precoce (do primeiro dia de vida até 3-4 meses), acompanhada por aparecimento no EEG da “burst-suppression” (BS): padrão eletroencefalográfico caracterizado por períodos de atividade elétrica de alta tensão alternada por períodos de nenhuma atividade cerebral. As crises são breves, cerca de 10 segundos, podendo apresentar-se isolada ou in Cluster, seja no sono ou em vigília (OHTAHARA e YAMATOOGI, 2006; BEAL et al, 2012; NORDLI, 2012; HOFMEIJER et al, 2013). A Síndrome se associa invariavelmente a deterioramento do desenvolvimento psicomotor, resistência a fármacos, tendo um prognóstico ruim, podendo evoluir para Síndrome de West (SW) (OTSUKA et al., 2010; BEAL et al., 2012).

Embora possa resultar de variedade etiologias, sendo a maioria dos casos associados com anormalidades estruturais do cérebro, casos da SO relacionados a mutações genéticas e alterações metabólicas têm sido descritas (OTSUKA et al., 2010; MOLINARI, 2010).

Alguns genes são frequentemente associados à SO: o gene ARX, tipicamente associado à SO e vários outros sinais relacionado com o neurodesenvolvimento. Estudos demonstram que este gene está envolvido no mecanismo de crescimento do córtex cerebral e na diferenciação dos neurônios GABAérgicos. A gravidade do fenótipo em presença de mutações em ARX é frequentemente, mas não univocamente, correlacionada com o número e o local de polialanina expandida, causando quadros diferentes (SO, SW e crises mioclônicas) (MASTANGELO E LEUZZI, 2012).

Mutação nos genes MECP2, quando em indivíduos masculinos (KAMIEN et al., 2012) e FOXG1 são responsáveis por quadros encefalopáticos precoces com retardo mental, distúrbios do movimento e alterações específicas na ressonância magnética (NOH et al., 2012; LEUZZI, 2012; HOFMEIJER et al, 2013).

As recentes mutações descobertas no gene Cyclin-DependentKinase-Like 5-CDKL5 que se manifestam precocemente (antes dos 3 meses de vida), mesmo que raramente

configurem um EEG com padrão BS, apresentam crises tônicas correspondentes a difusos achatamento do traçado seguido por anomalias focais (BAHI-BUISSON et al., 2008; ZWEIER et al, 2010).

O gene STXBP1 causa cerca 10-30% dos casos de SO se associa a retardo mental grave, sem alterações em neuroimagens, ou com hipomielinização específica e vários distúrbios do movimento da ataxia às discinesias (MASTRANGELO e LEUZZI, 2012; KAMIENET al., 2012).

O gene Polynucleotide Kinase 3-Prime Phosphatase- PNKP codifica para uma proteína envolvida na reparação do DNA se exprime através de mutações homozigotas ou heterozigotas compostas que levam a quadros de microcefalia, retardo mental e SO (MASTRANGELO e LEUZZI, 2012; OLSON et al., 2014). Outros tipos de mutações neste gene podem levar a quadros mais leves ou não apresentar epilepsia, de fato (TAVYEV ASHER E SCAGLIA, 2012).

SCN2A e KCNQ2, são genes codificantes para canais iônicos que apresentam um sobreposição com síndromes benignas e estão envolvidos também em quadros claramente encefalopáticos associados ou não a alterações em neuroimagens, retardo mental, distúrbios comportamentais e do movimento (TAVYEV ASHER E SCAGLIA, 2012).

Finalmente, uma desregulação dos genes ARHGEF9, SRGAP2 e MEFC2 se manifesta através de quadros de encefalopatias epilépticas de início precoce e prognóstico pior do que quando não acontece a desregulação (ZWEIER et al., 2010; SHIMOJIMA et al., 2011; DENNIS et al., 2012).

Com a crescente aplicação de técnicas avançadas de sequenciamento do exoma foi possível evidenciar o envolvimento de outros genes em casos isolados de SO: KCNT1 e PIGQ1 (MARTIN et al., 2014), o gene CASK associado a hipoplasia ponto cerebelar e o gene BRAT1 que comporta também microcefalia e dismorfismos (SAITSU et al., 2012;).

6.3.3 Encefalopatias Mioclônicas Precoces (EME)

A EME é caracterizada por início precoce (entre os três primeiros meses de idade), mioclonias parciais, geralmente associadas a crises parciais erráticas, raramente espasmos ou mioclonias massivas com padrão BS no EEG. Este aspecto é mais evidente no sono. A

patologia é grave, mas não tende a evoluir para outra síndrome epiléptica definida ou apresentar BS persistente no EEG (OHTAHARA e YAMATOIGI, 2006). Causas individuais estão associadas a vários defeitos metabólicos, não existindo anomalias estruturais específicas na neuroimagens. São muitos os genes relacionados com os defeitos no mecanismo bioquímicos ligados à EME; relacioná-los aqui extrapolaria o objetivo deste trabalho. Porém, alguns destes genes individuados recentemente merecem atenção especial, entre eles mutações recessiva no gene SCL25A22, mapeado em 11p15.5, que codifica para um transportador mitocondrial do GABA e que está associada à EME, microcefalia, retinite pigmentosa e hipotonia (NOH et al., 2012; TAVYEV ASHER E SCAGLIA, 2012); mutações no gene PNPO (17q21.32), que codificam a Pirodoxamina Oxidase, que pode precipitar dos quadros de EME e que respondem à suplementação com fosfato de pirodoxal (NOH et al., 2012); mutações em ALDH7A1 (5q23.2), que podem causar hipotonia, hipoplasia cerebelar, atrofia cerebelar difusa e corpo caloso associados a outras crises precoces que respondem a pirodoxina e folato (NOH et al., 2012) e, por fim, mutações do gene TBC1D24, que codifica para proteína envolvida no transporte vesicular e que podem dar quadros análogos (OLSON et al., 2014).

Na tabela 6.3 estão elencadas as características principais de algumas das mais frequentes encefalopatias epiléticas sindrômicas, agrupadas por idade de surgimento e por genes candidatos. Enquanto na tabela 6 é possível observar as características das encefalopatias por agrupamento sindrômico. Enquanto na 6.4 podem ser vistas as principais Encefalopatias Epilépticas de início precoce por agrupamento sindrômico (GOBBE et al., 2014).

Tabela 6.3- Encefalopatia Epiléptica e genes relacionados

Idade média de início	Tipo de crise/ Fenótipo/Síndrome (Id-OMIM)	Gene (nome) Locus cromossômico, Modo de transmissão, Tipos de mutações	Função da proteína	Prognóstico Evolução
>4 meses	Crises tônicas, espasmos, S. de Ohtahara EIEE ⁽¹⁾ 1 ⁻ (OMIM30350)	ARX (<i>aristaless-related homobox</i>) Chr:Xp21.3 XR ⁽²⁾ Mutações puntiformes, deleções/ duplicações de tripletes, mutação truncada.	Fatores de regulação da transcrição; expansão polyA; função na migração e diferenciação celular	Ruim; A gravidade do quadro depende do número e local da polialanina sobrenumerária
< 6 meses	Encefalopatia precoce com crises convulsivas recorrentes EIEE2 (OMIM300672)	CDKL5 (<i>cyclin dependente kinase like5</i>) Chr:Xp22.13 XD ⁽³⁾ Mutações truncadas, missense, splicing, deleções frameshift, inserção, duplicações, CNV	Atividade catalítica ainda não bem esclarecida. Recentemente foi demonstrada que não age do mesmo modo que MECP2 como se pensava.	Ruim; muda crises, evolui para S. West, conservar-se em epilepsia farmacorresistente associada a retardo mental. Quadro mais graves nas mutações truncadas que envolvem o domínio catalítico. Rara e fenótipo mais grave em indivíduos do sexo masculino
Primeiros meses de vida	Crises tônicas Síndrome de Ohtahara EIEE4 (OMIM612164)	STXBP1 (<i>syntaxina binding protein1</i>) Chr:9q34.11 AD ⁽⁴⁾ Mutações heterozigotas missense, truncadas, microdeleções.	Proteína envolvida na liberação sináptica vesicular	Ruim
	Crises tônicas, retardo do desenvolvimento, microcefalia (OMIM613402) AOA ⁽⁶⁾ (OMIM208920)	PNKP (<i>Polynucleotide Kinase 3'- Phosphatase</i>) Chr:19q13.33 AR ⁽⁵⁾ Mutações puntiformes, de clivagem	Enzima envolvida na replicação do DNA	Outras mutações dão quadros mais leves
	Crises tônicas (OMIM 606.524)	SRGAP2 (<i>Slit-Robo Rho Gtpase- Activating Protein 2</i>) Chr:1q32.1	Função relacionada com a migração neuronal	Evolução para síndrome de West

		“Quebra” do gene por translocação balanceada		
	Crises Tônicas+ hiperecplexia EIEE8 (OMIM-300429)	ARHGEF9 (<i>Cdc42 guanine nucleotide exchange factor GEF9</i>) Chr:Xq11.1- q11.2 XR Mutações missenses, “quebra” do gene por translocação balanceada, microdeleções	Co-fator para troca de guanina na divisão celular; claustre de receptores inibitórios pós-sináptico	Ruim Os casos com ganho de função parecem ser mais graves
	Crises tônicas e tônico-clônicas S. Rett variante congênita (OMIM613454)	FOXP1 (<i>Forkhead BOX G1</i>) Chr:14q12 AD Mutações puntiformes, deleções	Fator de transcrição envolvido no desenvolvimento telencefálico	Ruim
>3meses	Crises variável Síndrome de Rett típica, atípica, variante Zappella (OMIM312.750)	MECP2 (<i>metil-CpG-binding protein-2</i>) Chr:Xq28 XD-fenômeno de inativação alterada, mutações puntiformes, microdeleções	Regulador da transcrição, necessário para maturação cerebral	Geralmente ruim; relatado êxito precoce em alguns casos. Quadro precoce letal para os indevidos masculinos
	S. da deleção 5q14.3; retardo mental, movimento estereotipado epilepsia e/ou malformação cerebelar (OMIM 613443)	MEF2C (<i>myocyte enhancer factor 2C</i>) Chr:5q14.3 Casos isolados “Quebra” do gene para transcrição	Migração e diferenciação neuronal	Alterações na regulação da expressão gênica
Primeira semana de vida	Crises tônicas associadas ou não a componentes clônicos focais e apnéia EIEE7 (OMIM602.235) BFNS1 ⁽⁷⁾ e/ou Mioquimia (OMIM121200)	KCNQ2 (<i>potassium channel, voltage gated KQT-like subfamily Q, member 2</i>) Chr:20q13.33 AD Mutação missense	Canal de potássio, proteína transmembrana	Pode haver remissão das crises entre os três primeiros anos de vida, mas o retardo cognitivo permanece. Mesmo gene envolvido em formas diferentes de desordens neurológicas infantis
< 6meses	Epilepsia parcial, crises migratórias ENFL5 ⁽⁸⁾ (OMIM615005)	KCNT1 (<i>potassium channel, sodium activated subfamily T, member 1</i>) Chr: 9q34.3 AD Mutações puntiformes com ganho de função	Sub-família T de canais de potássio	Ruim; alguns pacientes podem desenvolver manifestações comportamentais ou psiquiátricas e/ou desabilidades intelectuais.

Crises tônicas e espasmos infantis; EIEE12 (OMIM613722)	PLCB1 (<i>phospholipase C, beta 1 - phosphoinositide-specific</i>) Chr:20p12.3 AR Deleções em homozigose na região promotora	Enzima envolvida nas vias de sinalização celular	Ruim; EEG com características da S. de West, processo encefalopático difuso, atraso, parada ou regressão do desenvolvimento global, crises recorrentes e refratárias, relato de casos com tetraparesia espástica e morte precoce.
Espasmos infantis EIEE5(OMIM613477)	SPTAN1 (<i>spectrin, alpha, non-erythrocytic 1</i>) Chr:9q34.11 AD Mutações puntiformes, deleções mutações por quebra.	Proteína que forma filamentos do citoesqueleto envolvidos com as subunidades dos axônios; A proteína regulamenta a ligação de receptores e reticulação de actina.	Ruim; surgimento de crises epiléticas associadas com hipsarrítimia refratária; retardo mental grave, alteração no desenvolvimento da linguagem, hipomielinização difusa, atrofia cerebelar e microcefalia progressiva.
Espasmos infantis (OMIM 606382)	MAGI2 (<i>membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 2</i>) Chr:7q11.23-q21.1 Deleção/duplicação, CNV	Empacotamento celular para receptores pré e pós sinápticos.	Mioclônias, retardo no desenvolvimento da fala, desabilidade intelectual, hipotonia, retardo no crescimento global, ataxia episódica. Relatos de casos com dismorfismos (epicanto hipertelorismo, fronte proeminente, microcefalia, micrognatia, ecdactilia das mãos e pés)
Crises polimórficas, mioclônicas, ausência típica, suscetibilidade ao estado febril; Síndrome de Dravet (OMIM607208)	SCN1A (<i>sodium channel, voltage gated, type I alpha subunit</i>) Chr:2q24.3 AD Mutações puntiformes, deleções Possíveis genes reguladores: SCN8A; CACNB4; SCN9A	Subunidade alfa do canal de sódio, várias mutações, diminuem a atividade inibitória de GABA com consequente aumento da suscetibilidade neural	Variável, na maioria há persistência das crises e retardo cognitivo.

6-36 meses	EFMR ⁽⁹⁾ : diversos tipos de crises febris e afebris EIEE9 (OMIM 300088)	PCDH19 (<i>protocadherin 19</i>) Chr:Xq22.1 XL ⁽¹⁰⁾ Mutações missenses e nonsense metilado.	Proteína de membrana que controla a adesão celular	Encontrado mutação também em pacientes com crises epiléticas sem retardo. Letal em indivíduos masculinos.
Segunda infância 2-5 anos	Crises frontais noturnas, atônicas ausência atípica Síndrome de Lennox Gastaut (OMIM)			Ruim
	FESD ⁽¹¹⁾ (OMIM) ESES ⁽¹²⁾	GRIN2A (<i>glutamate receptor, N-methyl D-aspartate 2A</i>) Chr:16p13.2 AD Mutações puntiformes truncadas e de clivagem		Variável; EEG-apresenta ponta onda generalizada contínua no sono lento; desenvolve déficit cognitivo, alteração de linguagem e desabilidade intelectual
	Síndrome de Landau-Kleffner (OMIM)	GRIN2A ((glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2A) Chr:16p13.2 AD Mutações puntiformes truncadas e de clivagem		Anormalidade contínua na região temporal parietal, permanente déficit de linguagem
⁽¹⁾ EIEE: Encefalopatia epilética de início precoce; ⁽²⁾ Ligada ao X Recessiva; ⁽³⁾ Ligada ao X Dominante; ⁽⁴⁾ Autossômica Dominante; ⁽⁵⁾ Autossômica Recessiva; ⁽⁶⁾ AOA: Ataxia-oculomotor-apraxia; ⁽⁷⁾ BFNS: Crises neonatais benignas familiar; ⁽⁸⁾ ENFL: Epilepsia noturna do lobo frontal; ⁽⁹⁾ EFMR: Epilepsia e retardo mental restrito ao sexo feminino; ⁽¹⁰⁾ XL: Ligado ao X; ⁽¹¹⁾ FESD: Epilepsia, focal, com desordem de linguagem, com ou sem, retardo mental; ⁽¹²⁾ ESES: Ponta-onda generalizada, contínua no sono lento.				

Adaptado de Gobbe et al., 2014

Tabela 6.4- Epilepsias benignas e relativos genes candidatos

Epilepsia	Idade média de início	Principais tipo de crise	Gene (nome) Locus cromossômico, Modo de transmissão, Tipos de mutações	Função da proteína	Evolução
Crises Neonatais Benignas Familiares (BFNSs) Tipo 1 (OMIM121200)	Neonatal (1º dia de vida)	Crises tônicas, por vezes seguidas por fase clônica generalizada.	KCNQ2 -(<i>Potassium Channel, Voltage Gated KQT-Like Subfamily Q, Member 2</i>) Chr:20q13.33 AD	Canal de potássio voltagem-dependente	Benigna (remissão no 1ª ano de vida)
			KCNQ3 (<i>Potassium Channel, Voltage Gated KQT-Like Subfamily Q, Member 3</i>) Chr:8q24.22 AD		
Cises Neonatais-Infantis Benignas Familiares (BFNISs)	Poucos dias de vida aos 6 meses	Tônico/clônicas-focais e atônicas	SCN2A (<i>Sodium Channel, Voltage Gated, Type II Alpha Subunit</i>) Chr:2q24.3 AD	Canal de sódio voltagem-dependente subunidade alfa tipo 2	Benigna (remissão espontânea entre o 1ª ano de vida)
		Cluter de crises focais ou tônico-clônicas	KCNQ2 -(<i>Potassium Channel, Voltage Gated KQT-Like Subfamily Q, Member 2</i>) Chr:20q13.33 AD	Canal de potássio voltagem-dependente	
Crises Infantis Benignas Familiares (BFISs) Tipo 3 (OMIM607745)	Entre 3-8 meses	Crises tônico-clônicas	SCN2A (<i>Sodium Channel, Voltage Gated, Type II Alpha Subunit</i>) Chr:2q24.3 AD	Canal de sódio voltagem-dependente subunidade alfa tipo 2	Benigna
Tipo 2 (OMIM607751)	Entre 4-8	Crises focais tônico-clônicas podendo apresentar convulsões febris	PRRT2 (<i>Proline-Rich Transmembrane Protein 2</i>) Chr:16p11.2 AD	Proteína 2 transmembrana rica em prolina	Benigna, as vezes necessitando de terapia no primeiro ano
	Entre 3-8 meses (média de 6 meses)	Crises focais com generalização secundária	KCNQ2 -(<i>Potassium Channel, Voltage Gated KQT-Like Subfamily Q, Member 2</i>) Chr:20q13.33 AD	Canal de potássio voltagem-dependente	Benigna

	Entre 3-8 meses (média de 6 meses)	Crises breves (2 min), geralmente focais	KCNQ3- (<i>Potassium Channel, Voltage Gated KQT-Like Subfamily Q, Member 3</i>) Chr:8q24.22 AD	Canal de potássio voltagem- dependente	Benigna com completo controle
Crises Infantis Benignas Familiares com hemicrania hemiplégica familiar (OMIM602481)			ATP1A2 (<i>ATPase, Na+/K+ Transporting, Alpha 2 Polypeptide</i>) Chr:1q23.2 AD	ATPase, transportador de sódio/potássio alfa 2	
Epilepsia Noturna do Lobo Frontal			CHRNA4 (<i>Cholinergic Receptor, Nicotinic, Alpha 4</i>) Chr:20q13.33 AD	Receptor colinérgico nicotínico Alfa 4	Geralmente, persiste até a idade adulta
Tipo 1 (OMIM600513)	Idade infantil	Crises frequente brusca e imprevisível caracterizada por movimentos desordenados durante o sono			
Tipo 2 (OMIM603204)			Marc D15S152 Chr:15q24 AD	Receptores colinérgicos nicotínicos	
Tipo 3 (OMIM605375)			CHRN2 (<i>Cholinergic Receptor, Nicotinic, Beta 2</i>) 1p21.3 AD	Receptor colinérgico nicotínico Beta 2	
Tipo 4 (OMIM610353)			CHRNA2 (<i>Cholinergic Receptor, Nicotinic, Alpha 4</i>) Chr:8p21.2 AD	Receptor colinérgico nicotínico Alfa 2	
Epilepsias Genéticas com Convulsões Febris Plus (GEFS+)	Entre 6 meses a 6 anos. Persiste crises febris além dos 6 anos	Amplo espectro de fenótipo: generalizadas associadas à febres; crises tônico-clônicas; crises parciais; crises de ausência...	SCN1A (<i>Sodium Channel, Voltage Gated, Type II Alpha Subunit</i>) Chr:2q24.3 AD	Canal de sódio voltagem- dependente subunidade alfa tipo1	Geralmente benigna (2- 7% das crianças desenvolvem crises afebris ao longo da vida;
Tipo 2 (OMIM604403)					Encontrado também na Síndrome de Dravet; em hemicrania hemiplegia familiar; em Crises Febris Familiar.
Tipo 1 (OMIM604233)			SCN1B (<i>Sodium Channel, Voltage Gated,</i>	Canal de sódio voltagem-	Encontrado também em

			<i>Type I Beta Subunit</i> Chr:19q13.12 AD	dependente subunidade beta tipo 1	EEEE
			SCN2A (<i>Sodium Channel, Voltage Gated, Type II Alpha Subunit</i>) Chr:2q24.3 AD	Canal de sódio voltagem- dependente subunidade alfa tipo 2	—
Tipo7 (OMIM613863)			SCN9A (<i>Sodium Channel, Voltage Gated, Type IX Alpha Subunit</i>) Chr:2q24.3 AD	Canal de sódio voltagem- dependente subunidade alfa tipo 9	Encontrada também em Crises Febris Familiar
Tipo 3 (OMIM611277)			GABRG2 (<i>Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) A Receptor, Gamma 2</i>) Chr:5q34 AD	Receptor de GABAa subunidade gama tipo 2	Encontrada também em Crises Febris Familiar
Tipo 5 (OMIM 613060)			GABRD (<i>Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) A Receptor, Delta</i>) Chr:1p36.33 AD	Receptr de GABAa subunidade delta	Descrito também em epilepsia idiopática generalizada e nas epilepsias mioclônicas juvenis
Tipo 4 (OMIM609800)			? Chr:2p2 AD	?	?
Tipo 8 (OMIM613828)			? Chr:6q16.3-q 22.31 AD		
Tipo 6 (OMIM612279)			? Chr:8p23-p21 ?		
Epilepsia Mioclônica Familiar Infantil (FIME) (OMIM605021)	Primeira Infância	Início com Crises mioclônicas, convulsões febris e crises tônico- clônicas	TBC1D24 (<i>TBC1 Domain Family, Member 24</i>) Chr:16p13.3 AR	Família de domínio TBC 1 tipo 24	Encontrada também em EEEE 16
Epilepsia Familiar do Lobo Temporal Tipo 1 (OMIM600512)	Início entre 8-19 anos	Crises parciais originadas do lobo temporal, geralmente associadas a sintomas sensoriais	LGI 1 (<i>Leucine-Rich, Glioma Inactivated 1</i>) Chr:10q23.33 AD	proteína 1 rica em leucina inativada em glioma	Benigna, geralmente com uso farmacológico

		(comumente de natureza auditiva, mas também olfativa, visiva ou vertiginosa), crises autonômicas (gástricas/epigástricas, taquicardia) e ou físcico-emocional(medo, dejavu)			
Epilepsia Mioclônica Juvenil (Síndrome de Janz)	Da adolescência à II década de vida	Presença de grampos mioclônicos, algumas vezes associada a ausência típica	GABRA 1 (<i>Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) A Receptor, Alpha 1</i>) Chr:5q34 AR	Receptor GABA Alfa 1	Encontrada também em EEEI 19 e Epilepsia ausência infantil
Epilepsia Mioclônica Juvenil (EJA)			EFHC1 (<i>EF-Hand Domain (C-Terminal) Containing 1</i>) Chr:6p12.2 AD	Proteína C-terminal contendo motivo em mão EF	Encontrada também na ataxia episódica tipo 2
Epilepsia generalizada idiopática com fenótipos variáveis	Variáveis com dois picos: (4-10 anos) (6-12 anos)	Diversos fenótipos (crises de ausência infantil e juvenil; crises mioclônicas juvenil; epilepsia grande mal)	SLC2A1 (<i>Solute Carrier Family 2 (Facilitated Glucose Transporter), Member 1</i>) Chr:1q34.2 AD	Família soluto Transportador 2 (transportador de glicose) tipo 1	Bom prognóstico com resolução na adolescência ou logo após
Chr = cromossomo; AD= autossômica dominante ; AR= autossômica recessiva ; EEEI= Encefalopatia Epiléptica de Início na Infância;					

Adaptado de Gobbe et al., 2014

1.1.1 Encefalopatias Benignas da Idade Evolutiva

Para quem entra em contato com o mundo prático das manifestações epiléticas, o termo benigno dado a algumas manifestações epiléticas ou até mesmo a algumas alterações genéticas nestas encontradas, parece um paradoxo. A pergunta que fica é: o quanto benignas são estas manifestações?

Em termos neurológicos são definidas como epilepsias benignas aquelas que apresentam um bom resultado em termos clínicos, terapêuticos (boa resposta farmacológica) e bom desenvolvimento cognitivo (BERG et al, 2010; ZARA et al., 2013). Também no estudo genético não é possível estabelecer uma relação linear entre genótipo-fenótipo ou fenótipo-genótipo das epilepsias benignas devido à heterogeneidade genética apresentada (ALLEN et al., 2014).

Dois tipos de epilepsias classificadas como benignas têm chamado a atenção nas últimas décadas pelos relatos de vários déficits e/ou dificuldades relatadas por pais, professores e pelo próprio paciente: A Epilepsia Rolândica (RE) ou epilepsia benigna da infância com paroxismos centrotemporais e a Epilepsia Mioclônica Juvenil (EJA).

6.3.4 Achados genéticos em Epilepsia Rolândica (RE)

A epilepsia Rolândica ocorre na criança saudável em idade escolar, se manifesta por crises no segundo período da noite ou próximas ao despertar, caracterizadas por sensação na face, salivação abundante, dificuldade para falar seguida de crises motoras na face que podem se estender para o braço e mais raramente para a perna, se mantendo geralmente restritas a um dos lados do corpo. Nestas crianças, as crises têm de fácil controle em 80% dos casos, com remissão total na adolescência, geralmente sem uso de medicações (SMITH, 2015). Porém, constantes queixas de baixo rendimento escolar e dificuldade nas funções executivas tem atraído atenção dos pesquisadores para uma avaliação mais aprofundada desta forma benigna de epilepsia. Estudos neuropsicológicos e de imagens têm comprovado que algumas crianças com epilepsia Rolândicas são mais lentas na execução de tarefas assim como nos desempenhos cognitivos em geral. Estudos de imagens demonstraram uma diferença na ativação funcional das regiões frontais e temporais destas crianças com uma população controle normal, sugerindo diferenças na organização da rede cerebral que contribuem para compreensão da leitura, por exemplo (SMITH et al,2015; MALFAIT et al., 2015). Outros

estudos demonstram que o desenvolvimento das características atípicas da RE depende de um espectro clínico de fenótipos variáveis dependente da idade, assim como de uma predisposição genética. Uma pesquisa conduzida por pesquisadores espanhóis concluiu que o início precoce da RE, aparecimento de novas crises convulsivas com uma frequência aumentada, além de aparecimento focos frontocentrotemporais no EEG, são características de um desenvolvimento eletroclínico atípico nesta forma de epilepsia (PESÁNTEZ-RÍOS et al., 2015).

Por longa data pesquisadores assumiram a possibilidade de uma contribuição genética forte nas gêneses das epilepsias focais idiopáticas. No entanto, ao longo dos anos, pouco se falou dos genes envolvidos com esta forma de epilepsia. Em 2010, pesquisadores alemães, através de triagem de todo genoma para avaliar alterações genômicas estruturais com a técnica de CGH microarray, relataram 3 casos de microdeleção em 16p13, tendo como o único gene localizado na região crítica compartilhado por todos os três pacientes o GRIN2A, que codifica para subunidade alfa-2 neuronal de N-metil-D-aspartato (NMDA). Em resumo, os pesquisadores sugeriram que a deleção chr:16p13.2p13.13 constitui uma Síndrome de microdeleção com características variáveis, dismórficas e intelectuais e crises características do espectro rolândico (REUTLINGER et al, 2010).

Sucessivamente, no mesmo ano, Endele e colaboradores sequenciaram as subunidades A e B do gene GRIN2 em um grupo de 127 e 468 indivíduos com epilepsia idiopática e/ou retardo mental e retardo mental, respectivamente. Atraves deste estudo foram descobertas mutações no GRIN2A em três gerações de uma família e uma mutação de novo no mesmo gene em uma menina com quadro de encefalopatia epiléptica de início precoce, assim como uma mutação por missense por erro de leitura e duas inserções na subunidade beta do mesmo gene. Os pesquisadores sugeriram que os distúrbios que interferem no equilíbrio eletrofisiológico neural, durante a fase de desenvolvimento, resultam em fenótipos neurológicos variáveis, dependendo de qual unidade do receptor NMDA for afetado (ENDELE et al., 2010);

Em 2013, uma atenção maior foi dada para pesquisa genética nesta população de pacientes. Três comunicações tidas como “tope de linha” foram publicadas em um mesmo volume da revista Nature Genetics associando o gene GRIN2A com encefalopatia que cursa com afasia adquirida, como na Síndrome de Lindau-Kleffner (LKS), e nas epilepsias centrotemporais com picos contínuos de ondas lentas durante o sono (POCS). Os autores

sustentam que estes fenótipos podem ser vistos como expressões clínicas de uma única entidade patológica. Como a região rolândica faz parte da região cerebral envolvida na produção da fala, casos de afasia adquirida poderiam ser uma característica proeminente em alguns pacientes RE. Com estes estudos, os pesquisadores acreditam que alterações eletroclínicamente atípicas encontradas em pacientes com RE, frequentemente associadas com comprometimento da fala e déficit cognitivo, poderiam ter uma origem genética sustentada por mutação de novo no gene GRIN2A (LESCA et al, 2013; CARVILL et al.: 2013; CARVILL et al.: 2013; LEMKE et al., 2013).

N-metil-D-aspartato (NMDA) são receptores pós-sinápticos de glutamato que possibilitam o afluxo de sódio e de cálcio na pós-sinapse, essencial para transmissão das atividades neurais (LESCA et al., 2013). Além disso, estes receptores são fundamentais para a plasticidade sináptica, mecanismo molecular à base do aprendizado e da memória (SMITH, et al., 2015). Entre todos os receptores de glutamato, estes são os principais receptores para os principais neurotransmissores excitatório do sistema nervoso central (SNC) (GÜRISOY e ERÇAL, 2015).

As Mutações e deleções no gene GRIN2A identificadas nos pacientes com síndromes epilépticas, afasia ou outras formas de epilepsias idiopáticas, são suscetíveis de provocar a redução na expressividade da proteína que compõe a subunidade deste importante receptor (NR2A) (EDELE et al., 2010; LESCA et al., 2013;).

Um grupo de pesquisadores realizou uma pesquisa em 204 pacientes europeus com epilepsia RE típica e variantes atípicas (ARE), comparando com 728 controles. O objetivo principal deste estudo foi comparar a frequência de 18 genes que codificam para receptores GABAérgicos, com finalidade de testar mutações no gene que codifica o receptor ácido γ -aminobutírico da subunidade tipo A (GABAA-R) e verificar sua contribuição na etiologia da RE e/ou nas ARE. O método utilizado foi plataforma para sequenciamento do inteiro exoma (*Whole Exome Sequencing*-WES), sendo posteriormente avaliados os resultados das variantes GABAA-R identificadas em suas diferentes capacidades: funcional, na estabilidade da proteína formada, no tráfico, o agrupamento pós-sináptico e a função do receptor. Os resultados obtidos revelaram variantes raras do gene GABRG2 (gene ácido gama-aminobutírico (GABA) receptor 2), em paciente RE e ARE, mostrando na avaliação funcional uma expressão reduzida de superfície desta subunidade e diminuição de corrente evocada de GABA. A avaliação mostrou ainda níveis reduzidos de palmitoilação

(modificação pós-traducional crucial para realização de tráfico das proteínas para a membrana celular). Os pesquisadores interpretaram os resultados como prova que mutações neste gene aumentam o risco de RE e ARE e acreditam que estudar a relação entre mutações em GABRG2 e a palmitoilação pode ser útil para abordagem terapêutica para reverter o efeito

6.4 AS TÉCNICAS DE INVESTIGAÇÃO GENÉTICA E SUAS INDICAÇÕES CLÍNICAS EM EPILEPSIA

Para determinar a causa genética de uma epilepsia, atualmente são disponíveis diversas técnicas de investigação com a finalidade de escolher as mais apropriadas e eficazes, de acordo com o caso em questão. Porém, antes de tudo, se faz necessário pôr-se frente a cada caso individualmente a pergunta: Por que acontece neste caso?

6.4.1 Premissa pré-teste

Atualmente tornou-se fácil entender esta necessidade, pois a genética deixou de ser um tema secundário para ser vista como um elemento central a ser considerado em todos os casos de desenvolvimento de doenças. Não existe um só órgão ou sistema, nenhuma especialidade ou disciplina na área biomédica em que a genética não possa fazer parte como tema central.

O termo fenótipo do grego, *faínein* = mostrar, visto como princípio fundamental da genética, é o resultado da interpretação do genótipo (resultado da constituição genética, com o meio ambiente). Desta maneira, um caráter genético pode ser interpretado como sendo uma manifestação com distribuição familiar e populacional, na qual o efeito do ambiente pode ser minimizado ou não levado em conta, e vice-versa (um fenótipo “não genético” pode ser considerado como aquele cuja contribuição genética pode ser desprezível) (BEIGUELMAN, 2008).

6.4.2 A importância da História Familiar

O nascimento de uma criança com epilepsia, primariamente considerado como um evento isolado, como de fato o é na grande maioria das vezes, pode, ao contrário, ser devido ao resultado do cruzamento genético entre genitores portadores sadios ou assintomáticos, que carrega uma alteração genética, assim como acontece para tantas outras doenças hereditárias (BRICARELLI, 2008; ZARA et al 2013). Um exemplo disso pode ser dado observando os resultados obtidos por um grupo de pesquisadores italianos (ZARA et al., 2000; De FALCO et al, 2001). Os mesmos diagnosticaram Epilepsia Mioclônica Idiopática em 8 dos 14 primos de uma vasta família napolitana. Até aquele momento raros casos deste tipo de epilepsia tinham comprovação de transmissão hereditária, sendo conhecida somente com a modalidade dominante, a qual não comporta a existência de portadores sadios (AICARDI, 1986; NAKAMURA, 1990; MINASSIAN et al., 1995; PLASTER et al., 1999). O estudo desta família revelou que alguns membros, mesmo sendo assintomáticos, eram portadores de uma alteração genética no cromossoma 16p13 (ZARA et al., 2000). Esse caso, na época, foi uma exceção: a primeira vez que uma epilepsia idiopática foi descrita com transmissão autossômica recessiva. Neste sentido, vale à pena ressaltar que uma investigação familiar se faz necessária, mesmo nos casos aparentemente esporádicos (De FALCO et al, 2001; BRICARELLI, 2008).

Na era pós-genômica, com os avanços tecnológicos e as possibilidades diagnósticas das causas genéticas que envolvem as diversas patologias, uma história familiar detalhada é uma informação tão crítica para o prontuário de um paciente quanto os sinais vitais; achados e resultados laboratoriais. Schaefer e Thompson, J., na sua última publicação ressaltam que:

“(...) na prática, quem usa este recurso já sabe que uma história familiar cuidadosamente construída e adequadamente interpretada é uma ferramenta de diagnóstico poderoso e se torna tão efetiva quantas todas as opções de exames combinados”. (SCHAEFER E THOMPSON, JR, 2015).

Em 2004, a agência de saúde dos Estados Unidos iniciou uma campanha de saúde pública sobre o uso do histórico familiar encorajando as famílias americanas a aprender mais

a respeito de suas condições hereditárias (CARMONA e. WATTENDORF, 2005). O quadro 3 resume os objetivos desta pesquisa.

A determinação do padrão de herança fica facilitada quando se faz a representação gráfica das relações de parentesco entre o propósito e outros membros da genealogia, isto é, pelo heredograma. Este recurso, sem custo adicional, além do tempo, quando bem estabelecido, é o começo de um investigação genética diagnóstica que possibilitará novas descobertas e, na era atual, esta se tornando indispensável para investigação genética laboratorial e até mesmo clínica também nas epilepsias (BEIGUELMAN, 2008; BRICARELLI, 2008; ZARA et al.,2000; SCHAEFER E THOMPSON, JR, 2015). Para os casais em risco, aquelas que já têm filho (os) ou parentes afetados, se trata de uma descoberta importante: conhecer a modalidade de transmissão é em efeito o primeiro passo para a prevenção e o diagnóstico precoce (BEIGUELMAN, 2008; BRICARELLI, 2008).

- Aumentar a consciência da população sobre a importância da história familiar para sua saúde;
- Fornecer ferramentas acessíveis ao público para reunir, entender, avaliar e usar as informações da história familiar para indivíduos leigos e profissionais de saúde;
- Aumentar a consciência dos profissionais de saúde acerca da importância da história familiar;
- Aumentar a utilização da história familiar por profissionais da saúde e comunicar isso a seus pacientes;
- Aumentar o grau de instrução acerca de genômica e saúde;
- Preparar tanto a população americana quanto seus profissionais da saúde para a era que se aproxima, na qual a genômica será parte integral da assistência médica regular.

