

CLÁUDIA VIANNA MAURER MORELLI

***IDENTIFICAÇÃO DO LOCUS RESPONSÁVEL PELA
EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL MESIAL FAMILIAR
ATRAVÉS DE ESTUDOS DE LIGAÇÃO GENÉTICA***

CAMPINAS

2006

CLÁUDIA VIANNA MAURER MORELLI

***IDENTIFICAÇÃO DO LOCUS RESPONSÁVEL PELA
EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL MESIAL FAMILIAR
ATRAVÉS DE ESTUDOS DE LIGAÇÃO GENÉTICA***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para Obtenção do título de Doutor em
Fisiopatologia Médica, Área de Concentração
Neurociência.*

ORIENTADORA: PROF. DRA. ISCIA LOPES CENDES

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO CENDES

CAMPINAS

2006

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP
	M815i
V	EX
TOMBO BC/	70337
PROC.	16.123-06
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	16/10/2006

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

010 ID:388722

M815i

Morelli, Cláudia Vianna Maurer

Identificação do locus responsável pela epilepsia de lobo temporal mesial familiar através de estudos de ligação genética. / Cláudia Vianna Maurer Morelli. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientadores : Iscia Lopes Cendes, Fernando Cendes

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Genotipagem. 2. DNA. 3. Hipocampo. 4. Canais de Sódio. 5. Sistema Nervoso Central. I. Cendes, Iscia Lopes. II. Cendes, Fernando. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em ingles: Identification of locus responsible for familial mesial temporal lobe epilepsy by linkage study

Keywords:

- Genotype
- DNA
- Hippocampus
- Sodium Channels
- Central Nervous System

Área de concentração: Neurociência

Titulação: Doutorado em Fisiopatologia Médica

Banca examinadora:

Profª.Drª. Iscia Lopes Cendes

Profª Drª Marília de Arruda Cardoso Smith

Profª Drª Maria de Fátima Sonati

Profº Drº João Pereira Leite

Profº Drº Li Li Min

Data da defesa: 28 / 07 / 2006

DEDICATÓRIA

*Ao meu marido Luis Fernando, aos meus filhos Eduardo e
Júlia, com carinho.*

Considero esta uma página importante, visto que uma tese é construída com a colaboração, o apoio e por que não dizer, o carinho de muita gente. Por esse motivo quero registrar o meu agradecimento a todos que de uma forma ou outra colaboraram para que essa tese fosse realizada.

Não poderia iniciar meus agradecimentos sem antes reconhecer que a boa mão de Deus me guiou e sustentou durante todo esse período. Não foram poucos os momentos de luta, mas encontrei a força Naquele que é a Rocha firme.

Com carinho, quero agradecer aos meus pais pelo amor incondicional que dedicam a mim e também por todo incentivo que me dão. Sei do orgulho que vocês sentem desta tese.

Agradeço ao meu marido que com paciência e amor me apoiou nesta empreitada que exige tanta dedicação e tempo. Aos meus pequenos e queridos filhos de quem subtrai tanto tempo....Vocês três são meus verdadeiros tesouros!

Esta tese simplesmente não existiria se não fosse a Dra Iscia! Obrigada, Iscia pela confiança que você depositou em mim e por todo o carinho durante esses anos. Agradeço a Deus o privilégio que tive de ser orientada por você. Gosto muito de uma característica sua: você é dinâmica e sempre pronta para novos e bons projetos. Além disso, sou testemunha da sua preocupação e cuidado para com seus alunos. Obrigada!

Outro privilégio meu foi ter a participação do Dr. Fernando Cendes nesta tese. Muito obrigada professor, porque o senhor sempre deu seu apoio e conhecimento quando precisei dele. Admiro muito seu conhecimento!

Os colegas de laboratório dão um colorido especial à pesquisa. Com eles você aprende, se diverte, se renova, se aborrece, mas também cresce. No meu caso que sou umas das mais velhas (mas nem tanto...) essa convivência faz rejuvenescer. Não poderia deixar

de citar alguns nomes: agradeço a Neide que foi quem me apresentou à Dra. Iscia, ao Rodrigo pelo apoio estatístico, ao Rafael, a Eliane e a Romênia que nestes últimos tempos se tornou meu braço direito. Todos vocês foram importantes nesta tese.

Impossível deixar de agradecer ao Fábio (nosso livro de genética ambulante) pela amizade e transmissão de conhecimento. À Marilza sempre preocupada com o bom andamento do laboratório. Também quero agradecer a Patrícia, a Luciana e ao Tiago, meus amigos de conversa, tão importantes quando as PCRs não funcionavam....enfim não dá para citar o nome de cada um, mas nosso laboratório tem muita gente especial a quem agradeço neste momento.

Não poderia deixar de agradecer às famílias que foram objeto de estudo nesta tese.

Quero agradecer às secretárias do Departamento de Genética e do Curso de Fisiopatologia.

A Fapesp pelo suporte financeiro.

A FCM e a Unicamp

É muito bom olhar tudo que passou e ver o quanto tenho que agradecer e concluir que, durante toda essa jornada, em momento algum estive sozinha. Obrigada a todos vocês!

EBENEZER!! (até aqui nos ajudou o Senhor)

	<i>PAG.</i>
RESUMO	<i>x</i>
ABSTRACT	<i>xii</i>
1 - INTRODUÇÃO	13
1.1 - Epilepsia de Lobo Temporal	13
1.2 - Epilepsia de Lobo Temporal Mesial	14
1.2.1 – Manifestações Clínicas	14
1.2.2 – Neuroimagem na ELTM	15
1.2.3 – Neuropatologia da ELTM	15
1.3 – Epilepsia de Lobo Temporal Familiar	17
1.4 – Epilepsias e Genética	18
1.5 – Análise de Ligação Genética	19
2- OBJETIVOS	21
3- CAPÍTULO 1 - ARTIGO: Complex Segregation Analysis in Familial Mesial Temporal Lobe Epilepsy	22
4- CAPÍTULO 2 – ARTIGO: The SCN2A Gene is not a Likely Candidate for Familial Mesial Temporal Lobe Epilepsy	33
5- CAPÍTULO 3 - ARTIGO: Linkage Study of Voltage-Gated Potassium Channels in Familial Mesial Temporal Lobe Epilepsy	43

	<i>PAG.</i>
6- CAPÍTULO 4 - ARTIGO: Genome-Wide Linkage Study Identifies a Locus for Familial Mesial Temporal Lobe Epilepsy with Hippocampal Atrophy.	56
7 – DISCUSSÃO	77
8 - CONCLUSÕES	82
9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
APÊNDICES	94
Apêndice I - Heredogramas das Famílias com ELTMF	94
Apêndice II – LOD <i>Score</i> de Dois Pontos para Marcadores Microssatélites Genotipados no Cromossomo 18p (F26)	95
Apêndice III - Protocolo de Genotipagem para Marcadores Microssatélites	96
Apêndice IV - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	97

LISTA DE ABREVIATURAS

AH	Atrofia Hipocampal
CPVD	Canais de Potássio Voltagem-Dependente
CSVD	Canais de Sódio Voltagem-Dependente
EEG	Eletroencefalograma
EH	Esclerose Hipocampal
ELT	Epilepsia de Lobo Temporal
ELTM	Epilepsia de Lobo temporal Mesial
ELTMF	Epilepsia de Lobo Temporal Mesial Familiar
EMT	Esclerose Mesial Temporal
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
IRM	Imagens de Ressonância Magnética
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Pro	Prolina
Ser	Serina
SNC	Sistema Nervoso Central

A associação entre epilepsia de lobo temporal e esclerose mesial temporal (EMT) é bem estabelecida, assim como o uso da atrofia hipocampal (AH) e outros sinais indicativos de esclerose hipocampal, visíveis por imagens de ressonância magnética, como marcadores da EMT *in vivo*. Um dos fatores de risco associados à EMT são as crises epiléticas febris prolongadas na infância. Em 2001, Kobayashi et al. descreveram um tipo distinto de epilepsia de lobo temporal mesial com evidente recorrência familiar associada à AH, mas com baixa frequência de crises febris, nomeada de epilepsia de lobo temporal mesial familiar (ELTMF). Uma análise prévia dos heredogramas destas famílias sugere que as anormalidades hipocampais podem ser geneticamente determinadas na ELTMF. Para determinar se a ELTMF pode ser explicada por fatores genéticos foi empregada a técnica de análise de segregação complexa baseada no modelo misto de Morton, com o emprego do software POINTER[®]. Na investigação de genes candidatos, com funções biológicas significantes na fisiologia da epilepsia de lobo temporal ou em modelos animais descritos previamente, foram genotipados marcadores microssatélites que flanqueiam estes genes relevantes e realizada a análise de ligação genética. Finalmente, objetivando identificar a região do genoma responsável por conter o gene principal associado com a AH na ELTMF foi realizada a análise de ligação genética genômica em duas famílias suficientemente informativas, com 57 indivíduos incluindo 27 pacientes. Os resultados obtidos demonstraram que: i) a análise de segregação complexa confirmou a observação prévia de uma predisposição genética para ELTMF, indicando a presença de um gene principal com transmissão Mendeliana e que pode ter um envolvimento na gênese da AH encontrada nestes pacientes; ii) embora a lesão hipocampal encontrada em camundongo transgênico com mutação no gene *Scn2a* seja similar àquela encontrada na ELTM foi descartada a possibilidade do gene homólogo *SCN2A* ser um gene candidato na ELTMF; iii) a análise de ligação em genes candidatos codificadores de canais de potássio voltagem-dependente não evidenciou qualquer tipo envolvimento destes genes na determinação das anormalidades hipocampais na ELTMF; iv) foi identificada ligação no cromossomo 18p11.3-11.2 com um LOD score máximo de 3,63 para $\theta = 0,0$ para o marcador D18S976 em uma única família com 11 indivíduos afetados com AH. A análise de multipontos e o haplótipo localizam a região candidata dentro um intervalo de 6 cM flanqueado pelos marcadores D18S976 e D18S452. Além disso, os genes *ZFP161* e *TGIF* que se localizam na região candidata

mapeada, não apresentaram mutações em suas regiões codificantes, as quais poderiam estar relacionadas à ELTMF. Estes resultados mostram pela primeira vez, evidências de que a AH pode ser determinada por fatores genéticos, os quais podem ter maiores implicações no estudo dos mecanismos fisiopatológicos que permeiam a EMT e sua relação com a epilepsia de lobo temporal. No entanto, estudos adicionais são necessários para identificar o gene maior responsável pela ELTMF.

The association between temporal lobe epilepsy and mesial temporal sclerosis (MTS) has been well established; as well as the use of hippocampal atrophy (HA) on magnetic resonance imaging as an *in vivo* surrogate marker of MTS. One of the risk factors associated to MTS is childhood prolonged febrile seizures. In 2001, Kobayashi et al., described a type of mesial temporal lobe epilepsy with evident familial recurrence associated with HA but low frequency of febrile seizures, named familial mesial temporal lobe epilepsy (FMTLE). Previous pedigree analysis provided evidence that hippocampal abnormalities may be genetically determined in FMTLE. To determine whether FMTLE can be explained by the involvement of genetic factor we employed complex segregation analysis with the POINTER[®] software. To investigate candidate genes with significant biological functions related to temporal lobe epilepsy, we genotyped microsatellite markers flanking these relevant genes and performed linkage analysis. In addition, we performed a genome wide search in two large families with 57 individuals, including 27 patients. Our results show the following: i) complex analysis segregation strengthened previous evidence for a genetic predisposition in FMTLE, indicating the presence of a major gene with Mendelian transmission, which could be involved in HA development in these patients; ii) we conclusively ruled out the *SCN2A* gene as candidate in FMTLE, although the hippocampal lesion in the mutant *Scn2a* transgenic mouse is similar to that found in our FMTLE patients; iii) linkage analysis showed no evidence that voltage-gated potassium channels are involved in the determination of hippocampal abnormalities in FMTLE; iv) we identified linkage to chromosome 18p11.3-11.2, with a maximum LOD score of 3.63 at $\theta=0.0$ for the D18S976 marker in a single family (F-10) with 11 affected individuals with HA. Multipoint and haplotype analyses localized the locus within a 6 cM interval flanked by markers D18S976 and D18S452. Furthermore, we failed to find putative pathological mutations related to FMTLE in two candidate genes *ZFP161* and *TGIF*, both mapping within the locus on chromosome 18p11.3-11.2. With our results we have demonstrated the first conclusive evidence that HA may be caused by genetic factors which can have major implications in the study of the pathophysiological mechanisms underlying MTS and its relationship with temporal lobe epilepsy.

1. INTRODUÇÃO

As epilepsias formam um grupo de doenças neurológicas crônicas decorrentes de alterações das funções cerebrais associadas ou não a outras doenças neurológicas. A grande variedade de manifestações clínicas, etiológicas, gravidade e prognóstico sugerem que sejam tratadas como um grupo de doenças ou síndromes e não uma entidade clínica homogênea. No entanto, a característica comum a todas as síndromes epiléticas é a ocorrência de crises (Zielinski, 1988; Fisher et al., 2005).

A prevalência deste tipo de acometimento é alta, pois atinge de 1,5% a 2% da população geral (Hauser, 1996, Annegers et al., 1996, Borges et al., 2004), o que faz com que as epilepsias sejam consideradas um problema de saúde pública pela Organização Mundial de Saúde.

1.1 - EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL

Dentre as diferentes classificações adotadas pela Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE - sigla inglesa de *International League Against Epilepsy*), a epilepsia de lobo temporal (ELT) é a mais freqüente das epilepsias parciais ou focais, representando aproximadamente 50% dos casos em adultos e tem como manifestação típica, a crise parcial complexa (Gloor, 1991). É importante ressaltar, que embora a classificação internacional das síndromes epiléticas esteja passando por modificações (Engel, 2001a), neste estudo será empregada a classificação aprovada em 1989 pela ILAE (*Commission on classification and terminology of the International League Against Epilepsy*, 1989), visto que a proposta de 2001 ainda não está definitivamente em uso.

A ELT é reconhecidamente uma síndrome de grande importância clínica não somente por sua alta incidência, mas também por ser freqüentemente refratária ao tratamento medicamentoso, visto que o controle completo das crises apenas com o tratamento clínico ocorre em menos de 50% desses pacientes (Sander, 1993; Mattson, 1994). Nos casos refratários à medicação, o tratamento cirúrgico tem se mostrado bastante eficiente (Primrose e Ojemann, 1991; Engel, 2001b; Kobayashi et al., 2003a).

Os principais sintomas gerados pela ELT são predominantemente pelo acometimento das estruturas mediais do lobo temporal, sendo a ELT mesial (ELTM), a forma mais comum de ELT (Engel, 2001b).

1.2 – EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL MESIAL

1.2.1 - MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Na ELTM as crises originam-se na porção medial do lobo temporal, incluindo amígdala, hipocampo e giro parahipocampal e apresentam um perfil clínico bem definido.

Na maioria dos casos, a primeira crise ocorre no final da infância e início da adolescência e, após um período sem manifestações de crises, o paciente passa a apresentar crises habituais, em geral do tipo parcial complexa, seguidas de automatismos manuais e oromandibulares (Gloor, 1991; Engel, 2001b). A generalização secundária (crises tônico-clônicas) é pouco freqüente em pacientes sob tratamento medicamentoso. No entanto é comum que as crises tornem-se refratárias ao tratamento medicamentoso com o passar dos anos.

As auras são comuns e os relatos mais freqüentes são de sensação epigástrica ascendente, sensações do tipo *déjà vu*, medo súbito e crises autonômicas como palpitação e piloereção. Os exames eletroencefalográficos (EEG) de rotina evidenciam atividades epileptiformes unilaterais ou bilaterais nas regiões temporais médio-basais. No entanto, deve-se ressaltar que há casos nos quais os pacientes apresentam EEG normal, o que não exclui o diagnóstico de ELTM. O exame neurológico em sua maioria é normal, entretanto, pode ocorrer distúrbio de memória verbal ou não verbal de acordo com o lado do hipocampo comprometido (Helmstaedter e Kurthen, 2001; Alessio et al., 2006). Alterações de ordem psíquicas como depressão e alteração de humor podem ser encontradas em pacientes com ELTM (Paradiso et al., 2001; Moore e Baker, 2002).

1.2.2 – NEUROIMAGEM NA ELTM

Nos últimos anos, as imagens por ressonância magnética (IRM) de alta resolução permitiram a identificação da atrofia hipocampal (AH) e outros sinais indicativos de esclerose hipocampal (EH) em pacientes com ELTM (Berkovic et al, 1991; Cendes et al., 1993a,b; Van Paesschen et al., 1997).

Na IRM a EH pode ser evidenciada por alteração na estrutura interna e no eixo hipocampal nas imagens ponderadas em T1 e aumento no sinal nas imagens ponderadas em T2. Mais recentemente, as técnicas quantitativas volumétricas em estruturas do lobo temporal permitiram maior sensibilidade para a detecção da atrofia quando comparada com as análises qualitativas das IRM (Cendes et al., 1993a, Jackson et al. 1993). Esses achados de IRM apresentam uma forte correlação com os achados histopatológicos da esclerose mesial temporal (EMT; Cendes et al., 1993a,b; Lencz et al., 1992; Briellmann et al., 2002; Bernasconi et al., 2003) permitindo que a presença da AH seja considerada um marcador *in vivo* da EMT.

1.2.3 - NEUROATOLOGIA DA ELTM

A ELTM está frequentemente associada com achados histopatológicos de EMT. A EMT é caracterizada por perda neuronal nas regiões da amígdala, uncus e giro parahipocampal, mas o achado mais acentuado é a EH (Babb e Brown, 1987; Gloor, 1991, Meencke e Veith, 1991). O padrão de EH ligada a ELT tem um perfil típico de perda celular, diferindo daqueles encontrados em outras patologias neurológicas.

A relação entre epilepsia e alteração hipocampal vem de longa data, desde que Bouchet e Cazauvieilh em 1825 fizeram observações macroscópicas de alterações hipocampais relacionadas com epilepsia. A primeira descrição microscópica do hipocampo de pacientes com epilepsia foi feita por Sommer em 1880, que também contribuiu com suas interpretações sobre a relação entre alterações hipocampais e sintomas clínicos das crises (Mathern et al., 1997). Outra importante contribuição histórica foi a de Bratz que, no final do século XIX, fez uma descrição minuciosa da EH ligada a ELT, também observando que as lesões encontradas não eram recentes ou progressivas, mas tinham uma aparência antiga

e crônica (Mathern et al., 1997). Inicialmente limitados à observação em material de autopsia estes estudos foram importantes para a descrição do padrão de lesão hipocampal encontrada nas ELTM associada à EH.

A EH é caracterizada por perda neuronal seletiva nas áreas CA1, CA3 e hilus acompanhada de gliose em graus variados. Já a região de CA2 tem se mostrado mais resistente a esse tipo de insulto (Gloor, 1991; Mathern et al., 1997; Blümcke et al., 1999). A dispersão das células granulares também é comumente encontrada na EH (Houser et al., 1990; Blümcke et al., 1999; 2002).

A partir da última metade do século passado essas observações também puderam ser feitas em espécimes cirúrgicos de pacientes com ELT refratária à medicação (Falconer et al., 1964; Blümcke et al., 1999). O progresso nos tratamentos cirúrgicos associados aos avanços das técnicas moleculares e aos modelos animais têm tornado possível o estudo sobre as alterações estruturais, moleculares e eletrofisiológicas das epilepsias focais (Swanson, 1995; Becker et al., 2003; Lynd-Balta et al., 2004).

