

FÁBIO ROSSI TORRES

**DISTÚRBIOS DO DESENVOLVIMENTO CORTICAL
E EPILEPSIA AUTOSSÔMICA DOMINANTE
COM AURAS AUDITIVAS:
estudos genéticos e moleculares**

CAMPINAS

Unicamp

2008

FÁBIO ROSSI TORRES

**DISTÚRBIOS DO DESENVOLVIMENTO CORTICAL
E EPILEPSIA AUTOSSÔMICA DOMINANTE
COM AURAS AUDITIVAS:
estudos genéticos e moleculares**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor
em Fisiopatologia Médica, área de concentração
em Neurociências.

ORIENTADOR: PROFA. DRA. ISCIA LOPES-CENDES

CAMPINAS

Unicamp

2008

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

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

T636d	Torres, Fábio Rossi Distúrbios do desenvolvimento cortical e epilepsia autossômica dominante com auras auditivas: Estudos genéticos e moleculares / Fábio Rossi Torres. Campinas, SP : [s.n.], 2008. Orientador : Iscia Lopes-Cendes Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Sistema Nervoso Central . 2. Genética. 3. Córtex Cerebral. I. Lopes-Cendes, Iscia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
-------	---

Título em inglês : Malformations of cortical development and autosomal dominant partial epilepsy with auditory features

Keywords: • Central Nervous System
• Genetics
• Cerebral cortex

Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica
Área de concentração: Neurociências

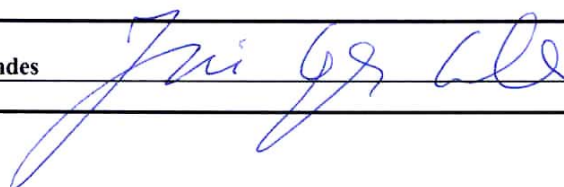
Banca examinadora:

Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes
Profa. Dra. Marília de Arruda Cardoso Smith
Profa. Dra. Vera Cristina Terra Bustamante
Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo
Prof. Dr. Carlos Alberto Mantovani Guerreiro

Data da defesa: 31 - 01 - 2008

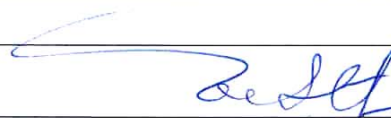
Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Iscia Teresinha Lopes Cendes



Membros:

Professor (a) Doutor (a) Marília de Arruda Cardoso Smith



Professor (a) Doutor (a) Vera Cristina Terra Bustamante



Professor (a) Doutor (a) Mônica Barbosa de Melo



Professor (a) Doutor (a) Carlos Alberto Mantovani Guerreiro



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

Data: 31/01/2008

DEDICATÓRIA

Para a minha família

Pois sem o amor, carinho e atenção

que foram depositados em mim

eu jamais teria conseguido chegar até aqui.

Meu muito obrigado às pessoas especiais que me acompanharam durante a minha longa jornada no Departamento de Genética Médica:

Danizinha e Simone, por todo fundamental apoio profissional que me deram neste trabalho sem o qual o mesmo não poderia ter sido realizado, mas principalmente pela amizade sincera de vocês duas.

Secolin, pela sua grande amizade, pelos momentos de descontração e pela enorme ajuda na realização deste trabalho.

Claudia, por sua valiosa amizade e também pelos conselhos que me deu durante todos estes anos de convivência.

André, Fábio Conti, Oni (parte da turma do almoço e do basquete) pela amizade, risadas e descontração da hora do almoço, impreterivelmente no Bandeirão, e pelas tentativas de aprender, junto comigo, a jogar basquete (se bem que o Oni mandava bem...).

Marilza, pelo exemplo de determinação que você é.

Anderson, companheiro de serão, pela amizade e convivência em todos estes anos de laboratório, república e corridas na FEF (se bem que o último foram só alguns meses...).

Rafa, Érika, Emiliane, Vinicius, Melina... Enfim o pessoal que está e que passou pela república, pela convivência de todos estes anos... Ao **Rafa** não posso deixar de agradecer à amizade e às tentativas de me tornar um atleta, mesmo que não tenham tido resultado, à **Érika** também agradeço pela amizade e, claro, pelas maravilhosas tortas de frango, presunto e queijo que por várias vezes mataram a minha fome.

Patty e Marcelo, companheiros na luta dos estudos funcionais do gene *LGII*, vocês sabem que este gene não é fácil!

Bel, minha irmã postiça, eu só tenho agradecimentos de ter você como amiga, pela atenção e disponibilidade em sempre me ouvir... Ao **Wantuir** também... Pena que é Flamenguista...

Iarinha, minha outra irmã postiça (vejam como a família aumentou), por sua grande amizade e preocupação que sempre demonstrou para comigo, pena você estar tão longe...

Danilo, grande amigo, pela sua importante amizade, além das sempre ótimas conversas e dos conselhos.

Romênia e Angela (do Hemocentro) pela vital ajuda com o MegaBace...**Angela**, meus agradecimentos por você ter, muitas vezes, “segurado a barra” aí no Hemocentro... **Mada**, pela sua enorme presteza em ajudar com os meios de cultura, géis de proteína e placas para crescimento de leveduras e bactérias... **Neide**, pela primordial ajuda no início dos estudos de ligação genômico.

Luciana, Milena, Érika, Bernardo, Marina, Zé Bola, Aline, Karina... À toda turma do laboratório de genética molecular, pela troca de idéias, convivência extremamente agradável e por tornarem o ambiente de trabalho um lugar tão bom.

Mia, Thiago e Paulo, pela amizade de todos estes anos e pelos sempre emocionantes “campeonatinhos”.

Elisabeth, pela preciosa contribuição na caracterização clínica dos pacientes com epilepsia autossômica dominante com auras auditivas.

Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo, por ter aberto as portas do laboratório de genética molecular para mim.

Prof. Dr. Fernando Cendes, pela atenção com que sempre me atendeu e pela vital contribuição na caracterização clínica e de neuroimagem dos pacientes participantes desta tese.

Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes, minha orientadora de longa data, por todos os anos de convivência, agradeço à confiança que sempre depositou na minha pessoa e em meu trabalho.

Minha mãe Véra, meu irmão Fernando e minha Vó Lira... Minha Família, pela dedicação, carinho, atenção, amor... Enfim por tudo, tudo mesmo... Sem vocês nada disto faria sentido e nem teria graça... Muito obrigado!

	PÁG.
RESUMO	<i>xxix</i>
ABSTRACT	<i>xxxiii</i>
1- INTRODUÇÃO	37
2- OBJETIVOS	59
3- CAPÍTULOS	63
4- DISCUSSÃO	183
5- CONCLUSÃO	201
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	205
7- ANEXOS	223

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>ADAM22</i>	<i>gene a disintegrin and metalloproteinase domain 22</i>
AG	adenina - guanina
AMPA	ácido propiônico a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole
<i>APOe2</i>	apolipoproteína E2
CF	crises febris
CG	citossina - guanina
CTCG	crises tônico-clônico generalizadas
DAE	drogas anti-epiléticas
DATP	adenosina deoxinucleotídeo trifosfato
DGTP	guanina deoxinucleotídeo trifosfato
DCTP	citossina deoxinucleotídeo trifosfato
DTTP	timina deoxinucleotídeo trifosfato
<i>DAB1</i>	<i>gene disable homolog 1</i>
DDC	distúrbios do desenvolvimento cortical
<i>DCX</i>	<i>gene doublecortin</i>
DMSO	dimetil sulfoxido
DFM	displasia frontometáfiseal
DHPLC	<i>denaturing high pressure liquid chromatography</i>
DNA	ácido desoxiribonucleico
<i>EMX1</i>	<i>gene empty spiracles 1</i>
<i>EMX2</i>	<i>gene empty spiracles 2</i>
EADAA	epilepsia autossômica dominante com auras auditivas

EH	esclerose hipocampal
ELAB	esquizencefalia de lábios abertos bilateral
ELAU	esquizencefalia de lábios abertos unilateral
ELFU	esquizencefalia de lábios fechados unilateral
ELT	epilepsia do lobo temporal
ELTM	epilepsia do lobo temporal mesial
ELTMF	epilepsia de lobo temporal mesial familiar
EPEP	epilepsia parcial com espículas perirolândicas
EPFFV	epilepsia parcial familiar com foco variável
<i>FGFR2</i>	gene receptor 2 do fator de crescimento de fibroblatos
<i>FLN1</i>	gene filamina 1
GT	guanina – timina
<i>GPR56</i>	gene receptor 56 acoplado à proteína G
HNP	heterotopia nodular periventricular
HNPB	heterotopia nodular periventricular bilateral
HB	homeobox
HSB	heterotopia subcortical em banda
IG	Imunoglobulina
Kd	kilodalton
<i>Kv1.1</i>	gene subunidade do canal de potássio voltagem dependente Kv1.1
<i>Kvbeta1</i>	gene subunidade beta 1 do canal voltagem dependente
LACC	lissencefalia com agenesia do corpo caloso
<i>LGII</i>	gene <i>leucine rich, glioma inactivated 1</i>
<i>LGI2</i>	gene <i>leucine rich, glioma inactivated 2</i>

<i>LGI3</i>	gene <i>leucine rich, glioma inactivated 3</i>
<i>LGI4</i>	gene <i>leucine rich, glioma inactivated 4</i>
LHC	lissencefalia com hipoplasia cerebelar
LIS	lissencefalia
<i>LIS1</i>	gene lissencefalia I
LRR	<i>leucine rich repeat</i>
<i>MASS1</i>	gene <i>monogenic, audiogenic seizure susceptibility</i>
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
OPD1	síndrome otopalatodigital tipo 1
OPD2	síndrome otopaltodigital tipo 2
<i>OTX1</i>	gene <i>orthodenticle 1</i>
<i>OTX2</i>	gene <i>orthodenticle 2</i>
<i>PAFAH1b1</i>	acetil hidrolase ativadora de plaquetas
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PMG	polimicrogria
RDNPM	retardo do desenvolvimento neuropsicomotor
<i>RELN</i>	gene <i>reelin</i>
RNA	ácido ribonucleíco
RM	ressonância magnética
SDS	dodecilsulfato de sódio
SLG	síndrome de Lennox-Gastaut
SMD	síndrome de Miller Dieker
SNPs	single nucleotide polymorphisms
SSCP	<i>single strand conformation polymorphism</i>

TC	tomografia computadorizada
TEMED – N,N,N,N	tetrametilenodiamina
<i>TUBA1A</i>	gene tubulina, alpha 1a
UTR	<i>untranslated region</i>
<i>VLDRL</i>	gene receptor de baixa densidade da lipoproteína
XLAG	lissencefalia com agenesia de corpo caloso ligada ao cromossomo X
WD	triptofano – aspartato

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Classificação em graus do espectro LIS-HSB.....	45
Tabela 2- Classificação das lissencefalias.....	49
Tabela 3- Mutações descritas até o momento no gene <i>EMX2</i> em pacientes com esquizecefalia.....	52
Tabela 4- Subtipos de ELT familiares	55
Tabela 5- Valores de <i>lod-score</i> para marcadores microsatélites do cromossomo 6.....	180
Tabela 6- Valores de <i>lod-score</i> de dois pontos para marcadores saturando o <i>locus</i> candidato no cr 6.....	181

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- RM de um indivíduo normal e de um paciente com HNP.....	42
Figura 2- RM de um indivíduo normal e de pacientes com espectro LIS-HSB.....	44
Figura 3- RM de pacientes com esquizencefalia bilateral e unilateral.....	51
Figura 4- RM de um indivíduo normal e de um paciente com polimicrogiria perisylviana bilateral.....	53
Figura 5- Gráfico mostrando a proporção de marcadores informativos e não informativos.....	178
Figura 6- Esquema da análise de ligação genômica randômica.....	179
Figura 7- Gráfico de análise de <i>lod-score</i> de múltiplos pontos para marcadores saturando a região candidata no cromossomo 6.....	182

RESUMO

A Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) e os distúrbios do desenvolvimento cortical (DDC) são duas das mais importantes causas de epilepsia. Avanços nos estudos de genética molecular levaram a descoberta de genes responsáveis por vários DDCs como a heterotopia nodular periventricular (HNP), o espectro da lissencefalia-heterotopia subcortical em banda (LIS-HSB), a esquizencefalia, a polimicrogiria e para um subtipo de ELT, a epilepsia autossômica dominante com auras auditivas (EADAA). Os principais objetivos deste projeto foram: 1) realizar uma triagem de mutações nos quatro principais genes associados aos DDC (*FLNI*, *LIS1*, *DCX* e *EMX2*) em um grande grupo de pacientes com este tipo de malformação, 2) mapear os *loci* para a EADAA, 3) investigar o mecanismo molecular das mutações identificadas. A triagem de mutações foi realizada através da técnica de *denaturing high performance liquid chromatography* (DHPLC) e subsequente sequenciamento automático dos fragmentos alterados. Para estudo funcional das mutações identificadas foi utilizada a técnica de HUMARA e PCR em tempo real. A análise de ligação foi realizada através da amplificação por PCR de marcadores microsatélites marcados com fluoróforos e análise dos alelos com os programas Fragment Profiler® e MLINK®. Um total de 108 pacientes com diferentes formas de DDC foi estudado, 13 pacientes possuem HNP, 19 são portadores do espectro LIS-HSB, 46 possuem esquizencefalia, enquanto 30 são afetados por polimicrogiria perisilviana bilateral. Nosso grupo também identificou quatro famílias segregando EADAA, sendo que duas possuem poder estatístico significativo para estudos de análise de ligação. Uma mutação deletéria G987C que altera o sítio de *splicing* do sexto intron do gene *FLNI* foi identificada em dois indivíduos relacionados, portadores da forma clássica e bilateral de HNP. Diferença no padrão de inativação do cromossomo X foi detectada como o provável fenômeno responsável pelas diferenças clínicas entre os dois pacientes. No grupo de pacientes com o espectro LIS-HSB, foi identificada uma mutação deletéria A1385C que altera uma histidina por uma prolina no aminoácido 277 da proteína LIS. Apenas alterações neutras foram identificadas no gene *DCX*. No grupo de indivíduos com esquizencefalia e polimicrogiria foram encontradas apenas variações neutras no gene *EMX2*. A análise de ligação foi positiva para um *locus* no cromossomo 10 apenas para uma família com EADAA. O sequenciamento automático de indivíduos afetados identificou uma mutação no gene *LGII* (IVS7-2A>G), além do mais, estudos de neuroimagem identificaram malformações

corticais em pacientes com mutações em *LGII*. Análise genética e de mutações na família de genes *LGI* e em *MASSI* identificou apenas variantes neutras nestes genes para as demais famílias estudadas. A análise de ligação genômica randômica em uma família com EADAA informativa e sem mutações em *LGII* identificou uma região candidata a possuir um gene implicado com esta síndrome no cromossomo 6q22 que, no entanto não foi confirmado pela análise subsequente de marcadores adicionais na região candidata. Através deste trabalho podemos concluir que: a) Mosaicismo, mutações em regiões não codificantes, grandes deleções e rearranjos, além da presença de casos atípicos, são fatores que podem estar influenciando na baixa frequência de mutações encontradas em pacientes com HNP e o espectro LIS-HSB, b) mutação no gene *FLNI* foi encontrada em casos familiares de HNP bilateral, c) o mecanismo patológico desta mutação é uma destruição do sítio de *splicing* do sexto intron do gene *FLNI*, d) as diferenças fenotípicas entre os dois pacientes portando esta mutação podem ser explicadas por diferenças no padrão de inativação do cromossomo X, e) mutações de sentido trocado no gene *LISI* são raras em pacientes com LIS-HSB e a localização das mesmas em domínios terminais WD não estão relacionados a fenótipos menos severos, f) a esquizencefalia e a polimicrogiria não têm base genética relacionada com o gene *EMX2*, g) a EADAA é uma entidade geneticamente heterogênea, já que mutações em *LGII* foram identificadas em apenas uma família com esta síndrome, h) malformações corticais em pacientes com EADAA e mutações em *LGII* foram descritas pela primeira vez, i) os genes pertencentes à família *LGI* e *MASSI*, não estão envolvidos com a etiologia da EADAA nas demais famílias analisadas, j) um *locus* candidato para o segundo gene responsável pela EADAA foi identificado no cromossomo 6q22, no entanto a saturação da região com marcadores adicionais não confirmou este achado.

ABSTRACT

Temporal Lobe Epilepsy (TLE) and malformations of cortical development (MCD) are two of the most important causes of epilepsy. Extensive molecular genetic studies have resulted in gene discovery for MCD such as periventricular nodular heterotopia (PNH), lissencephaly/ subcortical band heterotopia spectrum (LIS-SBH), schizencephaly, polymicrogyria and for a subtype of TLE, the autosomal dominant partial epilepsy with auditory features (ADPEAF). The main goals of this project were 1) to screen for mutations in the four main genes responsible for abnormal cortical development (*FLN1*, *LIS1*, *DCX* and *EMX2*) in a large cohort of patients with different types of cortical malformations 2) to map the *loci* for ADPEAF and 3) to investigate molecular mechanisms of mutations identified. Mutation screening was performed by the polymerase chain reactions (PCR). PCR products were analyzed by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) and were subsequently sequenced using standard automatic sequencer. In addition, HUMARA marker and Real Time PCR were performed to study molecular mechanisms resulting from the mutations identified. Linkage analysis was carried out by amplifying microsatellites markers by PCR and analyzing alleles with Fragment profiler® software and MLINK® package program. We have studied a total of 108 patients with MCD. Thirteen had PNH, 19 had the LIS-SBH spectrum, 46 individuals had schizencephaly and 30 had polymicrogyria. In addition we have identified four families segregating ADPEAF. Two families were considered informative for linkage analysis. We found a G987C mutation that alters the splicing site of the 6th intron of the *FLN1* gene in two related patients with classical PNH findings, skewed X chromosome inactivation was detected as the possible mechanism responsible for clinical differences between the two patients. In the LIS-SBH group, one patient with agyria/pachygyria had an A1385C transversion, which changes a histidine for a proline in amino acid 277 of the LIS1 protein. Furthermore, in the group of the schizencephalies and polymicrogyria we have detected only neutral variants in the *EMX2* gene. Linkage analysis in ADPEAF showed linkage to chromosome 10q in only one family. Automatic sequencing identified a mutation in the *LGII* gene. In addition, neuroimaging studies showed cortical malformations in patients with *LGII* mutations. Mutation and genetics analysis of the *LGI* gene family and *MASS1* in other pedigrees failed to show a role for these genes in the etiology of ADPEAF. A genome wide scan performed in a large family segregating ADPEAF point to a potential candidate

region on chromosome 6q22, which was not confirmed after further investigation with additional microsatellite markers. We conclude that: a) Mosaicism, mutations in non coding regions, large deletions and the presence of atypical cases could have contributed for the low frequency of mutations found in patients with PNH and the LIS-SBH spectrum b) we found mutations in the *FLNI* gene in familial cases of bilateral PNH, c) the pathologic mechanism of this mutation is the splicing site destruction of the 6th *FLNI* gene intron, d) phenotypic differences between the two related patients harboring this *FLNI* mutation were explained by a non random X chromosome inactivation, e) missense mutations in the *LIS1* gene are a rare finding in patients with the LIS-SBH spectrum and its localization in latter WD domains are not always related with less severe LIS, f) schizencephaly and polymicrogyria appear not to have a genetic background in the *EMX2*, since our study detected only a neutral polymorphism in these patients, g) ADPEAF is a genetically heterogeneous entity, since mutations in the *LGII* gene were identified only in one family with this syndrome, h) cortical malformation in the left temporal lobe was detected by the first time in individuals with ADPEAF and *LGII* mutations, i) *MASS1* and *LGI* gene family were not involved with ADPEAF etiology in the other pedigrees studied, j) a potential candidate *locus* to contain the second gene responsible for ADPEAF was identified in chromosome 6q22, however additional studies failed to confirm linkage in this region.

1- INTRODUÇÃO

A epilepsia pode ser definida como um grupo de doenças que têm em comum a ocorrência de crises epiléticas que recorrem na ausência de condições tóxico-metabólicas ou febris. As crises epiléticas são eventos clínicos que refletem a disfunção temporária de um conjunto de neurônios de parte do encéfalo ou de áreas mais extensas, sendo a manifestação clínica dependente da região do cérebro envolvida.

A epilepsia não possui barreiras sócio-econômicas, étnicas, geográficas, etárias ou sexuais e é o transtorno neurológico grave mais comum. Os problemas sociais e econômicos decorrentes desta condição a transformam em um problema de saúde pública mundial (Gomes, 1994; Gomes, 1997). Uma das características que contribui para a gravidade desta patologia é a refratariedade, ou seja, a resistência em ocorrer remissão dos episódios de crise ou se reduzir a frequência desses, mesmo quando o paciente é tratado com drogas anti-epiléticas (DAE).

Duas das maiores causas conhecidas de epilepsia refratária são os distúrbios do desenvolvimento cortical e a epilepsia do lobo temporal.

1. DISTÚRBIOS DO DESENVOLVIMENTO CORTICAL

Os distúrbios de desenvolvimento cortical (DDC) têm sido freqüentemente apontados como causa de epilepsia (Kuznieck et al., 1993). Um estudo relativamente recente desenvolvido no *Hôpital de la Salpêtrière* em Paris demonstrou que aproximadamente 8% dos pacientes com epilepsia que buscam atendimento em centros especializados, são portadores de algum tipo de DDC (Semah et al., 1998).

Até pouco tempo atrás a ocorrência de DDC era relacionada principalmente a insultos pré-natais (Palmini et al., 1994; Wyllie et al., 1996). No entanto, avanços importantes em duas áreas do conhecimento aparentemente não relacionadas, a elucidação dos mecanismos básicos de formação do córtex e a maior disponibilidade de exames de ressonância magnética (RM), têm demonstrado que os DDC também podem ser devidos a fatores genéticos.

Existem pelo menos três mecanismos principais pelos quais os DDC podem se desenvolver: (1) anormalidades da proliferação e diferenciação de neurônios e da glia; (2) anormalidades primariamente na migração neuronal e (3) anormalidades primariamente na organização cortical (Barkovich et al., 2001).

Esta divisão reflete as etapas de desenvolvimento embriológico do córtex cerebral, tópico fundamental para o entendimento destas malformações cerebrais.

1.2- O DESENVOLVIMENTO NORMAL DO CÓRTEX CEREBRAL

A formação do córtex cerebral pode ser dividida em três grandes estágios de desenvolvimento: proliferação, migração e diferenciação. Os precursores neuronais proliferam na zona ventricular e em seguida os neurônios pós-mitóticos migram para formar as estruturas que virão a se tornar o futuro córtex cerebral maduro (Allen et al., 1999).

As primeiras células que migram formarão uma estrutura acima da zona ventricular denominada de pré-placa. As demais ondas migratórias de neurônios irão então formar a placa cortical que irá dividir a pré-placa em uma camada mais externa denominada de zona marginal (futura camada I do córtex maduro) e uma camada mais interna chamada de sub-placa. Ao chegarem à placa cortical, os neurônios organizam-se em camadas que irão se desenvolver no córtex adulto. Este processo mostrou-se surpreendentemente complexo, havendo um padrão *'inside-out'* de deposição dos neurônios (Angevine et al., 1961). Em outras palavras, os neurônios recém chegados à placa cortical ultrapassam os neurônios mais antigos, acumulando-se progressivamente em camadas mais superficiais (Sidman et al., 1973).

A migração dos neurônios ocorre em sua maioria ao longo das células radiais gliais, no entanto, interneurônios gabaminérgicos seguem um padrão de migração tangencial, paralelo à superfície pial ou lateralmente dentro dos ventrículos (Van Slegtenhorst et al., 1998; Fishell et al., 1993; Tann et al., 1993; Walsh et al., 1992; O'Rourke et al., 1995).

Uma vez que os neurônios imaturos chegam as suas localizações definitivas estes estabelecem uma série específica de conexões pela extensão de seus axônios e dendritos. Estes fenômenos são característicos da fase de organização do córtex.

A interrupção dos mecanismos genéticos que orientam o desenvolvimento do córtex cerebral em qualquer um destes estágios irá potencialmente levar a diferentes tipos de malformações do desenvolvimento cortical.

1.3- DISTÚRBIOS DE DESENVOLVIMENTO CORTICAL: FASE DE MIGRAÇÃO

A fase de migração neuronal é definitivamente a etapa de desenvolvimento do córtex da qual se tem até o momento um maior conhecimento bioquímico e genético. Por tal motivo, não é surpresa que já se tenham descoberto vários distúrbios corticais que se originam de mutações em genes responsáveis pela síntese de proteínas envolvidas nas suas diversas etapas da migração, desde a saída dos precursores neuronais da zona ventricular até a parada do processo de migração quando estes mesmos precursores chegam as suas posições definitivas (Ross e Walsh, 2001).

Dentre as malformações corticais com base genética na fase de migração destacam-se as heterotopias nodulares periventriculares (HNP) e o espectro da lissencefalia (LIS)/heterotopia subcortical em banda (HSB).

1.3.1- Heterotopia Nodular Periventricular (HNP)

A HNP é um distúrbio na qual uma fração dos neurônios pós-mitóticos parece ser incapaz de deixar a zona ventricular resultando no adulto, em nódulos de neurônios diferenciados próximos da zona ventricular (figura 1), enquanto outros neurônios migram normalmente formando o córtex maduro (Eksioglu et al., 1996; Gleeson et al., 2000a).

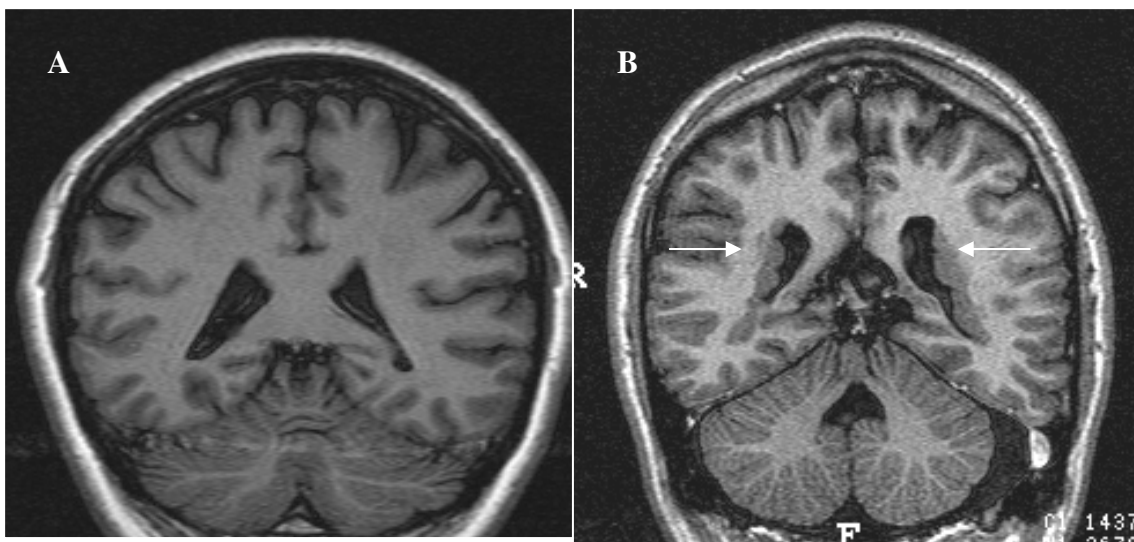


Figura 1- Cortes axiais de RM de um indivíduo normal (A) e de um paciente com HNP (B). Notar nódulos de neurônios ectópicos próximos aos ventrículos laterais (setas brancas).

Quando a HNP ocorre em famílias, o padrão de herança é similar ao de um gene dominante ligado ao cromossomo X, que afeta principalmente mulheres, já que os homens, em geral, não sobrevivem à gestação (Huttenlocher et al., 1994). A principal manifestação neurológica da HNP é a epilepsia (Dubeau et al., 1993), que provavelmente é consequência da localização heterotópica dos nódulos neuronais (Kothare et al., 1998), geralmente não havendo nenhuma deficiência grave nas funções cognitivas (Dubeau et al., 1995). Os homens afetados, quando sobrevivem ao termo, morrem precocemente devido a problemas de coagulação sanguínea (Fox et al., 1998). O gene responsável pela HNP foi clonado na região Xq28, possui 48 exons (Eksioglu et al., 1996) e seu produto foi identificado como a filamina 1 (FLN1), uma proteína de 280kD que realiza ligação cruzada com a actina, sugerindo que o papel da FLN1 na migração neuronal pode ser mediado através da modulação do citoesqueleto de actina (Fox et al., 1998). O fenótipo de HNP é, provavelmente, consequência de mutações que criam codons de parada prematuros ou alteram a matriz de leitura na região codificante 5' do gene, levando a uma perda de função da proteína (Fox et al., 1998), no entanto outros trabalhos identificaram mutações em outras regiões do gene (Sheen et al., 2001).

Recentemente mutações no gene *FLNI* foram detectadas em pacientes com múltiplas malformações congênitas, afetando estruturas craniofaciais, esqueleto, cérebro, vísceras e trato urogenital em quatro desordens ligadas ao cromossomo X: síndrome otopalatodigital tipos 1 (OPD1) e 2 (OPD2), displasia frontometáfiseal (DFM) e a síndrome de Melnick-Needles. (Robertson et al., 2003), demonstrando que nem sempre mutações neste gene são letais no período embrionário para homens. O espectro de fenótipos envolvendo este gene continua crescendo, com a descrição de pacientes com a síndrome de Ehler Danlos (Sheen et al., 2005), distrofia valvular cardíaca (Kyndt et al., 2006) e pseudo-obstrução intestinal crônica com envolvimento do sistema nervoso central (Gargiulo et al., 2007) portando mutações em *FLNI*.

A HNP é um distúrbio clínico e geneticamente heterogêneo já que apesar de mutações serem encontradas em praticamente 100% dos casos familiares, apenas 26% dos casos esporádicos apresenta mutações no gene *FLNI* (Sheen et al., 2001; Moro et al., 2002, Parrini et al., 2006). Este fato foi reforçado pelo achado de uma forma autossômica recessiva de HNP indistinguível em termos de neuroimagem da HNP clássica ligada ao X, com mutações no gene *ARFGEF2* (Sheen et al., 2003; Sheen et al., 2004) e de indivíduos portando HNP associadas a anormalidades citogenéticas no braço curto do cromossomo 5 (Sheen et al., 2003), cromossomo 7q11 (Ferland et al., 2006) e cromossomo 1p36 (Neal et al. 2006). Além disso, existem relatos de HNP associada às síndromes de pterígeo múltiplo (Holtmann et al., 2001) e também à síndrome de Allgrove (Zeharia et al., 1999), doença celíaca e palatoesquize (Intiso et al., 1998), megaencefalia (Jan et al., 1999) e retardo mental (Guerrini et al., 1998).

1.3.2- Espectro da lissencefalia (LIS)-heterotopia subcortical em banda (HSB)

A HSB ou córtex duplo é o extremo menos grave do espectro da LIS-HSB e caracteriza-se por uma banda anormal de neurônios na substância branca em um córtex aparentemente normal (Raymond et al., 1995; Barkovich et al., 2001) (figura 2). A gravidade das manifestações clínicas, epilepsia e retardo mental variam com o tamanho da banda heterotópica (Barkovich et al., 1994).

Os pacientes com LIS clássica ou tipo I demonstram um fenótipo mais grave, sendo caracterizados pela ausência (agiria) ou diminuição (paquigiria) das circunvoluções da superfície do córtex (Aicardi, 1991) (figura 2). A LIS tipo I está associada com profundo retardo mental e crises epiléticas intratáveis, estando também presente na síndrome de Miller-Dieker que além desta malformação cortical vem acompanhada de uma série de dismorfismos faciais (Dobyns et al., 1991; Dobyns et al., 1992). Quando o paciente apresenta apenas LIS tipo I e não possui todas as características faciais que façam com que o mesmo seja classificado como portador da Síndrome de Miller-Dieker, é relatado que este indivíduo possui a Síndrome da Lissencefalia Isolada.

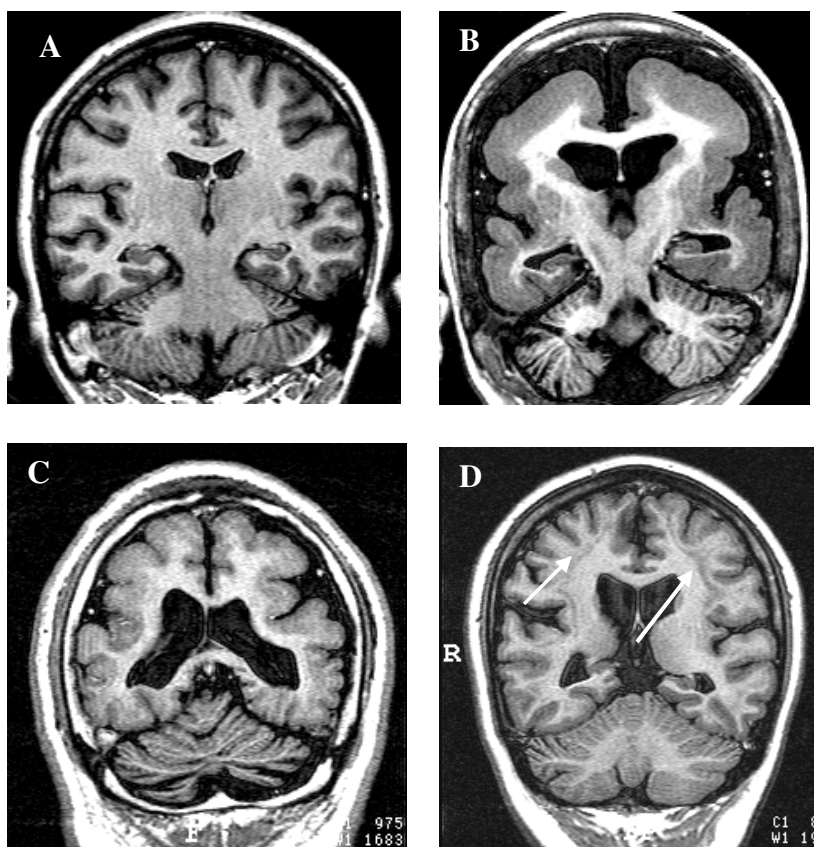


Figura 2- Cortes axiais de RM de um indivíduo normal (A) e de pacientes com espectro LIS-HSB (B, C e D). Notar a ausência de giros no paciente B caracterizando agiria, a presença de giros rasos no paciente C caracterizando paquigiria e uma banda de neurônios ectópicos na substancia branca do paciente D, característica de HSB (setas brancas).

A tabela abaixo resume os diferentes graus de malformação que podem ser encontrados nos indivíduos portadores do espectro da LIS-HSB.

Tabela 1- Classificação em graus do espectro LIS-HSB

Grau	Descrição
1	agiria difusa
1a	agiria difusa com simplificação dos giros orbitofrontais e temporais anteriores
1b	agiria difusa com simplificação dos giros anteriores temporais
2	agiria difusa com poucos sulcos rasos
2a	agiria difusa com poucos sulcos rasos sobre os pólos temporal e frontal e simplificação dos giros temporais anteriores e orbitofrontais
2b	agiria difusa com poucos sulcos rasos sobre os pólos occipitais e simplificação dos giros temporais anteriores
3	agiria e paquigiria
3a	paquigiria frontal e agiria posterior com simplificação dos giros temporais anteriores e orbitofrontais
3b	agiria frontal e paquigiria posterior com simplificação dos giros temporais anteriores
4	paquigiria difusa ou parcial
4a	paquigiria difusa posterior >anterior com simplificação dos giros orbitofrontais e temporais anteriores
4a2	paquigiria posterior transicionando para córtex normal anteriormente
4b1	paquigiria difusa anterior > posterior com simplificação dos giros temporais anteriores
4b2	paquigiria frontal com giros posteriores normais e simplificação dos giros temporais anteriores
5	paquigiria e HSB
5a	HSB frontal e paquigiria posterior
5b	paquigiria frontal e HSB posterior
6	HSB
6a1	banda completa ou quase completa com predominância posterior
6a2	banda fina posterior
6b1	banda espessa e completa com predomínio anterior
6b2	banda média e completa com predomínio anterior
6b3	banda completa e fina com predomínio anterior
6b4	banda fina frontal

HSB = heterotopia subcortical em banda; (modificado de Dobyns et al., 1999)

Tanto a LIS tipo I como a HSB têm sido observadas dentro das mesmas genealogias ou esporadicamente. Em várias famílias, mulheres com HSB têm filhos com LIS, deficiência mental profunda e epilepsia, enquanto as filhas desenvolvem HSB e deficiência mental leve, sugerindo o envolvimento de um único gene ligado ao X (Pinard et al., 1994). Este *locus* foi mapeado na região Xq21-q24 (Ross et al., 1997) e o gene clonado em Xq22.3-q23. O gene recebeu a denominação de doublecortina (*DCX*) e possui 9 exons (6 codificantes) (Des Portes et al., 1998). O produto de expressão deste gene é uma proteína que se associa a microtúbulos (Francis et al., 1999; Gleeson et al., 1999).

A LIS tipo I também pode ser causada por mutações e deleções em um gene localizado no cromossomo 17p13.3: o *LIS1* (Ledbetter et al., 1992; Lo Nigro et al., 1997; Reiner et al., 1993). Aproximadamente 65% dos pacientes com LIS possuem mutações intragênicas ou deleções envolvendo o gene *LIS1* que possui 11 exons (Cardoso et al., 2000), sendo que deleções envolvendo o gene *LIS1* são o evento mutacional predominante (Piltz et al., 1998). Em um total de 220 crianças com LIS (incluindo a Síndrome da Lissencefalia Isolada e a Síndrome de Miller-Dieker) foram encontradas deleções em 98 pacientes enquanto 33 tinham mutações intragênicas (Lo Nigro et al., 1997; Pilz et al., 1998, Pilz et al. 1999; Cardoso et al., 2000). Um estudo conduzido por Sakamoto et al. (1998) confirmou a alta taxa de deleções como o principal evento mutacional, mostrando 6 indivíduos portando deleções de um total de 12 com a Síndrome da Lissencefalia Isolada e somente 1 mutação intragênica detectada por SSCP. No entanto, apesar dos dados apontarem para uma predominância de deleções, Fogli et al. (1999) estudando mutações em 24 pacientes encontrou grandes deleções do gene *LIS1* em apenas três e mutações intragênicas em sete indivíduos.

O gene *LIS1* codifica a subunidade β da isoforma cerebral de uma acetil-hidrolase ativadora de plaquetas (PAFAH1b1) (Chong et al., 1994; Reiner et al., 1993; Hattori et al., 1994). O papel do fator ativador de plaquetas na migração neuronal está envolvido com fenômenos de diferenciação celular neuronal e cascatas de indução críticas para o desenvolvimento cortical (Garcia-Higuera et al., 1996; Ho et al., 1997).

Diferente do encontrado para *LIS1*, a maioria das mutações identificadas no gene *DCX* são mutações de sentido trocado. Mutações na região codificante do gene *DCX* foram encontradas em todos os casos familiares publicados até o momento (Matsumoto et al., 2001), no entanto a taxa de detecção de mutações em casos esporádicos varia entre 38 e 85% (Gleeson et al., 2000a; des Portes et al., 1998; Matsumoto et al., 2001; Sicca et al., 2003). A HSB raramente afeta homens, no entanto existem casos associados a mutações no gene *DCX* ou *LIS1* (Pilz et al., 1999). D'Agostino et al. (2002) publicaram uma amostra de 30 homens portando HSB, dos quais 24 possuíam análise completa dos genes *LIS1* e *DCX*, encontrando mutações nos genes *LIS1* e *DCX* em apenas um e sete pacientes respectivamente. Este estudo mostrou que a HSB em homens é uma síndrome heterogênea tanto clínica como geneticamente.

Um ponto interessante envolvendo os dois genes citados foi a observação de que as regiões do cérebro mais afetadas diferem entre os pacientes com mutações em *DCX* e *LIS1* (Pilz et al., 1998). As mutações em *DCX* resultam em LIS com anormalidades mais localizadas na região frontal, consistente com o padrão de expressão de *DCX* no córtex frontal (Sossey-Alaoui et al., 1998). Por outro lado, mutações em *LIS1* afetam mais as regiões occipital e parietal. No entanto, as similaridades no fenótipo, tais como a perda de foliação e o espessamento do córtex, ocasionadas por mutações nesses dois genes, levam a sugerir que *DCX* e *LIS1* estejam envolvidos nos mesmos mecanismos que controlam a migração neuronal. Já as diferenças nas regiões do cérebro mais acometidas apontam para uma participação em vias de transdução de sinal relacionadas, porém distintas (Allen et al., 1999).

