

SIMONE SAYURI TSUNEDA

ESTRATÉGIA PARA INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE EPILEPSIA COM IDENTIFICAÇÃO DE GENES RELACIONADOS A FORMAS DE POLIMICROGIRIA

STRATEGY OF MOLECULAR INVESTIGATION ON EPILEPSY WITH THE IDENTIFICATION OF GENES RELATED TO POLYMICROGYRIAS

Campinas 2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS Faculdade de Ciências Médicas

SIMONE SAYURI TSUNEDA

ESTRATÉGIA PARA INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE EPILEPSIA COM IDENTIFICAÇÃO DE GENES RELACIONADOS A FORMAS DE POLIMICROGIRIA

Orientadora / Supervisora: Prof^a. Dr^a. Iscia Teresinha Lopes Cendes

Co-Orientador/Co-Supervisor: Prof. Dr. Fábio Rossi Torres

STRATEGY OF MOLECULAR INVESTIGATION ON EPILEPSY WITH THE IDENTIFICATION OF GENES RELATED TO POLYMICROGYRIAS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Doutora em Ciências

Doctorate thesis presented to the Medical Pathophysiology Postgraduation Programm of the School of Medical Sciences of the State University of Campinas to obtain the Ph.D. grade in Medical Sciences.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA SIMONE SAYURI TSUNEDA E ORIENTADA PELA PROF^a. DR^a. ISCIA TERESINHA LOPES CENDES.

Assinatura do Orientador

Campinas 2012



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS UNICAMP

Tsuneda, Simone Sayuri, 1974-T789e Estratégia para investigação molecular de epilepsia com identificação de genes relacionados a formas de polimicrogiria / Simone Sayuri Tsuneda. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012. Orientador : Iscia Teresinha Lopes Cendes. Coorientador : Fábio Rossi Torres. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas. 1. Epilepsia. 2. Genes. 3. Malformações do desenvolvimento cortical. 4. Seguência de nucleotídios. 5. Sequenciamento em larga escala I. Lopes-Cendes, Íscia Teresinha, 1964-. II. Torres, Fábio Rossi. III Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas, IV, Título,

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Strategy of molecular investigation on epilepsy with the identification of genes related to polymicrogyrias.

Palavras-chave em inglês:

Epilepsy

Genes

Malformations of cortical development

Nucleotide sequence

High-throughput nucleotide sequencing

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Iscia Teresinha Lopes Cendes [Orientador]

Fábio Rossi Torres [Coorientador]

Ana Lucia Brunialti Godard

Cláudia Vianna Maurer Morelli

Tiago Campos Pereira

Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

Data da defesa: 30-08-2012

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica



Banca Exam	inadora de Tese de Doutorado
	Simone Sayuri Tsuneda
Orientador: Profa. Dra. Isc Co-orientador: Prof. Dr. Fá	ia Teresinha Lopes Cendes bio Rossi Torres
	*
Membros:	*
Membros:	dia Vianna Maralli
Membros: Professor (a) Doutor (a) Clau	dia Vianna Maurer Morelli
Membros: Professor (a) Doutor (a) Clau	dia Vianna Maurer Morelli Lucia Gil da Silva Lopes
Membros: Professor (a) Doutor (a) Clau Professor (a) Doutor (a) Vera	dia Vianna Maurer Morelli Lucia Gil da Silva Lopes
Membros: Professor (a) Doutor (a) Clau Professor (a) Doutor (a) Vera Professor (a) Doutor (a) Tiag	dia Vianna Maurer Morelli I Lucia Gil da Silva Lopes
Membros: Professor (a) Doutor (a) Clau Professor (a) Doutor (a) Vera Professor (a) Doutor (a) Tiag	dia Vianna Maurer Morelli I Lucia Gil da Silva Lopes
Membros: Professor (a) Doutor (a) Clau Professor (a) Doutor (a) Vera Professor (a) Doutor (a) Tiag Z (J Professor (a) Doutor (a) Ana	dia Vianna Maurer Morelli Lucia Gil da Silva Lopes O Campos Pereira Lucia Brunialti Godard
Membros: Professor (a) Doutor (a) Clau Professor (a) Doutor (a) Vera Professor (a) Doutor (a) Tiag Professor (a) Doutor (a) Ana	dia Vianna Maurer Morelli Lucia Gil da Silva Lopes O Campos Pereira Lucia Brunialti Godard

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

Data: 30/07/2012



DEDICATÓRIA

A todos aqueles que convivem com uma malformação cerebral, pacientes, familiares e amigos. Àqueles que melhor entendem a importância de um cérebro plenamente funcional e que enfrentam diariamente as limitações de uma sociedade despreparada para lidar com o diferente e o incomum.

Simone Sayuri Tsuneda



AGRADECIMENTOS

Este é um parêntesis de informalidade que me permito abrir para fazer jus às pessoas que tornaram essa tese possível e esse doutorado uma época maravilhosamente memorável. Esse título é resultado de muitos anos de esforço, teimosia, dedicação e amor à Ciência, permeado de pessoas generosas, que me ofereceram apoio e parte de seu precioso tempo. Tentando ser o menos pedante possível, aqui vão os meus agradecimentos:

Aos meus pais, **Mitsuyasu Tsuneda** e **Eliza T. I. Tsuneda**, por terem priorizado a educação em nossas vidas. Foram muitos os sacrifícios durante suas vidas para nos garantir esse bem tão precioso e para isso não há palavras de gratidão suficientes.

Aos meus irmãos, Matheus e Diogo Tsuneda, por existirem, por serem minha razão de tudo.

À **Dra. Iscia Lopes Cendes**, por sua orientação, num sentido amplo da palavra. Agradeço por esses anos dividindo comigo seus valores, sua maneira de encarar a Ciência e a Academia. Aprendi muito observando e desenvolvi uma admiração imensa por sua competência, seriedade, dedicação, integridade e caráter. Levo comigo uma inspiração e um grande exemplo de profissional.

À Fapesp pelo apoio financeiro desde o início e compreensão durante esse período de mudanças. Certamente, meu processo não foi nada convencional.

É importante que se reconheça que o Laboratório de Genética Molecular da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP é o melhor lugar para se trabalhar na face da Terra. É um local privilegiado, que reúne talentos fantásticos convivendo em plena harmonia e companheirismo, dividindo, somando e contribuindo diariamente entre si. Esse doutorado foi um período de crescimentos profissional e pessoal imensuráveis. E esses são alguns dos responsáveis:



Fábio R. Torres, a denominação de "pai" que você recebeu não foi à toa. Você é o maior coautor dessa tese, sem sombra de dúvida. Tentei aproveitar ao máximo a oportunidade de estar trabalhando ao lado de alguém tão inteligente e acabei ganhando um grande amigo!

Luciana C. Bonadia, agradeço por absolutamente tudo! Pelos conselhos acadêmicos, técnicos, pela amizade imensurável, pela Rafaela... Desenvolvi, ao longo dos anos, uma admiração gigantesca pela sua competência, por todo seu domínio sobre a Genética Médica, por sua integridade e clareza em todos os aspectos da vida. Sou sua fã!

Daniela A. de Souza, obrigada por ser minha grande companheira! Nesses anos dividimos absolutamente todo o material de trabalho sem sequer um prenúncio de desentendimento, o que resultou numa grande amizade, levada até o Planalto Central. Quem diria?

Alexandre Hilário, Aline Marcelino, Bernardo Passarinho, Carolina Lincoln, Daniela Furgeri, Danyella Dogini, Érika Freitas, Estela Gonçalves, Ilária Sgardioli, Fábio Conte, Fernando Marson, Karina Silveira, Lidiane Rueda, Marcela Baptista, Marina Gonsales, Milena Simioni, Patricia Aline, Renato "José Bola" dos Santos, Romênia Domingues, Simoni Avansini, Tatiane Kanazama, Thiago Peluzzo, Vinicius Pascoal, obrigada por criarem um ambiente de trabalho tão perfeito. Cada um de vocês tem uma enorme responsabilidade sobre a minha vontade de ficar nesse laboratório pra sempre!

Eduardo Yamamoto, nosso aluno aplicado e prestativo, muito obrigada por todo o empenho e companheirismo desde o primeiro contato!

Marilza e Madá, que ofereceram seu enorme apoio durante todo o período, mas principalmente na reta final. Esses anos teriam sido um completo caos sem vocês! Obrigada!

Prof. François Artiguenave, que com seu respeitável domínio da bioinformática nos ofereceu, muito generosa e pacientemente, um grande apoio, crucial para a realização dessa tese.



Há também algumas pessoas muito importantes fora das paredes do laboratório:

Dr. Lucio Brunale, ainda não descobri uma forma justa de agradecer pelo seu imenso apoio e esforço em meu benefício. Que fiquem aqui registradas a minha infinita gratidão e imensa admiração por esse chefe que continua me ensinando e inspirando todos os dias.

Ângela Luzia Drezza, Grace Young Kim e Julia Brugnaro Badur, vocês ultrapassaram a definição de 'amizade' e alcançaram o 'imprescindível' na minha vida. Obrigada por fazerem parte de tudo isso!

Aos meus queridos companheiros da **Turma Bio01D Unicamp**, muito obrigada! Felizmente, meu amor incondicional à Ciência vem atrelado a vocês e é um imenso privilégio ter pessoas tão verdadeiramente brilhantes em minha vida!

À família Bellinati por todo o apoio moral e logístico desde o início, sempre tão generosos e prestativos. Muito obrigada!

E, por fim, ao meu marido **André**: só eu sei o tamanho da sua responsabilidade sobre o meu equilíbrio, sobre o meu caminhar. Você teve a inacreditável capacidade de me convencer a chegar aonde nós dois chegamos juntos e por isso sou muito grata! As minhas conquistas também são suas.

Simone Sayuri Tsuneda

"If I have seen further than others, it is by standing upon the shoulders of giants."

Isaac Newton



EPÍGRAFE

"Look deep into nature, and then you will understand everything better."

Albert Einstein



	Página
RESUMO	xix
ABSTRACT	xxiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xxvii
LISTA DE TABELAS	xxxiii
LISTA DE FIGURAS	xxxv
LISTA DE ANEXOS	xlii
I. INTRODUÇÃO	43
1. Epilepsia	46
2. Desenvolvimento do Córtex Cerebral	48
3. Malformações do Córtex Cerebral	52
3.1. Aspectos Genéticos das Malformações do Córtex Cerebral	54
4. Polimicrogirias	57
4.1. Polimicrogiria Perisylviana Bilateral	58
4.2. Aspectos Genéticos das Polimicrogirias	59
II. OBJETIVOS	63
III. MATERIAL E MÉTODOS	67
1. Aspectos Éticos	69
2. Pacientes	69



3.	Extração de DNA genômico	81
4.	Triagem de mutações	81
	4.1. Amplificação por PCR	83
	4.2. Detecção de mutações	83
	4.3. Sequenciamento por eletroforese capilar utilizando o método de Sanger	84
	4.4. Enriquecimento, Captura e Sequenciamento da Região Candidata	85
5.	Análise In Silico	92
6.	Identificação de alterações nos demais indivíduos da família	93
7.	Clonagem do gene SPANXC para validação de alteração	94
8.	Busca de alterações estruturais através da técnica de SNParray.	95
IV. RE	ESULTADOS	101
1.	Screening de mutações	103
	1.1. Gene SRPX2	103
	1.2. Gene AFF2	105
	1.3. Gene <i>SLITRK2</i>	106
	1.4 Gene <i>SLITRK4</i>	112
	1.5. Gene <i>TUBA1A</i>	114
	1.6. Gene TUBA8	117



	1.7. Gene TUBB2B	118
	1.8. Gene <i>WDR62</i>	119
2.	Análise In Silico de Resultados do Screening de Mutações em Pacientes Esporádicos e Pequenas	122
3.	Avaliação da Região Candidata - Captura e Sequenciamento em Larga Escala	126
4.	Análise In Silico de Resultado do Sequenciamento em Larga Escala	131
5.	Busca de Alterações nos Demais Indivíduos da Família 1	140
6.	Busca de alterações estruturais através da técnica de SNParray	154
V. DIS	SCUSSÃO	163
1.	Triagem de Mutações em Pacientes Esporádicos e Pequenas Famílias	165
	1.1. O gene SRPX2	165
	1.2. O gene <i>AFF2</i>	168
	1.3. Os genes SLITRK2 e SLITRK4	169
	1.4. Os Genes de Microtúbulo	170
	1.5. O gene <i>WDR62</i>	173
2.	Da Análise da Região Candidata Xq27.1-27.3	174
	2.1. O gene <i>MAGEC1</i>	179
	2.2. O gene SPANXC	180
	2.3. O gene UBE2NL	182



VI. CONCLUSÃO	185
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	189
VIII. ANEXOS	203



RESUMO



A polimicrogiria (PMG) é uma malformação do córtex cerebral causada por falhas no seu desenvolvimento, caracterizando-se por um número excessivo de pequenos giros e laminação anormal, dando à superfície cortical uma aparência irregular e grosseira. A gravidade de suas manifestações clínicas se relaciona diretamente com a extensão da malformação e das regiões cerebrais afetadas, sendo que a presença de lesões bilaterais ou unilaterais extensas indica um pior prognóstico. Uma das síndromes de polimicrogiria mais frequentes e, consequentemente, mais bem descritas clinicamente, é a polimicrogiria perisylviana bilateral (PPB). Essa forma de polimicrogiria atinge a região que tange a fenda Sylviana, podendo apresentar-se tanto unilateralmente quanto em ambos os hemisférios. O padrão de herança da PPB foi descrito inicialmente como ligada ao cromossomo X por Borgatti et al. em 1999. Já em 2000, Guerreiro et al. confirmaram o padrão de herança consistente com herança ligada ao cromossomo X, mas ainda nenhum gene havia sido identificado como responsável pelo distúrbio. Nosso grupo recentemente mapeou uma nova região candidata para a PPB em Xq27.1-q27.3, e esta tese se propôs a avaliar essa região através da técnica de sequenciamento em larga escala aliada à tecnologia de captura para o cromossomo X. Os resultados apontaram como potenciais patogênicos os genes MAGEC1, UBE2NL, além da região do gene SPANXC, todos localizados na região candidata, mas uma avaliação mais detalhada levantou a hipótese de uma relação complexa entre as alterações encontradas no gene MAGEC1 e o quadro clínico dos pacientes. Além da análise da região Xq27.1-q27.3, considerando o grande número de genes de microtúbulo que tem sido relacionado a malformações do córtex cerebral, esse trabalho também avaliou pacientes esporádicos e famílias com histórico de PPB realizando triagem de mutações nas regiões codificantes dos genes AFF2, SLITRK2 e SLITRK4, localizados na região candidata, nos genes de microtúbulo TUBA1A, TUBB2B e TUBA8, além dos genes SRPX2 e WDR62, presentes em trabalhos na literatura de malformações corticais. A triagem foi realizada utilizando as técnicas de DHPLC e de sequenciamento utilizando a técnica de Sanger por eletroforese capilar. Foi encontrada uma alteração potencialmente patogênica no gene AFF2. As alterações identificadas neste estudo que resultam em troca de aminoácidos foram avaliadas utilizando as ferramentas in silico MutPred, SNPs&GO, Polyphen 2, Panther e



SIFT, de forma a fornecer mais informações a respeito de seu potencial patogênico. Além disso, as variantes inéditas identificadas nesse trabalho foram estudadas em uma amostra de indivíduos normais (grupo controle). Com esses dados foi possível sugerir que algumas dessas variantes encontradas possuem potencial patogênico que deve ser futuramente investigado através de estudos funcionais.



ABSTRACT



Polimicrogyria (PMG) is a cortical malformation caused by failures during the brain cortex development process and is characterized by an excessive number of small gyri, resulting in an irregular cortical surface. The severity of its clinical manifestations is directly related to the extension of the tissue abnormalities. Bilateral Perisylvian Polimicrogyria (BPP) is the most comum and, consequently, a very well described syndrome that affects the cortex surrounding the Sylvian fissures in both hemispheres. The genetic pattern for BPP was initially described by Borgatti et al. as an X-linked pattern, confirmed by Guerreiro et al. in 2000, but with no specific gene identified. We have recently described a candidate site for BPP at the Xq27.1-27.3 region and, in this project, we proposed to evaluate this site through next generation sequencing technology combined with capture technology. Our results suggest that MAGEC1 and UBE2NL genes, or the SPANXC gene area might be related to the pathogeny in this case, however a further analysis brought up the hypothesis of a complex relation between the MAGEC1 mutations and the clinical manifestations in each different patient. Considering recurrent description of relations between microtubule genes and cortex malformations, we also performed the evaluation of exon regions of eight selected genes from sporadic patients and BPP families through DHPLC and sequencing. The analysis focused on AFF2, SLITRK2 and SLITRK4 genes, located at the identified site, microtubule genes TUBA1A, TUBB2B and TUBA8, and SRPX2 and WDR62 genes, also related to cortical malformations. As a result from this screening, we identified a potentially pathogenic mutation in gene AFF2. All nonsynonymous SNPs were evaluated using the in silico tools MutPred, SNPs&GO, Polyphen 2, Panther and SIFT, providing further insights for their analysis. A control group of individuals was analyzed for the presence of the non-described SNPs. These data suggest a pathogenic potential for these genetic alterations that must be investigated through function studies.



a.C.	Antes de Cristo
ACN	Acetonitrila
AFF1/AF4	ALL1-fused gene from chromosome 4
AFF2 / FMR2	Membro 2 da família AF4/FMR2
AFF3/LAF4	Proteína nuclear linfoide relacionada a AF4
AFF4/AF5q31	ALL1-fused gene from 5q31
Asp	Asparagina ou ácido aspártico
COL18A1	Colágeno, tipo XVIII, alfa 1
СР	Placa cortical
CPXCR1	Candidato 1 da Região cromossômica CPX
CSTB	Protease cisteína catepsina B
d.C.	Depois de Cristo
dATP	desoxiadenosina Trifosfato
dCTP	desoxicitidina Trifosfato
DCX	Doublecortin
dGTP	desoxiguanosina Trifosfato
DHPLC	<i>Denaturing High-Performance Liquid Chromatograph /</i> Cromatografia Líquida de Alta Performance Desnaturante
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucleico



dTTP	Desoxitimidina Trifosfato
EPM1	Epilepsia mioclônica progressiva do tipo Unverricht-Lundborg
EST	expressed sequence tag
et al.	"E outros"
F	Feminino
FOXP2	forkhead box P2
Gln	Glutamina
GPR56	G protein-coupled receptor 56
H2BFM	Membro M da Família de Histonas H2B
H2BFWT	Membro W da Família de Histonas H2B, testículo-específico
НС	Hospital das Clínicas
HDX	highly divergent homeobox
ILAE	International League Against Epilepsy / Liga Internacional Contra a Epilepsia
Ile	Isoleucina
IZ	intermediate zone / zona intermediária
KIAA1279	KIF1-binding protein
L	<i>layer</i> / camada
Lis	Lisina
LIS1	lissencephaly-1
LRR	leucine rich repeats
М	Masculino
MAGEC1	melanoma antigen family C, 1



MCC	Malformações do córtex cerebral
MCEF	Major CDK9 elongation factor-associated protein
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
NCBI	National Center for Biotechnology Information / Centro Nacional para Informação Biotecnológica
NGS	next generation sequencing
NHEJ1	nonhomologous end-joining factor 1
PAX6	paired box 6
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
PMG	Polimicrogiria
PMG PS	Polimicrogiria perisylviana
РРВ	Polimicrogiria perisylviana bilateral
PPL	primordial plexyform layer / camada plexiforme primordial
Pro	Prolina
RAB3GAP1	RAB3 GTPase activating protein subunit 1
RM	Ressonância magnética
RNA	Acido ribonucleico
RSB	reaction stop buffer
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SLITRK2	Membro 2 da família SLIT e NTRK-like
SLITRK4	Membro 4 da família SLIT e NTRK-like
SNP	single nucleotide polimorphism / polimorfismos de único nucleotídeo



SP	Subplaca
SPANXC	Membro C da família SPANX
SPANXD	Membro D da família SPANX
SPANXN4	Membro N4 da família SPANX
SRPX2	sushi-repeat containing protein, X-linked 2
SVZ	Subventricular zone / zona subventricular
TBR2	T-box brain gene 2
TE	Tampão tris-EDTA
TEAA	Trietilamonio
TGIF2LX	TGFB-induced factor homeobox 2-like, X-linked
TUBA1A	Alfatubulina 1ª
TUBA8	Alfatubulina 8
TUBB2B	Betatubulina 2B classe IIb
TUBB3	Betatubulina 3 class III
UBE2NL	Enzima de conjugação à ubiquitina tipo E2N
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
uPAR	urokinase plasminogen activator receptor
V	ventricle / ventrículo
Val	Valina
VZ	Ventricular zone / zona ventricular
W	weeks / semanas
WDR62	WD repeat domain 62



WM

white matter / massa branca





LISTA DE TABELAS

Página
0

Tabela 1.	Classificação de malformações do córtex cerebral, segundo Barkovich <i>et al.</i> , 2012	53
Tabela 2.	Genes selecionados para análise de triagem de mutações em pacientes esporádicos e pequenas famílias	62
Tabela 3.	Dados de pacientes, esporádicos e familiais, cujo material genético foi avaliado neste projeto	71
Tabela 4.	Tipos de polimicrogirias apresentados pelos pacientes avaliados neste projeto	78
Tabela 5.	Comparativo entre as técnicas de sequenciamento em larga escala mais utilizadas e o método Sanger (modificado de Voelkerding, 2009)	86
Tabela 6.	Lista de algoritmos utilizados para a análise <i>in silico</i> das alterações detectadas	92
Tabela 7.	Lista de algoritmos utilizados para a análise <i>in silico</i> das alterações detectadas	93
Tabela 8.	Alterações identificadas na análise por seqüenciamento por eletroforese capilar do gene TUBA1A	114
Tabela 9.	Alterações identificadas no seqüenciamento do gene WDR62	1119
Tabela 10.	Análise <i>in silico</i> das alterações identificadas pela triagem de mutações através de DHPLC e sequenciamento pelo método de Sanger	123
Tabela 11.	Dados técnicos da avaliação do DNA de pacientes da família 1 através de captura e sequenciamento em larga escala	127
Tabela 12.	Lista de alterações identificadas pelo seqüenciamento em larga escala do cromossomo X de pacientes de família detentora da região candidata	130
Tabela 13.	Análise <i>in silico</i> das alterações identificadas pelo sequenciamento em larga escala	132
Tabela 14.	Alteração com maior potencial patogênico identificada neste estudo.	174



Tabela 15.	Dados técnicos do sequenciamento em larga escala para o material genético de cada indivíduo avaliado	178
Tabela 16.	Sequências de <i>primers</i> e respectivas temperaturas de anelamento estabelecidas para a amplificação dos exons do gene <i>SRPX2</i>	205
Tabela 17.	Sequencias de <i>primers</i> e respectivas temperaturas de anelamento para a amplificação dos exons do gene <i>AFF2</i>	206
Tabela 18.	Sequencias de <i>primers</i> e respectivas temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene <i>TUBA1A</i>	208
Tabela 19.	Sequências de <i>primers</i> e respectivas temperaturas de anelamento estabelecidas para a amplificação dos exons do gene <i>SRPX2</i> . Sequencias de <i>primers</i> e respectivas temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene <i>TUB</i> 48	208
Tabela 20.	Sequencias de <i>primers</i> e respectivas temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene <i>TUBB2B</i>	209
Tabela 21.	Sequencias de <i>primers</i> e respectivas temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene <i>WDR62</i>	209
Tabela 22.	Sequencias de <i>primers</i> e respectivas temperaturas de anelamento para análise das alterações nos genes HDX, CPXCR1, MAGEC1, TGIF2LX, SPANXC, H2BFM e UBE2NL	211
Tabela 23.	Sequencias iniciadoras para o sequenciamento dos genes MAGEC1, SPANXC e SPANXD	212



Figura 1.	Esquema das principais etapas do processo de desenvolvimento do córtex cerebral humano, modificado de Bentivoglio <i>et al.</i> 2003. Abreviaturas: CP = placa cortical; IZ = zona intermediária; L = camada; PPL = camada plexiforme primordial; SP = subplaca; SVZ = zona subventricular; VZ = zona ventricular; W = semana; WM = massa branca	50
Figura 2. Figura 3.	Representação esquemática do mecanismo <i>inside-out</i> e tangencial da migração, durante o processo de desenvolvimento do córtex cerebral, retirado de Bentivoglio et al. 2003. Abreviaturas: V = ventrículo; VZ = zona ventricular; IZ = zona intermediária; SP = subplaca; CP = placa cortical Imagens de ressonância magnética de indivíduos normais e portadores de malformação cortical: [A] individuo normal, [B] paciente de lissencefalia, [C] indivíduo normal, [D] paciente com polimicrogiria perisylviana (seta) e [E] paciente com heterotopia	51
Figura 4.	nodular periventricular (seta) e [15] paciente com necerotopia nodular periventricular (seta) Heredograma de família na qual a região candidata Xq27-1.27-3 foi identificada	54 78
Figura 5. Figura 6.	Heredograma de família cujo material genético foi avaliado junto aos pacientes esporádicos Heredograma de família cujo material genético foi avaliado junto	78
Figura 7.	aos pacientes esporádicos Heredograma de família cujo material genético foi avaliado junto aos pacientes esporádicos	79 79
Figura 8.	Heredograma de família cujo material genético foi avaliado junto aos pacientes esporádicos.	80
Figura 9.	Heredograma de família cujo material genético foi avaliado junto aos pacientes esporádicos	80
Figura 10.	Esquema ilustrativo do protocolo para uso do SureSelect ^{XI} Human X-Chromosome Panel Kit, da Agilent Technologies (modificado do protocolo formacido palo fabricante em unum acilent com)	88
Figura 11.	Heredograma da família que apresentou ligação à região Xq27.1- 27.3. Os indivíduos selecionados para a análise de sequenciamento	89
Figura 12.	em larga escala estão circulados <i>Pipeline</i> do Genoscope no qual foram disponibilizados os dados obtidos no sequenciamento em larga escala	90



Figura 13.	Lista de SNPs fornecida pelo Pipeline do Genoscope baseada nas sequências analisadas	91
Figura 14.	Heredograma indicando os indivíduos cujo DNA foi avaliado através da técnica de SNP <i>array</i>	96
Figura 15.	Análise cromatográfica permitindo observar os picos de retenção de paciente alterado (lilás) e controle (vermelho)	103
Figura 16.	Análise de seqüenciamento automático do exon 1 de paciente com alteração no DHPLC, destacando local da alteração	104
Figura 17.	Análise cromatográfica permitindo observar os picos de retenção de paciente alterado (azul) e controle (preto)	104
Figura 18.	Cromatograma de seqüenciamento automático mostrando a transversão citosina para adenina (SNP intrônico) em heterozigose (seta)	105
Figura 19.	Análise de sequenciamento do fragmento contendo o exon 15 gene AFF2, com destaque para a alteração refSNPID rs16994895	106
Figura 20.	Análise cromatográfica do gene <i>SLITRK2</i> exon 1.3 mostrando padrões de retenção diferentes identificados em pacientes com PMG. O pico verde é o mais comum e o pico preto é o menos	108
Figura 21.	comum. A seta indica a diferença entre os picos Análise cromatográfica do gene <i>SLITRK2</i> exon 1.3 mostrando padrões de retenção diferentes identificados em pacientes com PMG. O pico verde é o mais comum e o pico azul é o menos comum A seta indica a diferença entre os picos	109
Figura 22.	Análise cromatográfica do gene <i>SLITRK2</i> exon 1.3 mostrando padrões de retenção diferentes identificados em pacientes com PMG. O pico rosa é o mais comum e o pico azul é o menos comum (alterado)	109
Figura 23.	[A] Cromatograma de seqüenciamento automático mostrando o SNP rs2748589 T>C. [B] Cromatograma de seqüenciamento automático mostrando a sequencia considerada normal	110
Figura 24.	[A] Cromatograma de seqüenciamento automático mostrando o SNP rs2748589 T>C. [B] Cromatograma de seqüenciamento sutomático mostrando a sequencia considerada pormel	111
Figura 25.	Análise cromatográfica do gene <i>SLITRK2</i> exon 1.5 mostrando padrões de retenção diferentes identificados em pacientes com $PMC_{\rm e}$ O pico rovo á o mais comum a o pico stul á o monos	
Figura 26.	comum (alterado). A seta indica a diferença entre os picos Cromatograma de seqüenciamento automático mostrando a	111 112
	transição de timina para citosina em heterozigose	



Figura 27.	Análise de sequenciamento que identificou a alteração sinonímia rs1056875. No cromatograma A se observa o local da troca de base	
	de indivíduo heterozigoto, enquanto em B se observa a leitura de	115
	cromatograma considerado normal	110
Figura 28.	Análise de sequenciamento que identificou a alteração sinonímia	
-	rs61730859. No cromatograma A se observa a leitura de	
	cromatograma considerado normal, enquanto em B se observa o	115
	local da troca de base de indivíduo heterozigoto para a alteração	110
Figura 29.	Análise de sequenciamento que identificou a alteração sinonímia	
-	rs697624. No cromatograma A se observa o local da troca de base	
	de indivíduo heterozigoto, enquanto em B se observa a leitura de	116
	cromatograma considerado normal	110
Figura 30.	Análise de sequenciamento que identificou a alteração sinonímia	
	rs1065741. No cromatograma A se observa o local da troca de base	
	de indivíduo heterozigoto, enquanto em B se observa a leitura de	116
	cromatograma considerado normal	
Figura 31.	Análise de sequenciamento que identificou a alteração sinonímia	
	rs1062432. Em A se observa o local da troca de base de indivíduo	
	heterozigoto, enquanto em B se observa a leitura de cromatograma	117
	considerado normal	
Figura 32.	Análise de sequenciamento que identificou a alteração sinonímia	
	rs234332. Em A se observa o local da troca de base de indivíduo	
	heterozigoto, enquanto em B se observa a leitura de cromatograma	118
	considerado normal	
Figura 33.	Análise de sequenciamento que identificou a alteração rs67130760.	
	No cromatograma observa-se o local no qual há ausência de uma	118
T : A		
Figura 34.	Analise de sequenciamento que identificou a alteração rs14/021603.	
	Em A se observa o local da troca de base de individuo	
	heterozigoto, enquanto em B se observa a leitura de cromatograma	120
E	considerado normal.	
Figura 35.	Analise de sequenciamento que identificou a alteração rs2301/34.	
F ' 2(Em B se observa o local da troca de base de individuo	
	nelefozigolo, enquanto em A se observa a leitura de cromatograma	120
	Análico do seguenciamento que identifican o alternação re2074425	
Figura 36.	No cromatograma A observa se a loitura considerada normal. Em	
	B observa se o cromatograma de um beterozigoto para e alteração	
	E no cromatograma C observa se a leitura de um indivíduo.	404
	homozigoto para a alteração	121
	nomoligoto para a ancração	



Figura 37.	Eletroforese em gel de agarose 1% para avaliação da integridade do DNA de pacientes e familiares. No destaque, as amostras selecionadas do indivíduo controle (A) e dos indivíduos afetados	126
Figura 38.	(B, C e D) Dados de cobertura do experimento de sequenciamento em larga	128
Figura 39.	Análise de sequenciamento que confirmou a alteração rs35161124, no gene <i>HDX</i> . No cromatograma A, observa-se a leitura de um homozigoto para a alteração, uma troca de uma timina por uma citosina. O cromatograma B apresenta a secuência selvagem	141
Figura 40.	Análise de sequenciamento que confirmou a alteração rs5984611, no gene <i>CPXCR1</i> . No cromatograma A, observa-se a leitura de um homozigoto para a alteração, uma troca de uma guanina por uma adenina. O cromatograma B apresenta a sequência selvagem	141
Figura 41.	Análise de sequenciamento que confirmou a alteração rs56256227, no gene <i>MAGEC1</i> . No cromatograma A observa-se a leitura de um indivíduo heterozigoto para a alteração, a troca de uma citosina por uma timina, enquanto o cromatograma B apresenta a leitura de	142
Figura 42.	indivíduo homozigoto Análise de sequenciamento que confirmou a alteração rs11575111, no gene <i>TGIF2LX</i> . No cromatograma A observa-se a leitura de indivíduo normal, enquanto em B é observada a leitura de indivíduo heterozigoto para a alteração, uma troca de guanina por citorina	142
Figura 43.	Análise de sequenciamento que confirmou a alteração rs2301384, no gene <i>H2BFM</i> . No cromatograma A observa-se a leitura de indivíduo normal, enquanto em B é observada a leitura de indivíduo homozigoto para a alteração, uma troca de citosina por timina e em C se observa leitura de indivíduo heterozigoto	143
Figura 44.	Análise de sequenciamento que confirmou a alteração rs237520, no gene UBE2NL. No cromatograma A observa-se a leitura de indivíduo normal, enquanto em B é observada a leitura de indivíduo homozigoto para a alteração, uma troca de timina por guanina e em C se observa leitura de indivíduo heterozigoto	144
Figura 45.	Análise de sequenciamento que confirmou a alteração rs7764855 no gene <i>MAGEC1</i> . No cromatograma observa-se a citosina na posição onde, em indivíduos normais, encontra-se uma timina	144
Figura 46.	Analise de sequenciamento que confirmou a alteração rs176045 no gene <i>MAGEC1</i> . Em A observa-se o alelo selvagem, e em B observa-se a alteração, uma troca de citosina por adenina	145