Um fenômeno que tem sido bem caracterizado em pacientes com ELT é a reorganização axonal das células granulares. Acredita-se que após um insulto precoce, com conseqüente perda celular na região hilar do hipocampo, as células granulares formem novas sinapses. Isto tem levado à hipótese que essas reorganizações axonais anormais formem um circuito local de retroalimentação excitatório sobre as células granulares contribuindo para a geração de crises crônicas (Sutula et al., 1989; Mathern et al., 1995; Proper et al., 2000). Um estudo recente com jovens de 3-15 anos sugere uma seqüência de eventos moleculares que culmina com a reorganização sináptica em hipocampus escleróticos, logo no início do curso da doença (Lynd-Balta et al., 2004).

Apesar destas observações, ainda não estão bem esclarecidas as relações entre esses achados e os mecanismos epileptogênicos. Entretanto, esses eventos têm sido freqüentemente relacionados com insultos precoces de causas ambientais, como as crises epilépticas febris prolongadas na infância (Abou-Khalil et al., 1993; Cendes et al., 1993,c; VanLandingham et al., 1998).

1.3 - EPILEPSIAS DE LOBO TEMPORAL FAMILIAR

As epilepsias podem ter um caráter familiar quando dois ou mais membros de uma mesma família preenchem os critérios diagnósticos para a determinação da síndrome em questão. Recorrência familiar na ELT foi descrita pela primeira vez por Berkovic et al. (1996) a partir do estudo em gêmeos e demonstrou ter um caráter benigno com início tardio de crises e IRM normal. Em 1998, Cendes et al. descreveram um grupo de 11 famílias não relacionadas que segregava ELTM familiar com manifestação clínica heterogênea, inclusive com casos fármaco-resistentes. Neste mesmo período Fernandez et al. (1998) reportaram um estudo em famílias com ELT e antecedentes de crises febris, mas com IRM compatíveis com EH. Recentemente foi mapeado um *locus* no cromossomo 12q22-q23 para a ELT com antecedentes de crises febris, mas sem alteração hipocampal (Claes et al. 2004).

Em 2001, Kobayashi et al. identificaram um tipo distinto de ELTM com recorrência familiar, mas baixa frequência de crises febris conhecida como ELTM familiar (ELTMF; Kobayashi et al., 2001) que desde então, vem sendo intensamente investigada tanto no que se refere à apresentação clínica quanto às alterações em IRM (Coan et al., 2004; Kobayashi et al., 2002; 2003b). A ELTMF é uma síndrome que acomete pelo menos 7% dos pacientes com ELT vistos nos ambulatórios de epilepsia do Hospital das Clínicas da UNICAMP. A análise dos heredogramas evidenciou um padrão de herança autossômica dominante com penetrância incompleta (Kobayashi et al., 2001).

Apesar da maior parte dos indivíduos afetados apresentarem bom controle de crises, alguns pacientes apresentavam quadro clínico, eletroencefalográfico e de neuroimagem indistinto daqueles pacientes com a forma clássica de ELTM refratária dita “esporádica” ou não familiar. A atrofia hipocampal determinada por volumetria, associada à alteração da estrutura interna e hipersinal em T2 foi identificada em 70% dos pacientes com ELTMF (Kobayashi et al., 2003b), sendo mais severa e mais frequente nos pacientes com crises refratárias. Nos pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico foi encontrado 90% de controle total das crises (Kobayashi et al., 2003a), o que é semelhante ao relatado na literatura para os pacientes com ELTM não familiar (Primrose e Ojemann, 1991). Além disso, foram encontrados sinais indicativos de AH em 34% dos familiares assintomáticos submetidos à investigação por IRM (Kobayashi et al., 2002). Estes dados sugerem a

presença de um forte fator genético determinando as alterações hipocampais nessas famílias.

1.4 - EPILEPSIAS E GENÉTICA

A presença de fatores genéticos contribuindo na etiologia das epilepsias é estimada em torno de 40% dos pacientes (Robinson & Gardiner, 2004). De fato, a herança genética nas epilepsias tem sido observada desde longa data, mas as primeiras evidências para uma predisposição genética em diversas formas de epilepsia datam das décadas de 50 e 60 a partir de estudos epidemiológicos (Lennox, 1951; Metrakos e Metrakos, 1961). A princípio acreditava-se que somente as epilepsias ditas generalizadas poderiam ter etiologia genética, contudo, foram os estudos clínicos e eletrencefalográficos realizados por Andermann nos anos 70 que chamaram a atenção para o envolvimento de fatores genéticos também nas epilepsias focais (Andermann, 1982).

Com o avanço dos estudos em biologia molecular e em genética, vários *loci* e alguns genes já foram identificados para as epilepsias idiopáticas. Na Epilepsia Mioclônica Juvenil três *loci* foram identificados: 6p21.3 (Greenberg et al., 1988; 2000; Durner et al., 1991; Sander et al., 1997), 6p12-11 (Liu et al., 1995; 1996; Serratosa et al., 1996) e 15q14 (Elmslie et al., 1997). Recentemente uma mutação no gene *GABRA1* (*gamma-aminobutyric acid A receptor, alpha 1*) foi localizada no cromossomo 5q (Cossette et al. 2002). Já na Epilepsia Benigna Mioclônica Familiar do Adulto e na Epilepsia Mioclônica Familiar da Infância foram localizados os *loci* 8q (Mikami et al., 1999; Plaster et al., 1999) e 16p (Zara et al., 2000), respectivamente. Na Epilepsia Generalizada com Crises Febris “*plus*” foi mapeado o gene *SCN1B* (*sodium channel, voltage-gated, type I, beta*) no cromossomo 19q (Wallace et al., 1998) e os genes *SCN1A* (*sodium channel, voltage-gated, type I, alpha*) e *GABRG2* (*gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, gamma 2*) no cromossomo 2q (Lopes-Cendes et al., 2000; Baulac et al., 2001).

A despeito das primeiras evidências genéticas terem sido identificadas nas epilepsias generalizadas, nos últimos anos, a localização de genes tem sido mais eficaz nas epilepsias focais (Ottman, 2001). Na Epilepsia Parcial Familiar com Foco Variável um *locus* foi mapeado no cromossomo 22q11-q12 (Xiong et al., 1999). Na Convulsão Neonatal

Familiar Benigna foram identificados o gene *KCNQ2* (*potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 2*) no cromossomo 20q (Singh et al., 1998) e o gene *KCNQ3* (*potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 3*) no cromossomo 8q (Bivert et al., 1998). Na Convulsão Infantil Familiar Benigna foram mapeados três *loci* nos cromossomos 2q, 16p e 19q (Guipponi et al., 1997; Malacarne et al., 2001; Weber et al., 2004). Para a ELT com crises febris foi identificado um *locus* no cromossomo 12q22-q23 (Claes et al., 2004). Já na Epilepsia Noturna Autossômica Dominante do Lobo Frontal foram identificados os genes *CHRNA4* (*cholinergic receptor, nicotinic, alpha 4*) e *CHRNA2* (*cholinergic receptor, nicotinic, beta 2, neuronal*) nos cromossomos 20q13 e 1q respectivamente (Steinlein et al., 1995; Gambardella et al., 2000). Recentemente, três novos *loci* (3p, 8q e 15q) foram descritos para esta mesma síndrome (Phillips et al., 1998; Combi et al., 2005).

Os genes identificados até o momento, em sua maioria, referem-se aos componentes moleculares da sinalização neuronal, como os canais iônicos (Lerche et al., 2001; Meisler et al., 2001). No entanto, o gene *LGII* (*leucine-rich, glioma-inactivated 1 gene*) localizado no cromossomo 10q24 foi clonado e identificado como responsável pela ELT autossômica dominante com sintomas auditivos (Kalachikov et al., 2002), uma síndrome com recorrência familiar caracterizada por fenômenos auditivos, mas com bom controle das crises (Poza et al., 1999). Cabe aqui ressaltar que o gene *LGII* não está ligado a canais iônicos, o que sugere novos rumos na pesquisa de genes responsáveis por epilepsias idiopáticas, pois corrobora a hipótese que outras regiões cromossômicas além daquelas que codificam componentes iônicos podem conter o gene responsável pela expressão da doença.

1.5 – ANÁLISE DE LIGAÇÃO GENÉTICA

A identificação de genes envolvidos em doenças humanas tem importante papel na compreensão da fisiopatologia da doença, além de propiciar novos conhecimentos sobre mecanismos biológicos normais.

A descoberta de marcadores genéticos há pouco mais de duas décadas atrás permitiu uma evolução nos estudos visando à identificação de genes. No entanto, um importante

avanço ocorreu neste campo após a geração de mapas com marcadores altamente polimórficos distribuídos pelo genoma (Weber e May, 1989; Broman et al., 1998).

A análise de ligação é um método eficiente que se utiliza destes marcadores genômicos para a localização de genes responsáveis por doenças. Por este método pode-se confirmar ou excluir ligação entre marcadores genômicos e *loci* de doenças. A análise de ligação tem contribuído para a identificação de muitos genes relacionados com desordens humanas (Lopes-Cendes et al., 2000; Funayama et al., 2002; Berkovic et al., 2004).

Existem duas estratégias básicas para se localizar genes de maior efeito que causam doenças usando-se análise de ligação: *o teste dos genes candidatos* e a *clonagem posicional*. O teste dos genes candidatos é um método rápido, pois parte de um conhecimento prévio das alterações metabólicas ou dos mecanismos fisiopatológicos da doença para a seleção dos genes a serem analisados. Já a clonagem posicional é um método que utiliza técnicas de manipulação de DNA para o mapeamento genético a fim de localizar um gene responsável por doenças, quando pouca ou nenhuma informação há sobre as alterações metabólicas ou mecanismos fisiopatológicos de base. Este tipo de abordagem representa uma valiosa ferramenta no estudo de patologias cujos mecanismos são complexos e poucos conhecidos como é o caso das epilepsias (Rowland, 1992).

2- OBJETIVOS

Objetivo Artigo 1:

- Determinar se a recorrência familiar observada na ELTMF pode ser explicada por fatores genéticos e qual o padrão de herança que melhor explica a segregação deste fenótipo.

Objetivo Artigo 2:

- Investigar se o gene candidato *SCN2A* é responsável pelas anormalidades hipocâmpais encontradas na ELTMF, através do estudo de ligação.

Objetivo Artigo 3:

- Através do estudo de ligação, verificar se os genes codificadores de canais de potássio voltagem-dependente podem determinar as anormalidades hipocâmpais observadas na ELTMF.

Objetivos Artigo 4:

- Identificar o *locus* principal responsável pela ELTMF pelo estudo de ligação genômico.
- Reduzir a região candidata pela genotipagem de novos marcadores.
- Realizar a triagem de mutações em genes candidatos através do DHPLC (*Denaturing High-Performance Liquid Chromatography*).

ARTIGO 1

**COMPLEX SEGREGATION ANALYSIS IN FAMILIAL
MESIAL TEMPORAL LOBE EPILEPSY**

Rodrigo Secolin BSc¹, Cláudia V. Maurer-Morelli MSc¹, Ricardo G. M. Ferreira BSc³,
Neide F. Santos PhD¹, Eliane Kobayashi MD, PhD², Rafael B. Marchesini, BSc¹, Fernando
Cendes, MD, PhD², Henrique Kriger PhD³; Iscia Lopes-Cendes, MD, PhD¹

Complex Segregation Analysis in Familial Mesial Temporal Lobe Epilepsy

Rodrigo Secolin BSc¹, Cláudia V. Maurer-Morelli MSc¹, Ricardo G. M. Ferreira BSc³, Neide F. Santos PhD¹, Eliane Kobayashi MD, PhD², Rafael B. Marchesini, BSc¹, Fernando Cendes, MD, PhD², Henrique Kriger PhD³; Iscia Lopes-Cendes, MD, PhD¹

1. Department of Medical Genetics, 2. Department of Neurology;
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas;
3. Department of Parasitology, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo;
SP, Brazil.

Text word count: 1499

Abstract word count: 143

Running title: Segregation in Temporal Lobe Epilepsy

Key words: genetics of epilepsy, statistical genetics, Pointer, autosomal dominant inheritance.

Correspondence to: Iscia Lopes-Cendes, MD. PhD

Department of Medical Genetics, FCM – UNICAMP
Tessália Vieira de Camargo, 126
Cidade Universitária Zeferino Vaz
Campinas SP, Brazil, CEP 13084-971
TEL: +55 19 3788 8907
FAX: +55 19 3289 1818
e-mail: icendes@unicamp.br

Abstract

We aim to determine whether familial temporal lobe epilepsy (FMTLE) associated with hippocampal atrophy (HA) can be explained by involvement of genetic factors. We studied 98 nuclear families with FMTLE. A total of 602 individuals, including 147 patients were analyzed. Segregation analysis was performed using POINTER[®] software. Related models were compared by likelihood coefficient tests; whereas, non-related models were evaluated by Akaike Information Criteria (AIC). We rejected genetic effect absence ($p < 0.001$), major gene absence ($p < 0.001$) and autosomal recessive inheritance ($p < 0.001$). However, we could **not** reject absence of multifactorial inheritance ($p = 0.074$), codominant ($p = 0.208$) and autosomal dominant inheritance ($p = 0.204$). AIC indicates dominant inheritance is more parsimonious (147.164) than codominant inheritance (147.195). Our results strengthened previous evidence for a genetic predisposition in this disorder, indicating the presence of a major gene with Mendelian transmission, which could be involved in HA development in these patients.

INTRODUCTION

It is well known that among epilepsies with focal seizure onset, temporal lobe epilepsies (TLE) are the most common forms. One type of TLE is frequently associated with mesial temporal lobe sclerosis (MTS), a neuropathological abnormality that can be diagnosed *in vivo* by high-resolution brain imaging as hippocampal atrophy (HA) (1). MTS, which is characterized by selective neuronal loss and gliosis in regions of hippocampus and hilus, has been associated with predisposing environmental factors, such as prolonged febrile seizures in childhood (2).

Since 2001 we have been studying a type of mesial temporal lobe epilepsy with familial recurrence defined as FMTLE (3, 4). In FMTLE most affected individuals have a benign course of the disease (3), but HA was observed in 70% of individuals, including those with a single partial seizure, seizure remission, as well as 34% of asymptomatic first-degree relatives of patients with FMTLE (4). These initial observations suggested that the predisposition for epilepsy observed in these families have a strong genetic component. Therefore, in order to determine whether the familial recurrence observed in FMTLE can be explained by the involvement of genetic factors, we performed a complex segregation analysis in our family data.

METHODS

Ascertainment of families

Family ascertainment and clinical data collection have been described in detail previously (3). Briefly, FMTLE was defined when two or more individuals presented the diagnosis of mesial temporal lobe epilepsy (MTLE). The diagnosis of MTLE was based on clinical and EEG findings as defined by the International League Against Epilepsy criteria (5). We evaluated 602 individuals from 29 pedigrees distributed into 98 nuclear families (parents and their offspring). Individuals were classified into three classes of probability as: affected, unaffected or unknown. These probabilities were estimated empirically (table 1). Affected phenotype was assumed for individuals with HA detected by volumetric magnetic resonance imaging (MRI) (3, 4). In addition, we also considered affected individuals who had MTLE by clinical criteria but did not have MRI performed. Individuals with single

seizure, normal MRI or other epilepsy syndromes were considered unaffected. All family members gave informed consent and this study was approved by the Ethics Committee of our institution.

Segregation analysis

Segregation analysis was performed under mixed model by POINTER[®] software (6). Mixed model assumes a phenotype (x) with independent contribution of a major gene locus (g), a multifactorial component (c), and an environmental component (e). The overall phenotype is defined as $x = g + c + e$, and total variance is defined as $V = G + C + E$. The major locus has two alleles (A, a) and the genotype frequencies follow the Hardy-Weinberg equilibrium.

Four parameters were estimated: dominance (d), or the relative position of heterozygote mean, where $d=1$ indicates a dominant gene, whereas $d=0.5$ indicates additive and $d=0$ indicates recessive gene; displacement (t) between the two extreme homozygote means; allele frequency (q); and heritability (H), which represents the proportion between the variance of multifactorial component and total variance ($H = C/V$).

Transmission probabilities (τ_1 , τ_2 , and τ_3) were analyzed for Mendelian pattern of transmission from parents to offspring. These parameters, τ_1 , τ_2 , and τ_3 , denote probabilities of transmitting allele A for genotypes AA, Aa and aa, respectively. Under Mendelian transmission, $\tau_1 = 1$, $\tau_2 = 0.5$, $\tau_3 = 0$ and no transmission, $\tau_1 = \tau_2 = \tau_3$.

Models were estimated by maximizing conditional likelihood (L) of nuclear family phenotypes. The difference between $-2\ln L$ under a general model with m parameters and $-2\ln L$ under a nested model with n parameters is χ^2 asymptotically distributed, with $m-n$ degrees of freedom. Alternatively, it was used the Akaike Information Criterion (AIC) (7), which is $-2\ln L$ plus twice the number of free parameters in the model. This comparison has the advantage that one model does not have to be a subset of the other one. The model with lowest AIC indicates most parsimonious fit to the observed data.

RESULTS

Clinical data

There were no affected individuals who had MTLE but no HA on MRI; however we found five affected who had MTLE but who did not have MRI performed. Among unaffected individuals we found one individual who had a single seizure and five individuals who have had only febrile seizures.

Segregation analysis

As shown in table 2 our results rejected the random model ($\chi^2_4 = 192.758$; $p < 0.001$), absence of major gene ($\chi^2_3 = 192.758$; $p < 0.001$) and autosomal recessive inheritance ($\chi^2_2 = 27.334$; $p < 0.001$) models. We could not reject the multifactorial model ($\chi^2_1 = 3.191$; $p = 0.074$), as well as codominant ($\chi^2_2 = 3.144$; $p = 0.074$) and dominant ($\chi^2_2 = 3.176$; $p = 0.074$) inheritance models. However, comparison of AIC values indicated that autosomal dominant model is more parsimonious (AIC = 147.164) than codominant model (AIC = 147.195). In addition, Mendelian transmission ($\chi^2_3 = 115.710$; $p < 0.001$) and non-Mendelian transmission ($\chi^2_3 = 255.934$; $p < 0.001$) were both rejected. However, AIC indicates that Mendelian transmission is more parsimonious (37.454) than non-Mendelian transmission (403.098).

DISCUSSION

Complex segregation analysis has been used successfully to evaluate the transmission of a trait from pedigree data (8). It can determine whether a Mendelian locus has an effect on a particular phenotype, in addition it can test for the possible inheritance mode and the magnitude of environmental and polygenic effects that be influencing the defined phenotype. All these inferred parameters can be subsequently used for linkage analysis, fine mapping and gene identification related to the phenotype (8).

Several studies have suggested different inheritance patterns in various epilepsy syndromes. Direct observation of pedigrees with generalized epilepsy with febrile seizures plus, benign familial neonatal convulsions, autosomal dominant nocturnal frontal epilepsy and familial partial epilepsy with variable foci are consistent with autosomal dominant

inheritance with incomplete penetrance; whereas, most progressive myoclonus epilepsy syndromes present an autosomal recessive mode of inheritance (9). In addition, based in a preliminary segregation analysis Ottman et al. (10) suggested an autosomal dominant inheritance in a single family with partial epilepsy and auditory auras. To our knowledge, there is no previous segregation analysis performed in FMTLE. However, Berkovic et al. (11) proposed an autosomal dominant inheritance in a familial form of TLE, with no MRI abnormalities, identified in a population-based twin study.

The relationship between TLE and MTS has been recognized in classical histopathological studies (12) and more recently correlated with neuroimaging findings identified *in vivo* by high-resolution MRI (2, 3), making it HA a surrogate marker for MTS in patients with intractable MTLE (3). Until recently only environmental risk factors were associated to development of MTLE and HA, specially the occurrence of prolonged childhood febrile seizures (2). Only recently, evidence suggesting the involvement of genetic factors underlying the predisposition to HA was brought-up by descriptions of familial recurrence of TLE and observation of HA among these patients (3,4). With recognition of HA segregating in large pedigrees with FMTLE and present even in asymptomatic first degree relatives of patients with MTLE (4), it became clear that the genetic predisposition to HA was not necessarily associated to seizures in these patients. These previous clinical observations are supported by our results, since the complex segregation analysis strongly suggest that HA, as observed in FMTLE, is inherited and influenced by a major gene segregating in an autosomal dominant pattern.