Novos genes para lissencefalia têm sido descobertos, um deles está localizado em 7q22 (Hong et al., 2000). Este gene é o homólogo humano ao gene Reelina (*Reln*), cuja identificação se deu em uma linhagem de ratos (*reeler*) que apresenta um quadro de LIS semelhante ao encontrado em humanos portadores de mutações neste gene (D'arcangelo et al., 1995; Hirotsune et al., 1995). O gene *REELN* codifica uma grande proteína de 388Kd que é secretada (D'arcangelo et al., 1995) e atua na migração dos neurônios corticais. As características deste tipo de LIS diferem das encontradas na LIS clássica do tipo 1, pois existem anormalidades severas também no hipocampo, medula

espinhal e hipoplasia cerebelar. Além disso, um padrão de herança autossômico recessivo foi demonstrado nessas famílias (Hong et al., 2000). Pacientes com um quadro não idêntico, porém muito semelhante, principalmente em relação às malformações de cerebelo, foram identificados como sendo portadores de mutações em *VLDLR*, conhecido por codificar o receptor da proteína REELN (Boycoot et al., 2005). Foi descrita também uma forma de lissencefalia ligada ao X com agenesia de corpo caloso e genitália ambígua com mutações no gene *ARX*, um gene *homeobox* com expressão em interneurônios do telencéfalo (Kitamura et al., 2002). Recentemente mutações no gene *TUBA1A* que codifica a α tubulina, uma proteína associada à microtubulos, foram identificadas em pacientes com vários graus de LIS associado a um amplo espectro de malformações como hipoplasia cerebelar e de tronco encefálico, desorganização do hipocampo, agenesia completa ou parcial do corpo caloso e alargamento dos ventrículos (Keays et al., 2007; Poirier et al., 2007).

A tabela 2 resume as categorias do espectro LIS-HSB relatadas até o momento. Fica evidente pela tabela, que devido à grande variabilidade fenotípica é de vital importância um estudo de neuroimagem detalhado para que uma classificação correta seja efetuada.

Tabela 2-Classificação das lissencefalias

Malformações devido à migração neuronal anormal
A. Espectro das lissencefalias e Heterotopia Subcortical em Banda
1-) Mutações em <i>LIS1</i>
a-) Síndrome de Miller-Dieker com deleção de <i>LIS1</i> e genes teloméricos
b-) Síndrome da Lissencefalia Isolada (SLI) com mutações em <i>LIS1</i>
c-) HSB com mutações em <i>LIS1</i>
2-) Mutações em <i>DCX</i>
a-) Lissencefalia com mutações em <i>DCX</i>
b-) SLI com mutações em <i>DCX</i>
c-) Paquigiria central com mutações em <i>DCX</i>
d-) HSB com mutações em <i>DCX</i>
3-) Mutações em <i>ARX</i>
a-) Lissencefalia posterior > anterior com agenesia do corpo caloso e genitália ambígua
b-) Espasmos infantis ligado ao cr X, retardo mental ou agenesia do corpo caloso
4-) Mutações em <i>REEEN</i> e <i>VLDLR</i> – paquigiria associada a extrema hipoplasia cerebelar
5-) Outras síndromes de LIS e paquigiria
a-) com cerebelo normal
i-) paquigiria paracentral
ii-) síndrome de Baraitser-Winter
iii-) paquigiria frontotemporal autossômico recessiva
iv-) outros <i>loci</i> para lissencefalia e HSB
b-) Lissencefalia com hipoplasia cerebelar (LHC)
i-) LHC com agiria difusa, microcefalia extrema, ausência de corpo caloso, hipoplasia do tronco encefálico e hipoplasia cerebelar de moderada a severa
ii-) LHC com agiria e paquigiria difusa, microcefalia severa, moderada hipoplasia do tronco encefálico e do cerebelo
iii-) LHC com paquigiria, microcefalia moderada, tronco encefálico normal, moderada hipoplasia do vermis, hemisférios cerebelares preservados
iv-) LHC com agiria frontal e abrupta transição para uma sulcação posterior simplificada, microcefalia leve, tronco encefálico normal, hipoplasia do vermis moderada
6-) Lissencefalia, ainda não classificada
a-) Lissencefalia com deficiência de linfócitos T
b-) Síndrome de Winter-Tsukahara
(Modificado de Barkovich et al., 2005)

1.4- DISTÚRBIOS DE DESENVOLVIMENTO CORTICAL: FASE DE ORGANIZAÇÃO

A esquizencefalia, um tipo de DDC classificada como uma anormalidade da organização cortical é considerada, na maioria das vezes, como consequência de insultos ambientais. No entanto, evidências de um comprometimento gênico foram apresentadas (Brunelli et al., 1996.). Esta patologia tem sido descrita como um distúrbio congênito extremamente raro caracterizado por fendas localizadas dentro dos hemisférios cerebrais (Barkovitch et al., 1996) (figura 3). Estas fendas são cercadas pela substância cinzenta e na maioria das vezes envolvem as regiões perisylvianas (Wolpert et al., 1992). Áreas extensas dos hemisférios cerebrais podem estar ausentes, sendo substituídas pelo líquido cérebro-espinhal. Os pacientes com esquizencefalia são clinicamente caracterizados por atraso no desenvolvimento motor e intelectual que é proporcionalmente mais grave conforme a extensão das malformações cerebrais, além de serem freqüentemente afetados por epilepsia (Barkovich e Kjos, 1992; Granata et al., 1996). Foram caracterizados dois tipos de esquizencefalia, dependendo da magnitude da área envolvida e do tamanho das fendas (Wolpert et al., 1992). A esquizencefalia do tipo I (fendas com lábios fechados) é a menos grave e os pacientes são freqüentemente normais, no entanto eles podem apresentar crises epilépticas e ter algum grau de espasticidade. A esquizencefalia do tipo II (fendas com lábios abertos) apresenta a maioria das anormalidades descritas nos parágrafos anteriores, no entanto sua manifestação clínica é bem mais severa.

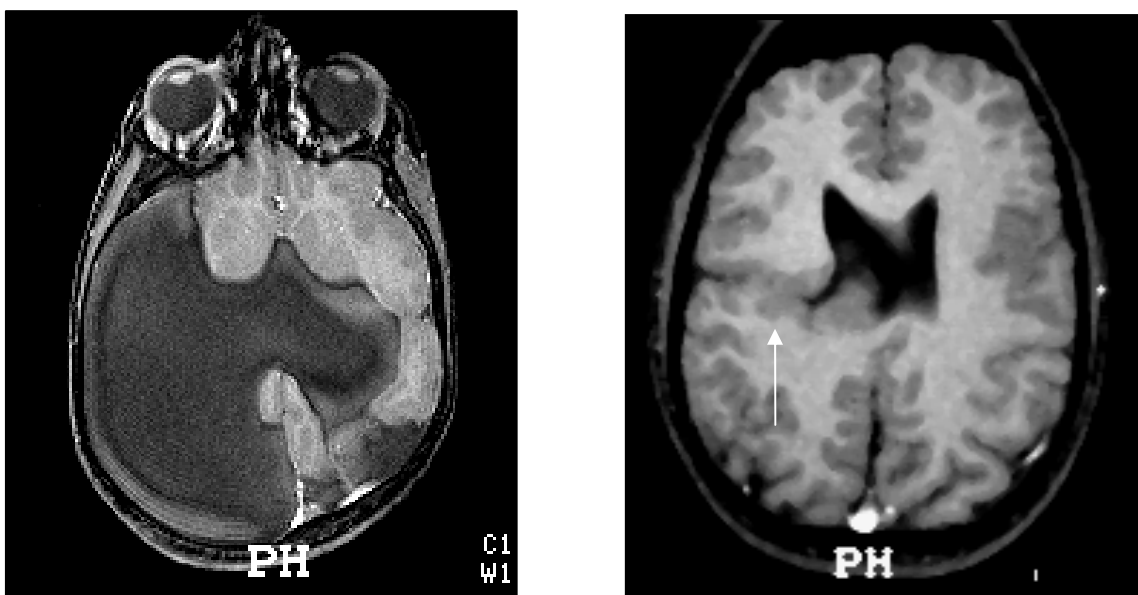


Figura 3- Cortes Axiais de RM de pacientes com esquizencefalia bilateral (A) e unilateral (B). Notar o preenchimento das áreas ausentes do córtex com líquido cérebro-espinhal (A) e de substância cinzenta na borda das fendas (B) (seta branca).

Em uma pesquisa procurando detectar mutações em genes humanos homólogos a *Emx1*, *Emx2*, *Otx1* e *Otx2* que são expressos no prosencéfalo em desenvolvimento de ratos, Brunelli et al. (1996) encontraram que três de oito pacientes com esquizencefalia tipo II eram heterozigotos para diferentes mutações no gene *EMX2*. Mais tarde Faiella et al. (1997) analisaram geneticamente 18 indivíduos afetados detectando pelo menos 13 portadores de mutação em *EMX2* em condição heterozigótica. Estes dois trabalhos solidificaram a hipótese de que a esquizencefalia pode ter causas predominantemente genéticas. A tabela abaixo resume as mutações descritas até o momento na literatura para pacientes portadores de esquizencefalia (tabela 3).

Tabela 3- Mutações descritas até o momento no gene *EMX2* em pacientes com esquizencefalia

Paciente	Esquizencefalia	Mutação	Mecanismo
1	bilateral e severa	inserção de 1 base no hb	sem sentido
2	bilateral e severa	substituição sinonímia no hb	desconhecido
3	bilateral e severa	deleção de 2 bases no intron 2	desconhecido
4	bilateral e severa	substituição no sítio de <i>splicing</i> 3' do intron 1	sítio de <i>splicing</i>
5	bilateral e severa	substituição na primeira base do exon 2	sítio de <i>splicing</i> , sentido trocado
6	bilateral e severa	substituição na primeira base do exon 2	sítio de <i>splicing</i> , sentido trocado
7	bilateral e severa	substituição no sítio de <i>splicing</i> 3' do intron 1	sítio de <i>splicing</i>
8	unilateral e leve	substituição sinonímia dentro do hb	desconhecido
9	unilateral e leve	substituição sinonímia dentro do hb	desconhecido
10	unilateral e leve	substituição sinonímia dentro do hb	desconhecido
11	unilateral e leve	substituição sinonímia dentro do hb	desconhecido
12	unilateral e leve	deleção de uma base dentro do intron 2	desconhecido
13	unilateral e leve	substituição de uma base dentro do intron 2	desconhecido

hb= domínio *homeobox*

O gene *EMX2* possui 3 exons e 2 introns e localiza-se em 10q26.1, pertencendo ao grupo de genes *Emx*, uma família de genes *homeobox* homóloga ao gene *ems* (*empty spiracles*) de *Drosophila* que, quando mutado, é responsável por defeitos na fase de segmentação asa-cérebro do inseto (Hirth et al., 1995).

Acredita-se que, em mamíferos, o *EMX2* pode ter um papel como inibidor da proliferação celular ou como um regulador positivo da diferenciação neuronal (Cecchi et al., 2000). A medida dos níveis de expressão de *EMX2*, tanto do seu RNA como da proteína (Mallamaci et al., 1998), sugerem que este gene contribui para a polaridade cortical, identidade celular e no processo inicial de definição de regiões que ocorre na zona ventricular. No entanto, permanece ainda controversa a participação deste gene na etiologia da esquizencefalia, pois a literatura especializada é muito escassa em relação a estudos genéticos feitos com indivíduos portando este tipo de malformação.

1.4.1- Relação entre esquizencefalia, polimicrogiria e mutações no gene *EMX2*

A polimicrogiria é caracterizada por um número excessivo de pequenos e proeminentes giros separados por sulcos rasos e espaçados (figura 4). A polimicrogiria pode ser focal ou difusa, unilateral ou bilateral. Além do mais, a polimicrogiria pode ocorrer isolada ou em associação com outras malformações como heterotopia (Wieck et al., 2005), lesões da substância branca ou como parte de síndromes com múltiplas anomalias e retardo mental. O espectro de manifestações clínicas varia de indivíduos com leve atraso cognitivo e nenhuma ou pouca crise epilética (Galaburda et al., 1985), até pacientes com encefalopatia severa e epilepsia intratável (Guerrini et al., 2002). Várias síndromes apresentando polimicrogiria bilateral têm sido descritas, dentre as quais podemos destacar a polimicrogiria perisylviana bilateral, (Kuzniecky et al., 1993a), a polimicrogiria parietooccipital parasagital bilateral (Guerrini et al., 1997) e a polimicrogiria frontal bilateral (Guerrini et al., 2000), estas diferentes formas podem representar entidades distintas que refletem a influência de genes expressos regionalmente.

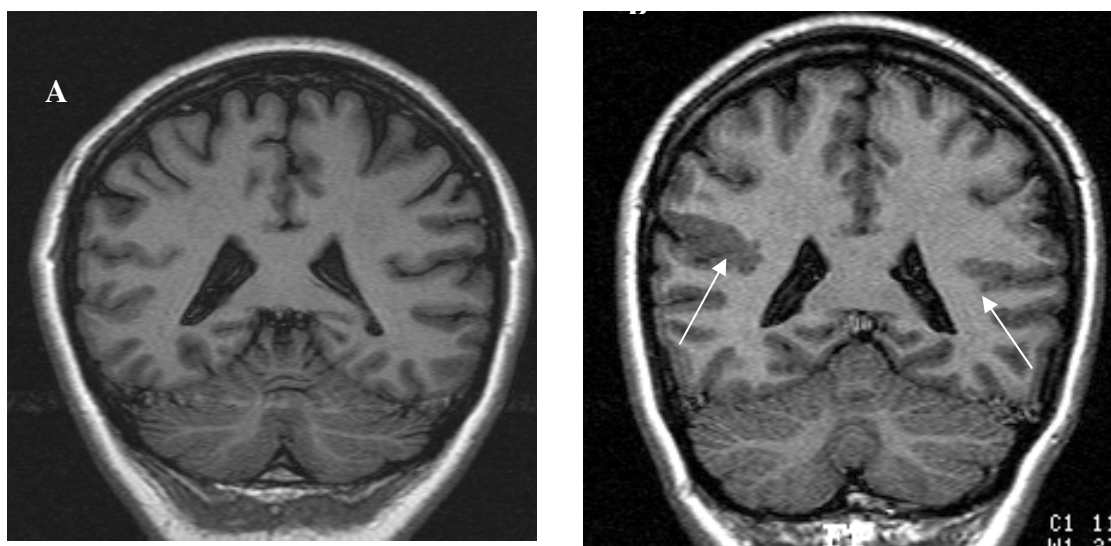


Figura 4- Cortes coronais de RM de um indivíduo normal (A) e de um paciente com polimicrogiria perisylviana bilateral (B) (setas brancas).

É importante destacar que a polimicrogiria está presente frequentemente nas bordas das fendas características da esquizencefalia, sendo sugerido que ambas as malformações podem fazer parte de um mesmo espectro clínico (Barkovich, et al., 1992; Guerreiro et al., 2002). Como mutações em heterozigose no gene homeobox *EMX2* foram relatadas em alguns pacientes esporádicos e em casos familiares com esquizencefalia (Brunelli, et al., 1996; Faiella, et al., 1997), seria possível que mutações no gene *EMX2* fossem detectadas em pacientes com polimicrogiria.

2- EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL

Dentre os vários tipos de epilepsias, a epilepsia do lobo temporal (ELT) é a mais freqüente em adultos, representando cerca de 40% do total de casos (Sutula, 1990). Somente nos Estados Unidos são 2.5 milhões de pessoas afetadas sendo cerca de 40% dos pacientes refratários ao tratamento (De Lanerolle et al., 2005). A doença é caracterizada por crises parciais, que podem ou não se generalizar. As crises se originam na porção medial do lobo temporal no caso da epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM), sendo que a atividade epileptiforme na ELT pode envolver o lobo temporal medial/rede límbica (Spencer et al., 2002). Incluídos nesta rede estão o hipocampo, amígdala, córtex entorrinal, neocórtex temporal lateral, tálamo medial e a porção inferior dos lobos frontais (Spencer et al., 2002).

Dentro do grupo das ELT um subtipo foi descrito: a Epilepsia Autossômica Dominante com Auras Auditivas (EADAA). A EADAA é uma síndrome benigna com início das crises entre a primeira e a terceira década de vida, nenhuma anormalidade detectada em exames de ressonância magnética (RM) e sem associação com crises febris. Os indivíduos portadores desta síndrome apresentam a ocorrência de aura com componente auditivo e/ou afasia ictal, algumas vezes disparadas por ruídos ou sons no ambiente, que precedem as crises parciais complexas.

2.1- GENÉTICA DAS EPILEPSIAS DO LOBO TEMPORAL

Tradicionalmente a ELT tem sido reconhecida como um distúrbio adquirido, muitas vezes secundário a lesões como esclerose hipocampal, tumores, traumas, malformações vasculares e distúrbios de migração neuronal (Bruton, 1988). Falconer et al., (1964), entretanto, estudando a etiologia da ELT em 110 casos refratários, demonstrou que 95% dos casos eram devido a algum tipo de patologia cerebral, mas também apontou que “as lesões, entretanto, poderiam se desenvolver em um cérebro já predisposto às convulsões”. Nos últimos anos vem se tornando evidente o envolvimento de fatores genéticos na etiologia das ELT. A tabela abaixo resume os subtipos de ELT familiares (Tabela 4).

Tabela 4- Subtipos de ELT familiares.

Síndrome	Síndromes de ELTMF				ELT em Síndromes de Epilepsia Parcial	
	EADAA	ELTMF sem EH, sem CF	ELTMF frequentemente associada com EH e com ou sem CF	ELTMF com CF e geralmente sem EH	EPFFV	EPEP
Idade de início	8 anos à 4ª década	10 anos à 4ª década	1 ano à 3ª década	1 ano à 2ª década	1 ano à 4ª década	2 anos à 2ª década
Principais características	Auras auditivas, sensoriais	Aura autonômica, psíquica			Crises com origens focais variadas em diferentes membros da família	Múltiplos tipos de crises no mesmo indivíduo
EEG	Descargas temporais raras	Descargas temporais raras	Descargas temporais freqüentes	Descargas temporais ocasionais	Descargas temporais ocasionais	Espículas pericentraes freqüentes
RM	Normal	Normal	EH	Normal	Normal	Normal
Progresso	Geralmente benigno	Geralmente benigno	Frequentemente refratário	Variável	Variável	Geralmente benigno
Ligação	10q	4q	18p	18q, 1q (?), 12q	22q, 2q (?)	4p
Genes	<i>LGII</i>	-	-	-	-	-

EADAA = Epilepsia Autossômica Dominante com Auras Auditivas, ELTMF = Epilepsia do Lobo Temporal Mesial Familiar, EPFFV = Epilepsia Parcial Familiar com Foco Variável, EPEP = Epilepsia Parcial com Espículas Periolândicas, CF = crises febris, EH = esclerose hipocampal, (modificado de Valdlamudi et al., 2003).

2.2- GENÉTICA DA EPILEPSIA AUTOSSÔMICA DOMINANTE COM AURAS AUDITIVAS

O primeiro relato de uma grande família com padrão de herança autossômico dominante com EADAA foi realizado por Ottman et al. (1995) que também descreveu ligação no cromossomo 10q para esta síndrome. Famílias com características clínicas e padrão de herança similar foram descritas sendo o *locus* mapeado na mesma região (Poza et al., 1999; Brodtkorb et al., 2002). Após oito anos de estudo, Kalachikov et al. (2002) descreveram o gene *LGII* como sendo o responsável por esta síndrome. Este gene foi primeiramente identificado em gliomas de alto grau nos quais foi encontrado deletado em ambos os alelos (Chernova et al., 1998). Estudos recentes confirmaram que mutações no gene *LGII* são responsáveis pela EADAA (Gu et al., 2002, Morant-Redolat et al., 2002; Fertig et al., 2003; Michelluti et al., 2003; Pizutti et al., 2003; Berkovic et al., 2004; Hedera et al., 2004 e Ottman et al. 2004). No entanto, foram descritas famílias com características clínicas similares e que não possuíam mutações no gene *LGII* (Bisuli et al., 2002; Michelucci et al., 2003) Acredita-se que cerca de 50% das famílias com EADAA possuem mutações em genes ainda não identificados (Ottman et al., 2004).

O gene *LGII* ocupa cerca 36.9kb e consiste de 8 exons que variam entre 72 e 1197pb. O seu RNAm possui uma região 3' *Untranslated Region* (UTR) de 262pb e uma *Open Reading Frame* (ORF) de 1.674pb. (Chernova et al., 1998). A estrutura da proteína LGII mostra uma sequência peptídeo sinal na região 5' e três repetições funcionais ricas em leucina (LRR – *leucine rich repeat*) flanqueadas por *clusters* de sequências ricas em cisteína. A região carboxi terminal é composta por duas repetições diretas em *tandem* e um possível domínio transmembrana. Todas as proteínas contendo domínios LRR estão envolvidas em processos de ligação, interações proteína-proteína e vias bioquímicas de transdução de sinal (Kobe e Deisenhofer, 1994; Kobe e Deisenhofer, 1995). A presença de quatro resíduos de cisteína flanqueando as repetições LRR pode indicar que o gene *LGII* pertence ao maior grupo da superfamília das proteínas LRR: a dos receptores e proteínas adesivas (Kobe e Deisenhofer, 1994).

É importante destacar que todos os genes identificados anteriormente como causadores de epilepsias idiopáticas em humanos eram canais iônicos voltagem dependente ou ligante dependente (Meisler et al., 2001). O gene *LGII* não é homólogo a nenhum canal iônico humano conhecido sendo, portanto o primeiro gene identificado responsável por uma epilepsia idiopática que não se encaixa neste grupo. Apesar de não haver nenhum dado experimental direto sobre as funções do gene *LGII*, sua homologia com outros genes codificando proteínas contendo repetições LRR e seu possível papel na progressão de gliomas sugere funções envolvidas com comunicação e migração celular e neuronal e guia axonal no desenvolvimento do sistema nervoso central (Kalachikov et al., 2002). Além disso, recentemente Kunapuli et al., (2003) demonstraram que a expressão de *LGII* reduz de forma significativa a proliferação e habilidade migratória do glioma. O mesmo grupo, utilizando *chips* de expressão da Affimetrix detectou alterações significativas nos níveis de expressão de genes associados com elementos da matrix extracelular, como genes de colágeno (superexpressos) e metaloproteinases (hipoexpressos) (Kunapuli et al., 2004). Desta forma, talvez o gene *LGII* esteja envolvido com mecanismos celulares de controle da migração e invasividade.

No entanto, dados interessantes sobre os possíveis papéis do gene *LGII* na epileptogênese assim como sua participação em eventos sinápticos tem sido descritos na literatura recentemente. Schulte et al., (2006) demonstrou por espectrometria de massa que a proteína LGI1 se complexa com Kv1.1, o maior constituinte dos canais pré-sinápticos tipo A que modulam a transmissão sináptica no sistema nervoso central. A LGI1 agiria removendo seletivamente a rápida inativação mediada pela subunidade Kvbeta1. O exato mecanismo molecular pelo qual LGI1 inibiria a inativação de Kvbeta1 ainda não é claro, entretanto supõe-se que este efeito possa se dar por mecanismos que atuariam prevenindo o acesso do domínio de inativação ao poro do canal ou por oclusão do domínio de ativação mediado diretamente por interações proteína-proteína. Fukata et al., (2006) também utilizando espectrometria de massa mostrou que ADAM22, uma proteína transmembrana, que quando mutada leva à epilepsia, funciona como um receptor para LGI1. A ligação de LGI1 a ADAM22 levaria a um aumento da transmissão sináptica via AMPA.

2- OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Analisar a presença de mutações nos genes *FLN1*, *LIS1*, *DCX* e *EMX2* em um grupo de pacientes com distúrbios de desenvolvimento cortical,
2. Mapear os *loci* para EADAA, primeiramente utilizando a estratégia de genes candidatos, e em seguida a análise genômica randômica se necessário.
3. Estudar o mecanismo molecular das mutações encontradas nos genes pesquisados.

3- CAPÍTULOS

CAPÍTULO 1

ARTIGO 1

MUTATION SCREENING IN A COHORT OF PATIENTS WITH NEURONAL MIGRATION DISORDERS

Fábio Rossi Torres¹, Daniela Aguiar de Sousa-Kols¹, Simone Sayuri Tsuneda¹,
Maria Augusta Montenegro², Marilisa Mantovani Guerreiro², Fernando Cendes²,
Ischia Lopes-Cendes¹

Mutation screening in a cohort of patients with neuronal migration disorders

Fábio Rossi Torres¹, Daniela Aguiar de Souza-Kols¹, Simone Sayuri Tsuneda¹,
Maria Augusta Montenegro², Marilisa Mantovani Guerreiro², Fernando Cendes²,
Iscia Lopes-Cendes¹

Departments of Medical Genetics ¹ and Neurology ², Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

Running title: Mutations in neuronal migration disorders

Keywords: neuronal migration disorders, genetics, mutation

Correspondence to: Iscia Lopes-Cendes, MD, PhD

Department of Medical Genetics,

University of Campinas - UNICAMP

Tessália Vieira de Camargo, 126

Campinas SP, Brazil, 13084-971

Tel: +55 19 35218907

FAX: +55 19 3289-1818

Email: icendes@unicamp.br

In press – Molecular Neuroscience

ABSTRACT

Background/Objective: Mutations in three genes, *FLN1*, *LIS1* and *DCX* are responsible for neuronal migration disorders including bilateral periventricular nodular heterotopia (BPNH), classical lissencephaly (LIS) and subcortical band heterotopia (SBH). We describe here, clinical, neuroimaging and molecular findings in a group of 32 patients with classical and atypical forms of these disorders.

Methods: Thirty patients had high resolution magnetic resonance imaging (MRI) while two patients had computerized tomography scans (CT). We searched for mutations in *FLN1* (six first coding exons), *LIS1* and *DCX* genes in all 32 patients and 50 unrelated control subjects.

Results: Nine patients had atypical periventricular nodular heterotopia (PNH) and four had classical BPNH, while 10 patients had LIS and nine had SBH determined by imaging criteria. We have identified mutations in 3/32 patients. A splicing site G987C mutation was identified in the *FLN1* gene in two related patients with BPNH whereas a deleterious missense mutation A1385C was detected in the 5th WD domain of *LIS1* gene of one patient with LIS. This patient has a more severe LIS grade than expected. Genetic screening of *DCX* gene had detected only neutral variants.

Conclusion: Mutations were identified only in 6.25% of our patients. Low frequency of mutations could be related to atypical forms of PNH and LIS-SBH spectrum in our cohort of patients, somatic mosaicism, mutations in non-coding regions and genetic heterogeneity. In addition, our results confirm high incidence of *FLN1* mutations in families segregating classical BPNH and strongly support that missense mutations localized in latter WD domains of LIS1 protein could result in severe grade of LIS.

INTRODUCTION

Migration of post-mitotic neurons from the ventricular zone to form the cortical plate comprises one of the most critical stages in brain development. Our understanding of this complex process has progressed based on studies of human malformations and mouse mutants with deficient neuronal migration, particularly malformations known as bilateral periventricular nodular heterotopia (BPNH) and lissencephaly – subcortical band heterotopia spectrum (LIS-SBH). BPNH is a human brain malformation in which masses of confluent and symmetric subependymal nodules of gray matter located along the lateral ventricles fail to migrate to the cortex. A gene for BPNH has been identified as *Filamin A* (*FLNA*, also known as *FLN1*, actin-binding protein 280, ABP-280, MIM#300017) (Fox et al., 1998). The FLN1 protein is involved in many fundamental processes surrounding cell protrusion and motility (Ott et al., 1998; Stendahl et al., 1980; Cunningham et al., 1992; Glogauer et al., 1998). Mutations in the *FLN1* gene have been associated with BPNH, both in sporadic patients and families with X-linked pattern of inheritance and multiple affected women (Fox et al., 1998; Sheen et al., 2001), and in a few male patients presenting somatic mosaicism (Guerrini et al., 2004; Parrini et al., 2004).

LIS-SBH encompass a spectrum of gyral malformations from complete agyria (absent gyri) to regional pachygyria (broad gyri) resulting in a simplified and thick cortex which contains only four of the usual six layers (Crome, 1956) and merges with subcortical band heterotopia (SBH). SBH or ‘double cortex’ consists of circumferential bands of heterotopic neurons located just beneath the cortex and separated from it by a thin band of white matter (Barkovich et al., 1994; Dobyns et al., 1996). Mutations in two major genes, *DCX* and *LIS1* are found in many patients with LIS and SBH. *LIS1* was originally identified as a subunit of platelet-activating factor acetylhydrolase, an enzyme which degrades platelet activating factor (Hattori et al., 1994), however *LIS1* also plays a role in regulating microtubule dynamics (Gupta et al., 2002), nuclear and somal migration (Faulkner et al., 2000; Liu et al., 2000; Smith et al., 2000) suggesting a crucial role in neuronal migration. *DCX* is also a microtubule associated protein (Francis et al., 1999; Gleeson et al., 1999) and it is involved with the regulation of cell adhesion (Kizhatil et al., 2002) and microtubule-actin crosstalk (Tsukada et al., 2003, 2005). In this

paper we report a mutation screening performed in the most important genes involved with neuronal migration disorders: *FLNI*, *LIS1* and *DCX* genes. The cohort analyzed is a large group of patients with classical and atypical forms of BPNH and LIS-SBH spectrum. We believe that our results will contribute to a better comprehension of molecular etiology of these diseases.

METHODS

Patients

A total of 32 patients, thirteen with BPNH and 19 with the LIS-SBH spectrum were identified through a systematic investigation of patients seen at the Neurology Clinic of a tertiary hospital at the University of Campinas (UNICAMP). We used a structured questionnaire in order to obtain a thorough clinical and family history, including antecedent of epilepsy or other neurological impairment in first-degree, second-degree, or third-degree relatives and the occurrence of any prenatal event during gestation. All patients signed an informed consent form approved by the ethics committee of our Institution.

The diagnosis of BPNH, LIS or SBH was established according to Magnetic Resonance Imaging (MRI) or Computadorized Tomography (CT) findings. The severity of LIS-SBH was graded using an established system described previously (Dobyns et al., 1999). Two patients included in this study had CT scans while 30 had high-resolution MRI scans performed in a 2T scanner, with T1- and T2-weighted images in three orthogonal planes (Elscent Prestige; Elcint Ltd, Haifa, Israel). In general MRI acquisition parameters were: (1) Sagittal T1 spin echo, 6mm thick, flip angle= 180°; repetition time (TR)=430, echo time (TE)=12, matrix 200X350, field of view (FOV)=25X25cm; (2) Coronal images, perpendicular to long axis of hippocampus, defined by the sagittal images; (2.a) T2-weighted “fast spin echo” (FSE), 4mm thick, flip angle= 120°; TR=4800, TE=129, matrix 252X320, FOV=18X18cm; (2.b) T1-weighted IR, 3mm thick, flip angle=200°; TR=2800, TE=14, inversion time (TI)=840, matrix 130X256, FOV=16X18cm; (3) Axial images parallel to the long axis of the hippocampi; (3.a)

T1-weighted gradient echo, 3mm thick, flip angle=70°, TR=200, TE=5, matrix 180X232, FOV=22X22 cm; (3.b) T2-weighted FSE, 4mm thick, flip angle=120°, TR=6800, TE=129, matrix 252X328, FOV=21X23cm; (4) T1-weighted 3D gradient echo, acquired in the sagittal plane (1mm thick, flip angle=35°, TR=22, TE=9, matrix 256X220, FOV=23X25cm).

Mutation screening

Genomic DNA was obtained by direct extraction from lymphocytes of fresh blood, using standard manual techniques. Molecular analysis of the first six coding exons of *FLN1* gene and coding region of *LIS1* and *DCX* genes of affected individuals and controls were initially performed by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) which was carried out with the WAVE® 4500 system (Transgenomic, San Jose, CA). PCR was performed in 20µl containing 5µM of each specific primers, 200µM of each dNTP, 0.5 units of Taq DNA polymerase, 1 X buffer, 1.5 mM MgCl₂ and 50ng DNA. Amplicons were checked by agarose gel electrophoresis preceding DHPLC analysis. PCR products were denatured at 95°C for 5 minutes and allowed to cool slowly to room temperature over 40 minutes prior to DHPLC analysis. The composition of buffers used for DHPLC was: buffer A – 0.1M triethylammonium acetate (TEAA) and buffer B- 0.1M 25% acetonitrile in TEAA. Aliquots of 5µl of each PCR products were eluted from a DNASep® column (Transgenomic, San Jose, CA) at a flow rate of 0.9ml/min. Mutation screening was performed under partial denaturing conditions at different ideal running temperatures for each PCR fragment based on the WAVEMAKER™ software (Transgenomic). DHPLC data analysis was conducted on visual inspection of the chromatogram profiles and comparison with normal controls.

Individuals that have a different chromatogram profile from normal controls were subsequently sequenced with the Big Dye Terminator Sequencing kit® for Megabace 1000® (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

RESULTS

Clinical and Neuroimaging findings

A total of 32 patients were analyzed in this study. Detailed clinical and neuroimaging findings of majority of these patients have been presented previously (Montenegro et al., 2002). To date, twenty individuals were female and 12 were male whose ages ranged from 1 to 61 years old (mean age = 24.375 years old). Epilepsy was present in 31 patients; while one individual was seizure free. Seizures were predominantly partial (n = 20), however, TCG, tonic and mioclonic seizures, drop attack, infantile spasms and seizures typical of Lennox-Gastaut syndrome were also observed. Age onset for first seizure ranged from one to 36 years old (mean age = 7.03 years old). Neurological exam was altered in 16/31 patients whose data were available. Prenatal events were reported by 10 patients, while familiar history of epilepsy, mental retardation, miscarriage, premature and neonatal death was identified in 19 patients. Recurrence of neuronal migration disorders confirmed by neuroimaging was identified only in two related patients with BPNH. **Table 1 and 2** summarizes the main demographic, clinical and imaging characteristics, as well as the molecular findings of the patients studied.

In addition, our cohort of patients was also divided in two groups: patients with PNH and patients with LIS-SBH spectrum. In PNH group, ten patients were female and three were male whose age ranged from 21 to 61 years old (mean age = 37.46 years old). Eleven patients have sporadic PNH while other two patients were related and had familiar BPNH. Four patients had typical MRI findings of BPNH mainly: bilateral gray matter predominantly lining the lateral ventricles with otherwise normal appearing white and cortical gray matter. Whereas nine patients had atypical imaging findings such as unilateral periventricular heterotopia, highly asymmetric or focally located nodules, or nodules extending from the surface of the cortex down to the ventricles and involvement of other cortical malformations. Seizure episodes were reported by all individuals of this group. Age occurrence for the first seizure ranged from two to 36 years old (mean age = 12.75). Partial seizures were identified in almost all patients (11/13), however TCG were reported by two individuals, while drop attack associated with tonic seizures seizure were identified in one patient. More than one category of seizure could be identified in the same patient.

Neurological exam was normal in 12/13 patients. Prenatal events such as vaginal bleeding and abortion attempt were reported by three patients, while familiar history for seizure occurrence, abortion, consanguineous marriage and recurrence of the neuronal migration disorder were identified in eight patients. In LIS-SBH spectrum group, eleven patients were female and eight were men whose age ranged from one to 45 years old (mean age = 14.73). LIS were identified in 10 patients (three woman and seven men), while SBH were identified in nine patients (eight women and one man). Seizure episodes were identified in 18 patients and age onset for first seizure ranged from one to 18 years old (mean age = 3.22). Partial seizures were identified in nine patients; TCG, tonic and mioclonic seizures, infantile spasms and seizures typical of Lennox-Gastaut syndrome were also reported, however were less frequent. Neurological exam was altered in 15 patients (this data was not available for one patient) and ranged from mild to severe delay from developmental milestones. Prenatal events were reported by seven individuals and include fever, rash, abortion attempt, bleeding, drugs abuse and infection. Familiar history for occurrence of epilepsy, mental retardation, spontaneous abortion, premature death and miscarriage were identified in 11 patients.

Molecular analysis

DHPLC analysis of the adjacent intron boundaries and coding region of *FLNI* (only first six coding exons), *LIS1* and *DCX* detected altered fragments elution profile for all genes screened. Seven patients with PNH showed an altered elution profile for *FLNI* gene. Automatic sequencing of these fragments revealed two SNPs already described in NCBI database: IVSV + 519C>G (NCBI, rs4898478) and IVSV + 506C>T (NCBI, rs4898479) identified in five and three unrelated patients, respectively. Both substitutions could be present in the same individual. In addition, a G987C (NCBI, NM 001456) substitution was detected in two related patients with classical BPNH (**figure 1, table 1**). This nucleotide change was not identified in 50 unrelated controls. This substitution is predicted to destroy the splicing-site of *FLNI* intron 6 (data not showed). Altered elution profiles were detected in 11 patients with LIS-SBH spectrum for *LIS1* gene. A neutral substitution C1805T (NCBI, rs6628) was identified by automatic sequencing in

nine individuals, while another neutral variant IVSVI+ 27C>T (NCBI, rs3213696) was detected in three unrelated patients. Both SNPs could be present in the same individual. A substitution G1670C (NCBI, NM_000430) was identified in a patient with LIS (**table 2**). This variant is predictable to change an amino-acid cysteine for a serine in the position 372 of protein (C372S); however this nucleotide exchange was also detected in the control group. In addition, another two variants were identified in a patient with LIS, G1368C (NCBI, NM_000430) and G1383C (NCBI, NM_000430), both are predicted to change a glutamic acid for an aspartic acid in positions 271 (E271D) and 276 (E276D), respectively, however these substitutions were also present in the control group. Automatic sequencing of an altered fragment of one patient with LIS identified a mutation A1385C, (NCBI, NM_000430) (**figure 1, table 2**). This mutation, originally reported by Torres et al. (2004), was not identified in 50 unrelated controls. This nucleotide exchange is predicted to cause a histidine to proline substitution at amino acid 277, a residue localized in the 5th WD-40 domain of the LIS1 protein.

A sequence alignment between human *lis1* protein and its orthologues in other species revealed that the mutated histidine is a very conserved amino acid in different organisms. All species, with exception of *A. thaliana*, has a histidine in the position corresponding to the human amino acid 277. The 5th WD-40 domain is also conserved in different species, with 100% identity among human, rat and mouse. Furthermore, additional *in silico* analysis, including SIFT and Polyphen software and Grantham scale (Grantham et al., 1974) confirmed that the substitution A1385C is potentially deleterious.

Automatic sequencing of altered elution profiles of *DCX* gene identified two neutral variants present in a patient with LIS (**table 2**): IVSII+28G>A and IVSV+19G>A. These two nucleotide substitutions were not described in the NCBI database.

DISCUSSION

A total of 32 patients with neuronal migration disorders were screened for mutations in *FLNI*, *LIS1* and *DCX* gene. Deleterious mutations were found only in 6.25% of patients studied. In addition, when our data are divided in groups, deleterious mutations were identified in 7.69% of individuals with PNH and in 5.26% of patients with LIS-SBH.

Mutations in *FLNI* gene have been described in 100% of familial cases and in approximately 20-25% of sporadically cases with classical BPNH (Fox et al., 1998; Sheen et al., 2001; Moro et al., 2002; Parrini et al., 2006). Additionally, 93% of patients described with mutations in the *FLNI* gene were female, while only 7% were men (Parrini et al., 2006). Mutations have been described mostly in the actin binding domain (ABD), which is classified as a hot spot region and must be the first region to be screened in patients with PNH (Parrini et al., 2006).

Only one pedigree with a classical X-linked pattern of inheritance and two affected individuals (mother and daughter) with classical BPNH was identified by our group. Automatic sequencing of altered elution fragments of these two patients revealed a splicing site mutation localized one base pair upstream of the 6th intronic region. This result is not surprising, since there is a high prevalence of *FLNI* mutations in X-linked-BPNH pedigrees and the genomic sequence screened codes for the ABD region. Molecular study of this mutation was described in other report (Tsuneda et al., 2007 – data not published), and is out of the scope of this work.

Classical BPNH was identified also in two sporadic patients, a male and a female. Only neutral variants were detected by automatic sequencing in these individuals. In despite of fact the low prevalence of mutations reported in sporadic patients, we cannot exclude the presence of mutations in other exons of *FLNI* gene or in intronic and promoter regions. Additional studies will be necessary to rule out these regions.

We also include in our study nine patients with atypical forms of PNH such as unilateral nodules and periventricular heterotopia associated with other cortical malformations. Only neutral variants were identified in the ABD region of *FLNI* gene in these patients. Mutations in *FLNI* have never been reported in patients with this pattern of cortical malformation (Sheen et al., 2001; Parrini et al., 2006) and is expected that other genes may have a role in the molecular etiology of these forms of PNH, however analysis of the *FLNI* remaining exons will be required to confirm this hypothesis.

Mutation prevalence studies in individuals with LIS-SBH spectrum were actually controversial. While some authors report that 60% of patients with LIS have mutations in *LIS1* (Uyanik et al., 2007) and that mutations are identified in 90% of cases

(Keerjan and Gleeson, 2007), others describing molecular analysis of *LIS1* and *DCX* genes in over 200 patients with the LIS-SBH spectrum detected mutations only in 40% of patients (Beldjord and Chelly, unpublished data).