Figura 47.	Análise de sequenciamento que confirmou a alteração rs12558365	
	no gene MAGEC1. Em A observa-se o alelo selvagem, e em B	145
	observa-se a alteração, uma troca de citosina por timina	
Figura 48.	Analise de sequenciamento que confirmou a alteração rs5/22/2/5	
	no gene MAGEC1. Em A observa-se o alelo selvagem, e em B	146
T : (0	observa-se a alteração, uma troca de timina por citosina	
Figura 49.	Analise de sequenciamento que confirmou a alteração rs62611965	
	no gene MAGEC1. Em A observa-se o alelo selvagem, e em B	146
T : T 0	observa-se a alteração, uma troca de citosina por guanina	
Figura 50.	Analise de sequenciamento que confirmou a alteração rs62611966	
	no gene MAGEC1. Em A observa-se o alelo selvagem, e em B	147
T ' 5 4	observa-se a alteração, uma troca de citosina por guanina	
Figura 51.	Analise de sequenciamento que confirmou a alteração rs $138268/26$	
	no gene MLAGECI. Em A observa-se o aleio selvagem, e em B	148
E:	observa-se a alteração, uma troca de timina por citosina	
Figura 52.	Analise de sequenciamento que confirmou a alteração $rs1400/5882$	
	no gene <i>MAGECI</i> . Em A observa-se o alelo selvagem, e em B	148
E:	An flight de generación de la alternación de guanina por citosina	
Figura 55.	Analise de sequenciamento da alteração rs1/5552045 no gene	149
Eiona 54	A pálica de acquenciamente atravás de visualização des made portedos	
Figura 54.	Analise de sequenciamento atraves de visualização dos <i>reals</i> gerados	151
Figure 55	Alinhamento dos reada obtidos do indivíduo A não afotado na	
rigula 55.	região do gene SPANXNA No destaque o local da deleção	152
Figura 56	Alinhamento dos <i>mads</i> obtidos do indivíduo B afetado do sevo	
1 iguia 50.	masculino, na região do gene SPANXN4. No destaque o local da	450
	deleção	152
Figura 57.	Alinhamento dos <i>reads</i> obtidos do indivíduo C. afetado do sexo	
	feminino, na região do gene SPANXN4. No destaque, o local da	152
	deleção	155
Figura 58	Alinhamento dos <i>reads</i> obtidos do indivíduo D. afetado do sexo	
8	masculino, na região do gene SPANXN4. No destaque, o local da	153
	delecão	155
Figura 59.	Visualização dos produtos de PCR em gel de agarose 2%. Amostras	
0	1 a 7, em seguida o branco (três canaletas), amostras aleatórias. M é	154
	o marcador de peso molecular de 100pb	154
Figura 60.	Visualização dos produtos da fragmentação em gel de agarose 2%.	155
0	Amostras 1 a 7. M é o marcador de peso molecular 50bp	155
	· · ·	



Figura 61.	Panorama geral do Cromossomo X de uma mulher portadora do haplótipo. Observar a distribuição homogênea dos <i>spots</i> ao longo de todo cromossomo (a linha se mantém praticamente no valor 2, demonstrando a presenca de duas cópias).	156
Figura 62.	Panorama geral do Cromossomo X de um homem portador do haplótipo. Observar a distribuição homogênea dos <i>spots</i> ao longo de todo cromossomo (a linha se mantém praticamente no valor 1, demonstrando a presenca de uma cópia)	157
Figura 63.	Panorama geral do Cromossomo X de um homem portador do haplótipo. Observar a distribuição homogênea dos <i>spots</i> ao longo de todo cromossomo, já que a linha se mantém praticamente no valor	158
Figura 64.	Panorama da região candidata Xq27.1-q27.3 de um homem portador do haplótipo. Observar a distribuição homogênea dos <i>spots</i> ao longo de todo cromossomo, com a linha se mantendo praticamente no valor 1, demonstrando a presença de uma	150
Figura 65.	cópia Panorama da região candidata Xq27.1-q27.3 de uma mulher portadora do haplótipo. Observar a distribuição homogênea dos <i>spots</i> ao longo de todo cromossomo, com a linha se mantendo	137
Figura 66.	praticamente no valor 2, demonstrando a presença de duas cópias Panorama da região candidata Xq27.1-q27.3 de um homem portador do haplótipo. Observar a distribuição homogênea dos <i>spots</i> ao longo de todo cromossomo, com a linha se mantendo praticamente no valor 1 demonstrando a presença de uma	160
Figura 67.	cópia Análise de alta resolução da região cromossômica 17q21.31 do indivíduo III-4 da família 1. Notar as barras em azul e vermelho que representam variações no número de cópias já descritas em bancos de dados e não associadas a quadros patológicos	161
Figura 68.	Representação gráfica da estrutura da proteína SRPX2, modificado de Tanaka <i>et al.</i> (86)	166
Figura 69.	Estrutura de dímero alfa/beta-tubulina, modificado de Nogales <i>et al.</i> (96)	172
Figura 70.	Esquema representativo dos parâmetros utilizados para a seleção das alterações identificadas no sequenciamento massal que devem ser avaliadas mais profundamente	177
Figura 71.	Lista de tipos de repetições presentes no genoma humano [a] e as porcentagens de cada cromossomo constituídas por tais repetições [b], modificado de Treangen & Salzberg (105)	179



LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Listas de sequencias iniciadoras (primers) para as reações de	
	amplificação de DNA por PCR	205
Anexo 2.	Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências	
	Médicas da UNICAMP	213
Anexo 3.	Formulário de consentimento livre e esclarecido para pesquisa	
	médica	215
Anexo 4.	Artigo publicado relatando a descoberta da região candidata	
	Xq27.1-27.3 (Santos et al., 2008)	219





I. Introdução




Hipócrates (460-379 a.C.), na Grécia antiga, já discutia as causas da epilepsia e de distúrbios mentais, como é o caso de sua obra "On the Sacred Disease", abordando também uma visão espiritual do tema. De forma notável, ele relacionou a epilepsia ao cérebro e reconheceu a existência de um componente genético para o distúrbio. Nos séculos seguintes, com o foco da Medicina voltado para o coração, o papel do cérebro no organismo humano ficou subestimado até que, no século XVI, trabalhos como o do médico e anatomista Vesalius (1514-1564 d.C.), principalmente com dissecação de cadáveres humanos, resultou em grandes avanços no entendimento da anatomia cerebral. O primeiro livro abordando doenças neurológicas, "De Cerebri Morbis" (1549), de Jason Pratensis, já incluía a epilepsia em seu conteúdo.

No século XVII, trabalhos de neuroanatomia, como o do médico inglês Thomas Willis, possibilitaram o reconhecimento da importância funcional e clínica do cérebro, com a descrição da base patológica de um grande número de doenças, muitas delas neurológicas. Em seus livros, ele ilustra malformações cerebrais observadas em tecido *post-mortem* de pacientes com formas congênitas de retardo mental, correlacionando tais malformações com alterações de comportamento.

Em 1873, Camillo Golgi estabeleceu a técnica que consistia na fixação e impregnação de células do tecido nervoso por prata. A aplicação dessa nova técnica culminou, em 1880, na publicação do famoso artigo "*Sulla fina anatomia degli organi centrali del sistema nervoso*", contendo descrições ricas e detalhadas de células nervosas de diferentes tecidos. Suas observações foram o estopim para uma série de investigações acerca da embriogênese, em especial dos tecidos do sistema nervoso (1) e possibilitaram a hipótese, formulada por Wilhelm von Waldeyer-Haltz, de que as células nervosas são as unidades estruturais básicas do sistema nervoso, que mais tarde seria demonstrada por Santiago Ramón y Cajal (2).

Desse período em diante, a neurociência clínica avançou significativamente, de forma que neuropatologistas começaram a estabelecer uma relação entre malformações corticais e



epilepsia (3,4 e 5) e, pela primeira vez, levantou-se a hipótese de que as crises pudessem ser causadas por descargas elétricas anormais no cérebro.

O surgimento do exame de ressonância magnética (RM), na década de 1980, revolucionou o diagnóstico das malformações corticais com seu notável poder de resolução e contraste, fornecendo uma riqueza de detalhes jamais observada antes (6).

1. EPILEPSIA:

Epilepsia é um quadro complexo, com etiologia variada e padrões clínicos, eletrofisiológicos, patológicos e de imagem diferenciados, sendo essa heterogeneidade a justificativa para a utilização do termo "síndrome" ao invés de "doença" (7). Portanto, o termo é utilizado para definir um conjunto de síndromes ou doenças de diferentes etiologias e prognósticos, que apresentam uma característica comum: a ocorrência de crises, as quais recorrem na ausência de condição tóxico-metabólica ou febril. Múltiplas crises em um período de 24 horas ou um episódio de *status epilepticus* são considerados eventos isolados (8).

A crise epiléptica é causada por descargas elétricas anormais excessivas e transitórias das células nervosas, resultantes da movimentação iônica através da membrana neuronal. Existem várias causas para a ocorrência de crises epilépticas, como distúrbios metabólicos, traumas cranioencefálicos, estados febris, defeitos genéticos, malformações corticais dentre outras. Dentre todas estas causas destacam-se as epilepsias estruturais/metabólicas e as malformações de desenvolvimento cortical que constituem as maiores causas de epilepsia na infância (9). Nos casos em que a epilepsia é refratária ao tratamento, a ressonância magnética tem revelado uma alta frequência de malformações corticais (10 e 11).



De acordo com o Relatório da Comissão da International League Against Epilepsy (ILAE) de Classificação e Terminologia, 2005-2009 (12), há pelo menos quatro grupos que podem ser considerados no contexto de síndrome ou doença:

- Síndromes eletroclínicas: o uso do termo "síndrome" será restrito a um grupo de entidades clínicas que são identificadas de forma confiável por um aglomerado de características eletroclínicas. Pacientes cuja epilepsia não se encaixe nos critérios para uma síndrome eletroclínica específica podem ser descritos em relação a uma variedade de fatores de relevância clínica (por exemplo, etiologia conhecida e tipos de crises).
- Constelações: além das síndromes eletroclínicas com fortes componentes genéticos
 e do desenvolvimento, há uma série de entidades que não são exatamente síndromes
 eletroclínicas no mesmo sentido, mas que representam constelações clinicamente
 distintas, com base em lesões específicas ou outras causas. Estas são, quanto ao
 diagnóstico, formas significativas de epilepsia e podem ter implicações para o
 tratamento clínico, particularmente a cirurgia. Estes incluem a epilepsia do lobo
 temporal mesial (com esclerose hipocampal), hamartoma hipotalâmico com crises,
 epilepsia com hemiconvulsão e hemiplegia, e "síndrome" de Rasmussen. A idade na
 apresentação não é uma característica definidora desses transtornos, no entanto, eles
 são suficientemente distintos para serem reconhecidos como entidades diagnósticas
 relativamente específicas.
- Epilepsias estruturais/metabólicas: inclui epilepsias secundárias a lesões ou condições específicas estruturais ou metabólicas, mas que não se enquadram em um padrão específico eletroclínico. Portanto, essas entidades representam um menor nível de especificidade do que os dois primeiros grupos.
- Epilepsias de causa desconhecida: são aquelas epilepsias que, no passado, eram chamadas "criptogênicas".



Segundo o relatório da Organização Mundial da Saúde do ano de 2009, cerca de 50 milhões de pessoas apresentavam algum tipo de epilepsia, sendo que aproximadamente 90% delas residem em países em desenvolvimento. Em 70% dos casos, o quadro clínico responde aos tratamentos. No entanto, aproximadamente 75% das pessoas afetadas em países em desenvolvimento não recebem o tratamento adequado, configurando um grave quadro da saúde pública (13).

2. O DESENVOLVIMENTO DO CÓRTEX CEREBRAL:

O desenvolvimento do córtex cerebral humano é um processo que envolve mecanismos complexos, requerendo uma eficiente maquinaria molecular e bioquímica para atingir o grau de organização apresentado pelas suas camadas neuronais, cujas células se diferenciam tanto morfológica quanto funcionalmente. No intuito de facilitar o estudo deste processo, pode-se didaticamente dividi-lo em três grandes estágios: proliferação, migração e organização celular.

O estágio de proliferação celular caracteriza-se pela extensa divisão dos precursores neuronais. Durante a fase de corticogênese, dois compartimentos germinativos, a zona ventricular e a zona subventricular, paralelas aos ventrículos cerebrais, originam neurônios piramidais e uma fração dos neurônios inibitórios do córtex cerebral. Na zona ventricular, progenitores neuroepiteliais dividem-se na superfície apical e são submetidos a uma migração intercinética durante as fases G1 e G2 de seu ciclo celular. Posteriormente, ocorrem mitoses na superfície basal da zona ventricular, originando progressivamente a zona subventricular. Ambos compartimentos apresentam padrão de expressão gênica diferenciados, já que a zona ventricular gera células neuronais para as camadas mais baixas, enquanto a zona subventricular fornece células para as camadas mais distantes do córtex cerebral. Dessa forma, os primeiros neurônios formam uma pré-placa que é subsequentemente dividida por novos neurônios corticais, originando uma zona marginal externa e uma subplaca interna (figura 1). Com o



progresso da corticogênese, os neurônios pós-mitóticos migram radialmente dos compartimentos germinativos para suas regiões de estabelecimento no córtex cerebral, constituindo a fase de migração (14, 15, 16 e 17).

A migração celular ocorre através da movimentação dos neurônios corticais, tanto pelas fibras radiais gliais, quanto por translocação nuclear ou somática, em um padrão denominado *inside-out* (figura 2), já que os primeiros neurônios gerados formam as camadas mais profundas e as células geradas em seguida ocupam, sucessivamente, camadas mais distantes do compartimento germinativo (18 e 19). Quando a placa cortical é totalmente estabelecida, a subplaca desaparece.

Após o estabelecimento das células em seus destinos, ocorre a fase de organização celular, estágio que envolve processos de extensão de neuritos, sinaptogênese e maturação neuronal, resultando em uma rede de ligações especificas entre as células, e na formação do neocórtex, que já responde por cerca de 75% do córtex adulto, contando com vinte bilhões de células neuronais (20 e 21).





Figura 1. Esquema das principais etapas do processo de desenvolvimento do córtex cerebral humano, modificado de Bentivoglio *et al.* (2003). Abreviaturas: CP = placa cortical; IZ = zona intermediária; L = camada; PPL = camada plexiforme primordial; SP = subplaca; SVZ = zona subventricular; VZ = zona ventricular; W = semana; WM = massa branca.





Figura 2: Representação esquemática do mecanismo *inside-out* e dos padrões radial e tangencial da migração, durante o processo de desenvolvimento do córtex cerebral, modificado de Bentivoglio *et al.* (2003). Abreviaturas: V = ventrículo; VZ = zona ventricular; IZ = zona intermediária; SP = subplaca; CP = placa cortical.

Uma falha em qualquer um destes três estágios da embriologia cortical pode levar ao desenvolvimento de malformações do córtex cerebral.



3. MALFORMAÇÕES DO CÓRTEX CEREBRAL:

A alta resolução das imagens obtidas pela técnica de ressonância magnética revelou a aparência do cérebro *in vivo*, revolucionando o diagnóstico de malformações do córtex cerebral (MCC). O advento dessa tecnologia confirmou os dados que colocavam as malformações do córtex cerebral (MCC) como uma das principais causas de doença mental e epilepsia (22), tendo revelado sua alta prevalência, de 8 a 14%, nos casos de epilepsia refratária a tratamento medicamentoso (10 e 11), correspondendo à segunda etiologia mais frequente de epilepsia refratária, atrás apenas da epilepsia de lobo temporal associada à esclerose hipocampal (23).

O termo malformações do córtex cerebral foi introduzido em 1996 para designar um grupo de desordens que atingem crianças com atraso de desenvolvimento e adultos com epilepsia, sendo classificadas de acordo com o estágio no desenvolvimento no qual ocorre o distúrbio. Com o avanço nos estudos genéticos e moleculares, novas síndromes foram descritas e novos genes e mutações gênicas foram identificados, gerando importantes informações referentes ao processo de desenvolvimento do córtex cerebral e exigindo atualizações dessa classificação, que ocorreram em 2001, 2005 e 2012 (24).

A tabela 1 apresenta, de forma resumida, a classificação das malformações do córtex cerebral, de acordo com sua última atualização, enquanto a figura 3 ilustra algumas dessas malformações através de imagens de ressonância magnética obtidas de pacientes.



Tabela 1: Classificação de malformações do córtex cerebral, de acordo com Barkovich et al. (2012).

CLASSE	SUBCLASSE	PRINCIPAL
CLASSE	SUBCLASSE	MANIFESTAÇÃO
Malformações de proliferação	Microcefalias congênitas resultantes de proliferação reduzida ou apoptose acelerada	-
neuronal ou glial anormal ou apoptose	Megalencefalias causadas por proliferação acentuada ou atraso na apoptose	-
	Disgenesia focal e difusa e Displasia resultantes de proliferação anormal	-
	Malformações resultantes de anormalidades do início da fase de migração	Heterotopia periventricular (Fig. 1E)
Malformações devido à migração neuronal anormal	Malformações resultantes de anormalidades generalizadas na migração	Lissencefalias (Fig. 1B)
	Anormalidades localizadas da fase de migração	Heterotopia subcortical
	Anormalidades causadas por defeitos no final da fase de migração ou defeitos de limitação da membrana pial	Lissencefalia Cobblestone
	Polimicrogirias e esquizencefalias	-
Malformações do desenvolvimento pós-	Disgenesias corticais ligadas a erros inatos do metabolismo	-
migratório anormal	Displasias corticais focais	-
	Microcefalia pós-migratória	-





Figura 3: Imagens de ressonância magnética de indivíduos normais e portadores de malformação cortical: [A] indivíduo normal, [B] paciente de lissencefalia, [C] indivíduo normal, [D] paciente com polimicrogiria perisylviana (seta) e [E] paciente com heterotopia nodular periventricular (setas).

3.1. Aspectos Genéticos das Malformações do Córtex Cerebral:

A etiologia das malformações do córtex cerebral é heterogênea, podendo estar ligada a causas genéticas, causas não genéticas ou uma combinação de ambas. A identificação de uma causa genética provê um diagnóstico diferenciado ao indivíduo, facilitando uma previsão mais precisa da evolução do seu quadro clínico e possibilitando um aconselhamento genético mais preciso à família do paciente (25). Além disso, a evolução nos estudos genéticos de malformações corticais têm fornecido elementos importantes para o entendimento do



processo de desenvolvimento do córtex cerebral, além de outros aspectos celulares e fisiológicos de grande relevância, como aqueles relacionados ao funcionamento do citoesqueleto e sua atuação direta na migração neuronal.

A evolução nos critérios de diagnóstico das malformações do córtex cerebral têm facilitado a escolha e agrupamento de famílias para estudos de ligação, fazendo com que as descobertas de novos genes ocorram rapidamente. A função de tais genes frequentemente confirma a hipótese levantada para o mecanismo responsável pelo distúrbio através da classificação clínica.

Em 2008, Guerrini, Dobyns e Barkovich (26) listaram as malformações do córtex cerebral com causa genética até então descritas. São 27 quadros clínicos, relacionados a 33 loci, dos quais 24 genes foram mapeados. Dos 33 loci, apenas quatro localizam-se no cromossomo X, sendo os outros 29 autossômicos. A grande maioria dos genes já identificados está relacionada a malformações da fase de migração, revelando a importância de processos como o transporte via microtúbulos, posicionamento centrossomal, transporte nuclear, estabilização de microtúbulos, fusão e trânsito de vesículas e integridade neuroependimal no desenvolvimento cortical. Desde então, não surpreende que mutações nos genes de microtúbulo Alfatubulina 1A (TUBA1A), Alfatubulina 8 (TUBA8), Betatubulina 2B (TUBB2B) e Betatubulina 3 (TUBB3) tem sido associadas a malformações resultantes de migração neuronal anormal e de desenvolvimento pós-migratório. Em 2009, Jaglin et al. (27) relataram mutações de novo no gene TUBB2B encontradas em quatro pacientes com polimicrogiria bilateral assimétrica e em 2012, Guerrini et al. (28) descreveram três novas mutações, neste mesmo gene, em pacientes que apresentavam polimicrogiria difusa e paquigiria, estendendo o espectro de fenotípico de malformações corticais associadas ao gene TUBB2B. Abdollahi et al. (29) identificaram um caso de síndrome autossômica recessiva causada por uma mutação no gene TUBA8, encontrada em pacientes com polimicrogiria generalizada associada a hipoplasia do nervo óptico.



Já o gene *TUBA1A*, que codifica uma subunidade estrutural de microtúbulos, tem sido relacionado a diferentes tipos de malformações do córtex cerebral, com diferentes mutações identificadas. Poirier *et al.* (30) encontraram mutações *de novo* em seis pacientes não-familiais que apresentavam um grande espectro de disgenesias cerebrais. Já Fallet-Bianco *et al.*, em 2008, e Leucortois *et al.*, em 2010, (31 e 32) descreveram casos de fetos portadores de mutações no gene *TUBA1A* que apresentaram quadros extremas de disgenesia cerebral que resultaram em aborto. Bahi-Buisson *et al.* (33) detectaram seis mutações *de novo* no gene *TUBA1A* em pacientes de lissencefalia. Kumar *et al.* (34) realizaram um estudo com 17 pacientes com diferentes espectros de lissencefalia, além de um paciente com agenesia do corpo caloso e hipoplasia cerebelar, identificando seis novas mutações e duas já descritas anteriormente. E mais recentemente, em 2011, Jansen *et al.* (35) identificaram duas novas mutações nesse gene, uma delas em um paciente com agiria/paquigiria e a outra em três pacientes de uma família, dois deles com quadro de polimicrogiria perisylviana.

Outro gene que tem sido relacionado a malformações corticais é o *WD repeat domain 62* (*WDR62*), de função ainda não descrita. Dois desses trabalhos utilizaram a técnica de sequenciamento de exoma. Bilguvar *et al.*, em 2010 (36), identificaram mutações nesse gene em pacientes com grande espectro de malformações corticais, incluindo microlissencefalia, agiria, paquigiria, esquizencefalia e microcefalia. Esse trabalho também analisou expressão do *WDR62* em cérebro de camundongos em desenvolvimento. Murdock *et al.* (37) também identificaram, através da técnica de sequenciamento de exoma, mutações no gene *WDR62*, agora em um par de irmãos do sexo masculino, um deles com polimicrogiria parietal bilateral, enquanto o outro apresentou polimicrogiria extensa e um foco de heterotopia de massa cinzenta na região parietal direita. Também em 2011, Bhat *et al.* (38), identificaram duas novas mutações em duas famílias afetadas por paquigiria, microlissencefalia, heterotopia em banda, espessamento giral e cortex displásico.



4. POLIMICROGIRIAS:

O termo polimicrogiria (PMG) define um número excessivo de pequenos giros separados por sulcos rasos (15, 39) e um padrão anormal de laminação, conferindo à superfície cortical uma aparência irregular, visível ao exame de ressonância magnética de crânio. Microscopicamente, é possível observar dois padrões histológicos de polimicrogiria: simplificação no número de camadas corticais, que apresenta quatro camadas, ao invés de seis delas, ou ausência total de camadas (40). Esse distúrbio é relacionado a falhas na fase de organização cortical, incluindo o final da fase de migração (41), assim como a padronização e organização regional do cérebro em estágios prematuros de desenvolvimento cortical, geralmente entre a 17^a a 25-26^a semanas de gestação (42,43).

A polimicrogiria é uma malformação altamente heterogênea, podendo resultar de eventos genéticos e destrutivos, incluindo infecções, hipoxi-isquemia e trauma. Em muitos casos, até a análise combinada de imagem, patologia e estudos genéticos é incapaz de identificar a etiologia (16).

A PMG pode se apresentar de forma generalizada ou focal, unilateral ou bilateral. Pode ocorrer como uma lesão isolada ou associada com outras malformações corticais, como a heterotopia nodular periventricular (44) ou a esquizencefalia (45), ou ainda como parte de múltiplas anomalias congênitas graves (46). Sua forma mais comum é simétrica, bilateral e acomete principalmente a região perisylviana.

A gravidade das manifestações clínicas está diretamente relacionada à extensão do distúrbio e a região acometida. A polimicrogiria não é necessariamente associada a epilepsia, apesar de sua incidência nesses pacientes ser alta, em torno de 87% (47). Os indivíduos ainda podem apresentar déficit cognitivo em graus variáveis, sinais pseudobulbares caracterizados, principalmente, por dificuldades na aquisição e desenvolvimento da linguagem oral e/ou escrita e dificuldades de mobilidade da língua, com consequente distúrbio de mastigação e salivação. As lesões bilaterais ou unilaterais extensas estão relacionadas a um pior prognóstico.



O mecanismo de epileptogênese nos pacientes de polimicrogiria não é conhecido. Modelos experimentais sugerem uma área mais extensa de perturbação funcional, além da anormalidade detectada visualmente, por isso o tratamento cirúrgico é pouco recomendado (48).

Nos exames de imagem, a aparência da polimicrogiria varia de acordo com a idade do paciente. Em pacientes recém-nascidos até dois anos de idade, o córtex polimicrogírico apresenta-se delgado, com múltiplas e pequenas ondulações. Após a mielinização, o córtex polimicrogírico apresenta-se levemente mais espesso. A superfície pial pode apresentar-se lisa, como resultado da fusão da camada molecular através dos microgiros adjacentes (49).

4.1. Polimicrogiria Perisylviana Bilateral:

A polimicrogiria perisylviana bilateral (PPB), também chamada de polimicrogiria opercular bilateral ou displasia perisylviana bilateral, foi descrita inicialmente por Kuznieck *et al.* em 1993 (50) e é a forma mais comum de polimicrogiria, apresentando espectro clínico e de neuroimagem muito amplos.

Essa forma de polimicrogiria atinge bilateralmente a massa cinzenta que tange a fissura sylviana, usualmente orientadas verticalmente e estendendo-se mais posteriormente ao lobo parietal. A observação histológica ao microscópio revelou tanto a forma com quatro camadas, quanto a ausência total de camadas. Essas anormalidades, geralmente, se apresentam de forma simétrica, mas esse padrão pode variar nos pacientes (46).

Os pacientes apresentam em geral um quadro de diplegia facio-faríngeo-glossomastigatória, levando a prejuízo na fala e deglutição, e quando os danos são muito extensos, pode ser observado um quadro de quadriparesia espástica (51). Além disso, a maioria dos pacientes possui quadro de retardo mental, sinais piramidais e epilepsia, com crises iniciadas,



geralmente, entre quatro e 12 anos de idade. Dentre os tipos de crises mais frequentes estão ausências atípicas, *drop-attacks* tônicos e atônicos, e crises tônico-clônicas. Apenas 26% dos pacientes apresentam crises parciais. Dentro do grupo de pacientes com epilepsia, cerca de 65% têm dificuldade de controle das crises (40).

4.2. Aspectos Genéticos das Polimicrogirias:

As diferentes formas de polimicrogirias têm sido associadas a poucos genes, incluindo o Sushi-repeat containing protein, X-linked 2 (SRPX2) (52), Paired box 6 (PAX6) (53), T-box brain gene 2 (TBR2) (54), KIF1-binding protein (KLAA1279) (55), RAB3 GTPase activating protein subunit 1 (RAB3GAP1) (56), G protein-coupled receptor 56 (GPR56) (42) and Colágeno, tipo XVIII, alfa 1 (COL18A1) (57), sendo todos, com exceção do SRPX2, encontrados em síndromes raras.

Somente a PPB, a polimicrogiria bilateral generalizada e a polimicrogiria bilateral frontal tiveram recorrência familial descrita dentre as síndromes polimicrogíricas. No caso da PPB, o espectro de achados histológicos nas famílias é vasto, com tênues desorganizações corticais que resultam em mudanças estruturais difíceis de serem detectadas por técnicas de imagens (58).

A primeira descrição de ocorrência de um padrão familial da PPB foi feita em 1996 por Andermann e Andermann (59) e caracterizada como herança ligada ao cromossomo X. Desde então, cerca de 28 casos familiais de PPB já foram descritos, e desses, 75% são compatíveis com o padrão de herança ligado ao cromossomo X. Ainda assim, nenhum gene foi identificado para nenhum desses casos. Em 1999, Borgatti *et al.* (60) descreveram um caso de PPB com herança ligada ao cromossomo X. Já em 2000, Guerreiro *et al.* (61), num estudo multicêntrico que reuniu 12 famílias, realizaram a investigação sistemática de membros da família de pacientes com quadro clínico de PPB confirmando o padrão de herança consistente com



herança ligada ao cromossomo X. Este estudo identificou indivíduos assintomáticos que apresentaram, na investigação de neuroimagem, polimicrogiria parietal posterior bilateral.

Estudos recentes, utilizando análise de ligação genética, mapearam uma região candidata em Xq28 em cinco famílias com uma forma da PPB ligada ao cromossomo X (62). Outra região candidata foi mapeada na região 16q12.2-21 em 2 famílias palestinas não-relacionadas e que apresentavam pais consanguíneos não-afetados e membros da prole afetados com polimicrogiria frontoparietal bilateral, sugerindo herança autossômica recessiva para esta síndrome (63). Posteriormente Chang *et al.* (64) acrescentaram 19 pacientes provenientes de 10 famílias com polimicrogiria frontoparietal bilateral, todos ligados à região cromossômica 16q. Em 2004, Piao *et al.* (42) identificaram o gene *GPR56* como responsável pela polimicrogiria frontoparietal bilateral num estudo com 12 famílias, sendo que a maior parte dos pacientes apresentou atraso no desenvolvimento, distúrbio de linguagem, dificuldade de marcha e epilepsia. Este gene codifica uma proteína expressa em células progenitoras neuronais das zonas ventricular e subventricular durante o período de neurogênese.

Já em 2006, Robin *et al.* (65) relacionaram pacientes de PPB com a síndrome de deleção 22q11.2. Ainda em 2006, Roll *et al.* (52) identificaram uma mutação no gene *SRPX2* em um paciente portador de PPB associada com epilepsia rolândica e dificuldades na fala, sua mãe e uma tia, ambas não afetadas. O gene *SRPX2* encontra-se na região Xq22 e codifica uma proteína de função ainda desconhecida. Uma das proteínas associadas ao *SRPX2* é a *cysteine protease cathepsin B* (CSTB), a qual é relacionada epilepsia mioclônica progressiva do tipo Unverricht-Lundborg (EPM1), que se manifesta através de múltiplos tipos de crises, mioclonia, demência e ataxia (66).

Cantagrel *et al.*, em 2007 (67) identificaram uma translocação na região do gene Nonhomologous end-joining factor 1 (NHEJ1) em um paciente com polimicrogiria extensa.

Nesse contexto, nosso grupo recentemente mapeou uma nova região candidata, compreendendo uma região de 13cM, em pacientes com PPB na região Xq27.1-q27.3 (68, 69),



uma região mais centromérica que prevista por Villard *et al.* (62). O ponto forte de nosso trabalho foi a utilização de uma única família, grande o suficiente para gerar *lod scores* significativos, sem o risco da presença de heterogeneidade na região.

Além disso, vários trabalhos foram publicados nos últimos três anos relacionando tanto a polimicrogiria, como outras MCC a mutações em genes de microtúbulo. O desenvolvimento do córtex cerebral envolve diversos mecanismos celulares complexos em seus estágios distintos, entre os quais se destaca o papel crucial dos componentes do citoesqueleto (70), fato reforçado pela descrição de mutações nos genes *Doublecortin (DCX)* e *lissencephaly-1 (LIS1)* em pacientes portadores de MCC, ambos envolvidos com a homeostase de microtúbulo (71).

Considerando esse panorama de genes relacionados a MCC, além do estudo da região candidata descrita por Santos *et al.* (2008), selecionamos alguns genes para a triagem de mutações em casos esporádicos de nossa casuística (tabela 2).

O estágio atual do entendimento da genética das polimicrogirias sugere que mutações em genes específicos afetariam a proliferação celular em regiões da zona embriológica ventricular subjacente a diferentes áreas corticais ou uma relação com genes envolvidos em padronização e organização regional do cérebro em estágios prematuros de desenvolvimento cortical. Considerando que a divisão do processo de desenvolvimento do córtex cerebral é mais didática do que real, e que estas três fases são parcialmente simultâneas, ou seja, o final da fase de proliferação coincide com o início da migração, e que o mesmo ocorre com as fases de migração e organização celular, é relevante que o estudo genético de malformações corticais vislumbre tal complexidade e não descarte produtos gênicos que possam atuar em qualquer etapa do processo.



Tabela 2: Genes selecionados para análise de triagem de mutações em pacientes esporádicos e pequenas famílias.