Fonte: Carmona RH, Wattendorf DJ. American Family Physician, 2005•.

Quadro 6.1 - Metas da iniciativa americana para a saúde familiar

Para Bernardo Beiguelman, quando se trata de padrões genéticos, é necessário um olhar para além do indivíduo, sabendo-se da importância de estudar seus antepassados, descendentes e outros parentes (BEIGUELMAN, 2000).

Um fator muito importante, que reforça a necessidade de se saber o histórico familiar de um paciente, é o efeito causado pelas relações de parentesco. Parentesco genético entre dois seres humanos pode ser medido por intermédio da probabilidade de eles terem genes idênticos, herdados de um ancestral comum a ambos (FREIRE-MAIA, 1986; BEIGUELMAN, 2000).

No modelo de transmissão autossômica recessiva existe uma alta frequência de casamentos consanguíneos entre os genitores de indivíduos afetados. Quanto mais próximo for o grau de parentesco entre os genitores e quanto mais raro for o gene, a frequência deste aumenta na família com relação à população. Em populações caucasoides tem-se verificado que o percentual de indivíduos afetados por doenças autossômicas recessivas (que são filhos de primos em primeiro grau) pode atingir valores extraordinariamente altos (BEIGUELMAN, 2005; AZEVEDO, 1991).

6.4.3 Técnicas de investigação genética

É evidente que os atuais avanços na metodologia da investigação genômica provocaram uma mudança de paradigma nas pesquisas genéticas e estão redirecionando a maneira de pensar de muitos pesquisadores e clínicos. Se, no passado, a determinação de um diagnóstico em indivíduos com fenótipo alterado era limitado por impossibilidade de gerar dados genotípicos, atualmente o maior desafio é dar significado às diversas variantes genômicas reveladas em pesquisas genéticas de determinados indivíduos, famílias ou população (SZAFRANSKI et al, 2010). Mesmo sendo importante reconhecer que cada técnica há sua própria limitação e nenhuma é, até o momento, capaz de explorar o inteiro genoma em todas as suas complexidades, os instrumentos colocados à disposição da ciência são atualmente indispensáveis como auxílio diagnóstico para as doenças genéticas e complexas.

6.4.4 Citogenética convencional

A investigação por análises cromossômicas (citogenética-convencional) ainda são válidas, mesmo que em um número reduzido de pacientes com epilepsia. De fato, elas podendo evidenciar alterações cromossômicas, numéricas, estruturais e eventualmente outras alterações cromossômicas características que meçam entre 5-10Mb. Em indivíduos com

epilepsia associada a retardo mental, dismorfismos e outras anomalias congênitas, bem como, com histórico familiar compatíveis com alterações cromossômicas já foram descritas. Por exemplo, a descoberta dos cromossomos em anel 14 e 20 nas décadas de oitenta e noventa respectivamente (LIPPE e SPARKES, 2001; SCHEFFER et al., 1994; PHILLIPS et al, 1995). Em pacientes com este tipo de alteração, as crises são cotidianas, com episódios variáveis ao longo do tempo e geralmente são resistentes a fármacos (VAN KARNEBEEK, 2000; GARCIA-CRUZ, 2000; VIALLE, 2006; ZHANG, 2004; ISHMAEL, 2003).

6.4.5 Citogenética molecular

A hibridação genômica comparativa sobre microarray (*Array-Comparative Genomic Hybridization ou Array-CGH*) é um método desenvolvida para identificar anomalias cromossômicas de tipo numéricas ou variações (variações no numero de cópias-CNV) no conteúdo de pequenas porções cromossômicas, como duplicações/amplificações (presença de cópias em excesso de segmento de DNA), ou deleções (perda de porção de DNA no genoma). O poder resolutivo das análises é variável. Atualmente, para finalidade diagnóstica, são empregadas array entre 1Mb e 100Kb, ou seja, uma resolução de 100 vezes mais elevada com relação à citogenética convencional. Além disso, o método Array-CGH é capaz de definir exatamente a região genômica alterada e, portanto, também os genes contidos nesta região, melhorando a compreensão da relação existente entre variações no número de copias e a patologia. Quando a epilepsia não está associada a retardo mental e eventualmente outras características, o impacto diagnóstico desta técnica parece ser inferior (WANG et al., 2015).

6.4.6 Sequenciamento tradicional e sequenciamento de nova geração (NGS)

O sequenciamento Sanger é um método rápido para a determinação da sequencia de DNA por meio de sínteses estimuladas por DNA polimerase. Progressivamente, foram colocados à disposição os chamados Sequenciamento de Nova Geração (Next Generation Sequencing-NGS), que têm permitido o sequenciamento com elevada velocidade e “baixo custo”, quando comparado com o tempo gasto com o emprego da técnica de sequenciamento tradicional (GOLD WA e CHRISTODOULO, 2015). A técnica de NGS permite a construção de painéis de genes para análise de certo numero de pacientes de uma só vez (geralmente 16-32). Atualmente esta sendo muito utilizado para pesquisas de mutações

em genes relacionados com encefalopatias epilépticas. O teste tem uma sensibilidade de cerca 90%, variável de 80 a 95% de acordo com o gene. Tal análise implementa a triagem mutacional, a fim que o teste alcance uma sensibilidade superior a 95% para os genes mais envolvidos em específicas categorias sindrômicas (MASTRANGELO, 2015; REAM e PATEL, 2015).

6.4.7 Sequenciamento de inteiro Genoma e Exoma

O sequenciamento completo do genoma do organismo humano em um único experimento é conhecido como sequenciamento do inteiro genoma (*Whole Genome Sequencing-WGS*). O experimento foi iniciado em 2006 e atualmente já é uma realidade, ainda que extremamente dispendiosa para ser aplicada na atividade clínica (NG PC e KIRKNESS, 2010 ; MASTRANGELO, 2015). Se escolheu, portanto, desenvolver métodos alternativos, definidos “alvos”, que se concentram somente sobre uma região específica do genoma humano, representando abordagem a preços acessíveis para individuar eventuais variantes gênicas associadas à doenças, inclusive a epilepsia. O sequenciamento de todas as regiões codificantes de proteína do genoma é o candidato promissor: o exoma constitui cerca de 1% do genoma e requer sequenciamento somente de cerca 30 Mb; o sequenciamento do inteiro exoma (*Whole exome sequencing -WES*) é somente 1/20, com relação ao WGS (NG, BIGHAM et al, 2010; MCDONELL et al., 2014), mas representa um conjunto altamente rico do genoma onde procurar as variantes com grande efeitos fenotípicos, sendo muito usada atualmente para pesquisa em epilepsia (KLASSEN et al., 2011; VEERAMAH et al., 2013; MCDONELL et al, 2014; REAM e PATEL, 2015; CEN et al, 2015). O

WGS é mais útil para os distúrbios com provável heterogeneidade genética. Esta estratégia pode estendida também para as doenças com uma genética mais complexa, através análises de amostra de dimensões maiores e para o estudo do impacto funcional das variantes não sinônimas identificadas (NG, BIGHAM et al, 2010; CEN et al, 2015; CEN et al, 2015). Além disso, o WGS representa uma base promissora para a medicina genômica personalizada (MAJEWSKI et al., 2011). De fato, graças a identificação do gene causador, será possível identificar a via proteica alternada que ode fornecer o alvo para uma terapia mirada (REAM MA e MIKATI 2014; DIETEL, et al., 2015; TACIK et al., 2015). A tabela 6.5 traz uma revisão geral das principais técnicas que vem sendo utilizada para o diagnóstico genético em epilepsia com suas indicações clínicas.

Tabela 6.5- Métodos de investigação genética nas epilepsias

TIPO DE INVESTIGAÇÃO	DESCRIÇÃO	QUANDO UTILIZAR
Cariótipo convencional	Representação estrutural e numérica das cópias cromossômicas do indivíduo.	Em pacientes com epilepsia associada a dimorfismos, anomalias congênitas múltiplas, suspeita de monossômias, trissômias ou rearranjos cromossômicos (translocações, duplicações, deleções, anel cromossômico...)
Cariótipo molecular (Microarray)	Baseia-se sobre hibridização de DNA do paciente com DNA controle em sondas específicas empregadas seja para evidenciar polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP-arrays) ou para determinar rearranjos cromossômicos submicroscópicos, como as CNVs, em diversos loci contemporaneamente (Array-CGH).	Sobretudo quando a epilepsia está associada a retardo do desenvolvimento, retardo mental, déficit cognitivo, autismo e/ou dimorfismos.
Sequenciamento de um único gene (Sanger)	Revela alterações na sequência de bases nucleotídicas que compõe os genes e prevê se esta provoca alterações nos aminoácidos	Quando se suspeita que a epilepsia é causada por alteração em um gene específico (SCN1A, SLC2A1; GRIN2A...)
Sequenciamento para pesquisa de mutação específica	Pesquisar mutação específica	Nos genitores para determinar o significado da mutação ainda desconhecida
Pesquisa de duplicação/deleção em um único gene (MLPA)	Avalia CNV em um gene específico	Quando se suspeita de uma alteração em um gene específico com sequenciamento negativo.
Painel de genes associados a uma determinada condição patológica (NGS)	Sequenciamento de nova geração para pesquisa de alterações em painéis de genes previamente determinados	Em distúrbios associados a muitos genes, como as encefalopatias epiléticas.
Estudos de metilação	Sondas que revelam específicas regiões cromossômicas.	Quando suspeitar de alteração de metilação em genes específicos como na Síndrome de Prader- Willi e Angelman.
Hibridização fluorescente in situ (FISH)	Sonda que individualiza regiões cromossômicas específicas	Confirmar deleção ou duplicação em região específica
Sequenciamento do inteiro exoma (whole Exome Sequencing-WES) ou Genoma (Whole Genome Sequencing-WGS)	Avaliar alterações de sequência e CNVs no inteiro exoma (para sequência codificante) ou genoma.	Quando se tem uma forte suspeita que a epilepsia é geneticamente determinada e as outras investigações não levaram a resultados ou não são adequadas para a tipologia da epilepsia (ex. epilepsias generalizadas ou epilepsias familiar com fenótipos variáveis), ou ainda para estudo de ligação e associação em famílias multigeracionais.

Adaptada de Olson 2014; Gobbe et al, 2014

Objetivos

7 OBJETIVOS

7.1 GERAL

Investigação genética e familiar em indivíduos com diferentes formas de epilepsias.

7.2 ESPECÍFICOS

Avaliar história familiar através de construção da genealogia;

Avaliar alterações genômicas estruturais, através de técnica de Array-CGH nos indivíduos e familiares com epilepsia associados a RM e/ou distúrbios psiquiátricos, deficiências intelectuais, dismorfismos, déficit cognitivo e/ou autismo;

Avaliar alterações gênicas nos indivíduos com encefalopatia epiléptica de início precoce, através de painel NGS constituídos com 21 genes associados às formas graves de encefalopatias epiléticas;

Validar, através de sequenciamento Sanger, as variantes significativas resultantes da análise do painel NGS, no propósito, genitores e eventuais familiares que possam apresentar fenótipo alterado;

Avaliar, através de sequenciamento Sanger, alterações no gene GRIN2A nos pacientes com Epilepsia Rolândica Atípica;

Relacionar fenótipo (quadro clínico e tipo de epilepsia) com genótipo (mutação gênica específica) nas amostras estudadas;

Observar os diferentes impactos: clínico, familiar, social, econômico, psicológico, ético, na amostra estudada, refletindo sobre a importância do diagnóstico precoce.

Metodología

8 METODOLOGIA

8.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo de corte transversa, descritivo e analítico.

8.2 COMPOSIÇÃO AMOSTRAL

8.2.1 Seleção dos sujeitos da pesquisa

Os sujeitos do estudo foram selecionados dos ambulatórios de epilepsia do Complexo HUPES/Magalhaes Neto e de um consultório de neurologia infantil em um hospital privado de Salvador.

8.2.2 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos na pesquisa três diferentes grupos de pacientes admitidos nos dois ambulatórios citados.

8.2.2.1 *Primeiro grupo:*

Composto de pacientes com epilepsia, com indicativo de recorrência familiar. Foram selecionados a partir de revisão de prontuários e contatados todos aqueles que constassem no prontuário a informação de possuir familiares com histórico de epilepsia.

8.2.2.2 *Segundo grupo:*

Este grupo foi constituído por pacientes com Encefalopatia Epiléptica (EE), com crises intratáveis, com ou sem recorrência familiar, que preencheram os critérios do protocolo estabelecido pelo serviço de neurogenética do hospital Gaslini (Anexo 1).

8.2.2.3 *Terceiro grupo:*

Foram alocados pacientes com Epilepsia com descargas centro-temporais (Epilepsia Rolândica) com evolução atípica, com ou sem herança familiar. Pelo menos dois critérios foram essenciais para enquadramento destes pacientes: a presença de ponta-onda contínua no sono (POCS) em algum momento da evolução e ter havido piora clínica e eletrográfica com drogas antiepilépticas bloqueadoras de canais de sódio.

Foram incluídos os familiares dos três grupos que apresentavam fenótipo compatível com o propósito e/ou com qualquer tipo de epilepsia e os genitores dos sujeitos do 2º grupo, mesmo sem nenhum histórico de epilepsia.

Um critério indispensável para inclusão na pesquisa de qualquer um dos participantes foi a condição voluntária expressa e declarada, após leitura, escuta e esclarecimento dos objetivos desta pesquisa, por assinatura do termo de consentimento pós-informado (Anexo 2).

Foram excluídos os sujeitos com epilepsia com etiologia secundária e sujeitos sem ocorrência familiar detectado após a construção da genealogia.

8.2.3 Recrutamento dos sujeitos da pesquisa e coleta de material

Para esta etapa foi formada uma equipe de trabalho composta por profissionais e estudantes nas áreas de: psicologia (5), fonoaudiologia (2), fisioterapia (3), enfermagem (2), serviço social (2), biomedicina (2), Filosofia e sociologia (1), os quais foram informados sobre os objetivos da pesquisa, participaram de encontro de formação, leitura de artigos sobre o tema, preparação para eventuais intercorrências no momento do contato com o paciente, além de reflexão sobre ética, direitos, deveres e responsabilidade em pesquisa. Todos assinaram um termo de compromisso ético (Apêndice 1).

Grupo 1: Variáveis de interesse foram extraídas dos prontuários dos indivíduos que atenderam aos critérios de interesse para composição do grupo, as quais estão expostas no quadro (8.1).

<ul style="list-style-type: none"> • N° do prontuário • Registro geral • Nome • Data de nascimento • Sexo • Escolaridade • Estado civil • Proveniência • Endereço • Contato telefônico • Nome do responsável 	<ul style="list-style-type: none"> • Dados pré-natais • Idade de início das crises • Data da primeira consulta no ambulatório • Diagnóstico ou suspeita diagnóstica • Tipo de crises • RM/distúrbios cognitivos • Malformações congênicas • Familiares com epilepsia • Familiares com distúrbios neuropsiquiátricos • Grau de parentesco • Consanguinidade
---	---

Quadro. 8.1 Variáveis extraídas dos prontuários dos indivíduos com história familiar para epilepsia

Em seguida com os dados para contato, foram feitas ligações telefônicas e agendados encontros presenciais com os interessados. Os encontros aconteceram em três distintos finais de semana, (1º em 1-2/03/2014; 2º em 8-9/03/2014 e 3º em 15-16/3/2014), no Projeto Pequena Ponte, espaço da Associação Pequena Fraternidade de Salvador-Bahia, localizado na Avenida Aleomar Baleeiro Km 8, n. 10A. Para a locomoção dos indivíduos da pesquisa até o local do encontro foram colocados à disposição condução saindo de um local central da cidade. O encontro foi programado com antecedência pelos profissionais que constituíram o grupo de pesquisa.

No local do encontro, após esclarecimento sobre os objetivos da pesquisa, prosseguiu-se com a leitura coletiva do TCLE e individualmente, com o auxílio dos colaboradores da pesquisa, os indivíduos prosseguiram com os questionamentos, esclarecimento das dúvidas e assinatura do documento. Todos os participantes do estudo (pacientes e responsáveis) foram convidados a responder ao questionário de qualidade de vida, QOLIE-89 (*Quality of life in Epilepsy Inventory*), (anexo 3) e coleta de material biológico.

Ainda no local do estudo foram iniciadas as pesquisas para avaliação familiar a qual foi continuada nas visitas domiciliares com diferentes membros da família, a fim de prosseguir com a construção de genealogias. A coleta de material biológico dos familiares inseridos na pesquisa, quando possível, foi realizada em domicílio no momento da visita.

Grupo 2: Para composição deste grupo, foram selecionados previamente 26 indivíduos com encefalopatia epiléptica, dos quais 20 prosseguiram no estudo. Após a assinatura do TCLE foi realizada avaliação familiar para construção da genealogia e coletado material biológico dos propósitos e genitores (trios) e, eventualmente, de outros familiares afetados. Os encontros e coleta de material deste grupo de pacientes ocorreram em um espaço na Pituba, Rua Território do Acre, 65, voluntariamente disponibilizado por um laboratório privado de Salvador.

Grupo 3: Foram selecionados 7 indivíduos com Epilepsia Rolândica atípica. Após a assinatura do TCLE foi realizada avaliação familiar para construção das genealogias e coletado material biológico dos propósitos e genitores (trios), quando possível. O local de encontro e coleta de material de 4 sujeitos deste grupo foi no espaço da Pituba e 3 no hospital das clínicas (ambulatório), a estes foram feitas visitas domiciliares.

Todas as genealogias foram registradas graficamente, através de símbolos e letras, constituindo o heredograma, a fim de: estabelecer grau de parentesco entre o propósito e

outros familiares com o fenótipo clínico de epilepsia; averiguar a ocorrência de casamentos consanguíneos e sua relação com a manifestação do fenótipo do propósito. Foram registrados, além do fenótipo epilepsia outros fenótipos relatados e/ou constatados como: retardo mental ou outras alterações neuropsiquiátricas; distúrbios de comportamento, de linguagem e/ou dificuldade intelectual, malformações congênitas, dismorfismos, mortes prematuras, recorrência de abortos espontâneos ou infertilidade, além de qualquer fenótipo, mesmo complexo, que incidissem ao longo das gerações dentro da mesma família.

8.2.4 Coleta de sangue extração e quantificação de DNA Genômico

Foram coletados dos sujeitos de pesquisa e seus familiares, por punção venosa, 10 ml de sangue em tubos de ensaio contendo EDTA. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da extração do DNA.

O DNA genômico foi extraído do sangue total utilizando o Kit comercial (*QIAamp® DNA Blood Mini Kit*), seguindo o protocolo standard resumido no quadro 4, anexo 3. Em seguida o DNA foi quantificado, utilizando o espectrofotômetro *Ultrospec® 1100 pro* (*Amersham Biosciences*). Para estimar a amostra quali-quantitativamente, foi efetuada uma corrida eletroforética em gel de agarose 1%, confrontando a banda das amostras de DNA genômico com um fragmento de 1Kb de DNA *ladder*.

As análises genéticas do DNA extraído foram realizadas no “*laboratorio di Malattie Muscolare e Neurogenetica – Unità Operativa Complessa (UOC)- Dipartimento di Neurologia Pediatrica e Malattie Muscolari*” do Hospital Gaslini de Genova-Itália.

8.3 INVESTIGAÇÕES GENÉTICAS

8.3.1 Triagem citogenômica por técnica de Array-CGH

A triagem para verificar alterações cromossômicas estruturais a nível gnômico foi realizada por técnica de array-CGH nos pacientes que apresentavam, além do fenótipo epilético, ou que tivessem história familiar de: dismorfismos, déficit cognitivo, deficiência intelectual, retardo mental, espectro dos transtornos autísticos e ou distúrbios neuropsiquiátricos, independente do grupo que pertenciam. Deste grupo foram avaliados com esta técnica 44 sujeitos (26 propósitos e 18 familiares) pertencentes aos 3 grupos.

A investigação foi realizada utilizando uma matriz de CGH de oligonucleotídios de ácido nucleico 8X60 (análise de 8 amostras com 60,000 sondas genômicas), comercializada pela *Agilent Technologies® (USA)*, versão 7.2 de 2012.

O DNA de referência (controle) e o DNA dos sujeitos foram dosados no nanodrop e levado a uma concentração final de 13 microlitros (μ l).

Para desnaturação do DNA foram acrescentados às amostras 2,5 μ l de *Random primer* e levados por 10 min ao aquecedor (termo block) à uma temperatura de 96°C e em seguida um choque térmico de 5 min em gelo; A mix para marcação foi preparada separadamente em dois tubos 1,5 ml identificados previamente e separados por sexo, um para cada paciente e seu respectivo controle.

A marcação foi realizada acrescentando em cada tubo: 5 μ l de buffer 5x, 2,5 μ l de DNTP 10x, 1,5 μ l de cianina 5 (Cy5) no tubo dos pacientes e 1,5 μ l de cianina 3 (Cy3) no tubo dos controles e 0,5 μ l de enzima para completar a mix em ambos os tubos. Volume final de 9,5 μ l por amostra. Após distribuição da mix nos respectivos tubos, estes foram aquecidos em banho-maria à 37°C por 2 horas, em seguida aquecidos por 10min a 96°C.

Para a purificação, à cada tubo contendo as amostras foi acrescentado 430 μ l de buffer TE (comercializado pela *Promega*), em seguida transferidos para tubos millipore® com filtros, previamente identificados. Prosseguiu-se com uma centrifugação a 14000rcr por 10 min. O mesmo processo foi repetido acrescentando desta vez 480 μ l de buffer TE.

Transferido o filtro para novo tubo com a abertura voltado para dentro e centrifugado a 1000rcr por 1 min.

Após eliminar o filtro, estes foram submetidos a centrifugação à vácuo por 40min para secar o marcado.

O *pellet* marcado foi ressuspensão com 9,5 μ l de buffer TE e submetido a leitura no *nanodrop* com o programa Micro-array para avaliação da intensidade da marcação.

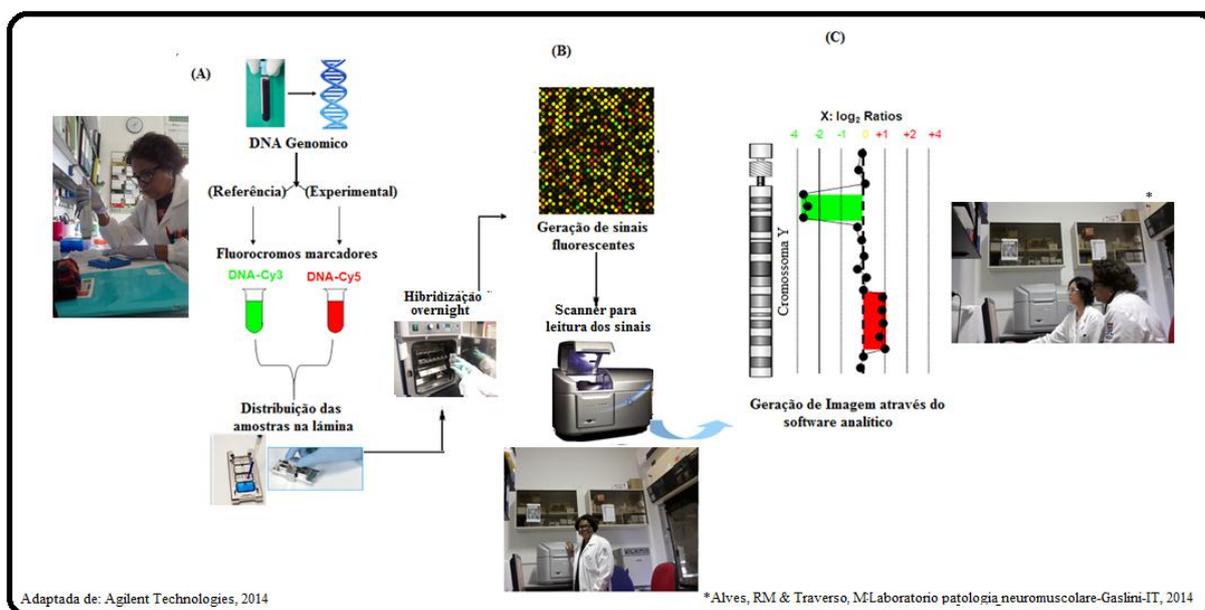
Após um breve centrifugação foi realizada a hibridação: em cada tubo contendo o material marcado dos pacientes com seus respectivos controles foram acrescentados os reagentes de hibridação conforme o protocolo do fabricante (*Agilent kit OLIGO- aCGH hybridization®*, pg 10 do manual).

Em seguida os tubos foram submetidos a um aquecimento de 96°C x 5 min e ao final do tempo, transferidos imediatamente para o banho-maria por 30min a 37°C, seguida de uma breve centrifugação.

No interior de um porta-lâminas metálico contendo a lâmina divididas nas 8 porções, as amostras foram transferidas para seus respectivos espaços, previamente identificados e registrados em caderno, em seguida coberto com a matriz array. Posicionou-se o suporte porta-lâmina contendo a matriz acoplada com as amostras em forno de hibridização para o processo overnight.

No dia seguinte o porta-lâminas contendo a matriz, foi retirada do hibridizador e as lâminas lavadas em dois *buffers* indicados pelo fabricante (OLIGO-aCGH Wash Buffer 1 e 2). Após liberar a lâmina no *buffer 1*, esta foi posicionada em porta lâmina de vidro para lavagem com o *buffer 2*, previamente aquecido em um *back* sobre agitador à temperatura de 37°C.

Matriz foi analisada pelo scanner *Bundle Agilent Microarray* (v8.1). A visão geral do gráfico foi obtida utilizando o software *CGH analytics* (v3,2,32) com as configurações padrão (algoritmo aberração: ADM-2, janela de 2 Kb, média centralizada de 10. Filtro de aberração: número mínimo de sondas para amplificação e deleção ≥ 5 , nível de alinhamento ≤ 100 e mínimo desvio médio absoluto *Log Ration* para amplificação e deleção 0.0 e tamanho mínimo (Kb) para região de amplificação e deleção 0.0). O genoma de construção hg19. Ilustração do procedimento completo na figura 8.1. Os significados das variantes resultantes do experimento foram pesquisados nos bancos de dados de CNV (*database of genomic Variants-DGV*; *Copy Number Variation in Disease-CNVD*; GEO-DATASETS; DECIPHER entre outros disponíveis online. Além disso, foram pesquisados na literatura a partir do OMIM e PubMed, artigos que relacionassem as diferentes CNV encontradas com o fenótipo de cada propósito e/ou familiares. Os resultados foram armazenados em bancos de dados.



Adaptada de: Agilent Technologies, 2014.

Figura 8.1. Esquema completo da técnica de Array-CGH.

7.4.2 - Painel NGS para pesquisa dos genes candidatos para encefalopatias epiléticas-Grupo 2.

O painel NGS dos 21 genes candidatos para encefalopatias epiléticas utilizado neste estudo foi desenvolvido pelo laboratório de neurogenética do hospital Gaslini de Genova.

O painel NGS realiza análises concomitantes das porções codificantes dos 21 genes especificados na tabela 8.1. Foram submetidos a esta avaliação 16 pacientes com encefalopatia epilética pertencentes ao grupo 2.

A customização do painel com os 21 genes selecionados foi realizado pela empresa comercial Ion AmpliSeq™ e recebeu a identidade “IAD40215 Encefalopatia Epilética”.

Tabela 8.1-Enquadramento sindrômico e genes candidatos dos pacientes para análises por NGS.

INDICAÇÃO PARA ANÁLISES			
ENQUADRAMENTO SINDRÔMICO	GENES CANDIDATOS		
<input type="checkbox"/> Encefalopatia de início precoce	<input type="checkbox"/> ARHGEF9	<input type="checkbox"/> SCN8A	<input type="checkbox"/> TBC1D24
<input type="checkbox"/> Epilepsia Piridoxina-dependente	<input type="checkbox"/> KCNQ2	<input type="checkbox"/> SLC2A1	<input type="checkbox"/> KCNT1
<input type="checkbox"/> Espectro S. de Dravet	<input type="checkbox"/> PNKP	<input type="checkbox"/> SPTAN1	<input type="checkbox"/> PLCB1
<input type="checkbox"/> Espasmos infantil/Síndrome de West	<input type="checkbox"/> ST3GAL3	<input type="checkbox"/> SCN2A	<input type="checkbox"/> STXBP1
<input type="checkbox"/> Espectro CSWS/ Síndrome de Landau Kleffner	<input type="checkbox"/> TBC1D24	<input type="checkbox"/> ALDHTA1	<input type="checkbox"/> PMPO
	<input type="checkbox"/> SCN1A	<input type="checkbox"/> PCDH19	<input type="checkbox"/> CDKL5
	<input type="checkbox"/> GRIN2A	<input type="checkbox"/> ARX	<input type="checkbox"/> SLC25A22

A aplicação do método previu uma sequência de trabalho de dois dias consecutivos seguindo as 4 etapas previstas na metodologia NGS: 1-Construção da biblioteca; 2-Amplificação dos fragmentos; 3-Sequenciamento e 4-Análises dos dados. Na figura 8.2 encontra-se esquematizada estas etapas as quais estão sumarizados no texto. O protocolo completo da técnica podem ser consultado no anexo 8.



Figura 8.2- As quatro etapas do sequenciamento NGS com a metodologia da Ion AmpliSeq™.

Para a preparação da biblioteca foi utilizado o kit 2.0 da Ion AmpliSeq™. Foram utilizados para cada amostra 2µl de máster mix HiFi; 5µl do pool de primers que constitui o painel; 1 µl de DNA a concentração de 5ng/ul; 2µl de H2O, volume final de 10µl. A mistura foi submetida à amplificação por PCR seguindo o programa: 99°C x 2 min; 16 x (99°C x 15s;

60°C x 4 min); 10°C. Após a corrida foi previsto um total de 690 amplicons (73,4 Kb) divididos em dois pools. Na etapa seguinte foi realizada uma digestão parcial dos primers, acrescentando em cada amostra 1µl da substância FuPa em seguida pipetando 5 vezes, logo após as amostras foram incubadas no termociclador à 50°C x 10min; 60°C x 20min; 10°C. Sucessivamente foi adicionado o *Barcode* (ligase), em uma concentração de 1:4, utilizando para cada pool: 0,5µl do adaptador Ion P1; 0,5µl de Ion Xpress barcode X; 1,0µl de H2O, volume final de 2µl. Para ligase, foi acrescentado à cada amostra 11µl do material digerido e acrescentado 2µl de solução *Switeh*; 1µl da diluição barcode-adaptador; 1µl de DNA ligase, pipetando por 5 vezes. A mistura foi submetida ao termociclador a 22°C x 30 min; 73°C x 10min; 10°C. Esquema na figura 12. Após esta etapa a biblioteca foi submetida a duas etapas de purificação e dosada com o quantificador fluorimétrico com o kit Qubit dsDNA HS Assay, comercializado pela ThermoFisher Scientific.

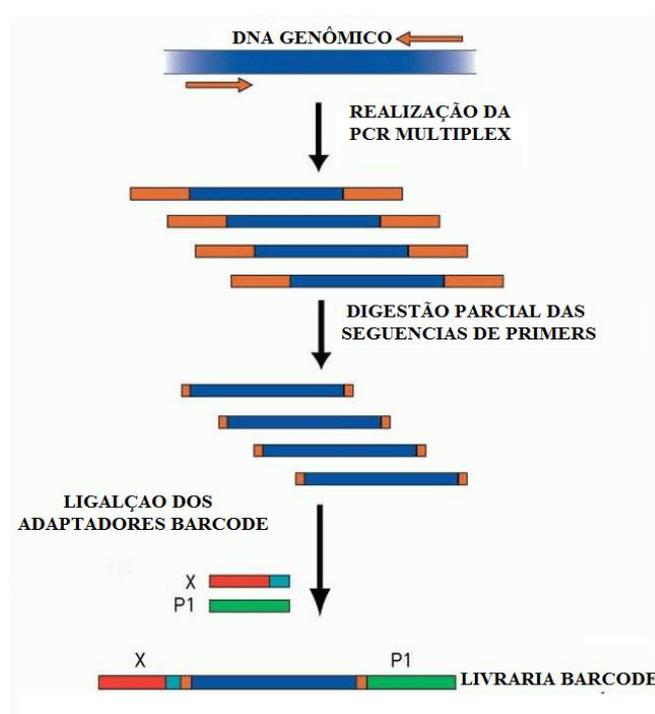


Figura 8.3- Esquema da construção de biblioteca para sequenciamento NGS

Após dosagem das amostras e acertamento das concentrações finais, foi realizada amplificação clonal (PCR OneTouch) a fim de aumentar o sinal para captura. A máquina “One Touch OT2”, foi preparada conforme indicação do fabricante. A preparação do material

para amplificação da biblioteca seguiu o protocolo personalizado (anexo 8), a partir da preparação do material listado a seguir:

- Mix de reagentes Ion OT2, previamente levados à temperatura ambiente, agitado por 30s e centrifugado por 2s;
- Reagente B- Ion OT2 PCR, agitado por 1min e centrifugado por 2s, observando a transparência da solução;
- Mix das enzimas Ion PGM Template OT2 200, centrifugação por 2s em seguida conservada em gelo;
- A biblioteca foi vigorosamente agitada por 5 e centrifugada por 2 (25µl);
- As esferas de partículas Ion PGM Template OT2 foram elevadas à temperatura ambiente
- A Mix de amplificação foi preparada segundo ordem e concentração dos reagentes dispostos na tabela 8.2 e em seguida agitada em vortex por 5s, seguida de centrifugação de 2s.

Tabela 8.2- Preparação da Mix para amplificação da biblioteca NGS para encefalopatia Epileptica. Adaptado do protocolo OneTouch, 2014

ORDEM	REAGENTE	COR DA TAMPA	VOLUME
1	Nuclease desprovida de água	-	25µl
2	Mix de reagentes “Ion PGM Template OT2 200”	Roxa	500 µl
3	Reagente B, “Ion PGM Template OT2 200 PCR”	Azul	300 µl
4	Mix de enzimas “Ion PGM Template OT2 200 “	Marrom	50 µl
5	Biblioteca diluída ao momento	-	25µl
-	Concentração Total		900µl

A biblioteca e os reagentes da PCR foram ressuspensos em H₂O, a fim de favorecer a amplificação clonal. Após a preparação do *OneTouch*, foi verificado no Quibit a porcentagem de bilhas positivas. Esta etapa foi seguida por uma fase de enriquecimento, com finalidade de separar as IPs que não se ligam ao DNA. Depois do enriquecimento a mistura foi quantificado no *Quibit* e anotado a % de ISP positivo. Para ressuspender as partículas do chip o mesmo foi submetida por 1 min a um agitador com máxima velocidade e em seguida centrifugada por 2s, seguida por uma rápida pipetagem. As partículas foram acrescentadas à

mix de amplificação conforme ordem pré-estabelecida pelo protocolo. Elevando a concentração da Mix de amplificação para 1000µl.

Foi efetuada limpeza da PGM, conforme instruções do fabricante e sua inicialização com utilização do chip, seguindo as etapas indicadas (vide protocolo anexo).

O teste previu uma sensibilidade superior a 80% para o conjunto de genes e uma sensibilidade acima de 95% para cada gene individualmente, de acordo com as características de cada um deles. Ao final das análises foram utilizados dois filtros para rastrear as eventuais alterações.

As alterações potencialmente patogênicas foram validadas por método de sequenciamento Sanger, juntamente com as amostras dos genitores e familiares dos propósitos com quadro clínico semelhante. Para isso foram desenhados *primers* da região de interesse, amplificado os fragmentos por PCR e sequenciados utilizando no sequenciador Applied Biosystems® 3730 xl DNA Analyzer de 96 capilares. As sequencia foram lidas utilizando o software SeqScape® comercializado pela Applied Biosystems.

As análises de cada gene individualmente por paciente podem ser contempladas nas tabelas expostas nos resultados. O processo dos dois dias de trabalho para análises desta amostra podem ser vistos na figura 8.3.