Furthermore, the effect of minor genes, possibly modifying the phenotype, could not be rejected by our analysis. This could explain the remarkable differences in disease severity observed even within families in which individuals with HA could be asymptomatic, have rare seizures, have good seizure control on antiepileptic medication or even present medically refractory epilepsy requiring surgical treatment (3, 4). With the development of tools and strategies allowing the benefits of the genomic era to be used in the discovery of genes of minor effect, the identification of such modifier genes associated to disease severity, prognosis and response to therapy are likely to be as important as the discovery of major genes determining monogenic disorders.

ACKNOWLEDGMENTS: This study was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil), grants #02/11736-3, #02/10435-0. We are grateful to our patients and their families for their helpful cooperation.

REFERENCES

1. Fisher PD, Sperber EF, Moshe SL. Hippocampal sclerosis revisited. *Brain Dev* 1998;20(8):563-73.
2. VanLandingham KE, Heinz ER, Cavazos JE, Lewis DV. Magnetic resonance imaging evidence of hippocampal injury after prolonged focal febrile convulsions. *Ann Neurol* 1998;43:413-426.
3. Kobayashi E, Lopes-Cendes I, Guerreiro CAM, Sousa SC, Guerreiro MM, Cendes F. Seizure outcome and hippocampal atrophy in familial mesial temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2001;56:166-172.
4. Kobayashi E, Li ML, Lopes-Cendes I, Cendes F. MRI evidence of hippocampal sclerosis in asymptomatic first degree relatives of patients with familial mesial temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol* 2002;59(12):1891-1894.
5. Commission on Classification and Terminology of the International League against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* 1989;30:389-399.
6. Lalouel JM, Morton NE. Complex segregation analysis with pointers. *Hum Hered* 1981;31:312-321.
7. Akaike H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Autom Control* 1974;19:716-723.
8. Jarvik GP. Complex Segregation Analysis: uses and limitations. *Am J Hum Genet* 1998;63:942-946.
9. Callenbach PMC, Maagdenberg AMJM, Frants RR, Brouwer OF. Clinical and genetic aspects of idiopathic epilepsies in childhood. *Neurology* 2005;9(2):91-103.
10. Ottman R, Risch N, Hauser WA, Pedley TA, Lee JH, Barker-Cummings C, Lustenberger A, Nagle KJ, Lee KS, Scheuer ML, Neystat M, Susser M, Wilhelmsen KC.

Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q. *Nat Genet* 1995;10(1):56-60.

11. Berkovic SF, McIntosh A, Howell RA, Mitchell A, Sheffield LJ, Hopper JL. Familial temporal lobe epilepsy: a common disorder identified in twins. *Ann Neurol* 1996;40(2):227-235.

12. Blümcke I, Beck H, Lie AA, Wiestler OD. Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 1999;36:205-223.

Table 1. Probabilities estimated for the three phenotypic classes.

Phenotype	Class of probability	Penetrance	n
Unaffected	1	0.01	150
Unknown	2	0.50	334
Affected	3	0.90	118
Total			602

Table 2. Segregation Analysis for three classes of phenotypes. Values between square brackets were fixed.

Model	d	t	q	H	τ_1	τ_2	τ_3	$-2 \ln L$	χ^2	d.f.	p	test	AIC
1. Mixed	0,988	1,943	0,290	0,009	[1]	[0.5]	[0]	146,340					154,340
2. Sporadic	[0]	[0]	[0]	[0]	[1]	[0.5]	[0]	339,098	192,758	4	0,000	2 x 1	339,098
3. Major gene absence	[0]	[0]	[0]	0,700	[1]	[0.5]	[0]	339,098	192,758	3	0,000	3 x 1	341,098
4. Multifactorial absence	1,002	1,924	0,293	[0]	[1]	[0.5]	[0]	143,149	3,191	1	0,074	4 x 1	149,149
5. Recessive (d=0)	[0]	1,941	0,707	[0]	[1]	[0.5]	[0]	173,673	27,334	2	0,000	5 x 1	177,673
6. Codominant (d=0,5)	[0.5]	3,028	0,293	[0]	[1]	[0.5]	[0]	143,195	3,144	2	0,208	6 x 1	147,195
7. Dominant (d=1)	[1]	1,925	0,293	[0]	[1]	[0.5]	[0]	143,164	3,176	2	0,204	7 x 1	147,164
8. Mendelian	[1]	0,902	0,186	[0]	1,489	0,594	0,000	27,454	115,710	3	0,000	7 x 8	37,454
9. Non-Mendelian	[1]	0,362	0,019	[0]	[0,981]	[0,981]	[0,981]	399,098	255,934	3	0,000	9 x 8	403,098

Notes: d: dominance, t: displacement, q: allele frequency, H: heritability, τ_1, τ_2, τ_3 : probabilities of transmitting allele A for genotypes AA, Aa and aa, respectively, L: likelihood, χ^2 : chi-square, d.f: degrees of freedom, AIC: Akaike Information Criterion (10).

ARTIGO 2

**THE SCN2A GENE IS NOT A LIKELY CANDIDATE FOR
FAMILIAL MESIAL TEMPORAL LOBE EPILEPSY.**

Cláudia Vianna Maurer-Morelli¹, Rodrigo Secolin¹, Rafael Breglio Marchesini¹, Neide
Ferreira Santos¹, Eliane Kobayashi², Fernando Cendes²; Iscia Lopes-Cendes^{1*}.

(Epilepsy Research - In Press)

SHORT COMMUNICATION

THE SCN2A GENE IS NOT A LIKELY CANDIDATE FOR FAMILIAL MESIAL TEMPORAL LOBE EPILEPSY.

Cláudia Vianna Maurer-Morelli¹, Rodrigo Secolin¹, Rafael Breglio
Marchesini¹, Neide Ferreira Santos¹, Eliane Kobayashi², Fernando Cendes²;
Ischia Lopes-Cendes^{1*}.

1- Department of Medical Genetics, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP,
Campinas, SP, Brazil

2- Department of Neurology, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Campinas,
SP, Brazil

Keywords: candidate locus, genetics, microsatellites, linkage study, voltage-gated sodium
channel, hippocampal sclerosis

Corresponding author: Ischia Lopes-Cendes, MD. PhD

Department of Medical Genetics, FCM – UNICAMP

Tessália Vieira de Camargo, 126

Cidade Universitária Zeferino Vaz

Campinas SP, Brazil, CEP 13084-971

TEL: +55 19 3788 8907

FAX: +55 19 3289 1818

e-mail: icendes@unicamp.br

Abstract

A transgenic mouse model carrying a mutation in the *Scn2a* gene showed chronic focal seizures associated with extensive cell loss and gliosis in the hippocampus, a similar phenotype found in familial mesial temporal lobe epilepsy (FMTLE). Our objective was to test whether the human homolog of the *Scn2a* gene is responsible for hippocampal abnormalities in FMTLE by linkage analysis. We conclusively ruled out the *SCN2A* gene as candidate in FMTLE.

1. Introduction

For several decades the relationship between temporal lobe epilepsy (TLE) and mesial temporal sclerosis (MTS) has been recognized and, more recently, high-resolution magnetic resonance imaging (MRI) identify hippocampal atrophy (HA) and other signs indicative of hippocampal sclerosis (HS) in most patients with intractable mesial temporal lobe epilepsy (MTLE; Berkovic et al, 1991; Cendes et al., 1993; Van Paesschen et al., 1997; Blumcke et al, 2002). Hippocampal sclerosis is characterized by severe segmental neuronal loss in CA1, CA3 and hilar region accompanied by pronounced astrogliosis (Engel, 1987; Blümcke et al., 2000). Mesial TLE with HA has been regarded as caused by environmental risk factors, such as prolonged childhood febrile seizures (Abou-Khalil et al., 1993; VanLandingham et al., 1998). We described a type of MTLE with evident familial recurrence (FMTLE) and a strong genetic predisposition for the development of HA (Kobayashi et al., 2001; 2002, 2003a; Coan et al., 2004).

In 2001, Kearney et al., described a transgenic mouse, named Q54, carrying a GAL879-881QQQ mutation in the *Scn2a* gene. Interestingly, Q54 at two months of age presents frequent focal seizures originating in the hippocampus and neuronal cell loss in CA1, CA2, CA3 and hilar region with gliosis reaction. This findings were restricted to hippocampus and no histological abnormalities were observed in other brain regions (Kearney et al.; 2001), making it a very good animal model for MTLE caused by MTS.

Based on this finding, the International League Against Epilepsy (ILAE), in a recent report, propose that a similar defect could be found in humans (Wieser, 2004). To test this hypothesis, we carried out linkage studies in order to investigate whether the human *SCN2A* could play a role in the etiology of FMTLE.

2. Methods

2.1 Families:

Family ascertainment and data collection have been described in detail previously (Kobayashi et al, 2001). The complete cohort is composed of 30 unrelated families segregating MTLE. Among these we have selected two informative kindreds for linkage analysis, named F-10 and F- 26 (Kobayashi et al, 2001). A total of 57 individuals, including 29 patients were genotyped. All family members studied gave informed consent and this research project was approved by the Ethics Committee of our institution.

2.2 Genetic analysis:

We chose seven microsatellites markers flanking the *SCN2A* gene on chromosome (ch) 2q22-2q24: D2S347, D2S129, D2S151, D2S2241, D2S141, D2S2330 and D2S335 from the Marshfield Human Genetic Map (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>). Genotyping was performed by polymerase chain reaction and its products were subsequently submitted to electrophoresis on 6% denaturing polyacrylamide gels, which were dried and exposed to X-ray films.

2.3 Linkage analysis

Linkage analysis was performed under the assumption of a dominant mode of inheritance with incomplete penetrance. Evidence for a dominant pattern of inheritance with Mendelian transmission was obtained from complex segregation analysis (Secolin et al., 2004). Two-point linkage analysis was performed using the MLINK program, version 5.1, of the LINKAGE computer package (Ott, 1974) for each family separately. To increase the power of the linkage test, we also used the LINKMAP support program of LINKAGE and performed multipoint analysis.

3. Results

Two-point maximum likelihood data are summarized in Table 1 for the two families separately and combined. LOD scores were significantly negative for most markers genotyped in kindred F10 ranging from 0.02 to - 3.90 at $\theta = 0.00$. LOD scores were also negative for all markers genotyped in kindred F26, ranging from -1.13 to -2.62 at $\theta = 0.00$;

however, significant exclusion was achieved for only two markers in the candidate region. Two-point LOD score data for the two families combined were significantly negative for all markers genotyped, ranging from -2.13 to -5.04 at $\theta = 0.00$. Multipoint analysis significantly excluded the candidate region containing the *SCN2A* gene on chromosome (ch) 2q24 for the two families combined (Figure 1).

4. Discussion

The histopathological abnormalities present in the Q54 mouse model are very similar to those found in patients with MTLE and MTS, making it the human homologue of the *Scn2a* a good candidate for causing similar abnormalities in patients with MTLE. Our robust collection of patients with FMTLE represents a unique opportunity to test this hypothesis in a very direct way.

Linkage analysis followed by positional and candidate gene cloning strategies have contributed to the identification of genes responsible for several human disorders. Nowadays, one of the major limitations of linkage studies is the ascertainment of informative families with a large number of affected individuals and a well defined mode of inheritance. These two conditions are important to insure the success in obtaining significant and reproducible results. Linkage analysis can also be used to investigate directly candidate genes, specially when candidate genes have been well localized, more than one candidate are clustered in the locus and coding regions are very large, making mutation screening a very time consuming and expensive task.

In the present study we were able to ascertain two large families segregating MTLE in an autosomal dominant mode of transmission (Secolin et al., 2004). Two-point and multipoint linkage analyses resulted in exclusion of the *SCN2A* gene as candidate for FMTLE. In addition, we were able to exclude two other VGSC α -subunits, which are also expressed in high levels in the central nervous system, *SCN1A* and *SCN3A*. Both of these genes are also mapped on ch 2q24 adjacent to *SCN2A* (Plummer and Meisler, 1999).

In summary, our results showed that, although the hippocampal lesion in the mutant *Scn2a* transgenic mouse is similar to that found in our FMTLE patients (Kobayashi et al., 2003b), the *SCN2A* gene is not the major locus involved in the etiology of the disease in these patients.

Acknowledgements

This study was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil), grants 02/10435-0 and 03/13424-1. We are grateful to our patients and their families for their helpful cooperation.

5. References

- Abou-Khalil, B., Andermann, E., Andermann, F., Olivier, A., Quesney, L.F., 1993. Temporal lobe epilepsy after prolonged febrile convulsions: excellent outcome after surgical treatment. *Epilepsia* 34, 878-883.
- Berkovic, S.F., Andermann, F., Olivier, A., Ethier, R., Melanson, D., Robitaille, Y., Kuzniecky, R., Peters, T., Feindel, W., 1991. Hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy demonstrated by magnetic resonance imaging. *Ann Neurol*. 29,175-182.
- Blumcke, I., Suter, B., Behle, K., Kuhn, R., Schramm, J., Elger, C.E., Wiestler, O.D., 2000. Loss of hilar mossy cells in Ammon's horn sclerosis. *Epilepsia*. 41, 174-180.
- Blümcke, I., Thom, M., Wiestler, O.D., 2002. Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol*. 12, 199–211.
- Cendes, F., Andermann, F., Gloor, P., Evans, A., Jones-Gotman, M., Watson, C., Melanson, D., Olivier, A., Peters, T., Lopes-Cendes, I., 1993. MRI volumetric measurement of amygdala and hippocampus in temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 43, 719-725.
- Coan, A.C, Kobayashi, E., Lopes-Cendes, I., Li, L.M., Cendes, F., 2004. Abnormalities of hippocampal signal intensity in patients with familial mesial temporal lobe epilepsy. *Braz J Med Biol Res*. 37, 827-832.
- Engel Jr. J. (Ed.), *Surgical Treatment of the Epilepsies*. Raven Press, New York, pp511-540.
- Kearney, J.A., Plummer, N.W., Smith, M.R., Kapur, J., Cummins, T.R., Waxman, S.G., Goldin, A.L., Meisler, M.H., 2001. A gain-of-function mutation in the sodium channel gene *Scn2a* results in seizures and behavioral abnormalities. *Neuroscience* 102,307-317.

Kobayashi, E., Lopes-Cendes, I., Guerreiro, C.A.M., Sousa, S.C., Guerreiro, M.M., Cendes, F., 2001. Seizure outcome and hippocampal atrophy in familial mesial temporal lobe epilepsy. *Neurology* 56, 166-172.

Kobayashi, E., Li, M.L., Lopes-Cendes, I., Cendes, F., 2002. MRI evidence of hippocampal sclerosis in asymptomatic first degree relatives of patients with familial mesial temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol.* 59,1891-1894.

Kobayashi, E., D'Agostino, M.D., Lopes-Cendes, I., Berkovic, S.F., Li, L.M., Andermann, E., Andermann, F., Cendes, F., 2003a. Hippocampal atrophy and T2 weighted signal changes in familial mesial temporal lobe epilepsy. *Neurology* 60, 405-409.

Kobayashi, E., D'Agostino, M.D., Lopes-Cendes, I., Andermann, E., Dubeau, F., Guerreiro, C.A., Schenka, A.A., Queiroz, L.S., Olivier, A., Cendes, F., Andermann, F., 2003b. Outcome of surgical treatment in familial mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 44:1080-1084.

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

Plummer, N.W., Meisler, M.H., 1999. Evolution and diversity of mammalian sodium channel genes. *Genomics* 57; 323-331.

Secolin, R., Maurer-Morelli, C.V., Ferreira, R.G.M., Santos, N.F., Kobayashi, E. Marchesini, R.B., Cendes, F., Kriger, H., Lopes-Cendes, I., 2004. Complex Segregation Analysis in Familial Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsia* 45: 224-224, Supp.7 (Abstract).

VanLandingham, K.E., Heinz, E.R., Cavazos, J.E., Lewis, D.V., 1998. Magnetic resonance imaging evidence of hippocampal injury after prolonged focal febrile convulsions. *Ann Neurol.* 43, 413-426.

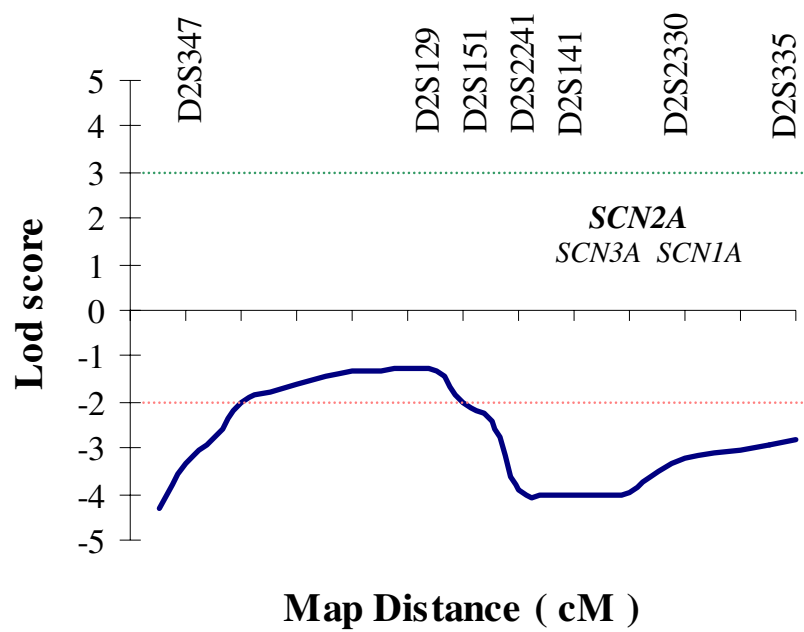
Van Paesschen, W., Revesz, T., Duncan, J.S., King, M.D., Connelly, A., 1997. Quantitative neuropathology and quantitative magnetic resonance imaging of the hippocampus in temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol.* 42, 756-766.

Wieser, H.G., 2004. ILAE Commission on Neurosurgery of Epilepsy. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia.* 45, 695-714.

Table 1: Two-point LOD scores results for seven markers flanking *SCN2A* gene for the two families separately and combined with mesial temporal lobe epilepsy (MTLE).

	Recombination fraction (θ)								
Marker	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40
F10									
D2S347	-3.19	-0.31	0.07	0.23	0.29	0.28	0.24	0.17	0.09
D2S 129	-0.82	0.23	0.49	0.57	0.56	0.49	0.39	0.27	0.15
D2S151	-2.56	-1.35	-0.76	-0.44	-0.24	-0.11	-0.04	-0.00	0.01
D2S2241	-2.68	-1.19	-0.66	-0.38	-0.20	-0.10	-0.05	-0.02	-0.01
D2S141	-3.90	-1.14	-0.62	-0.35	-0.19	-0.10	-0.05	-0.03	-0.02
D2S2330	-0.76	-0.45	-0.29	-0.19	-0.13	-0.08	-0.05	-0.02	-0.01
D2S335	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
F26									
D2S347	-1.68	-0.78	-0.42	-0.24	-0.15	-0.10	-0.07	-0.05	-0.03
D2S 129	-2.62	-1.48	-0.99	-0.65	-0.41	-0.24	-0.12	-0.04	-0.00
D2S151	-1.48	-1.25	-0.99	-0.73	-0.50	-0.32	-0.19	-0.09	-0.04
D2S2241	-1.80	-1.37	-1.03	-0.74	-0.51	-0.33	-0.20	-0.10	-0.04
D2S141	-1.13	-0.75	-0.57	-0.43	-0.33	-0.25	-0.19	-0.14	-0.09
D2S2330	-1.38	-0.99	-0.76	-0.60	-0.47	-0.38	-0.29	-0.21	-0.13
D2S335	-2.51	-1.53	-0.94	-0.58	-0.35	-0.20	-0.11	-0.06	-0.02
F10+F26									
D2S347	-4.87	-1.09	-0.35	-0.01	0.14	0.18	0.16	0.12	0.06
D2S129	-3.44	-1.25	-0.50	-0.08	0.15	0.25	0.27	0.23	0.15
D2S151	-4.04	-2.60	-1.75	-1.16	-0.74	-0.43	-0.23	-0.1	-0.03
D2S2241	-4.48	-2.56	-1.69	-1.12	-0.71	-0.43	-0.24	-0.12	-0.05
D2S141	-5.04	-1.89	-1.19	-0.78	-0.52	-0.35	-0.24	-0.17	-0.11
D2S2330	-2.13	-1.44	-1.06	-0.79	-0.60	-0.46	-0.34	-0.24	-0.14
D2S335	-2.49	-1.52	-0.93	-0.57	-0.34	-0.20	-0.11	-0.05	-0.02

Figure 1



Legend

Figure 1: Multipoint analysis for seven markers flanking *SCN2A* gene in the two families segregating mesial temporal lobe epilepsy (F10+F26).