GENE	LOCALIZAÇÃO	FUNÇÃO	MÉTODO UTILIZADO NA TRIAGEM DE MUTAÇÕES
AFF2 (Membro 2 da família AF4/FMR2)	Xq28	Regulação da transcrição e de <i>splicing</i> alternativo, plasticidade sináptica	DHPLC + sequenciamento pelo método de Sanger
<i>SLITRK2</i> (Membro 2 da família SLIT e NTRK-like)	Xq27.3	Modulação da proliferação de neuritos, de sobrevivência neuronal e no estabelecimento de sinapses	DHPLC + sequenciamento pelo método de Sanger
<i>SLITRK4</i> (Membro 4 da família SLIT e NTRK-like)	Xq27.3	Modulação da proliferação de neuritos, de sobrevivência neuronal e no estabelecimento de sinapses	DHPLC + sequenciamento pelo método de Sanger
SRPX2 (sushi-repeat containing protein, X-linked 2)	Xq22.1	Processos de adesão celular	DHPLC + sequenciamento pelo método de Sanger
<i>TUBA1A</i> (Alfatubulina 1A)	12q13	Subunidade estrutural de microtúbulos	Sequenciamento pelo método de Sanger
TUBA8 (Alfatubulina 8)	22q11	Subunidade estrutural de microtúbulos	Sequenciamento pelo método de Sanger
<i>TUBB2B</i> (Betatubulina 2B)	6p25	Subunidade estrutural de microtúbulos	Sequenciamento pelo método de Sanger
WDR62 (WD repeat domain 62)	19q13	Desconhecida	Sequenciamento pelo método de Sanger



II.

OBJETIVOS





O Objetivo Geral deste trabalho foi procurar por mutações em pacientes esporádicos com polimicrogiria e casos familiais de pacientes com polimicrogiria perisylviana bilateral.

Os Objetivos Específicos deste trabalho foram:

- 1. Estudar genes candidatos previamente relacionados na literatura como possivelmente envolvidos na etiologia da polimicrogiria
- 2. Estudar genes candidatos localizados dentro da região previamente identificada em Xq27.1-q27.3
- 3. Buscar o gene responsável pela polimicrogiria perisylviana bilateral contido na região cromossômica Xq27.1-q27.3, utilizando tecnologia de captura e enriquecimento do exoma do cromossomo X seguido de sequenciamento em larga escala em pacientes pertencentes a família na qual a ligação genética foi confirmada.





III.

MATERIAL E MÉTODOS





1. ASPECTOS ÉTICOS

Todos os indivíduos cujo material genético foi utilizado neste estudo assinaram formulário de consentimento para coleta de sangue e análise molecular, tendo o mesmo sido aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (parecer #383/2000).

Para assegurar que toda a manipulação da informação clínica e molecular seja confidencial, questionários clínicos e amostras de sangue e de DNA são identificados por um código comum designado no momento em que o indivíduo entra no estudo.

Informações geradas durante o nosso projeto e que possam ter implicações na confirmação diagnóstica de indivíduos sintomáticos serão comunicados aos profissionais responsáveis pelo acompanhamento dos pacientes. Este projeto não gerou dados para serem usados em diagnóstico preditivo de indivíduos assintomáticos, com risco de desenvolver a doenças.

2. PACIENTES:

Este estudo abrangeu um total de 40 pacientes (tabela 3), sendo 24 casos isolados com polimicrogiria sem comprovação de recorrência familiar por exames de neuroimagem, além de 16 pacientes provindos de seis famílias (figuras 4 a 9), todos identificados e acompanhados nos ambulatórios do Hospital das Clínicas da UNICAMP e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP Ribeirão Preto.

Os pacientes foram submetidos a exame neurológico detalhado e avaliação cognitiva e de linguagem por equipe multidisciplinar. Além disso, todos os pacientes e a maioria dos



membros das famílias foram submetidos a exame de ressonância magnética de alta resolução para detecção de alterações morfológicas corticais.



Tabela 3: Dados de pacientes, esporádicos e familiais, cujo material genético foi avaliado neste projeto.

	REGISTRO DO DNA	UNIDADE DE COLETA	GÊNERO	DATA DE NASCIMENTO	NEUROIMAGEM	EXAME NEUROLÓGICO	SINAIS PSEUDOBULBARES	FAMÍLIA
1	609/98	HC - UNICAMP	Μ	03/04/1996	PMG PS parietal posterior bilateral	normal	ausência	1
2	610/98	HC - UNICAMP	М	05/01/1985	PMG PS difusa	normal	dificuldade de mover a língua	1
3	611/98	HC - UNICAMP	F	não disponível	PMG PS parietal posterior bilateral	normal	ausência	1
4	612/98	HC - UNICAMP	Μ	27/01/1988	PMG PS parietal posterior bilateral	normal	dificuldade de verticalização da língua	1
5	2172/04	HC - UNICAMP	Μ	não disponível	PMG PS parietal posterior bilateral	normal	ausência	1
6	525/03	HC - UNICAMP	Μ	16/03/1998	PMG PS parietal posterior bilateral	normal	hemiparesia incompleta e desproporcionada à direita (predomínio crural)	2



7	379/04	HC - UNICAMP	F	14/02/1996	PMG parietal posterior	normal	ausência	2
8	443/03	HC - UNICAMP	Μ	26/07/2003	PMG PS frontoparietal posterior bilateral	normal	movimentação deficiente da língua, disfagia, dificuldade de protusão da língua	3
9	444/03	HC - UNICAMP	Μ	02/11/1990	PMG PS frontoparietal posterior bilateral	normal	dificuldade de protuir a língua	3
10	27/99	HC - UNICAMP	F	11/11/1994	PMG PS bilateral	normal	ausência	4
11	28/99	HC - UNICAMP	F	não disponível	PMG PS bilateral	Não especificado	Não especificado	4
12	573/03	HC - UNICAMP	М	19/07/1993	PMG PS parietal posterior	normal	fala anasalada e explosiva	5
13	576/03	HC – UNICAMP	Μ	10/07/1999	PMG PS parietal posterior	normal	fala lentificada com aparente dificuldade de movimentação da língua	5



14	997/01	HC - UNICAMP	М	não disponível	PMG PS bilateral	normal	reflexo do vomito diminuído	6
15	998/01	HC - UNICAMP	М	17/02/1986	PMG PS bilateral	normal	limitação do movimento de verticalização da língua	6
16	999/01	HC - UNICAMP	F	06/04/1996	PMG PS bilateral	normal	reflexo do vomito diminuído, fala caracterizada por trocas, substituições e omissão	6
17	1161/01	HC - UNICAMP	Μ	22/04/1991	PMG PS bilateral	normal	dificuldade de mobilização lateral e vertical da língua, assim como protusão	Esporádico
18	674/04	HC - UNICAMP	F	17/04/2000	PMG PS fronto parietal	dupla hemiparesia espastica, hiperreflexia global e presença de clônus	não especificado	Esporádico



19	1197/03	HC - UNICAMP	М	05/08/1990	PMG PS fronto parietal bilateral	normal	não protuí a língua e nem lateraliza a língua, reflexo nauseoso diminuído, estrabismo convergente	Esporádico
20	1335/03	HC - UNICAMP	М	19/07/1995	PMG PS bilateral difusa	hemiparesia direita	dificuldade de lateralização e verticalização da língua	Esporádico
21	1337/03	HC - UNICAMP	F	25/08/1995	PMG PS parietal posterior	normal	dificuldade de mobilização da língua	Esporádico
22	1381/03	HC - UNICAMP	Μ	07/02/1997	PMG PS parietal posterior bilateral	normal	não tem	Esporádico
23	1386/03	HC - UNICAMP	М	29/06/1992	PMG PS bilateral difusa	normal	sialorréia, dificuldades de movimentação da língua	Esporádico
24	848/04	HC - UNICAMP	М	05/01/1995	PMG PS simétrica bilateral	normal	não especificado	Esporádico

74



25	2106/04	HC - UNICAMP	Μ	23/03/1997	PMG PS parietal posterior unilateral direita	hemiparesia esquerda	movimentação mímica facial diminuída	Esporádico
26	322/08	HC – UNICAMP	Μ	19/10/1996	PMG Parietal	não disponível	não especificado	Esporádico
27	539/08	HC - FMRP- USP	F	21/10/2008	PMG PS frontal e parietal direita	retardo mental moderado	não especificado	Esporádico
28	552/08	HC FMRP - USP	Μ	27/09/1989	PMG frontotemporal e parietal à direita	hemiparesia esquerda	não especificado	Esporádico
29	611/08	HC FMRP - USP	Μ	14/12/1996	PMG temporal direita	déficit auditivo e visual	não especificado	Esporádico
30	188/09	HC FMRP - USP	F	18/07/2003	PMG PS bilateral	hipotonia global e retardo mental moderado	não especificado	Esporádico
31	456/09	HC FMRP - USP	Μ	13/08/2000	PMG	retardo mental leve	não especificado	Esporádico



32	463/09	HC FMRP - USP	F	30/08/2000	agenesia parcial de corpo caloso e PMG rolândica	retardo mental grave, hidrocefalia, mielomeningocele, bexiga neurogênica	não especificado	Esporádico
33	497/09	HC FMRP - USP	F	14/04/2001	PMG	retardo mental moderado	não especificado	Esporádico
34	503/09	HC FMRP - USP	F	26/10/1992	PMG	retardo mental moderado, hemiparesia direita	não especificado	Esporádico
35	505/09	HC FMRP - USP	F	25/11/1997	PMG temporal	retardo mental moderado	não especificado	Esporádico
36	506/09	HC FMRP - USP	F	07/05/1994	Normal	retardo mental	não especificado	Esporádico
37	525/09	HC - UNICAMP	Μ	12/05/2001	PMG	não disponível	não especificado	Esporádico
38	533/09	HC FMRP - USP	М	13/08/2000	PMG fronto- parietal direita	hemiparesia esquerda e retardo mental	não especificado	Esporádico



39	569/09	HC - UNICAMP	М	08/11/2001	PMG PS	não disponível	não especificado	Esporádico
40	47/10	HC - UNICAMP	Μ	06/10/2005	PMG difusa	não disponível	não especificado	Esporádico

Onde F = feminino, M = masculino, PMG = polimicrogiria, PS = perisylviana.



Tabela 4. Tipos de polimicrogirias apresentados pelos pacientes avaliados neste projeto.

	Esporádicos	Familiais	%
Perisylviana	12	15	67,5
Temporal	2	0	5
Parietal	3	1	7,5
Difusa	6	0	15
Rolândica	1	0	2,5



Figura 4: Heredograma de família na qual a região candidata Xq27-1.27-3 foi identificada.



Figura 5: Heredograma de família cujo material genético foi avaliado junto aos pacientes esporádicos.





Figura 6: Heredograma de família cujo material genético foi avaliado junto aos pacientes esporádicos.



Figura 7: Heredograma de família cujo material genético foi avaliado junto aos pacientes esporádicos.





Figura 8: Heredograma de família cujo material genético foi avaliado junto aos pacientes esporádicos.



Figura 9: Heredograma de família cujo material genético foi avaliado junto aos pacientes esporádicos.


3. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

A técnica utilizada para a extração do DNA genômico segue o protocolo de extração por fenol e clorofórmio que propicia a extração de grande quantidade de DNA (acima de 700µg a partir de 20mL de sangue venoso): cerca de 20 a 30mL de sangue venoso foram colhidos dos indivíduos. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1500 g e a parte intermediária, na qual se localizam os leucócitos, foi transferida para um tubo de propileno de fundo cônico. Em seguida foram adicionadas as soluções de RSB 1x até completar o volume de 11mL e 60µL de Nonidet. Após ser homogeneizada, a solução foi centrifugada por 10 minutos a 1500g e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 0,5mL de RSB 1x, 3mL de solução SDS a 10% e 80µL de proteinase K (100mg/mL). As amostras foram incubadas a 37° por 24h. Após a incubação, foram acrescentados 3mL de fenol, seguido de homogeneização e centrifugação a 5000g por 10 minutos. A parte inferior do tubo foi descartada e acrescentou-se 1,5mL de fenol e 1,5mL de solução de clorofórmio álcool isoamílico, seguidos de homogeneização e centrifugação a 5000gpor 10 minutos, sendo a parte inferior do tubo descartada. Este processo foi repetido com 3mL de solução de clorofórmio álcool isoamílico. O DNA genômico foi então precipitado com 6mL de etanol absoluto. Em seguida o DNA foi transferido para tubos cônicos de 1,5mL e diluídos em aproximadamente 200-250µL de TE 1x.

4. TRIAGEM DE MUTAÇÕES:

Como havia sido identificada uma região candidata em Xq27.1-27.3 (68) com cerca de 67 genes descritos, adotou-se a estratégia de selecionar genes presentes nesta região utilizando as bases de dados do *National Center for Biotechnology Information* (72), com o programa Map Viewer[®], tendo como base características funcionais, relação dos genes com canais iônicos e mobilidade celular, já que pode haver relação entre a polimicrogiria e o processo de migração neuronal. Os primeiros genes-alvo foram o *SLITRK2* e o *SLITRK4*. Também foram selecionados dois genes que haviam sido



recentemente relacionados a malformações do córtex cerebral e doenças neurológicas: SRPX2 e AFF2 (52, 73).

Inicialmente utilizou-se um método de triagem de mutações seguido de seqüenciamento das amostras candidatas a portarem alterações pela triagem inicial. O método de triagem escolhido foi a técnica de DHPLC (*Denaturing High-performance Liquid Chromatography*) (74).

À medida que o projeto se desenvolveu e a técnica de sequenciamento capilar pelo método de Sanger foi se tornando mais acessível, inclusive com a aquisição de novo equipamento sequenciador, abandonou-se a etapa intermediária do DHPLC e passamos a sequenciar diretamente todas as amostras. Dessa forma, a nova estratégia adotada foi realizar o sequenciamento utilizando a técnica de Sanger dos demais genes recentemente associados a malformações do córtex cerebral, *TUBA1A*, *TUBA8*, *TUBB2B* e WDR62 (70, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38). Esses genes foram sequenciados nos pacientes esporádicos e famílias que não foram submetidas à análise de ligação. Tanto na estratégia utilizando DHPLC, quanto na análise direta por sequenciamento, apenas as regiões codificantes foram analisadas, além de pequenas regiões flanqueadores dos *exons*, de forma a garantir que todo o *exon* fosse analisado.

Já no caso da família que apresentou ligação para a região Xq27.1-q27.3, optamos por realizar o sequenciamento em larga escala do cromossomo X utilizando tecnologia de captura e enriquecimento dos *exons* deste cromossomo, seguido de sequenciamento de alta performance.

Abaixo segue a descrição dos métodos utilizados durante todo o processo, desde a estratégia de triagem de mutações por DHPLC até o sequenciamento em larga escala.



4.1. Amplificação de DNA por PCR:

Para o estudo da região candidata, foram selecionados os genes *SLITRK2* e *SLITRK4, SRPX2* e *AFF2*. Sequências iniciadoras (*primers*) específicas foram sintetizadas para seus exons (anexo 1). Também foram construídos *primers* para análise de genes de microtúbulo recentemente relacionados a malformações do córtex cerebral (anexo 1), principalmente devido à atuação dos mesmos durante a divisão e proliferação celular. Esses genes são: *TUBA1A*, *TUBB2B*, *TUBA8* e *WRD2*.

As reações de PCR foram realizadas para um volume final de 22µL, contendo 40ng de DNA genômico; 100ng de cada *primer*; 2.2µL de tampão 10x, 200µM de dGTP, dCTP, dTTP e dATP; 0.5 unidades de *Taq* DNA polimerase e 1.0 a 2.0mM de MgCl₂. Para alguns pares de *primers*, foi necessária a utilização de DMSO para a otimização da reação.

4.2. Detecção de Mutações:

A triagem de mutações, inicialmente, foi realizada através da técnica de DHPLC (*Denaturing High-performance Liquid Chromatography*) para os genes SRPX2, AFF2, SLITRK2 e SLITRK4.

A técnica de DHPLC baseia-se na leitura do padrão de retenção de amostras de DNA em seus capilares. A região de interesse é amplificada, suas duplas fitas são desnaturadas por 5 minutos a 95°C e deixados em repouso por 45 minutos em temperatura ambiente para ocorra o reanelamento por resfriamento gradual. Na presença de uma alteração, são geradas moléculas heteroduplexes, além das homoduplexes já esperadas. Em seguida, o produto de PCR renaturado, adicionado de acetato de trietilamonio (TEAA) e acetonitrila (ACN), é injetado nos capilares. O TEAA realiza a retenção das duplas fitas, homoduplexes e heteroduplexes, em esferas hidrofóbicas contidas na coluna do aparelho. Em seguida, a passagem do ACN remove as moléculas de DNA dupla fita, cuja passagem pelos capilares é detectada pelo sistema WAVE[®] 4500 (Transgenomic), gerando perfis



cromatográficos. Como as moléculas heteroduplexes são menos estáveis, estas são removidas antes das moléculas homoduplexes, portanto quando há uma alteração na região analisada, o perfil cromatográfico apresentado é diferenciado, sendo detectada a passagem de moléculas em dois estágios, ao invés de apenas um.

A triagem de mutações foi realizada com temperaturas específicas para cada fragmento, definidas pelo software WAVEMAKERTM. Alíquotas de 5µl do amplificado foram injetadas em coluna DNASep[®] com fluxo de 0.9mL/min.

4.3. Sequenciamento por eletroforese capilar utilizando o método de Sanger:

Os fragmentos que apresentaram perfis cromatográficos diferenciados na análise de DHPLC foram submetidos à seqüenciamento por eletroforese capilar através do aparelho MegaBace1000 (*GE Healthcare Lifesciences*).

A reação submetida ao seqüenciamento consiste de 4µL de solução pré-mix, 1µL de primer (5pmol/µL) e 1µL do produto de amplificação para um volume final de 15µL. Essa reação é submetida a 35 ciclos de 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto. Sua purificação é realizada com etanol e acetato de amônio 7,5mM, como sugerido pelo fabricante *(GE Healthcare Lifesciences)*.

Já os fragmentos referentes às análises dos genes de microtúbulos, TUBA1A, TUBA8, TUBB2B e WDR62, foram sequenciados no aparelho ABI 3500 xL (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation).

Nesse caso, a reação consiste de 4 μ L de água deionizada, 2 μ L de tampão 5x, 1 μ L de *primer* (5 ρ mol/ μ L), 1 μ L de solução *BigDye* e 2 μ L de produto de amplificação. Tal reação é submetida a 95°C por dez segundos, temperatura de anelamento do *primer* por cinco segundos e 60°C por quatro minutos. Sua purificação é realizada adicionando 40 μ L de isopropanol a 75% a cada produto de reação. A amostra é mantida a temperatura ambiente por 5 minutos e, em seguida, submetida a centrifugação por 45 minutos (2254g). A amostra



é vertida para eliminação do isopropanol e, em seguida, recebe 10 μL de etanol a 70%, a qual é submetida a centrifugação por 45 minutos (2254g). O etanol é eliminado vertendo as amostras, as quais são aquecidas a 60°C por 5 minutos para evaporação de todo etanol restante. Essas amostras serão mantidas a 4°C, protegidas da luz até o momento da corrida no aparelho sequenciador, quando são ressupendidas em tampão para injeção.

Todas as alterações potencialmente patogênicas que foram identificadas, tanto na triagem de mutações em genes candidatos, quanto na análise dos experimentos de captura e seqüenciamento, também foram estudadas em um grupo controle composto de no mínimo 100 indivíduos normais. Esta etapa foi realizada para certificar de que não se tratavam de variantes polimórficas normais da população.

4.4. Enriquecimento, Captura e Sequenciamento em Larga Escala:

Desde sua publicação por Frederick Sanger e colaboradores em 1977 (75), o método de sequenciamento com dideoxinucleotídeos terminadores de cadeia, ou método Sanger, foi amplamente adotado para estudos de genética molecular nos mais variados organismos e com os mais diferentes propósitos, alcançando o campo do diagnóstico clínico. Entre as vantagens sobre os métodos existentes à época estavam a baixa toxicidade dos reagentes e a maior eficiência, que foi aprimorada com o surgimento dos sequenciadores automáticos, que tornaram as análises mais rápidas e menos laboriosas. Em 2003, fazendo uso desta técnica, foi anunciado o sequenciamento do genoma humano, resultado do trabalho de diversos grupos de pesquisa ao redor do planeta durante 13 anos.

O lançamento comercial do primeiro método de sequenciamento em larga escala ou *next generation sequencing (NGS)* no ano de 2005 alterou drasticamente o cenário da genômica, ampliando a capacidade de geração de dados e diminuindo o tempo de sua obtenção. Desde então, a evolução tecnológica tem sido significativa e veloz, e o genoma humano que demorou 13 anos para ser sequenciado, atualmente pode ser obtido em um experimento de cerca de três dias, a um custo consideravelmente mais baixo, ampliando os horizontes da pesquisa básica, aplicada e clínica (76, 77). Com a massiva geração de dados,



as novas técnicas de sequenciamento criaram um novo patamar de necessidades quanto à infraestrutura computacional, já que a grande quantidade de informação gerada a cada experimento exige um grande aparato de bioinformática que possibilite armazenar e analisar tantos dados de imagem e de sequência.

Com o intuito de selecionar, direcionar e, consequentemente, economizar esforços para o sequenciamento de regiões específicas do genoma, as técnicas de enriquecimento e captura evoluíram paralelamente ao sequenciamento em larga escala. Dentre elas, kits utilizando o método de captura por hibridização foram desenvolvidos especificamente para utilização em plataformas de sequenciamento *next generation* e consiste, basicamente, na hibridização do DNA fragmentado a sequências complementares alvo específicas. Essa ligação pode ocorrer tanto em solução, quanto em suportes sólidos, como placas de *array*, de forma a capturar e isolar as sequências de interesse (78).

	Roche 454 GS FLX	Illumina Genome Analyzer	Applied Biosystems SOLiD	Sanger
Comprimento das leituras (bases)	400	36	35	800pb
Tempo de corrida	10h	2,5 dias	6 dias	3h
Total de bases por corrida	500Mb	1,5Gb	4Gb	800pb

Tabela 5: Comparativo entre as técnicas de sequenciamento em larga escala (*next generation*) mais utilizadas e o método Sanger.

Neste projeto foi utilizada a plataforma de sequenciamento Illumina HiSeq (Illumina), localizada no Genoscope (Centro Nacional de Sequenciamento da França). Para a captura, optamos pelo kit da Agilent SureSelect DNA Capture Array[®] (Agilent



Technologies), SureSelect^{XT} Human X-Chromosome Panel Kit, que permite a seleção de regiões codificantes do cromossomo X humano. No protocolo desse kit de enriquecimento e captura da Agilent (figura 10) amostras de DNA genômico são fragmentados, recebem adaptadores a suas extremidades e são hibridizados em solução, com uma biblioteca de RNA biotinilada, a qual seleciona as regiões de interesse. À essa solução de fragmentos de DNA são adicionadas *beads* magnéticas revestidas com estreptavidinas, que se ligam ao RNA biotinilado e permitem a captura dos fragmentos de interesse através do magnetismo das *beads*. Os fragmentos não capturados são descartados, a solução é lavada para a retirada das *beads* magnéticas e os fragmentos de DNA de interesse são, então, amplificados, utilizando os adaptadores para a ligação dos *primers* universais, para serem submetidos ao sequenciamento.

O DNA genômico de quatro indivíduos selecionados da família com ligação para a região Xq27.1-q27-3 foi avaliado nessa etapa. Três destes indivíduos são afetados e possuem o mesmo haplótipo, enquanto um deles não é afetado pela PPB e possui um haplótipo diferente dos anteriores. Além disso, dois dos indivíduos selecionados são mãe e filho, possibilitando uma melhor observação da segregação dos alelos.

Os parâmetros iniciais para a análise dos dados obtidos foram:

- Abrangência de todo o cromossomo X;
- Leituras de alta qualidade: pelo menos 6 leituras;
- Indiferença quanto à presença nas bases de dados HapMap, 1000 genomes e dbSNP 132.





Figura 10: Esquema ilustrativo do protocolo para uso do SureSelect^{XT} Human X-Chromosome Panel Kit, da Agilent Technologies (modificado do protocolo fornecido pelo fabricante em www.agilent.com).





Figura 11: Heredograma da família que apresentou ligação à região cromossômica Xq27.1-27.3. Os indivíduos selecionados para a análise de sequenciamento em larga escala estão circulados.



< → C fi	کرمندز s://www.genoscope.cns.fr/secure-nda/projet_AUC/cgi-bin/analyzeForm.cgi?project=AUC	12 ×
œ	GEN, SCOPE PLATEFORME DE DETECTION DE MUTATIONS	
Genoscope	Plateforme Projet_AUC Navigateur Analyse Téléchargements F.A.Q. Contact	
	OUTIL D'ANALYSE DES VARIATIONS	
	PROJET AUC	
		ш
(Tous) (Aucun)	O Union ou O Intersection des variations <i>présentes</i> chez : O	
	Ind. A 🐨 🗹 Ind. B 🐨 🗹 Ind. C 🐨 🗸 Ind. D 💌	
	20 % < Hétérozygote Hh < 80	
(Tous) (Auoun)	et <i>absentes</i> des individus : 🚱	
	V Ind. A Ind. B Ind. C Ind. D	
	Région chromosomique :	
	Type de variation : 🔍 Standard OU 💿 Haute Qualité	
~	Variation confirmée par au moins 6 lectures avec un Qscore > 30 Ø et un Strand bias < 0.1 Ø	-

Figura 12: Pipeline do Genoscope no qual foram disponibilizados os dados obtidos no sequenciamento em larga escala.



€ →	C 🖷	8	bttps://w	ww.genos	cope.cr	ns.fr/secur	e- <mark>n</mark> da/pro	ojet_AUC/o	:gi-bin/ar	nalyzeDisplay.cg	Î									2	2
Individu	Référence	Chr	Début	Fin	Variation	Couverture	% lectures avec var.	Type de Localisation	ldentifiant du GENE	Site d'épissage	miRNA	Identifiant du TRANSCRIT	ldentifiant EXON •	Rang EXON	Mutation CODON	Mutation AA	dbSNP	1000 genomes	НарМар	Croisements	
С	C1899	х	103267974	103267974	G/A	93	61.2903%	CDS	H2BFWT	+:	÷	ENST00000217926	ENSE00000674142	1	CGG/TGG	R/W	<u>G/A</u>	*		B1663 D1615	
D	D1615	х	103267974	103267974	G/A	81	98.7654%	CDS	H2BFWT	*)	s	ENST00000217926	ENSE00000674142	1	CGG/TGG	R/W	<u>G/A</u>	at in	8	B1663 C1899	
В	B1663	х	103267974	103267974	G/A	80	98.75%	CDS	H2BFWT			ENST00000217926	ENSE00000674142	1	CGG/TGG	R/W	<u>G/A</u>		S.	C1899 D1615	
D	D1494 Q 📓	х	84563135	84563135	T/A	204	100%	CDS CDS CDS	POF18	ENSE00000847199	-2	ENST0000262753 ENST00000373145 ENST00000373149	ENSE00000847199 ENSE00000847199 ENSE00000847199	1 1 1	ATG/TTG ATG/TTG ATG/TTG	M/L M/L M/L	<u>T/A</u>	I/A	st.	B1544 C1748	
С	C1748 Q	x	84563135	84563135	T/A	255	100%	CDS CDS CDS	POF1B	ENSE00000847199	*	ENST0000262753 ENST00000373145 ENST00000373149	ENSE00000847199 ENSE00000847199 ENSE00000847199	1 1 1	ATG/TTG ATG/TTG ATG/TTG	M/L M/L M/L	<u>T/A</u>	<u>T/A</u>		B1544 D1494	
В	B1544	х	84563135	84563135	T/A	231	99.5671%	CDS CDS CDS	POF1B	ENSE00000847199	10	ENST0000262753 ENST00000373145 ENST00000373149	ENSE00000847199 ENSE00000847199 ENSE00000847199	1 1 1	ATG/TTG ATG/TTG ATG/TTG	M/L M/L M/L	<u>T/A</u>	<u> 1/A</u>	8 1	C1748 D1494	
D	D2107	х	14099 <mark>4</mark> 517	140994517	C/G	411	100%	CDS	MAGEC1	ti		ENST00000285879	ENSE00001021124	4	CTC/GTC	LIV	<u>C/G</u>	*	1	B2113 C2446	
В	B2115 Q	х	140995315	140995315	С/Т	296	100%	CDS	MAGEC1	20	- 23	ENST0000285879	ENSE00001021124	4	CAT/TAT	H/Y	<u>C/T</u>	<u>сл</u>	8	C2448 D2109	
С	C2442	х	140994 <mark>4</mark> 07	140994407	C/G	636	41.3522%	CDS	MAGEC1	27. 27	28	ENST00000285879	ENSE00001021124	4	TCT/TGT	S/C	<u>C/G</u>	14	8	82109 D2103	
D	D2099	х	140994200	140994200	T/C	293	100%	CDS	MAGEC1	÷.	-	ENST00000285879	ENSE00001021124	4	CTT/CCT	L/P	<u>T/C</u>	*	84	82105 C2440	
с	C2448	х	140995315	140995315	с/т	321	54.8287%	CDS	MAGEC1	*:	-	ENST00000285879	ENSE00001021124	4	CAT/TAT	H/Y	<u>C/T</u>	<u>C/T</u>	8	82115 D2109	
В	B2113	x	140994517	140994517	C/G	569	99.8242%	CDS	MAGEC1	+:	•>	ENST00000285879	ENSE00001021124	4	CTC/GTC	LIV	<u>C/G</u>	••	~	C2446 D2107	
в	B2105	х	140994200	140994200	T/C	389	99.7429%	CDS	MAGEC1	*	2	ENST00000285879	ENSE00001021124	4	CTT/CCT	L/P	<u>T/C</u>			C2440 D2099	
с	C2444	x	140994419	140994419	T/C	632	41.9304%	CDS	MAGEC1	**	•	ENST00000285879	ENSE00001021124	4	ATT/ACT	ντ		t.	8	B2111 D2105	
D	D2109	х	140995315	140995315	C/T	257	99.6109%	CDS	MAGEC1	+:	-	ENST00000285879	ENSE00001021124	4	CAT/TAT	H/Y	<u>c/T</u>	<u>C/T</u>		B2115	3

Figura 13: Lista de SNPs fornecida pelo Pipeline do Genoscope baseada nas sequências analisadas.



.5. ANÁLISE IN SILICO:

A análise dos resultados do sequenciamento em larga escala foi realizada em um *pipeline* disponibilizado pelo Genoscope, o qual pode ser visualizado na figura 12, e que permite a avaliação dos produtos do sequenciamento, listando os SNPs mapeados, sua localização cromossômica, e links para bancos de dados das alterações já descritas. As alterações identificadas na análise dos resultados foram avaliadas utilizando os algoritmos listados na tabela 6.

Tabela 6: Algoritmos utilizados para a	análise in silico das alterações detectadas.
--	--

Nome do algoritmo	Endereço
SIFT®	http://sift.jcvi.org/
Polyphen®	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/
Polyphen2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
SNPs&GO [®]	http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/
MutPred®	http://mutpred.mutdb.org/
Panther®	http://www.pantherdb.org/

As alterações não-sinonímias identificadas na triagem de mutações em genes candidatos também foram avaliadas com esses softwares, com exceção do Polyphen®, que não se encontrava mais disponível na rede.

Os softwares MutPred[®], Polyphen[®], Polyphen2[®] e SNPs&GO[®] avaliam a substituição da base nitrogenada baseando-se numa combinação de parâmetros funcionais e estruturais das proteínas, enquanto o SIFT[®] e o Panther[®] consideram informações evolutivas para tal (79).



Além desses algoritmos, também foi utilizada a escala Grantham (80), um método que avalia a troca de aminoácidos considerando sua composição, polaridade e volume molecular. Essa escala oferece um valor, o qual pode ser classificado como:

Score	Predição
0 – 50	Conservativo
51 – 100	Moderadamente conservativo
101 – 150	Moderadamente radical
>150	Radical

Tabela 7: Classificação de valores para escala Grantham

6. IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES NOS DEMAIS INDIVÍDUOS DA FAMÍLIA:

Através dos dados obtidos com a análise de predição de mutação, 15 alterações foram selecionadas para também serem avaliadas nos demais indivíduos da família ligada à região Xq27.1-q27.3 (afetados e não afetados) de forma a possibilitar uma correlação entre a segregação dos alelos e o quadro clínico. Para tal, *primers* foram sintetizados flanqueando a região da alteração (anexo 1 – tabela 7), no intuito de amplificar a sequenciar pela técnica de Sanger o DNA dos demais indivíduos.