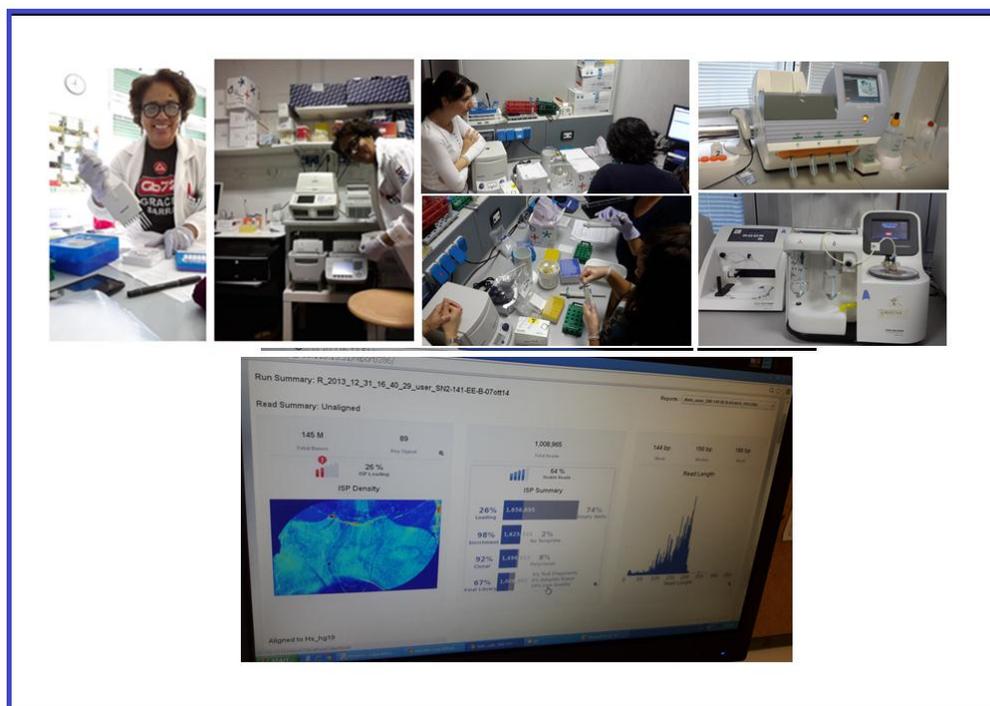


Figura 8.4- Etapas de trabalho para análises das amostras do grupo 2 por NGS

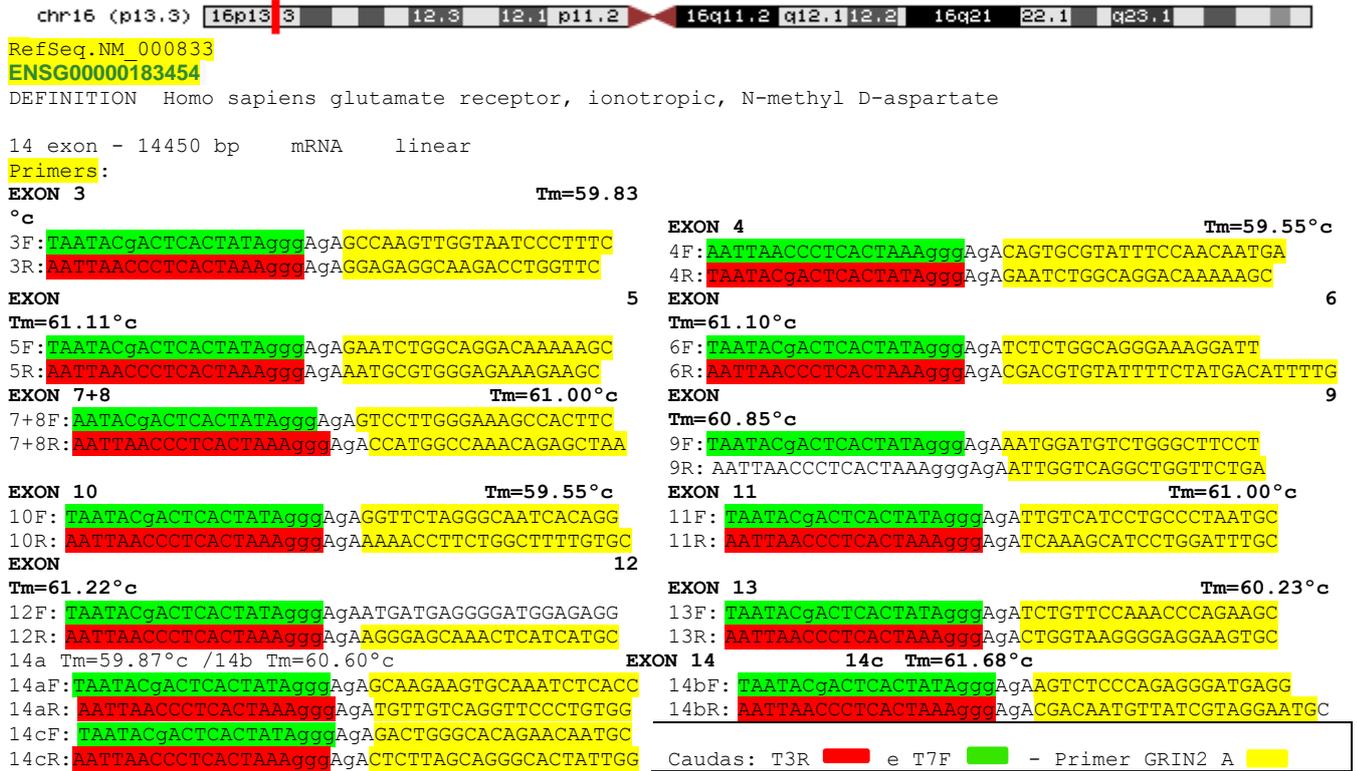
8.3.2 Sequenciamento Sanger para verificação de mutação no gene GRIN2A nos sujeitos do grupo 3

Esta técnica foi utilizada em todos os sujeitos com Epilepsia Rolândica Atípica pertencentes ao grupo 3.

O gene GRIN2A contém 14 exons. Para o desenho dos primers foi utilizada a sequência de referência NM_000833, ENSG00000183454, composta por um total de 14.450 bp a partir do exon 3. Por conter muitas dinucleotídeos CG os éxons 7 e 8 foram desenhados juntos. O exon 14, sendo o mais longo foi dividido em 3: 14a, 14b e 14c. No total foram construídos 14 primers a partir do exon 3, para amplificar segmentos de 402-800 pb. A temperatura de fusão variou entre 59.55°C à 61.68°C. Aos primers das sequências R e F, foram acrescentados as sequências T3: 3'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-5' e T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG- 3', respectivamente, afim de acelerar e alongar as reações no sequenciamento. Quadro 8.2. Os primers foram diluídos em solução para estoque (100µM) e solução para uso (5µM) e armazenados a -20°C e -4°C respectivamente. Quadro 5.

Para reação de amplificação dos fragmentos por PCR foi feito uma mix contendo: 10µl de Hot Máster Mix®; 2,5µl de primers F+R (5µM); 1,0µl DNA [80]; 11,5 µl H₂O, para um volume final de 25µl. As amostras foram submetidas à amplificação um programa de: 94°C - 2'; 84°C 40''; 61°C 40''; 68°C 45'' x 12 ciclos; 60°C x 12 ciclos; 59°C x 12 ciclo; 68°C 5'; 8°C + ∞. Após amplificação o produto foi submetido a uma corrida eletroforética em gel de agarose 1,5%. Foi acrescentado à 4µl de cada amostra 4µl de corante brometo de etídio e transferido os 8µl para o gel para realizando uma corrida de 20min à 120v, juntamente com 1,7µl ladder, 100pb®. Em seguida o gel foi fotografado e o produto da PCR foi purificado utilizando-se uma placa de purificação a qual foi banhada acrescentado a cada poço 80µl de H₂O + 25µl do produto e submetido x 4' a agitador à vácuo; acrescentado mais 25µl H₂O, submetido placa de agitação x 10'. Figura 14.

GRIN2A



Quadro 8.3- Primeres para sequenciamento Sanger do gene GRIN2A

A mistura para reação de sequência foi preparado com 3,4µl de H2O + 2,0µl de buffer B5x® (vortexado)+ 2,0µl de primers T3 e T7 nos tubos correspondentes as sequências reversas (R) ou Forward (F) + 0,6µl de BigDye® (vortexado) + 2,0µl do produto purificado da PCR, para um volume final de 10µl de reação a ser amplificada para cada amostra e cada fragmento F e R. A reação foi amplificada em termociclador utilizando o seguinte programa: 24 ciclos à 96°C x 2'; 96°C x 30'; 60°C x 2' + 8°C final. Em seguida o produto foi purificado em placa de purificação: a placa foi banhada com 10µl de solução injetável, em cada amostra foi acrescentada 20µl da mesma solução. Transferidos os volumes de 30µl de cada amostra nos respectivos poços, previamente identificado na placa, a qual foi levada para o agitador a vácuo por 4'. Após este tempo foi acrescentado +25µl de solução injetável com uma nova agitação a vácuo por 4'. Mais 25µl da solução injetável foi acrescentado aos poços contendo as amostras e levado à placa agitadora por 10', afim de ressuspender a solução. Em seguida a solução foi transferida para a placa de sequenciamento e levado ao sequenciador Applied

Biosystems® 3730 xl DNA Analyzer de 96 capilares. As sequências foram lidas utilizando o software SeqScape® comercializado pela Applied Biosystems.

Resultados

9 RESULTADOS

9.1 RESULTADOS DO GRUPO EPILEPSIA FAMILIAR (G-1)

9.1.1 Características gerais da amostra

Do total de prontuário revisados (n.968) 23,3% (226) tinham informação sobre recorrência de epilepsias nas famílias. Destes, 63,7% (144) eram da cidade de Salvador; 5,3% (12) da região metropolitana e 23,4% (53) provieram de diferentes cidades do interior do Estado, com distância variando de 49,5km à 681Km. Em 7,5% (17) dos 226 pacientes não foi possível identificar a procedência. A idade variou entre 05 à 79 anos, com média de 32,1 anos. Tabela 9-1.

Tabela 9-1 Caracterização das 226 pessoas atendidas no ambulatório de epilepsia do Magalhaes Neto-Complexo HUPES, com indicativo de recorrência familiar quanto ao sexo, idade e procedência.

SEXO		IDADE		PROCEDÊNCIA	
	n / (%)	Parâmetros	Anos	Localidade	n / (%)
Feminino	121 / (45%)	Média	32,1	Salvador	144 - (63,7%)
Masculino	101 / (53%)	Mediana	31,0	Região Metropolitana	12 - (5,3%)
Não informado	4 / (2%)	Desvio Padrão	12,6	Interior do Estado	53 - (23,4%)
				Não informado	17 - (7,5%)
				Cidade do interior com menor e maior distância (Km)	
				Candeias	Érico Cardoso
				49,50	681

Do total dos prontuários selecionados (226) foi possível contatar por telefone apenas 24,3% (55). Do total de contatados, 58,2% (32) foram incluídos no estudo; 11,1% (6) negaram a existência de outros casos de epilepsia na família; 7,4% (4) recusaram fazer parte do estudo e, 21,8% (12) não compareceram aos encontros agendados. Deste grupo habitavam em Salvador 68,7% (22); 9,4% (3) residem na região metropolitana e, 22% (7) no interior do Estado. Quanto ao sexo 53,1% (17) eram feminino. A idade variou entre 5 e 67 anos com média de 30,5. A tabela 9.2 e gráfico 9.1 ilustram estes achados.

Tabela 9.2 - Caracterização dos sujeitos de pesquisa do grupo 1 do estudo “Investigação genéticas e familiar em pacientes com epilepsias no Estado da Bahia”, quanto ao sexo, média de idade e procedência.

SEXO	IDADE		PROCEDÊNCIA		
	n / (%)	Parâmetros	Anos	Localidade	% / (n)
Feminino	17 (53,1%)	Média	30,5	Salvador	58,2% - (22)
Masculino	15 (46,9%)	Mediana	26,0	Região Metropolitana	9,4 % - (3)
		Desvio Padrão	13,8	Interior do Estado	22% - (7)
Cidade do interior com menor e maior distância (Km)					
				Barrocas	V. da Conquista
				203	517

O grau de escolaridade variou: 15,6% (5) dos sujeitos terminaram, estavam cursando ou não concluíram o ensino fundamental-1 (1ª-5ª séries); 15,6% (5) cursavam ou concluíram o ensino fundamental-2 (6ª-8ª séries); 28% (9) tinha o ensino médio (2º grau) completo, enquanto 9,4% (3) estava cursando ou tinham interrompidos este ensino e 28% (9), alcançaram o ensino superior (3º). Gráficos 8.1 e 8.2.

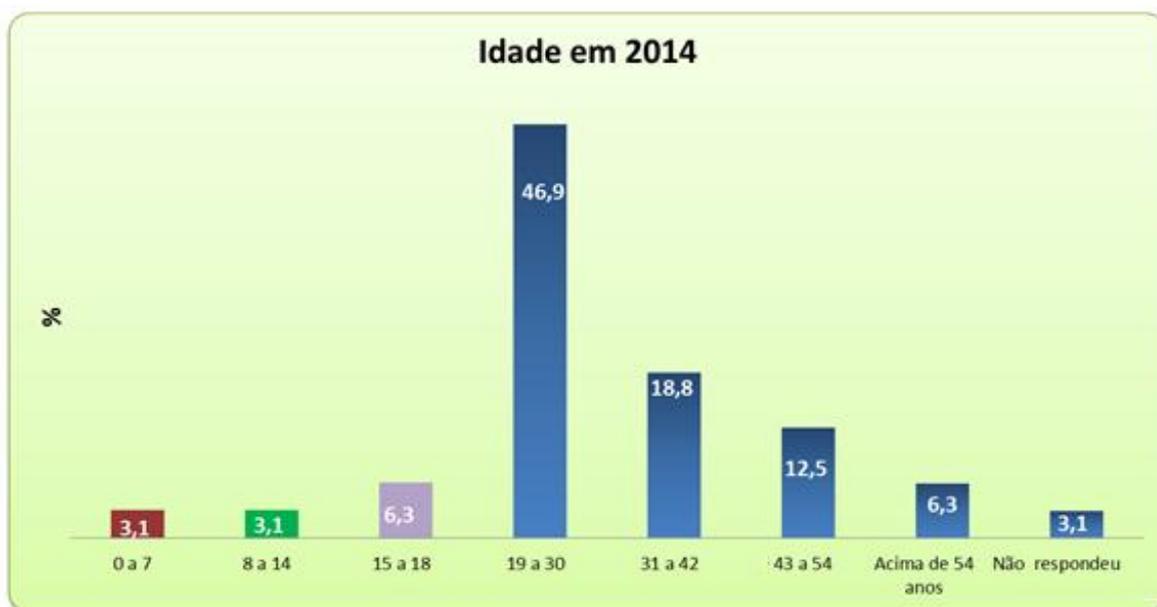


Gráfico 9.1- Idades categorizadas dos sujeitos do G-1 do estudo “Investigação genéticas e familiar em pacientes com epilepsias no Estado da Bahia”.

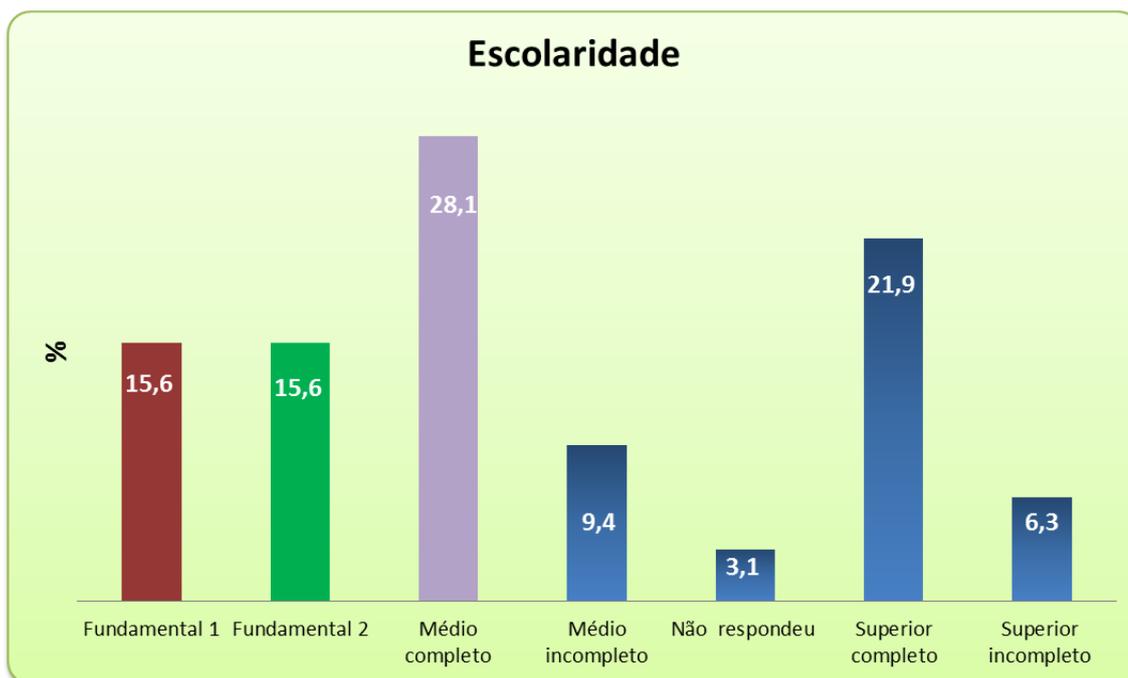


Gráfico 9.2 - Escolaridade dos sujeitos de pesquisa do G-1 do estudo “Investigação genéticas e familiar em pacientes com epilepsias no Estado da Bahia”.

Os 32 propósitos incluídos neste grupo constituíam 17 diferentes famílias. A Figura 9.1 traz a distribuição dos 32 propósitos dentro das 17 famílias e seus respectivos graus de parentesco. O total de familiares com epilepsia inseridos neste grupo foi de 33 pessoas, 45,2% do total de casos com epilepsia detectados nas genealogias. A relação de consanguinidade foi detectada somente em uma família. Em anexo, na sessão dedicada a avaliação familiar, estão as genealogias de 16 das 17 famílias incluídas em anexo. A 17ª família não foi avaliada devido a distância, sendo posteriormente excluída por falta de dados para as análises.

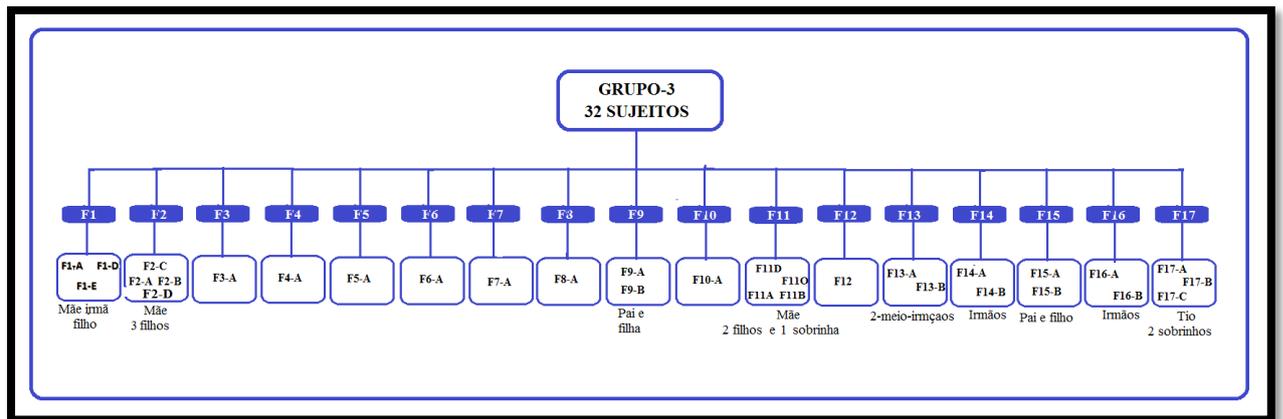


Figura 9.1- Composição amostral e relação de parentesco entre os propósitos do grupo 1.

Quanto a classificação das epilepsias: 21,8% (7) dos 32 tinha epilepsia idiopática (focal ou generalizada); 21,8% (7) epilepsia primária (focal ou generalizada); 18,8% (6) com epilepsia familiar: ausência (4), focal (1) generalizada (1); 6,2% (2) com epilepsia criptogênica; 9,3% (3) com epilepsia ou crises generalizadas (1- tônico-clônica, 1-fotosenssível, 1-com crises generalizadas); 6,2% (2) com crises frontal; 3,1% (1) com crises motoras no membro superior direito; 3,1% (1) com achados de potencial epileptiforme temporal; 3,2% (1) com síndrome Rolândica com descarga centro temporais e 3,1% (1) com epilepsia temporal.

Do total de sujeito estudado 18, 7% (6) relataram crises convulsivas na infância, sendo que 12,5% não souberam informar. Dos propósitos 18,7,% (6) tinham algum distúrbio neuropsiquiátrico (Tabela 8.3).

A idade na primeira crise variou entre 01 ano e 4 meses à 26 anos, com média de 9,3 anos. A média do tempo de convívio com as crises foi calculada em 10,8 anos (Quadro 9.1, gráfico 9.3).

Tabela 9.3 - Médias, faixas de idade e frequências dos 32 propósitos com relação à média de idade no início das crises e tempo de convívio com as crises.

Idade de início das crises		
Parâmetros	Em ano	
Média	9,3	
Mediana	9,0	
Desvio Padrão	6,2	

Tempo da 1ª crise até 2014		
Faixas de idade	Frequência	%
De 1 a 5	11	34,4
De 6 a 14	11	34,4
De 15 a 20	6	18,8
Acima de 20	1	3,1
Não respondeu	3	9,4
Total Geral	32	100,0

Parâmetro	Em ano
Média	10,8
Mediana	12,0
Desvio Padrão	6,5

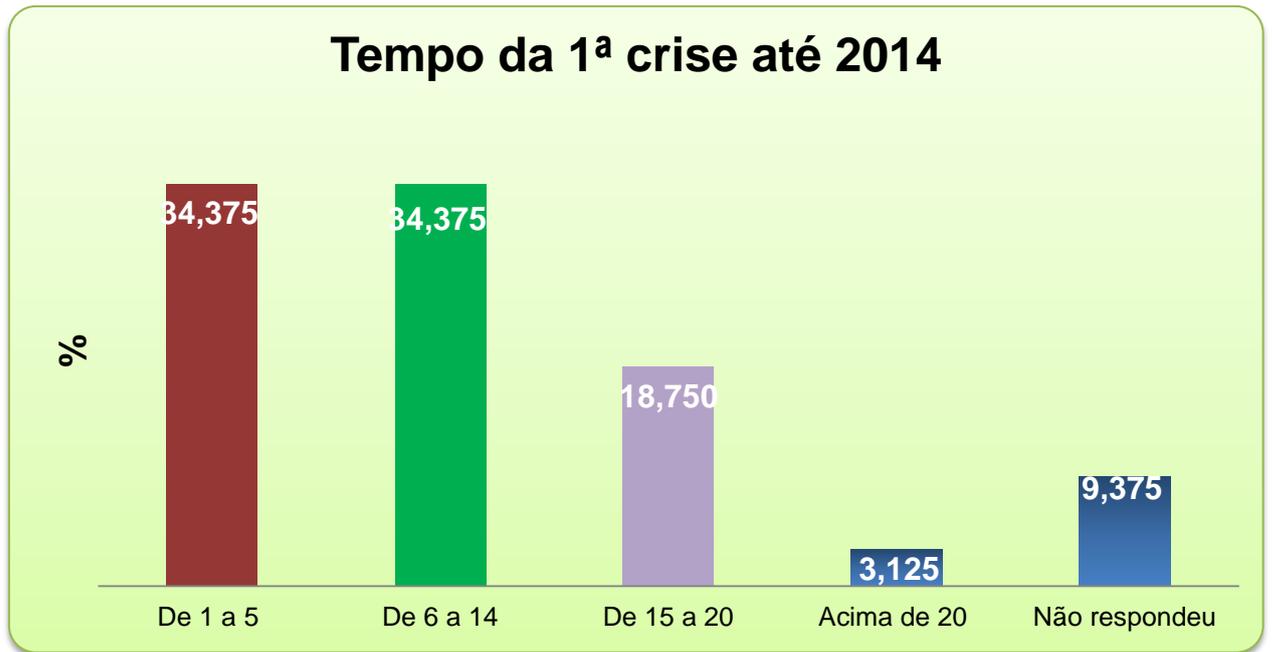


Gráfico 9.3- Tempo de convívio com as crises de 29 propósitos do grupo de epilepsia familiar (G-1) do estudo “Investigação genéticas e familiar em pacientes com epilepsias no Estado da Bahia”

Em 37,5% (12) dos familiares das 16 famílias tiveram ou têm convulsão febril, sendo que o número de pessoas com epilepsia variou de 01-22 casos, perfazendo um total de 73 casos. 37,5% (12) dos familiares têm algum tipo de distúrbios neuropsiquiátricos (Tabela 9.3).

Tabela 9.4 – Características clínicas individuais e dados familiares dos 32 propósitos do grupo 1 do estudo “Investigação genéticas e familiar em pacientes com epilepsias no Estado da Bahia”.

Id. Paciente	Idade da primeira crise	Idade	Convulsão Febril	Distúrbios neuropsiquiátricos	Familiares com distúrbios psiquiátricos	N. Familiares com epilepsia
F1-A	Epilepsia idiopática generalizada	5	33	X	✓	
F1-D	Epilepsia generalizada primária /Epilepsia mioclônica juvenil?	15	42	X	X	✓ 14
F1-E	Epilepsia focal idiopática	5	7	X	X	
F2-A	Epilepsia focal Idiopática com crises secundariamente generalizadas	12	34	✓	✓	
F2-B	Epilepsia focal criptogênica	13	46	X	X	✓ 6
F2-C	Epilepsia focal criptogênica	2	67	X	X	
F2-D	Epilepsia generalizada familiar	19	35	X	X	
F3-A	Epilepsia generalizada fotossensível	6	20	X	X	✓ 6
F4-A	Epilepsia generalizada idiopática	18	20	X	X	✓ 6
F5-A	Epilepsia frontal	34	9	X	X	✓ 4
F6-A	Epilepsia temporal	26	50	X	X	X 3
F7-A	Epilepsia primária generalizada	10	31	X	X	✓ 3
F8-A	Epilepsia parcial familiar/ ausência	5	15	X	X	✓ 2
F9-A	Epilepsia ausência familiar	3	23	✓	✓	✓ 2
F9-B	Epilepsia ausência familiar	2	57	X	X	
F10-A	Epilepsia generalizada primária	15	25	X	X	X 5
F11-A	Epilepsia parcial familiar	1,3	18	X	✓	
F11-B	Epilepsia focal primária	1,7	13	X	✓	
F11-D	Epilepsia ausência familiar/crises generalizadas	14	40	X	X	✓ 22
F11-O	Epilepsia primária	1	25	✓	X	
F12-A	Epilepsia do lobo frontal	17	26	X	X	✓ 2

F13-A	Epilepsia com generalização tônico-clônica	8	22	X	X		2
F13-B	Epilepsia generalizada idiopática	15	32	X	X	✓	
Continua na próxima página....							
Continuação tabela 8.3							
F14-A	Síndrome Rolândica/epilepsia com descargas centro-temporais	1,5	25	✓	X		6
F14-B	Epilepsia generalizada primária	3	28	✓	X	✓	1
F15-A	Crises focais	8	20	✓	✓	X	2
F15-B	Potencial epileptiformes temporal	9	51				
F16-A	Crises generalizadas	?	25	?	?	X	3
F16-B	Crises Motoras MSD	?	27				
F17-A	Epilepsia idiopática	15	49	?	X		
F17-B	Epilepsia idiopática	12	24	?	X	X	3
F17-C	Epilepsia generalizada primária	?	?	X	X		

9.1.2 Resultados da triagem genética por método Array-CGH

Das 17 famílias, inicialmente incluídos no estudo, uma foi excluída antes da análise genética devido a falta de material e 6 não entravam nos critérios para realizar CGH. Ficando um total de 20 propósitos para serem analisados. Destes 45% (9) tiveram resultados concluídos, 35% (7) tiveram resultados inconclusivos e os 20% (4) restantes não foi possível analisar por falta de qualidade do material genético. (Tabela 9.4).

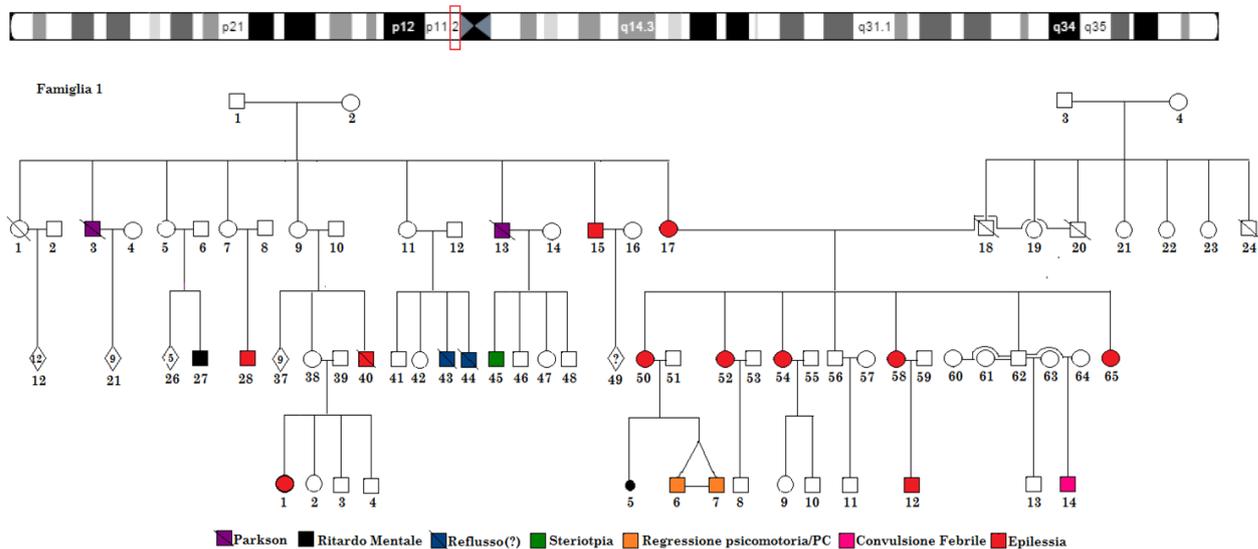
Tabela 9.5 – Resultado da seleção para triagem por CGH dos 29 propósitos pertencentes a 16 famílias do grupo- Epilepsia Familiar.

Rg. Pesq.	Idade /anos	Idade 1º crise.	Tipo de epilepsia	Triagem genética / êxito
F1-A	30	5	Idiopática generalizada	CGH/ inconclusivo
F1-D	42	15	Generalizada primária	✓ CGH
F1-E	7	5	Focal Idiopática	CGH/ inconclusivo
F2-A	34	12	Crises complexas secundariamente generalizadas/ OIRDA	CGH/ inconclusivo
F2-B	46	13	Focal criptogênica	Não realizado
F2-C	67	2	Focal criptogênica	✓ CGH
F2-D	35	19	Epilépia generalizada familiar	Não realizado
F3-A	20	14	Fotossensível generalizada	✓ CGH
F4-A	20	18	Generalizada Idiopática	CGH/ inconclusivo
F5-A	34	9	Frontal	✓ CGH
F6-A	50	26	Temporal	Sem critério
F7-A	31	10	Primária generalizada	✓ CGH
F8-A	15	5	Parcial familiar/ausência	Sem critério
F9-A	23	3	Ausência familiar	CGH/ inconclusivo
F9-B	37	5	Ausência familiar	Não realizado
F10-A	25	15	Generalizada primária	Sem critério
F11-A	18	1a,4m	Parcial familiar	✓ CGH
F11-B	13	1a, 9m	Focal primária	✓ CGH
F11-D	40	14	Ausência familiar	✓ CGH
F11-O	25	1	Primária	CGH/ inconclusivo
F12-A	26	17	Lobo Frontal	✓ CGH
F13-A	22	8	TCG	Sem critério
F13-B	32	15	Generalizada Idiopática	Sem critério
F14-A	25	1a, 6m	Rolândica	Sem critério
F14-B	28	3	Generalizada primária	Sem critério
F15-A	20	8	Crises focais	CGH/ inconclusivo
F15-B	51	9	Potencial epileptiforme temporal	Não realizado
F16-A	25	?	Crises generalizadas	Sem critério

9.1.3 Genealogia e resultados de família

Família 1 : não consanguínea, residentes em Salvador, três membros são acompanhados em uma dos ambulatorios. Possuem 13 familiares com epilepsia 1 caso de convulsão febril, casos de morte prematura por feluxo (III-33 e II-34) e casos de distúrbios neuropsiquiátri na família. Casal de gêmeos com Paralesia Cerebral, após involução cognitiva (IV-6 e7), com um caso de aborto espontâneo que os precederam (IV-5), a genitora (I II-50), tem epilepsia, estrabismo divergente e histórico de problemas mentais na infância. Propósitos em estudo F1-A(III-58); F1-D (III-54) e F1-E (IV-12)

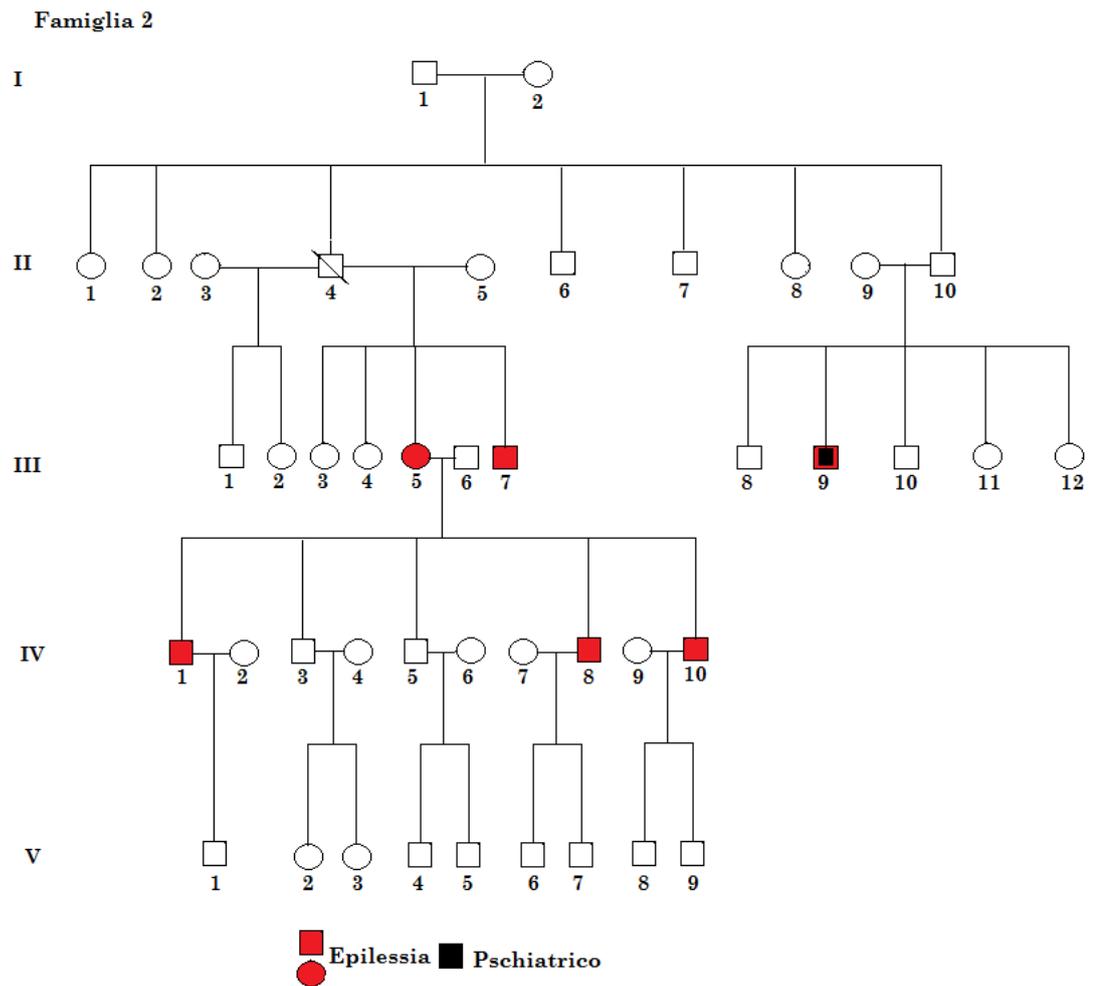
Figura. 9.2- Genealogia da família 1



O resultado da avaliação genética por CGH-Array na propósita F1-D demonstrou uma deleção em no braço longo do cromossom 2 sub-banda q12.2

Famiglia 2: sem relação de consanguinidade com relato de um membro colateral com problemas psiquiátricos e 6 casos de epilepsias (inclusive). Matriarca III-6-F2A (69anos) teve a primeira crise com 2 anos e seus filhos IV-1; IV-8 e IV-10 respectivamente F2-A; F2-D e F2-B, no início da adolescência, como demonstrado na tabela 9.3.

Figura 9.3 Genealogia da Família 2.



Resultado do CGH na matriarca (F2C) demonstrou uma deleção no braço curto do cromossomo 2 sub-banda p11.2-p11.1.