ARTIGO 3

**LINKAGE STUDY OF VOLTAGE-GATED POTASSIUM
CHANNELS IN FAMILIAL MESIAL TEMPORAL LOBE
EPILEPSY**

Cláudia Vianna Maurer-Morelli, Rafael Breglio Marchesini, Rodrigo Secolin, Neide
Ferreira Santos, Eliane Kobayashi, Fernando Cendes, Iscia Lopes-Cendes.

LINKAGE STUDY OF VOLTAGE-GATED POTASSIUM CHANNELS IN FAMILIAL MESIAL TEMPORAL LOBE EPILEPSY

Cláudia Vianna Maurer-Morelli, MSc¹, Rafael Breglio Marchesini, BSc¹,
Rodrigo Secolin, BSc¹, Neide Ferreira Santos, PhD¹; Eliane Kobayashi, MD,
PhD², Fernando Cendes, MD, PhD²; Iscia Lopes-Cendes MD, PhD^{1*}.

1- Department of Medical Genetics, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP,
Campinas, SP, Brazil

2- Department of Neurology, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Campinas,
SP, Brazil

Corresponding author: Iscia Lopes-Cendes, MD. PhD

Department of Medical Genetics, FCM – UNICAMP

Tessália Vieira de Camargo, 126

Cidade Universitária Zeferino Vaz

Campinas SP, Brazil, CEP 13084-971

TEL: +55 19 3788 8907

FAX: +55 19 3289 1818

e-mail: icendes@unicamp.br

ABSTRACT

Voltage-gated potassium channels (VGKCs) play a critical role in the regulation of neuronal excitability and have been implicated in some types of epilepsies. Recently, autoimmune limbic encephalitis (LE) was associated with antibodies against VGKC. In addition, patients with LE showed partial epilepsy and increased T2 signal abnormalities in limbic structures. We have reported familial mesial temporal lobe epilepsy (FMTLE) associated with hippocampal atrophy (HA) and other signs of mesial temporal sclerosis detected by magnetic resonance imaging (MRI). In order to investigate whether VGKC may be associated to HA present in FMTLE, we perform linkage study in these candidate genes. Seventy-three microsatellites markers were genotyped in different human autosomal chromosome. Two-point LOD scores did not show evidence for linkage with any of the microsatellite markers genotyped ($Z_{\max}$ ranging from 0.11 to 9.53 at $\theta=0.00$). In the present study, linkage data showed no evidence that VGKC are involved in the determination of HA in FMTLE.

Keywords: hippocampal sclerosis, genetics, microsatellites

RESUMO

Canais de potássio voltagem-dependente (CPVD) desempenham um importante papel na excitabilidade neuronal e estão associados a determinados tipos de epilepsia. Recentemente, um tipo de encefalite límbica autoimune (EL) foi associado com anticorpos contra CPVD. Além disso, há relatos de pacientes com EL e epilepsia parcial que apresentam sinal hiperintenso em regiões límbicas detectadas em imagens de ressonância magnética (IRM). Nós descrevemos a epilepsia de lobo temporal mesial familiar (ELTMF) associada à atrofia hipocampal (AH) e outros sinais de esclerose mesial temporal observadas em IRM. Para investigar se os CPVD podem estar associados com a AH identificada na ELTMF, empregamos o estudo de ligação genética nesses genes candidatos. Setenta e três marcadores microssatélites foram genotipados e o LOD *score* de dois pontos mostrou um $Z_{\max}$ variando de 0.11 a -9.53 para $\theta=0.00$. Nossos dados obtidos com a análise de ligação, mostram que os CPVD não estão envolvidos na determinação da AH na ELTMF.

Palavras-Chaves: esclerose hipocampal, genética, marcadores microssatélites.

INTRODUCTION

Epilepsy is a common neurological disorder that affects 1.5 - 2% of world population¹. This condition is characterized by abnormal neuronal hyperexcitability and episodes of synchronized firing by large group of neurons, which clinically manifests as a seizure.

It is well known that voltage-gated potassium channels (VGKC) play an important role in the regulation of neuronal excitability by modulate resting membrane potential and control of the shape and frequency of action potentials. Therefore, mutations in VGKC genes are found in many neurological disorders, including epilepsies. In fact, VGKC have been implicated in some types of idiopathic and symptomatic epilepsies²⁻⁴.

Recently, patients presenting a type of autoimmune limbic encephalitis (LE) showed strong relationship with VGKC-antibodies⁵. LE is associated with memory loss, partial seizures and increased T2 signal abnormalities in limbic structures in magnetic resonance imaging (MRI)⁵⁻⁸. In addition, an immunostaining study showed that hippocampus is a preferential location of VGKC-antibodies in LE⁹.

Hippocampal atrophy (HA) and increased T2 signal in limbic structures are a frequent MRI finding related with mesial temporal sclerosis (MTS) identified in patients with mesial temporal lobe epilepsy (MTLE)¹⁰⁻¹¹. MTLE is the most common partial epilepsy in adults and it is frequently associated with an early-life initial insult, such as a childhood prolonged febrile seizure¹²⁻¹⁴.

We were the first to identify a type of MTLE with clear evident of familial recurrence (FMTLE)¹⁵⁻¹⁷. Although, most of the affected individuals in FMTLE have a benign course of the disease¹⁵ MRI studies showed signs of clear-cut HA in most affected individuals, including patients who had only a single partial seizure as well as in asymptomatic, at risk, first degree relatives¹⁵⁻¹⁸. This evidence supports the idea that a significant genetic predisposition for the development of HA is present in FMTLE. Based on these findings, together with the important association between seizure, VGKC and hippocampal abnormalities, we carried out linkage studies in FMTLE in order to investigate whether VGKC gene may be determining the HA present in these families.

SUBJECTS AND METHODS

Families:

Diagnosis of patients with FMTLE was established in accordance with the ILAE criteria¹⁹. The study cohort is composed of 30 unrelated families segregating MTLE identified in our hospital service. Among these, we have selected two informative kindred for linkage analysis, named F-10 and F-26. A total of 57 individuals, including 29 patients were genotyped. Family ascertainment and detailed clinical description have been published¹⁵. All family members signed an informed consent for this research, which was approved by the Ethics Committee of our institution.

Genetic analysis:

DNA was isolated from lymphocytes of fresh blood by standard methods. A set of 73 polymorphic dinucleotide repeat markers was chosen from the Marshfield Human Genetic Map, flanking 45 VGKC genes identified on different autosomal chromosomes. The sequences and genomic order of these markers are available in the MapViewer database on line (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>). Genotyping of microsatellite markers was accomplished by means of polymerase chain reaction (PCR) using a total volume of 12.5 µl containing 50 ng of genomic DNA; 100 ng of each primer; 200 µM of dGTP, dCTP and dTTP; 25 µM of dATP; 1,5 µCi [³³P]dATP; 0,5 units of *Taq* DNA polymerase and 1.5 mM of MgCl₂. The cycling parameters were as follows: initial denaturation at 94°C for three minutes; 35 cycles of denaturation at 94°C for 45 seconds; annealing at 57°C for 45 seconds; elongation at 72°C for 30 seconds and final extension at 72°C for one minute. PCR products were submitted to electrophoresis on 6% denaturing polyacrylamide gels, which were dried and exposed to X-ray films.

Linkage analysis

Linkage analysis was performed under the assumption of a dominant mode of inheritance with incomplete penetrance. Evidence for a dominant pattern of inheritance with Mendelian transmission was obtained from complex segregation analysis²⁰. Two-point LOD scores were calculated by the MLINK program, version 5.1, of the LINKAGE

computer package for each family separately. The region is considered positive for linkage when $Z_{\max} \geq 3$.

RESULTS

Two-point maximum likelihood data for the 73 markers genotyped are summarized in Figure 1. No significant positive LOD scores were obtained for any of the markers genotyped. LOD scores ranged from 0.11 to -9.53 at $\theta = 0.00$.

DISCUSSION

We have described a type of FMTLE in which most patients present HA not necessarily associated to the occurrence of seizures, suggesting that hippocampal abnormalities may be determined by genetic factors¹⁵⁻¹⁸. Although FMTLE is a well-defined clinically syndrome the gene responsible for this condition has not been identified yet.

VGKC genes are good candidates for epilepsies²¹. It is known that mutations in potassium channel genes are closely associated with disturbance in neuronal firing in humans and animals²²⁻²³. Many recent biochemical, immunological, neuroanatomical and molecular studies have contributed to elucidate the mechanisms by which ion channel subunits are involved in the normal functioning and disease in the mammalian central nervous system²⁴⁻²⁶.

The important description of HA and hyperintense T2 signal on MRI of patients with a type of autoimmune LE related with VGKC antibodies^{5,27} lead us to hypothesize the possible role of VGKC in FMTLE, since these imaging findings (HA and hyperintense T2 signal) are similar in both LE and FMTLE.

Linkage analysis is a powerful screening method to localize major genes responsible for inherited disorders and have contributed to the identification of many genes related with human disorders²⁸⁻²⁹. By this method we can confirm or exclude genetic linkage between selected markers and disease *loci*. Linkage analysis is also useful to investigate well localized candidate genes, which can circumvent extensive and time-consuming wide linkage studies. However, linkage analysis has had limited success when applied to mapping

genes of minor effects or when the number of families is not sufficient to establish linkage. In addition, power to detect linkage is limited when the mode of inheritance is incorrectly specified.

Our study was undertaken in two large and informative families segregating MTLE, in an autosomal dominant mode of transmission²⁰, insuring the success in obtaining significant and reproducible results. In the present study, we did not find any indication of linkage between VGKC and FMTLE, suggesting that potassium channel are not the major gene responsible for the phenotype founded in FMTLE.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to all of the patients and their family members who participated in this study. This study was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil), grants 02/10435-0 and 03/13424-1.

REFERENCES

- 1- Hauser WA, Annegers JF and Kurland LT. Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. *Epilepsia* 1993; 34:453-468.
- 2- Biervert C and Steinlein OK. Structural and mutational analysis of KCNQ2, the major gene locus for benign familial neonatal convulsions. *Hum Genet* 1999; 104:234-240.
- 3 -Lerche H, Jurkat-Rott K and Lehmann-Horn F. Ion channels and epilepsy. *Am J Med Genet* 2001; 106:146-159.
- 4- Roll P and Szepietowski P. Epilepsy and ionic channels. *Epileptic Disord* 2002; 4: 165-172.
- 5- Vincent A, Buckley C, Schott JM, Baker I, Dewar BK, Detert N, et al. Potassium channel antibody-associated encephalopathy: a potentially immunotherapy-responsive form of limbic encephalitis. *Brain* 2004; 127:701-712.
- 6 -Bien CG, Schulze-Bonhage A, Deckert M, Urbach H, Helmstaedter C, Grunwald T, et al. Limbic encephalitis not associated with neoplasm as a cause of temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2000; 55:1823-1828.
- 7- Pozo-Rosich P, Clover L, Saiz A, Vincent A and Graus F. Voltage-gated potassium channel antibodies in limbic encephalitis. *Ann Neurol* 2003; 54:530-533.
- 8- Thieben MJ, Lennon VA, Boeve BF, Aksamit AJ, Keegan M and Vernino S. Potentially reversible autoimmune limbic encephalitis with neuronal potassium channel antibody. *Neurology* 2004; 62:1177-1182.
- 9- Buckley C, Oger J, Clover L, Tuzun E, Carpenter K, Jackson M and Vincent A. Potassium channel antibodies in two patients with reversible limbic encephalitis. *Ann Neurol* 2001; 50:73-78.
- 10- Berkovic SF, Andermann F, Olivier A, Ethier R, Melanson D, Robitaille Y, et al. Hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy demonstrated by magnetic resonance imaging. *Ann Neurol* 1991; 29:175-182.
- 11- Coan AC, Kobayashi E, Lopes-Cendes I, Li LM, Cendes F. Quantification of hippocampal signal intensity in patients with mesial temporal lobe epilepsy. *J Neuroimaging* 2003; 13:228-233.

- 12- Abou-Khalil B, Andermann E, Andermann F, Olivier A and Quesney LF. Temporal lobe epilepsy after prolonged febrile convulsions: excellent outcome after surgical treatment. *Epilepsia* 1993; 34: 878-883.
- 13- Cendes F, Andermann F, Dubeau F, Gloor P, Evans A, Jones-Gotman M, et al. Early childhood prolonged febrile convulsions, atrophy and sclerosis of mesial structures, and temporal lobe epilepsy: an MRI volumetric study. *Neurology* 1993; 43: 1083-1087.
- 14- VanLandingham KE, Heinz ER, Cavazos JE and Lewis DV. Magnetic resonance imaging evidence of hippocampal injury after prolonged focal febrile convulsions. *Ann Neurol* 1998; 43: 413-426.
- 15- Kobayashi E, Lopes-Cendes I, Guerreiro CAM, Sousa SC, Guerreiro MM, Cendes F. Seizure outcome and hippocampal atrophy in familial mesial temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2001; 56: 166-172.
- 16- Kobayashi E, Li ML, Lopes-Cendes I and Cendes F. MRI evidence of hippocampal sclerosis in asymptomatic first degree relatives of patients with familial mesial temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol* 2002; 59:1891-1894.
- 17- Kobayashi E, D'Agostino MD, Lopes-Cendes I, Berkovic SF, Li LM, Andermann E, et al. Hippocampal atrophy and T2 weighted signal changes in familial mesial temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2003; 60:405-409.
- 18- Coan AC, Kobayashi E, Lopes-Cendes I, Li LM and Cendes F. Abnormalities of hippocampal signal intensity in patients with familial mesial temporal lobe epilepsy. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37:827-832.
- 19- Commission on Classification and Terminology of the International League against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* 1989; 30:389-399
- 20- Secolin R, Ferreira RGM, Maurer-Morelli CV, Santos NF, Kobayashi E, Marchesini RB, et al. Complex Segregation Analysis in Familial Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsia* 2004; 45: 224-224, Supp.7.
- 21- Scheffer IE and Berkovic SF. The genetics of human epilepsy. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24:428-433.

- 22- Borgatti R, Zucca C, Cavallini A, Ferrario M, Panzeri C, Castaldo P, et al. A novel mutation in KCNQ2 associated with BFNC, drug resistant epilepsy, and mental retardation. *Neurology* 2004; 63:57-65.
- 23- Otto JF, Yang Y, Frankel WN, Wilcox KS, White HS. Mice carrying the sztl mutation exhibit increased seizure susceptibility and altered sensitivity to compounds acting at the m-channel. *Epilepsia* 2004; 45:1009-1016.
- 24- Catterall WA. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu Rev Biochem* 1995; 64:493-531.
- 25- Trimmer JS and Rhodes KJ. Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain. *Annu Rev Physiol* 2004; 66, 477-519.
- 26- Misonou H, Mohapatra DP and Trimmer JS. Kv2.1: a voltage-gated k⁺ channel critical to dynamic control of neuronal excitability. *Neurotoxicology* 2005; 26:743-752.
- 27- Wieser S, Kelemen A, Barsi P, Vincent A, Borbely C, Rasonyi G, et al. Pilomotor seizures and status in non-paraneoplastic limbic encephalitis. *Epileptic Disord* 2005; 7:205-211
- 28- Lopes-Cendes I, Scheffer IE, Berkovic SF, Rousseau M, Andermann E, Rouleau GA. A new locus for generalized epilepsy with febrile seizures plus maps to chromosome 2. *Am J Hum Genet* 2000; 66:698-701.
- 29- Berkovic SF, Serratosa JM, Phillips HA, Xiong L, Andermann E, Diaz-Otero F, et al. Familial partial epilepsy with variable foci: clinical features and linkage to chromosome 22q12. *Epilepsia* 2004; 45:1054-1060.

Figure 1: Voltage-gated potassium channels genes studied by linkage analysis. LOD scores ranged from 0.11 to -9.53 for the 73 microsatellites markers genotyped.

ARTIGO 4

**GENOME-WIDE LINKAGE STUDY IDENTIFIES A LOCUS FOR
FAMILIAL MESIAL TEMPORAL LOBE EPILEPSY WITH
HIPPOCAMPAL ATROPHY.**

Cláudia Vianna Maurer-Morelli, Rodrigo Secolin, Romênia R Domingues, Rafael Breglio

Marchesini, Neide Ferreira Santos, Eliane Kobayashi, Fernando Cendes,

Iscia Lopes–Cendes.

GENOME-WIDE LINKAGE STUDY IDENTIFIES A LOCUS FOR FAMILIAL MESIAL TEMPORAL LOBE EPILEPSY WITH HIPPOCAMPAL ATROPHY.

Cláudia Vianna Maurer-Morelli¹, Rodrigo Secolin¹, Romênia R Domingues¹, Rafael Breglio Marchesini¹, Neide Ferreira Santos¹, Eliane Kobayashi², Fernando Cendes²; Iscia Lopes-Cendes^{1*}.

1- Department of Medical Genetics, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

2- Department of Neurology, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

Running Title: Genome-Scan in Focal Epilepsy

Keywords: candidate locus, genetics, microsatellites, linkage study, hippocampal sclerosis

Corresponding author: Iscia Lopes-Cendes, MD. PhD

Department of Medical Genetics, FCM – UNICAMP

Tessália Vieira de Camargo, 126

Cidade Universitária Zeferino Vaz

Campinas SP, Brazil, CEP 13084-971

TEL: +55 19 3788 8907

FAX: +55 19 3289 1818

e-mail: icendes@unicamp.br

Abstract

Previously, we have described several kindreds segregating a type of focal epilepsy characterized by clinical evidence of seizure onset in the temporal lobes associated with abnormalities in mesial temporal lobe structures, mainly hippocampal atrophy (HA). In addition, complex segregation analysis in these families showed evidence for the presence of a major locus segregating in an autosomal dominant pattern. In order to identify the region harboring the main gene predisposing to familial mesial temporal lobe epilepsy (FMTLE), we performed a genome-wide linkage study in a single large family with 13 affected individuals. A total of 345 microsatellite markers were genotyped along the 22 autosomal chromosomes and initial evidence of linkage was sought two-point LOD scores. A single significant positive LOD score was identified on chromosome 18p11.3-11.2 with a $Z_{\max}$ of 3.63 at $\theta = 0.0$ for the marker on D18S976 locus. Furthermore, multipoint and haplotype analyses localized the candidate locus within a 6 cM interval flanked by D18S976 and D18S452. This is the first conclusive evidence that HA may be caused by genetic factors, which can have major implications in the study of the pathophysiological mechanisms underlying abnormalities in mesial temporal lobe structures and its relationship with epilepsy.