7. CLONAGEM DO GENE SPANXC PARA VALIDAÇÃO DE ALTERAÇÃO:

Análises de bioinformática não permitiram a construção de *primers* totalmente específicos para *SPANXC*, devido a sua alta homologia com outros membros da família *SPANX*, por isso ele foi amplificado por PCR juntamente com o gene *SPANXD*, que foi o máximo de especificidade obtida com a técnica. Para a separação dos alelos dos genes e confirmação da alteração identificada pelo sequenciamento realmente pertencer ao gene *SPANXC*, e não a outro gene da família SPANX, os produtos de PCR foram clonados em vetores pGEM®T Easy (Promega), seguindo o procedimento a seguir.

a) Ligação dos fragmentos de DNA

Para a ligação dos fragmentos em pGEM-T Easy preparou-se uma solução composta de cerca de 100ng do vetor, o inserto a ser ligado (3x a quantidade do vetor), 5 μ L do tampão 2X da ligase (Promega) e 1,0 μ L da T4 DNA ligase (Promega, 3U/ μ L). Esta solução foi mantida a 16°C por 12-16 horas e em seguida foi estocada a -20°C.

b) Transformação bacteriana

As células competentes de *Escherechia coli* DH5 α , armazenadas a -80°C, foram descongeladas em gelo. Adicionou-se a estas cerca de 10 μ L da reação de ligação. A mistura permaneceu em gelo por 30 minutos em seguida foi levada a temperatura de 42°C por um minuto e 30 segundos e novamente levada a gelo por 1 minuto. Em seguida adicionou-se de 400 a 800 μ L de meio SOC sendo a cultura levada a agitação vigorosa a 37°C por uma hora. Cerca de 200 μ L foram plaqueados em placas LB-ágar mais o antibiótico apropriado. As placas foram deixadas em incubadora a 37°C por 12-18 horas.

c) Extração de DNA plasmidial (Mini-Prep)

Utilizamos a mini-preparação caseira, que consiste de ressuspensão com 300µl da solução 1 (Tris-HCl 50mM, pH 8.0, EDTA 10mM, pH 8,0 e 6µl de RNase 1mg/mL), seguido



da adição de 300µl de solução 2 (NaOH 200mM, SDS 1%), agitação por inversão suave do tubo cinco vezes, incubação a temperatura ambiente por 5 minutos, 300µl de solução 3 (acetato de potássio 3M, pH 5.5), agitação por inversão, centrifugação a temperatura a 14°C (1000g) durante 10 minutos, transferência de 700-800µl do sobrenadante para um novo tubo, precipitação primeiro com 400µl de isopropanol seguida de inversão e centrifugação a 1000g por 10 minutos a 4°C, descarte do sobrenadante, nova precipitação com 500µl de álcool etílico 70%, inversão do tubo e centrifugação durante 5 minutos a 1000g, descarte do sobrenadante e eluição em 30µl de água deionizada.

8. BUSCA DE ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE SNP*ARRAY*:

Para avaliar a possibilidade de grandes deleções ou alterações estruturais na região Xq27.1-27.3, utilizamos a técnica de SNP*array* para analisar o DNA genômico de pacientes da Família 1. O kit utilizado foi o CytoScan HD da Affymetrix, seguindo as recomendações do fabricante. Este kit permite a detecção de aberrações cromossômicas e SNPs, com mais de 2,6 milhões de marcadores de *copy number*. Os dados foram obtidos em uma plataforma GeneChip® System (GCS) 3000Dx e analisados utilizando o software *Chromosome Analysis Suite* (ChAS), também da Affymetrix.

Para esta análise, três indivíduos afetados foram selecionados da Família 1, de acordo com a qualidade do material genético disponível, e estes estão indicados no heredograma na figura a seguir.





Figura 14: Heredograma indicando os indivíduos cujo DNA foi avaliado através da técnica de SNP*array*.

O protocolo, com duração de quatro dias, se divide em dez etapas, descritas resumidamente a seguir:

a) Digestão das amostras de DNA com a enzima NspI:

Cada amostra de DNA, a 50ng/µL, foi submetida a uma reação de digestão adicionando 1µl de enzima *NspI*, 2µl de tampão da enzima, 0,2µl de tampão BSA e 11,55µl de água. As reações foram processadas em um aparelho termociclador (Mastercicler Gradiente Eppendorf®) sob temperatura de 37°C por 120 minutos e 65°C por 20 minutos.

b) Reação de ligação com adaptadores:

Para a reação de ligação, foram adicionadas às amostras de DNA processadas 0,75µl de solução com adaptadores a 50µM, 2,5µL de tampão T4 DNA Ligase 10x e 2µL de enzima T4



DNA Ligase. Em seguida as reações foram levadas a um aparelho termociclador (Mastercicler Gradiente Eppendorf®) sob temperatura de 16°C por 180 minutos e 70°C por 20 minutos.

c) Amplificação dos fragmentos por PCR

As amostras de DNA digeridas e ligadas a adaptadores foram diluídas com 75µL de água e, para cada amostra, sete alíquotas de 10µL foram transferidas para uma nova placa, para amplificação dos fragmentos através da técnica de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os reagentes a seguir: 39,5µL de água, 10 µL de tampão *TITANIUM Taq* PCR 10x, 20µL de reagente GC-*Melt*, 14µL de dNTP a 2,5mM, 4,5µL de *primer* a 100pM e 2µL de enzima *TITANIUM Taq DNA Polimerase* 50x. A reação foi submetida a ciclagem em aparelho termociclador (Mastercicler Gradiente Eppendorf®) seguindo as temperaturas de 94°C por 3 minutos; 30 vezes de 94°C por 30 segundos, 60°C por 45 segundos e 68°C por 15 segundos; e 68°C por 7 minutos.

A reação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 2% para verificação do padrão de amplificação dos fragmentos.

d) Purificação:

A purificação das amostras amplificadas foi realizada com *beads* magnéticas e etanol em um procedimento baseado em repetidas centrifugações e um suporte magnético.

e) Quantificação:

As amostras purificadas foram avaliadas quanto à concentração ideal (4500 a 7000ng/ μ L) e sua pureza foi observada pelas relações de absorbância (A260/280 entre 1,8 e 2,0 e A320 < 0,1).



f) Fragmentação:

Os produtos da purificação são, então, fragmentados utilizando reagentes específicos, além de água e tampão, fornecidos pelo fabricante para a preparação de um *Master Mix* de fragmentação. A solução é levada a um aparelho termociclador (Mastercicler Gradiente Eppendorf®) e é submetida a ciclagem de 37°C por 35 minutos e 95°C por 15 minutos. Em seguida, o padrão de fragmentação é avaliado por eletroforese em gel de agarose 3%.

g) Marcação do DNA:

O próximo passo foi adicionar ao 51µL de cada uma das amostras 14µL de tampão TdT 5x, 2µL de DNA *Labeling Reagent* 30mM e 3,5µL de enzima TdT e submete-los às temperaturas de 37°C por 4 horas e 95°C por 15 minutos, utilizando um aparelho termociclador (Mastercicler Gradiente Eppendorf®).

h) Hibridação:

O DNA marcado recebeu 165µL de Hyb Buffer Part I, 15µL de Hyb Buffer Part II, 7µL de Hyb Buffer Part III, 1µL de Hyb Buffer Part IV e 2µL de Oligo Control Reagent 0100. Em seguida, foi feita a desnaturação em aparelho termociclador (Mastercicler Gradiente Eppendorf®) a 95°C por 10 minutos. As amostras, aplicadas aos *chips*, foram colocadas no forno de hibridação por 16 horas a temperatura de 50°C e rotação de 60rpm.



i) Lavagem:

Após a hibridação, os *chips* passaram pela estação de lavagem com tampões (*GeneChip Fluidics Station* 450, Affymetrix®) que realiza automaticamente um processo de injeção de soluções para remover resíduos em excesso.

j) Escaneamento:

Por fim, os chips foram escaneados pelo GeneChip[®] Scanner 3000 7G (Affymetrix®).





IV.

RESULTADOS





1. TRIAGEM DE MUTAÇÕES:

1.1. Gene SRPX2:

As reações de PCR para cada um dos 11 exons do gene *SRPX2* foram protocoladas, no intuito de determinar sua temperatura de anelamento ideal, além da proporção dos reagentes.

Na análise cromatográfica por DHPLC dos produtos de amplificação de todos os pacientes, foi observado um padrão diferenciado de retenção em dois pacientes, no *exon* 1, quando comparados aos controles (figura 15).



Figura 15. Análise cromatográfica permitindo observar os picos de retenção de paciente alterado (lilás) e controle (vermelho).

Tais fragmentos foram submetidos à seqüenciamento por eletroforese capilar utilizando o método de Sanger, que revelou uma substituição de uma citosina por uma guanina na 82ª base do éxon 1 (figura 16), um polimorfismo já descrito e identificado como refSNP ID rs1343213.





Figura 16. Análise de seqüenciamento por eletroforese capilar do exon 1 de paciente com alteração no DHPLC, destacando local da alteração.

Ainda no exon 1 desse gene foi encontrado outro perfil cromatográfico alterado (figura 17) em dois pacientes. Cinquenta controles não relacionados foram testados e não apresentaram o mesmo perfil cromatográfico.



Figura 17. Análise cromatográfica permitindo observar os picos de retenção de paciente alterado (azul) e controle (preto).

Já a análise cromatográfica do exon 9 indicou cinco diferentes padrões cromatográficos. Sendo assim, decidimos sequenciar diretamente o exon 9, no qual não foram detectadas alterações.



Também encontramos uma alteração intrônica não descrita na base de dados do NCBI (72) em quatro pacientes de nossa amostra (Figura 18), trata-se de uma transversão de uma citosina para uma adenina na posição c.1095+8C>A.

Para os demais exons foram encontrados padrões de retenção cromatográfica alterados em vários pacientes, mas a análise de sequenciamento não apontou nenhuma alteração.



Figura 18. Cromatograma de seqüenciamento por eletroforese capilar mostrando a transversão citosina para adenina (SNP intrônico) em heterozigose (seta).

1.2. Gene AFF2:

A análise do gene *AFF2* através da técnica de DHPLC foi realizada até o início do exon 20 para todos os pacientes do projeto. Os parâmetros ótimos para a reação de PCR foram estabelecidos e seus perfis de retenção comparados a controles. Algumas reações não funcionaram perfeitamente, não permitindo a leitura do cromatograma e foram sequenciadas diretamente.

Dos padrões alterados, o sequenciamento por eletroforese capilar identificou duas alterações. Uma delas, encontrada em cinco pacientes, é uma substituição de uma timina por uma guanina no intron 15 e é um polimorfismo já descrito, denominado refSNPID rs16994895 (figura 19). Sua descrição não o relaciona a nenhum quadro patogênico. A 2ª



alteração, encontrada em dois pacientes, é uma troca de uma citosina por uma adenina na 843^a base do exon 11 (c.2400C>A). Não foi encontrada descrição dessa alteração na literatura, em bases de dados de SNPs e em amostras controle, sequenciadas posteriormente.



Figura 19: Análise de sequenciamento do fragmento contendo o exon 15 gene *AFF2*, com destaque para a alteração refSNPID rs16994895.

O exon 20 foi analisado por seqüenciamento direto e já que o mesmo se trata de um exon extenso, dividimos o produto a ser amplificado em três partes. Não foi identificada alteração em nenhuma delas.

1.3. Gene SLITRK2

A análise dos produtos de amplificação por DHPLC identificou vários padrões de eluição, que foram sequenciados. A visualização dos cromatogramas para o produto de amplificação referente ao exon 1.2 (fragmento 2 do exon 1) revelou quatro padrões cromatográficos, descritos a seguir.



Para a temperatura de análise de 57,5°C no DHPLC foi identificado um paciente com padrão alterado, no entanto, o seqüenciamento automático não evidenciou nenhuma alteração neste paciente em relação à sequência controle.

Para a temperatura de análise de 59,5°C no DHPLC foram identificados cinco pacientes com padrão alterado. A análise do sequenciamento destes indivíduos não identificou nenhuma alteração.

Para a temperatura de análise de 59,5°C no DHPLC foram identificados dois pacientes com outro tipo padrão alterado. O seqüenciamento também não evidenciou nenhuma alteração.

Para a temperatura de análise de 59,5°C no DHPLC foram identificados seis pacientes com mais de um tipo de padrão alterado. O seqüenciamento dos mesmos não evidenciou nenhuma alteração nos produtos de amplificação referentes a estes produtos de amplificação.

A análise de DHPLC na temperatura de 61,1°C não pode ser realizada, sendo assim sequenciamos todos os pacientes. Novamente nenhuma alteração na sequencia dos pacientes foi encontrada.

A visualização dos cromatogramas para o produto de amplificação referente ao exon 1.3 (fragmento 3 do exon 1) revelou quatro padrões cromatográficos, descritos a seguir.

Para a temperatura de análise de 57°C no DHPLC foram identificados dois pacientes com padrão alterado. O seqüenciamento automático dos mesmos não evidenciou nenhuma alteração na sequencia de nucleotídeos.

Para a temperatura de análise de 57°C no DHPLC foram identificados mais dois pacientes com outro tipo de padrão alterado (Figura 20). Um deles, pela análise de



seqüenciamento automático, não demonstrou nenhuma alteração, no entanto o outro paciente possui o SNP rs2748588 T>C, já descrito no NCBI, em homozigose (Figura 21).

Para a temperatura de análise de 58,7°C no DHPLC foi identificado um paciente com padrão alterado. A análise do seqüenciamento identificou uma transição de timina para citosina em um paciente do sexo masculino com polimicrogiria perisylviana posterior bilateral, esta alteração é o SNP rs2748588 T>C, o qual já está exemplificado na Figura 21.



Figura 20. Análise cromatográfica do gene *SLITRK2* exon 1.3 mostrando padrões de retenção diferentes identificados em pacientes com PMG. O pico verde é o mais comum e o pico azul é o menos comum. A seta indica a diferença entre os picos.

Para a temperatura de análise de 61,6°C no DHPLC foi identificado um paciente com padrão alterado (Figura 22). O seqüenciamento automático evidenciou duas alterações de sequencia, uma delas é o SNP rs2748588 T>C, exemplificado na Figura 26, a outra é uma transição em homozigose de timina para citosina também já descrita no NCBI como SNP rs2748589 T>C (Figura 23).





Figura 21. [A] Cromatograma de seqüenciamento automático mostrando o SNP rs2748588 T>C. **[B]** Cromatograma de seqüenciamento automático mostrando a sequencia selvagem



Figura 22. Análise cromatográfica do gene *SLITRK2* exon 1.3 mostrando padrões de retenção diferentes identificados em pacientes com PMG. O pico rosa é o mais comum e o pico azul é o menos comum (alterado).





Figura 23. [A] Cromatograma de seqüenciamento automático mostrando o SNP rs2748589 T>C. **[B]** Cromatograma de seqüenciamento automático mostrando a sequencia selvagem.

A visualização dos cromatogramas para o produto de amplificação referente ao exon 1.4 (fragmento 4 do exon 1) revelou dois padrões cromatográficos, descritos a seguir.

Para a temperatura de análise de 56,4°C no DHPLC foi identificado um paciente com padrão alterado. A análise por seqüenciamento automático não evidenciou nenhuma alteração de nucleotídeos neste produto de amplificação.

Para as temperaturas de 58,9 e 59,9 °C a análise por DHPLC identificou vários padrões de eluição. O seqüenciamento da maioria deles não identificou nenhuma alteração na sequencia de nucleotídeos, no entanto nós identificamos em um paciente o SNP rs2748589C>T já descrito na base de dados do NCBI (Figura 24).

A visualização dos cromatogramas para o produto de amplificação referente ao exon 1.5 (fragmento 5 do exon 1) revelou os padrões cromatográficos a seguir.





Figura 24. [A] Cromatograma de seqüenciamento automático mostrando o SNP rs2748589 T>C. **[B]** Cromatograma de seqüenciamento automático mostrando a sequencia selvagem.

Para a temperatura de análise de 59°C no DHPLC foi identificado outros pacientes com padrão alterado. O seqüenciamento de um deles identificou uma transição de timina para citosina, g.144905816T>C (Figura 26).



Figura 25. Análise cromatográfica do gene *SLITRK2* exon 1.5 mostrando padrões de retenção diferentes identificados em pacientes com PMG. O pico roxo é o mais comum e o pico azul é o menos comum (alterado). A seta indica a diferença entre os picos.





Figura 26. Cromatograma de seqüenciamento automático mostrando a transição de timina para citosina em heterozigose.

1.4 Gene SLITRK4

A visualização dos cromatogramas para os produtos de amplificação referentes ao exon 2.3 (fragmento 3 do exon 2) revelou os quatro padrões cromatográficos descritos a seguir.

Para a temperatura de análise de 57,8°C no DHPLC foi identificado um paciente com padrão alterado. O seqüenciamento automático não revelou nenhuma alteração de nucleotídeos para este fragmento amplificado.

Para a temperatura de análise de 57,8°C no DHPLC foi identificado um paciente com outro padrão alterado. O seqüenciamento automático não revelou nenhuma alteração de nucleotídeos para este fragmento amplificado.

Para a temperatura de análise de 57,8°C no DHPLC foi identificado um paciente com mais um tipo de padrão alterado. Novamente o seqüenciamento não evidenciou nenhuma alteração.

Para a temperatura de análise de 59,2°C no DHPLC foi identificado um paciente com um tipo de padrão alterado. O seqüenciamento não identificou nenhuma alteração no produto de amplificação analisado.



A visualização dos cromatogramas para os produtos de amplificação referentes ao exon 2.4 (fragmento 4 do exon 2) revelou vários padrões cromatográficos de eluição. O sequenciamento não evidenciou nenhuma alteração.

Já a visualização dos cromatogramas para os produtos de amplificação referentes ao exon 2.5 (fragmento 5 do exon 2) revelou os padrões cromatográficos a seguir.

Para a temperatura de análise de 56,4°C no DHPLC foram identificados quatro pacientes com um padrão alterado. O seqüenciamento automático não evidenciou nenhuma alteração na sequencia de nucleotídeos deste fragmento.

Para a temperatura de análise de 56,4°C no DHPLC foi identificado um paciente com outro tipo de padrão alterado. Também não foi identificada nenhuma alteração por seqüenciamento automático.

Para a temperatura de análise de 57,8°C no DHPLC foi identificado um paciente com um padrão alterado. Nenhuma alteração foi identificada por seqüenciamento automático.

Para a temperatura de análise de 57,8°C no DHPLC foram identificados dois pacientes com um padrão alterado. Nenhuma alteração foi identificada por seqüenciamento automático.

A visualização dos cromatogramas para os produtos de amplificação referentes ao exon 2.6 (fragmento 6 do exon 2) revelou os dois padrões cromatográficos a seguir.

Para a temperatura de análise de 57,5°C no DHPLC foram identificados vários tipos de padrões de eluição. O seqüenciamento automático não evidenciou nenhuma alteração.

Para a temperatura de análise de 58,3°C no DHPLC foram identificados quatro pacientes com um padrão alterado. Nenhuma alteração foi identificada por seqüenciamento automático.



A visualização dos cromatogramas para os produtos de amplificação referentes ao exon 2.7 (fragmento 7 do exon 2) revelou vários padrões cromatográficos de eluição, mas sem alterações identificadas pelo sequenciamento automático.

1.5. Gene TUBA1A:

O seqüenciamento dos exons do gene *TUBA1A* revelou cinco trocas de base, todas no exon 4 do gene. As cinco alterações já foram descritas e constam no banco de dados de SNPs do NCBI (72).

Tabela 8: Alterações identificadas na análise por seqüenciamento por eletroforese capilar do gene *TUBA1A*.

	ALTERAÇÃO	RefSNP	CARACTERÍSTICA	№ DA FIGURA
1	c.440A>G	rs1056875	Sinonímia	27
2	c.453G>C	rs697624	Sinonímia	28
3	c.510T>C	rs1065741	Sinonímia	29
4	c.522G>A	rs61730859	Sinonímia	30
5	c.1008G>A	rs1062432	Sinonímia	31





Figura 27. Análise de sequenciamento que identificou a alteração sinonímia rs1056875. No cromatograma A se observa o local da troca de base de indivíduo heterozigoto, enquanto em B se observa a leitura de cromatograma considerado normal.



Figura 28. Análise de sequenciamento que identificou a alteração sinonímia rs61730859. No cromatograma A se observa a leitura de cromatograma considerado normal, enquanto em B se observa o local da troca de base de indivíduo heterozigoto para a alteração.





Figura 29. Análise de sequenciamento que identificou a alteração sinonímia rs697624. No cromatograma A se observa o local da troca de base de indivíduo heterozigoto, enquanto em B se observa a leitura de cromatograma considerado normal.



Figura 30. Análise de sequenciamento que identificou a alteração sinonímia rs1065741. No cromatograma A se observa o local da troca de base de indivíduo heterozigoto, enquanto em B se observa a leitura de cromatograma considerado normal.




Figura 31. Análise de sequenciamento que identificou a alteração sinonímia rs1062432. Em A se observa o local da troca de base de indivíduo heterozigoto, enquanto em B se observa a leitura de cromatograma considerado normal.

1.6. Gene TUBA8:

Na análise do seqüenciamento dos exons do gene *TUBA8* foi identificada a substituição c.816C>T, que consta na base de dados de SNPs do NCBI (72) como rs2234332 e é sinonímia, ou seja, não resulta em troca de aminoácido na tradução do gene.





Figura 32. Análise de sequenciamento que identificou a alteração sinonímia rs234332. Em A se observa o local da troca de base de indivíduo heterozigoto, enquanto em B se observa a leitura de cromatograma considerado normal.

1.7. Gene TUBB2B:

O seqüenciamento dos exons desse gene identificou a deleção 1607delT, já descrita como o SNP rs67130760 e cuja localização está na região não codificante.



Figura 33. Análise de sequenciamento que identificou a alteração rs67130760. No cromatograma observa-se o local no qual há ausência de uma timina.



1.8. Gene WDR62:

A análise do gene WDR62 foi realizada através de sequenciamento pelo método de Sanger e identificou doze alterações (tabela 9), todas já descritas anteriormente e constando em bancos de dados. Dessas doze alterações, apenas duas resultam em troca de aminoácido na proteína traduzida e uma localiza-se em região de sítio de splicing. As demais oito alterações são intrônicas e uma é silenciosa

	Alteração	RefSNP	Característica	Figura
1	c.700-18C>T	rs10423651	Intrônico	-
2	c.1233+13C>T	rs76130844	Intrônico	-
3	c.1371+138C>T	rs116976346	Intrônico	-
4	c.1371+92T>C	rs7246292	Intrônico	-
5	c.1415A>C	rs147021603	Q472P	34
6	c.1641G>A	rs2301734	sítio de <i>splicing</i>	35
7	c.1643-10C>T	rs4806263	Intrônico	-
8	c.1768+28G>A	rs77938609	Intrônico	-
9	c.2147-34G>A	rs2301736	Intrônico	-
10	c.2271G>A	rs61494900	Sinonímia	-
11	c.3082+76G>T	rs2311004	Intrônico	-
12	c.3914A>T	rs2074435	Q1305L	36

Tabela 9. Alterações identificadas no seqüenciamento do gene WDR62

Onde L = leucina, Q = glutamina, P = prolina





Figura 34. Análise de sequenciamento que identificou a alteração rs147021603. Em A se observa o local da troca de base de indivíduo heterozigoto, enquanto em B se observa a leitura de cromatograma considerado normal.



Figura 35. Análise de sequenciamento que identificou a alteração rs2301734. Em B se observa o local da troca de base de indivíduo heterozigoto, enquanto em A se observa a leitura de cromatograma considerado normal.





Figura 36. Análise de sequenciamento que identificou a alteração rs2074435. No cromatograma A, observa-se a leitura considerada normal. Em B, observa-se o cromatograma de um heterozigoto para a alteração. E no cromatograma C , observa-se a leitura de um indivíduo homozigoto para a alteração.



2. ANÁLISE *IN SILICO* DE RESULTADOS DA TRIAGEM DE MUTAÇÕES EM PACIENTES ESPORÁDICOS E PEQUENAS FAMÍLIAS:

As alterações não sinonímias identificadas na triagem de mutações em pacientes esporádicos e nas pequenas famílias foram analisadas utilizando os algoritmos SIFT, Polyphen, Polyphen 2, SNPs&GO, MutPred e Panther. Os resultados dessa análise (tabela 10), apesar de heterogêneos, apontaram um potencial patogênico mais significativo para a alteração identificada no gene *AFF2*.



Tabela 10: Análise *in silico* das alterações identificadas pela triagem de mutações através de DHPLC e sequenciamento pelo método de Sanger.

			Troca de		I	MutPred			SNPs&	GO	Par	ther
	Gene	Alteração RefSNP	acordo com transcrito	Grantham Scale	Probability of deleterious mutation	Top 5 features	SIFT	Polyphen 2	effect	RI	subPSEC	Pdeleterious
1	AFF2	ΑΑС/ΑΑΑ	N800K	101 - moderadamente	0.523	Ganho de metilação em N800 (P = 0.0231) Ganho de sítio de ligação MoRF (P = 0.0281) Ganho de ubiquitinação em N800 (P = 0.0369)	Tolerado	Possivelmente prejudicial	neutro	GOPRIsubPSEC4-3.09554rito nsta prot-3.09554	-3.09554	0.52387
		AAC/AAA	N767K	radical	0.514	Ganho de metilação em N767 (P = 0.0206) Ganho de sítio de ligação MORF (P = 0.0281) Ganho de ubiquitinação em N767 (P = 0.0369)	Tolerado	Possivelmente prejudicial	transcr não cor no Unip	ito Ista Irot	-3.09554	0.52387



			N441K		0.527	Ganho de metilação em N441 (P = 0.0148) Ganho de sítio de ligação MoRF (P = 0.0281) Ganho de ubiquitinação em N441 (P = 0.0325)	Tolerado	Possivelmente prejudicial	transcri não con no Unip	to sta rot	-3.09554	0.52387
			N767K		0.482	Ganho de metilação em N767 (P = 0.0191) Ganho de sítio de ligação MoRF (P = 0.0281) Ganho de ubiquitinação em N767 (P = 0.0351)	Tolerado	Possivelmente prejudicial	transcri não con no Unip	to sta rot	-3.09554	0.52387
2	WDR62	rs147021603	Q472P	76 - moderadamente conservativo	0.400	Gain of glycosylation at Q472 (P = 0.0098) Gain of catalytic residue at Q472 (P = 0.0134) Perda de folha (P = 0.0315)	Tolerado	Benigno	transcri não con no Unip	to sta rot	position do to the	es not align HMM
3	WDR62	rs2074435	Q1305L	113 - moderadamente radical			Tolerado	Benigno	neutro	10	position do to the	es not align HMM



	Q1310L	0.280	Perda de acessibilidade a solvente (P = 0.0231) Perda de desordem (P = 0.0565) Perda de hélice (P = 0.0626)	Tolerado	Benigno	transcrito não consta no Uniprot	position does not align to the HMM
--	--------	-------	--	----------	---------	--	---------------------------------------

Onde K = lisina, L = leucina, N = asparagina, P = prolina, Q = glutamina.

Para efeito de interpretação dos resultados, o algoritmo MutPred® oferece um "general score", que seria a probabilidade de uma substituição de aminoácidos ser deletéria ou patogênica, adicionado de uma lista com as cinco principais possibilidades de consequências geradas por tal alteração, com seus respectivos valores P para o impacto sobre certa estrutura ou propriedade funcional. Já no caso do algoritmo Panther®, o parâmetro $P_{deleterious}$ estima a probabilidade de uma dada variante causar um efeito deletério sobre uma função proteica e tal parâmetro é gerado à partir do *score* subPSEC. Quanto mais negativo o *score* subPSEC, mais severa é a substituição e maior é o $P_{deleterious}$, podendo este variar de 0 a 1.



Essas três alterações foram testadas em grupo de 100 indivíduos controle através de sequenciamento pelo método de Sanger, e nenhuma delas foi encontrada nos indivíduos normais.

3. AVALIAÇÃO DA REGIÃO CANDIDATA - CAPTURA E SEQUENCIAMENTO EM LARGA ESCALA:

Para essa etapa foram selecionados quatro indivíduos da família, representando as três gerações que estudamos, incluindo um indivíduo não-afetado, para efeitos de comparação. Tal seleção baseou-se, principalmente na qualidade do DNA disponível para o experimento, avaliado através de eletroforese em gel de agarose e observação da integridade das bandas (Figura 64).



Figura 37: Eletroforese em gel de agarose 1% para avaliação da integridade do DNA de pacientes e familiares. No destaque, as amostras selecionadas do indivíduo controle (A) e dos indivíduos afetados (B, C e D).

A técnica de captura da Agilent seguida por sequenciamento Illumina caracteriza-se por proporcionar uma alta cobertura das regiões analisadas, assim como precisão das leituras. Em uma comparação entre as plataformas de sequenciamento *next generation* Roche 454, Illumina e



ABI SOLID, Harismendy *et al.* (81) encontrou melhor desempenho do sistema Illumina para os seguintes tópicos: acurácia do sequenciamento, acurácia na detecção de variantes, taxa de cobertura de leitura e taxa de discrepância entre variantes identificadas. A tabela 9 e a figura 64 apresentam os dados técnicos do experimento realizado com as nossas amostras, demonstrando a alta qualidade obtida na análise.

Tabela 11: Dados técnicos da avaliação do DNA de pacientes da família 1 através de captura e sequenciamento em larga escala.

Dado	Indivíduo I	Indivíduo II	Indivíduo III	Indivíduo IV
% leituras com identificação no genoma	97,6874032	98,2348415	94,2208018	97,7650642
% leituras realizadas nas duas direções	99,1363580	99,2471718	99,2112579	99,1584549
Média de cobertura	202,252445	150,561558	156,726397	121,795343









Para a análise dos dados do seqüenciamento em larga escala utilizamos como filtro dos SNPs identificados:

- 1. Presença de alteração nos indivíduos afetados e ausência no indivíduo não-afetado;
- 2. Abrangência de todo o cromossomo X;
- Indiferença quanto à presença nas bases de dados HapMap, 1000 genomes e dbSNP 132;
- 4. Alterações não-sinonímias;
- 5. Alta qualidade de leitura (no mínimo seis leituras de cada região);

Foram identificadas 25 alterações, das quais 22 estão presentes simultaneamente nos três indivíduos afetados.

Também foram realizadas análises com diferentes parâmetros, como alterações em sítio de *splicing*, alterações presentes na união dos três indivíduos afetados, ao invés da intersecção, e os resultados sempre foram muito similares. Para alterações de códon de parada prematuro, não houve nenhuma mutação encontrada. Além disso, optamos por manter a análise mais abrangente, utilizando o parâmetro "indiferente" para a presença nas bases de dados HapMap, 1000 genomes e dbSNP 132, de forma a garantir que todas as alterações segregando nos indivíduos afetados fossem vislumbradas.



Tabela 12: Lista de alterações identificadas pelo seqüenciamento em larga escala do cromossomo X de pacientes de família detentora da região candidata

	GENE	LOCALIZAÇÃO	CODON ALTERADO	AMINOÁCIDO ALTERADO	POSIÇÃO NO CROMOSSOMO	RefSNP
1	ARL13A	Xq22.1	TCA/TTA	S215L	100242536	rs41307262
2	CPXCR1	Xq21.31	CGT/CAT	R/H	88008807	rs5984611
3	CPXCR1	Xq21.31	TAT/TCT	Y/S	88008423	rs5940915
4	H2BFM	Xq22.2	CAG/TAG	Q/*	103294760	rs2301384
5	H2BFWT	Xq22.2	CGG/TGG	R/W	103267974	rs17332043
6	HDX	Xq21.1	ттт/тст	F339S	83723541	rs35161124
7	IRS4	Xq22.3	CAT/GAT	H/D	107976940	rs1801164
8	MAGEC1	Xq27.2	ATT/ACT	I/T	140994419	rs138268726
9	MAGEC1	Xq27.2	CAG/CAC	Q/H	140994066	rs140075882
10	MAGEC1	Xq27.2	CAT/TAT	H709Y	140995315	rs56256227
11	MAGEC1	Xq27.2	CTC/GTC	L443V	140994517	rs62611966
12	MAGEC1	Xq27.2	CTT/ATT	L283I	140994037	rs176045
13	MAGEC1	Xq27.2	CTT/CCT	L337P	140994200	rs57227275
14	MAGEC1	Xq27.2	TCC/TTC	S241F	140993912	rs12558365
15	MAGEC1	Xq27.2	TCT/CCT	S267P	140993989	rs77648555
16	MAGEC1	Xq27.2	TCT/TGT	S406C	140994407	rs62611965
17	POF1B	Xq21.1	ATG/TTG	M/L	84563135	rs363774
18	RPA4	Xq21.33	GCT/ACT	A/T	96139406	rs2642219
19	SPANXC	Xq27.2	CTG/GTG	L/V	140335742	rs60435127
20	TGIF2LX	Xq21.31	GCT/CCT	A/P	89177109	rs11575111
21	TGIF2LX	Xq21.31	GTC/ATC	V/I	89177673	rs2290380
22	UBE2NL	Xq27.3	TTA/TGA	L/*	142967468	rs237520

Onde A = alanina, C = cisteína, D = ácido aspártico, F = fenilalanina, H = histidina, I = isoleucina, K = lisina, L = leucina, M = metionina, N = asparagina, P = prolina, Q = glutamina, R = arginina, S = serina, T = treonina, V = valina, W = triptofano, Y = tirosina.