Familia 11- Com relação de parentesco em três consecutivas gerações, apresenta uma frequência de patologias associadas em diversos indivíduos. Com recorrência de mortes prematuras (duração em vida de no máximo de 1 dia), alguns destes malformados e vários casos de abortamento espontâneos. Casos de malformações congênitas (pés tortos, bexigas neurogênicas, lábios e palato fendidos, tumores oculares, dismorfismos faciais) além de graves problemas ortoarticulares; surdez e perda auditiva; diabetes, hipercolesterolemia; problemas hematológicos além da epilepsia. Diversos casos de distúrbios mentais também foram relatados. História recorrentes de câncer (prostático?) com morte prematura, também foi citado; tem recorrência na família de criptorquidia bilateral vários indivíduos masculinos, inclusive o irmão do propósito deste estudo. Uma irmã da genitora com infertilidade.

Avaliações desta família por CGH demonstra segregação de 3 variantes genômicas (CNV). (Figuras: 9.4; tabela 9.5).

Figura 9.4 Genealogia da familia 11

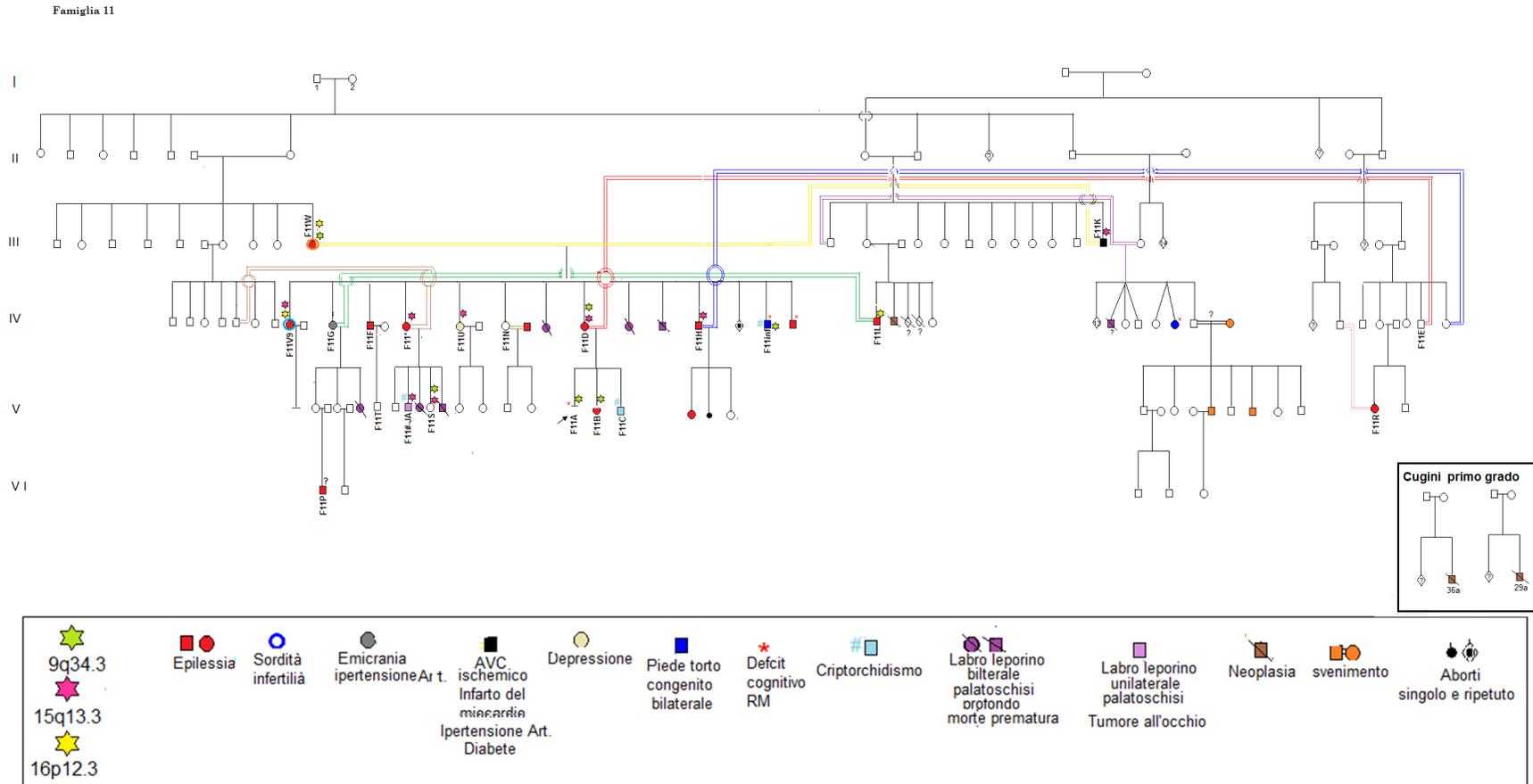


Tabela 9.6- Resultados da Análise por Array-CGH em membros da família 11

		9q34.3		15q13.3		16p12.3	
		Localização Genômica (Tamanho do duplicado)		Localização Genômica (Tamanho do duplicado)		Localização Genômica (Tamanho do duplicado)	
Id Pesq.	Posição Heredograma	Start	Stop	Start	Stop	Start	Stop
F11-A	II-1 figura (a)	139651255 39821083 (169.829 Kb)	-	-----		-----	
F11-inf	II-18 figura (b) Família central	139651255 139821083 (169.829 Kb)	-	-----		-----	
F11-W	I-2 figura (b) Família central	139651255- 139821083 (169.829 Kb)		-----		20563936- 20701992 (138.057 Kb)	
F11-D	I-2 figura (a)	139651255- 139794135 (142.881 Kb)		32021733 32438943 (417.211 Kb)	-	-----	
F11-S	II-4 figura (b)	139651255- 139794135 (142.881 Kb)		32021733 32510863 (489.131 Kb)	-	-----	
F11-B	II-2 figura (a) Núcleo familiar 1	139651255- 139758666 (107.412 Kb)		-----		-----	
F11-H	I-1 figura (b) (II-11) família central	-----		32021733 32510863 (489.131 Kb)	-	-----	
F11*	I-2 figura (b) (II-4) família central	-----		32021733 32510863 (489.131 Kb)	-	-----	
F11-U	figura (b)	-----		32021733	-	-----	

	(II-V) família central		32510863 (489.131 Kb)	
F11-v9	figura (b) (II-1) família central	-----	32021733 - 32326095 (304.363 Kb)	20496489 - 20750249 (253.761 Kb)
F11-JA	figura (c) II-2 figura 12	-----	31972646-32438943 (466.29,8 Kb)	-----
F11-K	I-1 patriarca família central figura (b)		32021733-32510863 (489.131 Kb)	-----
F11-L	I-1 figura 11 figura (b)	-----	-----	20496489-20750249 (253.761 Kb)
F11-C	III-3 do núcleo familiar 1, irmão do propósito. figura (a)	Negativo		
F11-T	Filho do terceiro filho do casal central II-3 V-6 heredograma completo figura (b)	Negativo		
F11-R	Sobrinha do pai do propósito	Negativo		
F11-P	VI-1 família central III-1 fig.11	Negativo		
F11-N	VI-1 da família central	Negativo		

Tabela 9.7- Descrição de Variações no Número de Cópias > 400kb encontradas em pacientes e familiares com epilepsia do estudo “Investigação genéticas e familiar em pacientes com epilepsias no Estado da Bahia”

Id. Pac.	Rearranjo	Posição genômica ponto de quebra proximal	Posição genômica ponto de quebra distal	Tamanho mínimo (Kb)	Herança	Data base/Significado (1.ISCA / 2.DECHIFER 3.NCBI36 /4.DGV v.1)
F1-D	del(2) (q11.2)	89,441,848	90,234,023	792	?	
F2-C	del(2) (p11.2 – p11.1)	89,276,158	91,766,271	2,490	?	
F2-C	dup(16) (p12.1)	24,931,032	24,931,892	861	?	
F3-A	dup(21) (p11.2)	98,324,48	98,334,32	985	?	
F7-A	del(1) (p21.1)	105300275	106208595	908	?	
F7-A	del(4) (q24)	104699794	105460788	761	?	
F7-A	del(6) (p11.2)	57329882	58180963	851	?	
F11-A	del(15) (q11.1-q11.2)	20481702	22509254	2,027	Materna	
F11-B	dup(8) (p31.1)	11141188	11145066	3,879	de novo?	
F11-B	dup(21) (p11.2)	9832448	9832448	985	de novo?	
F11-D	dup(15) (q13.3)	32021733	32438943	417	Paterna	
F11-ANA	dup(15) (q13.3)	32021733	32510863	489	Paterna	
F11-JÁ	dup(15) (q13.3)	31972646	32438943	466	Materna	
F11-H	dup(15) (q13.3)	32021733	32510863	489	Paterna	
F11-inf	del(15) (q11.1 - q11.2)	20575646	22432687	1,857	Materna	
F11-K	dup(15) (q13.3)	32021733	32510863	489	Paterna	
F11-L	del(15) (q11.1 - q11.2)	20481702	22784582	2,302	Materna	
F11-P	del(15) (q11.1 - q11.2)	20603042	22509254	1,906	?	
F11-S	dup(15) (q13.3)	32021733	32510863	489	Materno	
F11-W	del(15) (q11.1 - q11.2)	20575646	22509254	1,933	?	
F11-U	del(15) (q11.1 - q11.2)	20481702	22378143	1,896	Materna	
F11-U	dup(15) (q13.3)	32021733	32510863	489	Paterna	
F11-U	del(X) (p22.33)	169064	2865335	2,696	de novo	
F11-U	del(Y) (p11.32 - p11.2)	119064	6781557	6,662	de novo	
F11-V9	del(15) (q11.1 - q11.2)	20481702	22432687	1,950	Materna	
F11-V9	dup(Y) (q11.21 -q11.223)	14083244	23649430	9,566	de novo	
F12-A	dup(15) (q11.1 - q11.2)	20102541	22486999	2,384	?	

*As posições genômicas estão descritas de acordo com a Human Genome Bulding (Build GRCh37, hg19, 2009)

Tabela 9. 8 - Descrição de Variações no Número de Cópias de >100kb e < 400kb encontradas em pacientes e familiares com epilepsia do estudo “Investigação genéticas e familiar em pacientes com epilepsias no Estado da Bahia”

Id. Pac.	Rearranjo	Posição genômica ponto de quebra proximal	Posição genômica ponto de quebra distal	Tamanho mínimo (Kb)	Herança	Data base/Significado (1.ISCA / 2.DECHIFER / 3.NCBI36 /4.DGV v.1 / 5.CNV-CHOP	N. Genes relevantes para epilepsia
F2-C	dup (10) (q26.3)	135276496	135404523	128,37	?	5. 28 variantes de sobreposição pop. africana	CYP2E1 (PMID: 25280786)
F5-A	dup(3) (q26.1)	162514534	162619141	104,86	?		
F11-A	dup(9) (q34.3)	139651255	139821083	169,82	Materna		
F11-B	dup(3) (921.2)	51835114	51941665	106,55	De novo		
F11-B	dup(3) (q26.1)	162514534	162619141	104,60	De novo		
F11-B	del(3) (q29)	195425875	195614588	188,71	De novo		
F11-B	dup(9) (q34.3)	139651255	139758666	107,41	Materna		
F11-D	dup(9) (q34.3)	139651255	139794135	142,88	Materna		
F11-inf	dup(9) (q34.3)	139651255	139821083	169,82	Materna		
F11-L	dup(16) (p12.3)	20496489	20750249	253,76	Materna		
F11-S	dup(9) (q34.3)	139651255	139794135	142,88	Paterna?		
F11-W	dup(9) (q34.3)	139651255	139821083	169,82	?		
F11-W	dup(16) (p12.3)	20563936	20701992	138,05	?		
F11-V9	dup(15) (q13.3)	2021733	32326095	304,36	Materna		
F11-V9	dup(16) (p12.3)	20496489	20750249	253,76	Materna		
F12-A	dup(22) (q11.23)	25664618	25892253	227,63	?		
*As posições genômicas estão descritas de acordo com a Human Genome Bulding (Build GRCh37, hg19, 2009)							

Tabela 9.9-Descrição de Variações no Número de Cópias de <100kb encontradas em pacientes e familiares com epilepsia do estudo “Investigação genéticas e familiar em pacientes com epilepsias no Estado da Bahia”

Id. Pac.	Rearranjo	Posição genômica ponto de quebra proximal	Posição genômica ponto de quebra distal	Tamanho mínimo (Kb)	genes	Data base/Significado (1.ISCA / 2.DECHIFER 3.NCBI36 /4.DGV v.1 /5.CNV-CHOP)
F2-C	dup(9)(p11.2)	3851630	3851689	60		5.Não descrita
F2-C	dup(9)(q21.13)	77588923	77641141	52		5.Não descrita
F2-C	del(11)(q13.5)	75915308	75915367	60		5.Não descrita
F2-C	dup(22) (q12.3)	32327784	32327843	60		5.Não descrita
F3-A	dup(4) (q34.1)	173429497	173429556	60	GALNTL6	5.Não descrita
F3-A	dup(4) (q34.3)	181496115	181562163	66		5.Não descrita
F3-A	del(4) (p13)	42107069	42107128	60		5.Não descrita
F5-A	dup(19) (10158842	10158901	60	C3P1	
F7-A	del(14) (q24.2)	73425739	73425798	60	DCAF4	
F7-A	del(15) (q24.2)	75632573	75632632	60	COMMD4	
F7-A	dup(16) (p13.11)	16276056	16276115	60	ABCC6	
F7-A	del(19) (q24.2)	6702568	6797381	94,81	C3, GPR108, TRIP10...	5.Não descrita
F11-B	del(4) (p13)	42107069	42107128	60		5.Não descrita
F11-B	dup(4) (q34.1)	173429497	173429556	60		5.Não descrita
F11-B	dup(9) (p24.2)	3851630	3931394	79,76		
F11-B	del(21) (p22.3)	43826675	43826734	60		5.Não descrita
F12-A	del(1) (p31.1)	81951282	81951341	60		
F12-A	del(2) (q36.3)	226329408	226329467	60		5.Não descrita
F12-A	dup(3) (q26.31)	172538344	172538403	60		
F12-A	del(4) (p13)	42107069	42107128	60		
F12-A	dup(6) (p22.3)	21597975	21598034	60		
F12-A	dup(9) (p31.1)	21597975	21598034	60		
F12-A	dup(16) (p13.11)	16276056	16276115	60		
*As posições genômicas estão descritas de acordo com a Human Genome Bulding (Build GRCh37, hg19, 2009)						

9.2 RESULTADOS DO GRUPO- ENCEFALOPATIAS EPILÉPTICAS-G2

9.2.1 Características gerais da amostra

Dos 20 sujeitos analisados no grupo das encefalopatias epiléticas, 55% (11) eram do sexo feminino; a idade variou de 01-15 anos (média de 7,7/ mediana 8,0/desvio padrão 4,0). Gráficos 8.4, 8,5 e 8,6. A idade na primeira crise variou de 2 dias à 10 anos, sendo que 70% (14) dos pacientes tiveram a primeira crise até o primeiro ano de vida. A média de tempo de convívio com as crises foi de dois anos (mediana 0,8, desvio padrão de 2,6). Gráfico 9.7.

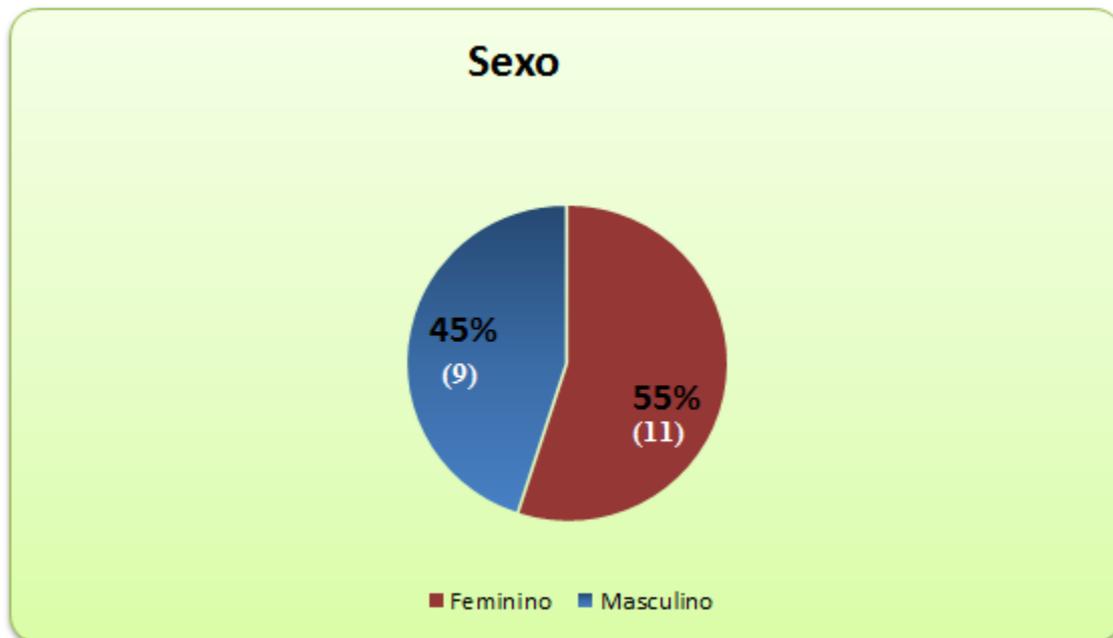


Gráfico 9.4- Frequências do total de sujeitos do grupo 2 por sexo

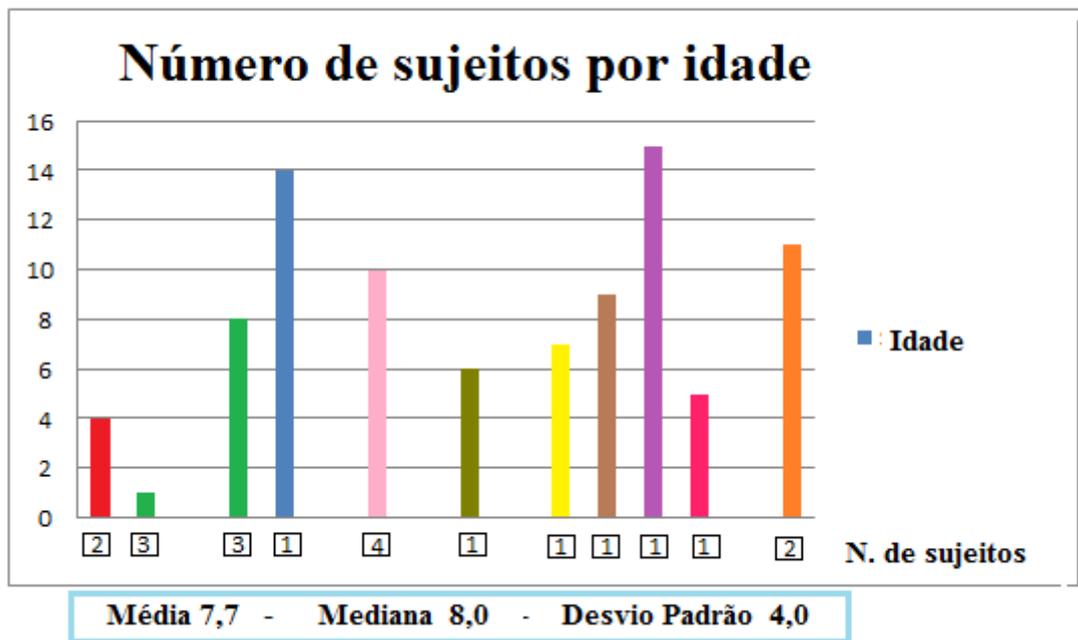


Gráfico 9.5- Número total de sujeitos do grupo G2 por idade

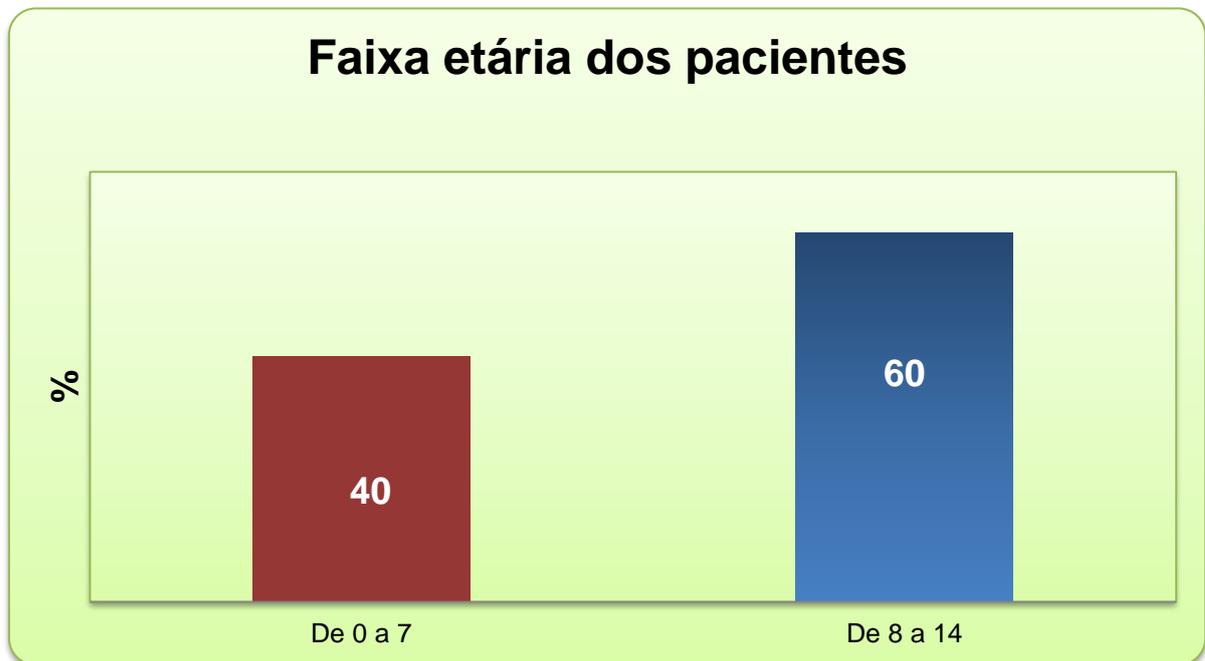


Gráfico 9.6- Frequências das idades por faixa etária

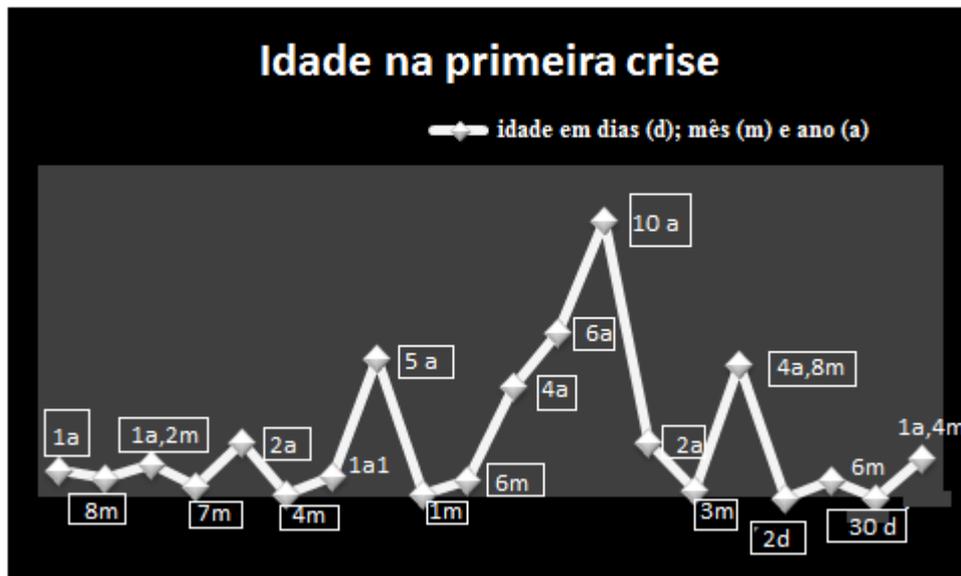


Gráfico 9.7- Distribuição das idades dos 20 pacientes do G-2 em ocasião da primeira crise

Quatro (20%) dos pacientes inseridos neste grupo tinham laços de parentesco (2 irmãs e 2 primas). As análises familiares de 85% (17) dos sujeitos mostraram recorrência familiar de epilepsia em 76,5% (13), com uma variação entre 1-5 casos por família; 29,4% (4) dos familiares avaliados tiveram convulsões febris (CF) e distúrbios neuropsiquiátrico-DNP: (retardo mental, demência, esquizofrenia, síndrome do pânico, déficit de atenção com hiperatividade) foram relatadas nas famílias de 41,1% (7) dos 17 propósitos avaliados, com uma variação de 1-25 casos por família. Somente 15% (3) das famílias avaliadas apresentaram consanguinidade. Familiares de 5 propósitos não puderam ser avaliados. (Tabela 9.9 e gráfico 9.8).

Tabela 10- Casos de epilepsia, convulsões febris e distúrbios neuropsiquiátricos em familiares de 17 propósitos do grupo 2.

Caso	(Id.pesq.)	N casos com DNP	N. casos com CF	N de casos com epilepsia na família	Consanguinidade (n.geração)
1	007(GB)	0	0	0	Não
2	C1(CM)	3	0	2	Não
3	004(CC)	0	0	1	Não
4	028(DD)	2	2	0	Não
5	P7(FF)	1	0	0	Não
6	023(HG)	0	0	0	Não
7	019(HA)	3	1	2	✓
8	P3(JM)	X	X	X	X
9	022(KO)	25	4	1	✓
10	D1(LR)	9	0	2	Não
11	O01(LCM)	0	0	5	Não
12	010(MC)	2	1	1	✓
13	P6(ME)	X	X	X	X
14	013(MLM)	X	X	X	X
15	014(MD)	0	1	4	✓
16	D2(PR)	9	0	2	Não
17	017(PB)	1	0	1	Não
18	P1(RR)	2	0	3	Não
19	C4(VM)	3	0	2	Não
20	P5(VE)	5	0	4	Não

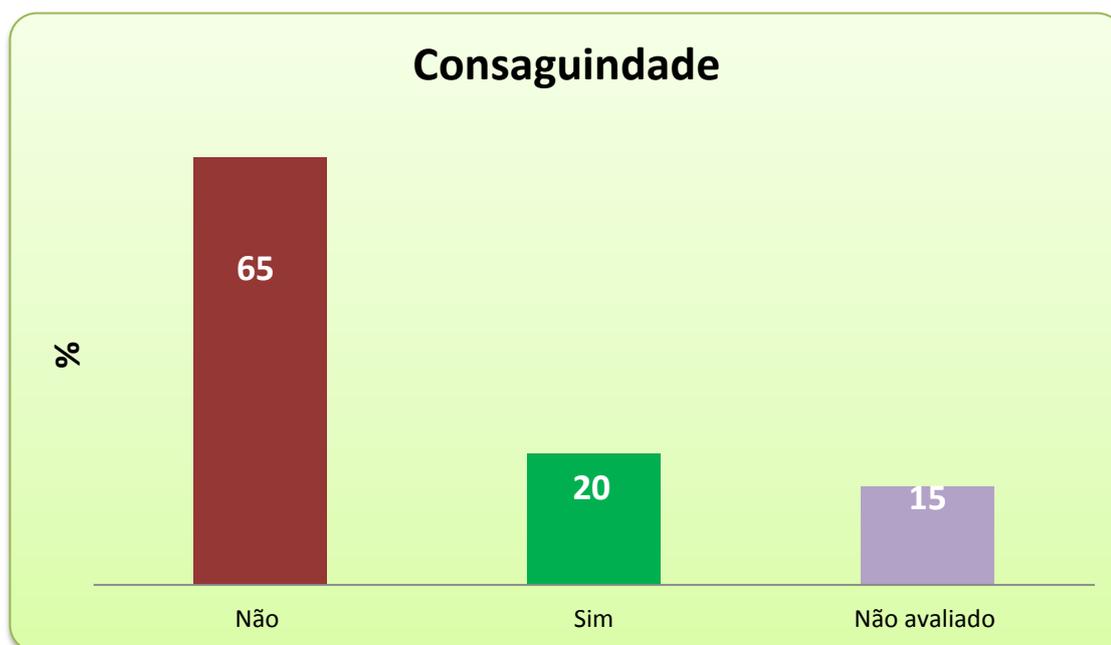


Gráfico 9.8- Frequência de consanguinidade nas famílias de 17 propósitos do G2.

Quanto aos tipos de crises 15% (3) dos pacientes tiveram crises focais; 5% (1) teve crises focais secundariamente generalizadas (ESES); 10% apresentavam crises generalizadas; 15% (3) crises parciais complexas; 5% (1) crises parciais complexas com componente atônico; 10% (2) crises febris mioclônicas astásticas; 5% (1) com crises hemifaciais; 5%(1) com mioclonias e 30% (6) apresentavam espasmos infantis, dois destes com outras crises ou síndromes associadas. (Tabela 10). As principais características clínicas destes pacientes podem ser visualizadas na tabela 11.

Quanto à avaliação genética laboratorial, 80% (16) dos 20 propósitos deste grupo foram incluídos para análise com um painel de 21 genes com a metodologia de sequenciamento de última geração (*Next Generation Sequencing* -NGS); destes 25% (4) apresentaram mutações gênicas significantes nos genes CDKL5, SCN1A, ARX e SLC25A22, tendo sido 50% (2), comprovado na validação (CDKL5 e SCN1A)ambos mutação *de novo*, um (SLC25A22) mostrou-se em estado de heterozigose no probando e na genitora e dois irmão com quadro clínicos semelhantes apresentaram alelos normais. A mutação do gene ARX, não foi possível terminar a análise a tempo para ser apresentada nestes resultados. A tabela 9.2 traz as especificações das mutações encontradas, bem como as características dos propósitos e familiares validados

Tabela 11 – Tipos e frequências das crises apresentadas pelos 20 pacientes com Encefalopias Epiléticas-G2.

CRISES EPILÉTICAS			
PACIENTES	TIPOS DE CRISES	FREQUÊNCIA	%
P5(VE)	Crises focais complexas secundariamente generalizadas ESES	1	5,0
P6(ME) +P3(JM)+022(KO)	Crises focais simples	3	15,0
028(DD) +019(HA)	Crises generalizadas	2	10,0
P7(FF)	Crises hemifaciais	1	5,0
D1(LR) +D2(PR)	Crises febris mioclônicas astásticas	2	5,0
001(LCM)+010(MC)+017(PB)	Crises parciais complexas	3	15,0
P1(RR)	Crises parciais complexas com componente atônico	1	5,0
C1(CM)+004(CC)+023(HG)+014(MD)	Espasmos infantil	4	20,0
007(BG)	Espasmos infantis; crise parcial versiva E; CPC	1	5,0
C4(VM)	Espasmos infantis, S. Ohtahara, S. West	1	5,0
O13(MLM)	Mioclonias	1	5,0
	Total geral	20	100,0

Tabela 12- Caracterização dos pacientes elegíveis para análises por painel de genes- NGS

ID	Idade/Sexo	Início das Crises	Aspectos Clínica
C1-CM	2,8 / F	7 meses	Espasmos epilépticos; completude de ondas lentas difusas.
C4-VM	2,4 / F	2 dias	Espasmos epilépticos; suspeita de S. Ohtahara, S. West; apresenta Síndrome do nervo sebáceos limiar; Déficit cognitivo; hemimegaencefalia; assimetria de face;
D1-LR	10/F	6 meses	Crises febris mioclônicas astáticas. EEG con surtos de CEP generalizado, sem crises. Deficit de atenção.
D2-PR	11/F	9 meses	Crises mioclônicas astáticas precipitada por febre; RNM e EEG anômalos (com surtos de CEP generalizados, sem crise);
P1-RR	12 / M	6 meses	Crise parcial complexa com componente atônico e queda de cabeça; distúrbio de comportamento com hiperatividade; dificuldade escolar, aquisição de escrita, leitura e cálculo;
P3-JM	11 / F	5 anos	Crise focal simples, crises hemifacial sensoriomotor, inabilidade na fala; hipersalivação; crises parciais complexas; crises durante o sono; Epilepsia Rolândica Atípica; hipotonia; displaxia oromotor; retardo mental.
P5-VE	10 / M	1 ano, 4 meses	Crises focais complexas secundariamente generalizadas durante o sono. Encefalopatia ESES.
P6-ME	16 / F	10 anos 8 meses	Crises focais simples; crises hemifaciais sensomotor, hipersalivação. Epilepsia Rolândica Atípica. Hipotonia.
P7-FF	15 / F	2 anos	Crise complexa hemifacial; Epilepsia Rolândica Atípica; Atraso na aquisição da leitura e escrita;
001-b LC	7,4 / M	4 anos	Crises parciais complexas, com vômito e cefaleia; Ataxia.
004-CC	4,10 / F	1ano, 2meses	Espasmos infantis; retardo psicomotor; dismorfismos; suspeitado síndrome de Smith Optiz (afastado)
007-BG	5,4 / M	1 ano	Espasmos infantis, crises parcial versíva para esquerda, crise parcial complexa; parada ou regressão psicomotora; sinais piramidais.
010-MC	9,6 / F	6 anos	Crises parciais complexas no sono; crises parciais complexas, motoras com versão da boca e salivação.
O13-ML	5,9 / F	2anos e 6 meses	Mioclonias ao acordar; mioclonia estática; ausência atípica; parada ou regressão psicomotora; Ataxia.

014-MD	1,6 / M	3 meses	Espasmos infantis; crises versívas com clonias; retardo psicomotor; hipotonia; Achados em neuroimagens: aumento dos ventrículos cerebrais; redução do corpo caloso.
017-PB	7,6/ M	25-30 dias	Crises parciais complexas com vocalização; Convulsões febris dos 4-6 anos e 11m; ataxia no início. Apresenta dificuldade escolástica
019-HA	/ M	8meses	?
022-KO	6 / F	1mês	Crises focais com olhos versivos; crises parciais complexas com clonias; convulsões febris;distúrbio do comportamento / hiperatividade; transtorno opositor; RNM: alterações dos sinais da substância branca no lobo occipital esquerdo e na região hipocampal (edema ou gliose ?); anomalias epileptiformes.
023-HG	8,4 /M	1mês Relatos de soluços desde a primeira mamada	Espasmos infantis; retardo psicomotor; manifestações extrapiramidais (discretos movimentos coreoatetosis); sinais piramidais; hipotonia. Dupla hemipareses espastica sem controle cervical.
028-DD	8 a /M	4 meses	

As análises dos 12 pacientes restantes revelaram polimorfismos raros (abaixo de 0.05%) em alguns dos 21 genes avaliados, pelo menos 29 destes foram não sinônimos. A tabela 9.2 traz a relação dos polimorfismos não sinônimos encontrados nos diferentes genes e pacientes avaliados.

Do total dos 20 pacientes, 45% (9) foram avaliados também por CGH. Dos quatro não avaliados pelo painel 50% (2) foram avaliados por CGH. A tabela 9.3 traz os resultado das CNVs encontradas nestes pacientes. Tabela 12- Polimorfismos resultantes das análises de 21 genes sequenciados com painel-NGS.

Tabela 13- Polimorfismos resultantes da análises de 21 genes sequenciados com painel-NGS em 16 pacientes com encefalopatia epiléptica pertencentes ao grupo 2.