We have identified only one individual with *LIS1* mutation in 19 patients with the LIS-SBH spectrum. Detailed description of this mutation and clinical characteristic of the patient were previously reported (Torres et al., 2004). To date, this patient has a LIS grade 3a, characterized by agyria in posterior and pachygyria in anterior regions and the mutation A1385C changes a conserved proline to a histidine in the 5th WD domain of LIS1 protein. Some authors reported that patients with missense mutations localized in the terminal WD domains of LIS1 protein have a milder phenotype than patients with truncation mutations (Cardoso et al., 2000; Leventer et al., 2001). However, our data and other very recent report (Uyanick et al., 2007) show that this is a vague correlation, since neither the location nor the type of mutation appear to modulate the malformation severity. Somatic mosaicism has been assumed to explain phenotypic variation (Uyanick et al., 2007) and could be the reason why our mutation screening in *LIS1* hasn't detected mutations in other patients. We also cannot completely exclude the presence of major rearrangements, especially deletions, in the *LIS1* gene. Additional studies using fluorescent in situ hybridization (FISH) will be necessary to rule out these types of deletions.

The absence of *DCX* mutations in our cohort of patients is not completely unexpected, since none of the pedigrees showed evidence of X-linked inheritance and mutation frequency in *DCX* are extremely variable, ranging from 38 to 85%, in sporadic patients with SBH (Des Portes et al., 1998; Gleeson et al., 1999; Matsumoto et al., 2001; Sicca et al., 2003). It's has been suggested that rates of patients with *DCX* mutations might be lower if unselected samples of SBH and LIS were considered (Sicca et al., 2003). Some individuals of our cohort of patients have atypical forms of SBH, such as SBH-pachygyria and predominantly posterior SBH, and this could be the reason for the low mutation frequency in our patients. In addition, approximately 25% of women with typical SBH don't have mutations in *DCX* gene, suggesting genetic heterogeneity for this syndrome.

These data, together with our findings, emphasize the heterogeneity of LIS-SBH spectrum and strongly support that other genes are involved in these disorders. Recently, mutations in tubulin alpha 1A (*TUBA1A*) have been identified in patients with a large spectrum of LIS phenotypes (Poirier et al., 2007), revealing a new potential candidate gene for patients with LIS-SBH spectrum. We pretend to perform a mutation screening in this gene to establish if *TUBA1A* is involved in the etiology of LIS-SBH in our group of patients.

In conclusion, our study describes a low frequency of mutations in *FLN1*, *LIS1* and *DCX* genes in patients with neuronal migration disorders. This low frequency could be related to atypical forms of BPNH and LIS-SBH spectrum in our cohort of patients, furthermore somatic mosaicism, genetic heterogeneity and mutations in non-coding regions may have a role in the molecular etiology of these disorders. We also have described a new mutation for familiar BPNH that is localized in the ABD hot-spot. This mutation causes an abolishing of the wild splicing-site, resulting in an aberrant shortened protein (Tsuneda et al., 2007 – data not published). In addition, our previously reported data were confirmed by other group (Uyanik et al., 2007), strongly supporting that missense mutations in *LIS1* and their localization in latter WD repeats are not always associated with a milder LIS phenotype as reported previously (Leventer et al., 2001). We believe that these results are important in advancing our understanding of cortical malformations and the role of the FLN1, LIS1 and DCX proteins in the cortex embryology. In addition, it may help to define new boundaries among phenotypes related to *LIS1* mutations.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the patients and their families. DAS received a scholarship from FAPESP, Brazil (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo). FRT received a scholarship from FAPESP, Brazil. SST received a scholarship from FAPESP, Brazil. Drs. FC and ILC are supported, in part, by CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), Brazil. This work was supported by grants from FAPESP, SP Brazil to Drs. FC and ILC.

REFERENCES

Barkovich AJ, Guerrini R, Battaglia G, et al. Band heterotopia: correlation of outcome with magnetic resonance imaging parameters. *Ann Neurol* 1994, 36: 609-617.

Cardoso C, Leventer RJ, Matsumoto N, et al. The location and type of mutation predict malformation severity in isolated lissencephaly caused by abnormalities within the LIS1 gene. *Hum Mol Genet* 2000, 9: 3019-3028.

Crome L. Pachygyria. *J Pathol Bacteriol* 1956, 71: 335-352.

Cunningham C, Gorlin J, Kwiatkowski D *et al.* Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion. *Science* 1992, 255: 325-327.

Des Portes V, Francis F, Pinard JM, et al. Doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia. *Hum Mol Genet* 1998, 7: 1063-1070.

Dobyns WB, Andermann E, Andermann F, et al. X-linked malformations of neuronal migration. *Neurology* 1996, 47: 331-339.

Dobyns WB, Truwit CL, Ross ME, et al. Differences in the gyral pattern distinguish chromosome 17-linked and X-linked lissencephaly. *Neurology* 1999, 53: 270-277.

Faulkner, NE, Dujardin, DL, Tai, CY, et al. Role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nat Cell Biol* 2000, 2: 784-791.

Fox JW, Lamperti ED, Eksioglu YZ, et al. Mutations in Filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* 1998, 21: 1315-1325.

Francis F, Koulakoff A, Boucher D, et al. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* 1999, 23: 247-256.

Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 1999, 23: 257-271.

Gleeson JG, Minnerath SR, Fox JW, et al. Characterizations of mutations in the gene doublecortin in patients with double cortex syndrome. *Ann Neurol* 1999, 45: 146-153

Glogauer M, Arora P, Chou D, et al. The role of actin-binding protein 280 in integrin-dependent mechanoprotection. *J Biol Chem* 1998, 275: 1689-1698.

Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 1974, 185 (4154): 862-864.

Guerrini R, Mei D, Sisodiya S et al. Germline and mosaic mutations of *FLNI* in men with periventricular heterotopia. *Neurology* 2004, 63:51-56.

Gupta A, Tsai LH, Wynshaw-Boris A. Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat Rev Genet* 2002, 3: 342–355.

Hattori M, Adachi H, Tsujimoto, M, et al. Miller–Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* 1994, 370: 216–218.

Kerjan G, Gleeson JG. Genetic mechanisms underlying abnormal neuronal migration in classical lissencephaly. *Trends in Genetics* 2007, 23(12): 623-630.

Kizhatil K, Wu YX, Sen A, Bennett V. A new activity of doublecortin in recognition of the phospho-FIGQY tyrosine in the cytoplasmic domain of neurofascin. *J Neurosci* 2002, 22: 7948–7958.

Leventer RJ, Cardoso C, Ledbetter DH, Dobyns WB. LIS1 missense mutations cause milder lissencephaly phenotypes including a child with normal IQ. *Neurology* 2001, 57: 416-422.

Liu Z, Steward R, Luo L. *Drosophila* Lis1 is required for neuroblast proliferation, dendritic elaboration and axonal transport. *Nat Cell Biol* 2000, 2: 776–783.

Matsumoto N, Leventer RJ, Kuc JA, et al. Mutation analysis of the DCX gene and genotype/phenotype correlation in subcortical band heterotopia. *Eur J Hum Genet* 2001, 9: 5-12.

Montenegro MA, Guerreiro MM, Lopes-Cendes I, Guerreiro CAM, Cendes F. Interrelationship of genetics and prenatal injury in the genesis of malformations of cortical development. *Arch Neurol* 2002; 59: 1147-1153.

Moro F, Carrozzo R, Veggiotti P et al. Familial periventricular heterotopia: missense and distal truncating mutations of the *FLN1* gene. *Neurology* 2002, 58: 916–921.

Ott I, Fischer E, Miyagi Y et al. A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280. *J Cell Biol* 1998, 140: 1241-1253.

Parrini E, Mei D, Wright M, et al. Mosaic mutations of the *FLN1* gene cause a mild phenotype in patients with periventricular heterotopia. *Neurogenetics* 2004, 5(3):191-6.

Parrini E, Ramazzotti A, Dobyns WB, et al. Periventricular heterotopia: phenotypic heterogeneity and correlation with Filamin A mutations. *Brain* 2006, 129: 1892–1906.

Poirier K, Keays DA, Francis F, et al. Large Spectrum of Lissencephaly and Pachygyria Phenotypes Resulting from De Novo Missense Mutations in Tubulin Alpha 1A (*TUBA1A*). *Human Mutation* 2007, 28(11):1055-1064.

Sheen VL, Dixon PH, Fox JW, et al. Mutations in the X-linked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females. *Hum Mol Genet* 2001, 10:1775–1783.

Sicca F, Kelemen A, Genton P, et al. Mosaic mutations of the *LIS1* gene cause subcortical band heterotopia. *Neurology* 2003, 61: 1042-1046.

Smith DS, Niethammer M, Ayala R, et al. Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian Lis1. *Nat Cell Biol* 2000, 2: 767–775.

Stendahl O, Hartwig J, Brotschi E, et al. Distribution of actin-binding protein and myosin in macrophages during spreading and phagocytosis. *J Cell Biol* 1980, 84: 215-224.

Torres FR, Montenegro MA, Marques-De-Faria AP, et al Mutation screening in a cohort of patients with lissencephaly and subcortical band heterotopia. *Neurology* 2004, 62: 799–802.

Tsukada M, Prokscha A, Oldekamp J, Eichele G. Identification of neurabin II as a novel doublecortin interacting protein. *Mech Dev* 2003, 120:1033–1043.

Tsukada M, Prokscha A, Ungewickell E, Eichele G. Doublecortin association with actin filaments is regulated by neurabin II. *J Biol Chem* 2005, 280: 11361–11368.

Tsuneda SS, Torres FR, Montenegro MA, et al. A New Missense Mutation Found in the *FLNI* Gene in a Family with Bilateral Periventricular Nodular Heterotopia (BPNH) Alters the Splicing Process. Submitted to *Molecular Neurosciences* 2007.

Uyanik G, Morris-Rosendahl DJ, Stiegler J, et al. Location and type of mutation in the *LIS1* gene do not predict phenotypic severity. *Neurology* 2007, 69: 442-447.

Table 1. Clinical, Neuroimaging and molecular findings of 13 patients with periventricular nodular heterotopia.

Patient / sex/age	Neuroimaging findings	Seizure: age (years)/type	Neurological exam	Prenatal events	familial history (number of relatives)	molecular findings in <i>FLN1</i> gene
hnp-01/F/37	BPNH, colpocephaly and white matter heterotopia	29/partial	normal	abortion attempt	epilepsy (1)	-
hnp-02/M/53	left asymmetric PNH, asymmetric cerebral lobes	17/partial	normal	-	-	-
hnp-03/F/61	BPNH	na/partial	normal	-	BPNH (1)	G987C*
hnp-04/M/38	right temporal PNH	20/partial	normal	-	epilepsy (1)	-
hnp-05/F/27	BPNH	2/partial	normal	-	-	IVSV + 519C>G
hnp-06/F/22	right PNH, focal heterotopia and polymicrogyria or dysplasia	12/partial	normal	vaginal bleeding	-	IVSV + 519C>G IVSV + 506C>T
hnp-07/F/31	BPNH	4/tonics, drop attacks	left pyramidal discharge, delayed developmental milestones	-	consanguineous parents BPNH (1)	G987C*
hnp-08/F/21	transmantle heterotopia	10/partial	normal	-	epilepsy (1)	IVSV + 519C>G
hnp-09/F/54	right PNH, hippocampus asymmetry and right hippocampus reduction, corpus callosum agenesis and polymicrogyria	36/partial	normal	-	abortion	-
hnp-10/M/22	BPNH	2/na	normal	na	na	IVSV + 506C>T IVSV + 519C>G
hnp-11/F/40	PNH	13/partial, TCG	normal	-	epilepsy (1)	-
hnp-12/F/27	left posterior PNH and left subcortical heterotopia	5/partial	normal	-	epilepsy (1)	IVSV + 506C>T IVSV + 519C>G
hnp-13/F/54	posterior nodular heterotopia, not contiguous nodules	3/partial, TCG	normal	abortion attempt	-	-

BPNH=bilateral periventricular nodular heterotopia, PNH=periventricular nodular heterotopia, TCG=tonic-clonic generalized seizure, na = not available, nd = not determined, IVS = intronic variant sequence, C = cytosine, G = guanine T = thymidine, * splicing-site mutation.

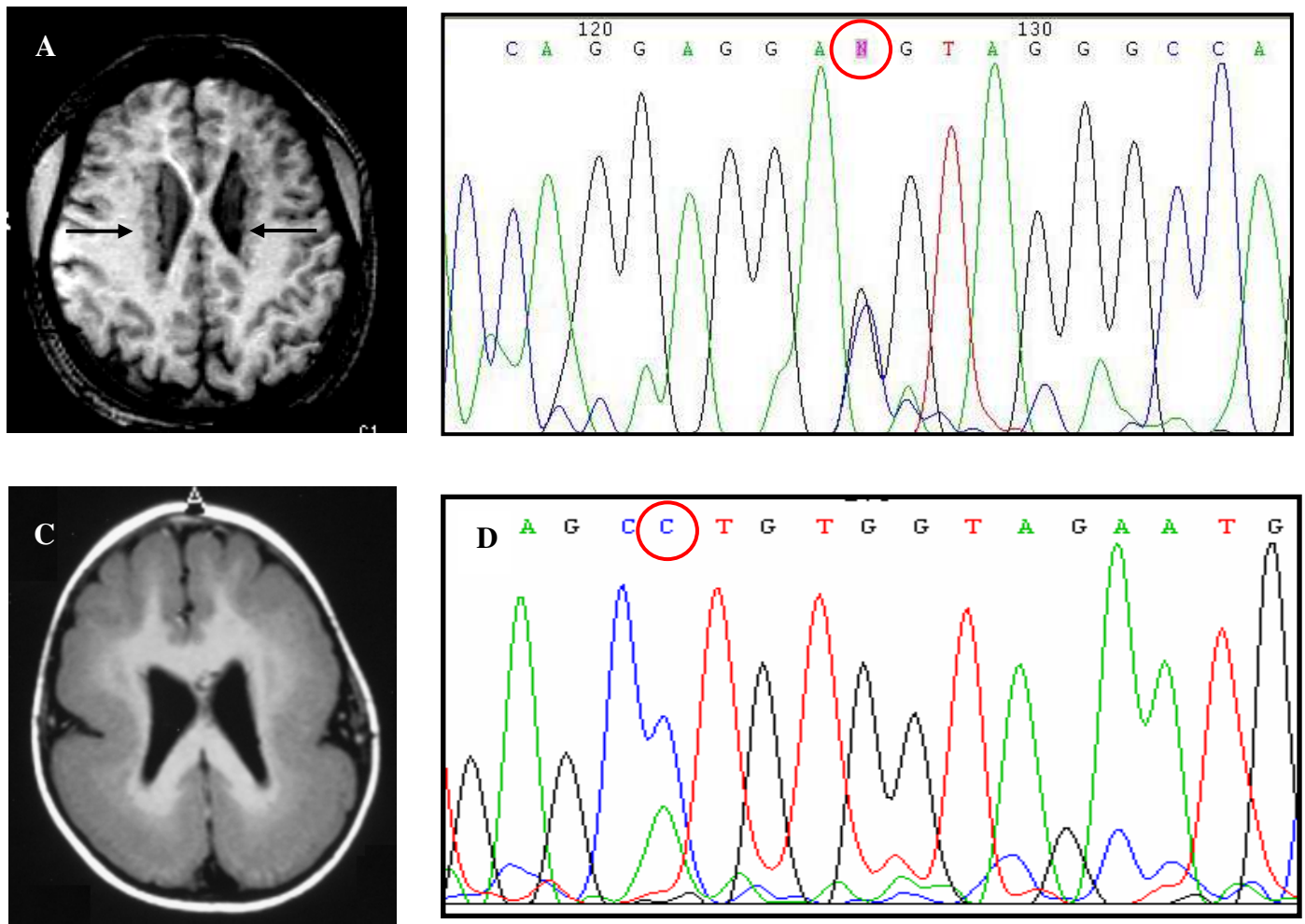
Table 2. Clinical, Neuroimaging and molecular findings of 19 patients with LIS-SBH spectrum.

Patient / age (years)/ sex	Neuroimaging findings (grade)	Seizure: age (years)/type	Neurological exam	Prenatal events	Family history (number of relatives)	Molecular findings in <i>LIS1</i> and <i>DCX</i> gene
lis-1/ 04/F	agyria/pachygyria (nd)	1/mioclonic	delayed developmental milestones	positive IgG for rubeola	-	<i>LIS1</i> : IVSVI+27C>T <i>DCX</i> : IVSII+28G>A <i>DCX</i> : IVSV+19G>A
lis-2/29/F	diffuse with posterior predominance and discontinuous SBH (6a1)	7/partial	normal	-	spontaneous abortion (1), epilepsy (1)	-
lis-3/12/F	diffuse with posterior predominance pachygyria (4a)	2/multiform (LGS)	delayed developmental milestones	fever and rash	MR (6 maternal cousins)	-
lis-4/37/M	diffuse with posterior predominance pachygyria (4a)	1/partial	delayed developmental milestones	-	-	-
lis-5/15/F	incomplete lissencephaly* (nd)	1/infantile spasms (West) multiform (LGS)	delayed developmental milestones and generalized pyramidal discharge	cytomegalovirus infection	-	<i>LIS1</i> : G1368C, E271D <i>LIS1</i> : G1383C, E276D <i>LIS1</i> : C1805T (UTR)
lis-6/08/M	incomplete lissencephaly (nd)	1/multiform (LGS)	developmental milestones and generalized pyramidal discharge	fever	-	<i>LIS1</i> : G1670C, C372S <i>LIS1</i> : C1805T (UTR)
lis-7/25/F	diffuse with anterior predominance, continuous and thick SBH (6b1)	4/partial	left hemiparesis and left pyramidal discharge	-	epilepsy (1)	-
lis-8/04/M	diffuse with posterior predominance pachygyria* (4a)	-	delayed developmental milestones and tetraparesis	abortion attempt, bleeding	-	<i>LIS1</i> : C1805T (UTR)
lis-9/29/F	SBH (6b3)	2/partial	normal	-	epilepsy (1)	<i>LIS1</i> : C1805T (UTR)
lis-10/06/M	posterior agyria and anterior pachygyria (3a)	1/partial	pyramidal discharge, hypotony, subnormal vision	abortion attempt	epilepsy (2)	<i>LIS1</i> : C1805T (UTR)
lis-11/03/M	posterior agyria and anterior pachygyria (3a)	1/nd	delayed developmental milestones and tetraparesis	-	epilepsy (2)	<i>LIS1</i> : A1385C, H277P <i>LIS1</i> : C1805T (UTR)
lis-12/21/F	anterior SBH and posterior pachygyria (5a)	7/partial	delayed developmental milestones	-	MR (1), neonatal death (1)	<i>LIS1</i> : C1805T (UTR)
lis-13/01/F	inconclusive but possibly anterior and thin SBH (nd)	1/tonic and mioclonic	na	-	MR (1)	<i>LIS1</i> : IVSVI+27C>T <i>LIS1</i> : C1805T (UTR)
lis-14/45/M	diffuse with anterior predominance and thin SBH (6b3)	18/nd	normal	-		<i>LIS1</i> : C1805T (UTR)
lis-15/11/M	diffuse with anterior predominance pachygyria (4b1)	2/partial	mild mental delay	-	premature death (4) and epilepsy (5)	-

lis-16/9/F	SBH (nd)	6/partial, TCG	mild mental delay	-	epilepsy (2) miscarriage (2) premature death (1)	LISI: IVSVI+27C>T
lis-17/11/F	SBH (6b2)	1/partial, TCG	mild mental delay	hemorrhage in the 5 th month of pregnancy, drugs abuse in her gestation	epilepsy (6)	-
lis-18/5/M	diffuse agyria with a few shallow sulci (2), cerebellar hypoplasia, Dandy-Walker syndrome	1/infantile spasms (West)	delayed developmental milestones and hemiparesis	-	-	-
lis-19/5/F	SBH (nd)	1/atypical (trembling)	delayed developmental milestones and hypotony	-	-	-

* CT scans, nd= not determined, na = not available, UTR = untranslated region, IVS = intronic variant sequence, LGS= Lennox-Gastaut syndrome, SBH = subcortical band heterotopia, TCG = tonic-clonic generalized, MR = mental retardation, G = guanine, C = cytosine, A = adenine, T = thymidine, C = cysteine, D = aspartic acid, E = glutamic acid, H = histidine, S = serine.

Figure 1



Legends

Figure 1. A) Sagital T1 MRI of a patient with BPNH (black arrows) and mutation in *FLN1* gene. B) Eletropherogram of the G987C substitution. C) Sagital T1 MRI of patient with LIS-SBH (grade 3a) and mutation in *LIS1* gene. D) Eletropherogram of the A1385C substitution.

CAPÍTULO 2

ARTIGO 2

A NEW MISSENSE MUTATION FOUND IN THE *FLNI* GENE IN A FAMILY WITH BILATERAL PERIVENTRICULAR NODULAR HETEROTOPIA (BPNH) ALTERS THE SPLICING PROCESS

Simone S. Tsuneda¹, Fabio R. Torres¹, Maria A. Montenegro², Marilisa M. Guerreiro²,
Fernando Cendes², Iscia Lopes-Cendes¹

A New Missense Mutation Found in the *FLN1* Gene in a Family with Bilateral Periventricular Nodular Heterotopia (BPNH) Alters the Splicing Process

Simone S. Tsuneda¹, Fabio R. Torres¹, Maria A. Montenegro², Marilisa M. Guerreiro², Fernando Cendes², Iscia Lopes-Cendes¹

Departments of Medical Genetics¹ and Neurology², Faculty of Medical Sciences, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

Running title: *FLN1* mutation in BPNH

Corresponding author: Iscia Lopes-Cendes, MD, PhD

Department of Medical Genetics-Faculty of Medical Sciences

University of Campinas – Unicamp

Tessália Vieira de Camargo, 126

Campinas SP, Brazil, 13084-971

Phone: +55 19 35218907

FAX: +55 19 3289-1818

E-mail: icendes@unicamp.br

Abstract

We describe the clinical and molecular evaluation of two patients, mother and daughter (proband), with bilateral periventricular nodular heterotopia (BPNH). The clinical evaluation revealed a more severe phenotype in the proband, with mental retardation and seizures. Imaging studies showed bilateral periventricular nodules in both patients. We identified a novel c.987G→C mutation in exon 6 of the *FLN1* gene in the genomic DNA of both patients. cDNA sequencing revealed the maintenance of intron 6 in the mutated allele. Bioinformatics analysis indicates that the mutation identified in both patients probably destroyed the intron 6 donor-splicing site, which is likely to introduce a premature stop codon resulting in a truncated FLN1 protein. In addition, X-chromosome inactivation studies in DNA of blood cells revealed a skewed pattern in the proband, and real time quantitative PCR showed a higher expression of the mutated allele in the proband when compared to her mother. This variation in expression of the mutated allele may be responsible for the differences in the clinical manifestations observed in the two patients.

Keywords: *FLN1* gene, bilateral periventricular nodular heterotopia, epilepsy, neurogenetics.

Introduction

Bilateral periventricular nodular heterotopia (BPNH) (MIM#300049) is an X-linked dominant human brain malformation in which masses of confluent and symmetric subependymal nodules of gray matter located along the lateral ventricles fail to migrate to the cortex. A gene for BPNH has been identified as *Filamin 1* (*FLN1*, also known as *FLN1*, actin-binding protein 280, ABP-280, MIM#300017) (Fox *et al.*, 1998). The FLN1 protein is involved in many fundamental processes surrounding cell protrusion and motility (Ott *et al.*, 1998; Stendahl *et al.*, 1980; Cunningham *et al.*, 1992; Glogauer *et al.*, 1998). Mutations in the *FLN1* gene have been associated with BPNH, both in sporadic patients and families with multiple affected women (Fox *et al.*, 1998; Sheen *et al.*, 2001), and in a few male patients presenting somatic mosaicism (Guerrini *et al.*, 2004; Parrini *et al.*, 2004). Recently, *FLN1* gene mutations have been also reported in patients with the Ehlers-Danlos variant of BPNH and in a group of X-linked skeletal dysplasias: the otopalatodigital (OPD) syndrome spectrum disorders (Robertson *et al.*, 2003), showing the genetic complexity and phenotypic heterogeneity of this neuronal migration disorder.

The objective of this study was to identify *FLN1* gene mutation in patients with BPNH and determine its molecular effects on the mRNA level. In addition, we aimed to investigate a possible molecular mechanism responsible for phenotypic differences in the clinical presentation of BPNH in our patients.

Materials and Methods

Patients

Patients were identified in our epilepsy clinic and evaluated by a neurologist, following standard protocols. We also used a structured questionnaire to investigate history of epilepsy or other neurological abnormalities in first-degree, second-degree, or third-degree relatives of the patients, and the occurrence of any prenatal event during pregnancy (Montenegro *et al.*, 2002).

In addition, both patients included in the study were submitted to high resolution magnetic resonance imaging (MRI scans) performed in a 2T scanner, with T1- and T2-weighted images in three orthogonal planes (Elscent Prestige™; Elcint Ltd, Haifa, Israel). All patients signed an informed consent form approved by the Research Ethics Committee of the University of Campinas (UNICAMP), Brazil.

Mutation screening

Genomic DNA was obtained by direct extraction from lymphocytes of fresh blood, using standard manual techniques. PCRs were carried out using published primer sequences (Sheen *et al.*, 2001), in a total volume of 12.5µl containing 40ng of genomic DNA; 100ng of each primer; 200µM of dGTP, dCTP and dTTP; 25µM of dATP; 1.5µCi[33P]dATP; 0.5units of Taq DNA polymerase, 1.5mM of MgCl₂, and a final volume of 10% DMSO and 5% glycerol. Samples were processed under the following conditions: 35 cycles of 45s at 94°C, 30s at 62-65°C and 60s at 72°C. PCR products were analyzed by single strand conformation polymorphism (SSCP) in order to search for mutations in the first six coding exons of the *FLN1* gene. PCR fragments that showed an altered mobility shift were reamplified and subsequently cloned, using the TOPO TA™ Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Sequencing of the cloned fragments was performed using BigDye™ Terminator Chemistry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to standard protocols.

cDNA analysis

The total RNA was obtained by direct extraction from lymphocytes of fresh blood, using standard manual techniques. RT-PCR was performed with 1µg of RNA using the Improm II™ Reverse Transcriptase System (Promega, Madison, WI, USA), in order to obtain the first cDNA strand. PCRs were performed using specific primer sequences for the region comprising the exon 6, intron 6 and exon 7. Samples were processed under the following conditions: 35 cycles of 45s at 94°C, 30s at 62°C and 60s at 72°C, using 10% DMSO. PCR products were electrophoresed in a 1% agarose gel. Gel bands were purified and cloned into *E. coli* DH5α cells using pGEM™ vector (Promega, Madison, WI, USA) and subsequently sequenced. Bioinformatics analysis was performed using the programs MultiAlign™ (Corpet, 1988) and Translate Tool™ (Gasteiger *et al.*, 2003).

X-chromosome inactivation analysis

The X-chromosome inactivation pattern was tested with the HUMARA (human androgen receptor gene) assay, which is based on DNA methylation, using fluorescence-labeled-primer and genomic DNA (Allen *et al.*, 1992). PCR products were analyzed by gel electrophoresis and quantified using the software ImageQuantTL™ on Typhoon™ (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, United Kingdom).

Gene expression assays were carried out using real time PCR (7500 Real Time PCR system from Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.) with the TaqMan™ system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Primers and probe for the *FLN1* gene were obtained from the Assays-On-Demand™ choice of Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), and the 18S gene was used as the endogenous control. In addition, we used probes and primer sequences for the exon 6–7 cDNA junction and for the intron 6 region. RT-PCR was performed using SuperScript III™ System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Real time PCRs were carried out using 100ng of cDNA, in a total volume of 12.5µL with master mix, probe and primer sequences provided by Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), as well as ABI 7500™ Real Time PCR System. All relative quantification experiments were performed in triplicate and the χ^2 test was used to access differences in gene expression between the two patients.

Results

Case Report

The proband is a 28-year-old woman, the second child of nonconsanguineous parents. Her mother reported that her pregnancy was complicated due to a generalized tonic-clonic seizure during the first trimester. Her developmental milestones were delayed and she presented seizures since 4 years old. Seizures were refractory to antiepileptic drugs (AED), despite the use of phenobarbital, carbamazepine, phenytoin, valproic acid, clobazam, oxcarbazepine and lamotrigine in monotherapy and many polytherapy associations. Investigation for inborn errors of metabolism was negative and fundoscopy was normal. The electroencephalogram evaluation showed generalized spike-and-wave complexes and focal epileptiform abnormalities in the right cerebral hemisphere. Magnetic resonance imaging of the brain (MRI) showed bilateral periventricular nodular heterotopia (Figure 1A). Her mother presented normal intelligence and described a history of five miscarriages and one stillbirth; her seizures were partial and well controlled with AED in monotherapy. The mothers MRI also showed bilateral periventricular nodular heterotopia, but with less prominent nodules than the proband (Figure 1B).

Mutation screening:

The SSCP analysis identified a band shift in exon 6 in the proband and her mother. Sequencing of these fragments revealed a c.987G→C mutation (figure 2) in the two patients. This abnormality was not detected in 50 unrelated sequenced controls.

cDNA analysis

The cDNA PCR product amplified from mother and daughter had a different size when compared to two different control samples (figure 3), indicating that the cDNA obtained from the patients was larger. Sequence of these cDNA fragments revealed that the complete intron 6 was transcribed in the patients (figure 4). Further bioinformatics analysis showed that the most likely consequence of the maintenance of intron 6 is the introduction of a premature stop codon, by changing the reading frame (figure 5).

X-chromosome inactivation analysis

X-chromosome inactivation studies performed in peripheral blood DNA revealed a skewed pattern of inactivation in the proband, but not in the mother (figure 6). However, we could not determine which allele was preferably expressed in the proband. In addition, quantitative real time PCR showed a higher expression of the mutated allele in the proband when compared to her mother (figure 7).

Discussion

We have identified two patients with BPNH belonging to the same kindred, mother and daughter (proband). The proband was first seen at our Epilepsy Clinic due to refractory seizures, since their family history revealed that the mother had seizures in the past, they both underwent imaging studies. The MRI showed that both patients had contiguous gross masses of neurons lining all extension of both ventricles, making the diagnosis of BPNH. In addition, the maternal history of 5 miscarriages is suggestive of lethality in males. This observation is compatible with an X-linked dominant inheritance, which has been previously described in families segregating BPNH (Eksioglu *et al.*, 1996). Male lethality is thought to be due to catastrophic hemorrhage, a pathophysiology still poorly understood (Robertson, 2005; Moro *et al.*, 2002) that might be explained by the interaction of the FLN1 protein with coagulation proteins, such as the glycoprotein 1b α (Robertson, 2005).

The putative function of FLN1 is to crosslink with actin, forming dimers which have high flexibility due to the hinge domains added to FLN1. Missense mutations in *FLN1* in patients with BPNH are rare, especially in the first six coding exons, which are predicted to code for the actin binding domain. Missense mutations in this region are usually associated with more severe phenotypes, such as the otopalatodigital syndrome types 1 and 2 (OPD1 and OPD2), frontometaphyseal dysplasia, Melnick-Needles syndrome (Robertson *et al.*, 2003; Parrini *et al.*, 2006), and severe mental retardation. By contrast, splicing site and nonsense mutations are more frequent and are associated with classical

BPNH. We have identified a novel point mutation in the *FLN1* gene, the substitution c.987G→C. This abnormality could potentially result in two molecular effects: **a)** a change of glutaminic acid for aspartic acid in the position 329 of FLN1 protein or **b)** a destruction of a splicing site. As mentioned above, the precise nature of the molecular defect is relevant for the establishment of genotype-phenotype correlations; therefore, we investigated its molecular effects on mRNA level.

Our results clearly showed that the pathogenic mechanism of the mutation found is the intron 6 splice-donor-site destruction. This was confirmed by the cDNA sequencing analysis. RNA splicing process consists in the precise removal of intron sequences from the pre-mRNA and subsequent ligation of the flanking exons. This process is carried out by the spliceosome, a large ribonucleoprotein complex composed by 5 types of small nuclear RNAs (snRNAs): U1, U2, U4, U5 and U6. Each snRNA binds to at least 7 protein subunits to form the small nuclear ribonucleoprotein (snRNP; Thanaraj and Clark, 2001; Newman, 1997). The splicing reaction consists of transesterifications that break the bounds between the intron and the flanking exons. Subsequently, the exons are connected in order to form the mRNA that will be translated. The splicing process starts with the recognition of the 5' splice site, performed by the U1 subunit of the spliceosome. The binding of the U1 to the pre-mRNA requires a specific sequence composed by the first dinucleotide of the 5' intron edge, the three nucleotides upstream, including the conserved AG at the end of the exon sequence, and the eight nucleotides downstream. Through the U1 binding, the other subunits of the spliceosome are able to recognize their respective sites to perform the splicing process. The mutation we describe affects the most important nucleotide position in the splice site (the last base pair of the coding exon); this along with nucleotide +5 upstream the 5' splice site are essential for the base-pairing of U1 in the snRNA (Carmel *et al.*, 2004). Therefore, mutations in one of these two nucleotide positions are very likely to cause damage to the splicing process in its very beginning.

In addition, the intron 6 sequence, abnormally kept by the mutation, introduces a stop codon at the beginning of the RNAm sequence, resulting in a truncated protein that loses the dimerization site, hinge domains, and deletes 23/24 filamin repeats. These last elements work as interaction sites for membrane receptors, signal transduction proteins,

hormone receptors, proteases and proteins involved in cell migration and coagulation (Robertson, 2005).

We observed a clear variation in phenotype severity of our two patients, being the proband more severely affected than her mother. One possible explanation for the large spectrum of clinical signs and syndromes found in patients with *FLNI* mutations is the presence of mosaicism (Parrini *et al.*, 2004). Mosaicism has been also described in male patients (Sheen *et al.*, 2001; Parrini *et al.*, 2004), and was taken as the explanation for their survival. In our proband, we found evidence for a skewed X- chromosome inactivation on methylated HUMARA gene experiments, although we could not determine which allele was preferentially inactivated. In addition, quantitative real time PCR showed a higher expression of the mutated allele in the proband when compared to her mother, indicating that the mutated allele could be preferentially expressed in the proband, but not in the mother, who had a normal (random) X-chromosome inactivation pattern. However, it is important to note that the X-chromosome inactivation and expression experiments were performed on samples from peripheral blood, and may not reflect the X-chromosome inactivation patterns of *FLNI* alleles in the central nervous system.

ACKNOWLEDGEMENTS:

We would like to thank the patients for their cooperation. This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil. SST and FRT also received scholarships from FAPESP, Brazil.

WEB RESOURCES

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.expasy.org

REFERENCES

1. Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB *et al.* (1992); Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet.* 1992; 51(6):1229-39
2. Carmel I, Tal S, Vig I, Ast G. (2004), Comparative analysis detects dependencies among the 5' splice-site positions. *RNA.* May;10(5):828-40.
3. Corpet F. (1988), Multiple sequence alignment with hierarchical clustering ; *Nucl. Acids Res.*, 16 (22), 10881-10890
4. Cunningham C, Gorlin J, Kwiatkowski D *et al.* (1992) Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion. *Science*, 255: 325-327.
5. Eksioglu YZ, Scheffer IE, Cardenas P, *et al.* (1996); Periventricular heterotopia: an X-linked dominant epilepsy locus causing aberrant cerebral cortical development. *Neuron.* Jan;16(1):77-87
6. Fox J, Lamperti E, Eksioglu Y, *et al.* (1998) Mutations in filamin 1 arrest migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* 21: 1315-1325.
7. Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A. (2003) ExPASy: the proteomics server for in-depth protein *knowledge and analysis*. *Nucleic Acids Res.* 31:3784-3788
8. Glogauer M, Arora P, Chou D, *et al.* (1998) The role of actin-binding protein 280 in integrin-dependent mechanoprotection. *J. Biol. Chem.*, 275: 1689-1698.
9. Guerrini R, Mei D, Sisodiya S *et al.* (2004) ; Germline and mosaic mutations of FLN1 in men with periventricular heterotopia. *Neurology.* Jul 13;63(1):51-6.
10. Konarska MM, Query CC. (2005); Insights into the mechanisms of splicing: more lessons from the ribosome.; *Genes Dev.* Oct 1;19(19):2255-60. Review.

11. Montenegro MA, Guerreiro MM, Lopes-Cendes I *et al.*(2002) ; Interrelationship of Genetics and Prenatal Injury in the Genesis of Malformations of Cortical Development. *Ach Neurol* 59: 1147-1153.
12. Moro F, Carrozo R, Veggiotti P *et al.* (2002) Familial periventricular heterotopia: missense and distal truncating mutations of the *FLN1* gene. *Neurology*; 58: 916-921.
13. Newman, AJ (1997); The role of U5 snRNP in pre-mRNA splicing; *The EMBO Journal* Vol.16 No.19 pp.5797–5800,
14. Ott I, Fischer E, Miyagi Y *et al.* (1998) A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280. *J. Cell Biol.*, 140: 1241-1253.
15. Parrini E, Mei D, Wright M, *et al.* (2004); Mosaic mutations of the *FLN1* gene cause a mild phenotype in patients with periventricular heterotopia. *Neurogenetics*. Sep;5(3):191-6. Epub Jul 28.
16. Parrini E, Ramazzotti A, Dobyns WB, *et al.*(2006); Periventricular heterotopia: phenotypic heterogeneity and correlation with Filamin 1 mutations. *Brain*. Jul;129(Pt 7):1892-906.
17. Poussaint TY, Fox JW, Dobyns WB, *et al.* (2000) Periventricular nodular heterotopia in patients with filamin-1 gene mutations: neuroimaging findings. *Pediatr Radiol* 30: 748-755
18. Robertson SP, Twigg SRF, Sutherland-Smith AJ *et al.* (2003) Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans. *Nature Genetics*, 33: 487-491.
19. Robertson SP. (2005); Filamin A: phenotypic diversity.; *Curr Opin Genet Dev*. Jun;15(3):301-7. Review.

20. Sheen VL, Dixon PH, Fox JW *et al.* (2001); Mutations in the X-linked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females. *Hum. Mol. Genet.*, 10: 1775-1783.
21. Stendahl O, Hartwig J, Brotschi E *et al.* (1980) Distribution of actin-binding protein and myosin in macrophages during spreading and phagocytosis. *J. Cell Biol.*, 84: 215-224.
22. Thanaraj TA, Clark F. (2001); Human GC-AG alternative intron isoforms with weak donor sites show enhanced consensus at acceptor exon positions. *Nucleic Acids Res.* Jun 15; 29(12):2581-93

FIGURE LEGENDS:

Figure 1: MRI images of the proband (A) and her mother (B). The white arrows are pointing to contiguous masses of gray nodules lining the lateral ventricles, a typical characteristic of patients with bilateral periventricular nodular heterotopia (BPNH). Note that the nodules are less prominent in the mother (1B).

Figure 2: Analysis of genomic DNA sequencing from a control sample (A) and the proband (B). The site of the mutation is marked with a red circle.

Figure 3: Analysis PCR amplification of cDNA samples from patients (A) and controls (B). There is a difference of 100 bp in the size of the fragments. Ladder 100bp.

Figure 4: Bioinformatics analysis of the cDNA sequencing (second line) obtained from a control sample (A) and patients (B) aligned with a genomic DNA sequence (first line). A black circle marks the position of the mutation we found (B). In panel A it is possible to observe the alignment of sequences from exons 6 and 7 (in red), while in panel B the sequence alignment also occurs with intron 6 after the mutation (marked by a white arrow).

Figure 5: Bioinformatics analysis showing the translation of the mutated sequence containing intron 6 as predicted by the Translate ToolTM (www.expasy.org). The abnormal premature stop codon is circled in red.

Figure 6: X-chromosome inactivation analysis using the methylation of the HUMARA gene assay. A) Electrophoresis of PCR fragments of nondigested genomic DNA of the proband (1) and the mother (2), showing the amplification of two different alleles indicating that both patients are heterozygous for the VNTR at the HUMARA gene. B) Electrophoresis of PCR fragments of digested genomic DNA of the proband (1) and her mother (2). Enzymatic digestion will only cut DNA fragments which are unmethylated, preventing its PCR amplification. We expect that in most females X-chromosome methylation occurs in 50% of each allele. In panel B, the proband shows only a single band, indicating that the proportion of methylated and unmethylated fragments of the two amplified VNTR regions are different from the expected 50%; by contrast, a normal pattern is observed in the mother (2).

Figure 7: Results of quantitative real time PCR analysis, comparing the expression of the mutated allele in both patients. We used probes and primer sequences specific for the intron 6 region, so that only expression of the mutated allele was detected in the experiment. The proband presents a four fold increased expression of the mutated allele when compared to her mother.