4. ANÁLISE *IN SILICO* DE RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO EM LARGA ESCALA:

As alterações identificadas pelo seqüenciamento em larga escala foram analisadas utilizando os algoritmos SIFT, Polyphen, Polyphen 2, SNPs&GO, MutPred e Panther. O resultado encontra-se listado na tabela a seguir (tabela 11).



Tabela 13: Análise *in silico* das alterações identificadas pelo seqüenciamento em larga escala.

			Cuanthan	N	lutPred				SNPs&G	C	Pant	her	
	Gene	RefSNP	Scale	Probability of deleterious mutation	Top features	SIFT	Polyphen	Polyphen 2	effect	RI	subPSEC	Pdelete rious	
				0,249	Gain of catalytic residue at S215 (P = 0.0148) Loss of phosphorylation at S215 (P = 0.0149)	Tolerado	Possivelmente prejudicial	Benigno	Neutro	9	-1,67	0,21	
1	ARL13A	rs41307262	121 Moderadam ente radical	0,169	Loss of phosphorylation at S89 (P = 0.0148) Gain of catalytic residue at S89 (P = 0.0148))	Tolerado	Benigno	Benigno	x	x	-1,67	0,21	
							0,287	Loss of sheet (P = 0.0063) Gain of helix (P = 0.0117) Loss of phosphorylation at S215 (P = 0.0147)	Tolerado	Benigno	Benigno	x	x



2	CPXCR1	rs5984611	29 Conservativo	0,243	Loss of MoRF binding (P = 0.0291) Loss of phosphorylation at T130 (P = 0.1187) Gain of sheet (P = 0.1208)	Tolerado	Provavelmente prejudicial	Provavelment e prejudicial	Neutro	3	No Panther HMM hit
				x	x	Tolerado	Provavelmente prejudicial	Provavelment e prejudicial	x	x	
3	CPXCR1	rs5940915	144 Moderadam ente radical	0,15	Gain of phosphorylation at Y3 (P = 0.0176) Loss of catalytic residue at Y3 (P = 0.0645) Gain of glycosylation at T5 (P = 0.0838)	Tolerado	Benigno	Benigno	Neutro	10	No Panther HMM hit
				x	x	Tolerado	Benigno	Benigno	×	X	
4	H2BFM*	rs2301384			*6	alteração de có	don de parada pr	ematuro			
5	H2BFWT	rs17332043	101 Moderadam ente radical	0,249	Loss of disorder (P = 0.0087) Loss of methylation at K90 (P = 0.0387)	t Deletéri	O Provavelme prejudicia	nte Provavelm I prejudic	ente Neutro ial)	1 No Panther HMM hit



				0,338	Gain of relative solvent accessibility (P = 0.0104) Gain of phosphorylation at F339 (P = 0.0186) Loss of stability (P = 0.0252)	Deletério	Possivelmente prejudicial	Possivelmente prejudicial	Neutro	7	No Pa HMN	nther 1 hit
6	HDX	rs35161124	155 Radical	0,097	Gain of relative solvent accessibility (P = 0.0104) Gain of phosphorylation at F397 (P = 0.0186) Loss of stability (P = 0.0252)	Deletério	Possivelmente prejudicial	Possivelmente prejudicial	x	x	No Pa HMN	nther 1 hit
				0,097	Gain of relative solvent accessibility (P = 0.0104) Gain of phosphorylation at F397 (P = 0.0186) Loss of stability (P = 0.0252)	Deletério	Possivelmente prejudicial	Possivelmente prejudicial	x	x	No Panther HMM hit	
7	IRS4	rs1801164	81 Moderadam ente conservativo	0,18	Gain of helix (P = 0.0349) Loss of loop (P = 0.0603) Loss of MoRF binding (P = 0.0831)	Tolerado	Benigno	Benigno	Neutro	10	-1,60	0,19
8	MAGEC1	rs138268726	89 Moderadam	0.189	Gain of glycosylation at 1410 (P = 0.0286) Loss of sheet (P = 0.0483)	Deletério	Provavelmente prejudicial	Não informado	Neutro	10	No Pa HMN	nther 1 hit

134



			ente		Gain of loop (P = 0.0502)							
			conservativo									
				0.062	Loss of helix (P = 0.0558) Gain of loop (P = 0.069) Loss of solvent accessibility (P = 0.1144)	Deletério	Benigno	Benigno	Neutro	10	No Pa	anther
9	MAGEC1	rs140075882	40 Conservativo	0.048	Gain of catalytic residue at Q59 (P = 0.1255) Loss of helix (P = 0.1299)	x	Possivelmente prejudicial		-	-	нмі	М hit
				0.046	Gain of catalytic residue at Q58 (P = 0.1255) Loss of helix (P = 0.1299)	x	Possivelmente prejudicial		-	-		
10	MAGEC1	rs56256227	83 Moderadam ente conservativo	0,15	Gain of loop (P = 0.024) Gain of solvent accessibility (P = 0.0328) Gain of phosphorylation at H709 (P = 0.0401)	Deletério	Não informado	Não informado	Neutro	9	-1,40	0,16
11	MAGEC1	rs62611966	32 Conservativo	0,163	Gain of sheet (P = 0.0344) Loss of catalytic residue at L443 (P = 0.0716) Loss of loop (P = 0.0804)	Tolerado	Não informado	Não informado	Neutro	9	No Pa HMI	nther M hit
12	MAGEC1	rs176045	5	0,39	Gain of sheet (P = 0.0344)	Tolerado	Benigno	Não	Neutro	10	No Pa	anther

135



			Conservativo		Loss of stability (P = 0.1905) Loss of glycosylation at S278 (P = 0.1923)			informado			HMM hit
				0,238	Gain of sheet (P = 0.1208) Loss of glycosylation at S80 (P = 0.1882) Loss of stability (P = 0.1905)	-	Benigno	Benigno	-	-	
				0,234	Gain of sheet (P = 0.1208) Loss of glycosylation at S79 (P = 0.1882) Loss of stability (P = 0.1905)	-	Benigno	Benigno	-	-	
13	MAGEC1	rs57227275	98 Moderadam ente conservativo	0,214	Gain of relative solvent accessibility (P = 0.0082) Gain of loop (P = 0.0166) Loss of helix (P = 0.0237)	Tolerado	Benigno	Não informado	Neutro	10	No Panther HMM hit
14	MAGEC1	rs12558365	155	0,2	Loss of phosphorylation at S241 (P = 0.01) Loss of glycosylation at	Tolerado	Benigno	Não informado	Neutro	9	No Panther HMM hit

136



			Radical		P239 (P = 0.034) Loss of sheet (P = 0.1158)							
				0,22	Loss of sheet (P = 0.0063) Loss of phosphorylation at S43 (P = 0.0065) Gain of loop (P = 0.024)	-	Benigno	Não informado	x	x		
15	MAGEC1	rs77648555	74 Moderadam ente conservativo	0,167		Tolerado	Benigno	Não informado	Neutro	10	No Ра НМЛ	nther A hit
16	MAGEC1	rs62611965	112 Moderadam ente radical	0,287	Loss of glycosylation at S406 (P = 0.018) Gain of catalytic residue at S406 (P = 0.0488) Loss of phosphorylation at S406 (P = 0.0601)	Deletério	Não informado	Não informado	Neutro	9	No Pa HMN	nther A hit
17	POF1B	rs363774	15 Conservativo	0,25	Loss of catalytic residue at M349 (P = 0.046) Loss of phosphorylation at S351 (P = 0.1637) Loss of disorder (P = 0.1988)	Tolerado	Benigno	Benigno	Neutro	10	-2,17	0,30



18	RPA4	rs2642219	58 Moderadam ente conservativo	0,112	Gain of glycosylation at A33 (P = 0.0136) Loss of ubiquitination at K35 (P = 0.0755) Gain of phosphorylation at A33 (P = 0.116)	Tolerado	Benigno	Benigno	Neutro	10	-2,46	0,36
19	SPANXC	rs60435127	32 Conservativo	0.282	Gain of MORF binding (P = 0.0776) Loss of helix (P = 0.079) Loss of catalytic residue at L68 (P = 0.1331)	Tolerado	Benigno	Benigno	Neutro	10	0,07	0,12
				x	x	Tolerado	Benigno	Benigno	x	x	0,07	0,12
				Х	x	Tolerado	Benigno	Benigno	x	x	0,07	0,12
20	TGIF2LX	rs11575111	27 Conservativo	0,133	Gain of glycosylation at A9 (P = 0.0328) Gain of solvent accessibility (P = 0.3194) Gain of phosphorylation at T11 (P = 0.3347)	Deletério	Provavelmente prejudicial	Provavelmente prejudicial	Neutro	7	No Panther HMM hit	
21	TGIF2LX	rs2290380	29 Conservativo	0,076	Loss of sheet (P = 0.0228) Gain of loop (P = 0.024) Gain of relative solvent	Tolerado	Benigno	Benigno	Neutro	10	-0,39	0,06



			accessibility (P = 0.025)						
22	UBE2NL*	rs237520	*alteração de códon de parada prematuro						



À partir dos resultados da análise *in silico*, 15 das 22 alterações foram selecionadas para investigação no restante da família e para a busca em grupo de indivíduos controle, considerando a predição de prejuízos causados pela alteração à proteína resultante de sua tradução. Os SNPs selecionados foram os seguintes:

- Gene *CPXC*R1: rs5984611.
- Gene *H2BFM*: rs2301384.
- Gene *H2BFWT*: rs17332043.
- Gene *HDX*: rs35161124.
- Gene *MAGEC1*: rs140075882, rs138268726, rs56256227, rs62611966, rs176045, rs57227275, rs12558365, rs77648555, rs62611965.
- Gene SPANXC: rs60435127
- Gene *TGIF2LX*: rs11575111.
- Gene UBE2NL: rs237520.

5. BUSCA DE ALTERAÇÕES NOS DEMAIS INDIVÍDUOS DA FAMÍLIA 1 ATRAVÉS DE SEQUENCIAMENTO PELO MÉTODO DE SANGER:

A análise *in silico* dos resultados obtidos com sequenciamento em larga escala apontou as alterações nos genes *HDX*, *H2BFWT*, *CPXCR1*, *MAGEC1*, *H2BFM*, *TGIF2LX*, *SPANXC* e *UBE2NL* como aquelas com maior possibilidade de relação com a patogenicidade do quadro clínico. A validação desses resultados foi realizada através de amplificação e sequenciamento por eletroforese capilar das regiões, de forma a confirmar os dados obtidos no sequenciamento em larga escala e eliminando possíveis artefatos de técnica. Além disso, o restante da família 1 (demais indivíduos afetados) foi avaliada para a presença das mutações.





Figura 39. Análise de sequenciamento que confirmou a alteração rs35161124, no gene *HDX*. No cromatograma A, observa-se a leitura de um homozigoto para a alteração, uma troca de uma timina por uma citosina. O cromatograma B apresenta a sequência selvagem.



Figura 40. Análise de sequenciamento que confirmou a alteração rs5984611, no gene *CPXCR1*. No cromatograma A, observa-se a leitura de um homozigoto para a alteração, uma troca de uma guanina por uma adenina. O cromatograma B apresenta a sequência selvagem.





Figura 41. Análise de sequenciamento que confirmou a alteração rs56256227, no gene *MAGEC1*. No cromatograma A observa-se a leitura de um indivíduo heterozigoto para a alteração, a troca de uma citosina por uma timina, enquanto o cromatograma B apresenta a leitura de indivíduo homozigoto.



Figura 42. Análise de sequenciamento que confirmou a alteração rs11575111, no gene *TGIF2LX*. No cromatograma A observa-se a leitura de indivíduo normal, enquanto em B é observada a leitura de indivíduo heterozigoto para a alteração, uma troca de guanina por citosina.





Figura 43. Análise de sequenciamento que confirmou a alteração rs2301384, no gene *H2BFM*. No cromatograma A observa-se a leitura de indivíduo normal, enquanto em B é observada a leitura de indivíduo homozigoto para a alteração, uma troca de citosina por timina, e em C se observa leitura de indivíduo heterozigoto.





Figura 44. Análise de sequenciamento que confirmou a alteração rs237520, no gene *UBE2NL*. No cromatograma A observa-se a leitura de indivíduo normal, enquanto em B é observada a leitura de indivíduo homozigoto para a alteração, uma troca de timina por guanina, e em C se observa leitura de indivíduo heterozigoto.



Figura 45. Análise de sequenciamento que confirmou a alteração rs7764855 no gene *MAGEC1*. No cromatograma observa-se a citosina na posição onde, em indivíduos normais, encontra-se uma timina.





Figura 46. Análise de sequenciamento que confirmou a alteração rs176045 no gene MAGEC1. Em A observa-se o alelo selvagem, e em B observa-se a alteração, uma troca de citosina por adenina.



Figura 47. Análise de sequenciamento que confirmou a alteração rs12558365 no gene *MAGEC1*. Em A observa-se o alelo selvagem, e em B observa-se a alteração, uma troca de citosina por timina.





Figura 48. Análise de sequenciamento que confirmou a alteração rs57227275 no gene *MAGEC1*. Em A observa-se o alelo selvagem, e em B observa-se a alteração, uma troca de timina por citosina.



Figura 49. Análise de sequenciamento que confirmou a alteração rs62611965 no gene *MAGEC1*. Em A observa-se o alelo selvagem, e em B observa-se a alteração, uma troca de citosina por guanina.





Figura 50. Análise de sequenciamento que confirmou a alteração rs no gene *MAGEC1*. Em A observa-se o alelo selvagem, e em B observa-se a alteração, uma troca de citosina por guanina.





Figura 51. Análise de sequenciamento que confirmou a alteração rs no gene *MAGEC1*. Em A observa-se o alelo selvagem, e em B observa-se a alteração, uma troca de timina por citosina.



Figura 52. Análise de sequenciamento que confirmou a alteração rs no gene *MAGEC1*. Em A observa-se o alelo selvagem, e em B observa-se a alteração, uma troca de guanina por citosina.



De todas as alterações, apenas o SNP rs
17332043, identificado no geneH2BFWT, não foi confirmado (figura 79).



Figura 53. Análise de sequenciamento da alteração rs173332043 no gene H2BFWT, na qual só foi observado o alelo selvagem.

As alterações nos genes *CPXCR1*, *HDX* e *H2BFM* foram encontradas tanto em indivíduos afetados da família 1, quanto em não-afetados. Já as alterações dos genes *TGIF2LX* e *UBE2NL* só foram localizadas em pacientes.

Dentre os genes, apenas o *MAGEC1*, o *SPANXC* e o *UBE2NL* localizam-se na região candidata, mais especificamente nas regiões Xq27.2 e Xq27.3, enquanto todos os outros genes encontram-se entre as região Xq21.1 e Xq22.3. Considerando que a sequência do gene *MAGEC1* é extremamente repetitiva em sua extensão e que o gene *SPANXC* apresenta altíssima similaridade com os outros genes da família *SPANX*, achamos mais prudente analisarmos a sequência completa de ambos os genes, através de amplificação e sequenciamento por eletroforese capilar.

Devido à alta homologia do gene SPANXC com outros membros da família SPANX, análises de bioinformática não permitiram a construção de sequências iniciadoras totalmente



específicas, portanto o máximo de especificidade obtida resultou na amplificação do gene *SPANXC* e do gene *SPANXD*. Para poder separar os alelos dos genes e determinar se a alteração identificada pelo sequenciamento realmente pertencia ao gene *SPANXC*, e não a outro membro da família SPANX, tendo sido atribuída erroneamente ao gene *SPANXC* devido ao mapeamento de sequências com alta identidade, os produtos de PCR foram clonados em vetores pGEM®T Easy (Promega) e inseridos em *E. coli* para seleção dos clones recombinantes e seu sequenciamento pela técnica de Sanger com *primers* específicos do vetor (SP6 e T7). Este procedimento foi realizado para todos os indivíduos afetados e portadores do haplótipo. A análise das sequências dos clones evidenciou que os indivíduos analisados desta família não possuem uma cópia do gene *SPANXC*, mas um gene híbrido *SPANXD/C* e a cópia completa do gene *SPANXD*. O alelo GTG foi identificado em todas as sequencias do gene *SPANXD/C*. Estes alelos fazem parte da sequencia selvagem destes genes. Portanto, a alteração CTG/GTG identificada no gene *SPANXC* trata-se na verdade de um erro de mapeamento das *reads* geradas pelo sequenciamento de segunda geração.

No caso do gene *MAGEC1*, devido ao grande número de alterações encontradas no sequenciamento em larga escala, mais especificamente nove, iniciadores foram construídos para toda a região codificante do gene e todas as nove alterações foram confirmadas em indivíduos afetados.

Todas as alterações identificadas estão descritas em bases de dados de SNPs, que forneceram dados de frequência dos alelos descritos nas populações testadas. Observa-se que as alterações rs12558365, rs77648555 e rs176045 estão presentes em uma frequência muito mais alta na população testada, quando comparadas às demais alterações. Se essas informações forem cruzadas com os resultados da análise *in silico*, nota-se que a maioria dos SNPs mais raros foram avaliados pelos algoritmos como mais deletérios, ou seja, com maior possibilidade de ação patogênica.



Uma análise posterior, com leitura de todos os *reads* gerados pelo sequenciamento, apontou uma deleção de três pares de base no gene *SPANXN4* (figura 54), localizado na região Xq27.3. A deleção está presente nos três indivíduos afetados (figuras 56, 57 e 58) e ausente no indivíduo não-afetado (figura 55), como ilustra a figura abaixo.



Figura 54. Análise de sequenciamento através de visualização dos *reads* gerados aponta deleção no gene *SPANXN4*, no destaque, em vermelho.

É interessante observar que o indivíduo C, do sexo feminino e afetado, apresenta menos cópias da deleção do que os indivíduos afetados do sexo masculino, que só possuem um cromossomo X.









Figura 56. Alinhamento dos *reads* obtidos do indivíduo B, afetado do sexo masculino, na região do gene *SPANXN4*. No destaque, o local da deleção.




Figura 57. Alinhamento dos *reads* obtidos do indivíduo C, afetado do sexo feminino, na região do gene *SPANXN4*. No destaque, o local da deleção.





Figura 58. Alinhamento dos *reads* obtidos do indivíduo D, afetado do sexo masculino, na região do gene *SPANXN4*. No destaque, o local da deleção

6. BUSCA DE ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE SNPARRAY:

Pacientes contendo o haplótipo para a região candidata Xq27.1-27.3 foram submetidos a analise de *microarray*. As etapas de digestão, ligação dos adaptadores e PCR foram realizadas com sucesso como pode ser visualizado no gel abaixo que mostra o padrão de amplificação dos fragmentos genômicos entre 2000 e 150pb (Figura 59).



Figura 59. Visualização dos produtos de PCR em gel de agarose 2%. Amostras 1 a 7, em seguida o branco (três canaletas), amostras aleatórias. M é o marcador de peso molecular de 100pb.

Em seguida foram realizadas as etapas de purificação com *beads* magnéticas, quantificação e fragmentação do material amplificado. Pode ser vizualizado o sucesso das



etapas, com exceção da primeira canaleta, pois todas as amostras apresentam o padrão de fragmentos entre 125 e 25pb (Figura 60). Por fim foram realizadas as etapas de marcação, hibridação, lavagem e escaneamento dos SNP*arrays*.

A análise dos SNP*arrays* dos indivíduos afetados, utilizando o programa *Chromosome Analysis Suite*, foi realizada para alterações de alta resolução, e não identificou grandes eventos de deleção ou ganhos no cromossomo X (figuras 61, 62 e 63), como o esperado.

O foco deste experimento era a região candidata, mais especificamente a região cromossômica contendo os genes SPANXC, MAGEC1 e UBE2NL. A análise com o mesmo *software*, mas desta vez focando a região candidata em questão, mostra resultados similares quando comparada ao quadro geral (figuras 64, 65 e 66).



Figura 60. Visualização dos produtos da fragmentação em gel de agarose 2%. Amostras 1 a 7. M é o marcador de peso molecular 50bp.



O programa de análise de dados apontou algumas alterações em outros cromossomos que foram avaliadas quanto à patogenicidade e a presença em bancos de dados, não tendo sido identificada nenhuma alteração inédita com potencial patogênico.

Um exemplo deste tipo de alteração, no caso um ganho no braço longo do cromossomo 17 em 17q21.31 pode ser visualizado na figura 67.





Figura 61. Panorama geral do Cromossomo X de uma mulher portadora do haplótipo. Observar a distribuição homogênea dos *spots* ao longo de todo cromossomo (a linha se mantém praticamente no valor 2, demonstrando a presença de duas cópias).



Figura 62. Panorama geral do Cromossomo X de um homem portador do haplótipo. Observar a distribuição homogênea dos *spots* ao longo de todo cromossomo (a linha se mantém praticamente no valor 1, demonstrando a presença de uma cópia).





Figura 63. Panorama geral do Cromossomo X de um homem portador do haplótipo. Observar a distribuição homogênea dos *spots* ao longo de todo cromossomo, já que a linha se mantém praticamente no valor 1, demonstrando a presença de uma cópia.





Figura 64. Panorama da região candidata Xq27.1-q27.3 de um homem portador do haplótipo. Observar a distribuição homogênea dos *spots* ao longo de todo cromossomo, com a linha se mantendo praticamente no valor 1, demonstrando a presença de uma cópia.





Figura 65. Panorama da região candidata Xq27.1-q27.3 de uma mulher portadora do haplótipo. Observar a distribuição homogênea dos *spots* ao longo de todo cromossomo, com a linha se mantendo praticamente no valor 2, demonstrando a presença de duas cópias.





Figura 66. Panorama da região candidata Xq27.1-q27.3 de um homem portador do haplótipo. Observar a distribuição homogênea dos *spots* ao longo de todo cromossomo, com a linha se mantendo praticamente no valor 1, demonstrando a presença de uma cópia.



3. · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	.0				- 19	p13.3
5_(CytoScanHD_Array).cyhd.cychp: Copy Number	State (segments)					p13.2
		Δ				p13.1
5_(CytoScanHD_Array).cyhd.cychp: Weighted Log	2 Ratio					
- 1 - 4 명한 위험은 10 년 4 년						p12
0,5 -						p11.2
5_(CytoScanHD_Array).cyhd.cychp: Copy Number	State					V/////
_3			I DELLEMENT DIA LEMENT			9111
_2						q11.2
_1						
DGV						g12
						q21.2
\ation_67211	Vis	Variation_0367		riatio de la companya		021.21
	Variation 8850					q21.32
Genes						q21,33
KIKAAR6267			ARL 177.Ava	NSFP1		q22
KIAA1267	LRRC37A ABLING N	ISFP	LRRC37A2	NSF		q23.2
						q23.3
Markers CytoScan HD Array dbSnp: 132 NetAffx: 3	2.1					q24.1
	Ξ.					q24.3
14200kb 44300kb	44400kb	44500kb	44600kb	44700kb		q25,1
17		q21.31	• J* 10 • 10 •		Ŷ	
				< >		q25.3
Detail View 🍾 🖽 QC and Sample Info 🍾 📇 C	hromosome Summary Data 🌂				U I	17

Figura 67. Análise de alta resolução da região cromossômica 17q21.31 do indivíduo III-4 da família 1. Notar as barras em azul e vermelho que representam variações no número de cópias já descritas em bancos de dados e não associadas a quadros patológicos.









1. TRIAGEM DE MUTAÇÕES EM PACIENTES ESPORÁDICOS E PEQUENAS FAMÍLIAS:

1.1. O gene SRPX2:

O gene *SRPX2* (*sushi-repeat containing protein, X-linked 2*) localiza-se na região Xq22.1 e é composto por 11 exons. Ele codifica uma proteína de 465 aminoácidos e é expresso, predominantemente, no cérebro, placenta e tecido vascular (82). Sua proteína é composta por uma sequência sinalizadora, seguida de três domínios *sushi-repeat* e um domínio *hyalin-repeat* (Figura 68). Os domínios *sushi-repeat* estão presentes em uma série de proteínas envolvidas em processos de adesão celular. Já a função do domínio *hyalin-repeat* ainda não foi elucidada, mas alguns trabalhos demonstram seu envolvimento também com processos de adesão celular (83).

Em análise evolutiva, o gene *SRPX2* foi inserido em uma família composta de cinco genes: *SRPX2*, *SRPX*, *SELP* (*selectin P precursor*), *SELE* (*selectin E precursor*) e *SVEP1* (*selectin-like protein*). Outra família de proteínas, a das seletinas, também apresenta domínios *sushi-repeat* e são evolutivamente similares ao *SRPX2*. As seletinas estão relacionadas a processos de migração de leucócitos, fixação e rotação celular (84).

O gene *SRPX2* foi identificado em 1999 por Kurosawa *et al.*, em estudos de leucemia aguda em células leucêmicas pró-B, e foi inicialmente denominado gene *SRPUL*. Em 2006, Roll *et al.* (52) encontraram duas mutações neste gene, uma delas em pacientes com crises rolândicas associadas com dispraxia oral e de fala, além de retardo mental; e a outra mutação foi descrita em um paciente com polimicrogiria perisylviana bilateral, assim como em sua mãe e uma tia, ambas não-afetadas. Em 2009, Tanaka *et al.* (84) detectaram uma alta expressão do gene em células de tumor gástrico e demonstraram sua atuação no aumento da mobilidade e da fixação celular. Já em 2010, Roll *et al* (85) demonstraram a interação da proteína SRPX2 com o receptor de ativador de plasminogênio uPAR (*urokinase plasminogen activator receptor*), e



descreveram o papel da proteína FOXP2 na regulação da atividade de ambas proteínas, sendo que mutações no gene *FOXP2*, que causam a perda de sua função, estão relacionadas a graves distúrbios de fala e linguagem. O complexo uPAR regula a proteólise extracelular, a ativação das integrinas e sinalização celular. Ainda em 2010, em um trabalho com angiogênese induzida em células endoteliais, Miljkovic-Licina *et al.* (83) detectaram sua expressão em tecido vascular em formação e relacionaram-no à regulação da migração celular e formação de novos vasos. E ainda demonstraram a interação da proteína SRPX2 com a uPAR vascular, durante a angiogênese, a qual atua facilitando a migração de células endoteliais em proliferação. Mais recentemente, Tanaka *et al.* (86) publicaram um novo trabalho demonstrando que a proteína SRPX2 é um proteoglicano, abrindo um novo patamar de possibilidades funcionais para a mesma, inclusive pelo fato de ser secretada, aumentando a adesão de células cultivadas *in vitro*. Em todos os trabalhos citados menciona-se a atuação da proteína *SRPX2* em processos de mobilidade celular, o que remete à fase de migração neuronal durante o desenvolvimento do córtex cerebral.



Figura 68: Representação gráfica da estrutura da proteína SRPX2, modificado de Tanaka *et al.* (86). SP = *signal peptide* (peptídeo sinal)



O estudo de mutações no gene SRPX2 revelou duas alterações:

- a. Um SNP já reportado, o refSNP ID rs1343213;
- b. Uma troca de adenina para citosina, c.1095+8C>A;

O SNP rs1343213 já está descrito em base de dados de SNPs, localiza-se na região 5'UTR e não há nenhum relato de relação com fenótipo anormal ou alteração na expressão ou produto gênico..

A transversão de adenina para citosina g.99922411C>A foi identificada em um indivíduo do sexo masculino com polimicrogiria perisylviana parietal posterior e ocorre na 7^a base do *intron* 9-10. Apesar da proximidade da alteração com o sítio de *splicing*, estudos têm demonstrado que a base presente nessa posição da sequência não apresenta grande relevância para o processo de remoção do *intron* (87, 88). Portanto, a possibilidade de uma relação direta entre tal alteração e o quadro clínico do paciente é muito pequena.

De acordo com a base de dados *Unigene* (82), o *SRPX2* é expresso em diversos tecidos, entre eles a derme, da qual o RNA poderia ser extraído e analisado através de PCR em Tempo Real utilizando sondas específicas e comparando com indivíduos controle. Esse material também poderia ser submetido à análise de western Blot para detecção e quantificação da proteína SRPX2. Estes dois ensaios seriam de grande valia para testar se a alteração influencia nas quantidades de RNA mensageiro e proteína. Outro experimento interessante seria o ensaio da luciferase, que consiste na clonagem da região com a inserção em um vetor para a expressão deste gene, concomitantemente, é também clonada a região selvagem (sem inserção) no mesmo vetor. Em seguida, são comparadas as intensidades de expressão do gene da luciferase, sendo quantificada desta forma a influência de regiões controladoras normais ou com mutações sobre a expressão gênica.



1.2. O gene AFF2:

O gene AFF2/FMR2 localiza-se na região cromossômica Xq28 e seus cinco transcritos produzem cinco diferentes proteínas, a principal delas com 1311 aminoácidos. Sua expressão ocorre predominantemente em sangue, cérebro e linfonodos, além de placenta e tecido embrionário. Ele pertence à família AFF, que reúne o genes AFF1/AF4 (ALL1-fused gene from chromosome 4), AFF2/FMR2 (fragile X mental retardation 2), AFF3/LAF4 (hymphoid nuclear protein related to AF4) e AFF4/AF5q31 (ALL1-fused gene from 5q31), este ultimo também chamado de MCEF (major CDK9 elongation factor-associated protein) (91).

Entre as funções descritas para esse gene consta a regulação da transcrição e de *splicing* alternativo. Uma expansão do codon CCG de cerca de 200 repetições localizada na região 5' não traduzida deste gene é responsável pelo seu silenciamento, que resulta numa forma branda a limítrofe de deficiência intelectual não-sindrômica, o retardo mental FRAXE. Estes dados, junto a resultados de experimentos *in vivo* indicam que a proteína AFF2/FMR2 teria uma função relacionada à plasticidade sináptica (92, 91). Considerando que o correto estabelecimento de conexões sinápticas acertadas é um dos principais eventos durante a fase de organização cortical, o gene *AFF2*, localizado próximo à região candidata identificado por nosso grupo, tornou-se um forte candidato em nossas análises de casos esporádicos.

A triagem de mutações no gene AFF2, apesar de trabalhosa devido à sua extensão, somente revelou duas alterações:

- a) O SNP rs16994895 no intron 15;
- b) A alteração c.2400C>A, no exon 11.

O polimorfismo rs16994895 localiza-se na 42^a base do intron 15, sua descrição na base de dados do NCBI não o relaciona a nenhuma condição patogênica e, considerando a sua distância do exon mais próximo, a probabilidade de essa alteração estar ligada a alguma modificação na expressão do gene ou até ao quadro clínico é muito baixa.



Já a alteração c.2400C>A não é descrita e resulta na troca de uma asparagina por uma lisina. O fato de a alteração ser de sentido trocado (*missense*), ou seja, de resultar em troca de aminoácido, possibilitou sua avaliação utilizando diferentes ferramentas de bioinformática. Tanto as avaliações baseadas em informações evolutivas, como é o caso do SIFT e do Panther, assim como *softwares* que utilizam parâmetros estruturais e funcionais, MutPred, Polyphen 2 e SNPs&GO, indicaram uma possibilidade baixa a média da substituição de aminoácido causar prejuízos à função proteica. A resposta que mais fornece suporte a hipótese patogênica veio da Grantham Scale, que classificou a alteração em "moderadamente radical". Nesse caso, a comparação baseia-se nas características moleculares dos aminoácidos em questão e necessita ser também analisada por ferramentas que levem em conta a estrutura tridimensional da proteína. A mesma alteração está ausente em material genético proveniente de um grupo controle composto de mais de 100 indivíduos, corroborando a hipótese de que tal gene pode ter um papel na etiologia da PMG neste paciente.

1.3. Os genes *SLITRK2* E *SLITRK4*:

As proteínas da família SLITRK são apresentadas, na literatura, como proteínas de membrana que têm como característica a presença de domínios LRR (*leucine rich repeats*) em sua estrutura, pertencendo à superfamília de proteínas LRR (94, 95). Os dois membros dessa família SLITRK2 e SLITRK4 se caracterizam por apresentar dois domínios LRR na região N-terminal, além de uma região C-terminal similar aos receptores de neurotrofina. Ambos os genes localizam-se na região cromossômica Xq27.3. O gene *SLITRK2* é predominantemente expresso no cérebro e no ouvido, enquanto o *SLITRK4* é expresso no cérebro, traqueia e tecido renal.

Estudos funcionais dos membros da família SLITRK indicam sua atuação no processo de modulação da proliferação de neuritos, de sobrevivência neuronal e no estabelecimento de



sinapses. Além disso, diferentes trabalhos têm demonstrado relação dos genes desta família com distúrbios psiquiátricos, sendo o *SLITRK2* associado a casos de esquizofrenia (95).