Nº	ID. Pac.	Cromossomo	Região	Tipo	Zigosidade	Cobertura	Homo sapiens (hg19) dbsnp variants	Homo sapiens (hg19)_Gene	Outras variantes	Não Sinôni ma
1		001-LCM								
		2	166908537	SNV	Heterozigotos	69		SCN1A	Não	-
		9	131390244	SNV	Heterozigotos	170	rs141475745	SPTAN1	Não	Não
		9	131380308^131380309	Inserção	Heterozigotos	101		SPTAN1	Não	Sim
		11	793620^793621	Inserção	Heterozigotos	32		SLC25A22	Não	Não
		16	29825126	SNV	Heterozigotos	39	rs11150573	AC009133.20, PRRT2	Não	-
		20	62045403	SNV	Heterozigotos	30		KCNQ2	Não	
2		C4-VM								
		2	166848740	SNV	Heterozigotos	25		SCN1A		Sim
		2	166211094	SNV	Heterozigotos	90		SCN2A		Não
		2	166223669	SNV	Heterozigotos	14		SCN2A		Sim
		2	166848740	SNV	Heterozigotos	24		SCN1A		Não
		9	131351042	SNV	Heterozigotos	137		SPTAN1		-
		9	138645901	SNV	Heterozigotos	75		KCNT1		-
		9	138647036	SNV	Heterozigotos	180		KCNT1		Não
		12	52162823	SNV	Heterozigotos	62		SCN8A		Sim
		16	9934691	SNV	Heterozigotos	144		GRIN2A		Sim

Continua na próxima pagina

...Continuação tabela 9.2 (Pg 2)

	16	29825022	SNV	Heterozigotos	110		AC009133.20, PRRT2		Não
	16	29825126	SNV	Heterozigotos	25		AC009133.20, PRRT2		Não
	19	50368466	SNV	Heterozigotos	80		PNKP		Sim
3	P-3-JM								
	16	9934691	SNV	Heterozigotos	96	rs9924016	GRIN2A	No	Não
	16	29825126	SNV	Heterozigotos	20	rs11150573	AC009133.20, PRRT2	No	Não
	20	8769104	SNV	Heterozigotos	90	rs61755436	PLCB1	No	Sim
	20	8769104	SNV	Heterozigotos	90	rs61755436	PLCB1	No	Sim
4	P-5-VE								
	2	166848740	SNV	Heterozigotos	13		SCN1A		Sim
	11	792166	SNV	Heterozigotos	44		SLC25A22		Sim
	12	52094965	SNV	Heterozigotos	112		SCN8A		Não
	12	52094965	SNV	Heterozigotos	112		SCN8A		Não
	12	52094965	SNV	Heterozigotos	111		SCN8A		-
	16	9928100	SNV	Heterozigotos	42	rs201444481	GRIN2A		Não
	16	29825126	SNV	Homozigoto	21	rs11150573	AC009133.20, PRRT2		Sim
	19	50370404	SNV	Heterozigotos	39	rs3739168	PNKP		Sim
5	13-MLM								
	2	166179779	SNV	Heterozigotos	153	rs141815642	SCN2A	No	Não
	2	166246235	SNV	Heterozigotos	144	rs73025979	SCN2A	No	Não
	2	166179779	SNV	Heterozigotos	153	rs141815642	SCN2A	No	Não
	2	166246235	SNV	Heterozigotos	143	rs73025979	SCN2A	No	-
	2	166903495..166903496	Deleção	Heterozigotos	203		SCN1A	No	-
	12	52100334	SNV	Heterozigotos	292	rs187115247	SCN8A	No	Não
	16	9934691	SNV	Heterozigotos	110	rs9924016	GRIN2A	No	Não

Continua na próxima pagina

...Continuação tabela 9.2 (Pg 3)

	16	29825126	SNV	Homozigoto	43	rs11150573	AC009133.20, PRRT2	No	
6	017-PB								
	2	166179779	SNV	Heterozigotos	156	rs141815642	SCN2A	No	Não
	2	166179779	SNV	Heterozigotos	152	rs141815642	SCN2A	No	-
-									
	2	166903495..166903496	Deleção	Heterozigotos	265		SCN1A	No	
	2	166903495..166903496	MNV	Heterozigotos	265		SCN1A	No	-
	5	125891713	SNV	Heterozigotos	269	rs138056453	ALDH7A1	No	-
	5	125929001..125929004	Deleção	Heterozigotos	268	rs5871220	ALDH7A1	No	-
	5	125929001..125929004	MNV	Heterozigotos	268	rs5871220	ALDH7A1	No	Não
	9	131380308^131380309	Inserção	Heterozigotos	74		SPTAN1	No	Sim
	9	138594134	SNV	Heterozigotos	53	rs139034501	KCNT1	No	Sim
	9	138594163	SNV	Heterozigotos	53	rs146292575	KCNT1	No	Não
	9	138656897	SNV	Heterozigotos	187	rs116691849	KCNT1	No	Não
	9	138594134	SNV	Heterozigotos	53	rs139034501	KCNT1	No	Sim
	9	138594163	SNV	Heterozigotos	53	rs146292575	KCNT1	No	Não
	9	138656897	SNV	Heterozigotos	187	rs116691849	KCNT1	No	Não
	16	9934691	SNV	Heterozigotos	144	rs9924016	GRIN2A	No	-
	16	29825126	SNV	Heterozigotos	60	rs11150573	AC009133.20, PRRT2	No	Não
	20	8639167	SNV	Heterozigotos	99		PLCB1	No	-
7	022-KO								
	1	44365454	SNV	Heterozigotos	21	rs112394294	ST3GAL3	No	
	16	29825126	SNV	Homozigoto	52	rs11150573	AC009133.20, PRRT2	No	Sim
	X	99551403	SNV	Heterozigotos	120	rs191333060	PCDH19	No	Não
	X	25025309	SNV	Heterozigotos	11		ARX	No	Sim

Continua na próxima pagina

Continuação tabela 9,2 (Pg 4)

	X	99551403	SNV	Heterozigotos	120	rs191333060	PCDH19	No	Sim
8	023-HG								
	2	166221706	SNV	Heterozigotos	124	rs145662546	SCN2A		Não
	2	166848740	SNV	Heterozigotos	29		SCN1A		Sim
	2	166930064	SNV	Heterozigotos	176	rs139397227	SCN1A, AC010127.4		Sim
	16	29825126	SNV	Homozigoto	60	rs11150573	AC009133.20, PRRT2		Não
	20	62038510	SNV	Heterozigotos	41	rs187252584	KCNQ2		Não
	X	18646587	SNV	Homozigoto	63		CDKL5		Sim
9	028-DD								
	2	166908477	SNV	Heterozigotos	31	rs121917909	SCN1A	No	Sim
	9	138594203	SNV	Heterozigotos	53	rs146152956	KCNT1	No	Não
	9	131389748	SNV	Heterozigotos	10	rs112955915	SPTAN1	No	Não
	9	138594203	SNV	Heterozigotos	52	rs146152956	KCNT1	No	Não
	16	9934691	SNV	Heterozigotos	103	rs9924016	GRIN2A	No	-
	16	29825126	SNV	Homozigoto	36	rs11150573	AC009133.20, PRRT2	No	Não
10	007-BG								
	2	166211094	SNV	Heterozigotos	275		SCN2A	No	Não
	2	166848568	SNV	Heterozigotos	464	rs149315236	SCN1A	No	Não
	2	166848740	SNV	Heterozigotos	121		SCN1A	No	Sim
	2	166892966	SNV	Heterozigotos	61		SCN1A	No	Não
	2	166210806^166210807	Inserção	Heterozigotos	348			No	Sim
	2	166848740	SNV	Heterozigotos	122			No	Sim
	16	29825126	SNV	Homozigoto	100	rs11150573	AC009133.20, PRRT2	No	Não
	X	18582647..18582648	MNV	Heterozigotos	65			No	-
	X	18582647..18582648	Deleção	Heterozigotos	65			No	-
11	010-MC								

Continua na próxima pagina

Continuação tabela 9.2 (Pg5)

2	166211094	SNV	Heterozigotos	226		SCN2A	No	Não
2	166245642	SNV	Heterozygous	179	rs138123155	SCN2A	No	Não
2	166848740	SNV	Heterozigotos	122		SCN1A	No	Sim
9	138664787	SNV	Heterozigotos	278	rs146810749	KCNT1	No	Não
16	29825126	SNV	Homozigoto	109	rs11150573	AC009133.20, PRRT2	No	Não
19	50367493	SNV	Heterozigotos	305	rs145904995	PNKP	No	Não
12	P1-RR							
19	50367493	SNV	Heterozigotos	305	rs145904995	PNKP	No	Não
2	166211094	SNV	Heterozigotos	49			No	Não
2	166848740	SNV	Heterozigotos	16			No	Sim
2	166894680	SNV	Heterozigotos	57			No	-
9	131340319	SNV	Heterozigotos	36			No	-
9	131340361..131340363	MNV	Heterozigotos	35			No	-
9	131340361..131340363	Deleção	Heterozigotos	35			No	-
16	9934691	SNV	Heterozigotos	64	rs9924016		No	-
16	29825126	SNV	Homozigoto	36	rs11150573		No	Não
13	P6-ME							
2	166894343	SNV	Heterozigotos	328	rs144679294	SCN1A	No	Não
19	50368466	SNV	Heterozigotos	53	rs34472250	PNKP	No	Sim
20	62055522..62055523	MNV	Heterozigotos	6		KCNQ2		-
X	18582647..18582648	MNV	Heterozigotos	30		CDKL5		-
X	18582647..18582648	Deleção	Heterozigotos	30		CDKL5		-
14	P7-FF							
2	166211094	SNV	Heterozigotos	185		SCN2A	No	Não
2	166848740	SNV	Heterozigotos	87		SCN1A	No	Sim

Continua na próxima página

Continuação tabela 9.2 (Pg6)

9	131367308	SNV	Heterozigotos	274	rs200543425	SPTAN1	No	-
9	138669210	SNV	Heterozigotos	237	rs149028586	KCNT1	No	Não
9	138669252	SNV	Heterozigotos	240	rs142726010	KCNT1	No	Não
9	131367308	SNV	Heterozigotos	274	rs200543425	SPTAN1		-
9	138669210	SNV	Heterozigotos	238	rs149028586	KCNT1		Não
9	138669252	SNV	Heterozigotos	240	rs142726010	KCNT1		Não
16	29825126	SNV	Homozigoto	64	rs11150573	AC009133.20, PRRT2	No	Não
20	62038585	SNV	Heterozigotos	196	rs35647984	KCNQ2	No	Não
20	62038585	SNV	Heterozigotos	196	rs35647984	KCNQ2		Não
X	18582647..18582648	MNV	Heterozigotos	96		CDKL5		-
X	18582647..18582648	Deleção	Heterozigotos	96		CDKL5		-
15			D1-LR					
16	9934691	SNV	Heterozigotos	89	rs9924016	GRIN2A	No	-
16	9943856	SNV	Heterozigotos	64		GRIN2A	No	-
16	29825126	SNV	Homozigoto	36	rs11150573	AC009133.20, PRRT2	No	Não
17	46022869	SNV	Heterozigotos	94		PNPO, RP11-6N17.9	No	-
16			014-MD					
2	166848740	SNV	Heterozigotos	46		SCN1A	No	Sim
12	52096441..52096481	Deleção	Heterozigotos	193		SCN8A	No	-
12	52096441..52096481	MNV	Heterozigotos	193		SCN8A	No	-
16	9934691	SNV	Heterozigotos	179		GRIN2A	No	-
16	29825126	SNV	Homozigoto	66		AC009133.20, PRRT2	No	Não

SNV= Variante de um único nucleotídeo (*Single Nucleotide Variants*)

9.3 RESULTADOS DAS AVALIAÇÕES DO GRUPO 3-EPILEPSIA ROLÂNDICA

Dos 11 pacientes pertencentes a este grupo 63,6% (7) eram do sexo feminino a média de idade foi de 11,4 anos (mediana, 11,0 / desvio padrão de 2,5), com variação entre 7- 15, sendo que 90,9% estavam na faixa etária entre 8 e 15 anos (Gráficos 8.9). A idade na primeira crise variou entre 1 ano e 5 meses à 10 anos (gráfico 9.0), sendo a média de tempo de convívio com as crises de 7,3 anos (mediana 6,0 / desvio padrão 3,5). Apenas 27,3% dos propósitos tiveram convulsão febril. A avaliação familiar de 10 dos 11 propósitos revelou recorrência de crises epilépticas em 63,6% das famílias, nenhuma destas tinham relação de consanguinidade (Gráficos 9.9 e 10)



Gráfico 9.9- Faixa de idades dos pacientes do grupo 3-Epilepsia Rolândica



Gráfico 10 Idade no início das crises dos propósitos do grupo G-3

Tabela 14- Características clínicas dos pacientes com Epilepsia Rolândica pertencentes ao grupo 3.

Nº	Id. pesquisa	SEXO	IDADE	IDADE DE INICIO DAS CRISES	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS
1	POCS-1(RRS)	M	11	06	Crises focais, complexas secundariamente generalizadas, piora com carbamazepina não responde a valproato. Epilepsia Rolândica Atípica. Atraso na aquisição da leitura e escrita. Com ESES.
2	POCS-2(IVSS)	M	07	01	Crises focais, convulsão febril. Descargas frontotemporais de ponta onda continua no sono, piorando com carbamazepina. Dificuldade no aprendizado.
3	POCS-3(JMM)	F	10	05	Crise focal simples, crises sensoriomotor, crises parciais complexas; crises durante o sono, piora com carbamazepina; hipotonia displaxia retardo mental, inabilidade na fala; hipersalivação; Epilepsia Rolândica Atípica. EEG com descargas centrotemporais e ponta onda continua no sono.
4	POCS-4(NCRS)	F	14	06	Teve convulsão febril, crises focais complexas com discargas centro teporais e ponta onda contínua no sono, piora com uso de carbamazepina. Responde ao valproato., dificuldade no aprendizado, atraso do desenvolvimento psicomotor. Epilepsia Rolândica Atípica
5	POCS-5(VESP)	M	13	01	Crises focais complexas secundariamente generalizadas no sono. Retardo Mental, cluster frequentes de descargas generalizadas com pontas ondas lentas contínua no sono, aumentando quando em uso de carbamazepina-Encefalopatia ESES.
6	POCS5.1(VSP)	M	12	1a,5m	Crises focais complexas, sem convulsão febril., parada e regressão neurológica, dificuldade na fala e comunicação, atraso na aquisição da leitura e escrita
7	POCS5.2(JASP)	F	08	06	Retardo no desenvolvimento neuropsicomotor, parada regressão neurológica, afasia, ataxia, dificuldades na aquisição da comunicação; dificuldade de aprendizado escolar. Retardo mental

8	POCS-6(MEPB)	F	15	10	Crises focais simples; crises hemifaciais sensomotor; Hipotonia. Epilepsia Rolândica Atípica.
9	POCS-7(FSF)	F	14	02	Crise complexa, crise hemifacial; convulsão febril ; Atraso na aquisição da leitura e escrita; Epilepsia Rolândica Atípica;
10	POCS-8(LRC)	F	11	9m	Crises febris mioclônicas astáticas. Convulsão febril; EEG com surtos de CEP generalizado,. Déficit de atenção.
11	POCS-9 (PRC)	F	10	06	Crise mioclonica-astáticas precipitada por febre. Retardo mental e EEG com surtos de CEP generalizados,.

O sequenciamento do gene GRIN2A, não mostrou mutações nos casos concluídos. Alguns polimorfismos foram revelados. O como pode ser visto na tabela 15.

Tabela 15- Resultado Sequenciamento do GRIN2A nos pacientes do grupo 3

CÓDIGO PACIENTE	SNV	ALTERAÇÃO	SINÔNIMO
POCS-1(RRS)	rs9924016	c.[1498-34C>T]; Intrônica 7	NÃO
POCS-2(IVSS)	Inconclusivo		
POCS-3(JMM)	rs9924016	ENST00000404927:c.[1498-34C>T]	NÃO
POCS-4(NCRS)	Inconclusivo		
POCS-5(VESP)	rs201444481	ENST00000396575:c.[1652-13T>C];	NÃO
POCS5.1(VSP)	rs201444481	ENST00000396575:c.[1652-13T>C];	
POCS5.2(JASP)	WT		
POCS-6(MEPB)	WT		
POCS-7(FSF)	WT		
POCS-8(LRC)	rs9924016	ENST00000404927:c.[1498-34C>T] ENST00000396575:c.[1123-38G>T]	?
POCS-9 (PRC)	Inconclusivo		

Díscussão

10 DISCUSSÃO

A estratégia metodológica para análise genética das amostras do grupo 1 não foram suficientes para atender a todas as famílias. Isso ocorre pela heterogeneidade de fenótipos epiléticos apresentados nas diferentes famílias e mesmo dentro de uma família. As tecnologias de última geração para investigação genômica são complementares, e quando isoladas não são capazes de detectar as diferentes alterações.

A própria metodologia escolhida para avaliar este grupo (Array-CGH) tem suas limitações quanto ao fenótipo epilético, recente estudo de Zara, 2013, discute a não eficácia do CGH em pacientes com epilepsia generalizadas sem outras morbidades associadas. Esta também é a recomendação do Consórcio Internacional de Citogenômica Array-(ISCA), o qual reconhece a complexidade de fatores envolvidos desde o ensaio (testes) até análise dos resultados (CNVs), além da própria limitação da técnica.

A pesar disso, os resultados aqui gerados são importantes para esta população, mesmo que ainda não se saiba o significado de muitas das variantes encontradas, estes dados direcionam para um aprofundamento para futuros estudos.

Foi decidido não seguir as recomendações do ISCA quanto à avaliação dos resultados, isto é verificar entre os bancos de dados públicos de CNV a condição de patogenicidade das alterações encontradas. Isto porque não encontramos uma concordância dos pontos de quebra de muitas das CNVs encontradas em nossos pacientes quando comparados com as depositadas nos bancos de dados recomendados. Muitas fizeram sobreposições mais, não tinha sido comprovadamente patogênica.

Callaway et al., 2014, descreve que as CNV patogênicas podem associar-se a um significativa variabilidade fenotípica, bem como ser consideradas patogênicas ou presumivelmente patogênicas para quadros clínicos não correlacionados com a indicação que se está investigando gerando um resultado casual.

Acreditamos que ainda sejam necessárias muitas discussões e reflexões a respeito da interpretação dos dados gerados a partir do CGH. Se já são reconhecidas a existência de limitações intrínsecas com relação a diferentes plataformas utilizadas (em termo de tipologia e de cobertura), fazendo com que os resultados de um laboratório não sejam reproduzidos 100% por outro, a mesma ressalva vale para os resultados gerados.

Sem falar em todas as condições que envolvem a penetrância e expressividades das alterações genéticas e os envolvimento dos fatores ambientais, individuais e familiares de cada sujeito avaliado também influenciam nesta avaliação.

Nesse estudo foram consideradas as variações acima de 60 kb, apesar de que seja recomendado na literatura apenas CNV acima de 400kb, por acreditar que, se a mudança em um único nucleotídeo é capaz de precipitar patologias tão graves como tantas que conhecemos, desprezar estes resultados neste momento seria precipitado.

Os resultados encontrados neste estudo foram comparados com outros achados na literatura, através dos bancos de dados OMIN (Online Mendelian Inheritance in Man) e PubMed, Buscou-se a partir da CNV encontrada na nesta análise e casos clínicos semelhantes para serem comparados.

Com esta estratégia as 3 variantes encontradas segregando na família F11, assume um sentido importante pois, com pelo menos duas delas (9q34.3 e 15q13.3), foi encontrada uma correlação de até 100% dos sintomas apresentados por alguns membros da família, com genes localizados nestes seguimentos cromossômicos. Como alguns genes que causam surdez neurossensorial (fenótipo encontrado em 100% dos avaliados) e genes relacionados com diferentes causas de cânceres familiar, também este um achado significativo na família.

É neste segmento cromossômico que estão também localizadas enzimas que participam do sistema ABO, e muitas delas conhecidas por causar morbidades e mortalidades neonatais importantes como, por exemplo, a galactosemia.

Com relação à epilepsia a variante encontrada em 15q13.3 nesta família, contém um gene que codifica para a subunidade 7 do receptor nicotínico de acetilcolina. Achados de epilepsia envolvendo os estes tipos de receptores, já trouxeram importantes contribuições para este campo. Uma deleção desta variante é conhecida por causar a síndrome de microdeleção 15q13.3 (OMIM - # 612.001), responsável por um quadro clínico que vai desde problemas de desenvolvimento neurológico graves até encefalopatias epiléticas (Endris et al., 2010).

A alteração desta variante encontrada no nosso estudo foi em duplicação, a síndrome microduplicação 15q13.3 existe, mas não tão fortemente associada a epilepsias com a deleção. São encontrados uma variabilidade fenotípicas nos pacientes descritos com esta duplicação, revelada pela primeira vez em 2009, já que até então esta variante era tida como benigna (ref).

Os sintomas descritos nos poucos casos relatados na literatura são muito variáveis, até dentro de uma mesma família (REF). É o que acontece também na família aqui estudada, nem todos com a variante têm epilepsia, mas todos apresentavam sintomas associados. Os principais achados encontrados nesta variante são: retardo mental, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, dificuldade de comunicação, problemas comportamentais, distúrbios do espectro autístico, insônia e casos de convulsões (BEAL, 2013). Até o momento não foi encontrado na literatura um número de pessoas (8 indivíduos) pertencentes a uma mesma família com quadro clínico semelhante, acreditamos que possa existir mais pessoas com a variante que ainda não foram testadas.

Outras variantes encontradas neste grupo de pacientes foi a 2p11.2-p11.1, nos bancos de dados como CNV benigna. Três pacientes de 2 diferentes famílias (F1, F2) apresentaram esta variante em deleção, com dimensões diferentes. Achados na literatura correlacionam genes aí mapeados com as manifestações de espectros autísticos e outras alterações relacionadas com o desenvolvimento neurológico. Neste momento não temos condições de afirmar o envolvimento desta variável com os quadros clínicos apresentados pelos respectivos pacientes, sendo necessários novos estudos para maiores esclarecimentos.

Acreditamos que com os resultados gerados a partir do Array-CGH nesta família será possível trazer muitas contribuições, porém estudos adicionais devem ser feitos utilizando outras metodologias para comprovação e fortalecimento das hipóteses geradas.

Supõe-se que os principais resultados obtidos nesta pesquisa não são fatos inéditos, só vem a corroborar com pensamentos que remontam 410 aC, pois foi o próprio Hipócrates que afirmou que a epilepsia poderia ser herdada como qualquer outra doença do cérebro. Pensamento este que foi seguido e comprovado por diversos estudos, no passado e no presente, como os relatados em Zara et al., 2000; Schinzel e Niedrist, 2001; Bahi-Buisson, 2005; Battaglia; Guerrini, 2005; David et al., 2001, Johnson et al., 2011.

O fato de existir tantas famílias com recorrência de epilepsia nos faz pensar que a afirmação feita por Sander e Shorvon (1996) a qual assume significado nestes

casos, de fato para a maioria dessas famílias a epilepsia é somente mais um dos sintomas apresentados decorrentes de um distúrbio maior (neurológico e/ou genético).

Através da historia familiar de 32 indivíduos foi possível detectar 85 novos casos de recorrência de epilepsia no âmbito familiar. Estes achados nos convida à levar em consideração as observações de Beigueman (2000); Bricarelli (2008), Azevedo (2006) e quando afirmam que diante de um padrão genético se faz necessário um olhar para além do indivíduo. Schaefer e Thompson Jr.(2015), são mais contundentes quando afirmam que, na era pós-genômica, com maiores possibilidades de diagnóstico de doenças genética, “uma história familiar detalhada é uma informação tão crítica para o prontuário de uma paciente quanto a medição dos próprio sinais vitais e resultados laboratoriais”. Estes achados reforçam a necessidade de avaliação familiar a através de heredograma dos indivíduos afetados para estabelecimento dos riscos de recorrência

A genealogia da família F1, nos mostra segregação de sinais e sintomas patológicos impactantes em 3 gerações (falta acrescentar). Foi observado na realização dos heredogramas aspectos de negação, no relato de outros afetados, este achado também foi relatado por Bricarelli (2008), que descreveu impactos psicológicos imensuráveis para uma mãe em ver um filho com algum problema de saúde, esta senhora tem 5 dos seus 7 filhos com epilepsia, além de netos, irmãos, sobrinhos e ela própria.

A família F2-, composta de mãe e 3 filhos com epilepsia (todas atendidos em um dos ambulatório),foi também observado uma segregação familiar.

Na família F11, onde quatro membros são pacientes de um dos ambulatórios (mãe e dos filhos e uma sobrinha), observou-se , ser uma família consanguínea, de 3 gerações com casos afetados associados a diversos problemas de saúde. Sugerindo que o isolamento geográfico onde convivem colaborou para a endogamia. Foi encontrado relatos de 8 mortes prematuras (6 demonstrada no heredograma) de indivíduos malformados, diversos casos de aborto e ocorrência de epilepsia em 22 membros da família, além de vários problemas de saúde graves.

A alta especificidade e sensibilidade do painel NGS para rastrear mutações gênicas em massa mostrou-se uma técnica eficaz. O painel dos 21 genes mais frequentes nas encefalopatias epilépticas teve uma sensibilidade geral 90%, variando de 80 à 95% de acordo com o gene. O enquadramento clínico dos pacientes realizados previamente através de protocolo especifica foi um ponto fundamental para o êxito dos experimentos, esse fato

ajudou a aumentar o nível de sensibilidade do teste, relevante para o fenótipo específico do paciente.

A metodologia utilizada para o teste foram otimizadas para identificar mutações puntiformes envolvendo um única base (SNV) ou um número reduzido de bases (classificáveis como indel de pequenas dimensões). Mutações do tipo deleções/inserções /duplicações genômicas não puderam ser identificadas com precisão neste teste, sendo este um dos limites da técnica. Por este motivo a decisão de realizar análises de CGH nesta população.

Como todo o sequenciamento de massa existiu a possibilidades que mutações puntiformes patogênicas pudessem escapar da identificação seja devido a incorreta avaliação das bases nucleotídicas por parte dos instrumentos de bioinformática ou ainda pela possibilidade destas bases não serem cobertas pelo sequenciamento de alta velocidade, implicando em geração de resultados falso negativo.

Sendo estes mais uma limitação deste tipo de análise. Porém o desenho do teste limitou o número de bases não coberta adequadamente para menos de 5% do total, no caso dos genes com maior possibilidade de serem candidatos e inferior a 20% para os demais genes.

O experimento gerou 124 variantes dos 21 genes nos 16 pacientes analisados, muitas destas variantes são polimorfismos encontrados, mesmo que em baixa frequência, na população geral. Os dados depositados nos bancos públicos, na maioria das vezes, não são claros a respeito da população cujas as variantes foram encontradas, faltando parâmetros para comparar fenótipos.

A mutação detectada no gene SLC25A22 (11p15.5) em um dos pacientes avaliados (P5-VE) está associada com a forma precoce de encefalopatia epiléptica infantil 3 (EIEE3- OMIM # 609.304). Este gene codifica para um transportador de glutamato mitocondrial. Muitas variantes de Splicing alternativo que codificam para a mesma proteína já foram descritas (MOLINARI et al.,2005). Mutações homozigóticas em SLC25A22 foram descritos em relatos de casos de famílias consanguíneas com EIEE (MOLINARI et al.,2005; PODURI et al.,2013). Até à data atual não há descrição de mutações em heterozigose ou relatos de duplicações ou deleções neste gene. Em todo painel este foi o segundo gene que apresentou maior dificuldade de cobertura, variando muito de indivíduo para outro. No paciente em

estudo a cobertura total deste gene foi de 44%, abaixo do necessário para concluir um diagnóstico pelos parâmetros do serviço onde foram realizadas as análises. A decisão pela validação se deu pela história clínica do paciente e de seus dois irmãos (um menino e uma menina) que apresentavam quadros clínicos compatíveis, e ainda pela frequência que foi encontrada a mutação na região coberta (65%). Existe a possibilidade de mutação em outra parte do gene não coberta que possa estar causando um estado de heterozigose composta neste paciente. Sendo esta família uma forte candidata para estudo por exoma.

A mutação SCN1A encontrada no paciente 028-DD foi uma mutação missense, caracterizada por um câmbio de uma citosina por uma guanina no exon 8 do gene, tendo como consequência a troca de uma Alanina por uma Glicina na cadeia da proteína que compõe a subunidade 1 do canal neuronal de sódio potássio. Mutação neste gene é bem descrita na Síndrome de Dravet e na forma Autossômica Dominante da Epilepsia Generalizada com Convulsões Febris Plus (GEFS+) (OMIM #604.403). Casos herdados destas condições já foram descritos (TUNCER et al., 2015). A árvore genealógica deste paciente não demonstra recorrência de casos de epilepsia, porém existem casos de crises febris em duas gerações, além de 15 casos de aborto espontâneo e morte prematura. Estes achados familiares podem auxiliar no enquadramento diagnóstico, demonstrando mais uma vez a importância da avaliação familiar.

O gene ARX (Aristaless Related Homeobox), localizado em Xp22.13, codifica uma proteína que atua como fator de transcrição para regulação da atividade de outros genes. Mutações neste gene é bem descrita na S. de Ohtahara e na Encefalopatia Epiléptica Infantil Precoce EIEE1 (OMIM30350). Como relatado por Mastangelo e Leuzzi, 2012.

A mutação encontrada na paciente deste estudo (022-KO) foi uma mutação missense pro troca do aminoácido guanina para uma citosina na posição 1367 (c:1367G>C) no exon 5 deste gene. Foi o gene mais difícil de ser sequenciado neste painel e até o nosso estudo nenhuma outra variante deste gene tinha sido evidenciada pelo laboratório responsável. A cobertura, neste caso foi de somente 11% do gene, dados que classifica o experimento como inconclusivo no padrão determinado pelo laboratório. Porém achados familiares através da construção da genealogia desta criança foi decisivo para tomada de decisão na validação deste resultado. Como demonstrado na tabela 9.9 dos resultados, nesta família existem 25 sujeitos com distúrbios neuropsiquiátricos, segregando em 5 gerações da família consanguínea materna e 2 gerações da família paterna. Sendo os dois genitores aparentemente não

consanguíneos. Estes dados são condizentes com os descritos na literatura, os quais associa o ARX a forma de retardo mental ligado ao X, como relatado por Bienvenu et al, (2002); Gronskov et al (2004) e descrita também em 4 indivíduos masculino em duas gerações de uma família brasileira (GESTINARI-DUARTE et al, 2005). Estes achados, além de reforçar a importância da avaliação familiar para investigação genética laboratorial, demonstra, como bem discutido por Charzewska et al, (2013) a importância em expandir o fenótipo associado com mutações missense no gene ARX. É provável que a epilepsia desta criança um sintoma secundário a um distúrbio maior, como relatado em Sander e Shorvon (1996).

A validação da mutação no trios (pai, mãe, e criança) está sendo realizada por método de sequenciamento Sanger e pelas dificuldades de padronização da técnica os resultados serão relatados posteriormente.

A mutação no gene CDKL5 encontrada na criança (023-HG) de 8 anos com uma grave encefalopatia epiléptica foi mais um achado importante neste grupo avaliados pelo painel de genes. Por ser localizado no cromossoma X (p22.13), estas alterações são muitas vezes letais em homens. Desde sua descoberta (2008) existe uma tendência em correlacionar estes achados como sendo uma Síndrome de Rett. Os indivíduos com a Síndrome de Rett, geralmente são assintomáticas entre os 6-18 meses de vida, após esta idade, desenvolvem graves e persistentes alterações motoras, cognitivas e comportamentais (NEUL et al., 2010; PANTALEÓN et al., 2015). Enquanto a forma clássica de Rett só é descrita em meninos em mosaico ou em concomitância com a Síndrome de Klinefelter o que provoca uma variabilidade fenotípica tornando difícil a correlação genótipo fenótipo (AMIR et al., 1999; MURPHY et al., 1994; NAKASHIBA et al., 2000), os poucos achados de mutação no CDKL5 em indivíduos do sexo masculino vivos têm direcionado para separação em duas síndromes distintas, também do ponto de vista clínico. As meninas com CDKL5 apresentam fenótipo que sobrepõe os apresentados por pessoas com a Síndrome de Rett

Descrição na literatura demonstram que nos indivíduos masculinos com mutações CDKL5 existe um atraso grave de desenvolvimento e início das crises antes da idade de três meses (PANTALEÓN e JUVIER, 2013; ERMEL et al., 2014; GÜRSOY e ERÇAL, 2015) . Estas descrições corroboram com os achados do paciente em estudo fazendo que estes dados possam ajudar a melhor classificar esta

condição, a fim de delinear um quadro clínico que possa servir para diagnóstico precoce de em outras crianças na mesma condição.

A proporção dos achados de mutações neste gene de acordo com o sexo é de 5:1, até 2014 existiam pouco mais de 100 casos no mundo relatados na literatura, sendo 22 casos em meninos. No Brasil existem relatos na literatura de 2 casos em meninas associada a diagnóstico de Rett atípica (Leitão, 2013), mas não oficialmente são conhecidos 9 casos, sendo este o 10º caso brasileiro e o primeiro em indivíduo do sexo masculino. Estes achados, mesmo que não oficial segue o índice de proporção encontrado na literatura, porém acredita-se que existam muitos outros casos não diagnosticados, haja vista que pesquisa deste tipo de mutação tem sido revelada por sequenciamento de última geração, através destes paines de genes; Esta técnica ainda não está disponível para a população e tem um custo de 3.000 euros por análise.

O sequenciamento do gene GRIN2A, não revelou nenhuma mutação nos paciente que tiveram a análise finalizada. Posteriores estudos nestes pacientes deverão ser realizado.