FIGURE 1

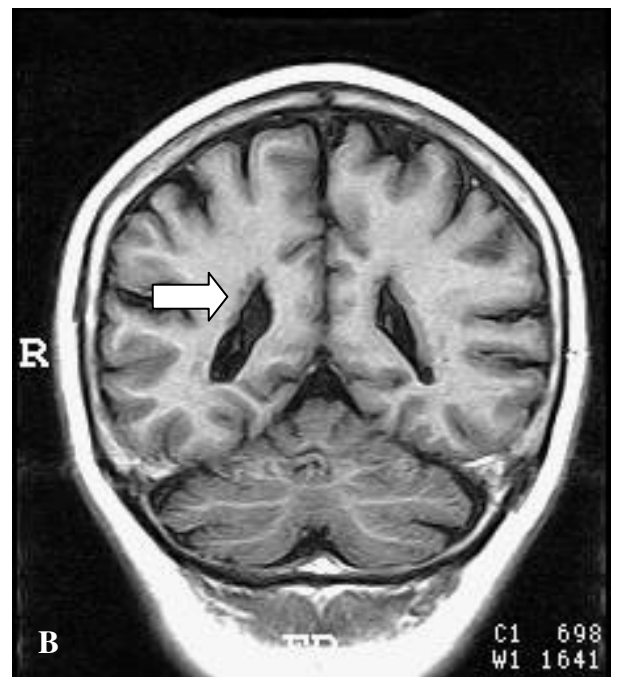
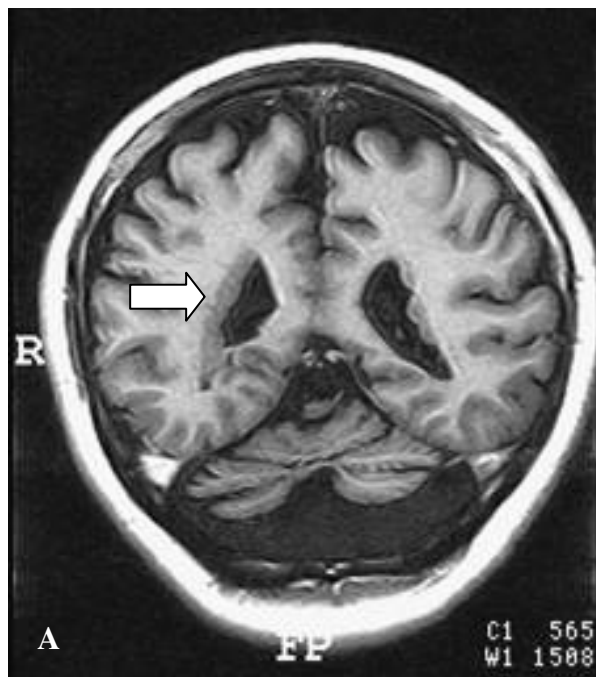


FIGURE 2

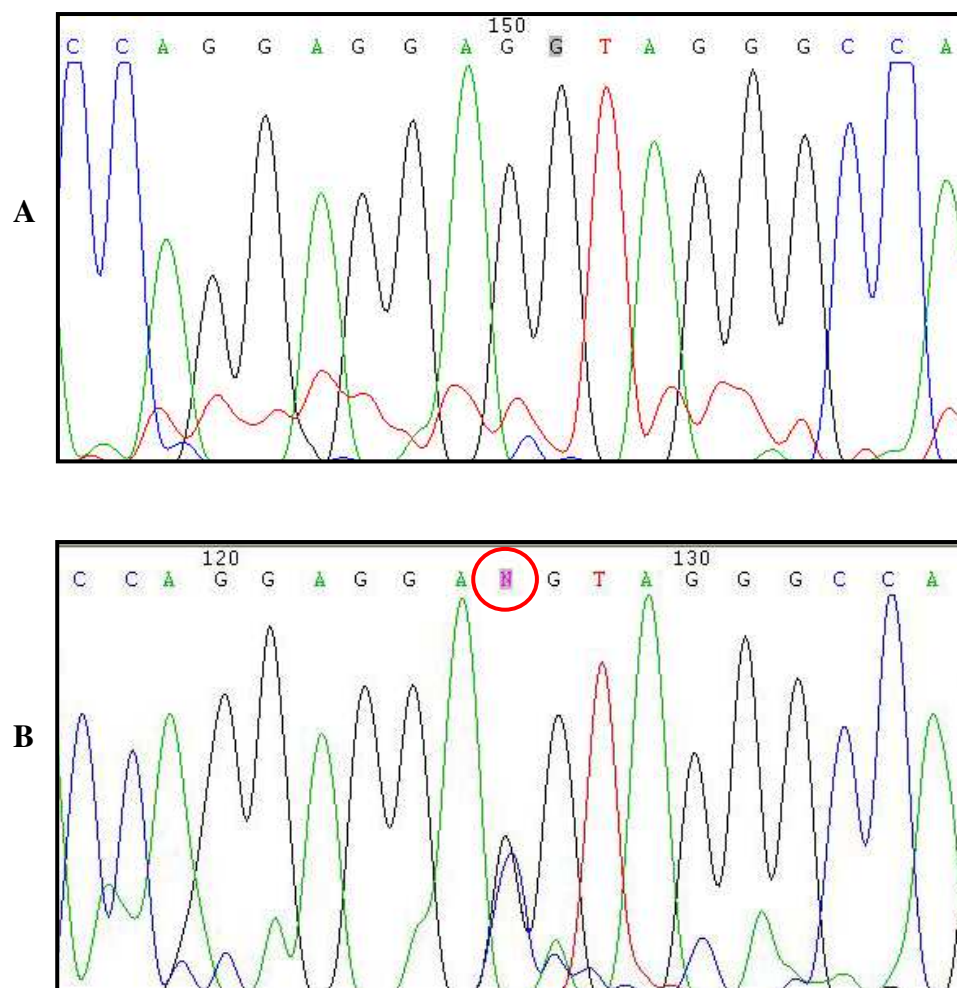


FIGURE 3

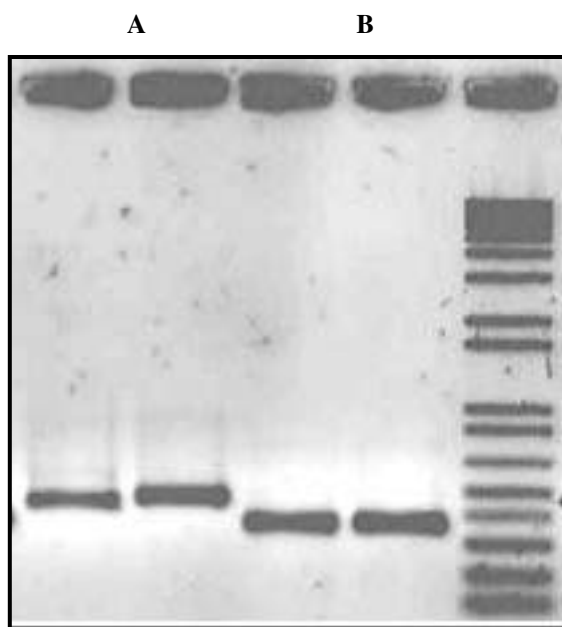


FIGURE 4

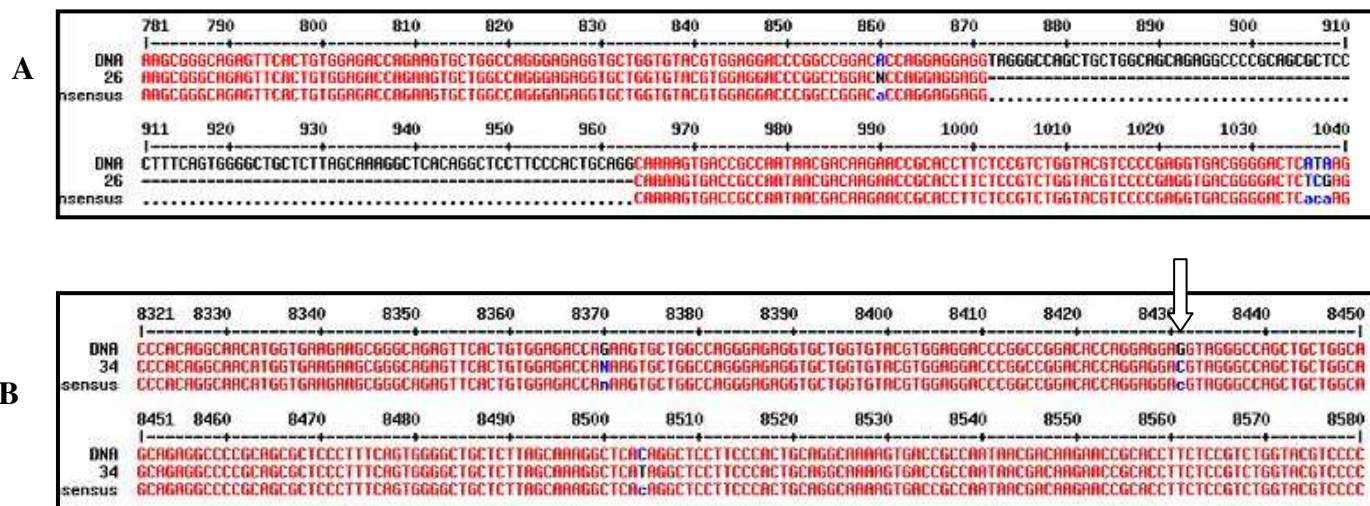


FIGURE 5

[5'3' Frame 1](#)

MetSSSSHSRAGQSAAGAAPGGGVDTTRDAEMetPATEKDLAEDAPWKKIQQNTFTRWCNEHLKCVSKRIAN
LQTDLS DGLRLIALLEVLSQKKMetHRKHNRPTFRQMetQLENVSVALEFLDRESIKLVSIDSKAIVDGNL
KLILGLIWTLILHYSISMetPMetWDEEEDEEAKKQTPKQRLLGWIQNKLPQLPITNFSRDWQSGRALGALV
DSCAPGLCPDWDSWDASKPVTNAREAMetQQADDWLGPQVITPEEIVDPNVDEHSVMetTYLSQFPKAKL
KPGAPLRPKLNPKKARAYGPGIEPTGNNMetVKKRAEFTVETR SAGQGEVLVYVEDPAGHQEEVGPAAGSR
GPAALPFSGAALSKGSQAPSHCRQKStopEPITTRTAPSPSGTSPRStopRGLI

FIGURE 6

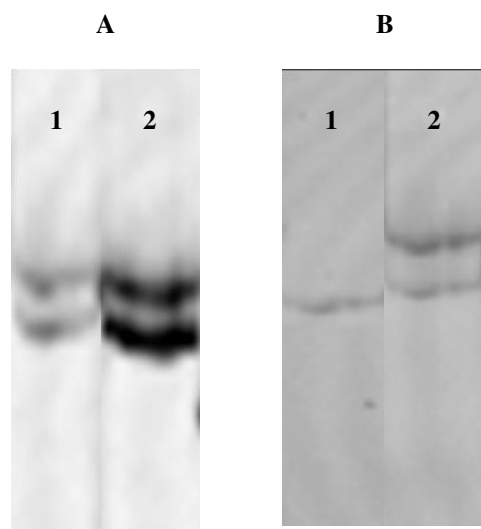
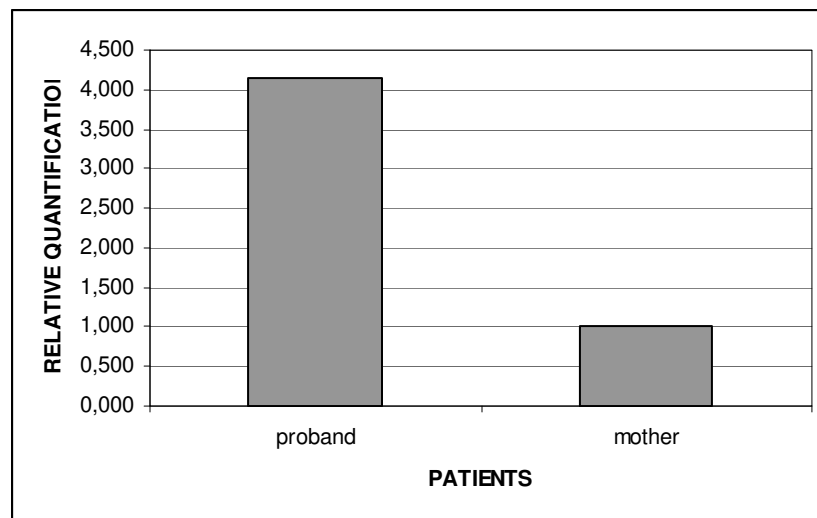


FIGURE 7



CAPÍTULO 3

ARTIGO 3

SCHIZENCEPHALY, POLYMICROGYRIA AND THE *EMX2* GENE: CLINICAL EVALUATION AND MUTATION SCREENING

Daniela Aguiar de Souza-Kols¹, Fábio Rossi Torres¹, Simone Sayuri Tsuneda¹, Iara Leda Brandão de Almeida¹, Camila Fernanda Lopes², Maria do Carmo Sousa Rodrigues³, Marilisa Mantovani Guerreiro², Juan Clinton Llerena Jr³, Fernando Cendes², Iscia Lopes-Cendes¹

Schizencephaly, polymicrogyria and the *EMX2* gene: clinical evaluation and mutation screening

Daniela Aguiar de Souza-Kols¹, Fábio Rossi Torres¹, Simone Sayuri Tsuneda¹, Iara Leda Brandão de Almeida¹, Camila Fernanda Lopes², Maria do Carmo Sousa Rodrigues³, Marilisa Mantovani Guerreiro², Juan Clinton Llerena Jr³, Fernando Cendes², Iscia Lopes-Cendes¹

Departments of Medical Genetics ¹ and Neurology ², Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

Department of Genetics³, Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Running title: Mutations in schizencephaly and polymicrogyria

Keywords: schizencephaly, polymicrogyria, *EMX2*, mutation

Correspondence to: Iscia Lopes-Cendes, MD, PhD

Department of Medical Genetics,
University of Campinas - UNICAMP
Tessália Vieira de Camargo, 126
Campinas SP, Brazil, 13084-971
Tel: +55 19 35218907
FAX: +55 19 3289-1818
Email: icendes@unicamp.br

Abstract

Schizencephaly is a rare cortical malformation disorder characterized by unilateral or bilateral full-thickness cleft of the cerebral hemispheres. Large portions of these may be absent and replaced by cerebrospinal fluid. Polymicrogyria has been considered as a mild form of schizencephaly and is characterized by abnormal cortical lamination and excessive number of small gyri and prominent convolutions. Heterozygous mutations in the *EMX2* gene have been reported in patients with schizencephaly; however these findings have not been confirmed in large scale. Clinical analysis and mutation screening of *EMX2* gene were performed in 76 patients, from which 46 presented schizencephaly and 30 polymicrogyria. Pathologic mutations were not identified in this cohort. Our data show that pathogenic mutations in the *EMX2* gene are not a common cause of schizencephaly and polymicrogyria.

INTRODUCTION

Schizencephaly consists of a unilateral or bilateral full thickness cleft of the cerebral hemispheres with consequent communication between the ventricle and pericerebral subarachnoid spaces (Guerrini et al., 2003). These clefts are characterized by an infolding of polymicrogyric gray matter along the cleft from the cerebral cortex into the ventricle (Barkovich, 1988, Wolpert et al., 1992; Granata et al., 1996). The clinical features of schizencephaly are extremely variable and their severity is closely related to the separation of the cleft lips and the position and size of the area involved (Barkovich et al., 1992). Based on the space separating the walls of the fissure and the hemispheres affected (unilateral or bilateral clefts), an open-lip form and a closed-lip form can be distinguished.

Polymicrogyria is a cortical malformation characterized by an excessive number of small and prominent convolutions spaced out by shallow and enlarged sulci, giving the cortical surface a lumpy aspect (Fried, 1989). There are, at least, two different types of histological patterns: unlayered type and four-layered type; in both, the cortical ribbon is abnormally thin, excessively folded, and may show fusion of adjacent gyri. Layered and unlayered PMG can be both found in the same individual, thus suggesting that they belong to the same malformation spectrum (Villard, 2004). Association between polymicrogyria and schizencephaly are well described, including regions of polymicrogyric cortex lining the borders of the schizencephaly clefts (Levine et al., 1974; Hayashi et al., 2002). Association of both malformations in adjacent areas of the cortex suggests a common etiology for these cortical development disorders.

Description of few schizencephaly familial cases (Hilburger et al., 1993) and the report of heterozygous mutations in *EMX2* (Brunelli et al., 1996; Faiella et al., 1997; Granata et al., 1997), a homeobox gene that codes for a transcription factor involved in the cortex development (Simeoni et al., 1992), raised the possibility that genetic factors could play a relevant role in the pathogenesis of this disorder. Since polymicrogyria is probably part of the schizencephaly spectrum, the *EMX2* gene could be involved with the molecular pathways associated with this malformation.

In despite of the potential role of *EMX2* in the etiology of schizencephaly and polymicrogyria, previous works failed to describe genetic association between this gene and cortical malformations. Recently, three reports describing mutation screening in large cohorts of patients with schizencephaly have detected no mutation in the *EMX2* gene (Barkovich et al., 2001; Granata et al., 2005; Tietjen et al., 2007). Although association between schizencephaly and polymicrogyria; a genetic screening in *EMX2* gene has never been performed in patients with polymicrogyria.

The aim of this work was to perform a clinical and genetic study in order to investigate the molecular etiology of the *EMX2* gene in a cohort of 76 patients, forty-six of these with schizencephaly and 30 with polymicrogyria.

METHODS

A total of 76 patients were identified through a systematic investigation at the neurologic clinic of tertiary hospitals, at University of Campinas (SP) and FIOCRUZ (RJ), Brazil. All patients were evaluated by a neurologist following standard protocols. The diagnosis of schizencephaly and polymicrogyria was established according to MRI or CT findings. All patients signed an informed consent form approved by the ethics committee of the University of Campinas, Campinas, Brazil and FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

We systematically interviewed patients and their family members according to a standard detailed questionnaire, emphasizing the family history of epilepsy or other neurological impairment in first-degree, second-degree, or third-degree relatives and the occurrence of any prenatal event during gestation.

Genomic DNA was extracted from peripheral whole blood lymphocytes with a standard protocol. Polymerase chain reactions (PCRs) were carried out using the published primer sequences (Brunelli et al., 1996) in a total volume of 22 µl, containing 40ng of genomic DNA; 100ng of each primer; 200µM of dGTP, dCTP, dTTP e dATP; 0.5 units of Taq DNA, 1.5mM of MgCl₂. Samples were processed in the following conditions: 35 cycles of 45s at 94°C, 30s at 62-65°C and 60s at 72°C. PCR products were analyzed by

denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) according to the manufacturer's specifications (Transgenomic – Omaha, NE, USA). DHPLC data analysis was conducted on visual inspection of the chromatogram profiles and comparison with 50 unrelated normal controls. Individuals that have a different chromatogram profile from normal controls were subsequently sequenced using the Big Dye Terminator Sequencing kit ® for Megabace ® in order to determine their exact nucleotide sequence. All identified nucleotide changes in the coding region of the *EMX2* gene were submitted to *in silico* analysis with Polyphen and SIFT software and to the Grantham scale (Grantham et al., 1974) to establish if it is deleterious to the protein.

RESULTS

Clinical findings

Detailed clinical and neuroimaging findings of majority of these patients have been presented previously (Lopes et al., 2006; Brandão de Almeida, unpublished data). Data are summarized in **tables 1, 2 and 3**. To date, we have studied a total of 76 patients, forty-six had schizencephaly and 30 had polymicrogyria (tables 1, 2 and 3). In the schizencephaly group, Twenty-three were women and 23 were men whose age ranged from four to 46 years (mean age = 14.28 years), only one familiar case were detected. In polymicrogyria group, eight were women and 22 were men, twenty cases were familiar and 10 cases were sporadic, age ranged from five to 65 years (mean age = 18.5 years). In general, seizures were observed in 40/76 patients and were well controlled or have a good outcome in 20 individuals. The mean age for seizure onset was 6.3 years old. Neurological deficits were detected in 57 patients. In the schizencephaly group, seizures were observed in 34/46 individuals. Partial seizures were identified in 20 patients, TCG seizures were detected in four individuals while other patients had infantile spasms (n=2), seizures typical of Lennox-Gastaut syndrome (n=2), typical absences (n=1), atypical absences (n=1), myoclonic seizures (n=1) and seizures not otherwise classified (n=9). More than one seizure category could be present in the same individual. The overall median age for the first seizure in individuals whose data is available was 6.6 years old. Schizencephaly

patients generally have well controlled seizures (n=14). Neurological deficit was observed in 39 patients, and ranged since mild hemiparesis to severe mental retardation and tetraparesis. In the polymicrogyria group, seizures were observed in six patients. Partial seizures were detected only in one individual, TCG were observed in six patients while infantile spasms were diagnosed in one individual. The overall median age for the first seizure in this group was 4.6 years old. All individuals had seizures well controlled or with good outcome. Neurological impairment was observed in 18 patients and ranged from pseudobulbar palsy to tetraparesis.

Prenatal events

Data are summarized in **tables 1, 2 and 3**. We have detected prenatal events in 30/76 patients. Prenatal events were reported by 21/46 patients in the schizencephaly group, and by 9/30 patients of polymicrogyria group. In patients with schizencephaly, vaginal bleeding was identified in six patients, abortion attempt was observed in five individuals while IgG positive for infectious agents were detected in other five individuals. Other prenatal events identified were: fever and rash, low blood pressure, hemorrhage, drug addiction, fall during pregnancy, anoxia and poor prenatal care. Association between two or more prenatal events could be observed in patients of this group (**table 3**). In polymicrogyria group, hypertension was identified in three patients; vaginal bleeding and twin pregnancy were reported by two patients while drug addiction and fever were observed in one individual, respectively.

Familiar history

Significantly familiar history was observed in 20/30 patients with polymicrogyria (**table 1 and 2**). Familiar cases with recurrence of cortical malformation confirmed by neuroimaging and segregating in pedigrees were included in our analysis, thus this data could be overestimated. In schizencephaly group, 18/46 patients showed familiar history, including schizencephaly recurrence confirmed by neuroimaging in two

sisters (**table 3**). Seizure has been identified in relatives of six patients. Miscarriage history was detected in five patients while consanguineous marriage, familiar history of mental retardation, amniotic brida, neurofibromatosis, familiar history of deaf and dumb and neonatal death were respectively reported by no more than one patient. Occurrence of two or more events in the same patient was also reported. Data of familiar history were not available for three patients.

Mutation Analysis

DHPLC analysis of the three exons and the adjacent intron boundaries of *EMX2* gene detected an altered elution profile corresponding to exon 2 in four patients with schizencephaly and four individuals from the control group. Sequencing of these fragments revealed a transversion C796A (NCBI; NM_004098) (**figure 1**), this substitution does not change the wild type amino acid arginine in position 156 of the protein. In addition, no alteration in the DHPLC elution profile of *EMX2* gene was detected in patients with polymicrogyria.

DISCUSSION

Barkovich and Kjos (1992) have proposed that localized damage to the radial glial cells or the neuronal guidance system causes a wedge-shape defect in the cortical mantle and disruption of the adjacent migration of neuroblasts and as a result the lips of the cleft are lined with abnormal gray matter. Furthermore, schizencephaly and polymicrogyria would be the result of the same ischemic cortical damage in the early postmigrational period (Barkovich & Kjos, 1992). This hypothesis is supported by the association of areas of polymicrogyria contralaterally and symmetrically located to unilateral schizencephalies.

Suggestions of the existence of genetics factors associated to schizencephaly have been reported by Zimmerman et al. (1983), with the identification of a dicentric chromosome 15 (Maurine et al., 1997) and 13q-karyotype in a patient with alobar

prosencephaly (Zimmerman et al., 1983). Brunnelli et al. (1996) reported de novo mutations in the *EMX2* gene in 7/8 patients analyzed. This data were supported by other studies analyzing familial cases (Granata et al.; 1997) and sporadic patients (Faiella et al.; 1997).

In addition, genetic contribution to the etiology of polymicrogyria is supported by reports of familial cases, suggesting that mutations in genes involved with cortex development 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). A candidate *locus* was mapped on ch Xq28 (Villard et al., 2002) in five families with bilateral perysylvian polymicrogyria and mutations in the *GPR56* gene were reported in patients with an autosomal recessive inheritance form of bilateral frontoparietal polymicrogyria (Piao et al., 2002; 2004). Recently, Roll et al. (2006) found a mutation in the *SRPX2* gene (located on Xq22) in a male patient with bilateral perysylvian with severe seizures and mental retardation showing that polymicrogyria could have a strong genetic background.

Since schizencephaly and polymicrogyria are closed related malformations with a potential genetically determined etiology, we supposed that the *EMX2* gene may have a role in the genesis of these cortical malformations in our group of patients.

We have identified a C796A substitution in *EMX2* gene in four individuals with schizencephaly. This substitution is localized in the first codon of the homeobox domain and doesn't change the arginine residue of the wild type protein. This synonymous change could have a pathogenic mechanism, acting through the creation of an alternative splicing site, however the same nucleotide change was found in four asymptomatic individuals from a control group.

It is important to note that Brunelli et al. (1996) have detected the C796A substitution in three patients with schizencephaly and classified this variant as a pathogenic alteration, in despite of the fact that asymptomatic mothers of some patients harbor the same nucleotide change. Mosaicism and double heterozygosity effect were proposed to explain the pathological phenotypes in these patients. Our results clearly show that this alteration is a neutral variant differing from the data reported previously. The absence of

this variant in control groups of previous works could be explained by the ethnic differences between the Brazilian and Italian populations. This ethnic difference is due a historic process of miscegenation that resulted in a more complex and heterogeneous genetic composition of the Brazilian population.

Our data together with other reports have suggested that pathologic mutations in the *EMX2* gene are not a common cause of schizencephaly (Barkovich et al., 2001; Granata et al., 2005; Tietjen et al., 2007). The high frequency of prenatal events identified in patients with schizencephaly in our cohort of patients point to an environmental origin for this cortical malformation. Series of patients with positive history for fetal hypotensive vasculopathy by severe bleeding (Norman et al., 1980), autoimmune thrombocytopenia (Kuijpers et al., 1994), exposure to organic solvents (Nuri et al., 1998) and CMV infection (Ianetti et al., 1998; Sener, 1998) have been reported, giving support to the hypothesis of an environmental etiology.

Polymicrogyria also could be consequence of prenatal events (Barkovich et al., 1995). In despite of small number of sporadic polymicrogyria cases analyzed, environmental factors were identified in the majority of patients of this group. However there is a high incidence of familial cases in our cohort of patients, strongly supporting that genetic factors are involved with polymicrogyria etiology. X-linked inheritance was observed in four families (data not showed) and could explain the skewed sex ratio identified in our patients with polymicrogyria.

It will be interesting to perform mutation screening in *GPR56* and *SRPX2* to investigate the potential role of these genes in the etiology of polymicrogyria in our cohort of patients. In addition, positional cloning studies should be performed in familial cases in order to identify new genes implicated with this cortical malformation.

In conclusion, the occurrence of *EMX2* mutations in patients with schizencephaly is a very rare event. Furthermore, this gene is not involved with the etiology of polymicrogyria. We believe that other genes associated with forebrain development might be involved, especially in familiar cases of polymicrogyria. An environmental etiology is more probable to schizencephaly cases.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the patients for their cooperation. This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil. DSA, FRT and SST also received scholarships from FAPESP, Brazil.

References

- Barkovich AJ, Norman D. MR imaging of schizencephaly. *AJR* 1988; 150: 1391-6.
- Barkovich AJ, Kjos B. Schizencephaly: Correlation of clinical findings with with MR characteristics. *AJNR* 1992; 13:85-94.
- Barkovich AJ, Rowley H, Bollen A. Correlation of Prenatal Events with the Development of Polymicrogyria. *AJNR* 1995; 16: 822-7.
- Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Jackson GD, Guerrini R, Dobyns WB. Classification system for malformations of cortical development: Update 2001. *Neurology* 2001; 57:2168–78.
- Bartolomei F, Gavaret M, Dravet C, Guerrini R.. Familial epilepsy with unilateral and bilateral malformations of cortical development. *Epilepsia* 1999; 40: 47-51.
- Borgatti R, Triulzi F, Zucca C, Piccinelli P, Balottin U, Carrozzo R,Guerrini R. Bilateral perisylvian polymicrogyria in three generations. *Neurology* 1999; 52:1910-13.
- Brunelli S, Faiella A, Capra V, Nigro V, Simeone A, Cama A, Boncinelli E.; Germline mutations in the homeobox gene EMX2 in patients with severe schizencephaly. *Nat Genet.* 1996 12(1):94-6.
- Caraballo RH, Cersosimo RO, Mazza E, Fejerman N. Focal polymicrogyria in mother and son. *Brain Dev* 2000; 22:336-9.
- Chang BS, Piao X, Giannini C, Cascini GD, Scheffer I, Woods CG, Topcu M, Tezcan K, Bodell A, leventer RJ, Barkovich AJ, Grant PE, Walsh CA. Bilateral generalized polymicrogyria (BGP). A distinct syndrome of cortical polymicrogyria. *Neurology* 2004; 62:1722-8.
- Faiella A, Brunelli S, Granata T, D'Incerti L, Cardini R, Lenti C, Battaglia G, Boncinelli E.; A number of schizencephaly patients including 2 brothers are heterozygous for germline mutations in the homeobox gene EMX2. *Eur J Hum Genet.* 1997; 5(4):186-90.
- Friede RL. Developmental neuropathology. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1989.

Granata T, Battaglia G, D'Incerti L, Franceschetti S, Spreafico R, Battino D, Savoiaro M, Avanzini G. Schizencephaly: neuroradiologic and epileptologic findings. *Epilepsia*. 1996; 37:1185-93.

Granata T, Fariana L, Faiella A, Cardini R, D'incerti L, Boncinelli E. Familial schizencephaly associated with *EMX2* mutation. *Neurology* 1997; 48: 1403-6.

Granata T, Freri E, Caccia C, Setola V, Taroni F, Battaglia G. Schizencephaly: Clinical spectrum, epilepsy, and pathogenesis. *J Child Neurol* 2005; 20:313–8.

Grantham R. Amino acid difference formula to help protein evolution. *Science* 1974; 185: 862-4.

Guerrini R, Carrozzo R. Epileptogenic brain malformations: clinical presentation, malformative patterns and indications for genetic testing. *Seizure*. 2001; 10:532-43.

Hayashi N, Tsutsumi Y, Barkovich AJ. Polymicrogyria without porencephaly/schizencephaly: MRI analysis of the spectrum and the prevalence of macroscopic findings in the clinical population. *Neuroradiology* 2002;44:647-55.

Hilburger AC, Willis JK, Bouldin E, Henderson-Tilton A. Familial schizencephaly. *Brain Dev* 1993; 15: 234-6.

Iannetti P, Nigro G, Spalice A, Faiella A, Boncinelli E. Cytomegalovirus infection and schizencephaly: case reports. *Ann Neurol*. 1998; 43(1):123-7.

Kuijpers RW, van den Anker JN, Baerts W, von dem Borne AE. A case of severe neonatal thrombocytopenia with schizencephaly associated with anti-HPA-1b and anti-HPA-2a. *Br J Haematol*. 1994; 87(3): 576-9.

Levine DN, Fisher MA, Caviness VS Jr. Porencephaly with microgyria: a pathologic study. *Acta Neuropathol* . 1974; 29: 99-113.

Li X, Park WJ, Pyeritz RE, Jabs EW. Effect on splicing of a silent *FGFR2* mutation in Crouzon syndrome. *Nat Genet*. 1995; 9(3): 232-3.

Lopes CF, Cendes F, Piovesana AM,SG, Torres FR, Lopes-Cendes I, Montenegro MA, Guerreiro MM. Epileptic features of patients with unilateral and bilateral schizencephaly. *J Child Neurol* 2006; 21: 757-760.

Guerreiro MM, Andermann E, Guerrini R, Dobyns WB, Kuzniecky R, Silver K, Van Bogaert P, Gillain C, David P, Ambrosetto G, Rosati A, Bartolomei F, Parmeggiani A, Paetau R, Salonen O, Ignatius J, Borgatti R, Zucca C, Bastos AC, Palmini A, Fernandes W, Montenegro MA, Cendes F, Andermann F. Familial perisylvian polymicrogyria: a new familial syndrome of cortical maldevelopment. *Ann Neurol* 2000; 48:39-48.

Norman MG. Bilateral encephaloclastic lesions in a 26 week gestation fetus: effect on neuroblast migration. *Can J Neurol Sci* 1980; 7(3): 191-4.

Piao X, Basel-Vanagaite L, Straussberg R, Grant PE, Pugh EW, Doheny K, Doan B, Hong SE, Shugart YY, Walsh CA. An autosomal recessive form of bilateral frontoparietal polymicrogyria maps to chromosome 16p12.2-21. *Am J Hum Genet* 2002; 70:1028-33.

Piao X, Hill RS, Bodell A, Chang BS, Basel-Vanagaite L, Straussberg R, Dobyns WB, Qasrawi B, Winter RM, Innes AM, Voit T, Ross ME, Michaud JL, Descarrie JC, Barkovich AJ, Walsh CA. G protein-coupled receptor-dependent development of human frontal cortex. *Science* 2004; 303:2033-6.

Roll P, Rudolf G, Pereira S, Royer B, Scheffer IE, Massacrier A, Valenti MP, Roeckel-Trevisiol N, Jamali S, Beclin C, Seegmuller C, Metz-Lutz MN, Lemaingue A, Delepine M, Caloustian C, de Saint Martin A, Bruneau N, Depetris D, Mattei MG, Flori E, Robaglia-Schlupp A, Levy N, Neubauer BA, Ravid R, Marescaux C, Berkovic SF, Hirsch E, Lathrop M, Cau P, Szepetowski P. SRPX2 mutations in disorders of language cortex and cognition. *Hum Mol Genet* 2006; 15:1195-1207.

Sener RN. Schizencephaly and congenital cytomegalovirus infection. *J Neuroradiol.* 1998; 25: 151-2.

Simeone A, Gulisano M, Acampora D, Stornaiuolo A, Rambaldi M, Boncinelli E. Two vertebrate homeobox genes related to the Drosophila empty spiracles gene are expressed in the embryonic cerebral cortex. *EMBO J* 1992; 11: 2451-2550.

Tietjen I, Bodell A, Apse K, Mendonza AM, Chang BS, Shaw GM, Barkovich AJ, Lammer EJ, Walsh CA. Comprehensive EMX2 genotyping of a large schizencephaly case series. *Am J Med Genet A*. 2007; 143: 1313-6.

Villard L, Nguyen K, Cardoso C, Martin CL, Weiss AM, Sifry-Platt M, Grix AW, Graham JrJM, Winter RM, Leventer RJ, Dobyns WB. A locus for Bilateral Perisylvian Polymicrogyria maps to Xq28. *Am J Hum Genet* 2002; 70:1003-8.

Villard L. Polymicrogyria. *Orphanet Encyclopedia*. August 2004.

Wolpert SM, Barnes PD. MTI in Pediatric Neuroradiology. St Louis, Mosby Year Book, 1992.

Zimmerman RA, Bilaniuk LT, Grossman RI. Computed tomography in migratory disorders of human brain development. *Neuroradiology* 1983; 25 (4): 257-263.

Table 1: Clinical and demographic data of 20 patients with familial polymicrogyria

Family	Pt/Age/Gender	MRI (PMG)	Seizure: age/type	Neurologic examination	Language Dev.	Language skill	Prenatal events	Molecular analysis for <i>EMX2</i> gene
1	I-2/65/F	PS	13yr/GTC/SF	normal	normal	normal	-	-
	II-3/42/F	PS BPPP		normal	normal	dyslexia	-	-
	II-4/39/M	PS		pseudobulbar palsy + left hemiparesis	delay	SLI	-	-
	II-6/35/F	PS BPPP		normal	normal	normal	-	-
	III-1/19/M	PS		pseudobulbar palsy	delay	SLI	hypertension	-
	III-2/16/M	PS BPPP		normal	delay	dyslexia	-	-
	III-3/9/M	PS BPPP		normal	delay	dyslexia	-	-
2	II-12/39/M	PS	6yr/GTC/SF	pseudobulbar palsy	delay	normal	-	-
	II-13/37/M	PS		pseudobulbar palsy	delay	dyslexia	-	-
	III-4/19/M	PS BPPP		normal	delay	normal	-	-
	III-5/16/M	PS BPPP + ACC		pseudobulbar palsy	delay	dyslexia	-	-
	III-6/9/F	PS BPPP		pseudobulbar palsy	delay	SLI	-	-
	III-10/12/M	PS BPPP		normal	delay	SLI	-	-
	III-11/6/M	PS BPPP		pseudobulbar palsy	delay	SLI	-	-
3	II-1/15/M	PS	4yr/GTC/Con	pseudobulbar palsy	delay	SLI	twin pregnancy	-
	II-2/15/M	PS BPPP		normal	delay	normal	twin pregnancy	-
	III-4/9/F	PS BPPP		normal	delay	dyslexia	-	-
4	III-6/7/M	PS	4yr/GTC/Con	pseudobulbar palsy + right hemiparesis	delay	dyslexia	-	-
5	III-2/35/F	PS BPPP		normal	normal	normal	-	-
	IV-1/6/F	PS BPPP		normal	delay	SLI	-	-

Pt=patient; MRI=magnetic resonance imaging; CT=computed tomography; M=male; F=female; NO= not obtained; ND=not done; GTC=generalized tonic-clonic; PS=perisylvian; PMG= polymicrogyria; BPPP = bilateral posterior parietal polymicrogyria; SLI=specific language impairment; ACC = agenesis of corpus callosum; SF = seizure free; Con = controlled with antiepileptic drug, yr = year.

Table 2: Clinical and demographic data of 10 patients with sporadic polymicrogyria

Pt/age, y/sex	MRI (PMG)	Seizure:age / type	Seizure outcome	Neurologic examination	Language skill	Language Dev.	Prenatal events	Molecular analysis for <i>EMX2</i> gene
1/14/M	PS	-	-	pseudobulbar palsy	SLI	delay	-	-
2/10/M	PS	8mo/CP,GTC	seizure- free	pseudobulbar palsy	SLI	delay	-	-
3/13/M	PS	-	-	pseudobulbar palsy	SLI	delay	-	-
4/10/M	PS	-	-	pseudobulbar palsy + right hemiparesis	dyslexia	delay	fever at wk 20th	-
5/10/M	PS	-	-	pseudobulbar palsy	SLI	delay	vaginal bleeding	-
6/8/M	PS BPPP	-	-	normal	SLI	delay	hypertension	-
7/15/M	PS	-	-	pseudobulbar palsy + microcephaly	ND	delay	vaginal bleeding	-
8/12/M	PS BPPP	-	-	normal	dyslexia	delay	hypertension	-
9/5/F	PS PMG	9mo/IS,GTC	controlled with AED	pseudobulbar palsy + tetraparesis + microcephaly	ND	delay	-	-
10/8/M	PS + HA	18mo/GTC	seizure- free	pseudobulbar palsy + left hemiparesis	SLI	delay	drug addiction	-

IS = infantile spasms; CP = complex partial; GTC = generalized tonic-clonic; ND = not done; PS = perisylvian; PMG = polymicrogyria; BPPP = bilateral posterior parietal polymicrogyria; SLI = specific language impairment; mo = months; HA = hippocampal atrophy; AED = antiepileptic drug; wk = week, mo = month.