Introduction

Mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) is the most common and severe form of focal epilepsy and it is frequently associated with the pathological finding of mesial temporal sclerosis (MTS). One of the major components of MTS is hippocampal sclerosis which is characterized by severe segmental neuronal loss in CA1, CA3 and hilar region accompanied by pronounced astrogliosis¹⁻². The association between MTLE and MTS has been well established; as well as the use of hippocampal atrophy (HA), observed on magnetic resonance imaging (MRI), as an *in vivo* surrogate marker of MTS³⁻⁵. Although the precise pathogenesis of HA and its relationship with MTLE is not completely clarified, these events have been frequently associated with environmental predisposing factors, specially an increased incidence of prolonged childhood febrile seizures⁶⁻⁷.

In 2001 we described a type of MTLE associated with HA with evident familial recurrence and low frequency of febrile seizures⁸. In familial MTLE most affected individuals have a benign course of the disease⁸, but HA, identified by MRI, was observed in 70% of individuals, including those with a single focal seizure, seizure remission⁹ as well as 34% of asymptomatic first-degree relatives of patients with FMTLE¹⁰. These observations suggest that the HA, at least in this familial form of MTLE, have a significant genetic predisposition and it is not necessarily associated to seizures^{8,11}.

In order to identify the candidate region harboring the main gene associated with HA in familial MTLE we performed a genome-wide linkage study.

Methods

Families:

Family ascertainment and data collection have been described in detail previously⁸. Briefly, familial MTLE was defined when two or more individuals presented the diagnosis of MTLE. The diagnosis of MTLE was based on clinical and electroencephalographic (EEG) findings as defined by the International League Against Epilepsy (ILAE) criteria¹². The complete cohort is composed of 30 unrelated families segregating MTLE. Among these we selected one informative kindred for linkage analysis, named F-10. A total of 25

individuals, including 11 patients were genotyped. Family members were classified into three phenotypic classes: 1) *affected*: individuals with HA detected by MRI, 2) *unaffected*: individuals with no seizures or a single seizure, but who had normal MRI and 3) *unknown*: individuals with no phenotypic information, mainly deceased relatives and individuals married-into the family. Prior to enrollment, all family members provided informed consent which was approved by the Ethics Committee of our institution.

Genotyping:

DNA was isolated from peripheral lymphocytes of fresh blood by standard methods¹³. DNA samples were initially genotyped for an in-house customized panel of 332 microsatellite markers at ~12cM intervals throughout the 22 autosomal chromosomes. Microsatellite markers were chosen from the sex-average map of the Marshfield Human Genetic Map with a polymorphism information content (PIC) $\geq 75\%$. The correct orientation of markers was obtained using the NCBI Map Viewer. Genotyping was carried out using capillary electrophoresis on MegaBACETM 1000 96-capillary sequencers (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). The fluorescent dye-labeled primers (FAMTM, VICTM, NEDTM) were customized or choose from the MD10 panel set (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Samples amplified by PCR and labeled with different dyes were pooled in a final volume of 40µl H₂O (1:20 for FAMTM, 1:20 for VICTM and 1:10 for NEDTM) in a 96-wells plate. Of this mix, 2µl were transferred to a MegaBACE 96-wells plate and mixed with 8 µl of a loading solution (for each reaction: 7.75µl of 0,1% Tween 20 in H₂O + 0.25 µl of internal size standard labeled with ROXTM dye, ET-550R (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Before loading, samples were denatured at 95°C for 3 min. The injection parameters used were 45 seconds at 3 kV and samples were run for 65 minutes at 10 kV. Automatic calling of genotypes was based in the Fragment Profiler Software v1.2 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

Fine Mapping

Thirteen additional markers were genotyped on chromosome 18p in order to refine the candidate region: telomere, D18S476, D18S1098, D18S481, D18S1154, D18S52,

D18S1132, D18S976, D18S1376, D18S967, D18S1163, D18S464, D18S1150 and D18S1158, centromere.

Linkage Analysis

Linkage analysis was performed under the assumption of a dominant mode of inheritance with incomplete penetrance and a gene frequency of 0.001. Evidence for a dominant pattern of inheritance with Mendelian transmission was obtained from previous complex segregation analysis¹⁴. Two-point LOD scores were calculated by the MLINK program, version 5.1, from the LINKAGE computer package¹⁵. In order to further narrow the candidate region on chromosome 18p we carried out a multilocus linkage analysis using the LINKMAP support program from the LINKAGE package.

Mutation Screening in Candidate Genes

Nine primer pairs were designed in order to amplify the coding exons of two candidate genes: *TGIF* (MIM 602630) and *ZFP161* (MIM 602126). DNA samples of the six patients and six controls were screened for mutations by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) which was carried out with the WAVE® 4500 system (Transgenomic, San Jose, CA). PCR was performed in 20µl containing 5µM of each specific primers, 200µM of each dNTP, 0.5 units of Taq DNA polymerase, 1 X buffer, 1.5 mM MgCl₂ and 50ng DNA. Amplicons were checked by agarose gel electrophoresis preceding DHPLC analysis. PCR products were denatured at 95°C for 5 minutes and allowed to cool slowly to room temperature over 40 minutes prior to DHPLC analysis. The composition of buffers used for DHPLC was: buffer A – 0.1M triethylammonium acetate (TEAA) and buffer B- 0.1M 25% acetonitrile in TEAA. Aliquots of 5µl of each PCR products were eluted from a DNASep® column (Transgenomic, San Jose, CA) at a flow rate of 0.9ml/min. Mutation screening was performed under partial denaturing conditions at different ideal running temperatures for each PCR fragment based on the WAVEMAKERTM software (Transgenomic). DHPLC data analysis was conducted on visual inspection of the chromatogram profiles and comparison with normal controls.

Sequencing Analysis

To identify the chromatogram profiles variation observed in the amplicons submitted to the DHPLC, PCR products were purified using EXOSAP (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) according to the manufacturer's instructions and sequenced in both directions on an ABI 310 automated sequencer, using Big-Dye terminator chemistry (Applied Biosystems, Foster City, CA), according to the manufacturer's instructions. Sequences obtained were aligned using *MultiAlin* program. In addition, variant genotypes were distinguished by direct comparison with the wild-type chromatograms profiles.

Results

Genome-wide linkage study is summarized in Figure 1. We found only a single significantly positive LOD score on chromosome 18p11.3-11.2. Fine mapping of the candidate region identified a Z_{max} of 3.63 at $\theta = 0.0$ for marker on D18S976 locus (Table 1). Multipoint and haplotype analysis showed recombination events localizing the critical candidate region within a 6 cM region between D18S976 and D19S452 (Figure 2). No other significantly positive LOD scores were detected for this family in the entire genome.

In addition we screened two candidate genes which mapped to chromosome 18p11.3-11.2 within the candidate region: *ZFP161* and *TGIF*. Two abnormal DHPLC profiles were found in 2 controls in exon 4d of the *ZFP161* gene. In the *TGIF* gene we found 3 abnormal chromatogram profiles in patients and controls. Sequencing of samples with the abnormal DHPLC profiles failed to show sequence variants that could be unequivocally related to a pathological effect in the two candidate genes. Examples of DHPLC profiles and their corresponding sequences are shown in the Figures 3 and 4. Only the variant C487T in exon 3a of the *TGIF* gene, which was found only in one control, promotes alteration in the protein sequence, changing Pro163Ser, all the remaining sequence variants are synonymous changes (G1170 in the exon 4d of the *ZFP161* gene and A487G, C576T in exon 3a of the *TGIF* gene).

Discussion

Genetic predisposition to epilepsy has been predicted for many years¹⁶⁻¹⁷; however, only in the past two decades, the progress in molecular genetics has contributed to identify many loci and genes predisposing to different epilepsies syndromes¹⁸. It is interesting to note that, most of the genes identified for epilepsy encode molecular components of neuronal signaling, such as ion channels¹⁹⁻²⁰.

Genetic mapping by linkage analysis is a powerful tool to localize major genes responsible for diseases, including may monogenic epilepsy syndromes²¹⁻²³; however, in order to obtain reliable results it is crucial the ascertainment of informative families with a large number of affected individuals, a well defined mode of inheritance, as well as the correct classification of phenotype in individual patients. In the present study we were able to ascertain one large family segregating a well established phenotype⁸ and with strong evidence for a monogenic inheritance (most likely autosomal dominant)¹⁴. In addition, for the phenotypic definition of the affection status we used the presence of HA, on MRI⁹⁻¹¹, which was determined by precise quantitative measurements. In this scenario it is interesting to note that we did not have any false positive result in our genome search and only significantly positive LOD scores were found within the candidate region identified on chromosome 18p11.3-11.2, clearly showing the power and sensitivity of linkage analysis in identifying major loci predisposing to disease.

Furthermore we determined that the candidate locus on 18p11.3-11.2 contains twelve genes potentially associated with central nervous system (CNS) development and function, which could have a role in FMTLE. We select two of these candidate genes for initial mutation screening: *ZFP161* and *TGIF*. The *ZPF161* gene is involved in CNS development and was recently pointed out as a candidate gene for holoprosencephaly (MIM 142946)²⁴⁻²⁵. Whereas, the *TGIF* gene plays a role in directing cellular differentiation processes and in determining cell fate during CNS development, it is expressed during early brain development in mice and may participate in the transmission of nuclear signals during development²⁶⁻²⁷. Mutations in the *TGIF* gene are associated with human holoprosencephaly and others abnormalities including agenesis of the corpus callosum, microcephaly and developmental delay²⁸. Since HA in patients with FMTLE could be

caused by abnormalities in the hippocampal formation during CNS development we chose to screen *ZFP161* and *TGIF* genes as our initial candidate genes²⁹.

We took advantage of the DHPLC mutation screening method as a high throughput technique that analyzes DNA mobility of different heteroduplexes using chromatography in partial denaturing condition³⁰⁻³¹. Because DHPLC is a very sensitive method, we detect different chromatogram profiles related to several variant alleles, which were subsequently confirmed by direct sequence analysis. However, none of the sequence variants found could be unequivocally related to the FMTLE phenotype. In this way, the G1170T variant identified in exon 4d of the *ZFP161* gene is most likely a neutral variant, because no change was found at the protein level, as demonstrated by alignment using SIM+LALNVIEW software. In addition, this variant was found only in one unaffected individual. The A/G variant in exon 4d of the *ZFP161* was located in a not transcribed region and present in unaffected individual. The C576T and A487G variant alleles detected in exon 3a of the *TGIF* gene are synonymous single nucleotide polymorphism (SNP) previously described (rs2229335 and rs2229334, respectively). The C489T variant found on exon 3a of the *TGIF* gene is a nonsynonymous SNP (rs2229333), which change Pro/Ser; however, it was present only in one unaffected individual unrelated to the family.

In conclusion, we identify a candidate locus for FMTLE on chromosome 18p11.3-11.2 and suggested that the major gene predisposing to the disease is probably related with the hippocampal abnormalities observed in our patients. This is the first conclusive evidence that HA may be caused by genetic factors that could be related to abnormal developmental events. Further mutation screening in candidate genes located within the 18p11.3-11.2 locus will be necessary in order to identify the gene responsible for the disease, thus providing a better understanding of the molecular mechanisms underlying MTS and its relationship with MTLE.

Acknowledgments

This study was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil), grants 02/10435-0 and 03/13424-1. We are grateful to our patients and their families for their helpful cooperation.

Appendix

Table showing the primer sequence and conditions of the DHPLC analysis for each exon of the two genes submitted to the screening mutation.

<i>Exon</i>	<i>Primer Sequence 5'→3'</i>	<i>DHPLC Temp</i>	<i>%Buffer B</i>
<i>ZFP161</i> gene			
ZFP3	Fw-CCTTAATGGTTCTCCAACC Rv-GTTACCATGAACAACCTCAGGC	54.5°C	55.6%
ZFP4a	Fw-GTGACTGTGTTCTCTATATGG Rv-TGACCCGATGACATCATTAAG	53.5°C 56.1°C 57.5°C	56.1% 53.6% 51.1%
ZFP4b	Fw-GTACACAGCAAAGATTTCCGT Rv-CCCAAGTCTTTTGATTCTGG	57.3°C 59.8°C 62.0°C	55.9% 53.3% 51.6%
ZFP4c	Fw-CAGGAAGTAGAATCCATGGAG Rv-GCACGCAAACGGTCTTTCATT	58.4°C 60.3°C	55.5% 52.8%
ZFP4d	Fw-GTAATGAAAGACCGTTTGCGTG Rv-AACCAAGCACTGCCTTAAGTC	60.0°C 62.8°C	54.6% 52.2%
<i>TGIF</i> gene			
TGIF1	Fw-ACTGACAGGTCTAGAGACAC Rv-TGTTCTTGAGAGTTCCTCG	61.9°C 64.8°C 66.4°C	59.4% 56.4% 55.7%
TGIF2	Fw-GTTACATTGAATGGTCAGCG Rv-ATGCATCCATAAACCTCACGC	59.0°C 60.7°C	54.5% 52.7%
TGIF3a	Fw-GAACATTCTCAGAACCCGTTG Rv-CCGCTATCTGCTGTATATC	58.5°C 60.5°C	57.4% 55.6%
TGIF3b	Fw-CGAATACACAGAGTGGTCT Rv-CCGGCAATCATGACATTCTG	59.5°C 60.5°C	52.0% 51.1%

Web Resources

Marshfield Human Genetic Map, <http://www.research.marshfieldclinic.org/genetics>

NCBI Map Viewer, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>.

MultAlin at INRA, <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>

SIM at LALNVIEW, <http://www.expasy.org/tools/sim-prot.html>

References

- 1-Blumcke I, Suter B, Behle, K, Kuhn R, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD (2000) Loss of hilar mossy cells in Ammon's horn sclerosis. *Epilepsia* 41:174-180.
- 2-Babb TL, Brown WJ (1987) Pathological findings in epilepsy. In: Engel J, Jr. (ed) *Surgical treatment of the epilepsies*. New York, Raven Press, pp511-540.
- 3-Van Paesschen W, Revesz T, Duncan JS, King MD, Connelly A (1997) Quantitative neuropathology and quantitative magnetic resonance imaging of the hippocampus in temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 42:756-766.
- 4-Cendes F, Andermann F, Gloor P, Evans A, Jones-Gotman M, Watson C, Melanson D, Peters, T., Lopes-Cendes, I (1993) MRI volumetric measurement of amygdala and hippocampus in temporal lobe epilepsy. *Neurology* 43, 719-725.
- 5-Berkovic SF, Andermann F, Olivier A, Ethier R, Melanson D, Robitaille Y, Kuzniecky R, Peters T, Feindel W (1991) Hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy demonstrated by magnetic resonance imaging. *Ann Neurol* 29:175-182.
- 6-Abou-Khalil B, Andermann E, Andermann F, Olivier A, Quesney LF (1993) Temporal lobe epilepsy after prolonged febrile convulsions: excellent outcome after surgical treatment. *Epilepsia* 34:878-883.
- 7-VanLandingham KE, Heinz ER, Cavazos JE, Lewis DV (1998) Magnetic resonance imaging evidence of hippocampal injury after prolonged focal febrile convulsions *Ann Neurol* 43: 413-426.
- 8- Kobayashi E, Lopes-Cendes I, Guerreiro CAM, Sousa SC, Guerreiro MM, Cendes F (2001) Seizure outcome and hippocampal atrophy in familial mesial temporal lobe epilepsy. *Neurology* 56:166-172.
- 9- Kobayashi, E., D'Agostino, M.D., Lopes-Cendes, I., Berkovic, S.F., Li, L.M., Andermann, E., Andermann, F., Cendes, F. Hippocampal atrophy and T2 weighted signal changes in familial mesial temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2003; 60, 405-409.
- 10- Kobayashi E, Li M Li, Lopes-Cendes I, Cendes F. MRI evidence of hippocampal sclerosis in asymptomatic first degree relatives of patients with familial mesial temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol*. 2002; 59 (12):1891-1894.

- 11- Coan AC, Kobayashi E, Lopes-Cendes I, Li LM, Cendes F. Abnormalities of hippocampal signal intensity in patients with familial mesial temporal lobe epilepsy. *Braz J Med Biol Res.* 2004; 37(6):827-832.
- 12- Commission on Classification and Terminology of the International League against Epilepsy (1989) Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* 30:389-399.
- 13- Sambrook J, Fritsch ES, Maniatis T(eds). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* (1989) 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, E3-E4.
- 14- Secolin R, Maurer-Morelli, CV, Ferreira RGM, Santos NF, Kobayashi E, Marchesini RB, Cendes F, Kriger H, Lopes-Cendes I (2004) Complex Segregation Analysis in Familial Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsia* 45: 224-224, Supp.7 (Abstract).
- 15- Ott J (1974) Estimation of the recombination fraction in human pedigrees: efficient computation of the likelihood for human linkage studies. *Am J Hum Genet* 26:588-597.
- 16- Lennox WG. Heredity of epilepsy as told by relatives and twins. *JAMA* 1951;146: 529-536.
- 17- Metrakos JD and Metrakos K. Genetics of convulsive disorder: II- Genetic and electroencephalographic studies in centrencephalic epilepsy. *Neurology* 1961; 11: 474-483.
- 18-Ottman R (2001) Progress in the genetics of the partial epilepsies. *Epilepsia* 42:(Suppl.5)24-30.
- 19-Lerche H, Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F (2001) Ion channel and epilepsy. *Am J Med Genet* 106: 146-159.
- 20-Meisler HM, Kearney J, Ottman R, Escayg A (2001) Identification of epilepsy genes in human and mouse. *Ann Rev Genet* 35:567-588.
- 21- Winawer MR, Martinelli Boneschi F, Barker-Cummings C, Lee JH, Liu J, Mekios C, Gilliam TC, Pedley TA, Hauser WA, Ottman R. Four new families with autosomal dominant partial epilepsy with auditory features: clinical description and linkage to chromosome 10q24. *Epilepsia.* 2002; 43(1):60-67.
- 22- Szepetowski P, Rochette J, Berquin P, Piussan C, Lathrop G M, Monaco AP. Familial infantile convulsions and paroxysmal choreoathetosis: a new neurological syndrome linked

to the pericentromeric region of human chromosome 16. *Am J Hum Genet.* October 1997; 61(4): 889–898.

23- Berkovic SF, Serratosa JM, Phillips HA, Xiong L, Andermann E, Diaz-Otero F, Gomez-Garre P, Martin M, Fernandez-Bullido Y, Andermann F, Lopes-Cendes I, Dubeau F, Desbiens R, Scheffer IE, Wallace RH, Mulley JC, Pandolfo M. Familial partial epilepsy with variable foci: clinical features and linkage to chromosome 22q12. *Epilepsia.* 2004; 45(9):1054-60.

24-Sobek-Klocke I, Disque-Kochem C, Ronsiek M.; Klocke R, Jockusch H.; Breuning A, Ponstingl H, Rojas K, Overhauser J, Eichenlaub-Ritter U (1997) The human gene ZFP161 on 18p11.21-pter encodes a putative c-myc repressor and is homologous to murine Zfp161 (chr 17) and Zfp161-rs1 (X chr). *Genomics* 43: 156-164.

25- Lee KH, Kwak YD, Kim DH, Chang MY, Lee YS, Lee YS (2004) Human zinc finger protein 161, a novel transcriptional activator of the dopamine transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 313(4):969-976.

26-Bertolino E, Reimund B, Wildt-Perinic D, Clerc RG (1995) A novel homeobox protein which recognizes a TGT core and functionally interferes with a retinoid-responsive motif. *J. Biol Chem* 270: 31178-31188.

27-Bertolino E, Wildt S, Richards G, Clerc RG (1996) Expression of a novel murine homeobox gene in the developing cerebellar external granular layer during its proliferation. *Dev Dyn* 205: 410-420.