Este estudo foi o primeiro realizado na Bahia e um dos poucos estudos brasileiro, se não o único, a utilizar mais de um método de tecnologia de última geração em uma mesma amostra. Os dados aqui gerados servirão de bases para projetos futuros, a fim de melhor caracterizar esta população o que ajudará no diagnóstico precoce de outros casos, e aconselhamento genético das famílias. À nível clínico um correto enquadramento diagnóstico pode inferir no prognóstico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGARWAL, AK, ARIOGLU, E., DE ALMEIDA, S et al.: AGPAT2 is mutated in congenital generalized lipodystrophy linked to chromosome 9q34 . *Nature Genet.* 31: 21-23, 2002;
2. AICARDI J.: Myoclonic epilepsies of infancy and childhood. *Adv Neurol* 43:1-3, 1986;
3. ALDRED MA, SANFORD ROC. THOMAS, NS et al.: Molecular analysis of 20 patients with 2q37.3 monosomy: definition of minimum deletion intervals for key phenotypes. *Med Genet.*; 41:433-39, 2004;
4. ALLDERDICE, PW. EALES, B. ONYETT, H, et, al.: Duplication 9q34 Syndrome. *Am J Hum Genet* 35:1005 -1019, 1983;
5. ALLEN NM, CONROY MMJ, LYNCH SA, et al. The variable phenotypes of KCNQ-related. *Epilepsia*; 55(9):e99-e105, 2014;
6. AMIR RE, IGNATIA B. VAN DEN VEYVER, et al.: Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2; *Nature Genetics* 23, 185-188,1999;
7. ANDERSON, G.D.; BOUGH, K.J. Rats fed a ketogenic diet exhibit significantly elevated levels of long chain, polyunsaturated fatty acids. *Epilepsia*, New York, n. 42, p. 262-263, 2001;
8. ANDREOZZI, P. et al. La medicina predittiva: la medicina interna del terzo millennio! *Journal of Prevention and Research in Medicine*, n. 8, 2011; Disponível em: <<http://www.preventionandresearch.com/la-medicina-predittiva-la-medicina-interna-del-terzo-millennio.html>>. Acesso em: 21 ago. 2012;
9. BAHI-BUISSON N, VILLE D, EISERMANN M et al.: Epilepsy in chromosome aberrations. *Arch Pediatr.*; 12(4):449-58, 2005;
10. BARKOVICH AJ, KUZNIECKY RI, JACKSON GD, GUERRINI R, DOBYNS WB. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. *Neurol.*: 65 (12): 1873-87, 2005;
11. BARKOVICH AJ, KUZNIECKY RI, JACKSON GD, GUERRINI R, DOBYNS WB. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. *Neurol.*: 65 (12): 1873-87, 2005;
12. BATTAGLIA, A.; GUERRINI, R. Chromosomal disorders associated with epilepsy. *Epileptic Disord.*, Montrouge, v. 7, n. 3, p. 181-192, 2005;
13. BEAL JC, KOSHI C, MOSHE SL.: Early-Onset Epileptic Encephalopathies: Ohtahara Syndrome and Early Myoclonic Encephalopathy. *Pediatric Neurology*; 47: 317-23, 2012;
14. BEAL JC.: Case Report: Neuronal Migration Disorder Associated With Chromosome 15q13.3 Duplication in a Boy With Autism and Seizures. *J Child Neurol* , 2013;
15. BEGHI E, CARPIO A, FORSGREN L, et al. Recommendation for a definition of acute symptomatic seizure. *Epilepsia*, 51:671–675, 2010;

16. BEIGUELMAN, B.:A Interpretação Genética da Variabilidade Humana. Sociedade Brasileira de Genética-SBG, Ribeirão Preto, pgs. 7 e 8 SP, 2008;
17. BENJAMIN A. KAMIEN, CARDAMONE M, et al.: A genetic diagnostic approach to infantile epileptic encephalopathies. *Jornal Clinical neurology*; 19(7):934-941, 2012;
18. BENNETT, WM, MUSGRAVE, JE, CAMPBELL, RA et al.: The nephropathy of the nail-patella syndrome: clinicopathologic analysis of 11 kindreds. *Am. J Med.* 54: 304-19, 1973;
19. BERG AT, BERKOVIC SF, BRODIE MJ, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 51(4):676-85, 2010;
20. BIENVENU, T, POIRIER, K, FRIOCOURT, G., et al. ARX, a novel Prd-class-homeobox gene highly expressed in the telencephalon, is mutated in X-linked mental retardation. *Hum Mol Genet*, v. 11, n. 8, p. 981-991, 2002;
21. BLUME WT, LUDERS HO, MIZRAHI E et al.: ILAE Commission report . Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*, 42 (9): 12 12-8, 2001;
22. BOISON, D.: Cell and Gene Therapies for Refractory Epilepsy. *Current Neuropharmacology*, 5: 115-125, 2007;
23. BRICARELLI FD, CARBONE LDL, ARSLANIAN A.: Anomalie cromosomiche : diagnosi e prevenzione. Genova : [s.n.], c1989 (Monografia).
24. BRICARELLI FD: La diagnosi genetica: Primo risultato della ricerca. In: *Le Malattie Genetiche - Dalla Ricerca alla Cura.* a cura de Sergio Pistoì. Ed. Il sole 24 ore (Telethon), Milano-MI, cap 3 pp 19-25, 2008;
25. CAPOVILLA G, BERG AT, CROSS JH et al.: Conceptual dichotomies in classifying epilepsies: partial versus generalized and idiopathic versus symptomatic. *Epilepsia* 50:1645–1649, 2009;
26. CARMONA RH and. WATTENDORF DJ.: Personalizing Prevention: The U.S. Surgeon General’s Family History Initiative. *Am Fam Physician*; 71(1):36-39. 2005
27. CARVILL GL, REGAN BM, YENDLE SC, et al.: GRIN2A mutations cause epilepsy-aphasia spectrum disorders. *Nature genetics*; 45,1073–76, 2013;
28. CEN ZD, XIE F, LOU DN, et al.;; Fine mapping and whole-exome sequencing of a familial cortical myoclonic tremor with epilepsy family. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.*;168(7):595-9,2015;
29. CHARZEWSKA A1, NAWARA M, JAKUBIUK-TOMASZUK A et al.: Expanding the phenotype associated with missense mutations of the ARX gene. *Am J Med Genet.* 161A (7): 1813-6 (2013);
30. CHEN ZH, WANG C, WANG LG et al.: Analysis of the CHRNA7 gene mutation and polymorphism in Southern Han Chinese patients with nocturnal frontal epilepsy; 8(4):330-3, 2015;
31. CHINCHURE S, KESAVADAS C, THOMAS B.: Structural and functional neuroimaging in intractable epilepsy. *Neurol India*, 58(3):361-70, 2010;

32. CHUGH1 D, ALI I, BAKOCHI A et al.: Alterations in Brain Inflammation, Synaptic Proteins, and Adult Hippocampal Neurogenesis during Epileptogenesis in Mice Lacking Synapsin2. PLoS One.;10(7):e0132366, 2015;
33. COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia*, 22:489-501, 1981;
34. COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*, 30:389-99, 1989;
35. COTTEREILL, CP, JACOBS, P. Hereditary arthro-osteo-onychodysplasia associated with iliac horns. *Brit. J. Clin. Pract.* 15: 933-41, 1961;
36. Criteria and Nomenclature. American Neurological Association (2010). Artigo on line. DOI: 10.1002/ana.22124; em: online at wileyonlinelibrary.com
37. DAI AI, WASAY M.: Idiopathic epilepsy of childhood and potassium ion channels. *J Pak Med Assoc.*; 57(8):415-8, 2007;
38. De FALCO FA, MAJELLO L, SANTANGELO R, et al.: Familial Myoclonic Epilepsy: Clinical Features in a Large Kindred with Autosomal recessive Inheritance. *Epilepsia*, 42(12):1541-48, 2001.
39. DENNIS MY, NUTTLE X, SUDMANT PH, et al.: Evolution of human-specific neural SRGAP2 genes by incomplete segmental duplication. *Cell* 149: 912-922, 2012;
40. DEVINSKY O, SULLIVAN J, FRIEDMAN D, et al.: Efficacy and safety of epidiolex (cannabidiol) in children and young adults with treatment-resistant epilepsy: initial data from an expanded access program. American Epilepsy Society; Abstract. 3.303, 2014.
41. DHINDSA RS, GOLDSTEIN DB.: Genetic Discoveries Drive Molecular Analyses and Targeted Therapeutic Options in the Epilepsies. *Curr Neurol Neurosci Rep*; 15 (10): 70, 2015;
42. DIETEL M, JÖHRENS K, LAFFERT MV et al.: A 2015 update on predictive molecular pathology and its role in targeted cancer therapy: a review focussing on clinical relevance. *Cancer Gene Ther.*; 22(9):417-30, 2015;
43. DUARTE MH, LISON MP, FERRARI I et al.: Epilepsy in ring chromosome 14 syndrome;47(2):205-11, 1989;
44. EHERLE J.: A treatise on the practice of medicine. Act of Congress, v. II 2^a ed, pg 42. Princeton University Library, 1831, Philadelphia. Digitalizado por Google, disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=Hippocrates+Morbus+sacer&source>
45. ENDELE S, ROSENBERGER G, GEIDER K et al.: Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes. *Nature Genetics*; 42(11):1021-28, 2010;
46. ENDRIS, V., HACKMANN, K., NEUHANN, TM, et al.: Homozygous loss of CHRNA7 on chromosome 15q13.3 causes severe encephalopathy with seizures and hypotonia. *Am. J. Med. Genet.* 152A: 2908-2911, 2010;
47. ENGEL J JR. ILAE Commission Report. A proposed diagnostic schema for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on classification and Terminology. *Epilepsia*, 42 (6): 796-803, 2001;

48. ENGEL J JR. Report of the ILAE classification core group. *Epilepsia*.;47:1558-68, 2006
49. ENGEL J JR.: International League Against Epilepsy (ILAE). 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):796-803, 2001;
50. ERMEL LE, CARNEIRO LC, MOURA DE SOUZA CFM et al.: Epileptic encephalopathy and atypical Rett syndrome with mutations in CDKL5: clinical and molecular characterization of two Brazilian patients. *Arq Neuropsiquiatr*;71(6):414-15, 2013;
51. ESCAYG, A, MACDONALD, BT, MEISLER, MH, et al.: Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS p 2. *Nat. Genet.*, 24, 343-345, 2000;
52. EVERITT AD, SANDER JW. Classification of the epilepsies: time for a change? A critical review of the international Classification of the Epilepsies and Epileptic Syndromes (ICEES) and its usefulness in clinical practice and epidemiological studies of epilepsy. *Eur Neurol.*, 42 (1)1-10, 1999;
53. FAULKNER MA AND SINGH SP.: Neurogenetic Disorders and Treatment of Associated Seizures, *Pharmacotherapy*; 33(3):330-43, 2013;
54. FEHR S, BEBBINGTON A, NASSAR N, et al.: Trends in the diagnosis of Rett syndrome in Australia. *Pediatr. Res.* 70:313–319, 2011;
55. FISHER RS, VAN EMDE BOAS W, BLUME W et al.: Epileptic seizures and epilepsy. Definitions proposed by the International League against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 46:470–472, 2005
56. FISHER RS, VAN EMDE BOAS W, BLUME W, et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsy*, 46(4):470-2, 2005;
57. FISHER RS. ACEVEDO C, ARZIMANOGLU A et al.: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4):475–482, 2014;
58. FOUCAULT M.: Il potere psichiatrico corso al collège de France (1973-1974). Ed Giangiacomo Feltrinelli. Pg. 378-87. Milano, 2003;
59. FREITAG H, TUXHORN I. Cognitive function in preschool children after epilepsy surgery: rationale for early intervention. *Epilepsia* 46:561–567, 2005;
60. FRENCH J.: Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, 51(6):1069-1077, 2010;
61. GALANOPOULOU AS, BUCKMASTER PS., STALEY KJ et al.: Identification of new epilepsy treatments: Issues in preclinical methodology. *Epilepsia*, 53(3):571-582,2012;
62. GARG R, WILSON R, BARNES R, et al.: A gene for congenital generalized lipodystrophy maps to human chromosome 9q34 . *J. Clin. Endocr. Metab.* 84: 3390-94, 1999;
63. GESTINARI-DUARTE RS, SANTOS-REBOUÇAS CB, PIMENTEL MMG: Identificação da mutação c.428-451dup (24pb) no gene ARX em uma família brasileira com retardo mental ligado ao X. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*. V.4 n. 1 Dezembro, 2005. Disponível em: http://revista.hupe.uerj.br/detalhe_artigo.asp?id=266

64. GLAUSER T, BEN-MENACHEM E, BOURGEOIS B, et al. ILAE treatment guidelines: evidence-based analysis of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes. *Epilepsia*;47:1094-120,2006;
65. GOLD WA, CHRISTODOULO J.: The utility of next-generation sequencing in gene discovery for mutation-negative patients with Rett syndrome; *Frontiers in Cellular Neuroscience*; 9 (266): 1-6, 2015;
66. GOLDIN, LR, GERSHON, ES, LAKE, CR, et al.: Segregation and linkage studies of plasma dopamine-beta-hydroxylase (DBH), erythrocyte catechol-O-methyltransferase (COMT), and platelet monoamine oxidase (MAO): possible linkage between the ABO locus and a gene controlling DBH activity. *Am. J. Hum. Genet.* 34: 250-262, 1982;
67. GREENBERG DA, DELGADO-ESCUETA AV, WIDELITZ H et al.: Juvenile Myoclonic Epilepsy (JMA) may be linked to the BF and HLA loci on human chromosome 6. *American Journal of Medical Genetics.* 31:185-192, 1988;
68. GRONSKOV, K., HJALGRIM, H., NIELSEN, I. M., ET AL. Screening of the ARX gene in 682 retarded males. *Eur J Hum Genet*, v. 12, p. 701-705, 2004;
69. GUERRINI R, MARINI C, MANTEGAZZA M.: Genetic Epilepsy Syndromes Without Structural Brain Abnormalities: Clinical Features and Experimental Models. *Neurotherapeutics*; 11:269-85, 2014;
70. GUERRINI RE, FALCHI M.: Dravet syndrome and SCN1A gene mutation related-epilepsies: cognitive impairment and its determinants. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 53 (Suppl. 2): 11–15, 2011
71. GÜRSOY S, ERÇAL D.: Diagnostic Approach to Genetic Causes of Early-Onset Epileptic Encephalopathy. *J Child Neurol*, 2015
72. HEILSTEDT, HA, SHAHBAZIAN, MD, LEE, B. infantile ipotonia come presentazione della sindrome di Rett. *Am. J. Med. Genet.* 111: 238-242, 2002;
73. HERMANN BP, SEIDENBERG M, DOW C et al.: Cognitive prognosis in chronic temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 60:80–87, 2006;
74. HERON, S.E., CROSSLAND, K.M., ANDERMANN, E, et al.: Sodium-channel defects in benign familial neonatal-infantile seizures. *Lancet*, 360, 851-852, 2002;
75. HIROSE G :Ring (20) chromosome epileptic syndrome. *Brain Nerve*, 67(5):585-97, 2015;
76. HIROSE S.: Mutant GABA(A) receptor subunits in genetic (idiopathic) epilepsy. *Prog Brain Res.*; 213:55-85, 2014;
77. HIROSE S.: Mutant GABA(A) receptor subunits in genetic (idiopathic) epilepsy. *Prog Brain Res.*; 213:55-85, 2014;
78. HOFMEIJER, J, TJEPKEMA-CLOOSTERMANS MC, VAN PUTTEN, MJAM: Burst-suppression with Identical Bursts: a distinct EEG pattern with poor outcome in postanoxic coma". *Clinical Neurophysiology*; 125 (5): 947-54, 2013;
79. ILAE: The History and Stigma of Epilepsy. *Epilepsia*, 44(Suppl. 6), 12-14, 2003;
80. ILAE-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;

81. INOUE Y, FUJIWARA T, MATSUDA K et al.: Ring chromosome 20 and nonconvulsive status epilepticus. *Brain*: 120 (Pt 6): 939-53, 1997;
82. JEFFERYS, JGR. Advances in understanding basic mechanisms of epilepsy and seizures. *Seizure*, London, n. 19, p. 638-646, 2010;
83. JIAO J, YUANYUAN Y, YIWU SHI et al.: Modeling Dravet syndrome using induced pluripotent stem cells (iPSCs) and directly converted neurons. *Human Molecular Genetics*, 22 (12): 4241-52, 2013;
84. JILEK- AALL, L.: Morbus Sacer in Africa: Some Religious Aspects of Epilepsy in Traditional Cultures. *Epilepsia*; 40(3):382-86, 1999;
85. JOHNSON, M.R.; ROBINSON, R.A; GARDINER, R.M. Molecular genetics of the epilepsies. Oxford: International League Against Epilepsy's 13th epilepsy teaching weekend, 2011. Disponível em: <<http://www.epilepsysociety.org.uk>>. Acesso em: 15 ago. 2012;
86. JOLY G, LAPIERRE JM, OZILOU C. et al., Comparative genomic hybridisation in mentally retarded patients with dysmorphic features and a normal karyotype. *Clin Genet*; 60 (3):212-9, 2001;
87. KATZOS G, TRIANTAFYLLOU P, GOMBAKIS N, SOFOCLEOUS C, et al.: Thelarche variant in a girl with Angelman syndrome; *Brain Dev.*; 26(5):339-412, 2004;
88. KLASSEN T, DAVIS C GOLDMAN A, et al.: Exome Sequencing of Ion Channel Genes Reveals Complex Profiles Confounding Personal Risk Assessment in Epilepsy. *Cell*, 145, 1036-48, 2011;
89. KOSSOFF EH, AL-MACKI N., CERVENKA MC et al.: What are the minimum requirements for ketogenic diet services in resource-limited regions? Recommendations from the International League Against Epilepsy Task Force for Dietary Therapy. *Epilepsia*, 56(9):1337–1342, 2015;
90. LEMKE JR, LAL, D REINTHALER EM, et al.: Mutations in GRIN2A cause idiopathic focal epilepsy with rolandic spikes. *Nature Genetics*; 45,1067–72, 2013;
91. LESCA G, DEPIENNE C: Epilepsy genetics: the ongoing revolution. *Rev Neurol*;171(6-7):539-57, 2015;
92. LESCA G, RUDOLF, G, BRUNEAU N,et al: Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes. *Nature Genetics*; 45, 1061–66, 2013;
93. LIN C, FRANCO B and ROSNER MR: CDKL5/Stk9 Kinase inactivation is associated with neuronal developmental disorders. *Human Molecular Genetics*; 14(24): 3775-3786, 2005;
94. LIPPE BM, SPARKES RS.: Ring 14 chromosome: association with seizures. *Am J Med Genet.*, 9(4):301-5, 1981;
95. LONG L, SONG Y, ZHANG L.: A case-control proton magnetic resonance spectroscopy study confirms cerebellar dysfunction in benign adult familial myoclonic epilepsy. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*; 11: 485–491, 2015;
96. LOSCHER W, POTSCHKA H.: Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci* 6:591–602, 2005;

97. LOSCHER W. Mechanisms of drug resistance in status epilepticus. *Epilepsia* 48(Suppl.8): 74-77, 2007;
98. LOUVEL J, GIGOUT S, ARMAND V et al.: Hypersynchronisation dans les dysplasies corticales focales. *Epilepsia*, ; 21 (1) : 63-70, 2009;
99. LUPSKI JR, STANKIEWICZ P.: Genomic Disorders: Molecular Mechanisms for Rearrangements and Conveyed Phenotypes. *PLoS Genet*, 1(6): 627-33, 2005;
100. MAJEWSKI J, SCHWARTZENTRUBER J, LALONDE E et al.: What can exome sequencing do for you? *J Med Genet.*; 48(9):580-9, 2011;
101. MALFAIT D, TUCHOLKA A, MENDIZABAL S, et al.: FMRI brain response during sentence reading comprehension in children with benign epilepsy with centro-temporal spikes. *Epilepsy Res*;15 (117):42-51, 2015;
102. MANFREDI, M. Epilessia: come un castigo degli dei divenne scienza (ovvero: la storia di una conquista scientific). *Forepontus*, n. 314, p. 1-64, May, 2012. Disponível em: <<http://www.forep.it/galleria/>>. Acesso em: 12 ago. 2012;
103. MARTIN MS, TANG B, PAPALE LA, et al.: The voltage-gated sodium channel *Scn8a* is a genetic modifier of severe myoclonic epilepsy of infancy. *Human Molecular Genetics*; 16(23): 2892-99, 2007;
104. MASTRANGELO M, LEUZZI V.: Genes of Early-Onset Epileptic Encephalopathies: From Genotype to Phenotype. *Pediatric Neurology*, 46: 24-31, 2012;
105. MASTRANGELO M, CELATO A, LEUZZI V.: A diagnostic algorithm for the evaluation of early onset genetic-metabolic epileptic encephalopathies. *Journal of the European Paediatric Neurology Societ*; 16(2):179-91, 2011;
106. MASTRANGELO M: Novel Genes of Early-Onset Epileptic Encephalopathies: From Genotype to Phenotypes. *Pediatrneurol*; 53(2):119-29, 2015;
107. MAZAKI-MIYAZAKI, E, NAGAFUJI, H, NODA, M, et al.: A missense mutation of the *Na_v* channel alpha II subunit gene *Na(v)1.2* in a patient with febrile and afebrile seizures causes channel dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 98, 6384-6389, 2001;
108. MCDONELL LM, CHARDON JW, SCHWARTZENTRUBER J, et al.: The utility of exome sequencing for genetic diagnosis in a familial microcephaly epilepsy syndrome. *BMC Neurology*, 14:(22):1-6, 2014;
109. MILLER D, ADAM MP, ARADHYA S et al.: Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. *The American Journal of Human Genetics*; 86, 749-764, 2010;
110. MINASSIAN BA, SAINZ J, DELGADO-ESCUETA AV.: Genetics of myoclonic and myoclonus epilepsies. *Clin Neurosci* 3:223-35, 1995;
111. MOLINARI F, RAAS-ROTHSCHILD A, RIO M, FIERMONT G, et al.: Impaired mitochondrial glutamate transport in autosomal recessive neonatal myoclonic epilepsy. *Am. J. Hum. Genet.* 76: 334-339, 2005;

- 112.MOLINARI F. Mitochondria and neonatal epileptic encephalopathies with suppression burst. *J Bioenerg Biomembr*; 42:467-71, 2010;
- 113.MØLLER RS, DAHL HA, HELBIG I.: The contribution of next generation sequencing to epilepsy genetics. *Expert Rev Mol Diagn.*, 13:1-8, 2015;
- 114.MONTINI E, ANDOLFI G, CARUSO A et al.: IDENTIFICATION AND Characterization of a Novel Serine-Threonine Kinase Gene from the Xp22 Region. *Genomica*; 51 (3):427-433,1998;
- 115.MOOG U, SMEETS EEJ, ROOZENDAAL KEP, et al.: Neurodevelopmental disorders in males related to the gene causing Rett syndrome in females (MECP2); *European J of pediatric neurology*; 7 (1): 5-12, 2002;
- 116.MOOG U, SMEETS EEJ, ROOZENDAAL KEP, et al.: Neurodevelopmental disorders in males related to the gene causing Rett syndrome in females (MECP2); *European J of pediatric neurology*; 7 (1): 5-12, 2002;
- 117.MURPHY DB, WIESE S, BURFEIND P, et al.: Human brain factor 1, a new member of the fork head gene family. *Genomics* 21: 551-557, 1994;
- 118.NAKAMURA M.: Clinicoelectroencephalographic concordance between monozygotic twins with severe myoclonic epilepsy in infancy. *Epilepsia*, 31:281-86,1990;
- 119.NAKASHIBA T, IKEDA T, NISHIMURA S, et al.: Netrin-G1: a novel glycosyl phosphatidylinositol-linked mammalian netrin that is functionally divergent from classical netrins. *J Neurosci* 2000 1 settembre; 20 (17): 6540-50.
- 120.NEUL JL, KAUFMANN WE, GLAZE DG et al.: Rett Syndrome: Revised Diagnostic
- 121.NG PC , KIRKNESS EF.: Whole Genome Sequencing. *Methods Mol Biol*, 628:215-26, 2010
- 122.NICITA F, DE LISO P, DANTI FR: The genetics of monogenic idiopathic epilepsies and epileptic encephalopathies. *Seizure*; 21: 3-11, 2012;
- 123.NIETO-BARRERA. Reflections on international classification of epilepsies and epileptic syndromes and proposed diagnostic scheme ILAE task force. *Rev Neurol.*, 34(6):537-43, 2002
- 124.NUSSBAUM, ROBERT L.; MCINNES, RODERICK R.; WILLARD, HUNTINGTON F. (2008) Thompson & Thompson – *Genética Médica*. Setima Edição. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, cap. 3; pp 13-27.
- 125.OHTAHARA S, YAMATOJI Y. Ohtahara syndrome: with special reference to its developmental aspects for differentiating from early myoclonic encephalopathy. *Epilepsy Res.*, 70(Suppl. 1):S58e67, 2006;
- 126.OLSON HE, PODURI A, PEAR PL.: Genetic Forms of Epilepsies and Other Paroxysmal Disorders. *Semin Neurol*; 34 (03): 266-279, 2014;
- 127.OTSUKA M, OGUNI H, LIANG JS, et al.: STXBP1 mutations cause not only Ohtahara syndrome but also West syndrome: Results of Japanese cohort study. *Epilepsia*; 51:2449-52, 2010;
- 128.OTTMAN R, HIROSE S, JAIN S et al.: Genetic testing in the epilepsies-Report of the ILAE Genetics Commission. *Epilepsia*, 51(4):655-70, 2010;

- 129.PANTALEÓN FG, JUVIER RT.: Molecular basis of Rett syndrome: A current look; *Rev Chil Pediatr.*;86(3):142-51, 2015.
- 130.PAVONE P, SPALICE A, POLIZZI A et al.: Ohtahara syndrome with emphasis on recent genetic discovery. *Brain Dev.*, 34:459-68, 2012;
- 131.PAYNE NE, CROSS JH, SANDER JW, et al.: The ketogenic and related diets in adolescents and adults – a review. *Epilepsia*;52:1941-1948, 2011;
- 132.PERUCCA E, FRENCH J, BIALER M.: Development of new antiepileptic drugs: challenges, incentives, and recent advances. *Lancet Neurol* 6:793–804, 2007;
- 133.PERUCCA E.: When clinical trials make history: demonstrating efficacy of new antiepileptic drugs as monotherapy. *Epilepsia* 51:1933–1935, 2010;
- 134.PESÁNTEZ-RÍOS G, MARTÍNEZ-BERMEJO A, ARCAS J, et al.: The atypical developments of rolandic epilepsy are predictable complications. *Rev Neurol.*; 61(3):106-13, 2015;
- 135.PESÁNTEZ-RÍOS G, MARTÍNEZ-BERMEJO A, ARCAS J, et al.: The atypical developments of rolandic epilepsy are predictable complications. *Rev Neurol.*; 61(3):106-13, 2015;
- 136.PHILLIPS HA, SCHEFFER IE, BERKOVIC SF et al.: Localization of a gene for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy to chromosome 20q13.2. *Nature Genetics*, 10: 117-118, 1995;
- 137.PLASTER NM, UYAMA E, UCHINO M, et al.: Genetic localization of the familial adult myoclonic epilepsy (FAME) gene to chromosome 8q24. *Neurology*, 53:1180-1183,1999;
- 138.PODURI A, HEINZEN EL, CHITSAZZADEH, V, et al.: SLC25A22 is a novel gene for migrating partial seizures in infancy. *Ann. Neurol.* 74: 873-882, 2013.
- 139.RASPALL-CHAURE M, BRIAN G NEVILLE and SCOTT RC.: The medical management of the epilepsies in children: conceptual and practical considerations. *Lancet neurol*;7:57-69, 2008;
- 140.REAM MA and MIKATI MA: Clinical utility of genetic testing in pediatric drug-resistant epilepsy: A pilot study. *Epilepsy Behav.*; 37:241-8 ,2014;
- 141.REAM MA, PATEL AD.: Obtaining genetic testing in pediatric epilepsy. *Epilepsia*; 56(10):1505-14, 2015;
- 142.REUTLINGER C, HELBIG I, GAWELCZYK B, et al.: Deletions in 16p13 including GRIN2A in patients with intellectual disability, various dysmorphic features, and seizure disorders of the rolandic region. *Epilepsia*; 51(9):1870–73, 2010;
- 143.S.: The new ILAE classification. *Epilepsia*, 51(4):713-24, 2010;
- 144.SALEK-HADDADI A, MAYER T, HAMANDI K et al.: Imaging seizure activity: A combined EEG/EMG-fMRI study in reading epilepsy. *Epilepsia* 50:256–264, 2009;
- 145.SANDER JW, SHORVON SD. :Epidemiology of the epilepsies. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 61, 433-43, 1996.
- 146.SANDER, J W, HART YM, JOHNSON, AL., SHORVON SD: National General Practice Study of Epilepsy: newly diagnosed epileptic seizures in a general population. *Lancet*, 336, 1267-1271 1990;

- 147.SANDER, JW, SHORVON, SD.:Epidemiology of the epilepsies. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 61, 433-443, 1996.
- 148.SARAPPA, A. Epilessia storia clinica e laboratorio. *Revista online*, Anno VIII, nº 270, setembro, 2010. Em <http://www.napoli.com/indicecat>. (acessado em 20.09.2012);
- 149.SAURO KM, WIEBE S, PERUCCA E et al.: Developing clinical practice guidelines for epilepsy: A report from the ILAE Epilepsy Guidelines Working Group.
- 150.SCHEFFER IE, BHATIA KP, LOPES-CENDES IO et al.: Autosomal dominant frontal epilepsy misdiagnosed as sleep disorder. *Lancet*. 343 (8896): 515-7, 1994;
- 151.SCOTT A.: The medical management of the epilepsies in children: conceptual and practical considerations. *Lancet neurol* 2008;7:57-69.
- 152.SHIMOJIMA K., SUGAWARA M, SHICHIJI M, et al.: Loss-of-function mutation of collybistin is responsible for X-linked mental retardation associated with epilepsy. *J. Hum. Genet.* 56: 561-565, 2011.
- 153.SHINNAR S. The new ILAE classification. *Epilepsia*.2010;51(4):713-24.
- 154.SINIATCHKIN M, COROPCEANU D, MOELLER F et al.: EEG-fMRI reveals activation of brainstem and thalamus in patients with Lennox-Gastaut syndrome. *Epilepsia* 52:766-774, 2011;
- 155.SMITH AB, BAJOMO O, PAL DK.: A meta-analysis of literacy and language in children with rolandic epilepsy. *Dev Med Child Neurol.*; 57(11):1019-26, 2015;
- 156.SMITH AB, BAJOMO O, PAL DK.: A meta-analysis of literacy and language in children with rolandic epilepsy. *Dev Med Child Neurol.*; 57(11):1019-26, 2015;
- 157.SPECCHIO N, TRIVISANO M, SERINO D et al.: Epilepsy in ring 14 chromosome syndrome. *Epilepsy Behav.* 25(4):585-92, 2012;
- 158.STEINLEIN OK, MULLEY JC, PROPPING P et al.: Missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alfa 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nature Genetics*; 11:201-03, 1995;
- 159.STEINLEIN OK.: Gene defects in idiopathic epilepsy. *Rev Neurol.*, 155(6-7):450-3, 1999;
- 160.STROMME P, MANGELSDORF M, SHAW MA et al.: Mutations in the human ortholog of *Aristless* cause X-linked mental retardation and epilepsy. *Nature genetics* 30:441-5, 2002;
- 161.SZENTE MB, BODA B.: Cellular mechanisms of neocortical secondary epileptogenesis. *Brain*, 20;648(2):203-14, 1994;
- 162.TACIK P, GUTHRIE KJ, STRONGOSKY AJ, et al.: Whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a family with episodic ataxia type 1. *Mayo Clin Proc.*; 90(3):366-71, 2015;
- 163.TUNCER FN, GORMEZ Z, CALIK M et al.: A clinical variant in SCN1A inherited from a mosaic father cosegregates with a novel variant to cause Dravet syndrome in a consanguineous family. *Epilepsy Res.*113:5-10, 2015
- 164.TURNPENNY, P.D.; ELLARD, S. (2009) *Emery Genética Médica*. Décima terceira edição, Elsevier, Rio de Janeiro-RJ; cap 2 pp 12-20.

165. UYANILK G, AIGNER L, MARTIN P et al.: ARX mutation in X-linked lissencephaly with abnormal genitalia. *Neurology*; 61: 232-5, 2003;
166. VEERAMAH KR, JOHNSTONE L, KARAFET TM, et al.: Exome sequencing reveals new causal mutations in children with epileptic encephalopathies. *Epilepsia*; 54(7): 1270–81, 2013.
167. VIITMAA R, CIZINAUSKAS S, ORRO T, et al.: Phenotype, inheritance characteristics, and risk factors for idiopathic epilepsy in Finnish Spitz dogs. *J Am Vet Med Assoc*: 1;243(7):1001-9, 2013
168. WANG D, LI X, JIA S, et al.: Copy number variants associated with epilepsy from gene expression microarrays. *J Clin Neurosci*: S0967-5868(15):00320-3, 2015;
169. WANG D, LI X, JIA S, et al.: Copy number variants associated with epilepsy from gene expression microarrays. *J Clin Neurosci*: S0967-5868(15):00320-3, 2015;
170. WANG JH, LU W, WEN B.: Neuron-specific mechanisms for epilepsy self-termination. *Molecular & Cellular Epilepsy*, 2: e716; 1-7, 2015;
171. WHO- International Classification of Functioning and Disability. Beta-2 Draft, Full Version. Geneva: World Health Organization, July 1999.
172. XUE J, P QIAN, LI H, et al.: A cohort study of pyridoxine-dependent epilepsy and high prevalence of splice site IVS11+1G> A mutation in Chinese patients. *Epilepsia*;19;118:1-4, 2015;
173. ZARA F, GENNARO E, BRICARELLI FD et al.: Mapping of a Locus for a Familial Autosomal Recessive Idiopathic Myoclonic Epilepsy of Infancy to Chromosome 16p13. *Am. J. Hum. Genet.*; 66:1552–1557, 2000;
174. ZARA F, SPECCHIO N, STRIANO P, et al. Genetic testing in benign familial epilepsies of the first year of life: clinical and diagnostic significance. *Epilepsia*;54:425-3, 2013.
175. ZICKLER D, KLECKNER N.: DNA Recombination, Pairing, and Synapsis of Homologs during Meiosis *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7 (3):a016626, 2015
176. ZUPANC ML.: Clinical evaluation and diagnosis of severe epilepsy syndrome of early childhood. *J Child Neurol*; 24(Suppl.):6S14S, 2010;
177. ZWEIER M, GREGOR A, ZWEIER C., Engels, H., Sticht, H., Wohlleber, E., Bijlsma, E. K., Holder, S. E., Zenker, M., Rossier, E., Grasshoff, U., Johnson, D. S., Robertson, L., Firth, H. V., Kraus, C., Ekici, A. B., Reis, A., Rauch, A. Mutations in MEF2C from the 5q14.3q15 microdeletion syndrome region are a frequent cause of severe mental retardation and diminish MECP2 and CDKL5 expression. *Hum. Mutat.* 31: 722-733, 2010

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA
PACIENTE E/OU GENITORES/ TUTORES DE PACIENTES COM EPILEPSIA DO
AMBULATÓRIO MAGALHÃES NETO

A epilepsia é uma doença neurológica, caracterizada por episódios críticos de crises, às vezes com perda de consciência e convulsões, que se apresenta improvisamente e têm tendência a repetir-se.

Tais crises dependem de uma descarga excessiva, imprevista e rápida das células do sistema nervoso central, isto é, as células do cérebro. De acordo com as causas, as epilepsias podem ser divididas em dois grupos: quando os motivos que provocaram as crises não são aparentes, dizemos que se trata de epilepsias idiopáticas ou primárias; se forem identificadas as causas que geram as crises, se fala de epilepsias sintomáticas ou secundárias. De cem pessoas com qualquer tipo de epilepsia, cerca de 40 tem a forma idiopática, neste grupo os fatores genéticos são determinantes para a manifestação das crises. De fato, aproximadamente, 30% destes casos são de natureza hereditária, transmitidas através da família.

Os fatores genéticos estão relacionados com o DNA, seja ele na forma de gene ou como cromossomo. O DNA é o material que determina as nossas características, o nosso patrimônio genético. Funciona como uma “carteira de identidade biológica” onde pode ser lida as informações a respeito da nossa constituição, nossa origem materna e paterna, nossa raça e pode revelar se nós ou nossos familiares (mesmo aqueles mais distantes) temos ou podemos ter algum tipo de doença genética e/ou hereditária. Por este motivo, para saber o tipo de epilepsia idiopática que uma pessoa tem, muitas vezes, é necessário analisar o DNA e isso é feito através de exames de genética molecular.

A genética molecular tem a tarefa de estudar e localizar nos cromossomos, os genes responsáveis pelas mutações, nas diversas formas de epilepsias idiopáticas. Nos últimos anos têm sido identificadas mutações responsáveis por diversos tipos de epilepsias, assim como de outros fatores que cause predisposição hereditária a ela. Os resultados destas investigações vêm fazendo que as epilepsias sejam mais bem compreendidas e, a partir daí, diversas estratégias para diagnosticar, tratar e acompanhar pessoas com epilepsia vem sendo disponibilizado para os médicos.

Este projeto foi apresentado ao curso de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e tem a finalidade de estudar pacientes e familiares com epilepsias idiopáticas e Epilepsias Mioclônicas Progressivas, atendidos nos ambulatórios de epilepsia de crianças e adultos do Hospital Universitário Professor Edgar Santos, HUPES\UFBA, a fim de investigar as possíveis mutações genéticas que contribuem para manifestação das crises nesta população.

Como será feita a pesquisa? Se você concordar em participar, será aplicado, pelo seu médico (sob a supervisão da Prof^a Dr^a Marielza Fernandez Veiga), um protocolo contendo seus dados clínicos. Em seguida será feita, pela doutoranda Rita Maria Alves, responsável por esta pesquisa (sob a supervisão da Prof^a Dr^a Maria Betânia Pereira Toralles), o histórico de sua família, para construção da árvore genealógica, uma arrumação em forma de gráfico que mostra a conexão entre os seus familiares. Este histórico tem com o objetivo identificar outros membros da sua família que tenham ou tiveram epilepsia, assim como outros fatores que possam justificar o seu aparecimento.

Os resultados da investigação clínica e familiar irão indicar se será necessário ou não analisar o seu material genético (DNA). Caso os resultados clínicos indiquem que você tem epilepsia idiopática e o seu histórico familiar demonstrar que outras pessoas têm ou tiveram sintomas de epilepsia, você e seus familiares serão incluídos na próxima etapa da pesquisa que é a análise molecular.

Para a investigação molecular será necessário coletar uma quantidade de sangue (até 10ml), de onde será extraído o DNA. O material genético extraído será analisado pela doutoranda responsável pelo projeto, no laboratório de Neurogenética do Instituto Gaslini de Genova-Itália, sob a supervisão do Prof^o Dr^o Federico Zara e será utilizado só e exclusivamente com o objetivo de analisar os genes eventualmente responsáveis pela mutação que justificar o aparecimento da epilepsia.

Para alguns pacientes será importante fazer fotos com o propósito de auxiliar na formação dos profissionais de saúde e gestores de saúde pública, para que melhor compreendam e ajudem na identificação de outras pessoas. Portanto será pedindo permissão para fazer e utilizar as fotos. Podendo você aceitar ou não.

Os dados e registros feitos durante a entrevista serão discutidos com a equipe envolvida diretamente com esta pesquisa, mas não serão divulgados aos demais profissionais que

trabalham na instituição. Porém o relatório final, contendo citações anônimas, resultados encontrados, fotos (quando autorizada e devidamente tratadas a fim de evitar excesso de exposição) e outros dados que sejam relevantes, será utilizado para apresentações em encontros científicos, publicações em revistas especializadas e para servir de consulta para outros estudos.

O que será feito com todos os dados individuais e familiares, fotos e material biológico coletado quando a pesquisa terminar?

Seguindo as recomendações das Leis, diretrizes e normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, como a vigente, Resolução 466/12, inciso XI.2-f, todos os dados capazes de identificar os pacientes, serão mantidos em sigilo absoluto, durante a pesquisa, e após o término desta. Sendo assim, os protocolos contendo dados clínicos, dados familiares, resultados das análises genéticas, fotos e demais dados coletados nesta pesquisa, serão armazenados em arquivos físicos e/ou em forma digitalizada, sob a guarda e total responsabilidade do pesquisador responsável, por um período mínimo 5 anos.

De acordo com as recomendações da Resolução 466/12 inciso XI-C e visando proteger a identidade biológica dos participantes desta pesquisa, após a realização das análises, as amostras de DNA e os demais materiais biológicos ou derivados destes, serão misturando à detergente líquido, a fim de inviabilizá-los; acondicionados em recipiente adequado e descartados, observando os procedimentos de biossegurança.