Table 3: Clinical and demographic data of the 46 patients with schizencephaly

Pt Id/sex/ age (years)	MRI/CT (SCZ)	Seizure: age (years)\type	Seizure outcome	Neurological examination	Prenatal events	Familial history (No. of Relatives)	molecular analysis for <i>EMX2</i> gene
*1/F/12	unilateral left temporo-parietal, open lips + diffuse polimicrogyria	1/P	controlled	tetraparesis	-	neurofibromatosis	-
*2/F/9	nd, open lips	-	-	-	-	-	-
*3/M/26	bilateral parieto- occipital closed lips	4/Lennox- Gastaut	controlled	right pyramidal discharge	fever, rash, rubeola infection	epilepsy (2)	-
*4/M/11	unilateral left temporo-parietal open lips + polimicrogyria	1.5/P	controlled	right pyramidal discharge	abortion attempt, vaginal bleeding (7 th month)	MR (1)	-
*5/F/13	unilateral left temporo-frontal open lips + diffuse polimicrogyria	-	-	tetraparesis	-	-	-
*6/F/8	bilateral left frontal closed lips and right frontal open lips + agenesis of septum pellucidum and atrophy of the optic nerve	na/na	controlled	right pyramidal discharge	-	epilepsy (12)	C796A, R156R
*7/M/17	nd, left temporo- parietal open lips	5/P	two episodes per year	right hemiparesis	fall during pregnancy	-	-
8/M/10	bilateral diffuse open lips	4/IS (West)	daily	left pyramidal discharge	poor prenatal care, patient put up for adoption	-	-
9/M/23	unilateral right frontal closed lips	9/P	five episodes per week	left pyramidal discharge	abortion attempt	-	-
10/M/44	unilateral right occipital + cortical dysplasia	37/P	two episodes per week	normal	-	-	-
11/F/15	unilateral right parieto-occipital, open lips + heterotopia	-	-	left hemiparesis	hematemesis	-	-
12/F/19	bilateral fronto- parietal open lips + agenesis of septum pellucidum, arachnoid cyst	-	-	tetraparesis	-	-	-

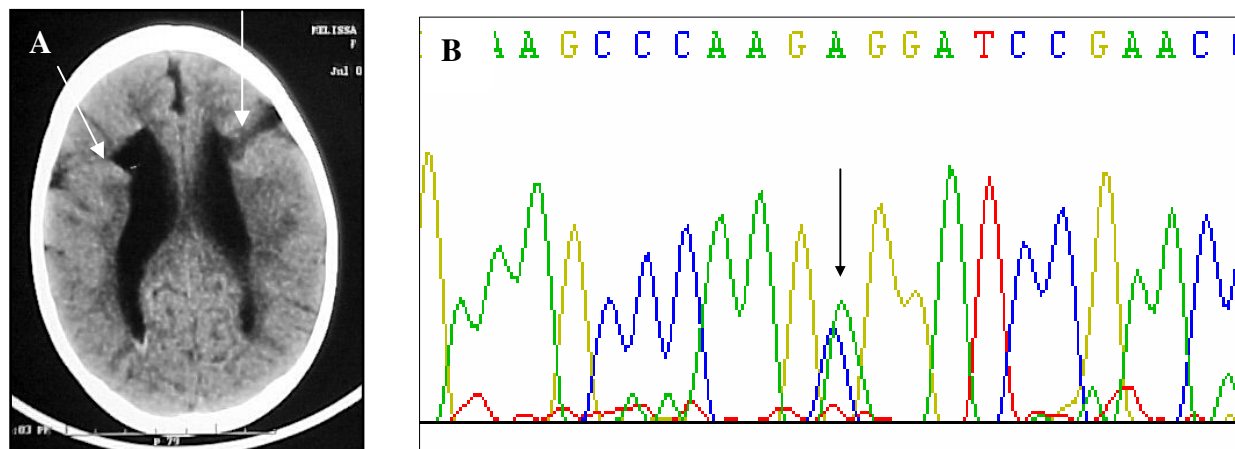
*13/M/20	nd, right closed lips	1.5/P	controlled	left pyramidal discharge	abortion attempt	-	-
14/M/46	unilateral right occipital + arachnoid cyst	15/P	three episodes per week	right hemiparesis	-	-	-
*15/M/17	unilateral left frontal open lips	12/P	daily	normal	-	-	-
*16/M/12	bilateral left fronto-temporo-parietal closed lips and right fronto-temporo-parietal open lips	1/P	na	tetraparesis	abortion attempt, drug addiction	-	-
17/M/44	unilateral right parietal closed lips + right subcortical heterotopia	18/P	five episodes per week	left pyramidal discharge	-	epilepsy (1)	-
18/M/14	unilateral left frontal, open lips + frontal polymicrogyria	-	-	right pyramidal discharge	-	miscarriage (2)	-
19/M/17	unilateral right temporo-parietal + polymicrogyria	5/atypical absence	controlled	left pyramidal discharge	-	epilepsy (1)	C796A, R156R
*20/F/6	unilateral left parieto-temporal open lips + periventricular calcifications, agenesis of septum pellucidum	-	-	right hemiparesis	vaginal bleeding, maternal IgG+ for toxoplasmosis	consanguineous marriage, epilepsy (2)	-
*21/M/7	unilateral right parietal open lips + periventricular calcification	-	-	right hemiparesis, hypotony	maternal IgG+ for toxoplasmosis and rubeola, IgG + for rubeola	-	C796A, R156R
*22/F/6	bilateral left temporo parietal and right parietal open lips + frontal lissencephaly	-	-	tetraparesis	maternal IgG + for toxoplasmosis and rubeola	-	-
*23/F/10	bilateral left fronto-temporo-parietal and right fronto-parietal open lips	2/generalised	not controlled	pyramidal discharge	fever, IgG + for toxoplasmosis and rubeola	-	-
*24/M/9	bilateral left fronto-parietal closed lips and right fronto-parietal open lips	1/na	not controlled	tetraparesis	-	-	-
*25/F/6	bilateral left frontal and right parietal open lips	na/IS (West)	not controlled	tetraparesis	maternal IgG + for toxoplasmosis and rubeola	miscarriage (1)	-

*26/F/12	bilateral fronto parietal open lips + enlargement of lateral and third ventricles, agenesis of septum pellucidum	1/P	not controlled	tetraparesis	vaginal bleeding	neonatal death (1)	-
*27/M/11	bilateral left parietal closed lips and right frontoparietal open lips	2/Lennox-Gastaut	not controlled	tetraparesis	-	miscarriage (1)	-
*28/M/14	inconclusive	1/P	four episodes per day	na	-	-	-
*29/F/7	bilateral left frontoparietal and right parietal open lips	-	-	hypotony	fever and vaginal bleeding	-	-
*30/F/7	bilateral fronto temporo parietal open lips	1/na	not controlled	na	vaginal bleeding	-	-
31/F/7	unilateral left frontal open lips + agenesis of corpus callosum, polymicrogyria, pachygyria	-	-	na	-	miscarriage (1)	C796A, R156R
*32/M/12	unilateral left temporo parietal open lips + agenesis of septum pellucidum	1/na	not controlled	tetraparesis	arterial low blood pressure	miscarriage (1), sister with malformations (amniotic brida)	-
*33/M/12	unilateral left parietal closed lips	3/na	10 episodes per day	normal	vaginal bleeding	deaf and dumb parents	-
*34/M/13	bilateral left parietal open lips and right parietal closed lips	3/na	na	hemiparesis	-	-	-
35/F/37	bilateral left parietal closed lips and right parietal open lips + absence of septum pellucidum	19/P and GTC	controlled with AED	hemiparesis	hemorrhage in the 6 th month of pregnancy	sister with schizencephaly (1)	-
36/F/35	unilateral left frontal closed lips + absence of septum pellucidum	25/P	controlled with AED	tetraparesis	-	sister with schizencephaly (1)	-
37/M/15	unilateral right frontal closed lips	8/P	controlled with AED	left hemiparesis	-	epilepsy (1)	-
38/F/9	unilateral right frontal closed lips	4/P	four episodes per month	left hemiparesis	na	na	-
39/F/8	unilateral right parietal closed lips + absence of septum pellucidum	na/P	controlled with AED	left hemiparesis	abortion attempt	epilepsy (2)	-

40/F/2	unilateral right fronto parietal open lips + absence of septum pellucidum	na/na	controlled with AED	tetraparesis	anoxia	-	-
41/M/12	unilateral right fronto parietal open lips + agenesis of corpus callosum	4/myoclonic, P and GTC	more than four episodes per month	tetraparesis	na	na	-
42/F/4	unilateral right fronto parietal closed lips	-	-	left hemiparesis	-	-	-
43/F/5	unilateral right occipital closed lips + septum optical dysplasia	1/P and GTC	one episode per month	left hemiparesis	-	-	-
44/F/6	bilateral parietal closed lips	1/na	only one afebrile episode during a meningitis	tetraparesis	-	-	-
45/F/4	bilateral left frontal closed lips and right frontal open lips + incomplete septum pellucidum and malformation of corpus callosum	-	-	tetraparesis	-	-	-
46/M/4	bilateral left fronto-temporo-parietal closed lips and right fronto-temporo-parietal open lips	1/P, GTC and typical absence	daily episodes	tetraparesis	na	na	-

* CT scans, SCZ = schizencephaly, IS = infantile spasms; P = partial; GTC = generalized tonic-clonic; nd = not determined; na = not available; AED = antiepileptic drug; MR = mental retardation, R = arginine, A = adenine, C = cytosine.

Figure 1



Legends for Figures

Figure 1. (A) CT of a patient with left open lips and right closed lips schizencephaly (white arrows) and (B) the C796A substitution in the *EMX2* sequence. This substitution doesn't change the identity of the wild-type arginine and was also identified in the control group.

CAPÍTULO 4

ARTIGO 4

MAGNETIC RESONANCE IMAGING ABNORMALITIES IN FAMILIAL TEMPORAL LOBE EPILEPSY WITH AUDITORY AURAS

Eliane Kobayashi¹, Neide F. Santos², Fábio Rossi Torres², Rodrigo Secolin², Luis A.C. Sardinha¹, Iscia Lopes-Cendes², Fernando Cendes¹

Magnetic Resonance Imaging Abnormalities in Familial Temporal Lobe Epilepsy With Auditory Auras

Eliane Kobayashi, MD, PhD; Neide F. Santos, PhD; Fábio R. Torres, BSc; Rodrigo Secolin, BSc; Luiz A. C. Sardinha, MD; Iscia Lopez-Cendes, MD, PhD; Fernando Cendes, MD, PhD

Background: Two forms of familial temporal lobe epilepsy (FTLE) have been described: mesial FTLE and FTLE with auditory auras. The gene responsible for mesial FTLE has not been mapped yet, whereas mutations in the *LGII* (leucine-rich, glioma-inactivated 1) gene, localized on chromosome 10q, have been found in FTLE with auditory auras.

Objective: To describe magnetic resonance imaging (MRI) findings in patients with FTLE with auditory auras.

Design and Methods: We performed detailed clinical and molecular studies as well as MRI evaluation (including volumetry) in all available individuals from one family, segregating FTLE from auditory auras.

Results: We evaluated 18 of 23 possibly affected individuals, and 13 patients reported auditory auras. In one patient, auditory auras were associated with déjà vu; in one patient, with ictal aphasia; and in 2 patients, with visual misperception. Most patients were not taking medication at the time, although all of them reported sporadic auras.

Two-point lod scores were positive for 7 genotyped markers on chromosome 10q, and a Zmax of 6.35 was achieved with marker D10S185 at a recombination fraction of 0.0. Nucleotide sequence analysis of the *LGII* gene showed a point mutation, IVS7-2A>G, in all affected individuals. Magnetic resonance imaging was performed in 22 individuals (7 asymptomatic, 4 of them carriers of the affected haplotype on chromosome 10q and the IVS7-2A>G mutation). Lateral temporal lobe malformations were identified by visual analysis in 10 individuals, 2 of them with global enlargement demonstrated by volumetry. Mildly reduced hippocampi were observed in 4 individuals.

Conclusions: In this family with FTLE with auditory auras, we found developmental abnormalities in the lateral cortex of the temporal lobes in 53% of the affected individuals. In contrast with mesial FTLE, none of the affected individuals had MRI evidence of hippocampal sclerosis.

Arch Neurol. 2003;60:1546-1551

THE FAMILIAL occurrence of temporal lobe epilepsy (FTLE) was first described as a benign clinical form of TLE.¹ Magnetic resonance imaging (MRI) studies in mesial FTLE demonstrated signs of hippocampal sclerosis, not only in patients with refractory seizures, but in patients with good seizure control and seizure remission. These findings indicate a strong genetic factor for the development of hippocampal sclerosis in some families.^{2,3}

CME course available online at www.archneurol.com

Another form of familial TLE was first reported by Ottman et al⁴ and later by other authors.⁵⁻⁷ Seizure semiology pointed to an extrahippocampal epileptogenic area, and

characteristically, most patients reported auditory auras. Patients had good seizure control, and epileptiform discharges were observed in the posterior temporal regions. Molecular studies identified linkage to chromosome 10q,^{4,7} and the gene has recently been cloned (leucine-rich, glioma-inactivated 1 gene [*LGII*]).⁸ No MRI abnormalities have been described in these patients so far.^{4,7} The objective of this study was to investigate MRI abnormalities in a large kindred with familial TLE with auditory auras, linked to chromosome 10q.

METHODS

We studied one large family, segregating TLE from auditory auras by detailed clinical and MRI evaluation. Molecular studies were performed in all available family members after informed consent was obtained. A family pedi-

From the Departments of Neurology (Drs Kobayashi, Sardinha, and Cendes) and Medical Genetics (Drs Santos and Lopez-Cendes and Messrs Torres and Secolin), Campinas State University, Campinas, Brazil.

ARCH NEUROL/VOL 60, NOV 2003 WWW.ARCHNEUROL.COM
1546

Downloaded from www.archneurol.com at Cape Canaveral, Fla on January 7, 2008
(REPRINTED WITH CORRECTIONS)

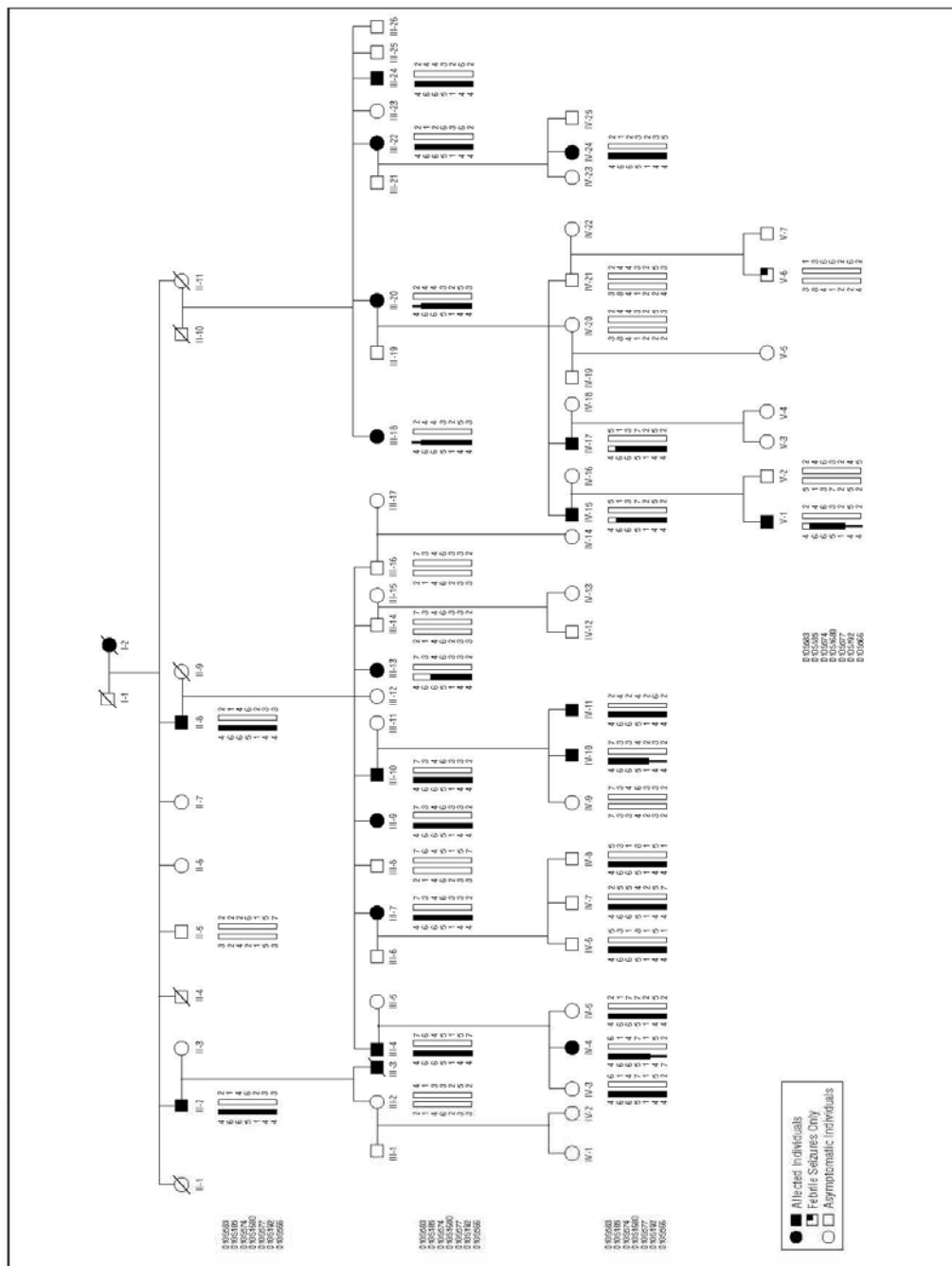


Figure 1. Summarized pedigree of the family with temporal lobe epilepsy and auditory auras, with haplotypes for markers on chromosome 10q.

gree was obtained, and all possibly affected individuals were clinically assessed by at least one of us. Seizures and epilepsy

syndromes were determined according to the recommendations of the International League Against Epilepsy,^{9,10} and all

affected individuals were also classified by the clinical outcome.

Genomic DNA was extracted from blood samples and genotyped for 7 dinucleotide repeat markers (D10S583, D10S185, D10S574, D10S1680, D10S577, D10S192, and D10S566),¹¹ which flank the 15-centimorgan (cM) candidate interval on ch10q. We calculated 2-point lod scores using the MLINK program of the Linkage package (Centre d'Etude des Polymorphismes Humains, Paris, France; University of Utah, Salt Lake City¹² and Columbia University, New York, NY, assuming an autosomal dominant inheritance with 80% penetrance. For mutation analyses, we screened the entire coding region of the *LGII* (leucine-rich, glioma-inactivated 1) gene by polymerase chain reaction, using primers that flanked all intron-exon junctions. Nucleotide sequences were analyzed using dye-terminator chemistry for megaBACE 1000 (Amersham Pharmacia Biosciences UK Ltd, Buckinghamshire, England).

Magnetic resonance imaging was performed by a 2-T scanner, with T1- and T2-weighted images in 3 orthogonal planes, including thin coronal (3 mm) T1 inversion recovery images perpendicular to the long axis of the hippocampus. In addition, a 3-dimensional T1 acquisition was obtained for multiplanar reconstruction.

Magnetic resonance imaging acquisition parameters were: (1) sagittal T1 spin-echo (6-mm thick; flip angle, 180°; repetition time [TR], 430 milliseconds; echo time [TE], 12 milliseconds; matrix, 200 × 350; field of view [FOV], 25 × 25 cm); (2) coronal, perpendicular to the long axis of the hippocampus, defined by the sagittal images: [a] T2-weighted fast spin-echo (4-mm thick; flip angle, 120°; TR, 4800 milliseconds; TE, 129 milliseconds;

matrix, 252 × 320; FOV, 18 × 18 cm); [b] T1-weighted inversion recovery (3-mm thick; flip angle, 200°; TR, 2800 milliseconds; TE, 14 milliseconds; inversion time, 840 ms; matrix, 130 × 256; FOV, 16 × 18 cm); (3) axial images parallel to the long axis of the hippocampi: [a] T1-weighted gradient echo (3-mm thick; flip angle, 70°; TR, 200 milliseconds; TE, 5 milliseconds; matrix, 180 × 232; FOV, 22 × 22 cm); [b] T2-weighted fast spin-echo (4-mm thick; flip angle, 120°; TR, 6800 milliseconds; TE, 129 milliseconds; matrix, 252 × 328; FOV, 21 × 23 cm); (4) T1-weighted 3-dimensional gradient echo, acquired in the sagittal plane (1-mm thick; flip angle, 35°; TR, 22 milliseconds; TE milliseconds, 9; matrix, 256 × 220; FOV, 23 × 25 cm).

Visual analyses were performed using a workstation (OMNIPRO; Elscint, Haifa, Israel) for multiplanar reconstruction. Independent analyses were performed by 2 investigators (E.K. and F.C.) who were blinded to clinical status, and both agreed with the conclusion. Quantitative analyses of hippocampal formation and the anterior aspect of the temporal lobes (volumetry) were done according to a standardized protocol,¹³ using thin coronal T1 inversion recovery images and the National Institutes of Health Image program (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). Volumes were compared with those in a control group of 20 healthy adult volunteers, and data were transformed into z scores (number of SDs from the mean of control group).

RESULTS

We identified 23 possibly affected subjects (5 were deceased) in the pedigree (**Figure 1**). We evaluated 18 of them: 11 men and 7 women. The mean age at seizure onset was 19 years (range, 10-35 years). None of the evaluated individuals who met the clinical criteria for TLE with auditory auras had a history of risk factors (febrile convulsions, head trauma, or meningitis). All patients had a benign clinical course.

Auditory auras were reported by 12 (66%) of 18 patients, and were described as a radio sound or a motorcycle running by most of them (**Table 1**). Other reported symptoms are presented in Table 1, and included déjà vu, visual misperception, with distortion of faces or objects, and episodes in which they suddenly were unable to hear or understand what people said (aphasic aura). There was only 1 patient (III-22) who did not report auras, but she had only a few generalized tonic-clonic seizures during sleep. Secondarily generalized tonic-clonic seizures were reported as a rare manifestation by 12 patients. One individual (V-6) had only recurrent febrile seizures during childhood but no clinical findings of TLE with auditory auras.

Two-point lod scores were greater than Zmax = 3.0 for all 7 markers genotyped on chromosome 10q (**Table 2**):

Table 1. Different Types of Aura in Affected Family Members

Individual No.	Auditory Aura	Visual Misperception Aura	Aphasic Aura	Déjà vu
II-2	+	-	-	-
II-8	+	-	-	-
III-4	+	-	-	-
III-7	+	+	+	-
III-9	-	+	-	-
III-10	+	-	+	-
III-13	+	+	-	-
III-20	+	-	-	-
III-18	-	-	-	+
III-24	+	-	+	-
IV-10	-	-	+	-
IV-11	-	-	+	-
IV-15	+	-	-	-
IV-17	+	-	-	-
IV-24	+	-	-	+
V-1	+	-	+	-

Abbreviations: Minus sign, absent; plus sign, present.

Table 2. Two-Point Lod Score Obtained for 7 Markers on Chromosome 10q Within the Candidate Region for TLE With Auditory Auras

Marker	0	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4
D10S583	5.61	5.17	4.69	4.18	3.63	3.04	2.41	1.75	1.06
D10S185	6.35	5.83	5.28	4.70	4.08	3.43	2.75	2.02	1.27
D10S574	4.79	4.33	3.83	3.31	2.76	2.19	1.59	1.00	0.49
D10S1680	4.77	4.37	3.94	3.47	2.97	2.44	1.89	1.33	0.77
D10S577	4.26	3.92	3.54	3.15	2.73	2.28	1.82	1.33	0.88
D10S192	5.55	5.08	4.58	4.06	3.50	2.91	2.29	1.65	0.99
D10S566	3.08	4.26	4.05	3.69	3.24	2.74	2.19	1.59	0.96

Abbreviation: TLE, temporal lobe epilepsy.

Table 3. Visual and Volumetric Data on the 22 Individuals Who Underwent Magnetic Resonance Imaging

Individual Number	Chromosome 10q Haplotype	Status	Hippocampal Volumetry	Temporal Lobe Abnormalities
III-4	+	Affected	Normal	LTLM, with LTL enlargement* and fusiform gyrus malformation
IV-8	+	Nonaffected	Normal	...
III-7	+	Affected	Normal	...
IV-9	-	Nonaffected	Normal	LTLM, with LTL enlargement*
IV-24	+	Affected	Normal	...
IV-17	+	Affected	Reduced at left	LTLM, with LTL encephalocele
IV-11	+	Affected	Normal	...
IV-7	+	Nonaffected	Normal	...
IV-15	+	Affected	Normal	LTLM, with LTL enlargement and absence of 1st and 2nd temporal sulcus. Abnormal shape of left fusiform gyrus
IV-5	+	Nonaffected	Reduced at right	...
III-13	+	Affected	Reduced at left/mild increased T2 signal	LTLM, with LTL enlargement and absence of 1st and 2nd temporal sulcus, abnormal shape and axis of hippocampus, and mild hemispheric asymmetry (left>right) (Figure 2)
IV-10	+	Affected	Normal	LTLM, with hippocampus showing abnormal shape and axis, and widened fusiform gyrus
III-24	+	Affected	Normal	LTLM, with LTL enlargement
III-10	+	Affected	Normal	LTLM, with LTL enlargement and hippocampus showing abnormal shape and axis
V-6	-	Febrile seizures	Reduced at left/mild increased T2 signal	LTLM, with abnormally rounded hippocampus, fusiform and parahippocampal gyri malformation
III-20	+	Affected	Normal	...
III-9	+	Affected	Normal	LTLM, with LTL enlargement
IV-4	+	Affected	Normal	...
III-16	-	Nonaffected	Normal	...
V-1	+	Affected	Normal	...
III-22	+	Affected	Normal	...
IV-3	+	Nonaffected	Normal	...

Abbreviations: LTL, left temporal lobe; LTLM, left temporal lobe malformation; ellipses, not applicable; minus sign, absent; plus sign, present.
*Confirmed by volumetry.

Zmax=5.61 at $\theta=0$ for D10S583; Zmax=6.35 at $\theta=0$ for D10S185; Zmax=4.79 at $\theta=0$ for D10S574; Zmax=4.77 at $\theta=0$ for D10S1680; Zmax=4.26 at $\theta=0$ for D10S577; Zmax=5.55 at $\theta=0$ for D10S192; and Zmax=4.26 at $\theta=0.05$ for D10S566. Nucleotide sequence analysis of the *LGII* gene showed a point mutation, IVS7-2A>G, that was likely to abolish the splicing site. We predict that this mutation results in exon 8 skipping, thus producing a truncated protein. The point mutation was present in all affected individuals. An interictal electroencephalogram performed in 6 patients detected no abnormalities.

Twenty-two family members underwent MRI (7 asymptomatic, 4 of them haplotype carriers). In **Table 3**, we present the affected status, the presence of the chromosome 10q haplotype, and the visual and quantitative MRI studies for each subject. Visual analysis showed lateral temporal lobe dysgenetic features (**Figure 2** and **Figure 3**) in 10 (45%) of 22 patients. Their left temporal lobes seemed enlarged, sometimes with protrusion of brain parenchyma with an encephalocelelike appearance (**Figure 2**). However, anterior temporal lobe volumetry showed a significant global increase in volumes in only 2 individuals.

Volumetric studies revealed mildly reduced hippocampi in 4 individuals, with z scores ranging from -2.0 to -2.5. In 2 of them, a mildly increased hippocampal T2 signal was also observed on visual analysis. However, none of these 4 patients fulfilled the criteria for de-

termining MRI evidence of mesial temporal sclerosis on visual analysis, as commonly encountered in mesial FTLE.²

COMMENT

Although the description of auditory auras in FTLE is remarkable, some patients also report other sensory and psychic symptoms, in isolation or accompanying the auditory symptoms.¹⁴ Auditory features may vary among affected family members, from undefined sounds to auditory illusions, such as distortions and volume changes. In addition, some patients had an ictal aphasia. All of these positive and negative manifestations suggest a lateral temporal lobe seizure focus involving the cortex of posterior temporal regions.

The identification of temporal lobe abnormalities on MRI in patients with this specific form of TLE, linked to chromosome 10q, has not been reported so far. We found clear-cut signs of lateral temporal malformations in 53% of affected individuals and in 1 asymptomatic carrier of the haplotype. Although 4 individuals had mildly reduced hippocampal volumes on volumetry, this was not sufficient to define MRI evidence of mesial temporal sclerosis. However, this mild volume loss and altered shape of the hippocampus and parahippocampal gyrus may influence the pattern of propagation of ictal discharges and seizure semiology.

The relationship of the mesial and lateral aspects of the temporal lobe has been extensively studied.¹⁵ Although it is well recognized that in mesial TLE, the main structures implied in the pathogenesis of epilepsy are the hippocampus, amygdala, and other mesial temporal lobe structures, the lateral temporal cortex may also play an important role in this scenario. The subcortical connections of mesial temporal structures are bidirectional, and include afferents from the hypothalamus, the auditory system, and the lower brainstem nuclei involved in viscerosensory and gustatory functions.¹⁵

Several types of perceptual phenomena can occur in temporal lobe seizures. Visual and auditory hallucinations and illusions are commonly elicited by temporal lobe seizure discharge. Auditory illusions are usually changes in the loudness of perceived sounds. Most of these

changes are attributable to discharge in the auditory association cortex, but occasionally they can be reproduced by amygdaloid stimulation.¹⁶ These illusions frequently have experiential qualities. Elementary auditory and visual hallucinations indicate discharge in the primary auditory and visual cortices. The stimulation response map of Penfield and Perot shows that the points in the temporal isocortex from which auditory experiential phenomena could be elicited occupy the first temporal convolution. Experiential phenomena with auditory features may be elicited by stimulation with intracranial electrodes of several temporal lobe structures.¹⁶ These have been observed with an after-discharge beyond the stimulated site in 22 (29%) of 75 individuals.¹⁶ In addition, there were reports of auditory hallucinations/illusions (one with associated visual

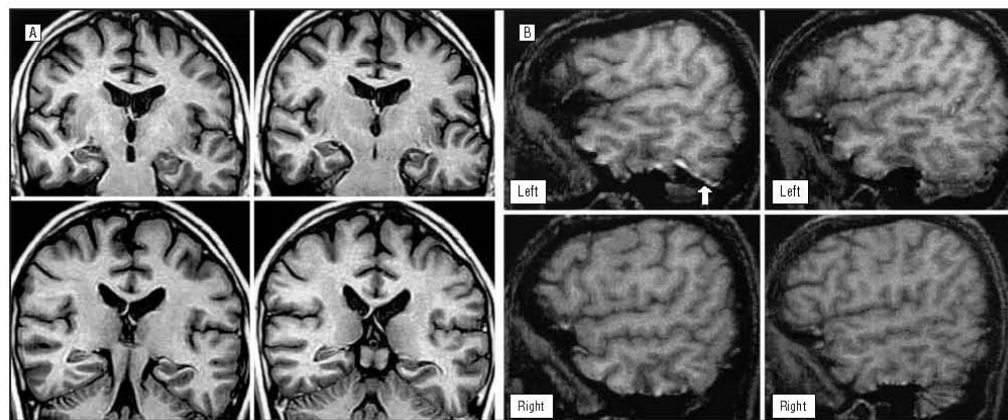


Figure 2. A, T1-weighted inversion recovery coronal magnetic resonance images from patient III-13 show left temporal lobe dysgenesis, characterized by enlargement of the lateral temporal lobe, with small gyri (although not characterizing polymicrogyria). B, T1 sagittal images from the same patient show the absence of the first and second temporal sulci on the anterior and middle portions of the left temporal lobe. The posterior basolateral aspect of the left temporal lobe is also abnormal, with a downward protrusion of parenchyma, exhibiting an encephaloclelike appearance (arrow).

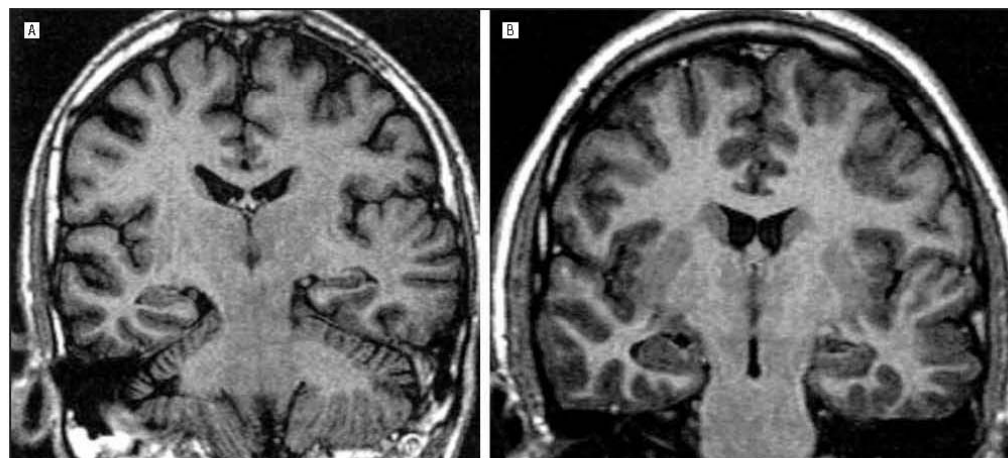


Figure 3. T1-weighted inversion recovery coronal magnetic resonance images from patients III-4 (A) and IV-11 (B) show left temporal lobe malformation, with a dysgenetic aspect of temporal gyri and enlargement of the lateral aspect of the temporal lobe.

hallucination) in 3 patients after hippocampus stimulation. Experiential phenomena without an after-discharge or with discharges limited to the stimulated site were elicited in 20 (27%) of 75 patients, and 3 of them had auditory hallucinations/illusions combined with visual features (one from temporal isocortex stimulation and 2 from amygdala stimulation).¹⁶

At this point, we cannot be sure that the developmental structural abnormalities in the temporal lobes found in our patients are directly implicated in seizure origin. However, the MRI findings in this family with TLE with auditory auras are clearly distinct from the MRI findings in mesial FTLE, and these different abnormalities are consistent with the distinct seizure semiology in these 2 forms of familial TLE.

Accepted for publication April 1, 2003.

Author contributions: *Study concept and design* (Drs Kobayashi, Sardinha, Lopes-Cendes, and Cendes); *acquisition of data* (Drs Kobayashi, Santos, Sardinha, Lopes-Cendes, and Cendes and Messrs Torres and Secolin); *analysis and interpretation of data* (Drs Kobayashi, Sardinha, Lopes-Cendes, and Cendes); *drafting of the manuscript* (Drs Kobayashi, Sardinha, Lopes-Cendes, and Cendes); *critical revision of the manuscript for important intellectual content* (Drs Kobayashi, Santos, Sardinha, Lopes-Cendes, and Cendes and Messrs Torres and Secolin); *obtained funding* (Drs Kobayashi, Sardinha, Lopes-Cendes, and Cendes); *administrative, technical, and material support* (Dr Santos and Messrs Torres and Secolin); *study supervision* (Drs Kobayashi, Sardinha, Lopes-Cendes, and Cendes).

This study was supported by grants 97/07584-3 and 99/10702-3 from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Corresponding author and reprints: Fernando Cendes, MD, PhD, Departamento de Neurologia, FCM-UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas SP, Brazil, CEP 13083-970 (e-mail: fcendes@unicamp.br).

REFERENCES

1. Berkovic SF, McIntosh A, Howell RA, et al. Familial temporal lobe epilepsy: a common disorder identified in twins. *Ann Neurol*. 1996;40:227-235.
2. Kobayashi E, Sousa SC, Lopes-Cendes I, et al. Seizure outcome and hippocampal atrophy in familial mesial temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 2001;56:166-172.
3. Cendes F, Lopes-Cendes I, Andermann F, Andermann F. Familial temporal lobe epilepsy: a clinically heterogeneous syndrome. *Neurology*. 1998;50:554-557.
4. Otman R, Risch N, Hauser WA, et al. Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q. *Nat Genet*. 1995;10:56-60.
5. Poza JJ, Sáenz A, Martínez-Gil A, et al. Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: clinical and genetic study of a large Basque pedigree linked to chromosome 10q. *Ann Neurol*. 1999;45:182-188.
6. Winawer MR, Boneschi FM, Barker-Cummings C, et al. Four new families with autosomal dominant partial epilepsy with auditory features: clinical description and linkage to chromosome 10q24. *Epilepsia*. 2002;43:60-67.
7. Brodtkorb E, Gu W, Nakken KO, et al. Familial temporal lobe epilepsy with aphasic seizures and linkage to chromosome 10q22-q24. *Epilepsia*. 2002;43:228-235.
8. Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B, et al. Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet*. 2002;30:335-341.
9. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia*. 1981;22:489-501.
10. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*. 1989;30:389-399.
11. Gyapay G, Morissette J, Vignal A, et al. The 1993-1994 Gênéthon human genetic linkage map. *Nat Genet*. 1994;7:246-339.
12. Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J. Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81:3443-3445.
13. Watson C, Andermann F, Gloor P, et al. Anatomic basis of amygdaloid and hippocampal volume measurement by magnetic resonance imaging. *Neurology*. 1992;42:1743-1750.
14. Winawer MR, Otman R, Hauser WA, Padley TA. Autosomal dominant partial epilepsy with auditory features: defining the phenotype. *Neurology*. 2000;54:2173-2176.
15. Gloor P. *The Temporal Lobe and Limbic System*. New York, NY: Oxford University Press; 1997.
16. Fish DR, Gloor P, Quesney FL, Olivier A. Clinical responses to electrical brain stimulation of the temporal and frontal lobes in patients with epilepsy. *Brain*. 1993;116:397-414.

- limb-girdle muscular dystrophies in the Brazilian population: from LGMD2A to LGMD2G. *Am J Med Genet*. 1999;82:392-398.
96. Girjaar HB, van der Kooi AJ, Ceelie H, et al. Sarcoglycanopathies in Dutch patients with autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy. *J Neurol*. 2000; 247:524-529.
 97. Farin M, Duggan DJ, Mostacciuolo ML, et al. Genetic epidemiology of muscular dystrophies resulting from sarcoglycan gene mutations. *J Med Genet*. 1997; 34:973-977.
 98. Melacini P, Farin M, Duggan DJ, et al. Heart involvement in muscular dystrophies due to sarcoglycan gene mutations. *Muscle Nerve*. 1999;22:473-479.
 99. Fardeau M, Hillaire D, Mignard C, et al. Juvenile limb-girdle muscular dystrophy: clinical, histopathological and genetic data from a small community living in the Reunion Islands. *Brain*. 1996;119:295-308.
 100. Linssen WH, Notermans NC, Van der Graaf Y, et al. Miyoshi-type distal muscular dystrophy: clinical spectrum in 24 Dutch patients. *Brain*. 1997;120:1989-1996.
 101. Argov Z, Sadeh M, Mazor K, et al. Muscular dystrophy due to dysferlin deficiency in Libyan Jews: clinical and genetic features. *Brain*. 2000;123:1229-1237.
 102. Weiler T, Bashir R, Anderson LV, et al. Identical mutation in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s). *Hum Mol Genet*. 1999;8:871-877.
 103. Moreira ES, Vainzof M, Marie SK, Sertie AL, Zatz M, Passos-Bueno MR. The seventh form of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy is mapped to 17q11-12. *Am J Hum Genet*. 1997;61:151-159.
 104. Weiler T, Greenberg CR, Zelinski T, et al. A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in Manitoba Hutterites maps to chromosome region 9q31-q33: evidence for another limb-girdle muscular dystrophy locus. *Am J Hum Genet*. 1998;63:140-147.
 105. Udd B. Limb-girdle type muscular dystrophy in a large family with distal myopathy: homozygous manifestation of a dominant gene? *J Med Genet*. 1992; 29:383-389.
 106. Messina DN, Speer MC, Pericak-Vance MA, McNally EM. Linkage of familial dilated cardiomyopathy with conduction defect and muscular dystrophy to chromosome 6q23. *Am J Hum Genet*. 1997;61:909-917.
 107. Speer MC, Vance JM, Grubbs JM, et al. Identification of a new autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy locus on chromosome 7. *Am J Hum Genet*. 1999;64:556-562.
 108. Palenzuela L, Andreu AL, Gamez J, et al. A novel autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy (LGMD 1F) maps to 7q32.1-32.2. *Neurology*. 2003; 61:404-406.
 109. van der Kooi AJ, Ledderhof TM, de Voogt WG, et al. A newly recognized autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with cardiac involvement. *Ann Neurol*. 1996;39:636-642.
 110. Carbone I, Bruno C, Sotgia F, et al. Mutation in the CAV3 gene causes partial caveolin-3 deficiency and hyperCKemia. *Neurology*. 2000;54:1373-1376.
 111. Hermann R, Straub V, Blank M, et al. Dissociation of the dystroglycan complex in caveolin-3 deficient limb girdle muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2000;9:2335-2340.
 112. Tateyama M, Aoki M, Nishino I, et al. Mutation in the caveolin-3 gene causes a peculiar form of distal myopathy. *Neurology*. 2002;58:323-325.
 113. Bönnemann CG, Darras BT, Lidov HGW, Feener CA, Shapiro FD, Kunkel LM. Strength improvement on prednisone in a patient with limb-girdle muscular dystrophy 2C (primary γ -sarcoglycanopathy) [abstract]. *Ann Neurol*. 1997;42:531-532.
 114. Walter MC, Lochmüller H, Reilich P, et al. Creatine monohydrate in muscular dystrophies: a double-blind, placebo-controlled clinical study. *Neurology*. 2000; 54:1848-1850.

Correction

Error in Wording and Terminology. In the article titled "Magnetic Resonance Imaging Abnormalities in Familial Temporal Lobe Epilepsy With Auditory Auras" in the November issue of the ARCHIVES (2003;60:1546-1551), the last sentence of paragraph 3 in the "Results" section should have read, "An interictal electroencephalogram performed in 6 patients detected no abnormalities," and "VIIIIS7(-2)A-G" in the "Results" section of the Abstract and article should have been "IVS7-2A>G." This correction was made previously to online versions of this article.