28- Gripp KW, Wotton D, Edwards MC, Roessler E, Ades L, Meinecke P, Richieri-Costa A, Zackai EH, Massague J, Muenke M, Elledge SJ (2000) Mutations in TGIF cause holoprosencephaly and link NODAL signalling to human neural axis determination. *Nat Genet* 25(2):205-8.

29- Lee KH, Lee YS (2004) Cloning and characterization of zinc finger protein 161 in *Rattus norvegicus*. *DNA Seq* 15:310-313.

30-Xiao W, Oefner PJ (2001) Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat* 17(6):439-74.

31-Choy YS, Dabora SL, Hall F, Ramesh V, Niida Y, Franz D, Kasprzyk-Obara J, Reeve MP, Kwiatkowski DJ (1999) Superiority of denaturing high performance liquid chromatography over single-stranded conformation and conformation-sensitive gel

electrophoresis for mutation detection in TSC2. Ann Hum Genet 63 (Pt 5):383-91.

Table

Table 1: Two-point LOD scores results for the markers genotyped in fine mapping in family with mesial temporal lobe epilepsy (FMTLE).

Marker	Recombination fraction (θ)								
	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40
F10									
D18S476	-0.27	0.21	0.38	0.43	0.43	0.38	0.30	0.21	0.11
D18S1098	1.54	1.38	1.22	1.05	0.87	0.69	0.50	0.32	0.16
D18S481	0.19	1.19	1.37	1.36	1.24	1.06	0.83	0.58	0.31
D18S1154	-1.32	-0.28	0.04	0.19	0.25	0.26	0.23	0.18	0.12
D18S52	0.31	1.18	1.36	1.35	1.24	1.07	0.84	0.59	0.33
D18S1132	0.14	1.10	1.28	1.27	1.16	0.98	0.76	0.51	0.27
D18S976	3.63	3.31	2.97	2.62	2.25	1.85	1.43	1.00	0.56
D18S1376	0.02	0.01	0.01	0.00	-0.00	0.00	0.00	0.01	0.01
D18S452	2.20	2.39	2.29	2.10	1.84	1.54	1.20	0.84	0.47
D18S967	0.74	0.65	0.56	0.46	0.37	0.28	0.19	0.11	0.05
D18S1163	-0.53	-0.23	-0.10	-0.04	-0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
D18S464	-0.08	-0.06	-0.05	-0.04	-0.03	-0.02	-0.01	-0.00	0.00
D18S1150	-2.88	-1.52	-0.99	-0.64	-0.39	-0.23	-0.11	-0.04	-0.00
D18S1158	-0.61	-0.52	-0.41	-0.30	-0.20	-0.12	-0.06	-0.02	-0.00

Legend for figures

Figure 1: Results for the 332 microsatellites markers genotyped in genome-wide linkage study for family segregating MTLE.

Figure 2: Haplotype analysis of typed individuals for 14 markers localized in the chromosome 18p. The haplotype inherited from affected individuals is represented by blackened vertical bars. Nonparticipating family members are not shown.

Figure 3: Chromatograms of DHPLC analysis corresponding to exon 4d of *ZFP161* gene (left panel) and direct sequencing of genomic DNA (right panel). A- Example of a common chromatogram profiles found in affected and unaffected individuals and a distinct alterations found only in one normal control (*), which correspond to the variant allele A/G in the direct sequence (this variant occurs in no transcript region). B- Common chromatogram profiles and a distinct alterations found in other normal control (**), which correspond to the G1170T in the direct sequence.

Figure 4: Left panel: Four different DHPLC profiles in exon 3a of *TGIF* gene. Profile (a) was found only in one affected individual; profiles (b) and (c) were found in both, affected and normal controls; profile (d) was found only in one unrelated normal control. Right panel: Direct sequence of genomic DNA showed: profile (a) is associated with the C576T (rs2229335); no variant allele was found in the profile (b); profile (c) is related to the synonymous alteration: A487G (rs2229334); profile (d) is related to variant alleles: A487G (rs2229334) and C489T (rs2229333).

Figures

Figure 1

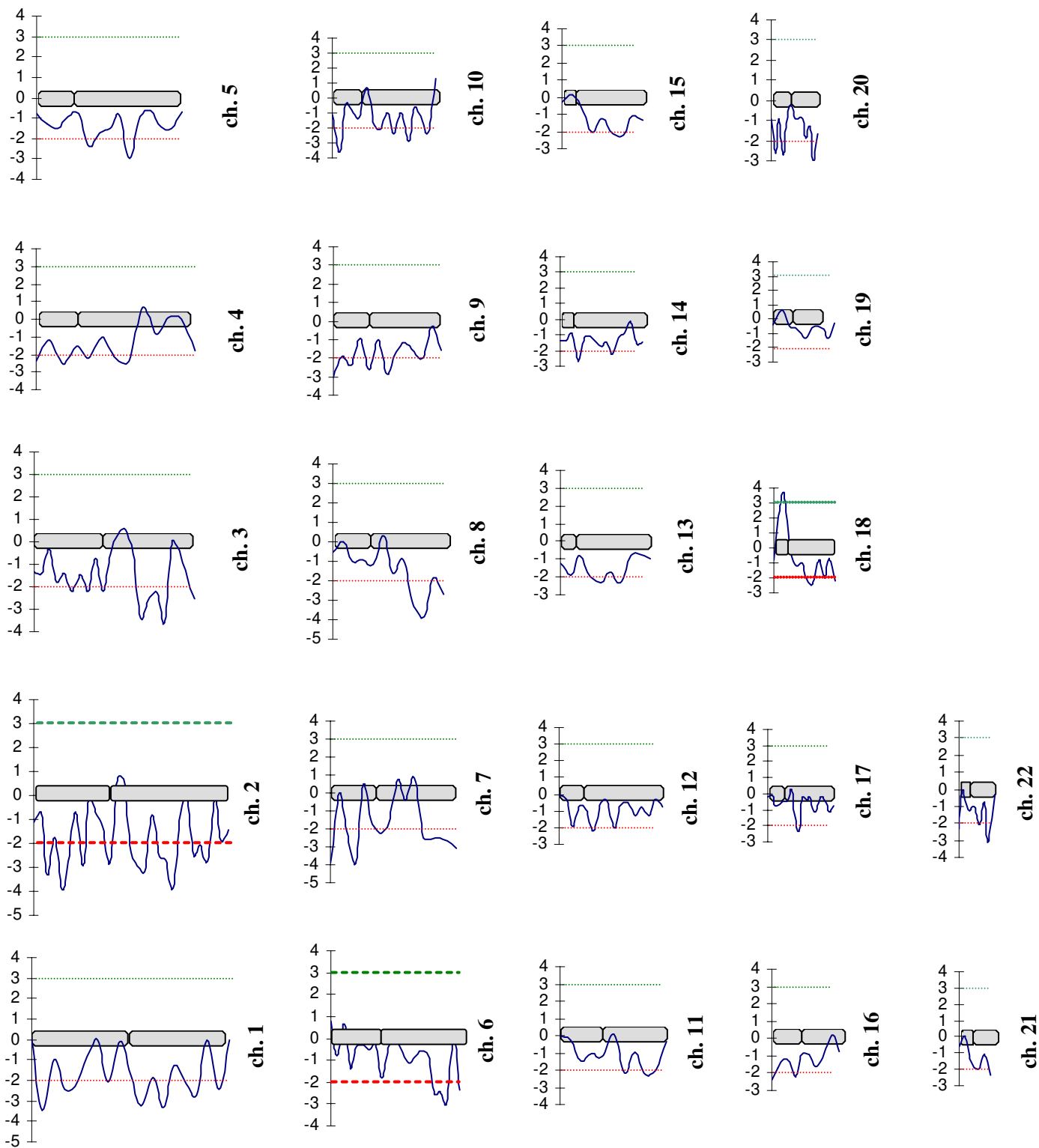


Figure 2

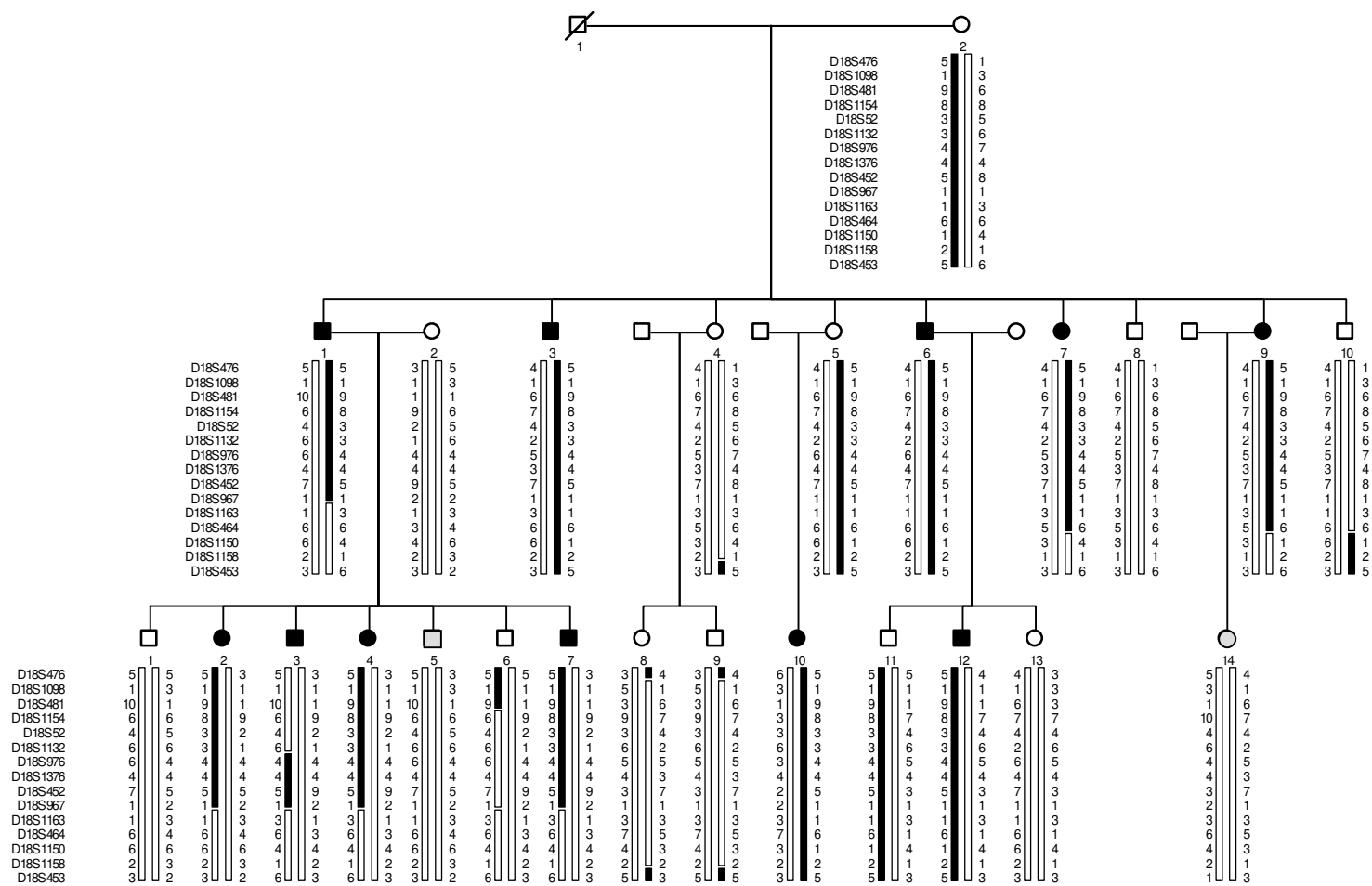


Figure 3

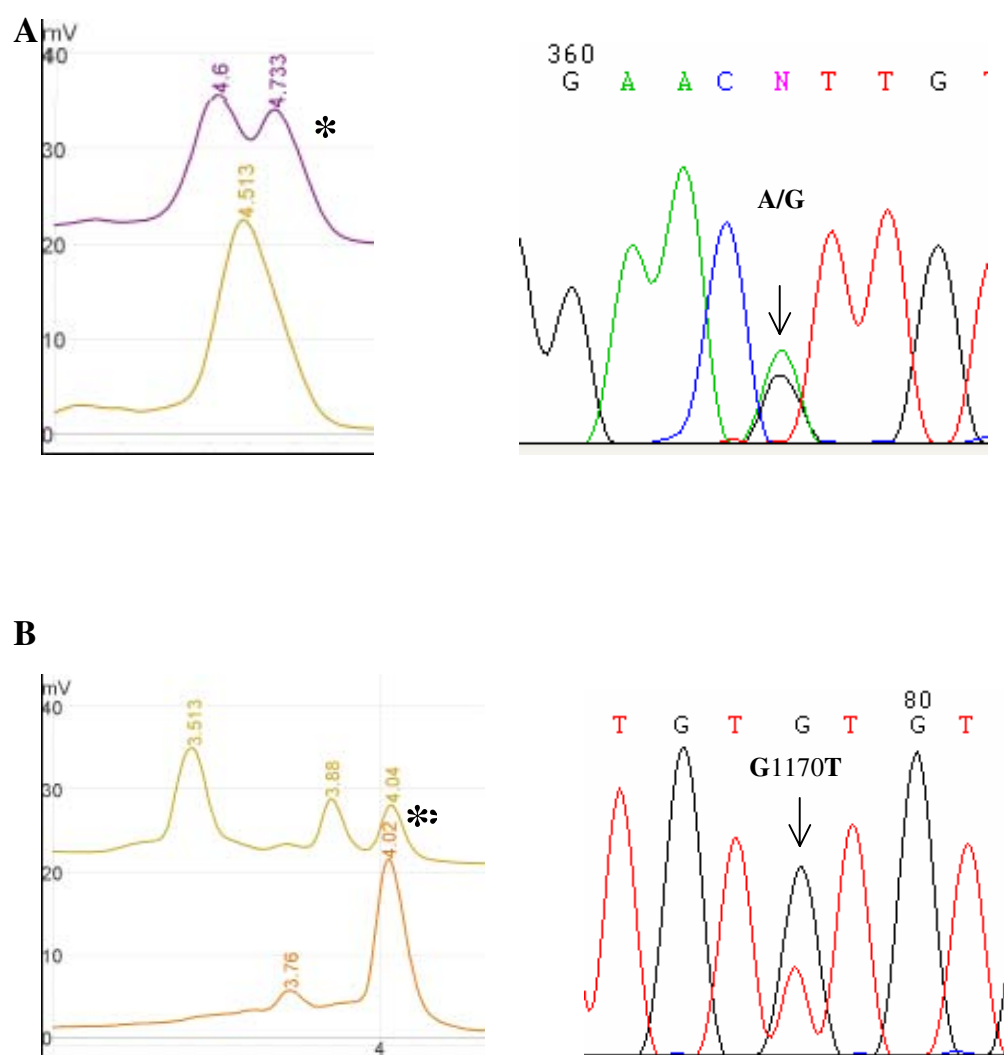
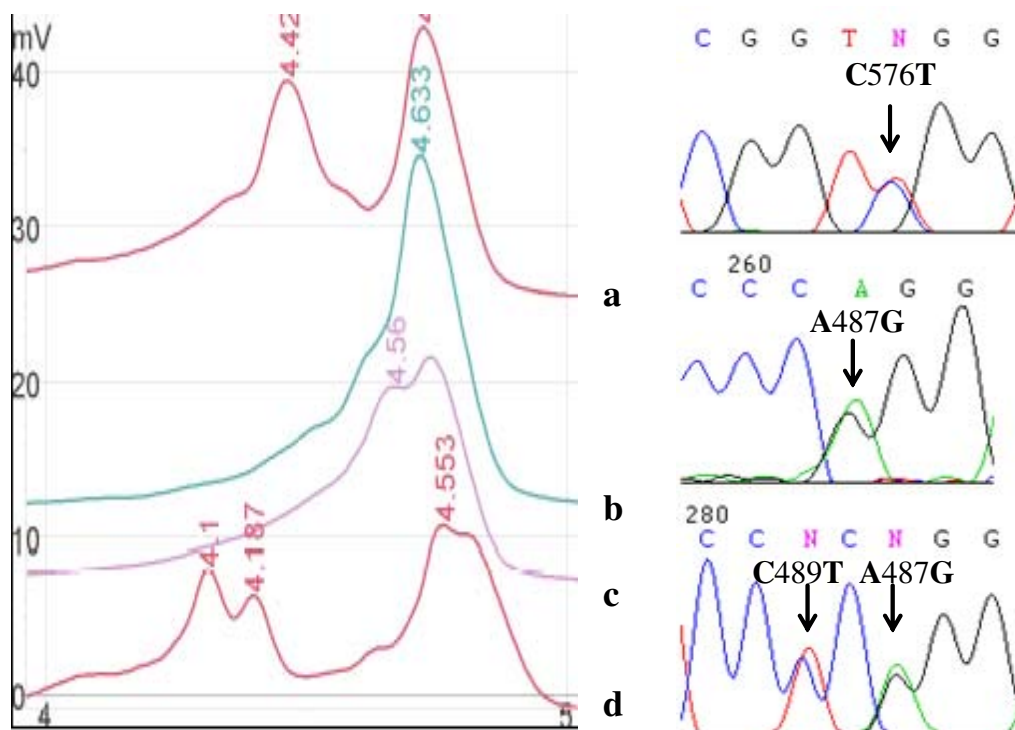


Figure 4



7 – DISCUSSÃO

A identificação de um tipo distinto de ELTM com recorrência familiar associada à AH (Kobayashi et al., 2001) evidenciou pela primeira vez uma possível predisposição genética para as anormalidades estruturais observadas na ELTM, ao menos na forma familiar da ELTM.

Para investigar se o fenótipo observado nessas famílias poderia ser determinado por um componente genético nós empregamos a análise de segregação complexa, como descrita no artigo 1.

A análise de segregação é uma importante ferramenta que tem contribuído para a determinação do padrão de herança em diferentes síndromes epiléticas (Jarvik, 1998; Ottman et al., 1995; Callenbachet al., 2005). Muito embora Berkovic et al. (1996) tenha proposto que a ELT na forma familiar e sem anormalidades hipocampais, seja de caráter autossômico dominante, não temos conhecimento sobre estudos de análise de segregação realizados em ELTMF. Este tipo de análise é importante não somente para confirmar um fenótipo hereditário, mas também para compor os parâmetros utilizados no estudo de ligação.

Os dados obtidos com a análise de segregação corroboraram as observações iniciais de que a AH observada na ELTMF tem um caráter genético e sugerem a presença de um gene principal segregando em um padrão de herança autossômico dominante, com transmissão Mendeliana nestas famílias. No entanto, é importante ressaltar que nossos resultados também demonstraram que não podemos descartar as evidências de que genes modificadores do fenótipo possam estar modulando as características clínicas e determinando as diferenças na gravidade da doença que são vistas nos pacientes com ELTMF (Kobayashi et al., 2001; 2002). Esses dados mostram a complexidade dos fatores genéticos que podem influenciar a ELTMF.

Uma vez que tenha ficado evidente uma forte predisposição genética na ELTMF associada à AH com a presença de um gene maior, partimos para a busca do mesmo utilizando inicialmente genes candidatos com relevante papel na fisiopatologia desta síndrome.

Os canais de sódio voltagem-dependente (CSVD) são uma das principais vias para a excitabilidade neuronal, portanto qualquer alteração que promova uma modificação nestes canais poderá levar a alteração da excitabilidade cerebral. De fato, mutações em genes codificadores de CSVD estão associadas com desordens neurológicas como as epilepsias (Berkovic et al., 2004; Fukuma et al., 2004; Spanpanato et al., 2004). Uma das alterações comumente encontrada é a persistência de correntes de sódio que contribui para a hiperexcitabilidade neuronal. Um alvo comum das drogas anti-epilépticas, a persistência de correntes de sódio está associada com a susceptibilidade às crises e à resistência ao tratamento medicamentoso em pacientes com ELT (Vreugdenhil et al., 2004).