Todos os dados, assim como o sangue e o DNA coletados, serão utilizados exclusivamente para os objetivos previstos neste estudo. Caso surja novas exigências, dentro desta mesma pesquisa o Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo-HUPES, responsável por avaliar este projeto, será informado e, se julgarem necessário, retornaremos o contato com todos os participantes do estudo para obter novas autorizações.

Quais são os benefícios deste estudo? Se você está sendo convidado para participar desta pesquisa é porque existem dúvidas quanto à origem (causa) da sua epilepsia ou os médicos querem saber exatamente qual o tipo de alteração genética você ou a pessoa que você representa tem. Por tanto, quando não for observada nenhuma relação da sua condição de saúde com os resultados na sua história clínica, no histórico da sua família ou no seu DNA, poderá não haver benefícios diretos ou imediatos. No entanto, indiretamente, todos serão beneficiados pela oportunidade de afastar a possibilidade de herança genética na condição de

saúde. Este fato ajudará os médicos a direcionar a pesquisa para outras áreas. Além disso, você terá a chance de entender melhor a história genética da sua família e, quem sabe, descobrir alguns hábitos de vida que podem ser importantes para o controle das crises, podendo ser estimulados pelos profissionais, para mudanças de hábitos.

Quando o resultado for positivo, os benefícios podem ser diretos e/ou indiretos para a pessoa, a família e a comunidade. Sem dúvida, saber o tipo de alteração genética que provoca a sua epilepsia ou se você e/ou sua família tem predisposição genética para desenvolver crises epiléticas, tem impacto na escolha do seu tratamento, a fim de melhorar a sua saúde e consequentemente, a sua condição de vida. Os médicos terão melhor entendimento das causas que está gerando as crises e isso interfere diretamente na escolha dos fármacos que você deve ser usado, assim como a influencias de outras substâncias que possam provocar e/ou agravarem as crises. Em alguns casos, o aconselhamento genético, pode informar a possibilidade de transmissão deste gene alterado para outros membros da sua família. Isso pode inferir diretamente na prevenção de novos casos na sua família e/ou no diagnóstico precoce de casos ainda não diagnosticados.

Quais são os malefícios ou prejuízo para as pessoas que aceitarem participar deste estudo? As práticas realizadas nesta pesquisa não colocam em risco a vida do paciente e nem provoca danos físicos. O único procedimento, minimamente invasivo, será a coleta de sangue. No entanto os procedimentos para coletar o sangue serão feitos por profissional competente e experiente, minimizando a possibilidade de possíveis hematomas e/ou eczemas cutâneos, que eventualmente acontece na punção venosa. Entretanto, quando se conhece a “identidade biológica” das pessoas alguns danos morais podem acontecer, por este motivo o material coletado e os demais dados que possam identificar as pessoas que farão parte desta pesquisa, serão protegidos seguindo as normas da Lei que regulamenta normas e diretrizes para realização de pesquisas em seres humanos como a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Esta resolução é fundamentada nos principais documentos internacionais que estabelecem diretrizes sobre pesquisa que envolve seres humanos. Nela estão contidos os quatro princípios básicos da bioética: autonomia, não maleficência, beneficência e justiça, visando assegurar os direitos e deveres que dizem respeito à comunidade científica, aos sujeitos da pesquisa e à coletividade.

Para que este projeto esteja sendo realizado ele foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (CEP-HUPES), localizado no

hospital das Clínicas, Rua Augusto Viana, s/n- Canela-Salvador Bahia. CEP: 40110-060 e julgado apito para ser executado. Caso você queira conferir a veracidade destes dados poderá pedir informação no seguinte contato: e-mail: cep.hupes@gmail.com; Tel: (71) 32838043.

Para garantir o cumprimento da lei a sua participação nesta pesquisa será completamente voluntária, não sendo oferecida nenhuma remuneração ou vantagens. O Senhor (a) terá autonomia para decidir se deve ou não aceitar ou continuar fazendo parte desta pesquisa.

Nenhuma identificação dos seus dados nem da sua família será possível por parte de terceiros. Os resultados das pesquisas efetuadas no seu DNA permanecerão em âmbito rigorosamente científico e, quando publicados em revistas científicas ou apresentados em congressos científicos, serão de modo que o sigilo da sua identidade e da identidade da sua família seja absolutamente garantido.

A propriedade dos dados e dos seus resultados pertence aos pesquisadores responsáveis e será conservado em local seguro pelo tempo de 5 anos, podendo o senhor (a) ter acesso a estes quando desejar. O acesso aos resultados desta pesquisa, por terceiros, mesmo que parente direto só será possível mediante autorização do interessado, expressa por escrito e legalmente reconhecida.

As coletas dos dados e materiais necessários para realização deste estudo serão feitos nos meses de Janeiro, Fevereiro e Março de 2014. Abaixo informações específicas sobre locais, dias e horas onde será realizada a pesquisa, assim como contato do pesquisador principal.

Pesquisador principal: Rita Maria Alves

Endereço Comercial: Instituto de Ciências da Saúde. Av. Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela – Salvador/BA – CEP 40.110-100. 4º andar, salas 400- Tel.: (71) 3283-8959/ (71) 92321989 (Tim)– E-mail: ritamaria.alves@gmail.com.

Locais de realização da pesquisa:

Coleta dos dados clínicos e familiar: Ambulatório Magalhães Neto, rua Padre Feijó s/n – Canela: Dias: as segundas-feiras: 1ª rampa, ambulatório de Epilepsia, das 13:00 às 18:00h e quartas-feiras ambulatório neuropediatria 3ª rampa das 13:00 às 18:00h.

Coleta de Sangue: De segunda à sexta-feira das 8:00h-16:00 (à combinar de acordo com a disponibilidade dos pacientes)- Laboratório de Imunologia e biologia molecular: Instituto de

Ciências da Saúde – Av. Reitor Miguel Calmon (Vale do Canela), s/n, Canela.

Caso necessário, e com o prévio consentimento do (da) Senhor (a), faremos visitas domiciliares a fim de investigar a história familiar e/ou realizar busca ativa de outros membros familiares que, por ventura, estejam impossibilitados de comparecer aos locais de coletas de dados.

Depois de ler e/ou ouvir a leitura deste termo de esclarecimento, O Senhor (a) está sendo convidado a participar desta pesquisa e poderá manifestar a sua disposição em forma pessoal ou como responsável legal pelo paciente, assinando a declaração de consentimento a seguir.

DECLARAÇÃO CONSENTIMENTO

Declaro que li, ouvi e/ou acompanhei a leitura do módulo informativo que esclarece sobre a pesquisa intitulada: “Investigação genética e molecular em pacientes com epilepsia idiopática familiar e Mioclônicas Progressivas: uma série de casos”, tendo como responsáveis a doutoranda Rita Maria Alves e a Prof^ª Dr^ª Maria Betânia Pereira Torales e como coresponsáveis a Profa Dr^ª Marielza Fernandes Veiga e o Profo Dro Federico Zara. Resalto que entendi que este projeto faz parte de uma pesquisa de doutorado e que tem início e fim, sendo que sou autônomo (a) para decidir, a qualquer momento, não mais fazer parte da pesquisa, comprometendo-me avisar aos responsáveis da mesma sob a minha decisão, a fim de não prejudicar o andamento do projeto.

Diante do exposto Eu decido que:

Quanto a utilização dos meus registros médico pelo pesquisador, autoridades regulatórias e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição.

Permito

Não permito

que seja efetuada a coleta de sangue e a utilização do meu DNA para os objetivos descritos no documento informativo;

Autorizo

Não autorizo

a comunicação aos meus familiares, que eventualmente possam interessar a alteração genética da qual sou acometido;

Permito

Não permito

que ao final da pesquisa o material biológico colhido possa ser conservado para eventuais pesquisas que possa interessar para compreensão ou aprofundamento dos conhecimentos sobre esta ou outras patologias genética, desde que a minha identidade não seja revelada.

Permito

Não permito

ser fotografado (a) para eventuais publicações em revistas científicas ou congressos, desde que estes resultados possa trazer respostas para o conhecimento científico e benefícios para as pessoas com problemas similares, ficando à critério dos pesquisadores responsáveis julgar a necessidade desta ação. Sou consciente que esta autorização implicara, mesmo que em parte, na minha identificação.

Assinatura _____ do
Paciente: _____

Assinatura _____ dos
Responsáveis: _____ e
_____.

No caso de tutor, registro da documentação que comprove a legalidade:

Nome Completo e assinatura do profissional responsável pela aplicação deste termo:

_____.

Local e data: _____, _____ de _____ de

FICHA CLÍNICA ENCEFALOPATIAS EPILEPTICAS

SEÇÃO 1

DADOS DO PACIENTE

NOME _____ SOBRENOME _____ MASCULINO FEMININO

DATA DE NASCIMENTO _____ LOCAL DE NASCIMENTO _____

FAMILIARIDADE PARA

PATOLOGIAS NEUROLÓGICAS NÃO SIM (anexar árvore genealógica) CONSANGUINIDADE NÃO SIM

DADOS ANAMINÉTICOS

GRAVIDEZ: decurso normal outro
especificar _____

PATOLOGIAS

PRENATAL: _____

FAMILIARIDADE PARA EPILEPSIA: NÃO SIM
ESPECIFICAR _____

FAMILIARIDADE PARA CONVULSÕES FEBRIS : NÃO SIM ESPECIFICAR

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

CRISES EPILÉPTICAS TIPO _____ IDADE DE INÍCIO _____ IDADE DE REMISSÃO _____
TIPO _____ IDADE DE INÍCIO _____ IDADE DE REMISSÃO _____
TIPO _____ IDADE DE INÍCIO _____ IDADE DE REMISSÃO _____
TIPO _____ IDADE DE INÍCIO _____ IDADE DE REMISSÃO _____

CONVULSÕES FEBRIS NÃO SIM

ESTADO DE MAL NÃO SIM febril generalizado focal

DESENVOLVIMENTO

parada ou regressão psicomotora

retardo psicomotor

moderado (QI 50-69) grave (QI <50)

retardo mental leve (QI 70-89)

ataxia

Especificar idade de início _____

OUTROS SINTOMAS

distúrbios do comportamento/hiperatividade

Especificar idade de início _____

circunferência craniana

normal < 2 DP >2DP

prejuízo na função verbal

Especificar _____

dimorfismos

Especificar _____

dimorfismos esqueléticos

Especificar _____

manifestações extrapiramidais

Especificar _____

envolvimento de outros órgãos

Especificar _____

sinais piramidais hipotonia

AVALIAÇÕES NEUROFISIOLÓGICAS E NEURORADIOLOGICAS

ATIVIDADE DE BASE normal alterado Especificar _____

EEG ANOMALIAS EPILEPTIFORMES SIM NÃO Especificar _____
 Resposta foto paroxística outros (sensibilidade, padrões, água) _____

RNM Idade de execução _____ normal alterado Especificar _____
Idade de execução _____ normal alterado Especificar _____

TESTES GENÉTICOS

NÃO normal alterado
ANÁLISE DE CARIÓTIPO Especificar _____

NÃO normal alterado Especificar _____
ARRAY-CGH

TESTES GENÉTICOS ESPECÍFICOS NÃO normal alterado Especificar gene (s) _____

SEÇÃO 2

INDICAÇÕES PARA A ANÁLISE	
<p>ENQUADRAMENTO (obrigatório, indicar uma única opção)</p> <p><input type="checkbox"/> Encefalopatia de início precoce</p>	<p>GENES CANDIDATOS (facultativo, indicar uma o mais opções dentro de uma categoria)</p> <p><input type="checkbox"/> ARHGEF9 <input type="checkbox"/> KCNQ2 <input type="checkbox"/> KCNT1 <input type="checkbox"/> PNKP <input type="checkbox"/> PLCB1 <input type="checkbox"/> SCN2A</p> <p><input type="checkbox"/> SCN8A <input type="checkbox"/> SLC2A1 <input type="checkbox"/> SLC25A22 <input type="checkbox"/> SPTAN1 <input type="checkbox"/> ST3GAL3 <input type="checkbox"/> STXBP1</p> <p><input type="checkbox"/> TBC1D24</p>

<input type="checkbox"/> Epilepsia pirodoxina-dependente	<input type="checkbox"/> ALDH7A1	<input type="checkbox"/> PNPO
<input type="checkbox"/> Spéctro Síndrome de Dravet	<input type="checkbox"/> SCN1A	<input type="checkbox"/> PCDH19 <input type="checkbox"/> STXBP1
<input type="checkbox"/> Espasmos infantis/Síndrome de West	<input type="checkbox"/> CDKL5	<input type="checkbox"/> KCNQ2 <input type="checkbox"/> SCN2A <input type="checkbox"/> SCN8A <input type="checkbox"/> SPTAN1 <input type="checkbox"/> STXBP1
	<input type="checkbox"/> ST3GAL3	
<input type="checkbox"/> Espasmos CSWS/Síndrome Landau Kleffner	<input type="checkbox"/> GRIN2A	

SEÇÃO 3

DATOS DO PROFISSIONAL QUE PREENCHEU A FICHA CLÍNICA

NOME E SOBRENOME

DEPARTAMENTO

INSTITUTO

TELEFONE

FAX

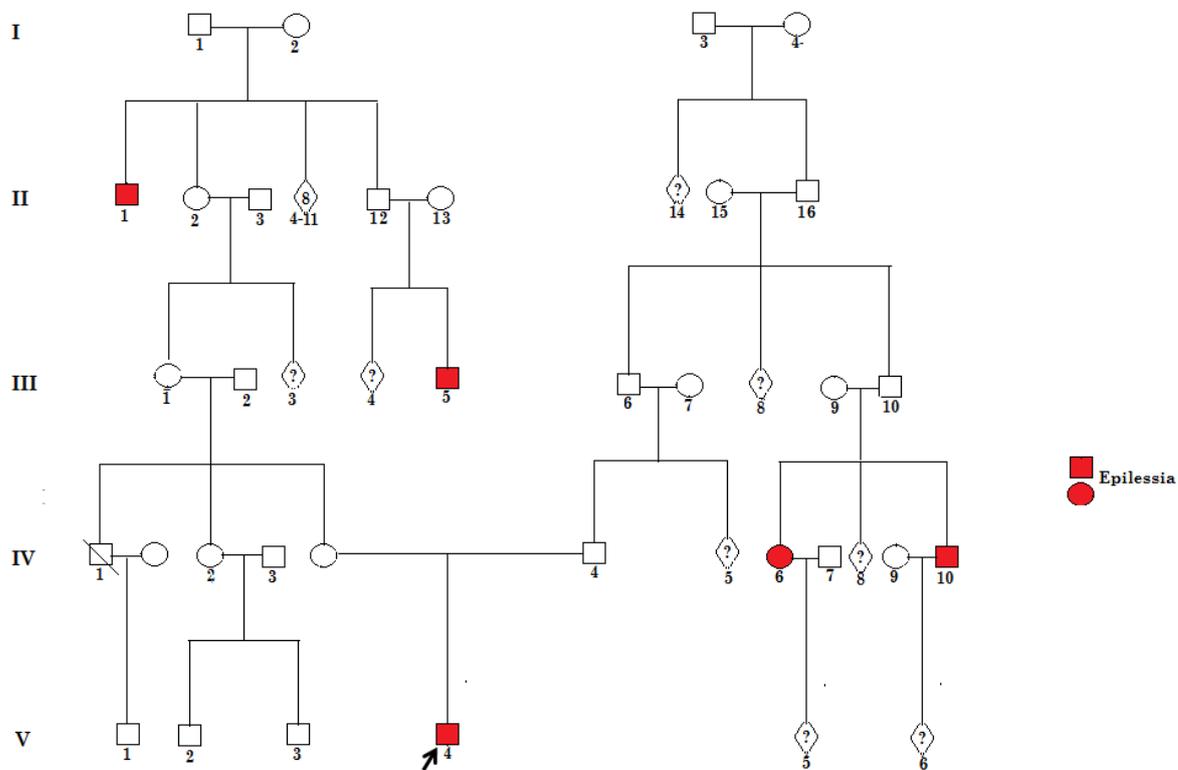
ENDEREÇO E-MAIL

LOCAL, DATA

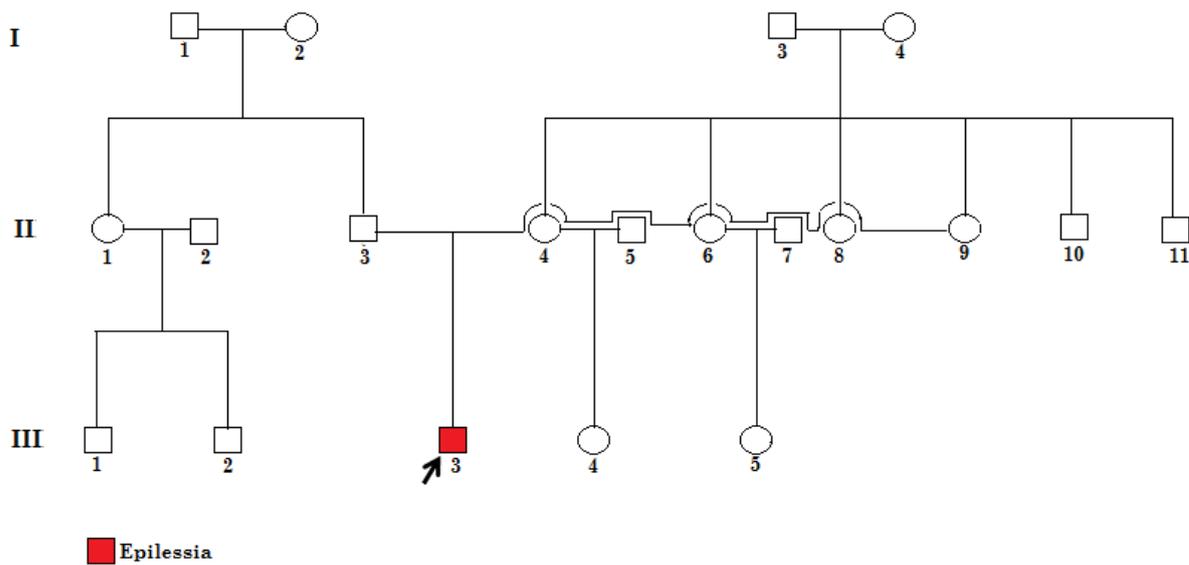
ASSINATURA

GENEALOGIAS DOS SUJEITOS DA PESQUISA

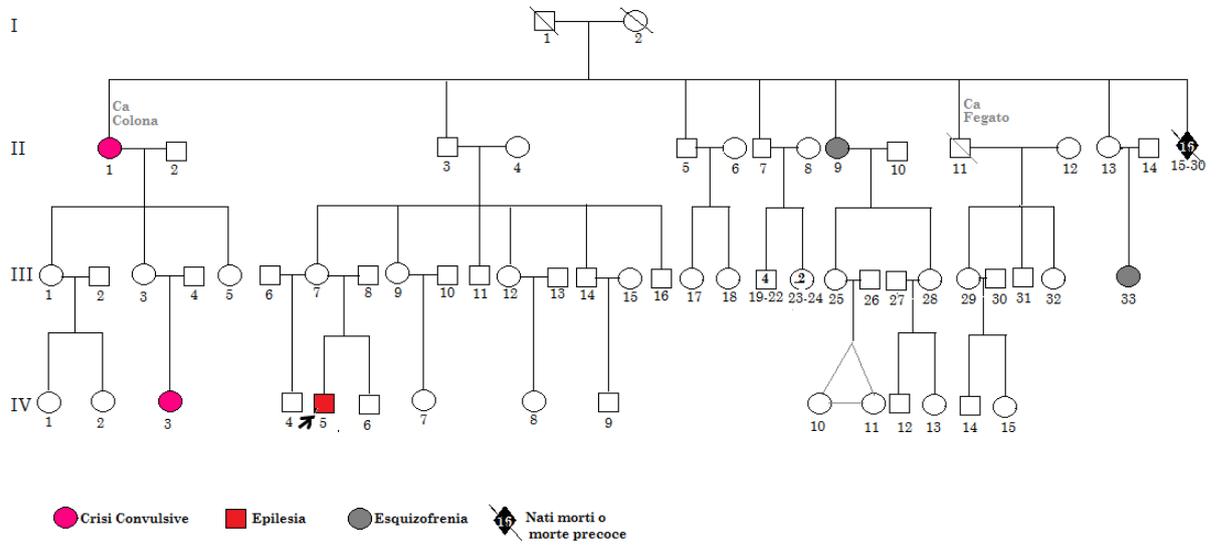
001-LCM



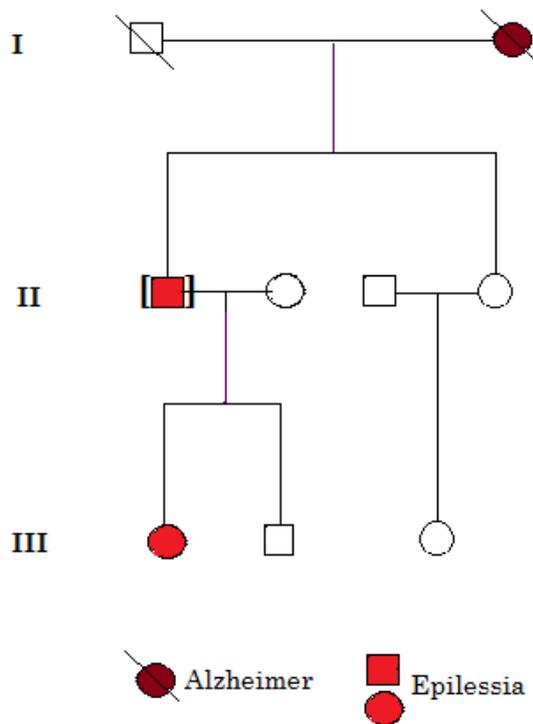
007-BG



028-DD

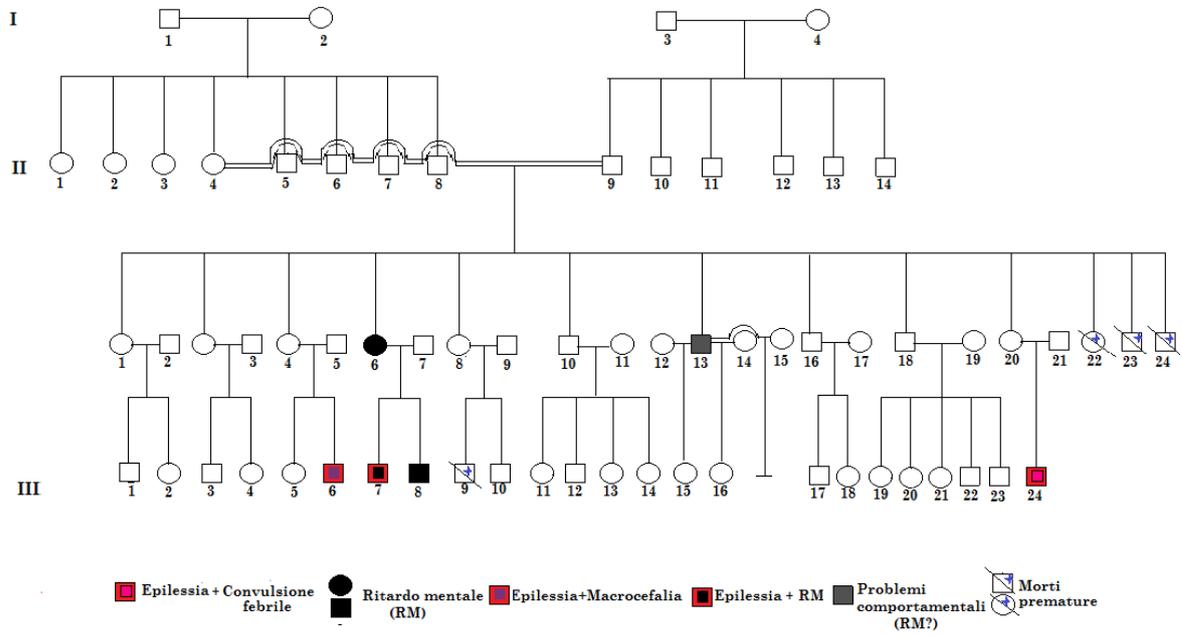


P7-FF

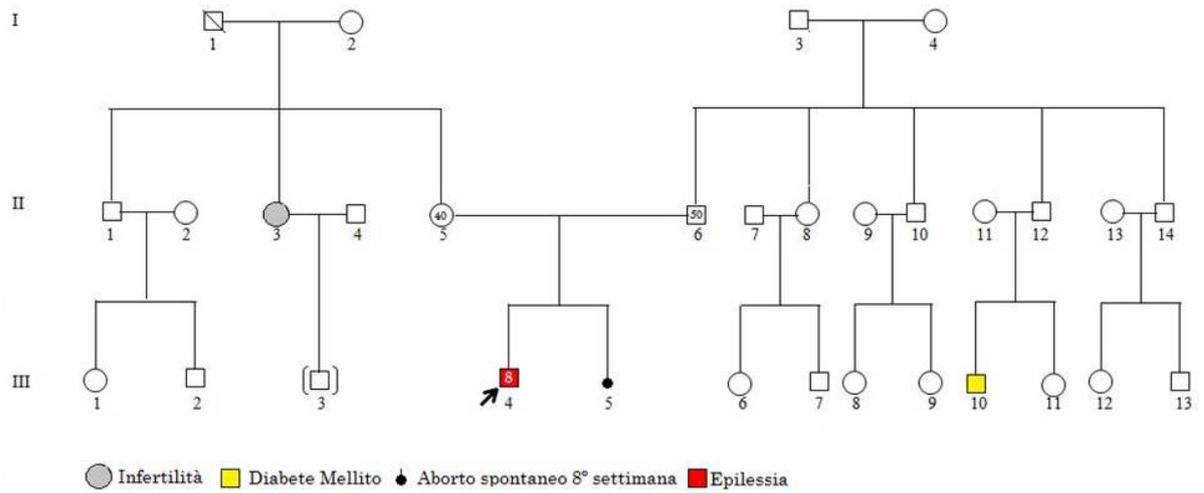


019-HÁ

Paziente 019

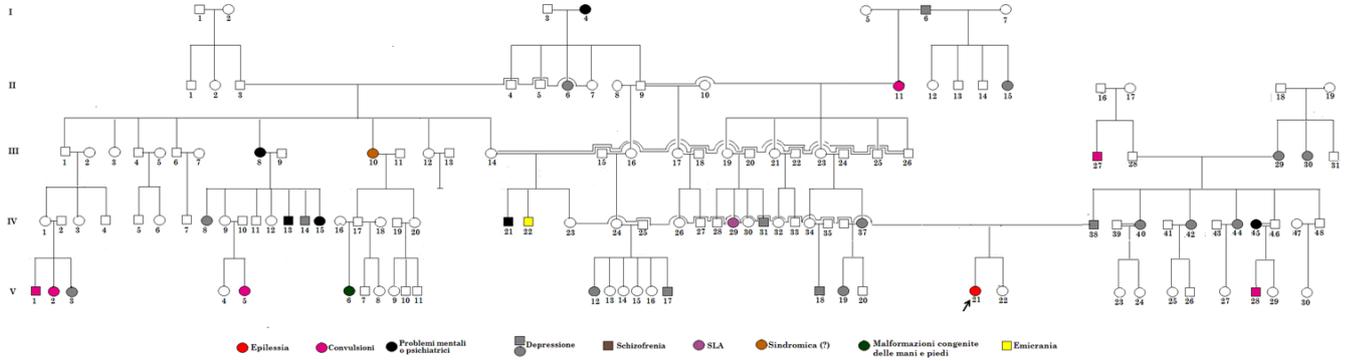


023-HG

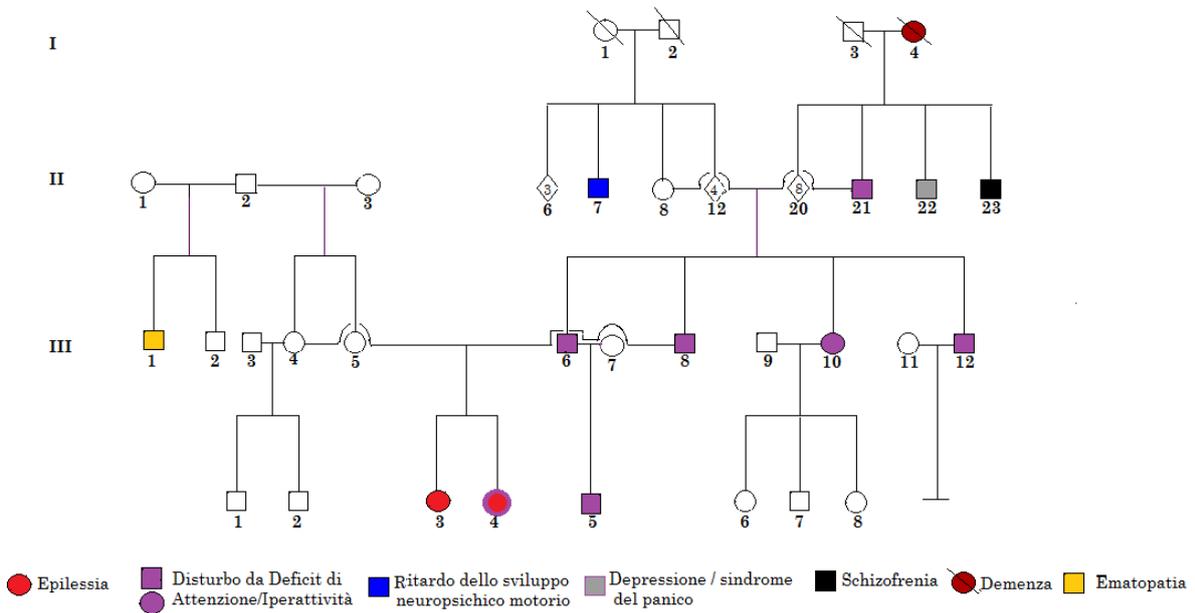


022-KO

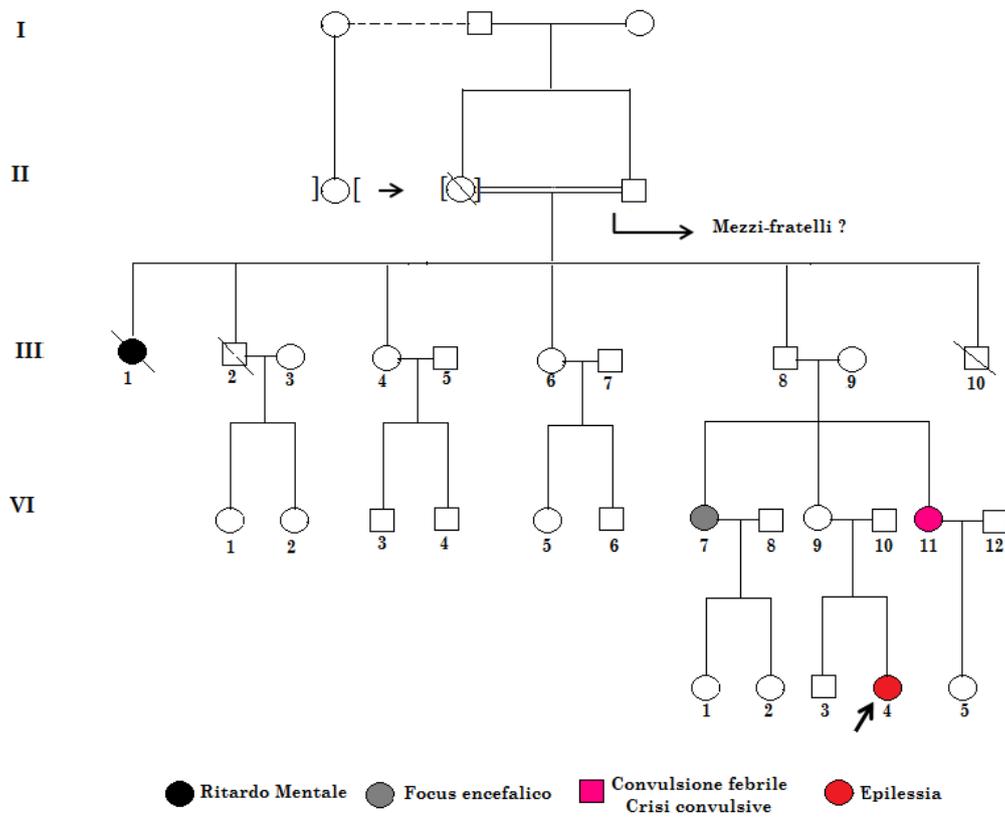
Paziente 022 (KOS)