Apesar dos indicativos funcionais e de localização tornarem estes genes candidatos extremamente interessantes para este estudo, a análise do gene *SLITRK2* identificou apenas SNPs silenciosos e já descritos como não associados a quadro patológicos, como rs2748588 T>C, rs2748589 C>T, rs2748589 T>C e g.144905816T>C. Estes SNPs, por não resultarem em troca do aminoácido traduzido ou alteração de função do *codon*, não possuem potencial patogênico. Em relação ao gene *SLITRK4*, o seqüenciamento pelo método de Sanger apontou que os padrões diferenciados obtidos no DHPLC eram causados por artefatos da técnica, não tendo sido detectadas variantes na sequência nucleotídica.

1.4. Os Genes de Microtúbulo:

Defeitos genéticos que resultam em falhas na fase de migração do desenvolvimento do córtex cerebral são uma das maiores causas de disgenesia cortical e destacam o papel do citoesqueleto neste processo. Reforçando esse aspecto, genes de microtúbulo ou associados a ele têm sido relacionados a causas de malformações corticais. Um destes exemplos é a FLNA, uma proteína que se liga à actina e atua na remodelagem do citoesqueleto, um dos processos intracelulares que promovem sua migração. Mutações no gene da *FLNA* resultam em nódulos de neurônios diferenciados em torno da zona ventricular, uma malformação cortical denominada heterotopia nodular periventricular. Além disso, os genes *DCX* e *LIS1*, cujas funções também estão estreitamente relacionadas a microtúbulos, são associados a distúrbios de migração neuronal. Consequentemente, as subunidades de microtúbulo das famílias de alfa e beta-tubulinas foram estudadas em pacientes com um grande espectro de malformações corticais, tendo mutações identificadas em quadros clínicos que indicam falhas na fase de migração neuronal, inclusive nos casos de polimicrogiria, uma desordem que é geralmente relacionada a falhas na fase de organização. A presença de heterotopia radial colunar na massa



branca, blocos de neurônios heterotópicos em ambos hemisférios e heterotopia cerebelar em um feto com polimicrogiria relacionada ao gene *TUBB2B* apontam para erros de migração neuronal. E considerando que o início da organização neuronal coincide com o final da migração no processo de desenvolvimento cortical, deve-se considerar que alguns quadros de polimicrogiria possam resultar de falhas no processo tardio de migração.

O gene TUBA1A é um dos representantes da família de Alfa-tubulinas, uma das seis famílias que compõem a superfamília Tubulina. Ele está localizado na região cromossômica 12q13, possui quatro *exons* e codifica uma proteína de 451 aminoácidos. Juntamente com as beta-tubulinas, as alfa-tubulinas são os principais componentes do microtúbulo, enquanto as gama-tubulinas tem sua função mais expressiva na concepção destas estruturas. As delta e épsilon-tubulinas não estão presentes em todos os seres eucariotos e as zeta-tubulinas são proteínas exclusivas de protozoários.

As alfa e beta tubulinas formam um dímero que constitui a principal subunidade dos microtúbulos, estando presentes no citoesqueleto de todos os organismos eucariotos e, por isso, são sequências altamente conservadas. Devido à sua atuação em uma estrutura tão essencial como o citoesqueleto, o gene *TUBA1A* é altamente expresso em todos os tecidos do corpo humano.

A triagem de mutações no gene *TUBA1A* identificou cinco alterações sinonímias (tabela 8), ou seja, não resultam em troca de aminoácido no produto proteico, portanto há poucas chances de uma influência destas alterações na proteína. Alterações sinonímias podem originar sítios de *splicing* alternativos, mas esse tipo de evento é extremamente difícil de ser previsto e exige estudos de expressão gênica. No entanto, pelo fato das alterações já terem sido descritas anteriormente, e sem relação com fenótipo alterado, a possibilidade de relação com o quadro clínico de nossos pacientes é remota.





Figura 69. Estrutura de dímero alfa/beta-tubulina, modificado de Nogales et al. (96).

Apesar desses resultados, o histórico recente de genética de malformações corticais tem citado o gene *TUBA1A*, além de outros genes de microtúbulo, com certa frequência (30, 34, 35, 97).

Um segundo representante da família de alfatubulinas, o gene *TUBA8*, localizado na região 22q11, apresenta quatro produtos proteicos, sendo o principal deles uma proteína de 449 aminoácidos (98). Ao contrário do gene *TUBA1A*, o gene *TUBA8* é expresso em poucos tecidos, entre eles cérebro, coração e , principalmente, músculo estriado esquelético (99).

A análise desse gene só identificou uma alteração, uma substituição de uma citosina por uma timina designada como rs2234332 em dois pacientes esporádicos, que não resulta em troca de aminoácido, ou seja, é silenciosa.

O representante da família de proteínas beta-tubulinas gene *TUBB2B* está localizado na região 6p25 do genoma humano e codifica uma proteína de 445 aminoácidos. Nele foi identificada uma única alteração, a deleção rs67130760, encontrada em seis pacientes esporádicos e um paciente de uma pequena família. O SNP localiza-se na porção 3'UTR não-



codificante do exon 6, portanto a possibilidade de tratar-se de uma alteração patogênica é baixa. Além disso, a variante está depositada em banco de dados e está presente em indivíduos normais.

1.5. O gene WDR62:

O gene *WDR62* localiza-se na região cromossômica 19q13, possui 36 *exons* e produz cinco diferentes transcritos que resultam em cinco proteínas de tamanhos que variam entre 414 e 1523 aminoácidos. De acordo com o site UniGene (82), ele é expresso em vários tecidos do corpo humano, mas com destaque para testículos e linfonodos. Apesar dos vários estudos publicados recentemente relacionando esse gene a malformações do córtex cerebral, sua exata função ainda é desconhecida e, devido a esses relatos, cada vez mais se associa o *WDR62* ao processo de desenvolvimento do córtex cerebral. Nos últimos dois anos, seis trabalhos relatam uma relação desse gene com quadros clínicos de microcefalia associada a disfunções cardíacas, retardo mental e outros tipos de malformação cortical (100, 101, 102, 103, 104, 38), o que fez desse gene um alvo interessante para nosso estudo.

A triagem de mutações deste extenso gene revelou 12 alterações já descritas em bases de dados (tabela 9), das quais nove estão localizadas em porções intrônicas, distante dos *exons* e com poucas possibilidades de possuírem caráter patogênico. Uma das alterações é sinonímia, ou seja, não resulta em troca de aminoácido no produto protéico. Duas delas causam troca de aminoácido, o que possibilitou a avaliação *in silico*. E a última alteração ocorre no sítio de *splicing* do *exon* 16, podendo repercutir na expressão de dois dos seus cinco transcritos. No entanto, a presença do alelo em indivíduos normais, como pode ser visualizada na base de dados do NCBI, praticamente exclui o potencial patogênico desta alteração.

A análise *in silico* dos SNPs rs147021603 e rs2074435 foi realizada para todos os transcritos nos quais elas poderiam constar e apontou baixa severidade em todas as trocas de aminoácidos avaliadas. Já a classificação do Grantham Scale apontou uma possibilidade



moderada de prejuízos à proteína. Como já comentado antes, essa classificação baseia-se exclusivamente nas características dos aminácidos em questão, ignorando a estrutura ou função protéica, portanto optou-se por considerar esse resultado apenas quando apoiado pelas outras ferramentas. Além disso, a presença das mesmas em bases de dados do NCBI, descritas em indivíduos normais, diminui em muito a probabilidade de patogenecidade destas variações.

De todas as alterações encontradas nesta triagem de mutações, uma apresentou potencial patogênico e necessita de avaliação mais profunda (tabela 14). Para tal, as próximas ações devem se concentrar em estudos funcionais e de efeitos na expressão do respectivo gene.

Alteração	Gene	Característica	Próximos passos	
			Avaliar presença de	
c.2400C>A	AFF2	Substituição de asparagina por lisina	alteração em pais e irmãos	
			Estudo funcional através de <i>western blot</i>	

Tabela 14: Alteração com maior potencial patogênico identificada neste estudo.

2. ANÁLISE DA REGIÃO Xq27.1-27.3:

No ano de 1977 a revista *Proceedings of the National Academy of Sciences* publicou dois artigos extremamente relevantes para a genômica: em fevereiro daquele ano Allan Maxam e Walter Gilbert relataram um método de sequenciamento de DNA utilizando moléculas marcadas radioativamente e sua separação por eletroforese (105) e, em dezembro do mesmo ano, Frederick Sanger com os colegas Nicklen e Coulson apresentaram seu método de sequenciamento de DNA com dideoxinucleotídeos terminadores de cadeia marcados (75).



Esse último método, menos prejudicial à saúde humana, foi aprimorado e refinado, de forma a disseminar-se entre os vários projetos de genética ao redor do mundo, tornando-se parte importante da pesquisa básica, aplicada e clínica até os dias atuais.

Após um período de 26 anos, em 2003, foi lançado comercialmente o primeiro método de sequenciamento em larga escala, ou *next generation sequencing (NGS)*, como são conhecidas as técnicas de sequenciamento massivo, o processo massivo de sequenciamento paralelo de moléculas de DNA únicas ou amplificadas clonalmente que são separadas espacialmente e, depois alinhadas. Esse aparato tecnológico aumentou em várias grandezas a capacidade de geração de sequencias e diminuiu drasticamente o tempo de obtenção de pacotes de dados do tamanho de um genoma inteiro de um organismo. Como base de comparação, o genoma humano, resultado de um grande consórcio com vários grupos de pesquisa envolvidos, demorou 13 anos para ser enfim obtido. Atualmente, através de apenas um experimento, é possível obter o mesmos montante de informação em cerca de dois ou três dias. Esse avanço revolucionou o campo da genômica, aumentando consideravelmente a eficiência da pesquisa, e trouxe consigo novos desafios para a bioinformática, que agora precisa resolver as questões de armazenamento e análise dessa enorme quantidade de dados produzidos pela biologia molecular (76, 77).

A utilização do sequenciamento em larga escala (NGS), dependendo do objetivo do estudo, pode ser uma estratégia exagerada e resultar em um pacote de informações muito maior do que o necessário para um projeto ou temática. Como solução para essa questão, as técnicas de captura e enriquecimento desenvolveram-se junto à *next generation sequencing technology*, possibilitando selecionar e direcionar o sequenciamento, economizando esforços e facilitando a análise dos resultados. Como uma evolução de técnicas como o PCR *Multiplex* e o PCR *Nested*, que utilizam sequencias iniciadoras diferentes em uma mesma reação para seleção de regiões do genoma, a tecnologia de captura por hibridização faz uso de bibliotecas de RNA e *beads* magnéticas para escolher e preparar as partes do DNA de interesse, que serão então submetidas ao sequenciamento em larga escala. Os kits disponíveis atualmente apresentam-se



em solução ou utilizando *arrays* para a captura do DNA e permitem a seleção de regiões codificantes de todo genoma, o chamado exoma, de cromossomos específicos, microRNAs, entre outras abordagens, desenvolvidas de acordo com a demanda dos pesquisadores. Isso poupa ao geneticista todo o trabalho de pesquisa da região de interesse, desenho e síntese de *primers*, além das múltiplas reações de amplificação, sequenciamento e análise de DNA, tornando o processo mais rápido e econômico (78, 106).

As principais tecnologias de *NGS* presentes no mercado atualmente são a Roche 454[®], Illumina/Solexa[®] e SOLiD[®] da Applied Biosystems. Em um estudo de Harismendy *et al.* (81) é realizada uma comparação entre as três tecnologias, a acurácia na obtenção das sequências e de variantes. A plataforma Illumina obteve os melhores resultados na identificação de SNPs, o que favorece o nosso estudo, que adotou tal plataforma. Outros parâmetros foram avaliados e comparados com a técnica de Sanger e em todos eles as plataformas de *NGS* apresentaram taxas de erro baixas. Um fator considerado extremamente importante e delicado para a qualidade do experimento, que é a cobertura da região não foi responsável pelos erros, os quais foram relacionados principalmente a características das regiões estudadas, como a presença de elementos repetitivos, uma região de homopolímeros maior que seis bases, repetições simples ou a presença de uma deleção maior que 30pb.

A presença de repetições tem sido um dos maiores desafios das técnicas de sequenciamento em larga escala e das ferramentas de análise desenvolvidas para a técnica, principalmente no caso da genética humana, já que cerca de 50% do nosso genoma consiste em repetições (107). As repetições melhor caracterizadas do genoma humano costumam ser separadas em dois grupos: repetições curtas em *tandem* ou microssatélites e repetições longas intercaladas, chamadas de *SINEs* (elementos nucleares curtos intercalados) e *LINEs* (elementos nucleares longos intercalados). A classe de microssatélites é formada por repetições de DNA em *tandem* com extensão de dois a dez pares de base, enquanto minissatélites apresentam de dez a 60pb de comprimento e satélites possuem mais de 100pb. Na figura 95, modificada de Treangen & Salzberg (107), a tabela (a) lista os diferentes tipos de repetições



(*repeat class*), sua quantidade no genoma humano (*number*), a porcentagem do genoma que essa quantidade constitui (*Cvg*) e a faixa de tamanho de cada tipo (*lenght*), enquanto o gráfico (b) ilustra a porcentagem de cada cromossomo que é coberta por cada tipo de repetição. É interessante observar que os cromossomos sexuais apresentam a maior porcentagem total coberta por repetições e, no caso do cromossomo X, destaca-se a repetição do tipo *LINE*.

Para a análise *in silico* de nossos resultados, utilizamos a própria base do Genoscope, que possibilitou ter acesso a parâmetros como a cobertura de cada região lida, além de detectar as alterações identificadas pelas leituras e permitir uma triagem de acordo com suas características. As coberturas das leituras obtidas para cada indivíduo em nosso experimento ficou bem acima dos padrões confiáveis estabelecidos e encontram-se listadas na tabela 13.



Figura 70. Esquema representativo dos parâmetros utilizados para a seleção das alterações identificadas no sequenciamento massal que devem ser avaliadas mais profundamente.



A qualidade dos dados nos possibilitou realizar uma seleção criteriosa das alterações a serem avaliadas mais profundamente, que resultou num total de 15 alterações mais potencialmente patogênicas, pois estão na intersecção entre os grupos de alterações encontradas em todos os indivíduos, estão presentes nos três indivíduos afetados e ausentes no indivíduo não-afetado e não são silenciosas. A análise *in silico* foi realizada apenas para as alterações de substituição de aminoácido e dela saíram as alterações 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 20 e 22 (de acordo com a tabela 5) para validação e avaliação quanto à sua presença nos demais indivíduos afetados da família.

Todas as 22 alterações avaliadas *in silico* encontram-se distribuídas em 13 genes, o que possibilitou a seleção de 15 destas para confirmação nos demais indivíduos da família. Estas 15 variantes estão localizadas em oito genes, no entanto, apenas três deles localizam-se na região candidata alvo: *MAGEC1*, *SPANXC* e *UBE2NL*.

Tabela 15: Dados técnicos do sequenciamento em larga escala para o material genético de cada indivíduo avaliado.

Dado	Taxa confiável	Indivíduo I	Indivíduo II	Indivíduo III	Indivíduo IV
% leituras com					
identificação	>77%	97,6874032	98,2348415	94,2208018	97,7650642
no genoma					
% leituras					
realizadas nas	~100%	99,1363580	99,2471718	99,2112579	99,1584549
duas direções					
Média de	>20	202 252445	150 561 558	156 726397	121 795343
cobertura	- 20	202,232443	130,301330	130,720377	121,79313



a Repeat class	Repeat type	Number (hg19)	Cvg	Length (bp)	
Minisatellite, microsatellite or satellite	Tandem	426,918	3%	2-100	
SINE	Interspersed	1,797,575	15%	100-300	
DNA transposon	Interspersed	463,776	3%	200-2,000	
LTR retrotransposon	Interspersed	718,125	9%	200-5,000	
LINE	Interspersed	1,506,845	21%	500-8,000	
rDNA (16S, 18S, 5.8S and 28S)	Tandem	698	0.01%	2,000-43,000	
Segmental duplications and other classe	s Tandem or interspersed	2,270	0.20%	1,000-100,000	



Figura 71: Lista de tipos de repetições presentes no genoma humano [a] e as porcentagens de cada cromossomo constituídas por tais repetições [b], modificado de Treangen & Salzberg (105).

2.1. O gene MAGEC1:

Nove das 15 alterações selecionadas pela avaliação *in silico* estão concentradas no gene *MAGEC1*, duas delas não haviam sido descritas até então, mas no momento da elaboração desta tese, ambas foram identificadas em bancos de dados de SNP como rs138268726 e rs140075882. Esse gene codifica uma proteína putativa de 1142 aminoácidos, um membro da família de antígenos tumor-específico MAGE. É também conhecido como o antígeno CT7



(108, 109), o qual é predominantemente expresso em células tumorais e vastamente estudado como alvo para vacinas e drogas de combate ao mieloma. A função das proteínas pertencentes a essa família ainda é desconhecida, mas alguns estudos *in vitro* têm encontrado evidências de sua interferência na apoptose mediada por p53, promovendo proliferação celular (110, 111, 112). Ambas as alterações, que até então era inéditas, foram encontradas em estudos de população, em uma taxa de cerca de 6% dos alelos, dos quais apenas 1 a 1,8% são homozigotos. Além destas duas, outras quatro alterações estão descritas na população em baixas frequências, sendo que a maioria destas alterações pouco frequentes apresentou potencial mais deletério na análise *in silico.* Considerando a grande quantidade de alterações encontradas nesse gene e confirmadas para outros indivíduos da família, levantamos a hipótese de uma atuação complexa dos mesmos sobre o quadro clínico apresentado pelos pacientes, ou seja, a "soma" desses SNPs raros levaria a uma proteína MAGEC1 não funcional resultando em PPB para esta família. Para avaliar mais profundamente essa hipótese, seria necessária a genotipagem de controles para busca destes SNPs em nossa população e confirmação estatística da hipótese.

2.2. O gene SPANXC:

Um dos genes localizado na região candidata é o SPANXC, descrito em 1999 por Zendman *et al.* (113) como CTp11, pertencente à família de genes SPANX, cujos estudos de expressão têm indicado sua atuação no processo de desenvolvimento de células do esperma (114). O SPANXC codifica um precursor proteico nuclear de 97 aminoácidos, cuja expressão foi detectada em células de melanoma, preferencialmente as células primárias, sendo, por isso, frequentemente relacionado ao gene MAGEC1 (115). Uma possível função ligada a desenvolvimento e/ou divisão celular tornou esse gene um interessante alvo para nosso estudo, assim como o MAGEC1. Um alinhamento dos genes da família SPANX indica uma grande similaridade entre suas sequências, o que pode ter influenciado os resultados do sequenciamento em larga escala. Ao avaliar os dados técnicos, observamos que a região do



SPANX apresentava algumas falhas de leitura. Para determinar se a alteração mapeada provinha realmente de SPANXC e não de um erro de mapeamento, realizamos a clonagem do mesmo para a separação dos alelos. A análise dos produtos da clonagem mostrou que os indivíduos da família 1, na verdade não possuem a cópia completa do gene SPANXC, estando o mesmo fusionado com parte do SPANXD. Além disso, a análise dos produtos de amplificação demonstrou que a alteração foi devido a um erro de mapeamento, já que a variante GTG pertence ao gene SPANXD, enquanto a variante CTG foi identificada no gene fusionado. É importante salientar que a presença de genes híbridos já foi descrita para a família SPANX, alguns indivíduos chegam até mesmo a não possuir cópias de determinados genes desta família que são substituídos por outros. Esse cenário provavelmente é consequência de duplicações segmentais e recombinações não homólogas, causadas pela grande identidade das sequencias (116, 117, 118). Os indivíduos com ausência de SPANXC descritos na literatura não possuem nenhuma síndrome ou anormalidade neurológica. Esses dados em conjunto com a ausência de expressão do gene SPANXC no sistema nervoso central, tornam o mesmo um candidato pouco provável a estar envolvido com a etiologia da PPB na família 1.

A família de genes SPANX, da qual também faz parte o gene já discutido SPANXC, codifica proteínas de baixo peso molecular, entre 15 – 20KDa. O cluster SPANX, no cromossomo X, é constituído por cinco genes, localizados na região Xq26.3-q27-3, cujas sequências são altamente similares entre si. A subfamília SPANX-N foi identificada em 2004 por Kouprina *et al.* (119) e é composta por quatro genes, altamente conservados, cuja similaridade entre suas sequências varia de 60 a 80%. Estudos de Kouprina *et al.* (116) indicam que os genes SPANX-N são expressos em outros tecidos, além do testicular, incluindo pulmão, próstata, ovário, placenta, útero, tecido mamário e cólon. Individualmente, há pouca informação sobre os membros desta família. O gene SPANXN4 localiza-se na região Xq27.3, ou seja, na região candidata identificado para a família 1 e, de acordo com dados do Ensembl, apresenta dois produtos proteicos. A base de dados UniGene (82) indica sua expressão somente em testículos e em baixa quantidade. Maiores detalhes sobre sua função ou relação a quadros clínicos diferenciados não estão disponíveis na literatura. Sendo assim, apesar de



termos identificado uma leitura diferenciada na região deste gene, a ausência de expressão do mesmo no cérebro e no período de desenvolvimento, torna este gene um candidato improvável como responsável pela etiologia da PPB na família 1.

Esta grande identidade entre os membros da família SPANX e o elevado número de repetições na região candidata ainda suscitou uma hipótese de modificação estrutural, como uma deleção de uma grande área que não seria detectada pela técnica de captura e sequenciamento e que poderia estar presente nos indivíduos sequenciados. No entanto, a análise através de *SNParray* não indicou grandes alterações no cromossomo X dos pacientes, eliminando tal hipótese. De qualquer forma, não podemos descartar a possibilidade de que eventos como translocações equilibradas e inversões estariam associados com a PPB nesta família, já que as mesmas não podem ser detectadas por limitações da técnica CytoScan HD SNP Array.

2.3. O gene UBE2NL:

O gene UBE2NL, assim como o MAGEC1 e o SPANXC, localiza-se na região candidata identificada, mais especificamente na região Xq27.3. Esse gene faz parte da família de enzimas conjugadas a ubiquitina e codifica uma proteína denominada UBE2NL (*Putative ubiquitin-conjugating enzyme E2 N-like*). O perfil de ESTs do UniGene (82) lista, entre os locais de sua expressão, tecidos embrionários e cérebro.

A ubiquitina é uma proteína que participa do processo, altamente conservado em eucariotos, de modificação pós-tradução de outras proteínas. Ela pode ser conjugada a lisinas em um processo denominado ubiquitilação, uma etapa que pode ocorrer quando a ubiquitina está inserida em processos de degradação proteica, reparo de DNA, replicação de DNA, sinalização do sistema imune, regulação de ciclo celular e divisão. A atuação da ubiquitina se dá através de uma cascata de reações e as enzimas do tipo E2, como é o caso da UE2NL, agem na



etapa intermediária dessa cascata, entregando a ubiquitina ativada ao substrato. Uma falha nesse processo pode resultar no desenvolvimento de doenças inflamatórias, dificuldade de resposta à hipoxia, câncer e desordens neurodegenerativas (120, 121). Recentemente, uma proteína da família das hidroxilases de ubiquitina foi relacionada a quadros de disfunção sináptica e perda de memória (122). Essas evidências de ligação entre as ubiquitinas e as funções de sinapse e ciclo celular tornam o gene *UBE2NL* um candidato interessante à nossa análise, considerando que a mutação encontrada interrompe a tradução da proteína de 153 aminoácidos na posição 89, ou seja, prejudica completamente a função da proteína por impedir a formação de seu sítio de ação.

A alteração que encontramos no *UBE2NL* cria um *codon* de parada prematuro no gene. No entanto, uma pesquisa mais detalhada em bases de dados de SNPs do NCBI (72), mostra que este alelo que leva a produção de um *codon* de parada tem ampla distribuição populacional, inclusive sendo o alelo mais frequente em algumas populações testadas. A presença desta variante em um grande número de amostras de indivíduos normais praticamente exclui o gene *UBE2NL* como responsável pela etiologia de PPB na família 1.

A triagem de mutações em pacientes esporádicos e pequenas famílias explorou genes presentes na literatura de polimicrogirias e malformações do córtex cerebral, identificando uma alteração, no gene *AFF2*, com potencial patogênico a ser mais bem investigado. O próximo passo seria a coleta e análise de material genético de pais e irmãos destes pacientes, para testar a possibilidade de herança das alterações, assim como estudos funcionais seriam propícios para a análise de suas consequências moleculares. Já a análise da região candidata Xq27.1-27.3, através do sequenciamento de todo o cromossomo X, elencou genes e regiões candidatas, através da identificação de SNPs e da cobertura da leitura das regiões cromossômicas. Os SNPs foram avaliados por algoritmos disponíveis *in silico* e confirmados através de sequenciamento pelo método de Sanger, além de terem sido mapeados para os demais indivíduos da família, afetados ou não. A análise destes resultados, junto às informações disponíveis nos bancos de dados de SNPs sugere que essas variantes identificadas, principalmente no gene *MAGEC1*,



possuem potencial patogênico, mas estudos funcionais, como observação de fenótipo celular ou animal ou estudos de mutação sítio-dirigida, devem ser realizados para corroborar tal hipótese.



VI. conclusão





Em 2008, nosso grupo de pesquisa publicou um trabalho apontando a região cromossômica Xq27.1-27.3 como possível portadora da alteração responsável pelo quadro de polimicrogiria perisylviana bilateral em uma família avaliada no Ambulatório de Neurologia do Hospital das Clínicas da Unicamp (68). Dando prosseguimento a esse trabalho, esta tese teve como objetivo avaliar a região candidata descrita, utilizando a técnica de sequenciamento massivo do cromossomo X, em busca de evidências para a causa genética dessa malformação cortical. Para este objetivo, as conclusões foram as seguintes:

- Foram encontradas alterações potencialmente deletérias em genes candidatos localizados na região candidata Xq27.1-27.3 para polimicrogiria perisylviana bilateral familial, principalmente no gene *MAGEC1*.
- Não encontramos evidências de alteração estrutural submicroscópica desbalanceada nos pacientes com polimicrogiria perisylviana bilateral ligada ao cromossomo X da família 1 avaliados;

Adicionalmente, esta tese se propôs a avaliar genes candidatos em pacientes esporádicos através de triagem de mutações. Essa parte do estudo utilizou diferentes técnicas, acompanhando a evolução das tecnologias desenvolvidas. As conclusões referentes a esta etapa são as seguintes:

- Não foram encontradas evidências do envolvimento dos genes TUBA1A, TUBA8, TUBB2B, SLITRK2, SLITRK4 e WDR62 no fenótipo de polimicrogiria nos pacientes avaliados neste estudo;
- Uma alteração com potencial patogênico foi identificada no gene AFF2.



Dessa forma, as recomendações para os próximos passos são:

- Avaliar as regiões não-codificantes dos genes e da região candidata;
- Avaliação da alteração no gene AFF2, através da coleta e análise de material genético de pais e irmãos do paciente no qual a alteração foi encontrada, além de estudos funcionais;
- Genotipagem de controles, mapeamento da família I e análise estatística para alterações identificadas no gene *MAGEC1;*
- Estudos funcionais de alterações identificadas no sequenciamento massivo da família I, como observação de fenótipo celular ou animal ou estudos de mutação sítio-dirigida;
- Triagem de mutações em novos genes candidatos, como, por exemplo, o gene FOXP2.


VII. referências





- 1. Bentivoglio M, Tassi L, Pech E, Costa C, Fabene PF, Spreafico R. Cortical development and focal cortical dysplasia. Epileptic Disord 2003; 5 (Suppl 2): S 27–S 34
- Cajal SR Coloracion por el método de Golgi de los centros nerviosos de los embriones de pollo. Gaceta Médica Catalana 1889; 12: 6-8
- Tungel, C. Ein Fall von Neubildung grauer Hirnssubstanz. Virchous Arch. Pathol. Anat. 1859; 16, 166–168.
- 4. Virchow, R. Zur Pathologischen Anatomie des Gehirns. II. Heterotopie des grauen Hirnsubstanz.Arch. Pathol. Anat. 1867; 38, 138–142.
- 5. Alzheimer, A. Die Gruppierung der Epilepsie. Allg. Z. Psychiatri. 1907; 64, 418–421.
- Barkovich, A.J. Magnetic resonance imaging: role in the understanding of cerebral malformations. Brain Dev. 2002; 24: 2–12.
- Beghi E. The concept of the epilepsy syndrome: How useful is it in clinical practice?. Epilepsia 2009; 50(Suppl. 5): 4–10.
- Banerjee PN, Filippi D, Hauser WA. The descriptive epidemiology of epilepsy-a review. Epilepsy Res. 2009; 85(1): 31–45
- 9. Guerrini R, Andermann F, Canapicchi R, Roger J, Zifkin BG and Pfanner P. Dysplasias of cerebral córtex and epilepsy, Philadelphia, New York, Lippincott-Raven, 1996, p461.
- Sisodiya, S.M. Surgery for malformations of cortical development causing epilepsy. Brain 2000; 123: 1075–1091.
- des Portes, V., Abaoub, L., Joannard, A., Souville, I., Francis, F., Pinard, J.M., *et al.* Socalled 'cryptogenic' partial seizures resulting from a subtle cortical dysgenesis due to a doublecortin gene mutation. Seizure 2002; 11: 273–277.
- Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, *et al.* Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. Epilepsia 2010; 51(4):676–685.
- World Health Organization website [homepage on the internet]: Organização Mundial da Saúde 2012. Available on: www.who.int.



- Francis F, Meyer G, Fallet-Bianco C, Moreno S, Kappeler C, Socorro AC, et al. Human disorders of cortical development: from past to present. European Journal of Neuroscience, 2006; 23: 877–893.
- Guerrini R, Dobyns WB, Barkovich AJ. Abnormal development of the human cerebral cortex: genetics, functional consequences and treatment options. Trends in Neurosciences 2008; 31 (3): 154-162.
- Squier W, Jansen A. Abnormal development of the human cerebral cortex. J. Anat. 2010; 217: 312–323.
- Manzini MC, Walsh CA. What disorders of cortical development tell us about the cortex: one plus one does not always make two. Current Opinion in Genetics & Development 2011; 21:333–339.
- 18. Angevine JB, Sidman, RL. Autoradiographic study of the cell migration during histogenesis of the cerebral cortex in the mouse. *Nature* 1961; 192: 766-768
- Gupta A, Tsai L, Wynshaw-Boris A. Life is a Journey: a Genetic Look at Neocortical Development.Nature Reviews. 2002; 2: 342-355
- Kanekar S, Gent M. Malformations of Cortical Development. Semin Ultrasound CT MRI 2011; 32:211-227.
- 21. Sansom SN, Livesey FJ. Gradients in the Brain: The Control of the Development of Form and Function in the Cerebral Cortex. Cold Spring Harb Perspect Biol 2009; 1:a002519.
- 22. Kuzniecky R, Murro A, King D, Morawetz R, Smith J, Powers R, et al. Magnetic resonance imaging in chidhood intractable partial epilepsies: pathologic correlations. Neurology 1993; 43: 681-697
- Semah F, Picot MC, Adam C, Broglin D, Arzimanoglou A, Bazin B, et al. Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence?; *Neurology* 1998; 51: 1256-126.
- Barkovich AJ, Guerrini R, Kuzniecky RI, Jackson GD, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. Brain 2012; doi:10.1093/brain/aws019.



- Hehr U, Schuierer G. Genetic Assessment of Cortical Malformations. Neuropediatrics 2011; 42: 43–50.
- 26. Guerrini R, Dobyns WB, Barkovich AJ. Abnormal development of the human cerebral cortex: genetics, functional consequences and treatment options. Trends in Neurosciences. 2008; 31(3): 154-162
- Jaglin XH, Poirier K, Saillour Y, Buhler E, Tian G, Bahi-Buisson N. Mutations in the beta-tubulin gene TUBB2B result in asymmetrical polymicrogyria. Nat Genet. 2009; 41(6):746-52.
- Guerrini R, Mei D, Cordelli DM, Pucatti D, Franzoni E, Parrini E. Symmetric polymicrogyria and pachygyria associated with TUBB2B gene mutations. European Journal of Human Genetics 2012; doi:10.1038/ejhg.2012.21.
- 29. Abdollahi MR, Morrison E, Sirey T, Molnar Z, Hayward BE, Carr IM, Springell K, Woods CG, Ahmed M, Hattingh L, Corry P, Pilz DT, Stoodley N, Crow Y, Taylor GR, Bonthron DT, Sheridan E. Mutation of the variant alpha-tubulin TUBA8 results in polymicrogyria with optic nerve hypoplasia. Am J Hum Genet. 2009; 85(5):737-44.
- 30. Poirier K, Keays DA, Francis F, Saillour Y, Bahi N, Manouvrier S, *et al*. Large spectrum of lissencephaly and pachygyria phenotypes resulting from de novo missense mutations in tubulin alpha 1A (TUBA1A). Hum Mutat. 2007; 28(11):1055-64
- 31. Fallet-Bianco C, Loeuillet L, Poirier K, Loget P, Chapon F, Pasquier L, *et al.* Neuropathological phenotype of a distinct form of lissencephaly associated with mutations in TUBA1A; Brain. 2008;131(Pt 9):2304-20
- 32. Lecourtois M, Poirier K, Friocourt G, Jaglin X, Goldenberg A, Saugier-Veber P, *et al.* Human lissencephaly with cerebellar hypoplasia due to mutations in TUBA1A: expansion of the foetal neuropathological phenotype; Acta Neuropathol 2010; 119(6):779-89.
- 33. Bahi-Buisson N, Poirier K, Boddaert N, Saillour Y, Castelnau L, Philip N, et al. Refinement of cortical dysgeneses spectrum associated with_TUBA1A_mutations.; J Med Genet. 2008 Oct;45(10):647-53.