A subunidade alfa transmembrana do CSVD é responsável pela atividade funcional deste canal. Dos três tipos de subunidades alfa expresso no sistema nervoso central (SNC), a subunidades alfa do tipo II (*SCN2A*) é a mais amplamente expressa em neurônios (Litt et al., 1989). Mutações em *SCN2A* têm sido descritas tanto para as epilepsias esporádicas bem como para as epilepsias familiares (Berkovic et al., 2004; Ito et al., 2004; Kamiya et al., 2004). Kearney et al., 2001 descreveram um camundongo transgênico cuja mutação no gene *Scn2a* promoveu a diminuição da inativação dos CSVD com conseqüente persistência de corrente nesses canais (Kearney et al., 2001). Interessantemente, esses camundongos apresentaram perda celular nas regiões CA1, CA2, CA3 e hilus, com reação de gliose, uma lesão hipocampal semelhante àquela encontrada em pacientes com ELTM.

Foi com base nessas observações que investigamos em nosso segundo artigo se o gene *SCN2A* desempenha alguma função na etiologia da ELTMF. As análises de dois pontos e de multipontos resultaram na exclusão do gene *SCN2A* como candidato para ELTMF. Igualmente, foram excluídos outros dois CSVD que estão expressos em altos níveis no SNC (*SCN1A* e *SCN3A*) e estão adjacentes ao gene *SCN2A* (Plummer e Meisler, 1999). Desta forma, nossos resultados mostraram que embora a lesão hipocampal no camundongo mutante Q54 seja similar àquela encontrada em nossos pacientes com ELTMF, o gene humano homólogo ao *Scn2a* não é o gene principal na etiologia desses pacientes.

Já no artigo 3, investigamos outros genes candidatos por análise de ligação: os canais de potássio voltagem-dependente (CPVD). A investigação sobre uma possível relação entre CPVD e ELTMF baseou-se no importante papel destes canais sobre a

regulação da excitabilidade neuronal, pelas evidências de que os CPVD estão implicados com certos tipos de epilepsias (Lang et al., 2003; Roll e Szepietowski, 2002; Lerche et al., 2001), e em especial porque os CPVD foram associados com um tipo de encefalite límbica autoimune (Bukley et al., 2001). Tem sido reconhecido que a encefalite límbica pode estar associada à epilepsia focal com declínio de memória, AH e também com a ocorrência de hipersinais nas estruturas límbicas observadas em IRM (Bien et al., 2000; Khan e Wieser, 1994). Desde que estes achados de IRM (AH e hipersinal) são similares aos achados na ELTMF, consideramos os CPVD bons candidatos para a ELTMF. Os marcadores genotipados neste estudo (artigo 3) cobriram 100% dos genes para CPVD localizados nos cromossomos autossômicos e nenhuma evidência de ligação foi encontrada. Desta forma os genes codificadores de CPVD foram excluídos de serem candidatos ao principal gene responsável pela ELTMF.

Muito embora esses dois estudos (artigos 2 e 3) tenham apresentado resultados negativos para as nossas famílias, eles mostram que o emprego da análise de ligação genética na investigação direta de genes candidatos pode ser uma ferramenta bastante eficiente, especialmente quando estes genes são bem localizados, quando mais de um gene de interesse estão na mesma região e, principalmente quando possuem extensas regiões codificadoras, o que torna a triagem de mutações uma tarefa longa e dispendiosa.

Considerando que os genes candidatos selecionados não apresentaram qualquer ligação com a ELTMF prosseguimos o nosso estudo com a análise de ligação genômica randômica. Este tipo de abordagem representa uma valiosa ferramenta no estudo de patologias cujos mecanismos são complexos e poucos conhecidos e tem contribuído para a identificação de genes implicados em doenças humanas.

O emprego da análise de ligação genética requer que algumas condições sejam bem estabelecidas para que os resultados obtidos sejam confiáveis e significativos. Para isso é imprescindível que o estudo seja realizado a partir de famílias suficientemente informativas, com um padrão de herança Mendeliano e com uma classificação fenotípica bem definida. Para esta tese nós selecionamos duas grandes famílias segregando ELTM associada à AH e com um grande número de indivíduos afetados (apêndice I). Além disso, nosso estudo genômico foi conduzido com três classes fenotípicas bem definidas, o qual considera a AH como o principal fenótipo na ELTMF.

Através da análise de ligação genômica, nós identificamos ligação da ELTMF com um *locus* no cromossomo 18p11.3-11.2 com um $Z_{\max}$ de 3,63 em $\theta=0,00$ em uma única família (F10). Além disso, as análises de multipontos e de haplótipo para esta família, localizam o *locus* candidato dentro de um intervalo de 6 cM flanqueado por D18S976 e D18S452. É interessante notar que para a família F10 obtivemos resultados significativos, sem que, no entanto obtivéssemos nenhum resultado falso positivo em todo o genoma.

Cabe ressaltar que esta é a primeira evidência conclusiva de que a AH associada à ELTMF pode ter um predisposição genética e não por fatores ambientais tais como as crises febris prolongadas na infância, confirmando nossa prévia observação (Kobayashi et al., 2001; 2002; Secolin et al., 2004).

O fato de não termos encontrado ligação para a família F26 reforça a teoria de que para se obter resultados significativos e confiáveis em estudos de ligação genética é imprescindível que a caracterização fenotípica esteja bem determinada. Embora a família F26 seja grande e com muitos indivíduos segregando ELTM (14 indivíduos afetados), o fenótipo desta família é mais complexo se comparado ao da F10. Creditamos a este fator, a falta de ligação em todo o genoma para esta família. Também não podemos descartar a possibilidade de que um outro gene possa estar influenciando o fenótipo da F26, principalmente pelo fato de que existem casamentos nos quais ambos os pais apresentam epilepsia ou têm histórico de epilepsia na família. Isso poderia levar a introdução de genes de predisposição por ambas as linhagens, materna e paterna, o que poderia dificultar a interpretação dos dados de ligação. Nesse caso somente o teste direto de mutações em genes candidatos poderia resolver a questão definitivamente.

Uma vez definido o *locus* candidato, nosso próximo passo foi fazer uma busca por genes candidatos nesta região. É plausível que o gene principal responsável pela ELTMF esteja relacionado ao desenvolvimento do hipocampo, devido às anormalidades estruturais hipocampais encontradas nos indivíduos afetados. No entanto, não podemos descartar quaisquer genes relacionados com funções no SNC e que se localizem no intervalo do *locus* candidato.

Em uma busca no banco de dados do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) encontramos aproximadamente 12 genes mapeados que podem ser candidatos para a ELTMF. Dentre

eles destacamos os genes *NDUFV2* (NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2), *IMPA2* (*inositol{myo}-1or4-monophosphatase 2*), *PTPRM* (*protein tyrosine phosphatase, receptor type, M*), *TGIF* (*TGFB-induced factor*) e *ZFP161* (zinc finger protein 161), esses dois últimos com o estudo concluído como descrito no artigo 4.

Nossa estratégia para a identificação do gene responsável pela ELTMF é a triagem de mutações pela análise da mobilidade de diferentes heteroduplexes através da cromatografia líquida em condição de desnaturação parcial (*Denaturing High-Performance Liquid Chromatography* - DHPLC) pelo sistema WAVE® 4500 (Transgenomic, San Jose, CA) e posterior sequenciamento dos amplificadores de perfis cromatográficos alterados. Esta abordagem já concluída para as regiões codificadoras dos genes *ZFP161* e *TGIF* (artigo 4) evidenciou duas diferentes alterações no exon 4 do gene *ZFP161*: uma troca A/G em região não traduzida do exon para um indivíduo controle e uma alteração sinônima G1170, ainda não descrita, em outro indivíduo controle. Já para o exon 3 do gene *TGIF* foram encontradas três diferentes alterações. Os alelos variantes A487G (encontrado em 4 afetados e 2 controles) e C576T (encontrado em apenas um indivíduo afetado) são alterações descritas como sinônimas e depositadas no banco do NCBI (rs2229334 e rs2229335 respectivamente). Já a variante C489T (rs2229333) é descrita como não sinônima e promove uma alteração na proteína ao trocar Pro/Ser. No entanto, essa alteração foi encontrada em apenas um indivíduo controle, que também apresentou a variante A487G. Os resultados obtidos para os genes *ZFP161* e *TGIF* não evidenciaram quaisquer significância na patologia da ELTMF e estudos adicionais serão necessários na investigação de outros genes candidatos na região. Acreditamos que com a identificação do gene maior responsável pela ELTMF será alcançado um maior conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos que norteiam a esclerose mesial e a sua relação com a ELTM.

8- CONCLUSÕES

Conclusões Artigo 1:

- A análise de segregação complexa indica que a AH observada na ELTMF é determinada geneticamente e influenciada por um gene principal segregando em padrão de herança autossômico dominante.
- Não foi descartado o fato de que genes modificadores do fenótipo possam estar modulando as características clínicas e determinando algumas das diferenças na gravidade da doença que são encontradas nos pacientes com ELTMF.

Conclusão Artigo2:

- Embora a lesão hipocampal observada em camundongo mutante seja similar à encontrada em pacientes com ELTM, o gene candidato *SCN2A* não é o gene principal envolvido na etiologia da ELTMF.

Conclusão Artigo 3:

- Nenhum indício de ligação foi encontrado entre canais de potássio voltagem-dependente e a ELTMF sugerindo que estes canais não são fatores determinantes para a AH observada em nossos pacientes.

Conclusões Artigo 4:

- A análise de ligação genômica evidenciou um *locus* no cromossomo 18p11.3–11.2 para uma das famílias genotipadas.
- A região candidata no cromossomo 18p11.3-11.2 foi refinada para uma região de 6cM entre os marcadores D18S976 e D18S452.

- O estudo de triagem de mutações em regiões codificadoras dos genes *ZFP161* e *TGIF*, localizados na região candidata para ELTMF, não apresentaram alterações significativas que possam ser responsáveis pela ELTM.
- A identificação de um *locus* para a ELTMF é a primeira evidência de que a AH pode ser causada por fatores genéticos.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abou-Khalil B, Andermann E, Andermann F, Olivier A, Quesney LF. Temporal lobe epilepsy after prolonged febrile convulsions: excellent outcome after surgical treatment. *Epilepsia* 1993; 34: 878-83.
- Alessio A, Bonilha L, Rorden C, Kobayashi E, Min LL, Damasceno BP, Cendes F. Memory and language impairments and their relationships to hippocampal and perirhinal cortex damage in patients with medial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav* 2006; 8(3):593-600.
- Andermann E. Multifactorial inheritance of generalized and focal epilepsy. In: Genetic basis of the epilepsies. Anderson VE, Penry JK, Sing CF. Editores. New York. Raven Press; 1982. p: 355-74.
- Annegers JF, Rocca WA, Hauser, WA. Causes of epilepsy - Contributions of the Rochester epidemiology project. *Mayo Clinic Proceedings* 1996; 71: 570-5.
- Babb TL, Brown WJ. Pathological findings in epilepsy. In: Engel J, Jr. Ed. Surgical treatment of the epilepsies. New York: Raven Press 1987; pp511-540.
- Baulac S, Huberfeld G, Gourfinkel-An I, Mitropoulou G, Beranger A, Prud'homme JF, et al. First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. *Nat Genet* 2001; 28(1):46-8.
- Becker AJ, Chen J, Zien A, Sochivko D, Normann S, Schramm J, et al. Correlated stage- and subfield-associated hippocampal gene expression patterns in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 2003; 18(10):2792-802.
- Berkovic SF, Andermann F, Olivier A, Ethier R, Melanson D, Robitaille Y, et al. Hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy demonstrated by magnetic resonance imaging. *Ann Neurol* 1991; 29:175-82.
- Berkovic SF, McIntosh A, Howell RA, Mitchell A, Sheffield LJ, Hopper JL. Familial temporal lobe epilepsy: a common disorder identified in twins. *Ann Neurol* 1996; 40(2):227-35.
- Berkovic SF, Heron SE, Giordano L, Marini C, et al. Benign familial neonatal-infantile seizures: characterization of a new sodium channelopathy. *Ann Neurol* 2004; 55(4):550-7.

Bernasconi N, Bernasconi A, Caramanos Z, Antel SB, Andermann F, Arnold DL. Mesial temporal damage in temporal lobe epilepsy: a volumetric MRI study of the hippocampus, amygdala and parahippocampal region. *Brain* 2003; 126(Pt 2):462-9.

Bien CG, Schulze-Bonhage A, Deckert M, Urbach H, Helmstaedter C, Grunwald T, Schaller C, Elger CE. Limbic encephalitis not associated with neoplasm as a cause of temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2000; 55(12):1823-8.

Bivert C, Schoeder BC, Kubisch Berkovic SF, Propping P, Jentsch TJ, et al. A Potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 1998; 279:403-406.

Blümcke I, Beck H, Lie AA, Wiestler OD. Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 1999; 36(2-3):205-23.

Blümcke I, MRCPath MT, Wiestler OD. Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol* 2002; 12: 199-211.

Borges MA, Li LM, Guerreiro CAM, Yacubian EM, Cordeiro JA, Tognola WA, et al. Urban Prevalence of Epilepsy: Populational Study in São José do Rio Preto – A Medium-Sized City in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 2004; 62(2A):199-204.

Briellmann RS, Kalnins RM, Berkovic SF, Jackson GD. Hippocampal pathology in refractory temporal lobe epilepsy: T2-weighted signal change reflects dentate gliosis. *Neurology* 2002; 58(2):265-71.

Broman KW, Murray JC, Sheffield VC, White RL, Weber JL. Comprehensive human genetic maps: individual and sex-specific variation in recombination. *Am J Hum Genet* 1998; 63 861-69.

Buckley C, Oger J, Clover L, Tuzun E, Carpenter K, Jackson M, Vincent A. Potassium channel antibodies in two patients with reversible limbic encephalitis. *Ann Neurol* 2001;50(1):73-8.

Callenbach PMC, Maagdenberg AMJM, Frants RR, Brouwer OF. Clinical and genetic aspects of idiopathic epilepsies in childhood. *Neurology* 2005; 9(2):91-103.

Cendes F, Andermann F, Gloor P, Evans A, Jones-Gotman M, Watson C, et al. MRI volumetric measurement of amygdala and hippocampus in temporal lobe epilepsy. *Neurology* 1993a; 43: 719-25.

Cendes F, Leproux F, Melanson D, Ethier R, Evans A, Peters T. et al. MRI of amygdala and hippocampus in temporal lobe epilepsy. *Journal of Computer Assisted Tomography* 1993b; 17: 206-10.

Cendes F, Andermann F, Dubeau F, Gloor P, Evans A, Jones-Gotman M, et al. Early childhood prolonged febrile convulsions, atrophy and sclerosis of mesial structures, and temporal lobe epilepsy: an MRI volumetric study. *Neurology* 1993c; 43: 1083-7.

Cendes F, Lopes-Cendes I, Andermann E, Andermann F. Familial temporal lobe epilepsy: a clinically heterogeneous syndrome. *Neurology* 1998; 50(2):554-7.

Claes L, Audenaert D, Deprez L, Van Paesschen W, Depondt C, Goossens D, et al. Novel locus on chromosome 12q22-q23.3 responsible for familial temporal lobe epilepsy associated with febrile seizures. *J Med Genet* 2004; 41(9):710-4.

Coan AC, Kobayashi E, Lopes-Cendes I, Li LM and Cendes F. Abnormalities of hippocampal signal intensity in patients with familial mesial temporal lobe epilepsy. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37:827-32.

Combi R, Ferini-Strambi L, Montrucoli A, Bianchi V, Malcovati M, Zucconi M, et al. Two new putative susceptibility loci for ADNFLE. *Brain Res Bull* 2005; 67(4):257-63.

Commission on Classification and Terminology of the International League against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* 1989; 30: 389-99.

Cossette P, Liu L, Brisebois K, Dong H, Lortie A, Vanasse M, et al. Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet* 2002; 31:184-9.

Durner M, Sander T, Greenberg DA, Johnson K, Beck-Mannagetta G, Janz D. Localization of idiopathic generalized epilepsy on chromosome 6p in families of juvenile myoclonic epilepsy patients. *Neurology* 1991; 41:1651-5.

Elmslie FV, Rees M, Williamson MP, Kerr M, Kjeldsen MJ, Pang KA, et al. Genetic mapping of a major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q. *Hum Mol Genet* 1997; 6:1329-34.

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* 2001a; 42(6):796-803.

Engel J Jr. Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? *Neuroscientist* 2001b; 7(4):340-52.

Falconer MA, Serafetinides EA, Corsellis JAN. Etiology and pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol* 1964; 10:233-48.

Fernandez G, Effenberger O, Vinz B, Steinlein O, Elger CE, Dohring W, Heinze HJ. Hippocampal malformation as a cause of familial febrile convulsions and subsequent hippocampal sclerosis. *Neurology* 1998; 50(4):909-17.

Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J Jr. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 2005; 46(4):470-2.

Fukuma G, Oguni H, Shirasaka Y, Watanabe K, et al. Mutations of neuronal voltage-gated Na⁺ channel alpha 1 subunit gene SCN1A in core severe myoclonic epilepsy in infancy (SMEI) and in borderline SMEI (SMEB). *Epilepsia* 2004;45(2):140-8.

Gambardella A, Annesi G, De Fusco M, Patrignani A, Aguglia U, Annesi F, et al. A new locus for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy maps to chromosome 1. *Neurology* 2000; 55(10):1467-71.

Gloor P. Mesial temporal sclerosis: historical background and overview from a modern perspective. In: Luders H. Editor. *Epilepsy Surgery*. New York. Raven Press. 1991. p: 689-703.

Greenberg DA, Delgado-Escueta AV. Juvenile myoclonic epilepsy may be linked to the BF and HLA loci on human chromosome 6 *Am J Med Genet* 1988; 31: 185-92.

Greenberg DA, Durner M, Keddache M, Shinnar S, Resor SR, Moshe SL, et al. Reproducibility and complications in gene searches: linkage on chromosome 6, heterogeneity, association, and maternal inheritance in juvenile myoclonic epilepsy. *Am J Hum Genet* 2000; 66:508-16.

Guipponi M, Rivier F, Vigevano F, Beck C, Crespel A, Echenne B, et al. Linkage mapping of benign familial infantile convulsions (BFIC) to chromosome 19q. *Hum Mol Genet* 1997; 6(3):473-7.

- Hauser WA, Annegers JF, Rocca WA. Descriptive epidemiology of epilepsy - contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota. *Mayo Clinic Proceedings* 1996; 71: 576-86.
- Helmstaedter C, Kurthen M. Memory and epilepsy: characteristics, course, and influence of drugs and surgery. *Curr Opin Neurol* 2001; 14(2):211-6.
- Houser CR. Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 1990; 535(2):195-204.
- Ito M, Shirasaka Y, Hirose S, Sugawara T, Yamakawa K. Seizure phenotypes of a family with missense mutations in SCN2A. *Pediatr Neurol* 2004; 31(2):150-2.
- Jackson GD, Connelly A, Duncan JS, Grunewald RA, Gadian DG. Detection of hippocampal pathology in intractable partial epilepsy: increased sensitivity with quantitative magnetic resonance T2 relaxometry. *Neurology* 1993; 43, 1793-9.
- Jarvik GP. Complex Segregation Analysis: uses and limitations. *Am J Hum Genet* 1998; 63:942-946.
- Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B, Winawer M, Barker-Cummings C, Martinelli Boneschi F. et al. Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet* 2002; 30: (3) 335-41.
- Kamiya K, Kaneda M, Sugawara T, Mazaki E, Okamura N, et al. A nonsense mutation of the sodium channel gene SCN2A in a patient with intractable epilepsy and mental decline. *J Neurosci* 2004; 24(11):2690-8.
- Kearney JA, Plummer NW, Smith MR, Kapur J, Cummins TR, Waxman SG, Goldin AL, Meisler MH. A gain-of-function mutation in the sodium channel gene Scn2a results in seizures and behavioral abnormalities. *Neuroscience* 2001;102(2):307-17.
- Khan N, Wieser HG Limbic encephalitis: a case report. *Epilepsy Res* 1994; 17(2): 175-81.
- Kobayashi E., Lopes-Cendes I., Guerreiro CAM., Sousa SC., Guerreiro MM., Cendes F. Seizure outcome and hippocampal atrophy in familial mesial temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2001; 56: 166-72.
- Kobayashi E, Li M Li, Lopes-Cendes I, Cendes F. MRI evidence of hippocampal sclerosis in asymptomatic first degree relatives of patients with familial mesial temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol*. 2002; 59(12):1891-4.