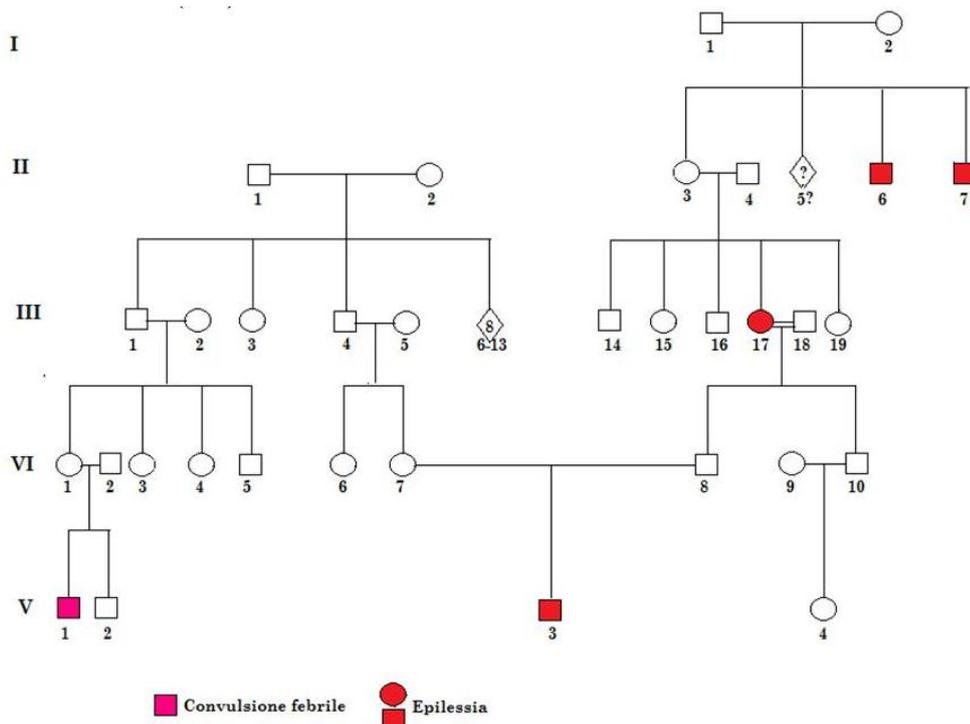
D1-LR



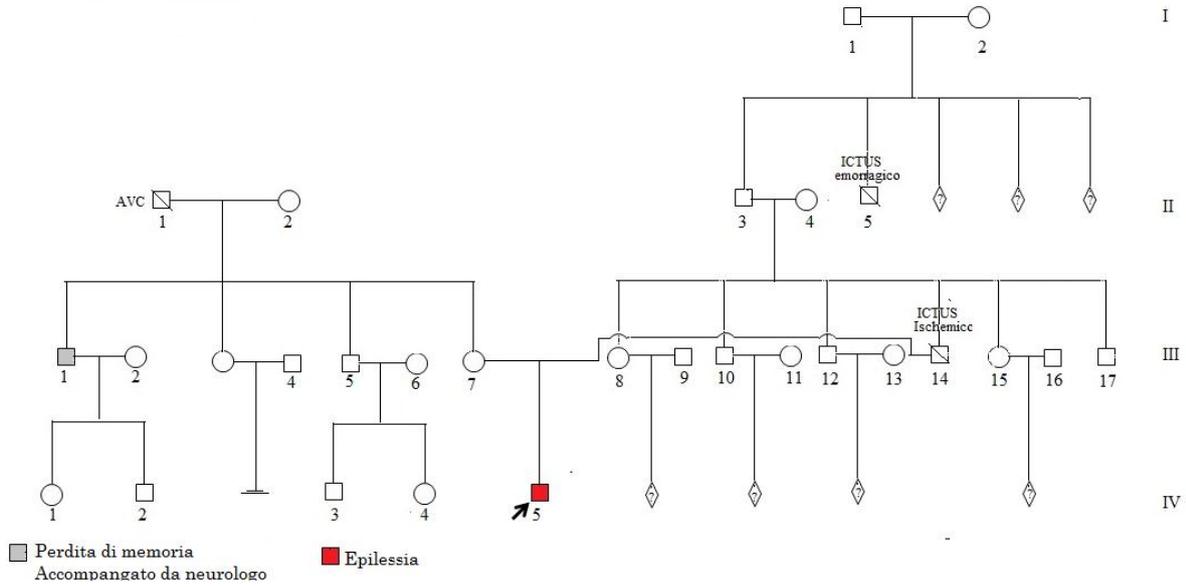
010-MC



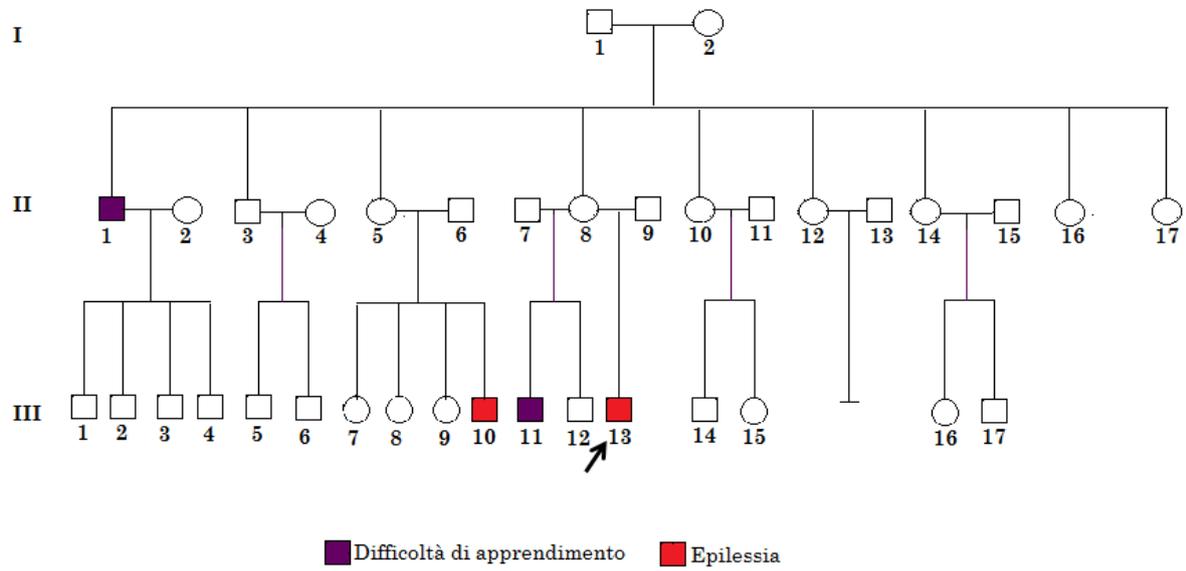
014-MD



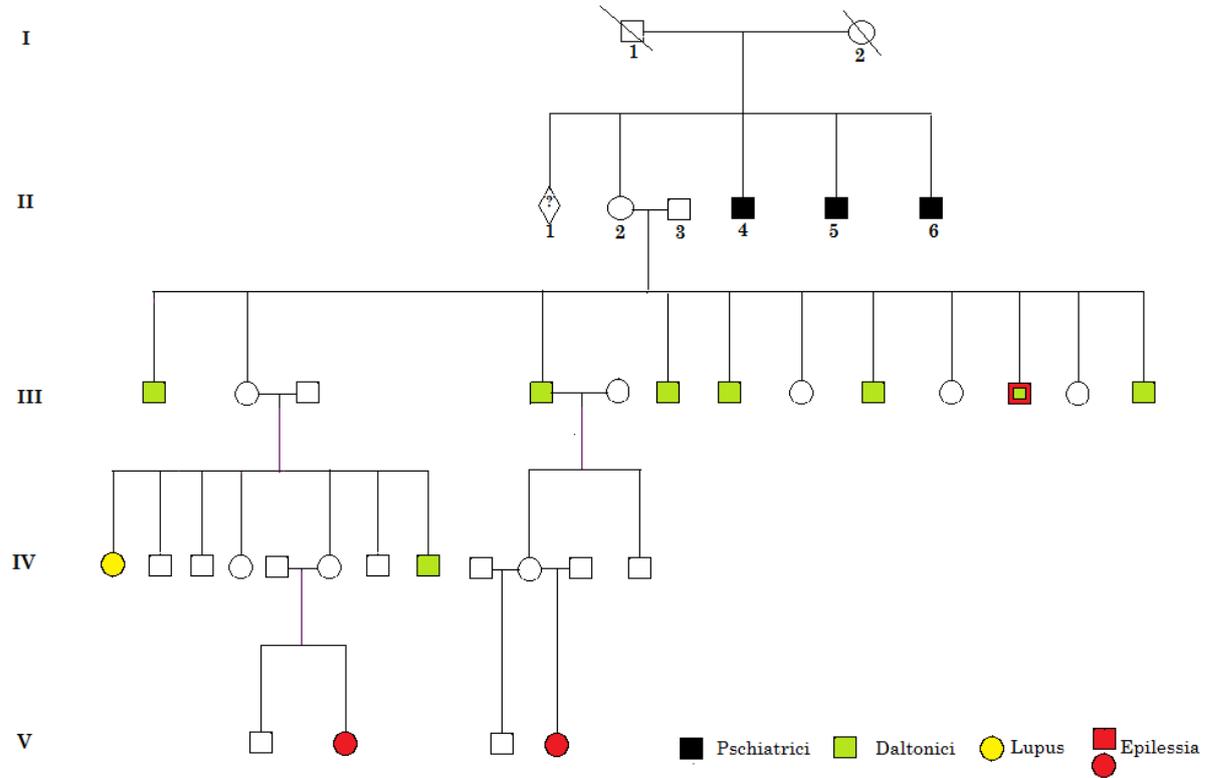
017-PB



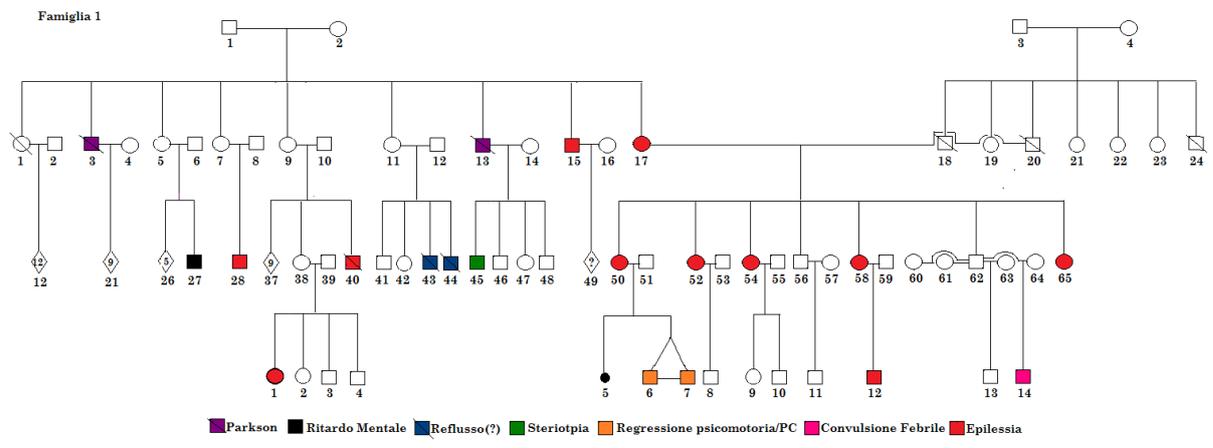
P1-RR



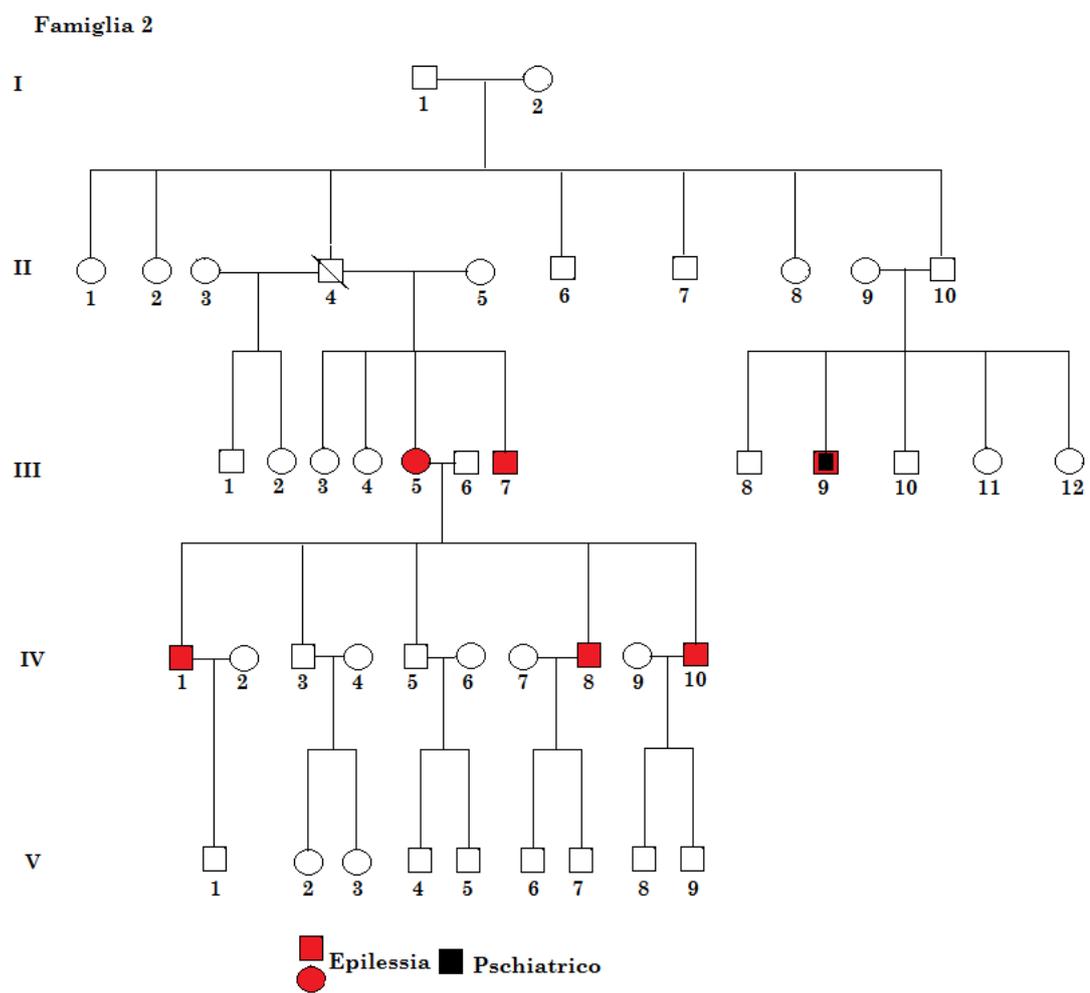
C-4-VM / C1-CM



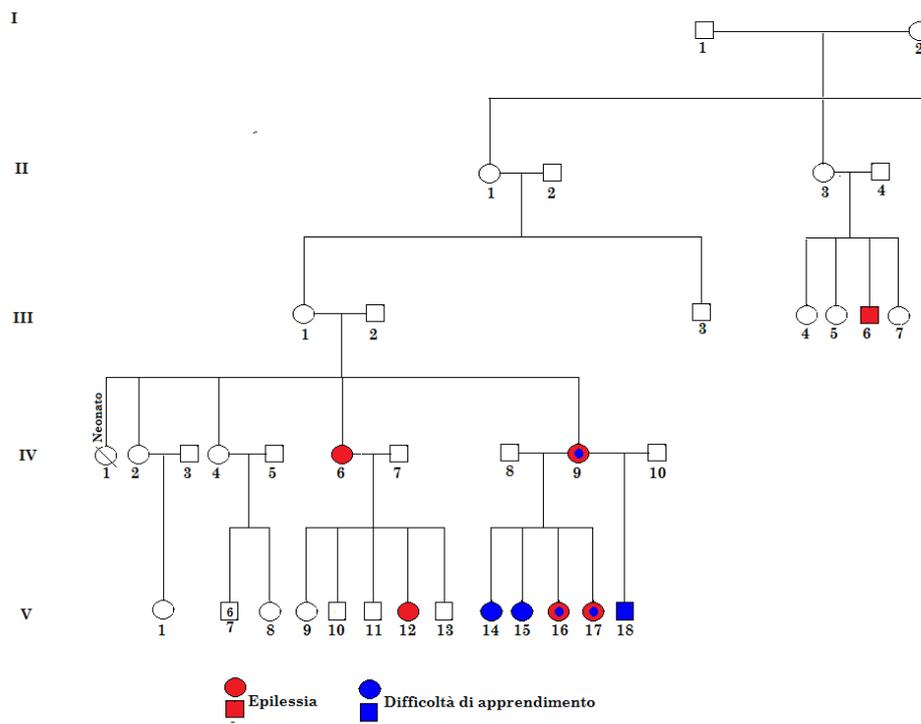
F1-



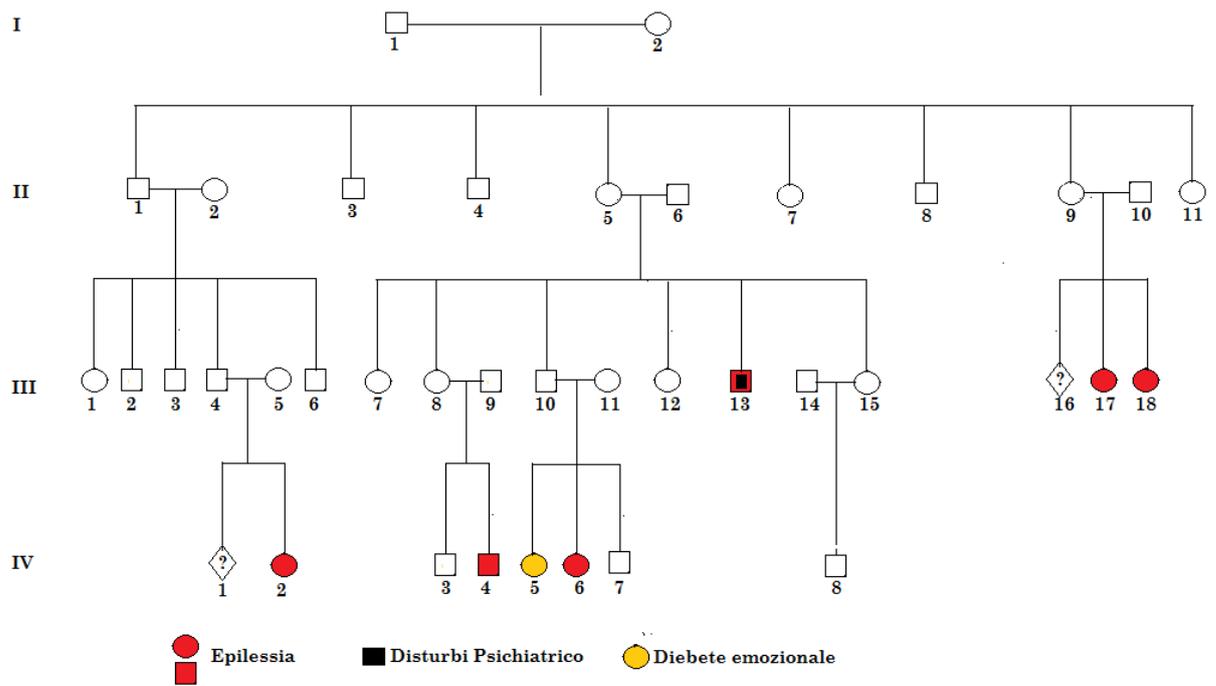
F2



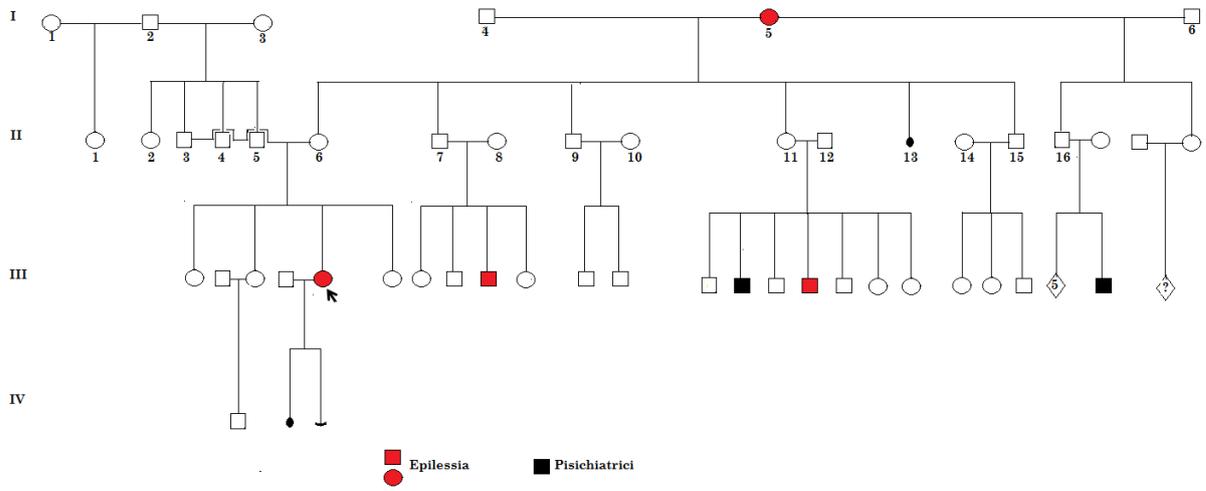
F3-



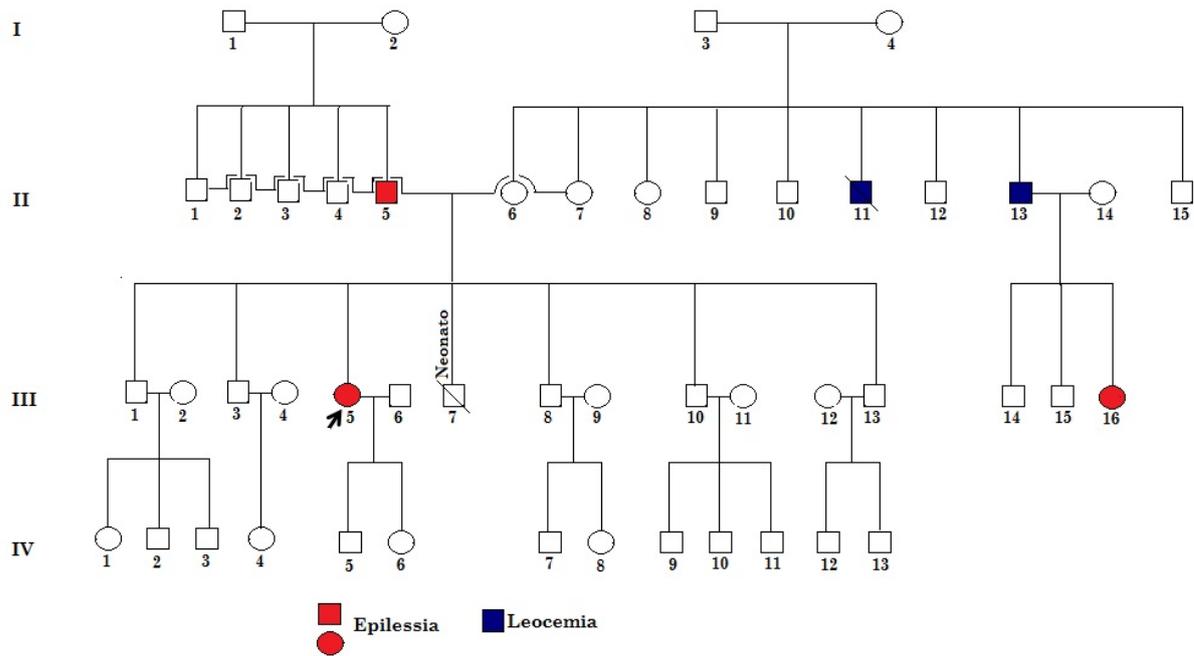
F4



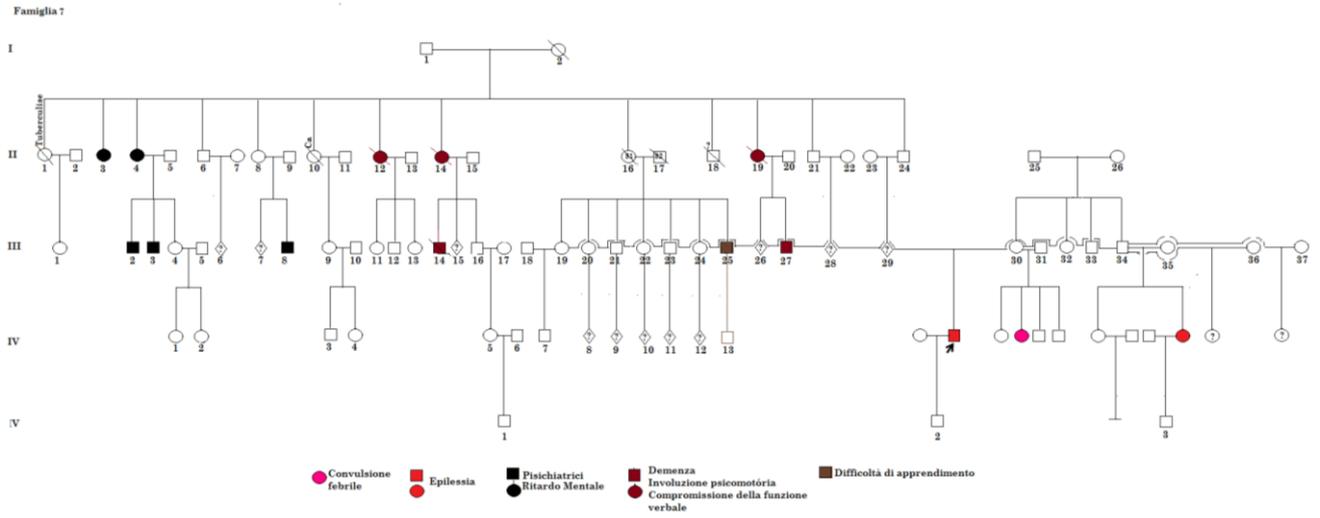
F5



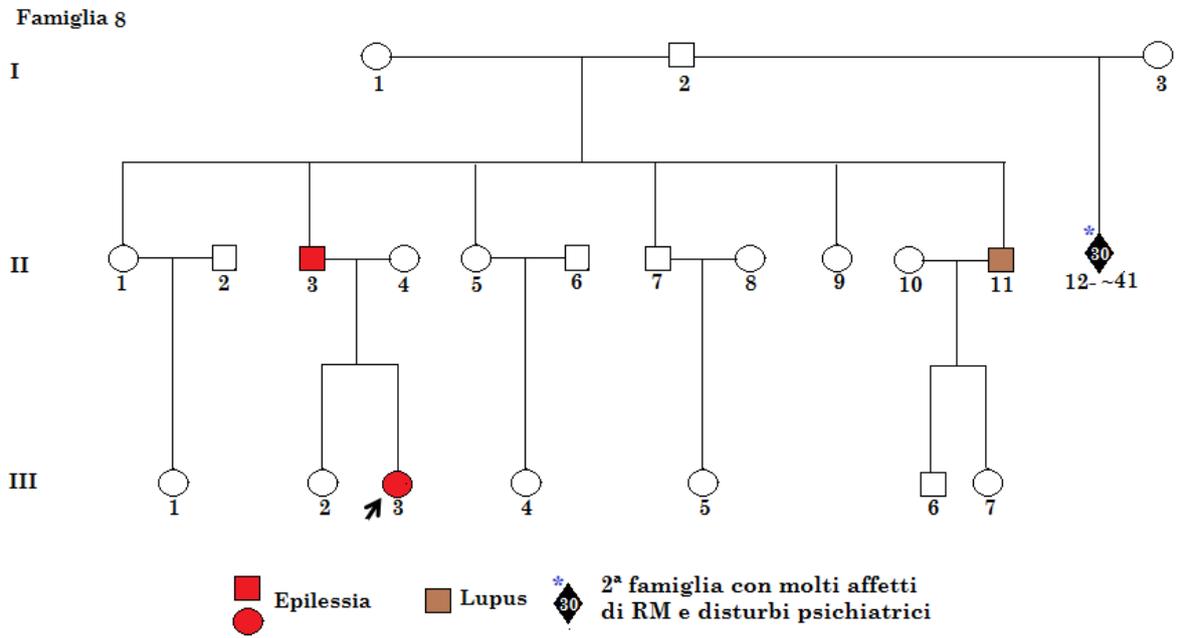
F6



F7

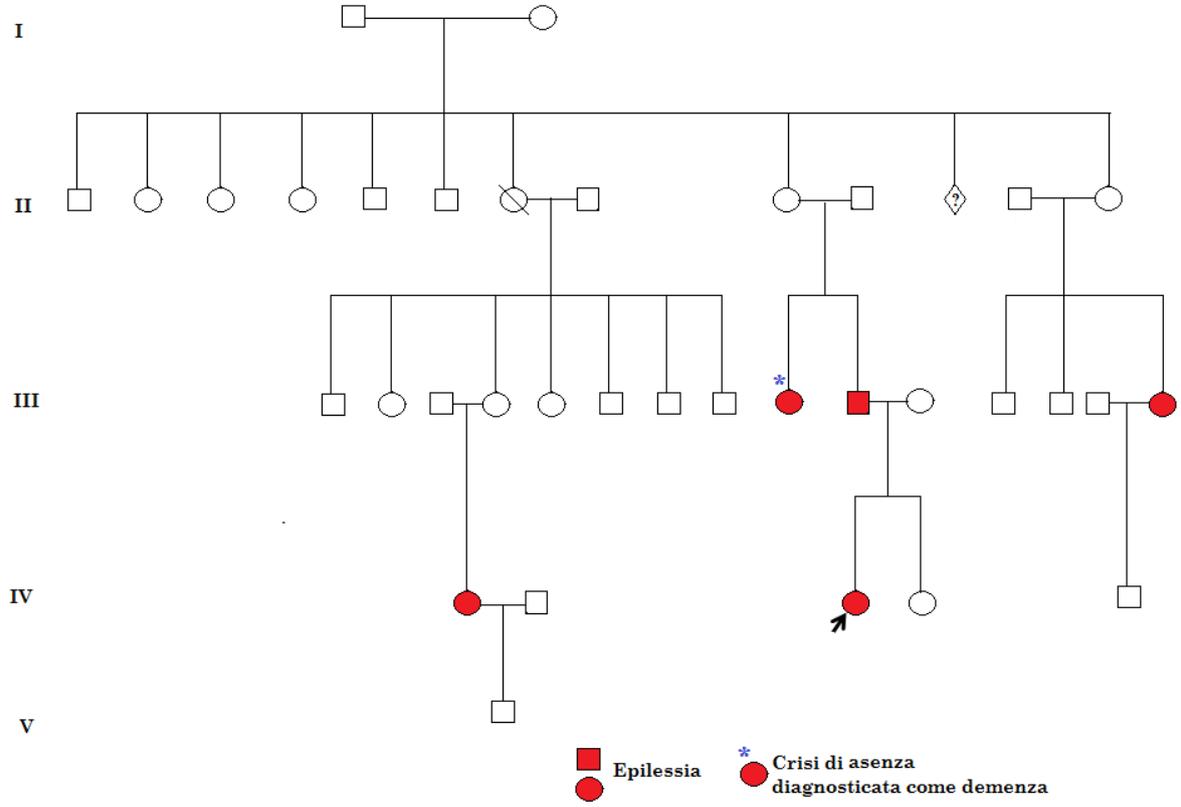


F8

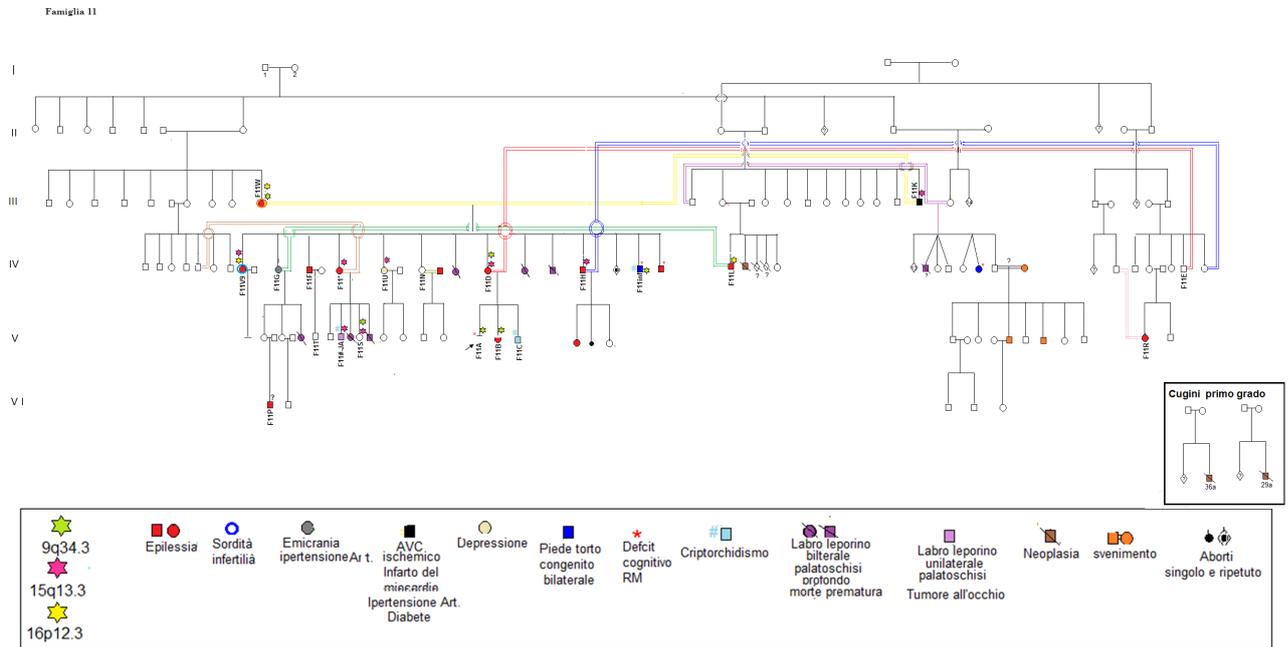


F10

Famiglia 10

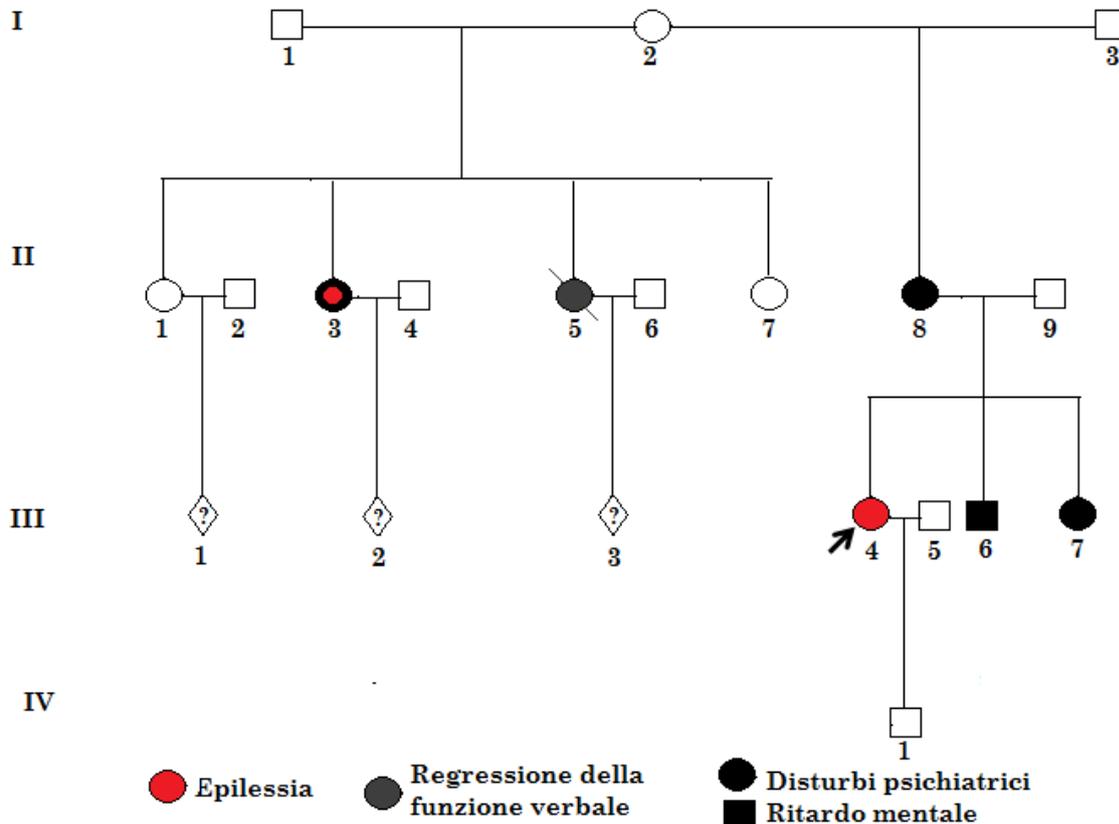


F11

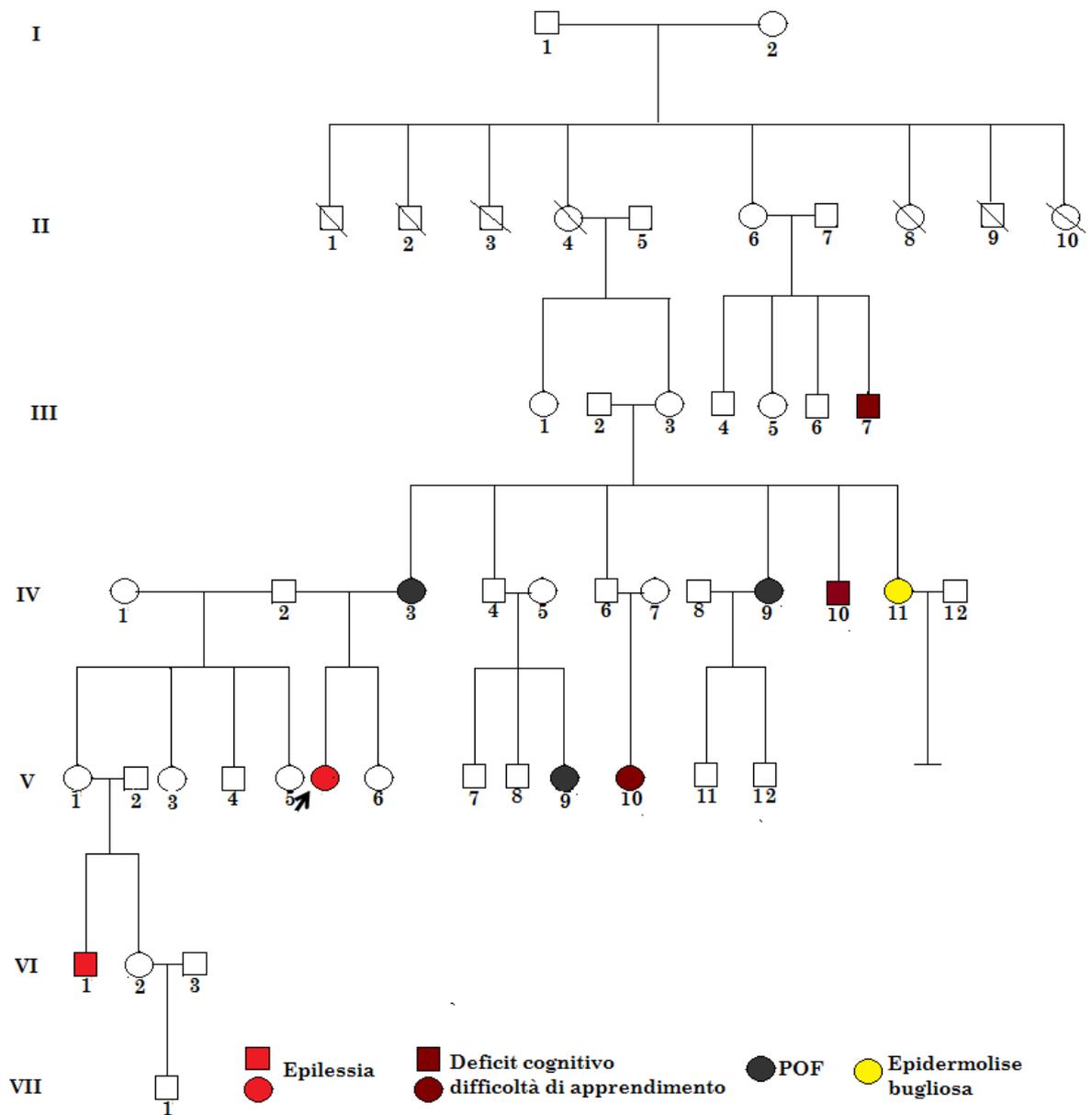


F12

Famiglia 12



F13



F14