- 34. Kumar RA, Pilz DT, Babatz TD, Cushion TD, Harvey K, Topf M. TUBA1A mutations cause wide spectrum lissencephaly (smooth brain) and suggest that multiple neuronal migration pathways converge on alpha tubulins. Hum Mol Genet. 2010;19(14):2817-27.
- 35. Jansen AC, Oostra A, Desprechins B, De Vlaeminck Y, Verhelst, H, Regal L, Verloo P, Bockaert N, Keymolen K, Seneca S, De Meirleir L, Lissens W. TUBA1A mutations: From isolated lissencephaly to familial polymicrogyria. Neurology 2011; 76: 988-992
- 36. Bilgüvar K, Oztürk AK, Louvi A, Kwan KY, Choi M, Tatli B, *et al.* Whole-exome sequencing identifies recessive WDR62 mutations in severe brain malformations. Nature. 2010;467(7312):207-10
- 37. Murdock DR, Clark GD, Bainbridge MN, Newsham I, Wu YQ, Muzny DM, et al. Wholeexome sequencing identifies compound heterozygous mutations in WDR62 in siblings with recurrent polymicrogyria. Am J Med Genet A. 2011; 155(9):2071-7.
- 38. Bhat V, Girimaji S, Mohan G, Arvinda H, Singhmar P, Duvvari M, et al. Mutations in WDR62, encoding a centrosomal and nuclear protein, in Indian primary microcephaly families with cortical malformations. Clin Genet. 2011 80 (6): 532-540.
- Mavili E, Coskun A, Per H, Donmez H, Kumandas S, Yikilmaz A. Polymicrogyria: correlation of magnetic resonance imaging and clinical findings. Childs Nerv Syst. 2012; DOI: 10.1007/s00381-012-1703-2.
- Guerrini R, Carrozzo R. Epilepsy and genetic malformations of the cerebral cortex. *Am J Med Genet.* 2001;106(2):160-73. Review.
- Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Jackson GD, Guerrini R, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. Neurology. 2005; 65(12):1873-87.
- 42. Piao X, Hill RS, Bodell A, Chang BS, Basel-Vanagaite L, Straussberg R, et al; G protein-coupled receptor-dependent development of human frontal cortex. *Science* 2004; 303:2033-6.
- Kanekar S, Gent M.; Malformations of cortical development; Semin Ultrasound CT MR. 2011; 32(3):211-27.



- Wieck G, Leventer RJ, Squier WM, Jansen A, Andermann E, Dubeau F, *et al.* Periventricular nodular heterotopia with overlying polymicrogyria. *Brain.* 2005; 128 (12):2811-21.
- 45. Kuzniecky RI, Barkovich AJ.; Pathogenesis and pathology of focal malformations of cortical development and epilepsy. *J Clin Neurophysiol.* 1996 Nov;13(6):468-80. Review.
- Guerrini R, Marini C. Genetic malformations of cortical development. *Exp Brain Res.* 2006; 173(2):322-33. Epub 2006 May 25. Review.
- 47. Takano T. Seizure susceptibility in polymicrogyria: Clinical and experimental approaches. Epilepsy Res. (2011), doi: 10.1016/j.eplepsyres.2011.06.010.
- 48. Sisodiya SM. Malformations of cortical development: burdens and insights from important causes of human epilepsy. Neurology 2004; 3: 29-38.
- Takanashi J, Barkovich AJ. The Changing MR Imaging Appearance of Polymicrogyria: A Consequence of Myelination. Am J Neuroradiol 2003; 24:788–793.
- 50. Kuzniecky R, Andermann F, Guerrini R. Congenital bilateral perisylvian syndrome: study of 31 patients. The CBPS Multicenter Collaborative Study. Lancet 1993; 341: 608-612.
- 51. Guerrini R, Dravet C, Raybaud C, Roger J, Bureau M, Battaglia A, Livet MO, Gambarelli D, Robain O. Epilepsy and focal gyral anomalies detected by MRI: electroclinico-morphological correlations and follow-up. Dev Med Child Neurol. 1992;34(8):706-18.
- 52. Roll P, Rudolf G, Pereira S, Royer B, Scheffer IE, Massacrier A, *et al.* SRPX2 mutations in disorders of language cortex and cognition. *Hum Mol Genet.* 2006; 15(7):1195-207.
- 53. Glaser T, Jepeal L, Edwards JG, Young SR, Favor J, Maas RL. PAX6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. Nat. Genet. 1994; 7: 463–471.
- 54. Baala L, Briault S, Etchevers HC, Laumonnier F, Natiq A, Amiel J, *et al.* Homozygous silencing of T-box transcription factor EOMES leads to microceph aly with polymicrogyria and corpus callosum agenesis. Nat. Genet. 2007; 39: 454–456.



- 55. Brooks AS, Bertoli-Avella AM, Burzynski GM, Breedveld GJ, Osinga J, Boven LG, et al. Homozygous nonsense muta tions in KIAA1279 are associated with malformations of the central and enteric nervous systems. Am. J. Hum. Genet.2005; 77: 120–126.
- Aligianis IA, Johnson CA, Gissen P, Chen D, Hampshire D, Hoffmann K, *et al.* Mutations of the catalytic subunit of RAB3GAP cause Warbu rg Microsyndrom e. Nat. Genet . 2005; 37: 221–223.
- 57. Sertié AL, Sossi V, Camargo AA, Zatz M, Brahe C, Passos-Bueno MR. Collagen XVIII, containing an endogenous inhibitor of angiogene sis and tumor growth, plays a critical role in the maintenance of retinal structure and in neural tube closure (Knobloch syndrome).Hum. Mol. Genet. 2000; 9: 2051–2058.
- Jansen A, Andermann E; Genetics of polymicrogyria syndromes; Journal of Medical Genetics 2005; 42(5):369-78. Review.
- 59. Andermann & Andermann, 1996
- 60. Borgatti R, Triulzi F, Zucca C, Piccinelli P, Balottin U, Carrozzo R, et al. Bilateral perisylvian polymicrogyria in three generations. Neurology 1999;52:1910-1913.
- Guerreiro MM, Andermann E, Guerrini R, Dobyns WB, Kuzniecky R, Silver K, *et al.* Familial perisylvian polymicrogyria: a new familial syndrome of cortical maldevelopment. *Ann Neurol* 2000; 48:39-48.
- 62. Villard L, Nguyen K, Cardoso C, Martin CL, Weiss AM, Sifry-Platt M, et al . A locus for bilateral perisylvian polymicrogyria maps to Xq2.8. Am.J.Genet 2002; 70:1003-1008.
- 63. Piao X, Basel-Vanagaite L, Straussberg R, Grant EP, Pugh EW, Doheny K, et al. An Autosomal recessive form of bilateral frontoparietal polymicrogyria maps to chromosome 16q12.2-21. Am. J. Hum. Genet 2002; 70:1028-1033.
- 64. Chang BS, Piao X, Bodell A, Basel-Vanagaite L, Straussberg R, Dobyns WB, et al. Bilateral frontoparietal polymicrogyria: Clinical and radiological features in 10 families with linkage to chromosome 16. *Ann Neurol* 2003; 53:596-606.



- 65. Robin NH, Taylor CJ, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Bingham P, Collins KJ, et al. Polymicrogyria and deletion 22q11.2 syndrome: window to the etiology of a common cortical malformation. Am.J Med Genet A. 2006;140(22):2416-25.
- 66. Houseweart MK, Pennacchio LA, Vilaythong A, Peters C, Noebels JL, Myers RM. Cathepsin B but not cathepsins L or S contributes to the pathogenesis of Unverricht-Lundborg progressive myoclonus epilepsy (EPM1). J Neurobiol. 2003; 56(4):315-27.
- 67. Cantagrel V, Lossi AM, Lisgo S, Missirian C, Borges A, Philip N, *et al.* Truncation of NHEJ1 in a patient with polymicrogyria. *Hum Mutat.* 2006;28(4):356-364.
- Santos NF, Secolin R, Brandão-Almeida IL, Silva MS, Torres FR, Tsuneda SS, *et al*. A new candidate locus for bilateral perisylvian polymicrogyria mapped on chromosome Xq27. *Am J Med Genet A*. 2008; 146(9):1151-7.
- 69. Brandão-Almeida IL, Guerreiro MM, Santos NF, Guimarães CA, Hage SR, Cendes F, *et al.* Familial congenital bilateral perisylvian syndrome: clinical spectrum and neuroimaging findings. *Am J Hum Genet* . 2003; 73:273.
- 70. Jaglin XH and Chelly J; Tubulin-related cortical dysgeneses: microtubule dysfunction underlying neuronal migration defects. Trends in Genetics 2009; 25 (12): 555-566.
- 71. Francis F, Meyer G, Fallet-Bianco C, Moreno S, Kappeler C, Socorro AC, *et al*. Human disorders of cortical development: from past to present.; Eur J Neurosci. 2006; 23(4):877-93. Review.
- 72. NCBI. [homepage on the internet]: National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, available from <u>www.ncbi.nlm.nih.gov</u>.
- 73. Flynn GA, Hirst MC, Knight SJ, Macpherson JN, Barber JC, Flannery AV, et al. Identification of the FRAXE fragile site in two families ascertained for X linked mental retardation; J Med Genet. 1993 ;30(2):97-100.
- 74. Flynn GA, Hirst MC, Knight SJ, Macpherson JN, Barber JC, Flannery AV, et al. Identification of the FRAXE fragile site in two families ascertained for X linked mental retardation; J Med Genet. 1993 ;30(2):97-100.



- 75. Sanger F, Nicklens S, Coulson AR. DNA Sequencing with Chain Terminator Inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1977; 74 (12): 5463-5467.
- Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics. Clinical Chemistry. 2009; 55 (4): 641-658.
- Metzker ML. Sequencing Technologies the next generation. Nature Reviews Genetics 2010; 11: 31-46.
- 78. Mertes F, El Sharawy A,Sauer S, van Helvoort JMLM,van der Zaag PJ, Franke A, *et al.* Targeted enrichment of genomic DNA regions for next-generation sequencing. Briefing in Functional Genomics. 2011; 10 (6): 374-386.
- Thusberg J, Olatubosu AI, Vihinen M. Performance of Mutation Pathogenicity Prediction Methods on Missense Variants. Human Mutation 2011; (32), No. 4, 358 – 368.
- Grantham R. Amino Acid Difference Formula to Help Explain Protein Evolution. Science 1974; 185: 862-864.
- Harismendy O, Ng PC, Strausberg RL, Wang X, Stockwell TB, Beeson KY *et al.* Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies. Genome Biology 2009; 10:R32 (doi:10.1186/gb-2009-10-3-r32)
- 82. Unigene [database on the Internet]: National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Available from: <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene/</u>
- Miljkovic-Licina M, Hammel P, Garrido-Urbani S, Bradfield PF, Szepetowski P, Imhof BA. Sushi repeat protein X-linked 2, a novel mediator of angiogenesis. The FASEB Journal 2009; 23: 4105-4116.
- Tanaka K, Arao T, Maegawa M, Matsumoto K, Kaneda H, Kudo K, *et al.* SRPX2 is overexpressed in gastric cancer and promotes cellular migration and adhesion. Int. J. Cancer 2009; 124: 1072–1080.
- 85. Roll P, Vernes SC, Bruneau N, Cillario J, Ponsole-Lenfant M, Massacrier A, et al. Molecular networks implicated in speech-related disorders: FOXP2 regulates the SRPX2/uPAR complex. Human Molecular Genetics, 2010; 19 (24): 4848–4860.



- 86. Tanaka k, Arao T, Tamura D, Aomatsu K, Furuta K, MatsumotoK, *et al.* SRPX2 Is a Novel Chondroitin Sulfate Proteoglycan That Is Overexpressed in Gastrointestinal Cancer. 2012; PLoS ONE 7(1): e27922. doi:10.1371/journal.pone.0027922.
- Hertel KJ. Combinatorial Control of Exon Recognition. J Biol Chem 2008; 283 (3): 1211-1215.
- Shepard PJ, Choi E, Busch A, Hertel KJ. Efficient internal exon recognition depends on near equal contributions from the 3' and 5' splice sites. Nucleic Acids Research, 2011; 39 (20): 8928–8937
- 89. Signori E, Bagni C, Papa S, Primerano B, Rinaldi M, Amaldi F, et al. A somatic mutation in the 5'UTR of BRCA1 gene in sporadic breast cancer causes down-modulation of translation efficiency. Oncogene. 2001; 20(33):4596-600.]
- 90. Pippucci T, Savoia A, Perrotta S, Pujol-Moix N, Noris P, Castegnaro G, et al. Mutations in the 5' UTR of ANKRD26, the ankirin repeat domain 26 gene, cause an autosomaldominant form of inherited thrombocytopenia, THC2. Am J Hum Genet. 2011; 88(1):115-20.
- 91. Melko M, Douguet D, Bensaid M, Zongaro S, Verheggen C, Gecz J, et al. Functional characterization of the AFF (AF4/FMR2) family of RNA-binding proteins: insights into the molecular pathology of FRAXE intellectual disability. Human Molecular Genetics. 2011; 20 (10) 1873–1885.
- 92. Gecz J, Gedeon AK, Sutherland GR, Mulley JC. Identification of the gene FMR2, associated with FRAXE mental retardation. Nat Genet. 1996;13(1):105-8.
- 93. Aruga J, Yokota N, Mikoshiba K. Human SLITRK family genes: genomic organization and expression profiling in normal brain and brain tumor tissue Gene. 2003 Oct 2;315:87-94.
- 94. Aruga J, Mikoshiba K. Identification and characterization of Slitrk, a novel neuronal transmembrane protein family controlling neurite outgrowth. Mol Cell Neurosci. 2003 Sep;24(1):117-29.



- 95. Proenca CC, Gao KP, Shmelkov SV, Rafii S, Lee FS. Slitrks as emerging candidate genes involved in neuropsychiatric disorders. Trends Neurosci. 2011; 34(3): 143–153.
- Nogales E, Wolf SG, Downing KH. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* (1998) 391 p.199.
- 97. Morris-Rosendahl DJ, Najm J, Lachmeijer AM, Sztriha L, Martins M, Kuechler A, et al. Refining the phenotype of alpha-1a Tubulin (TUBA1A) mutation in patients with classical lissencephaly; Clin Genet 2008; 74(5):425-33.
- 98. Ensembl [homepage on the internet]: Ensembl release 67 May 2012. Available from: www.ensembl.org.
- 99. Stanchi F, Corso V, Scannapieco P, Ievolella C, Negrisolo E, Tiso N, et al. TUBA8: A new tissue-specific isoform of alpha-tubulin that is highly conserved in human and mouse.; Biochem Biophys Res Commun. 2000; 270(3):1111-8.
- 100. Yu TW, Mochida GH, Tischfield DJ, Sgaier SK, Flores-Sarnat L, Sergi CM, et al. Mutations in WDR62, encoding a centrosome-associated protein, cause microcephaly with simplified gyri and abnormal cortical architecture. Nat Genet. 2010; 42(11): 1015–1020
- 101. Nicholas AK, Khurshid M, Désir J, Carvalho OP, Cox JJ, Thornton G, *et al.* WDR62 is associated with the spindle pole and is mutated in human microcephaly. Nat Genet. 2010; 42 (11): 1010-1014.
- 102. Zaki MS, Salam GMHA, Saleem SN, Dobyns WB, Issa MY, Sattar S. New Recessive Syndrome of Microcephaly, Cerebellar Hypoplasia, and Congenital Heart Conduction Defect. Am J Med Genet Part A. 2011; 155: 3035 – 3041
- 103. Kousar R, Hassan MJ, Khan B, Basit S, Mahmoo S, Mir A, et al. Mutations inWDR62 gene in Pakistani families with autosomal recessive primary microcephaly. Neurology 2011; 11:119-125.
- 104. Bacino CA, Arriola LA, Wiszniewska J, Bonnen PE. WDR62 Missense Mutation in a Consanguineous Family With Primary Microcephaly. Am J Med Genet Part A. 2012; 158A: 622–625



- Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977; 74(2): 560-564.
- 106. Tewhey R, Nakano M, Wang X, Pabón-Peña C, Novak B, Giuffre A, et al. Enrichment of sequencing targets from the human genome by solution hybridization. Genome Biology 2009; 10: R116 (doi:10.1186/gb-2009-10-10-r116)
- 107. Treangen TJ, Salzberg SL. Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. Nature Reviews Genetics. 2012; 13: 36-46.
- 108. Chen YT, Güre AO, Tsang S, Stockert E, Jäger E, Knuth A, *et al.* Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(12):6919-23.
- 109. Lucas S, De Smet C, Arden KC, Viars CS, Lethé B, Lurquin C, *et al.* Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis. Cancer Res 1998; 58(4):743-52.
- 110. Yang B, O'Herrin SM, Wu J, Reagan-Shaw S, Ma Y, et al. MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines. Cancer Res 2007; 67: 9954–9962.
- 111. Monte M, Simonatto M, Peche LY, Bublik DR, Gobessi S, et al. MAGEA tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103: 11160–11165.
- 112. Atanackovic D, Hildebrandt Y, Jadczak A, Cao Y, Luetkens T, Meyer S, et al. (2010) Cancer-testis antigens MAGE-C1/CT7 and MAGE-A3 promote the survival of multiple myeloma cells. Haematologica 95: 785–793.
- 113. Zendman AJ, Cornelissen IM, Weidle UH, Ruiter DJ, van Muijen GN.; CTp11, a novel member of the family of human cancer/testis antigens; Cancer Res. 1999; 59(24):6223-9.
- 114. Hansen S, Eichler EE, Fullerton SM, Carrell D. SPANX gene variation in fertile and infertile males. Syst Biol Reprod Med. 2010; 55:18-26.



- 115. Zendman AJ, Zschocke J, van Kraats AA, de Wit NJ, Kurpisz M, Weidle UH, *et al.* The human SPANX multigene family: genomic organization, alignment and expression in male germ cells and tumor cell lines. Gene. 2003;309(2):125-33.
- 116. Kouprina N, Noskov VN, Pavlicek A, Collins NK, Bortz PDS, Ottolenghi C, et al. Evolutionary Diversification of SPANX-N Sperm Protein Gene Structure and Expression. PLoS ONE 2007; 2(4): e359. doi:10.1371/journal.pone.0000359
- 117. Kouprina N, Noskov VN, Solomon G, Otstot J, Isaacs W, Xu J, et al. Mutational Analysis of SPANX Genes in Families With X-Linked Prostate Cancer. The Prostate. 2007; 67: 820-828.
- 118. Kouprina N, Pavlicek A, Noskov VN, Solomon G, Otstot J, Isaacs W, *et al.* Dynamic structure of the SPANX gene cluster mapped to the prostate cancer susceptibility locus HPCXat Xq27. Genome Res. 2005; 15: 1477-1486.
- 119. Kouprina N, Mullokandov M, Rogozin IB, Collins NK, Solomon G, Otstot J, *et al.* The SPANX gene family of cancertestis-specific antigens: Rapid evolution and amplification in African great apes and hominids. PNAS 2004; 101 (9): 3077-3082.
- Schwartz AL, Ciechanover A. Targeting Proteins for Destruction by the Ubiquitin System: Implications for Human Pathobiology. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2009; 49: 73-96
- 121. Wagner SA, Beli P, Weinert BT, Nielsen ML, Cox J, Mann M, et al. A Proteome-wide, Quantitative Survey of In Vivo Ubiquitylation Sites Reveals Widespread Regulatory Roles. Molecular & Cellular Proteomics 2011; 10: 10.1074/mcp.M111.013284, 1–13
- 122. Gong B, Cao Z, Zheng P, Vitolo O, Liu S, et al. Ubiquitin hydrolase UchL-1 rescuesβamyloid-induced decreases in synaptic function and contextual memory. Cell 2006; 126: 775–88.



VIII.

ANEXOS





Listas de sequências iniciadoras (*primers*) para as reações de amplificação de DNA por PCR

Tabela 16: Sequências de *primers* e respectivas temperaturas de anelamento estabelecidas para a amplificação dos exons do gene *SRPX2*.

NOME	SEQÜÊNCIA	T.A. (°C)
SRPX2_1F	GCT TAA GCC AGC CTC TGT GT	56.0
SRPX2_1R	TGG GTC TCC TTA TCC CCT TC	50,0
SRPX2_2F	GGG AGG AAA AGG GAC CAT AA	
SRPX2_2R	AGT CTA ACT CTT CCT TCT CCA AGT C	57,4
SRPX2_3F	AGT TGG ATG AGA GGG GGA AG	ГСГ
SRPX2_3R	AAT CAC AGC CCC TGA TTC C	50,5
SRPX2_4F	TGT CTT TTC ACC AAC ACC ACA	F7 F
SRPX2_4R	TCC GGG CAT ATA CCC TCA G	57,5
SRPX2_5F	TCT GAT GTT TCT CCC TGT GCT	F7 0
SRPX2_5R	GGA ATG CCT TCT GTG GTG AG	57,0
SRPX2_6-7F	GTG TGT GGC ATT GCT TCA GT	F7 F
SRPX2_6-7R	GGT GGG TCA GGG TAG AGC AG	57,5
SRPX2_8F	GCA CCC TCT TAG CCT TTC CT	F8 0
SRPX2_8R	CCT GTC CAT GAG GAA GAT CC	58,0
SRPX2_9F	ATG GGA GAA ACA GCC AGA GA	
SRPX2_9R	TGC TGC AGA GAA CAA CTC TGA	57,4
SRPX2_10F	CCT TTC CCA CAC TGC TTC AT	F8 0
SRPX2_10R	AAG TTT GGC AGC CTC CCA	58,0
SRPX2_11F	GTA GAG CCT GTG GGG ATG G	F4 0
SRPX2_11R	TGT CAA ACT CAC CCA CCT CA	54,0



Tabela 17: Sequências de *primers* e respectivas temperaturas de anelamento para a amplificação dos exons do gene *AFF2*.

NOME			S	EQÜ	ÊNCI	Α			T.A. (°C)
AFF2 1F	TGT	ATG	TCC	TGC	CAT	ATC	CTT	G	61 5
AFF2 1R	TGC	TGC	TCT	CAT	GAT	TGT	GAG	G	01,5
AFF2 2F	TTT	GCT	TTA	CTT	GCT	TGT	CAT	G	55.0
AFF2 2R	GCA	GTT	GCC	TCA	AAT	ACA	GTG		55,0
AFF2 3.1F	TTA	ATC	ATA	CCC	GCT	CAT	TCC		52.5
AFF2 3.1R	TTC	CTT	TGC	AGA	TGG	GTT	ΤG		53,5
AFF2 3.2F	TGC	AAA	GGA	AGA	CAG	TAA	CCC		58.0
AFF2 3.2R	GAG	AGC	TGC	TTG	TGA	ATA	CTG	G	58,0
AFF2 4F	CAA	AGA	TGC	CTT	AAA	GAT	CAC	G	52 /
AFF2 4R	ACC	CGC	AAG	ATT	TCT	TCA	AC		55,4
AFF2 5F	TCA	CTG	GCA	GTT	TGC	AAG	CAT	С	58.2
AFF2 5R	TTG	CCA	CTG	AGA	ATC	CAG	TTG	G	56,2
AFF2 6_7F	CCT	TAT	AGG	AAT	CGC	AGC	ATC		56.0
AFF2 6_7R	ACA	ATG	GGA	AAT	TTG	ATT	CTC	С	50,0
AFF2 8F	TTC	ATG	GGA	AAC	TCT	GAG	CAC	С	61.0
AFF2 8R	AAA	GCC	ATT	CCA	GTT	CCT	CCT	G	01,0
AFF2 9F	TTG	GAA	AGC	TGC	ACT	TGG	ACA	G	61.0
AFF2 9R	TTT	CTT	CAT	CAG	GAG	CAC	AGG	G	01,0
AFF2 10F	CCA	CTC	TAC	CTG	CAT	TTC	ACA	G	61.0
AFF2 10R	TCT	GTG	TGT	GTG	TGT	GTT	GAG	G	01,0
AFF2 11.1F	CTT	GCT	GCT	GTT	TCT	CAA	TCT	G	58.0
AFF2 11.1R	AAT	GAA	TTC	CCG	AGA	CTT	TGG		J0,0
AFF2 11.2F	CAA	GAT	TGT	GCC	AAA	GTC	TCG		50 0
AFF2 11.2R	TAC	CTT	GTG	CTT	ACG	TTT	GCC		J9,0
AFF2 12F	TGC	CAT	GCA	TTT	CAA	GCT	С		59,0

anexos



AFF2 12R	TGA	ACA	ATC	ATA	CCA	AGC	CAT	С	
AFF2 13F	AGT	TCT	GCT	GCA	AAG	ACA	TGA	G	59.0
AFF2 13R	TCC	AAG	ATG	CTT	ACA	TTT	ACC	G	59,0
AFF2 14F	TTG	CCT	TCT	TTC	GTA	ACG	TGC		57.0
AFF2 14R	TGA	TGC	TGA	GGT	CTT	ATT	TGG	G	57,0
AFF2 15F	AAG	CAT	TGG	TTT	CTG	AAA	GAG	С	57.0
AFF2 15R	TAA	CCA	AGC	CCT	GAG	AAC	TTT	G	57,0
AFF2 16F	CAT	TGC	CAA	ATG	TTC	CCT	GTG		58.0
AFF2 16R	ATT	GCA	GAA	AGG	CCA	TTC	ACC		58,0
AFF2 17_18F	CAA	AGG	TAT	GCA	ATG	AGG	CTG		56.0
AFF2 17_18R	TTC	ACT	CCT	GAC	TTG	TCA	ATG	С	50,0
AFF2 19F	TTG	TCT	CTT	TCC	ATT	TCC	CAG		56.0
AFF2 19R	TCT	TTG	CCT	CTG	TTT	CTC	TGT	G	50,0
AFF2 20.1F	AAG	CAG	CTT	CTC	AAT	GTG	GTG	С	58.0
AFF2 20.1R	TTG	CAT	TTC	TCA	GGA	GCC	TGT	С	58,0
AFF2 20.2F	TTG	TGA	TAA	AGA	CAG	GCT	CCT	G	58.0
AFF2 20.2R	TTA	TGG	ACC	CAC	TTA	CCA	ACT	G	58,0
AFF2 20.3F	TTG	GTA	AGT	GGG	TCC	ATA	ACT	G	58.0
AFF2 20.3R	AAT	GCA	TGG	ATA	GTG	TTT	ACC	С	56,0



NOME	SEQÜÊNCIA	T.A. (°C)
TUBA1A_3.2F	AGA GTG GGT GAG TGA CCA G	FC
TUBA1A_3.2R	GCT GGG GAT ATG ACC TC	50
TUBA1A_3.3F	AAC AGT TCA ATT CTG TGT TTG	FC
TUBA1A_3.3R	CTG GTC ACT CAC CCA CTC	56
TUBA1A_3.4AF	AGA AAG CTG TTC ATG GTA GG	50
TUBA1A_3.4AR	TCC TGG AAG ATG TAT GAA AAG	50
TUBA1A_3.4BF	CAG ACC ACA ACT TTT CAA TG	ГС
TUBA1A_3.4BR	CCC TGA ATG TTG ACC TGA C	50

Tabela 18: Sequências de *primers* e respectivas temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene *TUBA1A*.

Tabela 19: Sequências de *primers* e respectivas temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene *TUBA8*.

NOME	SEQÜÊNCIA	T.A. (°C)	[MgCl ₂]
TUBA8.1F	AGG ACC CGG AGA TTT GAG		4 75
TUBA8.1R	ACT CCT CGA CCC TGA ACTG	50,7	1,75
TUBA8.2F	CCA GAC TCT CTG ACC TCG TTG	62	4 75
TUBA8.2R	TCT GCA GTT TCG AGA TGT TCT C	62	1,75
TUBA8.3F	TGG GCA GTA GGA CCT AAT GG	61	4 75
TUBA8.3R	GAT GCC AAC ACA GAG GAA GG	61	1,75
TUBA8.4F	TTT CTT CTC ATG TCC TGC TCT C	62	4 5
TUBA8.4R	TAT CCT TGG TCA CCT CCC TC	62	1,5
TUBA8.5F	TGT ATC TTC TTC TGT GGC TCC TC	62	4.05
TUBA8.5R	CTT GAC ACC AGC TGA CAT GAT C	62	1,25



Tabela 20: Sequências de *primers* e respectivas temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene *TUBB2B*.

NOME	SEQÜÊNCIA	T.A. (°C)	[MgCl ₂]
TUBB2B_1F	ATG TGT CCA CCT GGA TAC GCA C	C A	2.0
TUBB2B_1R	CCA TAC TGT GAC TGC GGA AAG G	64	2,0
TUBB2B_2F	AAG AGA CCA GTT CCT GCC TCA G	6 2 5	1 75
TUBB2B_2R	CCC AAG CCC GAG TAA CAA AC	62,5	1,75
TUBB2B_3F	GCT CGG AGC ATT ACG TCA G	FO *	4.75
TUBB2B_3R	GGA AGG TCT GCA TTT GGC	50*	1,75
TUBB2B_4F	TTG GGT TGT CGG AAC TGA GTC	6 2 5	1 75
TUBB2B_4R	AGG AAG CCC AAT GAA ATA CTG C	62,5	1,75
TUBB2B_5F	TTG CCT GAG GGT CTA AGT CAC	50.4	4 75
TUBB2B_5R	CAC CAG GCA CTC ACC AAA C	59,4	1,75
TUBB2B_6.1F	TGC TAA GAG CTT GGT GTC CTG	60.0	4 75
TUBB2B_6.1R	CTT GAA CAG CTC CTG GAT GG	60,9	1,/5
TUBB2B_6.2F	ATG TCG GCC ACC TTC ATC	<u> </u>	4 75
TUBB2B_6.2R	TGA AGA CAC ACA CTG TGC TTT C	60,4	1,75

*Necessita de adição de DMSO à reação

Tabela 21: Sequências de *primers* e respectivas temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene *WDR62*.

NOME	SEQÜÊNCIA	T.A. (°C)	[MgCl ₂]
WDR62_1-2F	CCG CAC AGC AGC ACT AAT G	FO	4 75
WDR62_1-2R	ATG GCG AGC AGC TTC TCA C	58	1,75
WDR62_3-4F	TTT CTT TGC AGG TGT CAC TCG	64.2	1 75
WDR62_3-4R	GTC TTT CCC AGA ATC GCT GTC	64,2	1,75
WDR62_5F	AAT AGA ATC ATC CCA GGA CCC	64.0	4.75
WDR62_5R	TGA GCA CCT ACC CAT GAG TAT C	61,3	1,75
WDR62_6-7F	CGG AAC CAG TGA TCA GCT C	64,1	1,75



WDR62_6-7R	CCC TGT	GCC	CAA	GAC	ATA	G			
WDR62_8-9F	CAG TCC	AGT	GGA	ATG	AGT	GC		60.8	1 75
WDR62_8-9R	CCT GCA	GAC	ACA	TAT	CAC	GAG		00,8	1,75
WDR62_10F	CGT GAA	GCA	CCA	AAT	CCA	С		60.8	1 75
WDR62_10R	AGA TGG	ATC	TGG	AAG	CAT	GG		00,8	1,75
WDR62_11-12F	GTG ATT	GAT	TAC	CCA	TGT	GGC		62.4	1 75
WDR62_11-12R	TGC TCA	TAT	GTC	CTC	AGG	GAG		03,4	1,75
WDR62_13-14F	GTC ATC	CTT	TGC	CTT	GTC	CTC		617	1 75
WDR62_13-14R	CAC TGT	GTG	GCA	GCT	GAA	ΤG		61,7	1,75
WDR62_15F	TGC TTC	TGA	GCT	GCT	CGT	G		61	1 75
WDR62_15R	GGG AGC	TGT	TCA	TGG	GAT	TAC		01	1,75
WDR62_16F	TGG CCA	TTC	TGA	CCT	ATT	CTA	G	60	1 75
WDR62_16R	TCC CAG	CTG	TCA	TCC	ACA	G		00	1,75
WDR62_17F	TGG TCA	CAC	TGC	CCT	TCT	G		64	1 75
WDR62_17R	ACC ATG	TTG	TCT	AGG	AAG	GTC	С	04	1,75
WDR62_18-19F	TGC CTA	ACA	CAC	AGC	GTC	CTC		64	1 75
WDR62_18-19R	TGG GTC	CCT	CAA	TTC	CTT	CC		04	1,75
WDR62_20F	CAA GAG	CCA	GAG	AAT	GAG	GTG		57.8	1 75
WDR62_20R	TCC AAC	TCC	TCA	CCT	TCA	GC		57,8	1,75
WDR62_21-22F	AGT GAC	ATG	TGG	GTC	CCT	TTC		64	15
WDR62_21-22R	TCT ACA	CAG	GCA	GGC	TGA	GTG		04	1,5
WDR62_23F	GCC TTG	TGT	GTC	TCT	CTT	TGA	С	64	1 25
WDR62_23R	TCT TGG	CCA	CCA	CTG	TGT	С		04	1,25
WDR62_24F	CTC TCC	TTA	CCA	TCC	TCA	TTC	С	62	15
WDR62_24R	AAA CCC	AGC	AAT	GAT	TCC	С		02	т,J
WDR62_25F	GTT TGT	TGG	GTT	GTT	TGT	CCT	С	64	1 5
WDR62_25R	AAC AAA	GGG	CTG	TCT	CAC	TGA	G	04	υ,,
WDR62_26F	GAG TGA	GCA	CTC	AGC	CAG	TTG		65	1 5
WDR62_26R	CTG CCC	TTC	ACC	ATC	TCA	ΤG		0.5	L,J



WDR62_27-28F	CCT CAG AAT GGC TGT GCT G	62,8	1,25
WDR62_27-28R	CTT GGC TGA ACG CAC AGA C		
WDR62_29-30F	CAG AAT GGT CAG GCT GTG G	CD 9	1 Г
WDR62_29-30R	AAG CAG TTG CTC TCC ACT CAC	02,8	1,5
WDR62_31-32-	TCT GTA CAT AAG GGT TTC TGG G	го	2.0
WDR62_31-32-	TGA CTC CAC CAC ACA GAA CTG	59	2,0
WDR62_34F	GTT CTG TGT GGT GGA GTC AGT G	62.4	1.0
WDR62_34R	GAG CTG AGC CAA CTA GCA CAC	03,4	1,0
WDR62_35-36F	GCT CAT CTT GCT CAT TCC CTT C	C A	1 75
WDR62_35-36R	TCC TCT GGG CAT CAC CTT CTA C	04	1,75

Tabela 22: Sequências de *primers* e respectivas temperaturas de anelamento para análise das alterações nos genes HDX, CPXCR1, MAGEC1, TGIF2LX, SPANXC, H2BFM e UBE2NL.