- Kobayashi E, D'Agostino MD, Lopes-Cendes I, Andermann E, Dubeau F, Guerreiro CA, et al. Outcome of surgical treatment in familial mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*.2003a;44(8):1080-4.
- Kobayashi E, D'Agostino MD, Lopes-Cendes I, Berkovic SF, Li LM, Andermann E, et al. Hippocampal atrophy and T2 weighted signal changes in familial mesial temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2003b; 60(3):405-9.
- Lang B, Dale RC, Vincent A. New autoantibody mediated disorders of the central nervous system. *Curr Opin Neurol* 2003; 16(3): 351-7.
- Lencz T, McCarthy G, Bronen RA, Scott T M, Insigni JA, Sass KJ et al. Quantitative magnetic resonance imaging in temporal lobe epilepsy: relationship to neuropathology and neuropsychological function. *Annals of Neurology* 1992; 31: 629-37.
- Lennox WG. Heredity of epilepsy as told by relatives and twins. *JAMA* 1951;146: 529-36
- Lerche H, Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F. Ion channel and epilepsy. *Am J med Genet* 2001; 106: 146-159.
- Litt M, Luty J, Kwak M, Allen L, Magenis RE, Mandel G. Localization of a human brain sodium channel gene (SCN2A) to chromosome 2. *Genomics* 1989; 5(2):204-8.
- Lynd-Balta E, Pilcher WH, Joseph SA. AMPA receptor alterations precede mossy fiber sprouting in young children with temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 2004; 126(1):105-14.
- Liu AW, Delgado-Escueta AV, Serratosa JM, Alonso ME, Medina MT, Gee MN, et al. Juvenile myoclonic epilepsy locus in chromosome 6p21.2-p11: linkage to convulsions and electroencephalography trait. *J Hum Genet* 1995 57:368-81.
- Liu AW, Delgado-Escueta AV, Gee MN, Serratosa JM, Zhang QW, Alonso ME, et al. Juvenile myoclonic epilepsy in chromosome 6p12-p11: locus heterogeneity and recombinations. *Am J Med Genet* 1996 63:438-46.
- Lopes-Cendes I, Scheffer IE, Berkovic SF, Rousseau M, Andermann E, Rouleau GA. A new locus for generalized epilepsy with febrile seizures plus maps to chromosome 2. *Am J Hum Genet* 2000; 66(2):698-701.
- Malacarne M, Gennaro E, Madia F, Pozzi S, Vacca D, Barone B, et al. Benign familial infantile convulsions: mapping of a novel locus on chromosome 2q24 and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 2001; 68(6):1521-6.

- Mathern GW, Pretorius JK , Babb TL. Quantified patterns of mossy fiber sprouting and neurondensities in hippocampal and lesional seizures. *J Neurosurg* 1995; 82:211–19.
- Mathern GW, Babb TL, Armstrong DL. Hippocampal Sclerosis. In: Engel J Jr e Pedley TA. Editores. *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. 1ª edição. Philadelphia. Lippincott-Raven. 1997, p:133-55.
- Mattson, RH. Current challenges in the treatment of epilepsy. *Neurolog* 199; 44: S4-9.
- Meencke HJ, Veith G. Hippocampal sclerosis in epilepsy. In: Luders H. Editor. *Epilepsy Surgery*. New York. Raven press. 1991, pp: 705-15.
- Meisler HM, Kearney J, Ottman R, Escayg A. Identification of epilepsy genes in human and mouse. *Ann Rev Genet* 2001; 35: 567-88.
- Metrakos K and Metrakos JD. Genetics of convulsive disorders. II. Genetic and electroencephalographic studies in centrencephalic epilepsy. *Neurology* 1961; 11: 474-83.
- Mikami M, Yasuda T, Terao A, Nakamura M, Ueno S, Tanabe H, et al. Localization of a gene for benign adult familial myoclonic epilepsy to chromosome 8q23.3-q24.1. *Am J Hum Genet* 1999; 65:745-51.
- Moore PM, Baker GA. The neuropsychological and emotional consequences of living with intractable temporal lobe epilepsy: implications for clinical management. *Seizure* 2002; 11(4):224-30.
- Ottman R, Risch N, Hauser WA, Pedley TA, Lee JH, Barker-Cummings C, Lustenberger A, Nagle KJ, Lee KS, Scheuer ML, Neystat M, Susser M, Wilhelmsen KC. Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q. *Nat Genet* 1995; 10(1):56-60.
- Ottman R. Progress in the genetics of the partial epilepsies. *Epilepsia* 2001; 42 Suppl 5:24-30.
- Paradiso S, Hermann BP, Blumer D, Davies K, Robinson RG. Impact of depressed mood on neuropsychological status in temporal lobe epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 70(2):180-5.
- Plaster NM, Uyama E, Uchino M, Ikeda T, Flanigan KM, Kondo I, et al. Genetic localization of the familial adult myoclonic epilepsy (FAME) gene to chromosome 8q24. *Neurology* 1999; 53:1180-3

- Phillips HA, Scheffer IE, Crossland KM, Bhatia KP, Fish DR, Marsden CD, et al. Autosomal dominant nocturnal frontal-lobe epilepsy: genetic heterogeneity and evidence for a second locus at 15q24. *Am J Hum Genet* 1998; 63(4):1108-16.
- Plummer NW, Meisler MH. Evolution and diversity of mammalian sodium channel genes. *Genomics* 1999; 57: 323-331.
- Poza JJ, Saenz A, Martinez-Gil A, Cheron N, Cobo AM, Urtasun M, et al. Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: clinical and genetic study of a large Basque pedigree linked to chromosome 10q. *Ann Neurol* 1999; 45(2):182-8.
- Primrose DC, Ojemann GA. Outcome of resective surgery for temporal lobe epilepsy. In: Lüders HO. Editor. *Epilepsy Surgery*. New York. Raven Press. 1991. p: 601-11.
- Proper EA, Oestreicher AB, Jansen GH, Veelen CWMv, van Rijen PC, Gispen WH, et al. Immunohistochemical characterization of mossy fibre sprouting in the hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Brain* 2000; 123:19-30.
- Robinson R, Gardiner M. Molecular basis of Mendelian idiopathic epilepsies. *Ann Med* 2004; 36, 89-97.
- Roll P, Szepietowski P. Epilepsy and ionic channels. *Epileptic Disord* 2002; 4(3): 165-72.
- Rosenberg RN. The triumph of linkage analysis. *Ann Neurol* 1990; 27: 111-3.
- Rowland LP. The first decade of molecular genetics in neurology: changing clinical thought and practice. *Ann Neurol* 1992; 32: 207-217.
- Sander JW. Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review. *Epilepsia* 1993; 34(6):1007-16.
- Sander T, Bockenkamp B, Hildmann T, Blasczyk R, Kretz R, Wienker TF, et al. Refined mapping of the epilepsy susceptibility locus EJM1 on chromosome 6. *Neurology* 1997; 49:842-7.
- Secolin R, Maurer-Morelli, CV, Ferreira RGM, Santos NF, Kobayashi E, Marchesini RB, Cendes F, Kriger H, Lopes-Cendes I. Complex Segregation Analysis in Familial Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsia* 2004; 45: 224-4, Supp.7 (Abstract).
- Serratosa JM, Delgado-Escueta AV, Medina MT, Zhang Q, Iranmanesh R, Sparkes RS. Clinical and genetic analysis of a large pedigree with juvenile myoclonic epilepsy. *Ann Neurol* 1996 39:187-95.

Singh NA, Charlier C, Stauffer E, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, et al. A Novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns, *Nat Genet* 1998; 18:25-9.

Spampanato J, Kearney JA, de Haan G, McEwen DP, et al. A novel epilepsy mutation in the sodium channel SCN1A identifies a cytoplasmic domain for beta subunit interaction. *J Neurosci* 2004;24(44):10022-34.

Steinlein OK, Mulley JC, Propping P, Wallace RH, Phillips HA, Sutherland GR et al. A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 4$ subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genetics* 1995; 11:201-203.

Sutula T, Cascino G, Cavazos J, Parada I, Ramirez L. Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol* 1989; 26(3):321-30.

Swanson TH. The pathophysiology of human mesial temporal lobe epilepsy. *J Clin Neurophysiol* 1995; 12(1):2-22.

VanLandingham KE, Heinz ER, Cavazos JE, Lewis DV. Magnetic resonance imaging evidence of hippocampal injury after prolonged focal febrile convulsions. *Ann Neurol* 1998; 43: 413-26.

Van Paesschen W, Revesz T, Duncan JS, King MD, Connelly A. Quantitative neuropathology and quantitative magnetic resonance imaging of the hippocampus in temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 1997; 42: 756-66.

Vreugdenhil M, Hoogland G, van Veelen CW, Wadman WJ. Persistent sodium current in subicular neurons isolated from patients with temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 2004;19(10):2769-78.

Wallace RH, Wang DW, Sing R, Scheffer IE, George AL Jr, Phillips HA, et al. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na^+ -channel $\beta 1$ subunit gene SCN1B. *Nat Genetics* 1998; 19: 366-370.

Weber JL, May, PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Genet* 1989; 44:397-401.

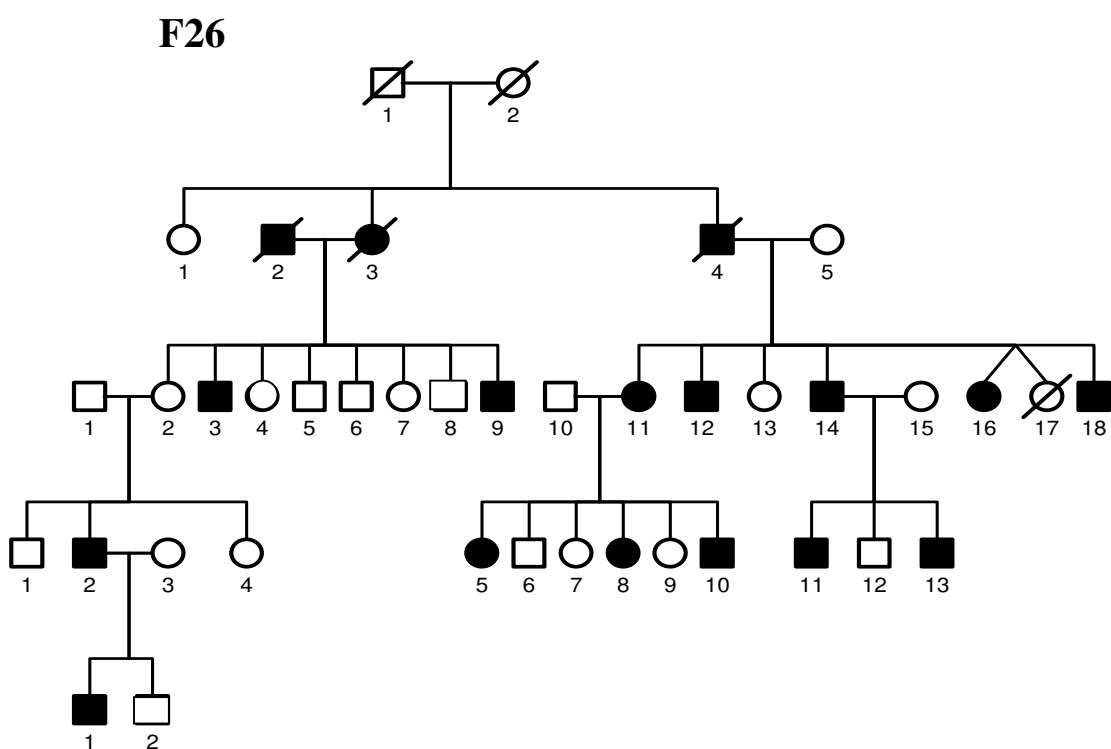
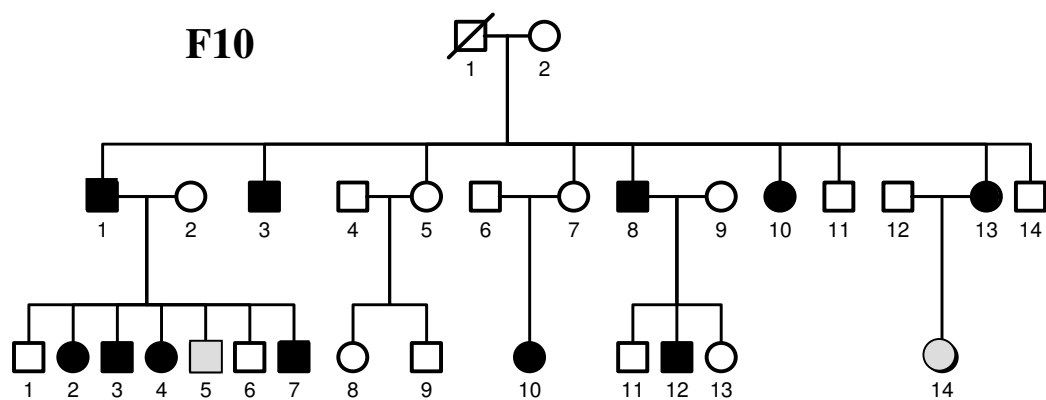
Weber YG, Berger A, Bebek N, Maier S, Karafyllakes S, Meyer N, et al. Benign familial infantile convulsions: linkage to chromosome 16p12-q12 in 14 families. *Epilepsia* 2004; 45(6):601-9.

Xiong L, Labuda M, Li DS, Hudson TJ, Desbiens R, Patry G, et al. Mapping of a gene determining familial partial epilepsy with variable foci to chromosome 22q11-q12. *Am J Hum Genet* 1999; 65(6):1698-710.

Zara F, Gennaro E, Stabile M, Carbone I, Malacarne M, Majello L, et al. Mapping of a locus for a familial autosomal recessive idiopathic myoclonic epilepsy of infancy to chromosome 16p13. *Am J Hum Genet* 2000; 66:1552-7.

Zielinski JJ. Epidemiology of epilepsy. In: Laidlaw J, Richens A e Oxley J (eds) *A textbook of epilepsy*, 3^a ed. Churchill livingstone, New York. 1988, p: 21-48.

APÊNDICE I – HEREDOGRAMAS DAS FAMÍLIAS COM ELTMF



**APÊNDICE II – LOD *SCORE* DE DOIS PONTOS PARA
MARCADORES MICROSSATÉLITES GENOTIPADOS NO
CROMOSSOMO 18p (F26)**

	Fração de recombinação (θ)								
	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40
F26									
D18S476	-2.07	-1.28	-0.92	-0.68	-0.50	-0.37	-0.27	-0.19	-0.12
D18S1098	-2.06	-1.43	-0.96	-0.63	-0.40	-0.25	-0.14	-0.08	-0.04
D18S481	-2.57	-1.79	-1.32	-0.96	-0.68	-0.48	-0.32	-0.21	-0.12
D18S1154	-2.45	-1.12	-0.65	-0.38	-0.21	-0.10	-0.03	-0.00	0.01
D18S52	-1.75	-0.95	-0.64	-0.43	-0.29	-0.18	-0.10	-0.05	-0.02
D18S1132	-1.51	-0.86	-0.65	-0.50	-0.38	-0.29	-0.22	-0.16	-0.10
D18S976	-0.70	-0.61	-0.51	-0.42	-0.34	-0.27	-0.20	-0.14	-0.09
D18S1376	-0.44	-0.30	-0.21	-0.16	-0.12	-0.10	-0.07	-0.06	-0.04
D18S452	-1.04	-0.88	-0.73	-0.59	-0.46	-0.34	-0.25	-0.17	-0.10
D18S967	-0.07	-0.04	-0.02	-0.00	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01
D18S1163	-1.35	-0.97	-0.65	-0.42	-0.26	-0.14	-0.07	-0.02	-0.00
D18S464	-0.71	-0.67	-0.58	-0.47	-0.35	-0.24	-0.15	-0.09	-0.04
D18S1150	-2.01	-0.86	-0.59	-0.45	-0.34	-0.25	-0.17	-0.10	-0.05
D18S1158	-0.62	-0.38	-0.26	-0.19	-0.14	-0.10	-0.07	-0.05	-0.03

APÊNDICE III – PROTOCOLO DE GENOTIPAGEM PARA MARCADORES MICROSSATÉLITES

1. Genotipagem Manual

Após o estabelecimento das condições ideais da reação em cadeia da DNA-polimerase (PCR) a genotipagem de cada um dos marcadores foi preparada em placa de 96 amostras (8x12) contendo um volume final de 12,5µl, composto de 40 ng de DNA genômico; 100 ng de cada primer; 200µM dGTP, dCTP e dTTP; 25 µM de dATP; 1,5 µCi [P^{33}] dATP; 0,5 unidade de Taq DNA polimerase; 1,5mM de $MgCl_2$. As reações da PCR foram conduzidas em 35 ciclos de 94°C por 45s; 55 a 59°C por 30s; e 72°C por 1 min. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 6%, 55 V e 1500W por aproximadamente 2 horas. Os géis secos a vácuo a 80°C por 1h foram expostos a filmes auto-radiográficos por 48-72h à temperatura ambiente dependendo da meia vida do radioisótopo utilizado. Depois do tempo de exposição apropriado os filmes foram revelados fornecendo o padrão característico de bandas escuras dos marcadores genotipadas.

2 - Genotipagem Automática

As amostras foram amplificadas em placas de 96 amostras contendo um volume final de 7,50µl, composto de 0,6µl de DNA genômico 50ng; 0,5µl de primer mix (5 µM cada primer); 0,75µl dNTP mix (2,5mM) 0,06µl de Taq DNA polimerase (5unidades/µl); 0,75µl Tampão 10x; 0,75µl de $MgCl_2$ (2,5mM) e 4,09µl H_2O . As reações da PCR foram conduzidas em 95°C por 12min.; 10 ciclos de 94°C por 15s, 55°C por 15s, 72°C por 30s; 20 ciclos de 89°C por 15s, 55°C por 15s, 72°C por 30s; e 72°C por 10min. Em outra placa de 96 amostras, os produtos da PCR foram diluídos em água: 20x para fluoróforos FAM e VIC e 10x para fluoróforo NED. Em seguida, 2µl de cada diluição foi distribuída em outra placa de 96 amostras previamente preparada com um mistura contendo 7,75µl de *Genotypin Loading Solution* (0,1% de Tween 20 em H_2O) + 0,25µl de MegaBACE Size standards ET550-R, perfazendo um volume final de 10µl em cada pocinho de uma placa própria para o MegaBACE. As amostras foram desnaturadas a 95°C por 3 min antes de serem injetadas no MegaBACE.

APÊNDICE IV – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 1 de 3

Título do projeto: Estudos Genéticos em Epilepsia

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

OBJETIVO DA PESQUISA:

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

PROCEDIMENTO:

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

RISCO E DESCONFORTO:

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



FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 2 de 3

Título do projeto: Estudos Genéticos em Epilepsia

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

VANTAGENS:

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

SIGILO:

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

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

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

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

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

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



Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Genética Médica

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 3 de 3

Título do projeto: Estudos Genéticos em Epilepsia

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

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

Nome do participante ou responsável

Assinatura do participante ou responsável

data

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

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

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado

data



Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Genética Médica