CAPÍTULO 5

ARTIGO 5

CLINICAL, NEUROIMAGING AND GENETIC HETEROGENEITY IN AUTOSOMAL DOMINANT PARTIAL EPILEPSY WITH AUDITORY FEATURES

Fábio R. Torres¹, Elisabeth Bilevicius², Rodrigo Secolin¹, Simone S. Tsuneda¹, Neide F. Santos¹, Daniela A. Souza-Kols¹, Eliane Kobayashi², Luiz A. C. Sardinha², Fernando Cendes², Iscia Lopes-Cendes¹

Clinical, neuroimaging and genetic heterogeneity in autosomal dominant partial epilepsy with auditory features

Fábio R. Torres MSc¹, Elisabeth Bilevicius MD,² Rodrigo Secolin BSc¹, Simone S. Tsuneda MSc¹, Neide F. Santos PhD¹, Daniela A. Souza-Kols, BSc¹, Eliane Kobayashi, MD, PhD², Luiz A. C. Sardinha, MD², Fernando Cendes MD, PhD², Iscia Lopes-Cendes, MD, PhD¹

Departments of Medical Genetics¹ and Neurology²

University of Campinas–UNICAMP

Campinas, SP, Brazil

Running titles: Heterogeneity in ADPEAF

Key words: Linkage studies, *LGII*, *LGI2*, *LGI3*, *LGI4*, *MASS1*

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

Departamento de Genética Médica

Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP

Tessália Vieira de Camargo, 126

Cidade Universitária “Zeferino Vaz”

Campinas SP, Brazil, CEP 13084-971

Tel: +55 19 3521 8907

FAX: +55 19 3289 1818

E-mail: icendes@unicamp.br

ABSTRACT

Purpose: To describe clinical, neuroimaging and genetics finding of families with autosomal dominant partial epilepsy with auditory features (ADPEAF) and whether clinical differences are able to predict the presence of *LGII* mutations in ADPEAF families.

Methods: Four families with ADPEAF were studied (S, MG, N and B). Clinical evaluation including neurological exam, EEG and MRI were performed. Families S and MG were genotyped for ch10q *locus*. MG kindred were genotyped for *LGI* gene family and *MASS1*. Linkage analysis was not performed in N and B kindred. Mutation screening was performed by DHPLC, sequencing and RFLP analysis. Mutation repercussion was studied by RT-PCR and Real Time PCR.

Results: Auditory auras were identified in all families studied and an overrepresentation of “déjà-vu” phenomena was detected only in MG family. Lateral temporal lobe malformation was observed in S kindred. Lod-scores were above 3.00 for ch10q *locus* in S kindred and negative (≥ -2.00) for *LGI* gene family and *MASS1* in MG kindred. A point mutation (IVS7-2A>G) in *LGII* was detected in S pedigree. No pathogenic variant was identified in other *LGI* genes and *MASS1*-EPTP domain. Molecular studies in mRNA of patients with *LGII* mutation were not conclusive.

Discussion: Clinical and genetic heterogeneity in ADPEAF have been identified and *LGI2*, 3, 4 and *MASS1* gene were excluded from ADPEAF etiology. This study does not permit to establish if distinct clinical signs are a predictive factor for *LGII* mutations. A wide genome search in MG family should be performed to identify the alternative *locus* for ADPEAF.

Key Words: Epilepsy, Genetics, Genetics Heterogeneity, Linkage, Mutation Screening,

INTRODUCTION

Autonomic dominant partial epilepsy with auditory features (ADPEAF) is a benign epilepsy syndrome characterized by seizure onset in late adolescence, typical auditory auras and/or symptoms suggesting a lateral temporal onset and absence of any brain structural abnormality (Ottman et al., 1995; Michelucci et al., 2003). Ottman et al. (1995) reported the first family segregating the disease and mapped a candidate *locus* on chromosome 10q. Additional families were soon reported, improving the phenotype characterization and the refinement of the candidate region (Poza et al., 1999, Winawer et al., 2002). These efforts resulted in the identification of mutations in a gene originally related to high-grade gliomas (Chernova et al., 1998): the leucine-rich glioma inactivated 1 gene (*LGII*) (Kalachikov et al., 2002; Morante-Redolat et al., 2002; Gu et al., 2002a; Fertig et al., 2003; Pizzuti et al., 2003, Berkovic et al., 2004; Ottman et al. 2004 e Hedera et al., 2004; Pisano et al., 2005).

Although mutations in *LGII* have been reported in several kindreds, identification of families that do not have mutations in *LGII* suggested genetic heterogeneity in ADPEAF (Bisulli et al., 2002; Michelucci et al., 2003; Ottman et al., 2004). Families with and without mutations in the *LGII* gene had similar clinical features, but those with mutations contained significantly more subjects with auditory symptoms and significantly fewer with autonomic symptoms (Ottman et al., 2004). We have previously reported a large family with ADPEAF and mutations in *LGII* (Kobayashi et al., 2003). In the present work we present information on additional family members of this family as well describe three other families and report their clinical features comparing with the genetic findings from linkage analysis and mutation screening in candidate genes.

PATIENTS AND METHODS

Ascertainment of families

We studied four unrelated families segregating ADPEAF: S (previously reported, Kobayashi et al., 2003), MG, N and B kindred (**figure 1**). All participating individuals gave informed consent before undergoing MRI scanning and blood sample

collection for molecular studies; both studies were approved by our Institution Research Ethics Committee.

Detailed clinical histories and pedigrees were obtained during field trips, in which we had the opportunity to evaluate a large number of affected and unaffected individuals. Seizures and epilepsy syndromes were determined according to the ILAE recommendations (Commission, 1981; 1989). Affected status for the diagnosis of ADPEAF was considered when we had clear identification of auditory auras, ictal aphasia or visual/auditory complex hallucinations that were compatible with a neocortical temporal origin.

EEG and MRI studies

Patients were subsequently invited for electroencephalogram (EEG) and MRI investigation. EEGs were performed in a 32 channels recorder, using the 10-20 international electrode placement system.

MRI scans were performed in a 2T scanner (Elscent Prestige®), and included T1- and T2- weighted images in three orthogonal planes, as well as thin coronal T1 inversion recovery (IR) images, perpendicular to the long axis of hippocampus to optimize the evaluation of mesial temporal structures.

MRI acquisition parameters were: (1) Sagittal T1 spin echo, 6mm thick, flip angle= 180°; repetition time (TR)=430, echo time (TE)=12, matrix 200X350, field of view (FOV)=25X25cm; (2) Coronal images, perpendicular to long axis of hippocampus, defined by the sagittal images; (2.a) T2-weighted “fast spin echo” (FSE), 4mm thick, flip angle= 120°; TR=4800, TE=129, matrix 252X320, FOV=18X18cm; (2.b) T1-weighted IR, 3mm thick, flip angle=200°; TR=2800, TE=14, inversion time (TI)=840, matrix 130X256, FOV=16X18cm; (3) Axial images parallel to the long axis of the hippocampi; (3.a) T1-weighted gradient echo, 3mm thick, flip angle=70°, TR=200, TE=5, matrix 180X232, FOV=22X22 cm; (3.b) T2-weighted FSE, 4mm thick, flip angle=120°, TR=6800, TE=129, matrix 252X328, FOV=21X23cm; (4) T1-weighted 3D gradient echo, acquired in the

sagittal plane (1mm thick, flip angle=35°, TR=22, TE=9, matrix 256X220, FOV=23X25cm). MRI visual analyses were performed using multiplanar reconstruction on an OMNIPRO® workstation.

Molecular studies

Genotyping

Genomic DNA was obtained by phenol-chloroform extraction from lymphocytes of fresh blood. For the two large families (S and MG), family members were genotyped by Polymerase Chain Reaction (PCR) for 12 polymorphic dinucleotide repeats sequences (D10S1644, D10S1687, D10S1765, D10S1753, D10S583, D10S185, D10S574, D10S1680, D10S577, D10S192, D10S566 and D10S187), which flank the *LGII locus* on ch10q. For family MG we genotyped additional 9 microsatellites (D4S3013, D4S2498, D4S391, D8S261, D8S560, D8S1786, D19S868, D19S425 and D19S224) that flank *LGI2*, *LGI3* and *LGI4 loci* respectively and six polymorphic dinucleotide repeats sequences (D5S1725, D5S815, D5S618, D5S644, D5S652 and D5S2498) which flank the *MASS1 locus*. Genotyping was carried out using capillary electrophoresis on MegaBACE™ 1000 96-capillary sequencers (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). The fluorescent dye-labeled primers (FAM™, VIC™, NED™) were customized or choose from the MD10 panel set (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Samples amplified by PCR and labeled with different dyes were pooled in a final volume of 40µl H₂O (1:20 for FAM™, 1:20 for VIC™ and 1:10 for NED™) in a 96-wells plate. Of this mix, 2µl were transferred to a MegaBACE 96-wells plate and mixed with 8 µl of a loading solution (for each reaction: 7.75µl of 0,1% Tween 20 in H₂O + 0.25 µl of internal size standard labeled with ROX™ dye, ET-550R (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Before loading, samples were denatured at 95°C for 3 min. The injection parameters used were 45 seconds at 3 kV and samples were run for 65 minutes at 10 kV. Automatic calling of genotypes was based in the Fragment Profiler Software v1.2 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

Linkage between *loci* and each of the markers was analyzed by the maximum likelihood method using the computer program MLINK and LINKMAP (version 5.2) (CEPH, University of Utah, and Columbia University 1990) of the LINKAGE[®] package (Terwillinger and Ott, 1993). Frequency for each marker allele was calculated from controls and unrelated individuals married into the pedigrees. We assumed an autosomal dominant inheritance, a gene frequency of 0.001 and penetrance of 0.8, which were calculated based on age-onset seizures obtained in our families with ADPEAF. Individuals considered as phenocopy and whose clinical evaluation was inconclusive or indicative of other syndrome than ADPEAF were excluded from the linkage analysis. Genetic heterogeneity analysis between S and MG kindred for ch10 *locus* was performed using the HOMOG Program (version 3.5) (Copyright © Jurg Ott, 1988) (Terwillinger & Ott, 1993).

Mutation Screening in Candidate Genes

Three individuals from family S and MG were submitted to automatic sequencing of *LGI1* gene with the Big Dye Terminator Sequencing kit[®] for Megabace 1000[®] (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). In addition, in order to investigate the presence of the mutation identified in *LGII* in additional family members of the S kindred we designed an assay using restriction enzyme digestion with *BstNI*.

For families N and B, mutation analysis of the *LGII*, *LGI2*, *LGI3*, *LGI4* and epitempin (EPTP) domain of *MASS1* gene were initially performed by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) which was carried out with the WAVE[®] 4500 system (Transgenomic, San Jose, CA). For MG family, we also performed DHPLC for all these genes, with exception of *LGII* that has been previously sequenced. In brief, DNA samples of the affected individuals and ten controls were screened for mutations by DHPLC. PCR was performed in 20µl containing 5µM of each specific primers, 200µM of each dNTP, 0.5 units of Taq DNA polymerase, 1 X buffer, 1.5 mM MgCl₂ and 50ng DNA. Amplicons were checked by agarose gel electrophoresis preceding DHPLC analysis. PCR products were denatured at 95°C for 5 minutes and allowed to cool slowly to room temperature over 40 minutes prior to DHPLC analysis. The composition of

buffers used for DHPLC was: buffer A – 0.1M triethylammonium acetate (TEAA) and buffer B- 0.1M 25% acetonitrile in TEAA. Aliquots of 5µl of each PCR products were eluted from a DNASep[®] column (Transgenomic, San Jose, CA) at a flow rate of 0.9ml/min. Mutation screening was performed under partial denaturing conditions at different ideal running temperatures for each PCR fragment based on the WAVEMAKER[™] software (Transgenomic). DHPLC data analysis was conducted on visual inspection of the chromatogram profiles and comparison with normal controls.

Individuals that have a different chromatogram profile from normal controls were subsequently sequenced with the Big Dye Terminator Sequencing kit[®] for Megabace 1000[®] (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

All Primers used in the mutation screening were designed with the Generunner[®] program package to amplify the entire coding region and splicing sites boundaries of the *LGII*, *LGI2*, *LGI3* and *LGI4* genes, for the *MASS1* gene we investigated only exon 49, which is part of the EPTP functional domain (primer sequence oligonucleotides could be obtained on request).

cDNA analysis

The total RNA was obtained by direct extraction from the epidermis of four individuals of the S kindred harboring the IVS7(-2)A→G mutation, using standard manual techniques. RT-PCR was performed with 1µg of RNA using the *Improm II Reverse Transcriptase System* (Promega, Madison, WI, USA), in order to obtain the first cDNA strand. PCRs were performed using specific primer sequences for the region comprising the entire coding sequence of *LGII* gene. Samples were processed under the following conditions: 35 cycles of 45s at 94°C, 45s at 60.5°C and 105s at 72°C. PCR products were submitted to electrophoresis in a 1% agarose gel and analyzed for altered mobility when compared with a control individual.

Gene expression assay

Gene expression assays were carried out using real time PCR (7500 Real Time PCR system from Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.) with the TaqMan™ system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Primers and probe for the *LGII* gene were obtained from the Assays-On-Demand choice of Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), and the 18S gene was used as the endogenous control. RT-PCR was performed using *SuperScript III System* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Real time PCRs were carried out using 100ng of cDNA, in a total volume of 12.5μL with master mix, probe and primer sequences provided by Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), as well as ABI 7500 Real Time PCR System. All relative quantification experiments were performed in triplicate and the χ^2 test was used to access differences in gene expression among different patients.

RESULTS

Phenotype characterization

A summary comparing the general clinical findings of S, MG, N and B families is given in **table 1**. More detailed clinical data of these families could be visualized in **table 2**.

S Kindred: detailed clinical description of this family was presented previously (Kobayashi et al., 2003). We evaluated 18 symptomatic subjects, and auditory auras were reported by 15 of them (83.33%). The seizure onset was $21,06 \pm 7,44$ years old. Associated ictal phenomena reported were: visual misperception, ictal aphasia and “jamais-vu” in one patient respectively, “déjà-vu” in two individuals, CPS was identified in four patients and GTCS were reported by 14 patients. “Déjà-vu” associated with GTCS were identified in one individual, isolated febrile seizure and GTCS were reported by one patient respectively (table 2). Six individuals underwent interictal routine EEG recordings in our hospital (III-9, III-10, III-13, IV-10, IV-11, V-1), with no abnormalities. MRI scan was performed in 15 symptomatic individuals and malformation of the lateral aspects of the temporal lobes was identified in nine individuals (60.0%). These abnormalities were characterized as an

enlarged temporal lobe and, sometimes, protruded brain parenchyma with an encephalocele-like appearance (figure 2). All affected family members from both kindreds had benign clinical course, either with spontaneous remission and a few seizures during life or isolated auras. Some of them were not aware of the fact that these auditory phenomena were seizures.

MG Kindred: We evaluated 21 symptomatic subjects, auditory auras were reported by 20 of them (95.23%), and “déjà-vu” was present in 12 individuals (57.14%). The seizure onset was 14.9 ± 8 years old. Ictal aphasia had been reported by only one patient while febrile seizures were detected in five patients. One individual had isolated “déjà-vu” episodes. CPS and GTCS were identified, respectively in two patients. (**table 2**). MRI was performed in 17 individuals and no abnormalities were identified by visual analysis (**figure 2**). Only one individual underwent EEG recordings (IV-4) but this exam was performed in another service, and could not be analysed by our group. In general, individuals of this family also have a good outcome, with isolated auras and few seizures during their life.

N Kindred: We evaluated six subjects of this family. Auditory auras were present in three patients (50%). “Déjà vu” or febrile seizures episodes were not observed in this family. GTCS were presented in all six subjects (**table 2**). One of the subjects had only GTCS during sleep, without any other symptoms. The outcome of all subjects was benign with few episodes during their life. EEG was recorded on five patients. Two exams were considered normal (III-2 and III-8) and, on the other three (II-6, III-1, IV-2), the exam showed epileptiform activity without predominance on both the centrottemporal lobes. MRI scan was performed in three of the subjects without any abnormality detectable on visual inspection.

B kindred: We evaluated only three individuals of this family and all of them were considered affected (table 2). The three subjects presented auditory features characterized by felling ears plugged followed by visual blurring and GTCS. None of them presented “déjà vu” or febrile seizures, neither nocturnal seizure. EEG was performed in only one subject and it showed epileptiform activity on right mesial temporal lobe. MRI was performed in the same subject and it was classified as normal on visual analysis.

Molecular studies

Two-point lod-scores of S kindred, as described previously (Kobayashi et al., 2003), were above 3.00 for seven markers with a $Z_{\max}=6.35$ at $\theta=0.00$ for D10S185 (**table 3**). However, two-point lod-score analyses of the MG kindred were significantly negative (below -2.00) for all markers genotyped for this *locus* excluding linkage to the *LGII* gene (**table 3**). Multipoint lod-score analysis confirmed these results for both kindred to *locus* in ch10 (**figures 3A and 3B**). Statistical analysis with the HOMOG© program showed significant genetic heterogeneity between the two families for ch10 *locus* ($p<0.001$) (**table 4**). A statistical simulation with the MLINK program was performed to confirm statistical significance of the MG family. Lod-score values were significantly positive, with $Z_{\max}=5.00$ at $\theta=0.00$ (**table 5**). In addition, *LG12*, *LG13*, *LG14* and *MASSI* loci were also genotyped for MG family excluding linkage to these genes (**table 5**). Automatic sequencing of the *LGII* gene showed an IVS7-2A>G substitution in the three affected individuals from S kindred which was identified previously (**figure 4**). Restriction enzyme fragment analysis showed that all affected individuals in S kindred have this substitution while it's absent in a control group (**figure 5**). However, no mutation was detected in *LGII* gene in MG kindred. In addition, mutation screening by DHPLC of this gene in N and B families had not detected any variant when compared to a control group.

Furthermore, mutation screening by DHPLC in *LG12*, *LG13*, *LG14* and EPTP domain of *MASSI* gene in MG, N and B kindred only detected non- pathogenic variants, since the alterations in nucleotide sequence detected are synonymous or also found in the control group (**table 6**).

Electrophoresis of cDNA PCR products of patients from S family with the IVS7-2A>G mutation in the *LGII* gene did not show any altered mobility pattern when compared with control individual (**figure 6**). In addition, real time PCR could not detect differences in expression of *LGII* between patients and control individuals since graphics generated by the real time PCR point to a low expression of this gene in the epithelial tissue (**figure 7B**) when compared with a endogenous control (**figure 7A**). To assess the liability of *LGII* primers, cDNA from a hippocampus specimen was also submitted to real time analysis showing detectable levels of *LGII* expression (**figure 7B**).

DISCUSSION

Although ADPEAF is a rare benign epilepsy syndrome, consecutive new families have been described worldwide, and it is possible that not all these families will present the same genetic basis (Bisulli et al., 2002; Gu et al., 2002a; Kalachikov et al., 2002; Morante-Redolat et al., 2002; Winawer et al., 2002; Fertig et al., 2003; Michelucci et al., 2003; Pizzuti et al., 2003; Berkovic et al., 2004; Ottman et al. 2004 e Hedera et al., 2004; Pisano et al., 2005). Genetic heterogeneity has been described in other epileptic syndromes as autosomal-dominant nocturnal frontal lobe epilepsy, generalized epilepsy with febrile seizures and juvenile myoclonus epilepsy (Jentsch et al., 2004). These syndromes have similar clinical aspects in despite of fact that been caused by mutations in different genes (Chabrol et al., 2007). The clinical observation of the four families described in this paper together with the previous observations, raise important questions about which genes are involved with the molecular etiology of ADPEAF in these pedigrees.

The discovery of genes and *loci* predisposing to epileptic syndromes has been rising due to recent progress in the molecular biology (Ottman et al., 2001). Genetic mapping by linkage has been broadly used as a tool to identify major genes involved in Mendelian diseases, including epilepsy monogenic syndromes (Winawer et al., 2002; Szepetowski et al., 1997; Berkovic et al., 2004). In addition, linkage analysis are also used to test directly candidate *loci*, avoiding expensive and time consuming mutation screening and wide genome scan projects. Otherwise, to achieve reliable results, its necessary large families with several affected individuals, very clear and detailed clinical information and well defined inheritance pattern. Working with small pedigrees, which on your own don't have statistical power to generate significant lod-scores values, could generate non-reliable results. In this scenario, lod-score values of single and small kindred are added and, if families are heterogeneous genetically with more than one *locus* responsible for a single syndrome, the summed lod-scores could result in not reliable values. Phenocopies must be detected and removed from the cohort of patients because they also can affect lod-score values. It is important to note that phenocopies, such as low penetrance and variable expressivity, are examples of the little assurance of molecular tests in the clinical diagnosis

of epilepsies, since a negative result in the test does not exclude the possibility of an individual to develop epilepsy in the future, neither a positive result is a certainty that patients harbouring mutations will be affected by seizures in the future.

To perform genetic analysis of these families we have defined two distinct strategies: large pedigrees such as S and MG were firstly analyzed for candidate *loci* by linkage studies and results were confirmed by mutation screening, for small pedigrees only mutation screening of candidate genes by DHPLC were carried out.

Although S kindred has been reported previously (Kobayashi et al., 2003) we are presenting in this manuscript, the molecular analysis of this pedigree with more details, including positive lod-score values for *LGII locus* in ch10 (**table 3**) and chromatogram of the IVS7-2A>G mutation (**figure 4**). We believe that the presentation of these results will result in a better comprehension of the goals of this article. Initially, we performed an *in silico* linkage analysis simulation with the MG kindred to prove its statistical significance. Computer testing has resulted in a lod-score value of 5.00 at $\theta=0.0$ (**table 5**) showing that linkage analysis in MG family “per se” is able to generate significant results without the requirement of include other families in the analysis. This is important because eliminate the genetic heterogeneity effect in the lod-score values. In addition, we have identified one phenocopy in this family that was excluded from analysis: a woman with auditory auras and GTCS married to an unaffected man of the pedigree. Clinical and genetic examination of S family also revealed the occurrence of one phenocopy in this pedigree: a boy suffering of febrile seizures without auditory auras and mutation in *LGII* gene.

Lod-score values of all markers flanking *LGII locus* on ch10 were significantly negative in MG family, otherwise a $Z_{\max}=6.35$ at $\theta=0.00$ for D10S185 was achieved in S family (**table 3**). Automatic sequencing of the *LGII* followed by restriction fragment analysis revealed an IVS7-2A>G mutation in this gene in all affected patients and absent in normal controls. These results show that the IVS7-2A>G mutation in *LGII* is responsible for molecular etiology of ADPEAF at least in this family.

This mutation probably destroys the intronic acceptor AG site, resulting in pathogenic mechanisms such as exon skipping or the formation of alternative splicing sites. mRNA transcription will be affected, with the production of aberrant RNAs including

intronic or incomplete exons regions and/or formation of non-stable molecules that will be destroyed by the cellular machinery. As consequence the wild type protein could undergo to dramatic structural changes like insertion of a premature stop codon and consequently deletion of the protein C-terminal region or haploinsufficiency of LGI1 protein synthesis.

LGI1 has been supposed to be a secreted protein (Senechal et al., 2006). Sirerol-Piquer et al., 2006 using artificial mutations showed that an intact EPTP domain, with all seven in tandem repeats are required for the protein to exit the cell. The EPTP domain is located in the C-terminal region of the protein that is possibly deleted in patients with the IVS7-2A>G mutation, consequently we may suggest that a truncated form of the LGI1 protein suffer retention in the Endoplasmatic Reticulum (ER) and fail to enter in Golgi and secretory pathway. Alternatively, if there is removal of non stable mRNA, this phenomenon could change normal ratio between LGI1 and their protein partners, probably affecting excitability of neuronal circuits.

To test these hypotheses we have performed cDNA analysis of patients with the IVS7-2A>G mutation. Gel electrophoresis has not detected any altered migration pattern and expression studies could not detect *LGII* expression. Experiments were carried out with epidermis of patients; since nervous tissue was not available for study. We suppose that low levels of *LGII* expression in the epidermis tissue may possibly be the reason why our experiments were not able to detect gene expression. Other studies have to be performed to elucidate questions related to molecular mechanisms of this mutation.

Following initial screening in *LGII* gene, our naturally choice to perform a candidate gene screen were genes belonging to the *LGI* subfamily, *LGI2*, *LGI3* and *LGI4* (Staub et al., 2002; Scheel et al., 2002; Gu et al., 2002). One of the most interesting features of *LGI* genes are the EPTP repeats located in the C-terminal half of the gene. Except for the *LGI* gene family, this repeat has only been found in the *MASS1* gene and in a putative human gene, *TNEPI/TSPPEAR* (Staub et al., 2002). *LGI4* has been considered as a potential candidate gene for childhood absence epilepsy (CAE) and benign familial infantile convulsions (BFIC). A strong association between polymorphisms in *LGI4* and CAE has been reported, indicating that this gene could act as a susceptibility gene for CAE (Gu et al., 2004). In addition a knock-out mouse for this gene has been generated showing

defects in segregation and hypomyelination of axons of the peripheral nervous system (Bermingham et al., 2006). A naturally occurring mutation of the *mass1* gene has been reported in the Frings mouse strain, which is susceptible to audiogenic seizures (Skradski et al., 2001). In addition, a nonsense mutation in this gene was detected in one Japanese family with febrile and afebrile seizures (Nakayama et al., 2002). These findings in association with the presence of the EPTP domain show that these genes are potential candidates for ADPEAF in families without mutations in *LGII* gene.

The lod-scores values for MG family were significantly negative, showing that these genes are not involved with ADPEAF, at least in the MG kindred. DHPLC mutation screening corroborates these results since only neutral variants were detected. For N and B kindred, DHPLC screening also identified only neutral variants also presented in a control group. Although promoter and intronic regions were not analyzed, our findings are in accordance with previous works that analyzed the *LGI* gene family in sporadic and familial temporal lobe epilepsy (Berkovic et al., 2004; Ayerdi-Izquierdo et al. 2005), strongly supporting that these genes do not confer susceptibility to ADPEAF.

Recently has been demonstrated that *LGII* could interact with *ADAM22* and *Kv1.1*. These genes are involved in nervous systems disorders and epilepsy. *ADAM22* deficient mice show cerebellar ataxia and die around 2 to 3 weeks after birth in consequence of multiple seizures (Saganek-Hayakawa et al., 2005) and mutations in human *Kv1.1* result in the dominant disorder Episodic Ataxia Type 1 (Browne et al., 1994; Herson et al., 2003). Interaction between *LGII*, *Kv1.1* and *ADAM22* were detected in complex containing various proteins, for example *Kv1.1* is a major constituent of presynaptic A-type channels, and has its gating properties, trafficking and cellular distribution determined by *Kv1 α* , *Kv1 β* subunits and cell adhesion molecules (Campomanes et al., 2002; Coetze et al., 1999), in addition, *ADAM22* may stabilize the AMPA receptor-mediated synaptic transmission through interaction with various proteins (Fukata et al., 2006). However, Chabrol et al., 2007, studying a cohort of 18 families without mutations in the *LGII* gene, failed to detect pathogenic mutations in *ADAM22* indicating that this gene is not a major gene for ADPEAF. Although the negative results described (Chabrol et al., 2007) *Kv1.1*, *ADAM22* and other proteins involved in biochemical pathways with these genes remain as

potential candidates to have a role in the molecular etiology of ADPEAF and must be screened in future.

Molecular results achieved by our group and previously reported molecular studies by other authors (Bisulli et al., 2002; Michelucci et al., 2003; Ottman et al., 2004) suggest that there is another gene involved with ADPEAF. Linkage analysis and DHPLC mutation screening showed that *LGII locus* is not involved with ADPEAF in MG, N and B families. Furthermore, statistical analysis performed by our group with the HOMOG© program (**table 4**) confirmed the genetic heterogeneity between MG and S kindred.

Regardless genetic heterogeneity proposed by diverse groups, no considerable difference in clinical signs has been reported between ADPEAF families with and without mutations in *LGII* (Michelutti et al., 2003; Berkovic et al., 2004). Ottman et al. (2004) have described in families with *LGII* mutations, a higher occurrence of patients with auditory features and a small number of individuals with autonomic features than pedigrees without mutations in this gene. Autonomic symptoms were not identified in the majority of our patients however when clinical data of MG kindred were analyzed (**table 1 and 2**) a noteworthy difference could be identified in the number of individuals with “déjà-vu” and GTCS. MG family shows an over-representation of “déjà-vu” phenomenon when compared with S, N and B families and other kindred described previously, while there is a small incidence of GTCS (**table 1 and 2**). “Déjà-vu” is a symptom associated with mesial structures of temporal lobe. In mesial temporal lobe epilepsy, structures involved with epilepsy are hippocampus, amygdale and other mesial temporal lobe structures. There are relationships of mesial and lateral aspects of temporal lobe that may have influence in the seizure manifestation, for example, subcortical connections of mesial temporal structures are bidirectional and include afferents of auditory system (Gloor, 1997). We supposed that these connections may have a role in the genesis of “déjà-vu” auras in MG.

Regarding B and N kindred, there was a predominance of GTCS, presented in all affected subjects. The presence of GTCS is reported as a less frequent finding in previous studies that describe *LGII* mutations. Berkovic et al. (2004), studying four families bearing mutations in this gene, showed an GTCS incidence of 50% while Bisulli et al. (2002) referred GTCS as an ictal manifestation in 79% of the subjects in a family

without mutation on *LGII*. Otherwise, it is important to note that S kindred also showed a high incidence of GTCS (93.33%), showing that the correlation between GTCS incidence and *LGII* mutations is not clear yet. Other genes may have influence in the subtle clinical differences between kindred with and without *LGII* mutations, and also could modulate phenotype expression of families with *LGII* mutations.

Finally, one of most significant divergence between families studied was in relation to the neuroimaging results. The S kindred showed clear-cut, MRI abnormalities on the lateral aspects of the temporal lobes (Kobayashi et al., 2003) localized exclusively in the left temporal lobe in the majority of individuals carrying a mutation in the *LGII* gene, while MG, N and B kindred had a normal pattern of neuroimaging. This is a very significant finding since it is the first evidence of a possible anatomical- pathological substrate that may link the molecular defect with seizure semiology in ADPEAF. Furthermore, this result also strongly supports the connection between clinical and genetically heterogeneity of this syndrome.

Recently, left-hemisphere predominance has been confirmed by other authors that related left-side electroencephalogram (EEG) abnormalities and asymmetry of long-latency evoked potentials (Brodtkorb et al., 2005; Gu et al., 2005). In addition, Tessa et al. (2007) identified by voxel-based analyses an area of high anisotropy in the left temporal cortex of patients with mutations in *LGII* gene. More detailed neuroanatomical and histological experiments may help to understand the anatomical and functional basis of this intriguing lateralization of ADPEAF.

It is very important to observe that the presence of individuals in the S kindred who have *LGII* mutations, but no structural abnormalities on the temporal lobes, avoid us to make major assumptions on the relevance of these MRI findings in the generation of seizures. However, they may represent the “tip of the iceberg” of a yet undetermined malformation of white matter and cortical development. Further neuroimaging and neurophysiological studies may be helpful in clarifying the role of *LGII* mutations in the development of seizures in ADPEAF.

We have studied four Brazilian families with ADPEAF. These kindred are very singular in clinical and molecular aspects, showing that the spectrum of the ADPEAF is much broader than suspected and that the limits for the more accurate diagnosis of this syndrome have to be established. A genome wide scan should be realized to find the alternative *locus* for MG family.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by CAPES and FAPESP, São Paulo, Brazil. FRT, EB, SST and DAS also were supported by FAPESP. We thank all the family members who participated in this study. We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

REFERENCES

- Ayerdi-Izquierdo A, Stavrides G, Sellés-Martínez JJ, Larrea L, Bovo G, Lópes de Munain A, Bisulli F, Martí-Masso JF, Michelucci R, Poza JJ, Tinuper P, Stephani U, Striano P, Striano S, Staub E, Sarafidou T, Hinzmann B, Moschonas N, Siebert R, Deloukas P, Nobile C, Pérez-Tur J (2006) Genetic analysis of the LGI/Epitempin gene family in sporadic and familial lateral temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 70: 118-126.
- Berkovic SF, Izzillo P, McMahon JM, Harkin LA, McIntosh AM, GSipEpidBiostat, Phillips HA, Briellmann RS, Wallace RH, Mazarib A, Neufeld MY, Korezyn AD, Scheffer IE, Mulley JC (2004) LGI1 mutations in temporal lobe epilepsies. *Neurology* 64: 1115-1119.
- Berkovic SF, Serratosa JM, Phillips HA, Xiong L, Andermann E, Diaz-Otero F, Gomez-Garre P, Martin M, Fernandez-Bullido Y, Andermann F, Lopes-Cendes I, Dubeau F, Desbiens R, Scheffer IE, Wallace RH, Mulley JC, Pandolfo M (2004) Familial partial epilepsy with variable foci: clinical features and linkage to chromosome 22q12. *Epilepsia* 45:1054-1060.
- Bermingham JR, Shearin H, Pennington J, O'Moore J, Jaegle M, Driegen S, Van Zon A, Darbas A, Ozkaynak E, Ryu EJ, Milbrandt J, Meijer D (2006) The claw paw mutations reveal a role for Lgi4 in peripheral nerve development. *Nat Neurosci.* 9: 76-84.
- Bisulli F, Tinuper P, Marini C, Avoni P, Carraro G, Nobile C (2002) Partial epilepsy with prominent auditory symptoms not linked to chromosome 10q. *Epileptic Disord.* 4: 183-187
- Brodtkorb E, Michler RP, Gu W, Steinlein OK (2005a) Speech-induced aphasic seizures in epilepsy caused by *LGII* mutation. *Epilepsia* 46: 963-966.
- Brodtkorb E, Steinlein OK, Sand T (2005b). Asymmetry of Long-latency Auditory evoked potentials in *LGII*-related Autosomal Dominant Lateral Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsia* 46: 1692-1694.
- Browne DL, Gancher ST, Nutt JG, Brunt ER, Smith EA, Kramer P, Litt M (1994). Episodic ataxia/myokymia syndrome is associated with point mutations in the human potassium channel gene, KCNA1. *Nat Genet.* 8: 136-140.

Campomanes CR, Carroll KI, Manganas LN, Hershberg ME, Gong B, Antonucci DE, Rhodes KJ, Trimmer JS (2002). Kv beta subunit oxidoreductase activity and Kv1 potassium channel trafficking. *J Biol Chem.* 277: 8298-8305.

Chabrol E, Gourfinkel-An I, Scheffer IE, Picard F, Couarch P, Berkovic SF, McMahon JM, Bajaj N, Mota-Vieira L, Mota R, Trouillard O, Deppiène C, Baulac M, LeGuern E, Baulac S (2007). Absence of mutations in the LGI1 receptor ADAM22 gene in autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Epilepsy Research* 76: 41-48.

Chernova OB, Somerville RP, Cowell JK (1998). A novel gene, LGI1, from 10q24 is rearranged and downregulated in malignant brain tumors. *Oncogene* 17: 2873-2881.

Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich N, Vega-Saenz de Miera, Rudy B (1999). Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci.* 868: 233-285.

Commission on classification and terminology of the International League against Epilepsy (1981). Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia* 22: 489-501.

Commission on classification and terminology of the International League against Epilepsy (1989). Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* 30: 389-399.

Fertig E, Lincoln A, Martinuzzi A, Mattson RH, Hisama FM (2003). Novel LGI1 mutation in a family with autosomal dominant partial epilepsy with auditory features. *Neurology* 60: 1687-1690.

Fukata Y, Adesnik H, Iwanaga T, Bredt DS, Nicoll RA, Fukata M (2006). Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulate synaptic transmission. *Science* 313: 1792-1795.

Gloor P (1997). *The Temporal Lobe and Limbic System*. Oxford University Press; New York

Gu W, Wevers A, Schroder H, Grzeschik KH, Derst C, Brodtkorb E, de Vos R, Steinlein OK (2002a). The LGI1 gene involved in lateral temporal lobe epilepsy belongs to a new subfamily of leucine-rich repeat proteins. *FEBS Lett.* 519:71-76.

Gu W, Brodtkorb E, Steinlein OK (2002b). LGI1 is mutated in familial temporal lobe epilepsy characterized by aphasic seizures. *Ann Neurol.* 52: 364-367.

Gu W, Brodtkorb E, Piepoli T, Finocchiaro G, Steinlein OK (2005). LGI1: a gene involved in epileptogenesis and glioma progression? *Neurogenetics* 6: 59-66.

Hedera P, Abou-Khalil B, Crunk AE, Taylor KA, Haines JL, Sutcliffe JS (2004). Autosomal Dominant Lateral Temporal Epilepsy: two families with novel mutations in the *LGII* gene. *Epilepsia* 45: 218-222.

Herson PS, Virk M, Rustay NR, Bond CT, Crabbe JC, Adelman JP, Maylie J (2003). A mouse model of episodic ataxia type-1. *Nat Neurosci.* 6: 378-383.

Jentsch T, Hubner CA, Fuhrmann (2004). Ion channels: function unraveled by dysfunction. *Nat Cell Biol.* 6: 1039-1047

Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B, Winawer M, Barker-Cummings C, Martinelli Boneschi F, Choi C, Morozov P, Das K, Teplitskaya E, Yu A, Cayanis E, Penchaszadeh G, Kottmann AH, Pedley TA, Hauser WA, Ottman R, Gilliam TC. (2002). Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet* 30: 335-341.

Kobe B, Kajava AV (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol.* 11:725-732.

Kobayashi E, Santos NF, Torres FR, Secolin R, Sardinha LAF, Lopes-Cendes I, Cendes F (2003) Magnetic Resonance Imaging abnormalities in familial temporal lobe epilepsy with auditory auras. *Arch Neurol.* 60: 1546-1551.

Michelucci R, Poza JJ, Sofia V, Feo MR, Binelli S, Bisulli F, Scudellaro E, Simionati B, Zimbello R, D'Orsi G, Passarelli D, Avoni P, Avanzini G, Tinuper P, Biondi R, Valle G, Mautner VF, Stephani U, Tassinari CA, Moschonas NK, Siebert R, Munain AL, Perez-Tur J, Nobile C (2003). Autosomal Dominant Lateral Temporal Epilepsy: Clinical Spectrum, New Epitempin Mutations, and Genetic Heterogeneity in Seven European Families. *Epilepsia* 44: 1289-1297.

Morante-Redolat JM, Gorostidi-Pagola A, Piquer-Sirerol S, Sáenz A, Poza JJ, Galán J, Gesk S, Sarafidou T, Mautner VF, Binelli S, Staub E, Hinzmann B, French L, Prud'homme JF, Passarelli D, Scannapieco P, Tassinari CA, Avanzini G, Martí-Massó JF, Kluwe L, Deloukas P, Moschonas NK, Michelucci R, Siebert R, Nobile C, Pérez-Tur J, López de Munain A (2002) Mutations in the LGI1/Epitempin gene on 10q24 cause autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Hum Mol Genet.* 11:1119-1128.

Nakayama J, Fu YH, Clark AM, Nakahara D, Hamano K, Iwasaki N, Matsui A, Arinami T, Ptacek LJ (2002) A nonsense mutation of the MASS1 gene in a family with febrile and afebrile seizures. *Ann Neurol.* 52: 654-657.

Ottman R (2001) Progress in the genetics of the partial epilepsies. *Epilepsia* 42 (Suppl.5): 24-30.

Ottman R, Risch N, Hauser WA, Pedley TA, Lee JH, Barker-Cummings C, Lustenberger A, Nagle KJ, Lee KS, Scheuer ML, Neystat M, Susser M, Wilhelmsen KC (1995) Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q. *Nat Genet.* 10: 56-60.

Ottman R, Winawer MR, Kalachikov S, Baker-Cummings C, Gilliam TC, Pedley TA, Hauser WA (2004) LGI1 mutations in autosomal dominant partial epilepsy with auditory features. *Neurology* 62: 1120-1126.

Pisano T, Marini C, Brovedani P, Brizzolara D, Pruna D, Mei D, Moro F, Cianchetti C, Guerrini R (2005) Abnormal Phonologic Processing in Familial Temporal Lobe Epilepsy due to a new *LGII* mutation. *Epilepsia* 46: 118-123.

Pizutti A, Flex E, Bonaventura CD, Dottorini T, Egeo G, Manfredi M, Dallapicola B, Giallonardo A (2003) Epilepsy with auditory features: a LGI1 gene mutation suggests a loss-of-function mechanism. *Ann Neurol.* 53: 396-399.

Poza JJ, Sáenz A, Martínez-Gil A, Cheron N, Cobo AM, Urtasun M, Martí-Massó JF, Grid D, Beckmann JS, Prud'homme JF, López de Munain A (1999) Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: clinical and genetic study of a large Basque pedigree linked to chromosome 10q. *Ann Neurol.* 45:182-188.

Saganek-Hayakawa K, Kai J, Hirorashi E, Miyamoto N, Ino M, Oki T, Yamazaki K, Nagasu T (2005) Ataxia and peripheral nerve hypomyelination in ADAM22-deficient mice. *BMC Neurosc.* 6: 33-44.

Scheel H, Tomiuk S, Hoffmann K (2002) A common protein interaction domain links two recently identified epilepsy genes. *Hum Mol Genet.* 11: 1757-1762.

Schulte U, Thumfart JO, Klocker N, Sailer CA, Bildl W, Biniossek M, Dehn D, Deller T, Eble S, Abbass K, Wangler T, Knaus HG, Fakler B (2006) The epilepsy-linked Lgi1 protein assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by Kv β 1. *Neuron* 41: 697-706.

Senecchal KR, Thaller C, Noebels JL (2005) ADPEAF mutations reduce levels of secreted LGI1, a putative tumor suppressor protein linked to epilepsy. *Hum Mol Genet.* 14: 1613-1620.