NOME	SEQÜÊNCIA	T.A. (°C)
HDX_sense	CGG ACC TCA TTA CAT ACA GC	62 - 65
HDX_antisense	TGA TCC AGG TCC CAA ATC	
CPXCR1_sense	AAC CTC CCA GGA AGA TGT TG	50 – 54
CPXCR1_antisense	TGT TAT GGC TCT CTC GTG ATG	
H2BFWT_sense	CTG CGT GAC ACT TCA TCC AAT C	50 – 62
H2BFWT_antisense	ACT GGT CTT TCA GGC CAC ATT C	
MAGEC1a_sense	AAT CCT GCG AGT TCC TTC	58
MAGEC1a_antisense	GTC ATA GGA ATC TGG AGA AGA G	
MAGEC1b_sense	CTC CTC CAC TTT AGT GAG TC	56
MAGEC1b_antisense	AAG ACT CAA TAA AGT GTA GGA G	
MAGEC1c_sense	CTG TCC AGT CTC CTC TCC ATA G	58
MAGEC1c_antisense	AAG TGG AGG AGG AGC AGA TAC	
TGIF2LX_sense	TTA CAG ACC TGC CCA TGC TTT C	50 - 65
TGIF2LX_antisense	TTG AAG CAT ATC CGG GAG AAT G	



SPANXC_sense	GCT ACA GGA GGA ACG TGA A	58
SPANXC_antisense	TAT CAA CAC ATT TCT AAA GCA TA	
H2BFM_sense	GTT CTT GCT ATC TAA TGG C	58
H2BFM_antisense	GTT CTG AAT AGA GCC TTT G	
UBE2NL_sense	AGT TCC TGG CAT CAA AGC	60
UBE2NL_antisense	TTC CAC TGC TCC ACT ACA TC	

Tabela 23: Sequências iniciadoras para o sequenciamento dos genes MAGEC1, SPANXC e SPANXD.

NOME	USO	T.A. (°C)
MAGEC1 4.1F	PCR	60
MAGEC1 4.1R	PCR	
MAGEC1 4.2F	PCR	63.9
MAGEC1 4.2R	PCR	
MAGEC1 4.3F	Para seqüenciar	_
MAGEC1 4.3R	Para seqüenciar	
MAGEC1 4.4F	PCR	59
MAGEC1 4.4R	PCR	
MAGEC1 4.5F	Para seqüenciar	_
MAGEC1 4.5R	Para sequenciar	
MAGEC1 4.6F	PCR	59
MAGEC1 4.6R	PCR	
MAGEC1 4.7F	Para seqüenciar	-
SPANXC/D F	PCR	
SPANXC/D R	PCR	50
SPANXD R	Para sequenciar	-



Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Caixa Postal 6111 13083-970 Campinas, SP 2 (0_19) 3788-8936 fax (0_19) 3788-8925 cep@head.fcm.unicamp.br

CEP, 27/07/05 (PARECER PROJETO 383/2000)

PARECER

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETOS: "ESTUDO DAS MUTAÇÕES EM GENES RESPONSÁVEIS POR DIFERENTES FORMAS DE DESORDEM DO DESENVOLVIMENTO CORTICAL"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Fábio Rossi Torres

II - PARECER DO CEP

O Comité de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a emenda que introduz a aluna Iara Brandão de Almeida como coresponsável pelo sub-projeto: ESTUDO MOLECULAR E DE CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO NA POLIMICROGIRIA PERISYLVIANA BILATERAL CONGÊNITA, no protocolo de pesquisa supracitado.

> Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FCM / UNICAMP





Formulário de Consentimento Livre e Esclarecido para Pesquisa Médica

Universidade Estadual de Campinas



Departamento de Genética Médica

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 1 de 3

Título do Projeto: Estudo Clínico e de Genética molecular em Polimicrogiria

Pesquisadores Responsáveis: Dra. Iara L. Brandão de Almeida, Dra. Neide Ferreira dos Santos, Dra. Marilisa M. Guerreiro e Dra. Íscia T. 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 polimicrogiria. 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 uma melhor abordagem dessa doença.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e famílias. Eu serei submetido a um exame físico neurológico para estabelecer meu estado clínico. Além disso, poderei ser submetido a um eletroencefalograma (EEG), ressonância magnética de crânio, avaliação fonoaudiológica e neuropsicológica. 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, e coleta da amostra de sangue, fazem parte dos cuidados médicos de rotina para um paciente com polimicrogiria.

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.





Universidade Estadual de Campinas Departamento de Genética Médica

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 2 de 3

Título do projeto: Estudo Clínico e de Genética molecular em Polimicrogina

Pesquisadores Responsáveis: Dra. Iara L. Brandão de Almeida, Dra. Neide Ferreira dos Santos, Dra. Marilisa M. Guerreiro e Dra. Íscia T. 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 Polimicrogiria, possibilitando um melhor diagnóstico e tratamento mais adequados. É importante notar que o diagnóstico prê-sintomático não faz parte dessa pesquisa, mas se eu desejar obter orientação genética, ela será oferecida nos ambulatórios do serviço de genética clínica do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), tel. (019) 3788-8908.

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. Iara L. Brandão de Almeida, Dra. Neide Ferreira dos Santos, Dra. Marilisa M. Guerreiro e Dra. Íscia T. Lopes Cendes

tel (019) 3788-8907 estarão disponíveis 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)3788-7232.

<u>RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:</u> 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 os



médicos responsáveis por este estudo, poderão interromper a minha participação a qualquer momento que julgarem apropriado.

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 3 de 3

Título do projeto: Estudo Genético Clínico em Polimicrogiría

Pesquisadores Responsáveis: Dra. Iara L. Brandão de Almeida, Dra. Neide Ferreira dos Santos, Dra. Marilisa M. Guerreiro e Dra. Íscia T. 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 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





© 2008 Wiley-Lios, Inc.

American Journal of Medical Genetics Part A 146A-1151-1157 (2008)

A New Candidate Locus for Bilateral Perisylvian Polymicrogyria Mapped on Chromosome Xq27

Neide F. Santos,¹ Rodrigo Secolin,¹ Iara L. Brandão-Almeida,¹ Marilza S. Silva,¹ Fábio R. Torres,¹ Simone S. Tsuneda,¹ Catarina A. Guimarães,² Simone R.V. Hage,³ Fernando Cendes,² Marilisa M. Guerreiro,² and Iscia Lopes Cendes¹*

¹Department of Medical Genetics, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil ²Department of Medical Neurology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil ⁵Department of Speech Pathology, University of São Paulo (FOB), Baura, SP, Brazil

Becomed 10 April 2007. Accepted 17 December 2007

Polymicingiria (PMG) is characterized by an excessive number of small and prominent brain gyri, separated by shallow sailed Blaneral perisylvian polymicrogyria (BPP) is the most common form of PMG. Clinical signs include pseudobullur paresis, mental returbation, and epilepsy Familial forms of BPP have been described and a candidate locus was previously mapped to chromosome Xq28, distal do marker DXS8103. The objective of this study was to perform linkage analysis in one family segregating BPP. A total of 15 individuals, including 8 affected patients with BPP were evaluated. Family members were examined by a neurologist and subjected to magnetic resonance imaging scams. Individuals were genotyped for 18 microsatellite markers, flanking a 42.5 cM interval on th Xq27-q28. Twopoint and multipoint linkage analysis was performed using the LINKAGE package and haplotype reconstruction was performed by GENEHLINTER software. Our results showed a wide spectrum of clinical manifestations in affected individuals with BPP, ranging from normal to mild neurological abnormalities. Two-point linicage analysis yield a Zmax=2.06 at 0=0.00 for markers DXS1205 and DXS1217. Multipoint lod-scores indicate a candidate interval of 13 cM between markers DXS1305 and DXS8043, on ch Xq27.2.Nq27.5 These results point to a new locus for PPP in a more centromeric location than previously reported. © 2008 Wiley-Lise, Inc.

Key words: linkage analysis; X-linked inheritance; cortical malformation

How to cite this article: Santos NF, Secolin R, Brandão-Almeida IL, Silva MS, Torres FR, Tsuneda SS, Guimarñes CA, Hage SRV, Cendes F, Guerreiro MM, Lopes-Cendes L. 2008. A new candidate locus for bilateral perisylvian polymicrogyria mapped on chromosome Xq27. Am J Med Genet Part A 146A:1151–1157.

INTRODUCTION

Polymicrogyria (PMG) is a cortical development malformation characterized by an excessive number of small and prominent brain gyri, separated by shallow sulci [Kuzniecky et al. 1993]. Bilateral perisylvian polymicrogyria (BPP; OMIM*300388) is the most common form of PMG, characterized by thickening of the cerebral cortex, around and on the depth of the Sylvian fissures. These abnormalities are often asymmetrical and can vary in extent among patients [Kuzniecky et al., 1993]. Clinical features include pseudobulliar paresis, causing restricted tongue movements, drooling, feeding problems, dysarthria and delay or difficult speech. Mental retardation and epilepsy may be present as well [Kuzniecky et al., 1995]. Guerneiro et al., 2000. Montenegro et al., 2001].

Familial recurrence of BPP has been described and different patterns or inheritance have been proposed [Gropman et al., 1997; Yoshimura et al., 1998; Borgatti et al., 1999; Guerreiro et al., 2000; Villard et al., 2002]. A candidate locus was mapped on ch Xq28 [Villard et al., 2002] in five families with BPP. In addition, mutations in the *GPR56* gene were reported in patients with bilateral frontoparietal polymicrogyria and autosomal recessive influeritance [Piso et al., 2002, 2004] and recently. Roll et al. [2006]

N.F. Santos and R. Saredirerentisbuted equally to hirotude Gent sponsor bundledes de Ampart & Polyama de Dado de Sto Paulo (PAPESP). SP, Brazil, Gent sponsor: Consolito National de Polyama (CNPs). Brazil.

^{*}Conveption/marchisTecha Topes-Cendes, M.D., PhilD., Department of Medical Generica, POM-UNICAMP, Tossilia Vietra de Cernargo, 129, Collado Universitatia Zaforeno Van Campinas, SP CIP 1 384-971, Itanil. E-mark. Isanide Blunke angles DOI 10.1012/aprg.a.32270



1152

SANFOS ET AL.

found a mutation in the SRPX2 gene (located on Xq22) in a male patient with BPP with severe seizures and mental retardation.

We identified a family with recurrence of BPP following an X-linked pattern of inheritance and report here on the results of clinical, neuroimaging, and genetic linkage studies

MATERIAIS AND METHODS

We performed a detailed clinical investigation, imaging studies and linkage analysis in one family segregating BPP, including a total of 15 individuals. Among them, four were males married into the pedigree who were not included in the imaging studies but were clinically accessed and genotyped (Fig. 1). All 15 participating individuals gave informed consent and the study was approved by our Institution Research Ethics Committee.

American Journal of Medical Genetics Part A

Clinical and Language Evaluation

We systematically interviewed all patients and family members according to a standard detailed



Fo. 1. Welgave of the family studied showing the haplotype reconstruction for the 18 markins genorype douchr emosione 3xq27-28 in one family with 1999. Affected individuals are indicated by black symbols. The affected haplotype is shown by the black perton of the vertical bar.



American Journal of Medical Genetics Part A

1153

LINKAGE ANALYSIS IN HPP

questionnaire, emphasizing the history of problems with phonation and delayed speech, motor development and occurrence of prenatal events during the first two minesters of pregnancy. All patients were examined by clinical neurologists. The neuropsychological assessment included the Wechsler Intelligence Scale for Children-III (WISC-III) or Wechsler Adult Intelligence Scale—Revised (WAIS-R) [Wechsler, 1981; Figueiredo, 2002]. Language evaluation was performed by a child speech therapist. Spontaneous language and free conversation were evaluated according to a semi-structured protocol that characterized the following aspects of language: phonologic, syntactic, semantic, pragmatic, and lexical[Guerreiro et al., 2002].

Magnetic Resonance Imaging Studies

Magnetic resonance imaging (MRI) scans were performed in a 2T scanner (Elscint Prestige³⁸, Haifa, Israel), and included T1- and T2-weighted images in three orthogonal planes, as well as thin coronal T1 inversion recovery (IR) images. MRI visual analyses were performed using multiplanar reconstruction on OMNIPRO³⁸ workstation. According to MRI findings, individuals who clearly had BPP were classified as affected, whereas individuals with normal imaging studies were classified as unaffected.

Genotyping

Genomic DNA was obtained by direct extraction from lymphocytes of peripheric blood [Maniatis et al., 1989]. DNA samples were genotyped for 18 microsatellite markers. DXS102, DXS125, DXS127, DXS106, DXS8073, DXS8043, DXS8028, DXS8045, DXS806, DXS808, DXS115, DXS8091, DXS8045, DXS8086, DXS8069, DXS8105, DXS8061, and DXS1075, flanking a 42.3 cMinterval on ch Xq27-q28. Microsatellite markers were selected from published data [Villard et al., 2002] and Généthon human genetic linkage map [Dib et al., 1996], available at the National Genter of Biotechnology Information home page (http:// www.ncbi.nlm.nih.gov).

PCR reactions were performed with 50 ng/μl of DNA, 5 μM of each oligonucleotide, 10% GeneAmpTM PCR Baffer II, 2.5 mM GeneAmp dNTP, 5 units/μlTaqTM DNA Polymerase and 25 mM MgCl₂ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Sense oligonucleotides were fluorochrome labeled with FAM (6-carboxyfluorescein), VICTM or NED (phosphoramidite fluorescein; Applied Biosystems, Foster City, CA). PCR products of the microsatellite markers labeled with fluorochromes were analyzed in the MegaBACE 1000TM automatic sequencer (GE Heathcare, Buckinghamshire, UK). Results were analyzed using Fragment Profiler SoftwareTM (GE Heathcare).

Statistical Analysis

Data obtained from Fragment Profiler SoftwareTM was processed to input files for linkage analysis by the LINKGEN program. This software was developed by our laboratory and is available online at http:// lgm.fcm.unicamp.br:9001/cgi-bin/linkgen/linkgen. cgi for free use.

Two-point and multipoint genetic linkage analysis was calculated by the maximum likelihood method using the computer program MLINK[®] and LINK-MAP[®] (version 5.2) (CEPH, University of Utah, and Columbia University 1990), respectively, from the LINKAGE[®] package (Lathrop and Lakouel, 1984; Terwillinger and OU, 1993). The GENEHUNTER[®] program was used for haplotype reconstruction Krughyak et al., 1996]. We assumed an X-linked dominant mode of inheritance with 0.8 penetrance. Allelic frequencies for each marker was calculated from unrelated individuals married into the pedigree

Pedigee number	Gender	Neurological examination	language acquisition	PIQ/VIQ	MRI	Carrier of affected haplotype
1-1	Maler	Normal	Normal	NE	NE	No
14	Feenaler	Normal	Normal	462/83	BPP	Yes
15.5	Male	Normal	Normal	NE	Normal	No
113	Male	Neumal	Normal	NE	NE	No
13-4	Female	Normal	Normal	93/80	BPP	Yes
115	Male	PBP	Drived	29/NO	HPP	Yers
11-0	Male	Normal	Nermal	NE	NE	No
13-7	Female	Neumal	Normal	NE	Normal	No
11-8	Male	Neumal	Normal	NE	NE	No
110	Female	Normal	Normal	105/91	HPP	Yes
(B-4)	Male	PBP	Detayord	74/57	1000	Yes
19-4 -	Male	Normal	Delayed	95/97	1000	Yes
18-5	Male	Neumal	Deferved	97/93	1000	Yes
11.8	Male	Neumal	Delayed	107/97	HPP	Yes
1B-9	Formale	Normal	Nemmal	NE	Normal	No

TABLE 1. Demographic and Clinical Data on 15 Individuals Stadied in One HPP Family

PRQ performance indigence quotient, NQ, verbal indigence quotient, NML magnetic normalice imaging, PRP, possibilitabilitar parents NL, net evaluated, NO, not obtained, NPV, bilateral policyle an polymering year.

xos



1154

American Journal of Medical Genetics Part A

SANFOS ET AL



Bc. 2. Mill from Parient IE-50 radie). To -weighted sugital and contradimages showing bilateral period vian polynemogene extending to both frontal and parietal regions.

and controls. Disease allele frequency was 0.0001 [Villard et al., 2002]. Lod score values (Z) equal or higher than 2.00 indicate genetic linkage between marker and disease [Terwillinger and Ott, 1993].

RESULTS

A summary of clinical information is given in Table I. We accessed a total of 15 individuals, including 5 females (Fig. 1). Clinical spectrum ranged from normal to mild neurological dysfunction, including pseudobulbar paresis, such as poor articulation and poor tongue movements. Overall, the MRIs showed a different pattern between males



For 3: MRE from Patient ID-9 (make), TI-weighted segred (sop left), axial (top right), and coronal (bottom) images showing bilateral pertrylvian polymicrogyria.extending to both fromal and parietal region.

andfemales, with more pronounced and widespread polymicrogyric cortex in males (Figs. 2–5). Among the five affected males, two individuals (II-5, Fig. 2 and III-3, Fig. 3) had a more severe phenotype, with pseudobulbar paresis and delay in language acquisition (Table I). These individuals also had more severe MRI abnormalities with BPP extending over both frontal and parietal areas; whereas, the affected females (individuals I-2, Fig. 4; II-4, Fig. 5; and II-9) had the least severe MRI findings with asymmetrical and milder perisylvian polymicrogyria.

Significant two-point lod scores were observed for two markers, with a Zmax = 2.06 at $\theta = 0.00$ for markers DXS1205 and DXS1227 (Table II). Multipoint lod scores pointed to a candidate region of 13 cM between markers DXS1205 and DXS8043, located on cr Xq27.2-Xq27.3 (Fig. 6).

All eight patients with BPP on MRI had the affected haplotype (Table I, Fig. 1); however, findings in neurological and language evaluations were variable. Individuals I-1, II-3, II-6, and II-8 were not included in the MRI studies, but had no neurological complains or speech abnormalities (they were not formally tested by the speech therapist). Individuals



Fig. 4. MBI from Patient 1-2 (formale). T1-weighted scagital and enrored images show asymmetrical bilatorial periodytan polymicrogyria more premounced in right hemisphere (**top row**). The ridd polymicrogyria on the left hemisphere is present in the postnetic estimation of the Sylvian fiscare which is better approximated in the commal images (arrow).



Bi: 5. Mill: from Pariorit. II-4 (formak). Garoual T1 images showing mild bilatorial asymmetrical perioylytian polynicingyria (more evaluat on the right calle) which sparse frontial and paraetal lotse.

II-1, III-9 had normal neurological exam, normal language acquisition normal MRI and do not carry the affected haplotype. Although individuals I-2, II-4, and II-9 had normal neurological exam and language acquisition, MRI clearly showed BPP and haplotype analysis revealed that they have the affected haplotype. Individuals II-5 and III-3 had pseudobultur paresis and individuals III-4, III-5, and III-8 had normal neurological exams; however, all five had delayed language acquisition, MRI with BPP and the affected haplotype (Table I, Fig. 1). The only individual who carries the affected haplotype but

American Journal of Medical Genetics Part A

1155

does not have clinical or MRI abnormalities is II-7, a female who had normal development and has no neurological or speech abnormalities (Table I, Fig. 1). Unfortunately, we could not obtain a complete clinical, MRI or haplotype information on her two daughters (individuals III-6 and III-7), since the mother (individual II-7) did not agree to have the girls participate in the study; however, the mother informed us by a telephone interview that both girls (ages 19 and 8 years old) are presently asymptomatic and have had no developmental or speech problems.

DISCUSSION

Bilateral persylvian polymicrogyria is a brain abnormality currently classified under malformations due to abnormal cortical organization (including late neuronal migration) [Van Bogaert et al., 1998; Barkovich et al., 2005]. Genetic contribution to the development of BPP in some patients is supported by reports of familial cases, which suggests that gene mutations may cause this brain anomaly [Bartolomei et al., 1999; Borgatti et al., 1999; Caraballo et al., 2000; Guerreiro et al., 2000; Roll et al., 2006]. We identified one family segregating BPP, showing a possible X-linked dominant inheritance and in the present study we showed evidence for linkage to ch Xq27 2-Xq27.5 within a 15 cM candidate region.

In the family studied here, the matriarch individual I-2) who was normal on clinical evaluation had three affected children (II-4, II-5, and II-9) and four affected grandchildren (III-3, III-4, III-5, and III-8) with clinical and MRI abnormalities. Surprisingly, her MRI revealed BPP (Fig. 4). Furthermore, all eight individuals (clinically unaffected matriarch, three affected children and four affected grandchildren)

TABLE II. TWO-PORT	Ltd Series for 1	8 Markan on Chron	assome Xq2?-28
--------------------	------------------	-------------------	----------------

UNKAGE ANALYSIS IN HPP

Markers	Rev combinant, figatories (9)								
	0.00	0.05	0.00	0.15	0.20	0.25	030	0.35	0.40
DX81192	-464	0.61	0.70	12.79	0.75	80.0	0.59	0.47	0.33
D381205	2.06	1.89	1.71	1.51	4.32	1.10	0.88	0.65	0.42
D3S1227	2.06	1.89	4.73	1.51	1.32	1.10	0.88	0.65	0.42
DASB106	1.04	0.93	0.82	0.71	0.60	0.47	0.35	0.22	0.11
D0\$8073	1.44	1.23	1.12	1:04	0.90	().77	0.64	0.50	0.34
D0\$80-6	0.00	0.00	(5.03)	15.130	(0.00)	0.00	0.00	00.0	0.00
DOSi80.28	-0.64	0.89	1.0	0.98	0.01	0.80	0.67	0.52	0.36
D0880-45	-0.64	0.89	1.0	0.48	0.04	0.80	6.67	0.52	0.36
DXS1200	0.00	0.00	(E00)	0.300	0.00	0.040	0.00	0.00	0.00
D3S998	-1.97	-0.54	-0.12	-60.0A	0.01	6.08	0.03	0.02	0.01
D3S1215	-1.97	-0.34	-0.12	-0.08	0.01	0.08	0.04	0.02	0.04
D3S8091	-0.04	0.89	1.0	0.98	0.98	0.80	0.67	0.52	0.46
D3S1198	-0.64	0.89	1.0	0.585	0.94	0.80	0.67	0.52	0.36
D3S8086	0.00	0.00	0.00	0.130	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
D3S8069	-0.04	0.89	1.0	0.98	0.38	0.80	0.67	0.52	0.36
D3SS104	1.44	1.23	1.12	1.08	0.90	0.22	0.64	0.50	0.34
D3S806L	-1404	1.88	-1.02	-0.65	-0.38	-0.20	-0.08	-0.01	0.03
D3S1073	-597	+-0.62	-0.40	-0.23	-0.14	-0.09	-0.05	-0.03	-0.01
						0.00			



1155



Fig. 6. Multiprint bid snows calculated for fite 16 markers generaped on chromosome 36427-28. Dashed line indicates lead score threshold for Indiago.

shared the same affected haplotype (Table I; Fig. 1). These findings point to the great importance of imaging studies in clinically unaffected individuals, especially females, belonging to families segregating BPP. In addition, we also found evidence for incomplete penetrance, since individual II-7 carries at least part of the affected haplotype (from markers DXS1205 to DXS1227) but had normal development, no neurological or speech abnormities and normal MRL Incomplete penetrance has been previously reported in families with BPP and may result from the lack of sensitivity of clinically used imaging techniques to detect subtle brain abnormalities [Guerreiro et al., 2006; Jansen and Andermann, 2005].

Our linkage study focused initially at region Xq28 due to the reports of Villard et al. [2002] describing a candidate locus for BPP downstream to microsatellite marker DXS8103. However, the region of interest was extended to a more centromeric location, since the region telomeric to DXS8043 was excluded by haplotype analysis (Fig. 1). Our results point to a 13 cM candidate region for BPP in this family between markers DXS1205 and DXS8045 as defined by multipoint linkage analysis, on ch Xq 27.2-q27.3. Our candidate locus is approximately 16 cM upstream marker DXS8103 and therefore, does not overlap the candidate region previously reported. The fact that two different candidate regions for BPP were found could be an evidence of locus heterogeneity and, since cortical development is a very complex molecular mechanism with the potential involvement of several different genes, we cannot exclude the possibility that the distal region on the long arm of chX could harbor a cortical development genes cluster, with some of these genesinvolved in the etiology of BPP.

In conclusion, we mapped a candidate locus for BPPon chXq27.2-q27.3 which does not overlap with the candidate region previously mapped [Villard American Journal of Medical Genetics Part A

SANFOS ET AL.

et al., 2002). Our family demonstrated considerable variability of clinical expression with only makes showing pseudobulbar paresis and low cognitive scores. We recommend detailed clinical evaluation, including examination by speech pathologists and MRI scans in all related family members for the precise phenotypic classification in linkage studies of BPP.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the patients' family members for their helpful cooperation. NPS received a fellowship from CNPq. RS, ILBA, FRT, and SST received studentships from FAPESP.

REFERENCES

- Barkovich AJ, Kazniecky RJ, Jackson GD, Guernini R. Dobyns WB. 2005: A developmental and genetic classification for malformations of control development. Neurology 65:1875– 1887.
- Batolomei F, Gavaret M, Dravet C, Guerrini R. 1999. Familial epilepsy with unilateral and bilateral malformations of cortical development. Epilepsia 40:47–51.
- Borgatti R, Trindzi F, Za'ccu C, Piccinelli P, Balottin U, Carrozzo R, Gaerini R. 1959. Blateral petrylvian polymicrogynia in three generations. Neurology 52:1910–1913.
- Caraballo RH, Gerssimo RO, Mazza E, Fejerman N. 2000 Focal polymicrogyna in mother and son. Brain Dev 22:336–339. Dib C, Facaé S, Fizames C, Samson D, Diocut N, Vignal A,
- Dati C, Facare S, Fazanes C, Samson D, Docux N, Vignar A, Millaseau P, Marc S, Hizan J, Selboon E, Luthrop M, Qiapuy G, Morisette J, Weisseebach J. 1996. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5:264 microsatellites. Nature 380:352–154.
- Figuesie do VIM. 2002. WISC HE Wechtler Intelligence Scale for Children. Adapted in a Beazlian sample. São Paulo: Casa do Psicologo.
- Giorpman AL, Barkovich AJ, Vezina IG, Gonry JA, Dubovsky IX, Packer RJ. 1997. Pediatric congenital bilateral pethylvian syndrome. Ginical and MRI features in 12 patients. Neuropediatrics 28:198–203.
- Guerreiso MM, Andremann E, Guerrini R, Dobyne WB, Kamiecky R, Silver K, Van Bogaert P, Gillain C, David P, Ambrovetto G, Rosati A, Bartolomei F, Parmeggiarri A, Paetas R, Salonen O, Ignatan J, Borgyati R, Zacca C, Batow AC, Palmini A, Ferraindes W, Morteneggo MA, Cendes F, Andernunn F. 2000. Familial periodynan polymetrograir: A new familial syndrome of cortical maldevelopment. Ann Neurol 48:39–48.
- Guerreito MM, Hage SRV, Guimatien CA, Abramides DV, Ferrunden W, Pacheco PS, Howsana AMSG, Motterregio MA, Cenden F. 2002. Developmental language doorder associated with polymentgyria. Neurology 59:246–250.
- associated with polymernyyria Neurology 59,246–250. Jansen A, Andemann E. 2005. Genetics of the polymicrogenia syndromes. J Med Genet 42:369–578.
- Krughyak I, Dahy MJ, Reeve-Tahly MP, Lander ES. 1996. Parametric and nonparametric linkage analysis: A unified multiprint approach. Am J Hum Genet 58:1347–1368.
- Kuzenecky R, Andermann F, Guerrini R. 1993. Congenital Islateral persylvian synchronic Study of 31 parients. The CBPS Multicenter Collaborative Study. Luncet 341:608–612.
- Lahuop GM, Lalouel JM. 1984. Easy calculations off ordscores and genetic tills on small computers. Am J Hum Genet. 36:460– 465.
- Mamatis T, Fritsch EF, Sambrook J. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Hasbor Laboratory Press.


American Journal of Medical Genetics Part A

UNRACE ANALYSIS IN HPP.

1157

- Monteneggo MA, Guerreim MM, Lopes-Cendes I, Cendes F. 2021. Bilaterial Posterior Panetal Polymicingina: A mild form of Congenital Bilateral Persylvian Syndrome? Epilepia 42:845– 849
- Piao X, Basel-Vanagaite I, Straussberg R, Gunt PE, Pagh EW, Doheny K, Doan B, Hong SE, Stagart YV, Walsh CA. 2002. An autosomal accessive form of blateral frontoparietal polytiscrogrini maps to chromosome. Hip 12:2-21. Am J Hum Genet. 70:1028–1033.
- Piao X, Hill RS, Bodell A, Chang BS, Basel-Variagate L, Staussberg R, Dolyns WB, Qasarwi B, Watter RM, Iones AM, Volt T, Ross ME, Michaud JL, Descarie K, Barkovich AJ, Waldh CA. 2004. G protein-coupled inceptor-dependent development of human frontal costex. Science 303:2083– 2036.
- Roll P. Rudolf G. Pereim S. Royer B. Scheffer E. Massacher A. Valenti MP, Roeckel-Thevisiol N. Jamak S. Reclin C. Seegmalher C. Metz-Lutz MN, Jenninque A. Delepine M. Caloustian C. de Saint Muttis A. Braneau N. Depetits D. Manei MG, Flori E. Robaglia-Schlupp A. Levy N. Neulinner BA, Ravid R.

Marescaux C, Berkovic SF, Hirsch E, Lathrop M, Can P, Stepetonoski P. 2006. SBPX2 mutations in disorders of language cortex and cognition. Hum Mol Genet 15:1195– 1207.

- Terwillinger JD, Ott.J. 1993. Handbook of Itaman genetic linkage. Maryland: Johns Hopkins.
- VanBogrett P, David P, Gilarin CA, Wilder D. Damhaut P, Scalars E. Nattin C, Wetzburger C, Szliwowskii HB, Meterni T, Goldman S. 1998. Pentsylvian dysgenesis: Clinical, EDG, MRI and glictore costabolism features in 10 patients. Brain 121: 2229–2238.
- Villard L, Nguyen K, Girdoso C, Martin CL, Wess AM, Sifry-Platt M, Grin AW, Graham JM Jr, Winter RM, Jeventer RJ, Dohyns WB. 2002. A locus for Bilatesal Periodrian Polymicrogena maps to Xq28. Am J Hum Genet 70:1003–1008.
- Wechsler D. 1981. Wechsler Adult Intelligence Scale—Revised. San Antonio: The Psychological Corporation.
- Yoshimum K, Hamada F, Tomoda T, Wakiguchi H, Karashige T. 1998. Focal pachypolymicrogysia in three siblings. Pediatr Neurol 18:435–438.