Sirerol-Piquer MS, Ayerdi-Izquierdo A, Morante-Redolat J, Herranz-Pérez V, Favell K, Barker PA, Pérez-Tur J (2006) The epilepsy gene LGI1 encodes a secreted glycoprotein that binds to the cell surface. *Hum Mol Genet.* 15: 3436-3445.

Skradski SL, Clark AM, Jiang H, White HS, Fu YH, Ptacek LJ (2001) A novel gene causing a mendelian audiogenic mouse epilepsy. *Neuron* 31: 537-544.

Staub E, Perez-Tur J, Siebert R, Nobile C, Moschonas NK, Deloukas P, Hinzmann B (2002). The novel EPTP repeat defines a superfamily of proteins implicated in epileptic disorders. *Trends Biochem Sci.* 27: 441-444.

Szepetowski P, Rochette J, Berquin P, Piussan C, Lathrop G M, Monaco AP (1997). Familial infantile convulsions and paroxysmal choreoathetosis: a new neurological syndrome linked to the pericentromeric region of human chromosome 16. *Am J Hum Genet.* 61: 889-898.

Terwillinger, JD, Ott J (1993). *Handbook of human genetic linkage*. Johns Hopkins, Maryland.

Tessa C, Michelucci C, Nobile C, Giannelli M, Della Nave R, Testoni S, Bianucci D, Tinuper P, Bisulli F, Sofia V, De Feo MR, Giallonardo AT, Tassinari CA, Mascalchi M (2007) Structural anomaly of left lateral temporal lobe in epilepsy due to mutated LGI1 *Neurology* 69: 1298-1300.

Winawer MR, Martinelli Boneschi F, Barker-Cummings C, Lee JH, Liu J, Mekios C, Gilliam TC, Pedley TA, Hauser WA, Ottman R (2002) Four new families with autosomal dominant partial epilepsy with auditory features: clinical description and linkage to chromosome 10q24. *Epilepsia* 43:60-67

Tables:

Table 1 – General clinical features of MG, S, N and B families with ADPEAF.

Family	Number of symptomatic individuals evaluated	Seizure onset (yr)	Auditory aura	“Déjà-vu”	CPS	TCGS	MRI Temporal lobe abnormalities
MG	21	14,9 $\pm$ 8,19	20	12	2	2	0/17
S	18	21,06 $\pm$ 7,44	15	3	4	14	9/15
N	6	14,83 $\pm$ 10,34	3	0	5	6	0/3
B	3	6,0 $\pm$ 1,0	3	0	3	3	0/1

Yr = years, CPS=complex partial seizure, TCGS= tonic-clonic generalized seizures, MRI = magnetic resonance imaging

Table 2 – Detailed clinical features of MG, S, N and B families with ADPEAF

Family	Patient Id.	Age (yr)	Auditory Aura	CPS	GTCS	“Déjà-vu”	MRI	Other symptoms
MG	MG II-1	74	Buzzing	no	no	no	-	Depression, panic syndrome
	MG II-3	75	Buzzing in the left ear that stopped at least 15 years ago	no	no	no	normal	febrile seizures
	MG II-4	66	A sound like a whistle	no	no	no	-	-
	MG II-6	55	A butterfly sound in the left year and can't understand what people are saying	no	no	no	-	-
	MG II-8	52	Buzzing	yes	yes	no	normal	-
	MG III-2	52	Very frequently motor, radio and waterfall noises	no	no	yes	normal	Nightmare like episodes
	MG III-5	47	Motorcycle noise	no	no	no	normal	Episodes that sounds start to get low
	MG III-7	45	A sound like a cricket	no	no	yes	normal	Vertigo, febrile seizures
	MG III-11	41	Beetle sound in the left year, waterfall noise	no	no	yes	normal	-
	MG III-12	24	Buzzing	no	no	yes	normal	-
	MG III-14	24	Whistle sound	no	no	yes	normal	Febrile seizures
	MG IV-1	31	no	no	no	yes	normal	-
	MG IV-2	29	Buzzing	no	no	yes	normal	-
	MG IV-3	25	Buzzing, motor noise	no	no	yes	normal	Psychosis
	MG IV-4	29	Buzzing	no	yes	no	normal	Febrile seizures
	MG IV-5	17	Sound of a bee in both ears	no	no	yes	normal	-
	MG IV-6	17	Noise of a microphone	no	no	no	-	-
	MG IV-7	29	Whistle sound in both ears	no	no	yes	normal	-
	MG IV-8	24	Buzzing	no	no	yes	normal	-
	MG IV-11	24	Buzzing and loss of hearing	no	no	no	normal	Febrile seizures
	MG IV-12	23	Buzzing	yes	no	yes	normal	-
	*S II-2	91	Motorcycle noise	yes	yes	no	-	-
	*S II-8	79	Noise in the right ear	yes	yes	no	-	-
	*S III-4	56	Noise in the left year	no	yes	no	LTLM	-
	*S III-7	54	Strong buzzing	no	yes	no	normal	Start to see disfigured faces
S	*S III-9	52	no	no	yes	no	LTLM	Start to see disfigured faces and distorted objects
	*S III-10	50	People clapping	yes	yes	no	LTLM	-
	*S III-13	44	Radio and TV noise	no	yes	no	LTLM	Start to see disfigured faces
	*S III-18	71	Whistle sound	no	no	yes	-	“Jamais-vu”
	*S III-20	64	Whistle sound	no	yes	no	normal	-
	*S III-22	55	no	no	yes	yes	normal	-
	*S III-24	52	Whistle sound and loss of hearing	no	yes	no	LTLM	-
	*S IV-10	20	Felling ears plugged	no	yes	no	LTLM	-
	*S IV-11	21	Felling ears plugged	no	yes	no	normal	-
	*S IV-15	43	Radio noise	no	yes	no	LTLM	-
	*S IV-17	40	Noise	no	yes	no	LTLM	-
	*S IV-24	29	Buzzing	no	no	yes	normal	-
	*S V-1	19	Whistle sound in the left ear and can't understand what people are saying	yes	no	no	normal	-
	**S V-6	17	no	no	no	LTLM	LTLM	Febrile seizures
N	N II-6	69	no	yes	yes	no	-	-
	N III-1	54	Hearing misperception	yes	yes	no	normal	-
	N III-2	52	no	no	yes-during sleep	no	normal	-
	N III-3	54	Strong buzzing	yes	yes	no	normal	-
	N III-8	40	Pressure over the ears	yes	yes	no	-	Visual hallucination
B	N IV-2	19	no	yes	yes	no	normal	-
	B I-1	43	Felling ears plugged	yes	yes	no	normal	Visual blurring
	B I-2	-	Felling ears plugged	yes	yes	no	-	Visual blurring
	B I-3	-	Felling ears plugged	yes	Yes	no	-	Visual blurring

* Patients with *LGII* mutation, ** phenocopy, Yr = years, CPS=complex partial seizures, GTCS= tonic-clonic generalized seizures, MRI = magnetic resonance imaging, LTLM=lateral temporal lobe malformations

Table 3 – Two-point Lod-score obtained for 12 markers within the candidate region ADPEAF for MG and S kindreds

<i>Marker</i>	<i>Kindreds</i>	<i>Recombination fraction</i>								
		0	5	10	15	20	25	30	35	40
D10S1644	MG	-4.72	-2.89	-2.04	-1.42	-0.96	-0.61	-0.35	-0.17	-0.05
	S	-2.76	2.42	2.81	2.80	2.62	2.32	1.94	1.48	0.97
D10S1687	MG	-2.49	-1.41	-0.82	-0.44	-0.18	-0.01	0.09	0.14	0.13
	S	-3.24	0.71	1.46	1.70	1.71	1.59	1.36	1.06	0.70
D10S1765	MG	-3.03	-1.91	-1.28	-0.82	-0.48	-0.23	-0.07	0.04	0.08
	S	0.90	2.02	2.26	2.23	2.07	1.82	1.50	1.12	0.71
D10S1753	MG	-4.21	-2.22	-1.59	-1.13	-0.78	-0.51	-0.31	-0.17	-0.07
	S	0.63	1.64	1.66	1.55	1.38	1.17	0.94	0.70	0.45
D10S583	MG	-1.16	-0.72	-0.44	-0.24	-0.1	-0.01	0.03	0.05	0.04
	S	5.61	5.17	4.69	4.18	3.63	3.04	2.41	1.75	1.06
D10S185	MG	-4.02	-1.66	-0.85	-0.40	-0.11	0.07	0.16	0.20	0.18
	S	6.35	5.83	5.28	4.70	4.08	3.43	2.75	2.02	1.27
D10S574	MG	-2.21	-0.19	0.18	0.36	0.44	0.45	0.41	0.35	0.25
	S	4.79	4.33	3.83	3.31	2.76	2.19	1.59	1.00	0.49
D10S1680	MG	-3.46	-1.26	-0.67	-0.31	-0.08	0.06	0.15	0.18	0.16
	S	4.77	4.37	3.94	3.47	2.97	2.44	1.89	1.33	0.77
D10S577	MG	-3.90	-1.77	-1.01	-0.56	-0.27	-0.08	0.04	0.09	0.10
	S	4.26	3.92	3.54	3.15	2.73	2.28	1.82	1.33	0.82
D10S192	MG	-2.62	-1.60	-0.96	-0.54	-0.27	-0.09	0.02	0.07	0.09
	S	5.55	5.08	4.58	4.06	3.50	2.91	2.29	1.65	0.99
D10S566	MG	-2.82	-0.96	-0.71	-0.63	-0.61	-0.60	-0.55	-0.44	-0.29
	S	3.08	4.26	4.05	3.69	3.24	2.74	2.19	1.59	0.96
D10S187	MG	-1.69	-0.83	-0.52	-0.34	-0.21	-0.12	-0.06	-0.01	0.01
	S	-5.02	-1.71	-1.06	-0.68	-0.44	-0.28	-0.18	-0.11	-0.06

Table 4- Statistical analysis for genetic heterogeneity in ADPEAF.

<i>Locus</i>	Marker	H ₁ vs. H ₀			
		χ^2	LRT	d.F.	<i>pvalue</i>
10q	D10S1644	10.356	177.3195	2	0.00563
	D10S1687	7.829	50.1187	2	0.01995
	D10S1765	8.474	69.1831	2	0.01445
	D10S1753	5.061	12.5588	2	0.07961
	D10S583	23.484	1.257 x 10 ⁵	2	7.952 x 10 ⁻⁰⁶
	D10S185	26.514	5.719 x 10 ⁵	2	1.748 x 10 ⁻⁰⁶
	D10S574	21.184	3.981 x 10 ⁴	2	2.511 x 10 ⁻⁰⁵
	D10S1680	19.304	1.555 x 10 ⁴	2	6.429 x 10 ⁻⁰⁵
	D10S577	19.228	1.497 x 10 ⁴	2	6.678 x 10 ⁻⁰⁵
	D10S192	16.895	4663.7806	2	0.000214
	D10S566	23.018	9.959 x 10 ⁴	2	1.003 x 10 ⁻⁰⁵
	D10S187	17.564	6514.2757	2	0.000153

H₁ = heterogeneity; H₀ = homogeneity; χ^2 = chi-square; LRT = *Likelihood ratio test*; d.F. = degree of freedom

Table 5 – Simulation of statistical significance of MG family and lod-score values for microsatellites markers flanking the *LGI2*, *LGI3*, *LGI4* and *MASS1* loci.

Gene	Markers	Recombinant fractions (θ)								
		0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40
	Simulation	5.00	4.56	4.10	3.63	3.13	2.61	2.07	1.51	0.94
<i>LGI2</i>	D4S3013	-1.88	-1.59	-1.33	-1.09	-0.85	-0.63	-0.45	-0.29	-0.16
	D4S2948	-4.56	-2.85	-1.95	-1.34	-0.91	-0.59	-0.36	-0.19	-0.08
	D4S391	-2.94	-2.11	-1.49	-1.01	-0.66	-0.39	-0.21	-0.08	-0.01
<i>LGI3</i>	D8S261	-2.13	-1.81	-1.52	-1.22	-0.93	-0.67	-0.46	-0.28	-0.15
	D8S560	-3.99	-2.80	-2.03	-1.45	-1.02	-0.70	-0.45	-0.27	-0.13
	D8S1786	-2.74	-1.64	-1.31	-1.08	-0.87	-0.67	-0.48	-0.31	-0.18
<i>LGI4</i>	D19S868	-2.78	-1.11	-0.54	-0.21	-0.02	0.08	0.13	0.12	0.09
	D19S425	-3.55	-2.68	-1.86	-1.24	-0.81	-0.51	-0.30	-0.16	-0.06
	D19S224	-2.58	-1.33	-0.98	-0.73	-0.53	-0.37	-0.23	-0.13	-0.06
<i>MASS1</i>	D5S1725	-2.72	-1.85	-1.28	-0.87	-0.56	-0.34	-0.18	-0.08	-0.01
	D5S815	-3.32	-2.49	-1.88	-1.39	-0.99	-0.67	-0.42	-0.23	-0.10
	D5S618	-1.14	-0.88	-0.66	-0.48	-0.34	-0.23	-0.14	-0.08	-0.03
	D5S644	-3.58	-2.33	-1.61	-1.12	-0.77	-0.50	-0.31	-0.17	-0.07
	D5S652	-6.14	-3.25	-2.24	-1.56	-1.08	-0.72	-0.45	-0.26	-0.12
	D5S2498	-4.46	-2.61	-1.80	-1.26	-0.87	-0.57	-0.34	-0.18	-0.07

Table 6- SNPs identified in DHPLC mutation screening of MG, N and B families.

Genes	Families		
	MG	N	B
<i>LGII</i>	-	-	-
<i>LGI2</i>	-	-	-
<i>LGI3</i>	IVS V+49C>T*	IVS IV+61C>A* IVS IV+61C>A*	IVS IV+61C>A* IVS IV+61C>A* IVS V+49C>T* C778T, L260L (rs35142808)
<i>LGI4</i>	IVS II+47G>A* G831C, P267P, (rs1687998)	IVS II+47G>A* C1603A*, L534I C595A, L181I* C1396T, L465L (rs12610146) G831C, P267P (rs1687998)	IVS II+47G>A* C1603A*, L534I G831C, P267P (rs1687998)
EPTP- MASSI	-	-	-

IVS= intronic variant sequence, L= leucine, I = isoleucine, P = proline. (*) SNP not described in database from NCBI. SNP positions were determined with sequences NM 139278 (*LGI3*) and NM 139284 (*LGI4*) from NCBI database.

Figure 1

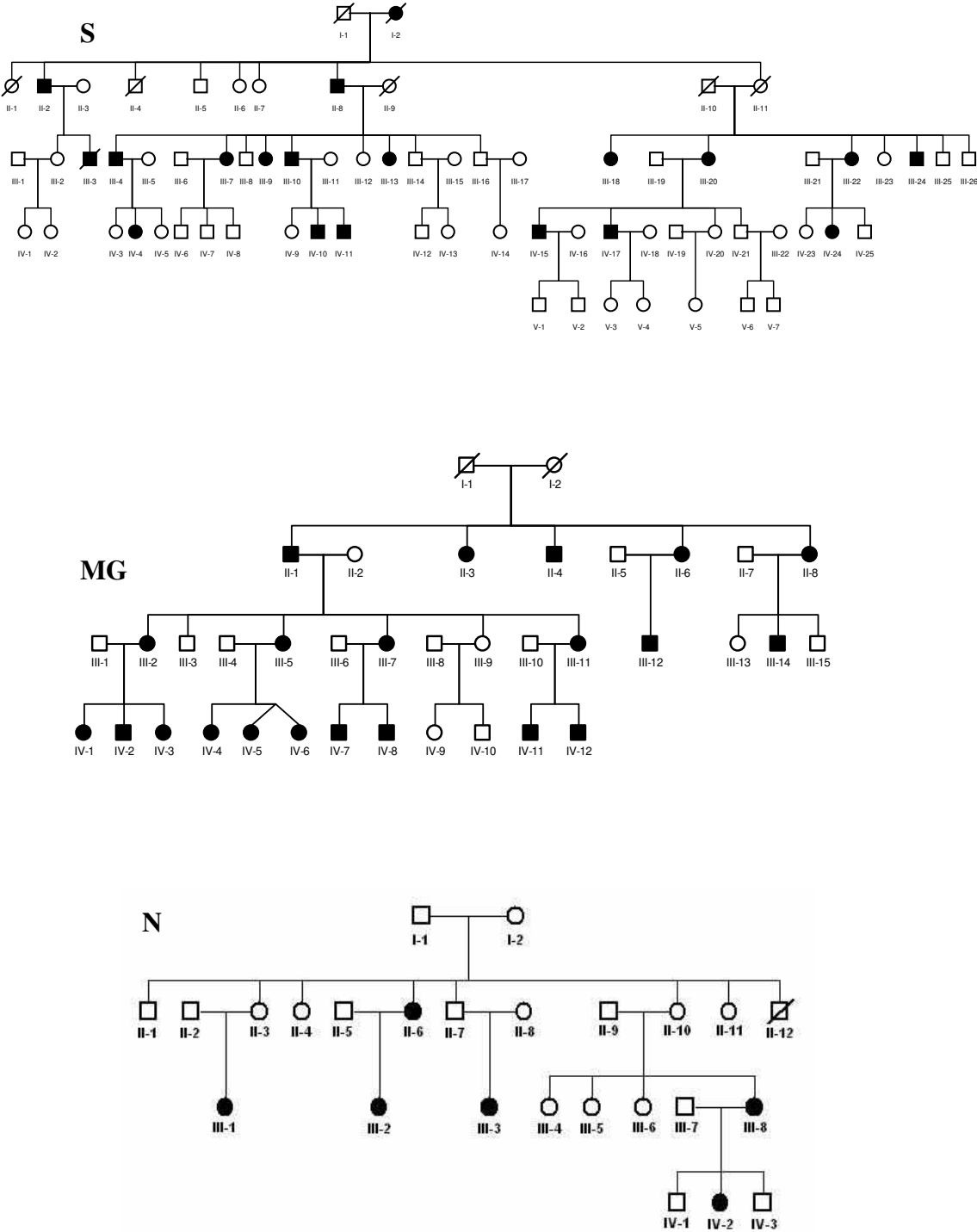


Figure 2

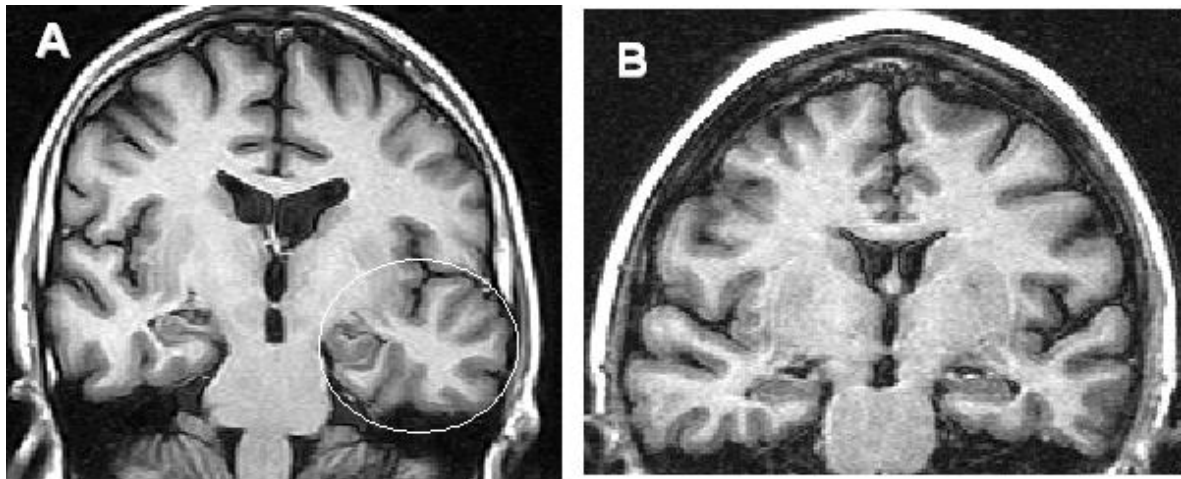


Figure 3

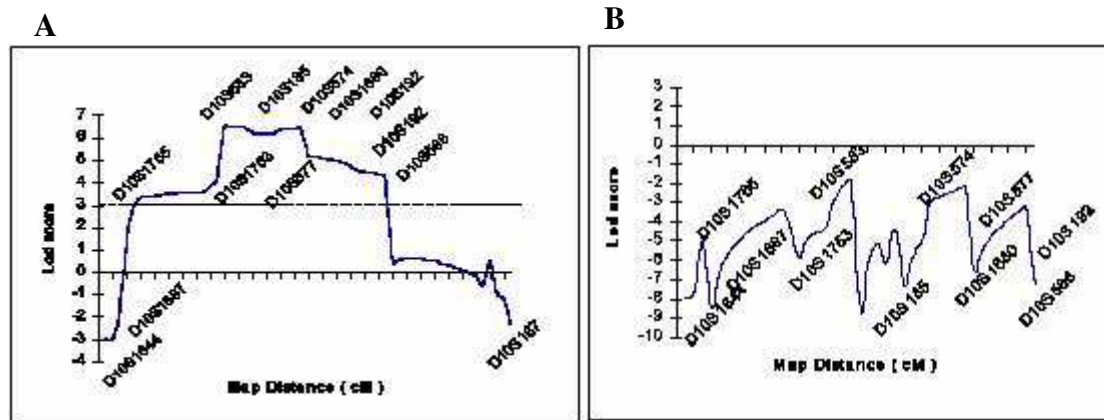


Figure 4

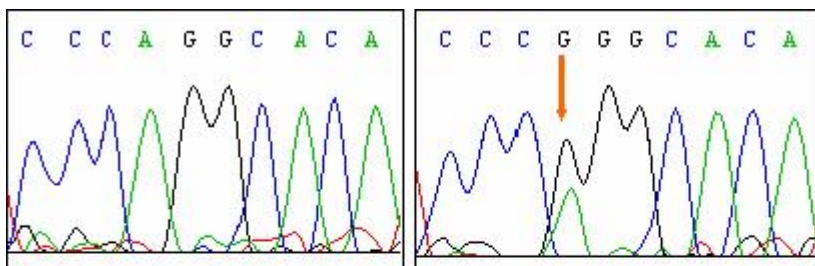


Figure 5

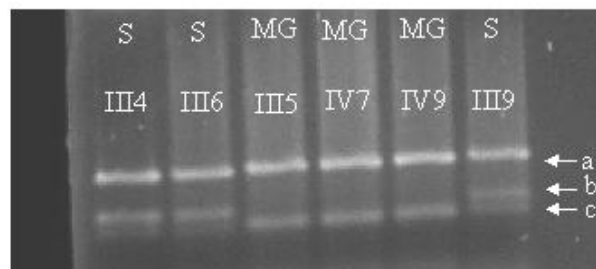


Figure 6

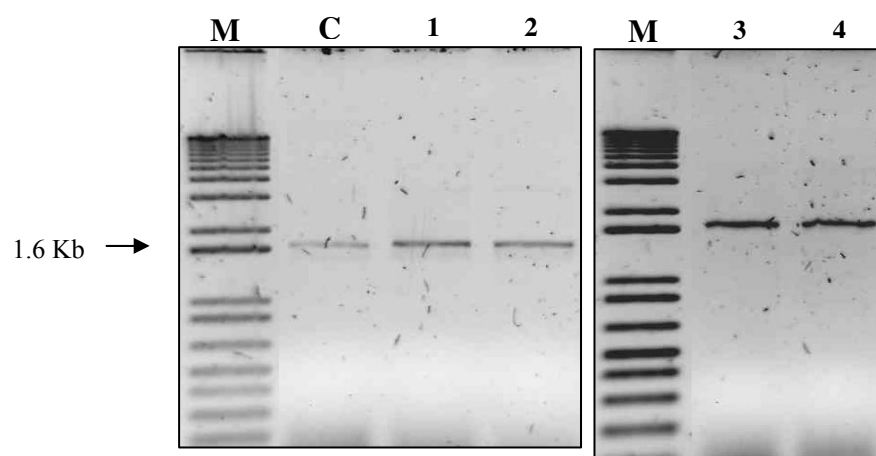
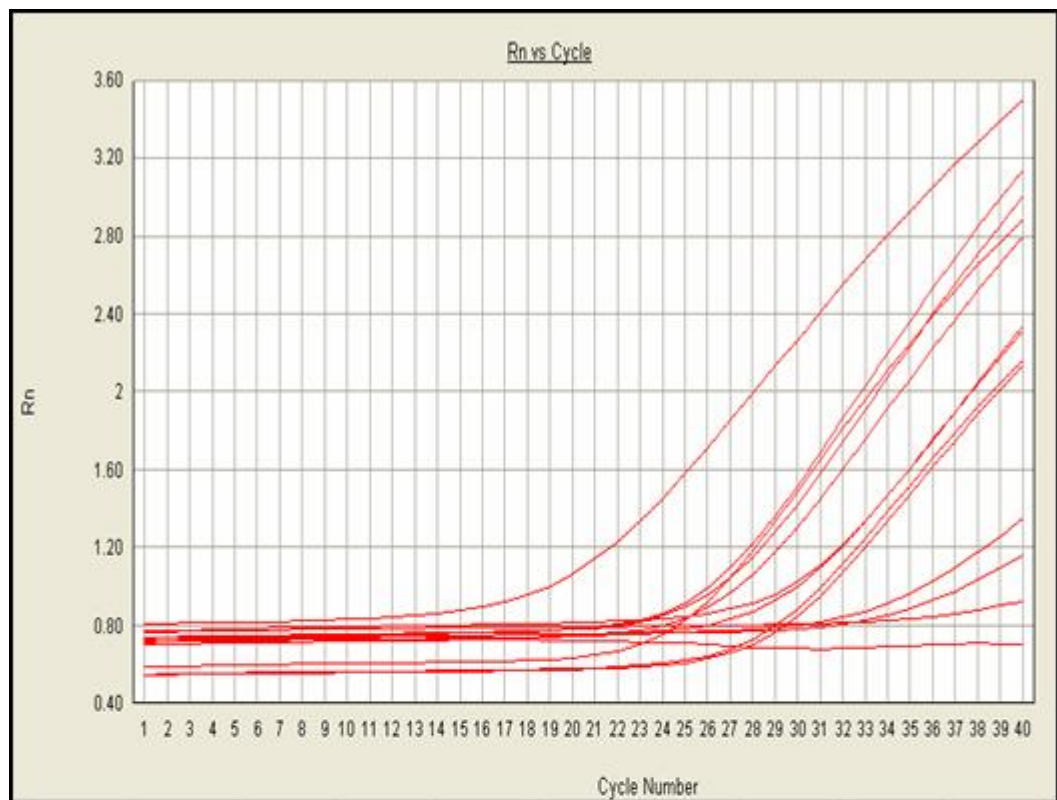
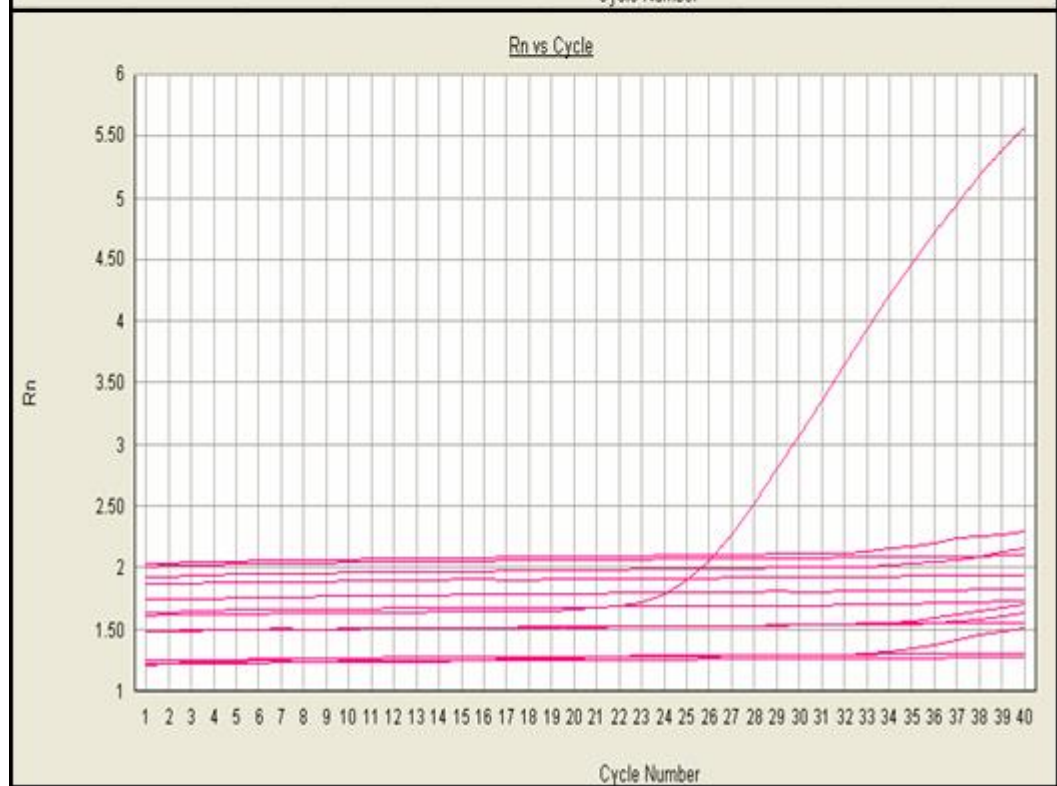


Figure 7

A



B



Legends for figures:

Figure 1: Pedigree structure of MG, S and N kindred segregating ADPEAF. Blackened symbols denote affected individuals. A diagonal line through a symbol denotes that the individual is deceased. The pedigree of B family couldn't be obtained due lack of information.

Figure 2: Coronal T1-IR MRI from patient II-8 (52 years old woman) from MG kindred, with seizures since age 16 (auditory auras, CPS and rare GTCS), showing normal morphology of the temporal lobes (2A).

Coronal T1-IR MRI from patient III-13 (41 years old woman), the proband on S kindred with seizures since age 24 (auditory auras and GTCS). We observe signs of left temporal lobe dysgenesis (white circle), characterized by enlargement of the temporal lobe, with small gyri (although not characterizing polymicrogyria), and absence of first and second temporal sulci. The basolateral aspect of the temporal lobe is also abnormal, more pronounced posteriorly, suggesting features of a small temporal lobe encephalocele. The mesial structures have also abnormal shape and axis, but no clear signs of mesial temporal sclerosis (2B).

Figure 3: Multipoint lod-scores obtained in S kindred (3A) and MG kindred (3B) with ADPEAF. Genetic distances between markers were obtained from NCBI. Values under the horizontal dashed line in figure 3a indicate exclusion of linkage between markers and gene. The horizontal dashed line in figure 3b represents the maximum lod-score -1.00 and the full line fix the 90% maximum interval confidence for gene localization.

Figure 4: Eletropherograms from affected (4A) and unaffected individuals (4B) from S kindred, showing the IVS7-2A>G mutation (orange arrow).

Figure 5: BstN I restriction enzyme analysis for three individuals of MG and S kindreds in agarose gel. Mutation carriers present three fragments (*a*-292bp, *b*-128bp and *c*-163bp), whereas non-carriers present only two fragments *a* and *c*. bp = base pairs.

Figure 6: Gel analysis of *LGII* cDNA from individuals of S kindred with the IVS7-2A>G mutation. Lines 1, 2, 3 and 4 are corresponding to patient samples. C= control individual, M= 1.0 Kb plus ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Figure 7: Real time PCR analysis showing expression of the endogenous control 18S (A) and *LGII* gene (B) from epidermis of a control individual and patients with the IVS7-2A>G mutation from S kindred. The red curve in B is related to the *LGII* expression of a control hippocampus specimen.

CAPÍTULO 6

ANÁLISE DE LIGAÇÃO GENÔMICA RANDÔMICA NA FAMÍLIA MG

Foram analisados 384 marcadores microsátélites distribuídos por todo o genoma humano e que distam um intervalo médio de 10cM. O cálculo de *lod-scores* de dois pontos gerou resultados negativos (*lod-scores* $\leq -2,00$) ou não informativos ($-2,00 < \textit{lod-scores} < 3,00$) para a grande maioria dos marcadores analisados (**Anexo 4**). É importante destacar a alta porcentagem de marcadores não informativos em relação aos que resultaram em valores significativos (figura 5)

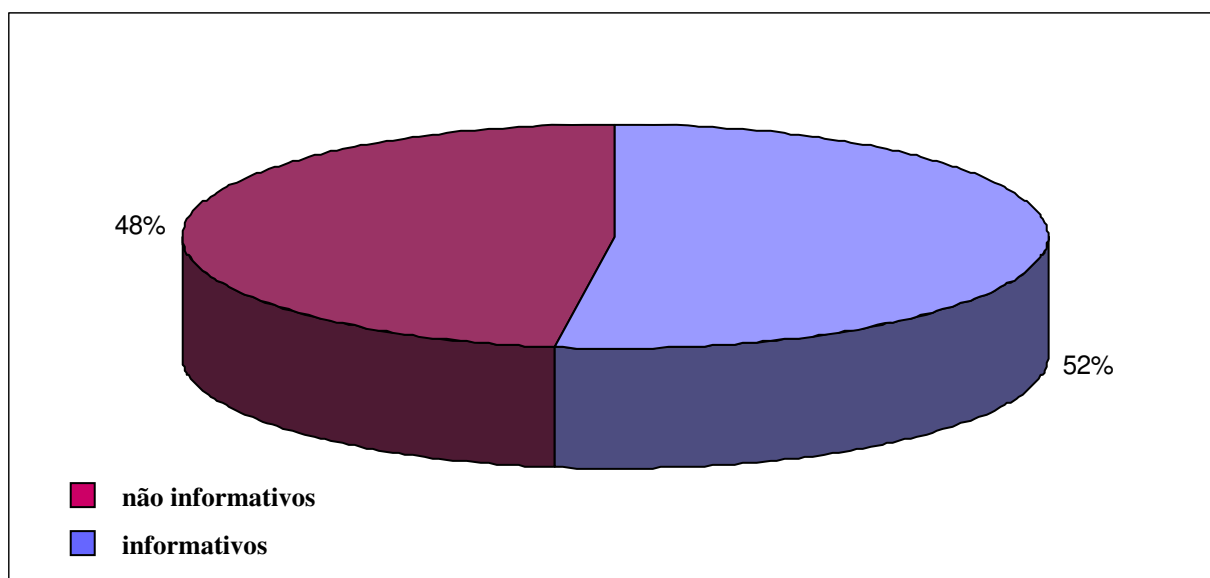


Figura 5. Gráfico mostrando a proporção de marcadores informativos (*lod-score* $\leq -2,00$) e não informativos ($-2,00 < \textit{lod-score} < 3,00$).

A figura abaixo mostra um panorama geral dos valores de *lod-score* obtidos na análise de ligação genômica randômica da família MG (figura 6).

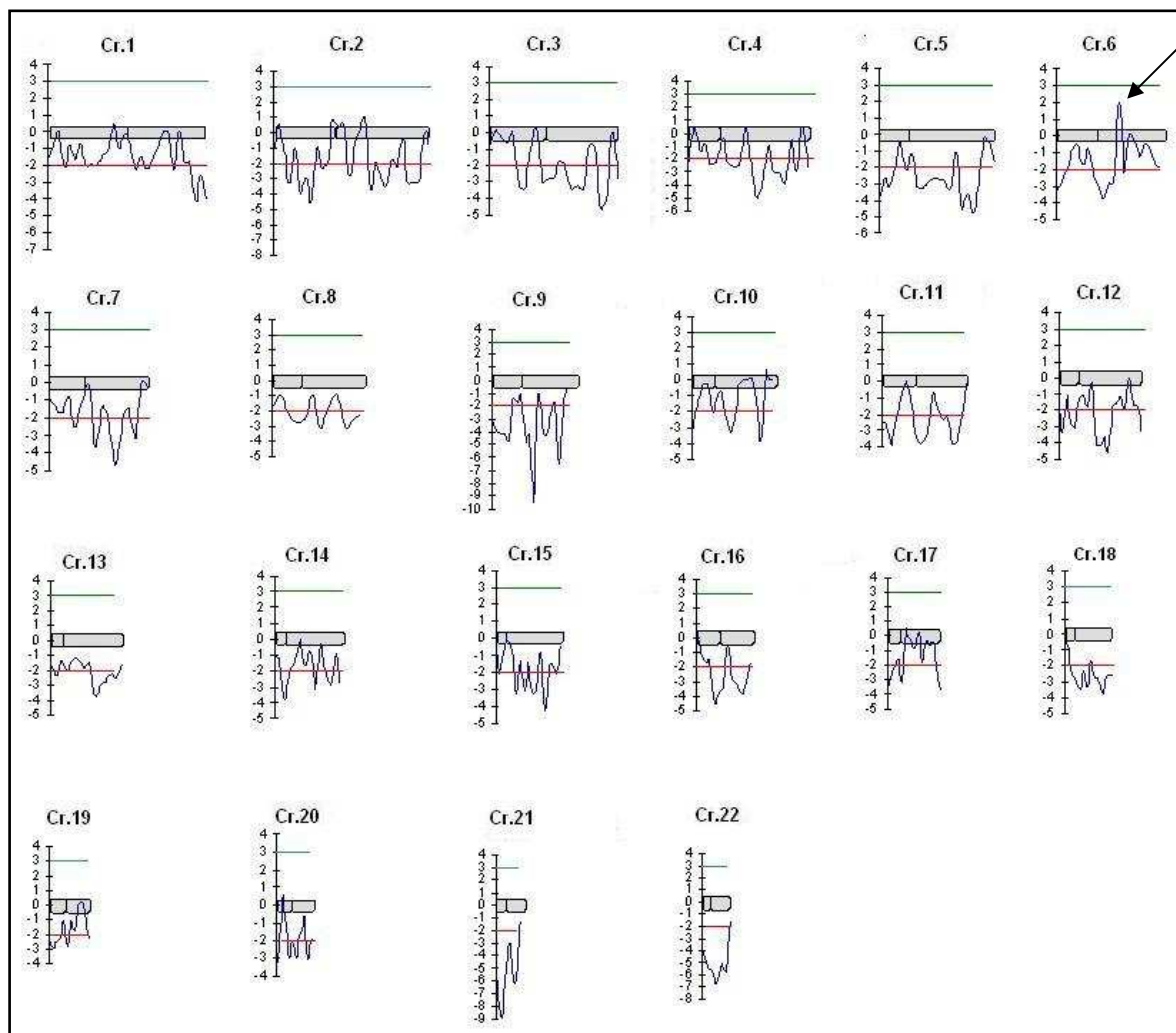


Figura 6. Esquema da análise de ligação genômica randômica. Neste esquema estão representados todos os 384 marcadores testados. A seta representa o marcador do cromossomo 6 que atingiu o maior valor de *lod-score* de dois pontos.

A visualização atenta da figura acima revela que um marcador microsatélite localizado no cromossomo 6 atingiu valores de *lod-score* indicativos de uma possível ligação genética.

O marcador D6S687, localizado mais especificamente no cromossomo 6q22, atingiu um Zmax de 2.07 a uma frequência de recombinação de 5 cM ($\theta=0.05$). Os valores de *lod-score* para todas as frequências de recombinação e marcadores do cromossomo 6 podem ser visualizados na tabela abaixo (tabela 5).

Tabela 5-Valores de *lod-score* para marcadores microsatélites do cromossomo 6.

<i>Marcador</i>	<i>Frequência de recombinação (cM)</i>								
	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40
D6S1574	-3.29	-1.44	-0.97	-0.65	-0.40	-0.21	-0.08	0.01	0.05
D6S309	-2.76	-1.81	-1.26	-0.87	-0.58	-0.36	-0.19	-0.08	-0.01
D6S470	-1.92	-1.31	-0.87	-0.54	-0.31	-0.14	-0.03	0.04	0.06
D6S289	-0.75	0.13	0.31	0.36	0.34	0.29	0.21	0.13	0.05
D6S422	-0.57	0.42	0.66	0.72	0.68	0.60	0.49	0.36	0.23
D6S276	-1.68	-0.45	-0.07	0.14	0.24	0.28	0.26	0.22	0.15
D6S1610	-0.69	0.05	0.33	0.46	0.51	0.49	0.44	0.36	0.26
D6S282	-2.15	-0.99	-0.45	-0.13	0.07	0.18	0.23	0.23	0.19
D6S257	-2.84	-1.06	-0.49	-0.16	0.05	0.18	0.24	0.25	0.21
D6S460	-3.71	-1.69	-0.95	-0.49	-0.19	0.00	0.11	0.16	0.15
D6S462	-2.79	-0.75	-0.37	-0.18	-0.06	0.01	0.05	0.06	0.06
D6S434	-2.77	-1.21	-0.63	-0.29	-0.08	0.05	0.12	0.14	0.12
D6S287	2.01	2.07	2.02	1.88	1.69	1.45	1.17	0.86	0.54
D6S262	-2.19	-0.55	-0.10	0.12	0.24	0.29	0.29	0.26	0.20
D6S308	-0.28	-0.21	-0.16	-0.12	-0.08	-0.06	-0.04	-0.02	-0.01
D6S441	-1.20	-0.59	-0.30	-0.12	-0.03	0.02	0.03	0.02	-0.00
D6S1581	-0.51	-0.41	-0.31	-0.22	-0.16	-0.12	-0.09	-0.07	-0.05
D6S264	-0.67	-0.45	-0.24	-0.07	0.03	0.08	0.09	0.07	0.04
D6S446	-1.73	-0.56	-0.22	-0.04	0.06	0.11	0.12	0.10	0.07
D6S281	-1.85	-1.35	-0.99	-0.71	-0.48	-0.31	-0.18	-0.09	-0.04

Com a identificação deste *locus* potencial, a próxima etapa foi saturar a região candidata com marcadores microsatélite adicionais. Os experimentos de saturação do *locus* geraram os seguintes valores de *lod-score* de dois pontos (tabela 6):

Tabela 6- Valores de *lod-score* de dois pontos para marcadores saturando o *locus* candidato no cr 6.

Markers	Frações de recombinação								
	0.0	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40
D6S301	-0.03	0.09	0.17	0.23	0.25	0.26	0.25	0.21	0.16
D6S1580	-1.87	-1.08	-0.77	-0.51	-0.30	-0.14	-0.04	0.02	0.05
D6S268	-2.29	-1.03	-0.46	-0.11	0.11	0.24	0.29	0.29	0.24
D6S1635	-2.27	-1.12	-0.59	-0.27	-0.07	0.06	0.12	0.14	0.12
D6S474	-1.82	-0.49	-0.09	0.11	0.20	0.23	0.21	0.16	0.10
D6S433	-3.89	-2.21	-1.49	-1.0	-0.65	-0.39	-0.21	-0.08	-0.01
D6S287	2.01	2.07	2.02	1.88	1.69	1.45	1.17	0.86	0.54
D6S1657	-4.99	-2.79	-1.88	-1.30	-0.88	-0.58	-0.35	-0.19	-0.08
D6S1608	-0.75	-0.37	-0.21	-0.12	-0.06	-0.03	-0.01	-0.00	-0.00
D6S1639	-2.86	-0.88	-0.40	-0.12	0.06	0.16	0.21	0.22	0.18
D6S407	-1.24	-0.66	-0.34	-0.14	-0.01	0.07	0.12	0.13	0.12
D6S1620	-1.0	-0.81	-0.65	-0.51	-0.39	-0.29	-0.20	-0.13	-0.07
D6S1705	-2.24	-0.89	-0.28	0.03	0.21	0.29	0.32	0.29	0.23

Para confirmar os resultados, foram realizados cálculos de *lod-score* de múltiplos pontos. Como pode ser visualizado na figura abaixo, esta análise evidenciou ainda mais os valores negativos obtidos, excluindo definitivamente a possibilidade do *locus* em questão estar envolvido com EADAA na família MG.

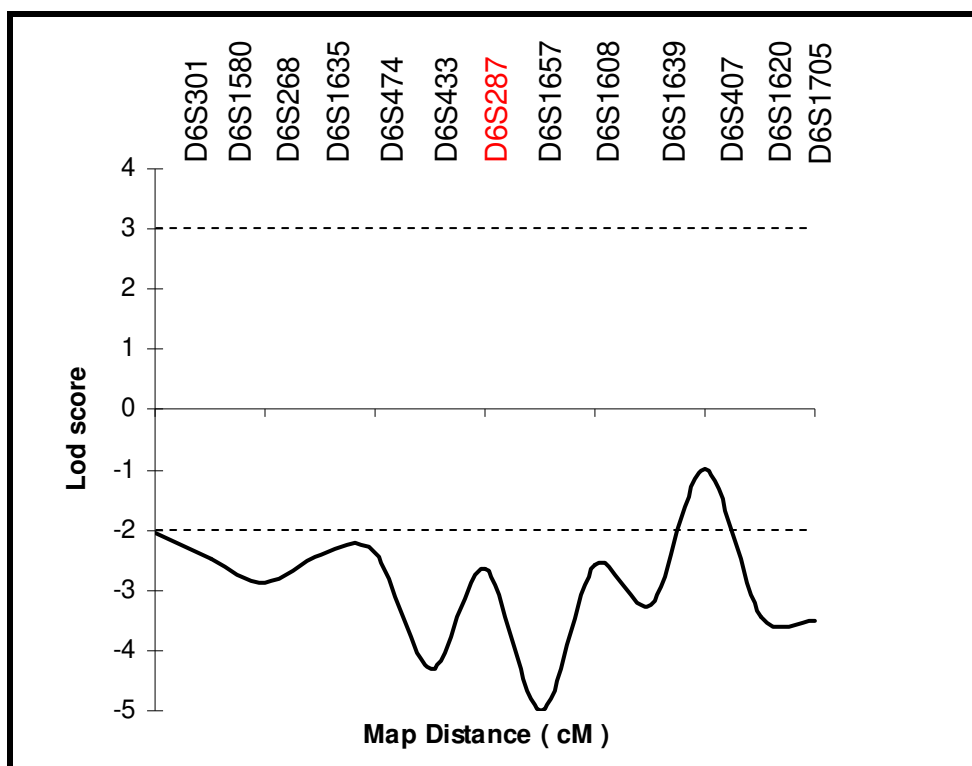


Figura 7. Gráfico de análise de *lod-score* de múltiplos pontos para marcadores saturando a região candidata no cromossomo 6. Observar que os valores negativos da análise de dois pontos se tornam ainda mais evidentes, incluindo o marcador D6S287 que havia gerado um *lod-score* positivo na análise de dois pontos.

4- DISCUSSÃO

1 - Distúrbios do Desenvolvimento Cortical

A triagem de mutações nos principais genes responsáveis pelos distúrbios de migração identificou alterações deletérias em 6,25% dos 32 indivíduos analisados, sendo uma delas presente em dois indivíduos aparentados com HNP. Já a pesquisa realizada para os distúrbios de organização cortical não detectou nenhuma alteração deletéria para os 76 indivíduos testados. Portanto, alterações deletérias foram identificadas em apenas 2,7% do total de pacientes pesquisados ($n=3/108$), no entanto se considerarmos a mutação encontrada nos dois indivíduos aparentados apenas como uma e descontarmos de nossa amostra um dos aparentados, nossa taxa de detecção de mutações será de 1,87% ($n=2/107$).

1.1- Distúrbios de migração neuronal

1.1.a- HNP e *FLNI*

Nossa análise para o gene *FLNI* compreendeu somente os seis primeiros exons codificantes, pois é esta região que codifica o importante domínio funcional protéico envolvido na ligação com a actina (Fox et al. 1998, Poussaint et al. 2000) e onde se encontra a grande maioria das mutações identificadas até o momento em pacientes com HNP (Fox et al., 1998, Sheen et al., 2001, Moro et al., 2002; Parrini et al., 2006). Além disso, o gene *FLNI* é muito extenso (48 exons) e rico em seqüências CGs fato que dificulta a síntese de *primers* e a amplificação dos produtos de PCR, tornando a padronização da técnica de PCR uma etapa dispendiosa em tempo.

A triagem de mutações em pacientes com HNP revelou uma substituição na posição C987G, isto é na terceira base do ultimo códon do exon 6 em dois pacientes aparentados (mãe e filha) com padrão clássico de HNP. Estudos anteriores demonstram que a taxa de detecção de mutações deletérias em casos familiares de HNP é de aproximadamente 100% (Parrini et al., 2006). Portanto, nossos achados confirmam a alta frequência de mutações deletérias em casos familiares de HNP clássico com um padrão de herança ligado ao cromossomo X.

Geralmente, famílias com padrões clássicos de neuroimagem de HNP e com um grande número de abortos do sexo masculino possuem mutações sem sentido que se localizam próximas ao domínio N-terminal da proteína (região de ligação com actina) ou de sítio de *splicing* que podem produzir um RNAm instável, truncando qualquer produto protéico que seja eventualmente traduzido (Sheen et al., 2001; Parrini et al., 2006).

No entanto a alteração encontrada por nosso grupo poderia levar à troca de um glutamato por um aspartato. Mutações de sentido trocado no gene *FLNI* têm sido descritas em homens e mulheres acometidos por síndromes clinicamente distintas da HNP e que afetam múltiplos órgãos como: as síndromes otopalatodigital tipo 1 e 2, displasia frontometáfiseal e síndrome de Melnick-Needles (Robertson et al., 2003). Ainda não se sabe ao certo qual a razão de diferenças tão grandes entre doenças causadas por mutações deletérias no mesmo gene, mas diferente do que ocorre com as mutações em pacientes com HNP, acredita-se que as mutações responsáveis por estas síndromes não resultam em instabilidade do RNAm, inserção de um códon de parada ou mudança de matriz de leitura da proteína e sim em manutenção do sentido de leitura, resultando em um mecanismo de ‘ganho de função’ da proteína. Uma proteína com função modificada poderia ser mais danosa do que a ausência total da mesma, prejudicando drasticamente o fenômeno da organogênese.

Além do mais, tem sido descrito que as mutações de sentido trocado levando às síndromes otopalatodigital 1 e 2 estão concentradas nos exons 3 e 5 e que na síndrome de Melnick-Needles estão localizadas principalmente no exon 22 (Robertson et al., 2003; Parrini et al., 2006). Estes exons codificam regiões como o domínio homólogo à calponina 2 (CHD2) e o domínio em bastão (*rod domain*). Mutações de sentido trocado nesses exons nunca foram descritas em pacientes com HNP. Desta forma podemos sugerir que estes exons codificariam regiões de extrema importância para o funcionamento correto da proteína e que o mecanismo de ganho de função nestas regiões levaria a fenótipos mais severos do que os produzidos por mutações de sentido trocado já descritas em outros exons para pacientes com HNP (Sheen et al., 2001; Moro et al., 2002)

A análise cuidadosa da mutação descrita por nosso grupo indica um segundo mecanismo patogênico, muito mais provável que a troca de aminoácidos sugerida acima. A substituição G987C altera um nucleotídeo adjacente ao sítio doador de *splicing* GT. Apesar

de serem cruciais, os dinucleotídeos GT e AG não são suficientes para realizar o fenômeno de *splicing* sozinhos, necessitando das seqüências adjacentes que também possuem um alto grau de conservação entre genes e espécies. Desta forma a perda do sítio doador de *splicing* do exon 6 poderia fazer com que sítios de *splicing* crípticos fossem ativados levando a um processamento errôneo do RNAm e à produção de uma proteína *FLNI* truncada ou sem nenhuma função residual (perda de função).

Os estudos funcionais realizados por nosso grupo demonstraram claramente a manutenção do sexto intron do gene *FLNI* no produto de transcrição nos pacientes portadores da alteração C987G, resultando em uma mudança de matriz de leitura e em um códon de parada prematuro. Desta forma, nossos resultados confirmam que o mecanismo molecular das mutações deletérias associadas com formas clássicas de HNP familiar é o de perda de função.

No entanto, uma atenta avaliação das duas pacientes (mãe e filha) mostrou uma grande variação na manifestação dos sintomas clínicos. A mãe, apesar de possuir padrão de neuroimagem idêntico ao da filha, não tem retardo mental e suas crises são controladas por DAE, a filha, por sua vez apresenta retardo mental moderado e crises epiléticas refratárias ao tratamento por DAE. A análise comparativa realizada através de PCR em Tempo Real apontou uma maior expressão do alelo mutado na filha, quando comparada à mãe. Complementar a este dado, os testes de inativação preferencial do cromossomo X apontaram um resultado positivo na filha. Portanto, nossos dados sugerem uma explicação molecular para tal diferença nos quadros fenotípicos, resultado de um mosaicismo nas pacientes, causado pela metilação desigual do cromossomo X. É importante citar que todas as análises foram feitas com material genético extraído de tecido sangüíneo, e não de tecido do sistema nervoso central dos pacientes. A obtenção desse tecido, no momento, é impraticável e seria a forma ideal de prosseguir com os estudos funcionais destes pacientes.

Nossa amostra de pacientes também é composta por mais dois indivíduos com o padrão clássico de HNP, no entanto ambos são casos esporádicos (sem histórico familiar) e um deles é do sexo masculino. Apesar de não termos analisado os 48 exons do gene *FLNI* a chance de encontrarmos alterações deletérias nestes pacientes é bem pequena, já que a prevalência de mutações deletérias para casos esporádicos de HNP clássica é de 26%, além

de haver uma significativo desvio de frequência de mutações a favor do sexo feminino (93% de mulheres contra 7% de homens) (Parrini et al., 2006). O mesmo raciocínio pode ser aplicado aos nossos demais casos com neuroimagem atípica para HNP, já que triagens de mutações em *FLNI* realizadas anteriormente foram negativas para alterações deletérias neste gene em pacientes com padrões atípicos de neuroimagem (Sheen et al., 2001; Parrini et al., 2006). Assim acreditamos que, mesmo sem excluir completamente toda a região codificando do gene *FLNI*, nossas chances de encontrar mutações deletériaa nos demais pacientes de nossa amostra são muito pequenas.

1.1.b- *LIS1*, *DCX* e espectro LIS/HSB

Os dados de frequência de mutações deletérias em pacientes com o espectro LIS-HSB são controversos. Enquanto alguns autores sugerem que cerca de 90% dos casos possuem mutação identificada (Keerjan e Gleeson, 2007), outros descrevendo uma análise nos genes *LIS1* e *DCX* em cerca de 200 pacientes com o espectro LIS-HSB, encontraram mutação em apenas 40% dos pacientes (Beldjord e Chelly, dados não publicados).

Foi identificado apenas um indivíduo com mutação deletéria em 19 analisados em nosso grupo de pacientes com LIS-HSB. Este paciente possui um padrão da malformação claramente ântero-posterior seguindo, portanto as características encontradas em indivíduos com mutações deletérias no gene *LIS1*. A análise por DHPLC e o sequenciamento automático revelou uma mutação de sentido trocado A1385C que altera uma histidina para uma prolina no aminoácido 277 (H277P) do 5º domínio WD-40 da proteína.

Os domínios WD são encontrados em muitas proteínas de várias espécies e são compostos por pelo menos quatro repetições começando com glicina/histidina na região N-terminal e terminando com triptofano/aspartato (WD) na região C-terminal. Cada repetição é composta por quatro fitas (a, b, c, d) que variam entre 31 e 60 aminoácidos, ficando a fita a e d próximas ao poro central e superfície externa da proteína (Smith et al., 1999). O gene *LIS1* possui sete repetições WD que conferem à proteína uma correta capacidade de dobra e

estrutura tridimensional estável (Reiner et al., 1993; Sapir et al., 1999). A mutação H277P identificada pelo nosso grupo, altera um aminoácido altamente conservado no segundo domínio WD. Como consequência é provável que ocorram mudanças na conformação da proteína LIS1 mutante que prejudicariam a sua interação com proteínas como NUDE e NUDEL (Feng et al., 2000; Sasaki et al., 2000), fatores importantes no desenvolvimento do sistema nervoso.

Até o momento foram descritas 61 mutações intragênicas no gene *LGII* (Cardoso et al., 2002; Uyanik et al., 2007). Deste total, apenas 11 são mutações de sentido trocado, incluindo a identificada por nosso grupo, desta forma, mutações de sentido trocado em *LIS1* são eventos raros.

Tem sido proposto que as características de neuroimagem de pacientes com mutações deletérias de sentido trocado no gene *LIS1* são geralmente mais variáveis e leves do que as de pacientes com outros tipos de mutação, apresentando padrões de malformação entre LIS 4 e 6 (Cardoso et al., 2000; Leventer et al., 2001). Além do mais, Leventer et al. (2001) sugeriu que mutações de sentido trocado em regiões do gene *LIS1* codificando domínios WD localizados próximos a região 3' terminal da proteína levariam a fenótipos menos severos, consequência de uma proteína LIS1 mutante com função residual.

Leventer et al. (2001) baseou sua hipótese em um de seus pacientes estudados. O indivíduo em questão apresenta paquigiria generalizada (grau 4a) e possui uma mutação que substitui um aspartato localizado no 5º domínio WD por uma histidina (A317H). Nossos dados refutam esta hipótese, já que a mutação descrita por nosso grupo se encontra localizada no mesmo domínio e resulta em um grau de malformação muito mais severo do que se esperaria, caso a hipótese proposta fosse realmente válida. Além do mais, recentemente Uyanick et al, (2007) realizando um estudo em 21 pacientes com LIS, identificou diversos tipos de mutações deletérias intragênicas não encontrando nenhum tipo de correlação entre a natureza e localização da mesma com o grau de malformação cerebral. Uma possível explicação para esta variação fenotípica é a presença de mosaïcismo somático, já que o mesmo foi descrito em um paciente com HSB e mutação de sentido trocado em *LIS1* (Pilz et al., 1999).

Neste ponto é importante discutir uma possível limitação da metodologia empregada para o estudo de mutações no gene *LIS1*. A baixa porcentagem de mutações deletérias encontradas em nossa amostra pode ser explicada pela técnica inicial de pesquisa, pois como já citado anteriormente uma grande parte dos casos de LIS se deve a grandes deleções detectadas por citogenética de alta resolução e *fluorescence in situ hybridization* (FISH) (Cardoso et al., 2000; Piltz et al., 1998), eventos mutacionais que não são detectados pela técnica de DHPLC.

Outro importante dado a ser discutido é a ausência de mutações deletérias no gene *DCX* em nossa amostra de pacientes. Geralmente, mutações deletérias na região codificante do gene *DCX* são responsáveis por 100% dos casos familiares de LIS-HSB ligadas ao cromossomo X (Matsumoto et al., 2001) e de 38 a 85% dos casos esporádicos de HSB em mulheres (Des Portes et al., 1998; Gleeson et al., 1999b; Matsumoto et al., 2001; Sicca et al., 2003). Todas as mulheres com mutações no gene *DCX* tem HSB e paquigiria predominantemente em regiões anteriores, no entanto cerca de 25% das mulheres com um padrão de banda anterior e todas aquelas com bandas localizadas em regiões posteriores ou bandas unilaterais não apresentam mutações em *DCX*, sugerindo que outros *loci* ou mosaïcismo somático podem ser responsáveis por estes diferentes fenótipos (Gleeson et al., 2000a; Gleeson et al., 2000b). Mutações de linhagem germinativa materna ou mosaïcismo podem ocorrer em 10% dos casos de HSB e lissencefalia ligada ao cromossomo X (Gleeson et al., 2000b). Apesar de raro, também já foram identificados homens com HSB e mutações em *DCX* e *LIS1* (Piltz et al., 1999).

Desta forma, nós podemos atribuir a ausência de mutações deletérias no gene *DCX* em nossos pacientes com o espectro LIS-HSB aos seguintes fatores: 1-) A maioria de nossos pacientes portadores do espectro são esporádicos e nenhum deles mostra um padrão familiar claro de ligação ao cromossomo X, 2-) foram testados apenas nove pacientes com HSB, uma amostra muito pequena quando comparada aos números descritos na literatura, 3-) nossa estríngência quanto às características de neuroimagem foi baixa, incluindo indivíduos com características atípicas, 4-) a presença de homens com HSB em nossa amostra cuja frequência de mutações deletérias em *DCX* é rara (D'agostino et al., 2002) e

5-) pode haver a presença de mosaicismos somáticos nos indivíduos de nossa amostra que não foi detectada em nossas análises por DHPLC.

Permanece aberta ainda a questão se outros tipos de mutações no gene *DCX*, localizadas possivelmente na região 3'UTR, nas seqüências promotoras ou dentro de regiões intrônicas poderiam estar presentes nesses pacientes.

Existe ainda a possibilidade da presença de heterogeneidade não alélica, ou seja, de que outros genes estejam envolvidos na gênese de LIS-HSB em nossos pacientes. Bons candidatos seriam alguns genes identificados em camundongos, e ainda não testados em humanos, que estão relacionados com malformações corticais similares ao fenótipo *reeler*, um modelo animal de lissencefalia. Apesar de o gene *REELN* humano ter sido clonado e não estar relacionado com lissencefalia clássica, genes que participam das mesmas vias bioquímicas como *DAB1*, *VLDR* e *APOE2* (Olson et al., 2002) e que já tem comprovado sua ligação com fenótipos semelhantes ao *reeler* em camundongos *knock-out* são candidatos potenciais. Recentemente foram identificadas mutações deletérias no gene *TUBA1A* em um grupo de pacientes com um grande espectro de malformações associadas a LIS (Poirier et al. 2007). Todos estes genes devem ser testados para que se confirme ou se exclua a participação dos mesmos na etiologia da LIS clássica em pacientes sem alterações deletérias nos genes *DCX* e *LIS1*. Portanto, com a amostra coletada de pacientes que já possuímos, podemos ampliar nossos estudos para incluir novos genes candidatos recém identificados.

1.2- Distúrbios de organização cortical

Esquizencefalia, Polimicrogria e *EMX2*

O achado de mutações no gene *EMX2* em dois irmãos e a ausência do mesmo defeito nos seus pais neurologicamente normais fornece evidências de que, pelo menos em alguns casos, as esquizencefalias são determinadas por mutações deletérias em genes *homeobox* (Granata et al., 1997). No entanto, a hipótese genética não substitui a possibilidade de mecanismos patogênicos alternativos como lesões encefaloclasticas

adquiridas resultantes de infartos locais no território das principais artérias cerebrais (Sarnat et al., 1992).

É também importante ressaltar que a grande maioria das mutações descritas até o momento estão localizadas dentro do domínio *homeobox* ou em regiões próximas do início do exon 2 como substituições na primeira base do exon 2 ou no sítio de *splicing* 3' do intron 1 (Brunelli et al., 1996; Granata et al., 1997; Faiella et al., 1997). Grande parte destas mutações foram detectadas utilizando-se os pares de *primers* que amplificam o exon 2 e parte do intron 1 (Brunelli et al., 1996), justamente o mesmo par para o qual identificamos alterações no padrão de eluição de DHPLC.

O sequenciamento dos padrões de eluição alterados identificou a substituição C796A no domínio *homeobox* do gene *EMX2* em quatro pacientes com esquizencefalia. Esta alteração não leva à troca de resíduos ou cria um códon de parada, mantendo o aminoácido arginina intacto. Surpreendentemente esta mesma alteração foi detectada por Brunelli et al. (1996) e foi considerada como uma mutação sinonímia já que não foi encontrada no grupo controle testado.

Apesar de não terem pesquisado os efeitos transcricionais e pós-transcricionais destas mutações, Brunelli et al. (1996) propuseram que estas alterações podiam ser patogênicas, já que haviam sido descritos casos da Síndrome de Crouzon devido a mutações sinonímias no gene *FGFR2* (Li et al., 1995). Nestes casos o mecanismo de patogenicidade se daria a partir da criação de sítios de *splicing* alternativos que levariam a um processamento errôneo do RNAm (Richard et al., 1995).

No entanto um achado do grupo de Brunelli et al. (1996) ficou sem uma explicação clara: as mães dos pacientes que portavam a substituição C796A também possuíam a mesma alteração, mas sem qualquer malformação cortical associada. Nosso achado da mesma substituição em quatro indivíduos de um grupo controle composto de 50 indivíduos (8% do total) esclarece esta contradição, demonstrando que a substituição C796A é provavelmente um polimorfismo neutro.

A razão da ausência do polimorfismo nos controles do grupo de Brunelli et al., (1996) pode ser explicada pela composição genética da população italiana, muito mais homogênea que a da população brasileira que possui um alto grau de miscigenação e, portanto, uma composição genética mais heterogênea.

Portanto, permanece ainda controversa a participação deste gene na etiologia da esquizencefalia já que a literatura especializada é muito escassa em relação a estudos genéticos realizados em indivíduos portando este tipo de malformação. Dobyns (dados não publicados) relatou que de um grupo composto por 15 pacientes portadores de esquizencefalia e analisados geneticamente para o gene *EMX2*, nenhum se mostrou portador de mutação deletéria no mesmo, somado a este relato, um trabalho recente pesquisando mutações no gene *EMX2* também não encontrou nenhuma alteração deletéria em 84 pacientes com esquizencefalia (Tietjen et al., 2007).

Novas regiões candidatas têm sido descritas, em trabalho recente Tietjen e colaboradores por meio de estudos de ligação, identificaram duas regiões para esquizencefalia em uma família com três indivíduos afetados. Uma no cromossomo 8q24.22-24.3, assumindo um modelo de herança recessivo e uma outra no cromossomo 5q21.3-23.2, assumindo modelo de herança dominante (Tietjen, et al., 2005). Estes dados demonstram uma possível heterogeneidade genética na etiologia molecular das esquizencefalias, embora ainda não confirmada diretamente.

Por ser sugerido que tanto a esquizencefalia como a polimicrogiria façam parte de um mesmo espectro de malformações (Jansen e Andermann, 2005), realizamos também a pesquisa de mutações em *EMX2* em um grupo de pacientes com polimicrogiria, composto de casos esporádicos e familiares. Nossa triagem de mutações não identificou nenhuma alteração nos pacientes portadores desta malformação, mostrando claramente que este gene não está envolvido na etiologia de polimicrogiria, pelo menos em nossa amostra de pacientes. Recentemente, um gene para polimicrogiria foi identificado, o gene *GPR56*, codifica um receptor de proteína G e mutações deletérias foram identificadas em 12 famílias de origem canadense (Piao et al., 2004). Este gene está envolvido com uma forma fronto parietal bilateral, diferente da grande maioria dos pacientes por nós analisada que possui uma forma perisylviana bilateral. No entanto, seria interessante testar este gene para

outras formas de polimicrogiria, no intuito de verificar se existe heterogeneidade fenotípica em pacientes portadores de mutações deletérias em um mesmo gene.

É de nossa opinião que a origem da maioria dos casos por nós analisados ocorra devido a um insulto ambiental, como sangramentos durante o período de gestação, ou a mutações em outros genes responsáveis pelo desenvolvimento do prosencéfalo. O histórico de eventos pré-natais é especialmente notável nos pacientes com esquizencefalia, uma pesquisa detalhada dos eventos gestacionais deve ser realizada para confirmar esta hipótese.

1.3- Variantes submicroscópicas e distúrbios do desenvolvimento cortical

Os SNPs costumam ser considerados como a principal fonte de variação no genoma humano, porém com o avanço das tecnologias de triagem do genoma foi descoberto um grupo de alterações estruturais com tamanho variável entre 1kb e 3Mb. Estas variantes são alterações submicroscópicas não detectadas por métodos de citogenética clássica ou por sequenciamento tradicional (Feuk et al., 2006). Estas alterações estruturais têm ganhando ênfase atualmente nas pesquisas devido à sua grande frequência no genoma humano e sua possível correlação com distúrbios do sistema nervoso (Lee et al., 2006). Desse modo futuras análises das variações estruturais nos pacientes com DDC serão de fundamental importância nos casos negativos para alterações deletérias pontuais e para uma melhor compreensão da influência da dosagem gênica na variação fenotípica destes pacientes.

2- Epilepsia Autossômica Dominante com Auras Auditivas (EADAA)

Dentre todas as famílias com ELT identificadas em nosso serviço ambulatorial foram identificadas quatro com quadro clínico compatível com EADAA: famílias S, MG, N e B. Apenas as famílias S e MG foram suficientemente informativas para estudos de ligação genética, ou seja, possuíam várias gerações de indivíduos afetados, além de fornecerem um número considerável de amostras de DNA para estudos de ligação.

A primeira família analisada pelo nosso grupo foi o pedigree S. Estudos de ligação foram realizados com marcadores microsátélites saturando o *locus* candidato para o cromossomo 10, mesma região que havia sido mapeada anteriormente por outros grupos (Ottman et al., 1995; Pozza et al. 1999). Valores de *lod-score* significativamente positivos para os marcadores microsátélites testados nos levaram a investir no sequenciamento do gene *LGII*, localizado nesta região genômica e no qual haviam sido descrito mutações levando à EADAA (Kalachikov et al., 2002). O sequenciamento de indivíduos afetados desta família revelou uma mutação deletéria IVS7-2A>G que provavelmente altera o sítio de *splicing* deste intron. A mutação não estava presente em nenhum dos parentes não afetados, assim como em um grupo de controles normais. Estudos de RM em pacientes desta família demonstraram malformações no lobo temporal esquerdo, descritas como um alargamento do lóbulo acompanhado algumas vezes de uma protusão do parênquima cerebral, lembrando a aparência de encefalocele. Esta foi a primeira descrição de um possível substrato anatômico-patológico para este subtipo de ELT. Recentemente outros autores têm confirmado a lateralidade para EADAA, já que descrições de anormalidades no eletro-encefalograma, potencial evocado e alta anisotropia têm sido detectados no lobo temporal esquerdo de pacientes com mutações deletérias em *LGII* (Brodtkorb et al., 2005; Gu et al., 2005, Tessa et al., 2007). No entanto, serão necessários estudos neuroanatômicos e histológicos mais profundos para desvendar esta intrigante lateralização esquerda observada na EADAA.

Seguindo os estudos genéticos, experimentos de análise de ligação genética para o *locus* no cr 10 foram realizados para a família MG. Os valores de *lod-score* para os marcadores utilizados foram significativamente negativos, excluindo o *locus* como potencial candidato. Para confirmar o resultado, três indivíduos desta família com clínica de EADAA tiveram a região codificante do gene *LGII* seqüenciada, sendo que nenhuma alteração no mesmo foi encontrada. Além do mais, o gene *LGII*, foi analisado diretamente por DHPLC e sequenciamento automático nas duas outras pequenas famílias, N e B, não sendo detectado nenhum padrão alterado. Nosso resultado demonstra que existe uma heterogeneidade genética nesta síndrome, estando de acordo e fortalecendo ainda mais relatos de trabalhos anteriores (Bisulli et al., 2002; Michelucci et al., 2003; Ottman et al., 2004). O próximo passo lógico foi analisar a família de genes *LGI* (*LGI2*, *LGI3*, *LGI4*) e o

gene *MASS1*. A escolha destes genes se deu pelos seguintes motivos: 1) por serem os únicos a possuírem o domínio recém identificado EPTP (Scheel et al., 2002), fato que sugere participação em funções biológicas semelhantes, 2) uma forte associação entre *LGI4* e epilepsia de ausência da adolescência foi identificada (Gu et al. 2004), 3) um camundongo *knock-out* para *lgi4* foi descrito apresentando problemas de hipomielinização no sistema nervoso periférico (Bermingham et al., 2004), 4) mutações deletérias em *MASS1* são responsáveis por uma forma audiogênica de epilepsia em ratos (Skradski et al., 2001) e 5) foram descritas mutações deletérias em *MASS1* em uma família com crises febris (Nakayama et al., 2002). Desta forma estes genes seriam candidatos potenciais a estarem envolvidos na etiologia da EADAA.

Estudos de ligação foram realizados com marcadores flanqueando o *locus* dos genes candidatos para a família MG, enquanto para as famílias menores estes mesmos genes foram analisados diretamente por DHPLC e sequenciamento. Ambas as análises demonstram que os genes em questão não estão envolvidos com a etiologia de EADAA, pelo menos nas famílias por nós estudadas. Para a família MG os marcadores mostraram valores de *lod-score* negativos, enquanto o sequenciamento dos genes identificou apenas alterações neutras. Para confirmar o resultado do estudo de ligação realizado na família MG, três indivíduos afetados também foram analisados por sequenciamento que detectou apenas variações não deletérias, presentes em grupo controle e/ou já descritas como SNPs neutros no banco de dados do NCBI.

Alguns dados relevantes em relação às características clínicas destas famílias podem ser apontados. A família MG possui um grande número de indivíduos afetados com auras do tipo *dejà-vù* e quase nenhuma generalização das crises, enquanto os exames de RM desta família, assim como das famílias N e B não apontam para nenhuma anormalidade cortical. Estes resultados apontam para uma maior heterogeneidade clínica na EADAA do que havia sido sugerido anteriormente (Ottman et al. 2004), fato que pode ser reflexo direto da heterogeneidade genética. Além do mais acreditamos que malformações do lobo temporal esquerdo podem ser um possível marcador biológico para EADAA com mutações deletérias no gene *LGII*, no entanto estudos mais detalhados de neuroimagem, incluindo as famílias descritas por outros grupos, devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

Recentemente, foram descritos dois genes cujas proteínas interagem com LGI1, o *Kv1.1* e *ADAM22* (Schulte et al., 2006; Fukata et al., 2006). Ambos os genes estão envolvidos com fenótipos associados com crises epiléticas, tanto em humanos como em camundongos, tornando-os bons candidatos para futuros experimentos de triagem de mutação e análise de ligação. Chabrol et al. (2007) realizando triagem de mutações em *ADAM22* em famílias negativas para mutações em *LGII*, não identificou nenhuma alteração deletéria neste gene que pudesse estar levando a EADAA nas famílias estudadas por este grupo.

Levando em conta os resultados negativos para pesquisa dos genes candidatos escolhidos realizada por nosso grupo, assim como os resultados de Chabrol et al., (2007) e o alto poder estatístico da família MG, passamos então para a etapa de análise de ligação genômica randômica, perfazendo todo o genoma humano, com exceção do cromossomo X, já que a família analisada possui um claro padrão de herança autossômico dominante.

2.1- Análise de ligação genômica randômica

Todo o genoma humano foi praticamente genotipado (**Anexo IV**). Uma reavaliação fenotípica para a família MG foi realizada, esclarecendo as condições de indivíduos considerados como possivelmente afetados e de outros com clínica duvidosa. Quando as dúvidas sobre a clínica dos pacientes permaneciam, os mesmos eram excluídos da análise genômica. Pudemos também identificar fenocópias que foram retirados da amostra, já que a presença dos mesmos prejudicaria o cálculo dos *lod-scores*. A eliminação de alguns indivíduos não diminuiu significativamente o poder estatístico de nossa família. Além do mais, pudemos eliminar as classes de probabilidade por idade, já que no momento em que foi realizada a primeira análise clínica da família vários indivíduos não haviam atingido a idade de manifestação das crises. Desta forma, utilizamos para a análise de ligação apenas duas classes, afetados e não afetados. Foram considerados como afetados os indivíduos que relataram mais de um episódio, associado ou não, de aura auditiva, *dejà-vù*, CPS e CTCG. A alteração destes parâmetros tornou os cálculos estatísticos mais simples e diretos.

Os cálculos de *lod-scores* apontaram uma região candidata em d6s287 localizada no cr6q22 ($Z_{\max}=2.07$, $\theta=0.05$). Próximo a este marcador existem genes cujas proteínas não foram caracterizadas (ex: C6orf60), outros envolvidos com o metabolismo de oligossacarídeos de membrana (*MAN1A1*) e histonas (*ASF1A*).

A saturação da região com marcadores microsatélites, no entanto, não confirmou a mesma como candidata potencial a conter o gene principal para EADAA nesta família. O fato de não termos detectado ligação nesta família reforça mais uma vez a importância da caracterização fenotípica bem determinada dos pacientes. Embora a família analisada seja grande e informativa, com vários indivíduos afetados segregando EADAA, o fenótipo desta família é complexo se, por exemplo, comparado ao da família portadora de mutação no gene *LGII*. Os sinais clínicos muito sutis das auras citadas pelos pacientes, associado a um quadro de cefaléia familiar podem ter influenciado nossa análise clínica, além do mais, devido à manifestação e evolução benigna deste tipo de epilepsia, talvez alguns indivíduos considerados como não afetados, na realidade tenham crises que passam despercebidas. Os mesmos problemas com o estabelecimento dos fenótipos foram encontrados em um trabalho recente, desenvolvido em nosso laboratório, no qual foi identificada ligação genética no cr18q para uma família com ELT mesial. No entanto o mesmo estudo também descreveu uma família com ELT mesial cuja ligação genética não foi identificada por análise de ligação genômica randômica (Morelli, 2006). Também não podemos excluir a hipótese de que genes modificadores estejam sendo introduzidos na família tanto por linhagem paterna como materna, através de fenocópias não detectadas ou familiares com histórico de epilepsia não identificada. Estes genes de predisposição tornariam os cálculos de *lod-score* e a interpretação dos mesmos muito complexos.

Outro fator que pode ter influenciado nossos resultados, foi a escolha do painel genômico de estudo de ligação. O *kit* utilizado foi o da Applied Biosystem, apesar de ser um painel eficiente em relação ao sucesso da amplificação de microsatélites, possui alguns marcadores com um valor de PIC (*polymorphism information content*) abaixo de 0.75. O PIC é um fator muito importante para estudos de ligação, já que mede o número de alelos que um determinado marcador possui, assim como a frequência dos mesmos na população. Este valor pode variar de população para população, revelando uma limitação do painel

escolhido que foi montado tendo como base as frequências alélicas de populações com estrutura genética diferente da brasileira.

Um novo refinamento na análise clínica dos indivíduos da família MG será necessário assim como a escolha de microsátélites com maior valor de PIC nos cromossomos nos quais houve número considerável de marcadores não informativos. Estas duas estratégias irão assegurar a identificação de locus responsável por EADAA nesta família.

5- CONCLUSÃO

Artigo I:

- Foram encontradas mutações em três pacientes em um grupo de 32 pacientes com distúrbios de migração neuronal,
- A maioria das alterações encontradas nos genes trata-se de variações neutras,
- Mutações de sentido trocado no gene *LIS1* são eventos raros em pacientes com o espectro LIS-HSB,
- A correlação entre classe de mutação, localização do domínio WD e gravidade de LIS não é válida,
- Mosaïcismo, mutações em regiões não codificantes e outros exons, grandes deleções e rearranjos, além da presença de casos atípicos, são fatores que podem estar influenciando na baixa frequência de mutações encontradas em pacientes com HNP e espectro LIS-HSB.

Artigo II:

- O mecanismo envolvido na mutação G987C no gene *FLN1* é a destruição do sítio doador de *splicing* do íntron 6, levando à manutenção do intron 6 durante o processamento do RNAm e à conseqüente criação de um códon de parada prematuro, resultando na síntese de uma proteína truncada,
- As diferenças clínicas encontradas nas duas pacientes que apresentam a mesma mutação em *FLN1* (mãe e filha) podem em parte, ser explicadas por alterações no mecanismo de inativação randômica do cromossomo X.

Artigo III:

- O gene *EMX2* não está envolvido na etiologia da esquizencefalia e polimicrogiria em nossa amostra de pacientes, portanto questionamos o papel deste gene na determinação destes DDC.

Artigo IV:

- A mutação IVS7(-2)A>G no gene *LGII* é a causa de EADAA na família S,
- A descrição, pela primeira vez, de uma possível base etiológica para as crises: presença de malformações corticais no lobo temporal esquerdo de pacientes com EADAA.

Artigo V:

- A confirmação de heterogeneidade genética na EADAA,
- Os genes da família *LGI*, assim como o domínio EPTP do gene *MASS1* não estão envolvidos com a etiologia da EADAA nas famílias MG, N e B,
- Presença de heterogeneidade clínica na EADAA, principalmente na família MG, já que um grande número de pacientes apresentou a ocorrência de *dejà-vù* e rara generalização secundária,
- Ainda não é possível correlacionar a heterogeneidade fenotípica com a presença/ausência de mutações no gene *LGII*,
- A malformação do lobo temporal esquerdo surge como um possível marcador para mutações em *LGII*,
- São necessários maiores estudos de neuroimagem na EADAA.

Análise de Ligação:

- Uma região candidata para o novo *locus* responsável por EADAA foi identificada em 6q22 na família MG, no entanto estudos com marcadores microsatélites saturando a região não confirmaram este achado.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aicardi J. The agyria-pachygyria complex: a spectrum of cortical malformations. *Brain Dev* 1991; 13: 1-8.

Allen KM, Walsh AC. Genes that regulate neuronal migration in the cerebral cortex. *Epilepsy Res* 1999; 36: 143-56.

Angevine JB, Sidman RL. Autoradiographic study of the cell migration during histogenesis of the cerebral cortex in the mouse. *Nature* 1961; 192: 766-8.

Barkovich AJ, Kjos BO. Squizencephaly: correlation of clinical findings with MR characteristics. *Am J Neuroradiol* 1992; 13: 85-94.

Barkovich AJ, Guerrini R, Battaglia G, Kalifa G, N'Guyen T, Parmeggiani A, et al. Band heterotopia: correlation of outcome with magnetic resonance imaging parameters. *Ann Neurol* 1994; 36: 609-17.

Barkovich AJ. Malformations of neocortical development: magnetic resonance imaging correlates. *Curr Opin Neurol* 1996; 9: 118-21.

Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Jackson GD, Guerrini R, Dobyns WB. Classification system for malformations of cortical development-update 2001. *Neurology* 2001; 57: 2168-78.

Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Jackson GD, Guerrini R, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. *Neurology* 2005; 65: 1873-7

Berkovic SF, Izzillo P, McMahon JM, Harkin LA, McIntosh AM, et al. *LGII* mutations in temporal lobe epilepsies. *Neurology* 2004; 64: 1115-9.

Bermingham JR, Shearin H, Pennington J, O'Moore J, Jaegle M, Driejen S, et al. The claw paw mutations reveal a role for *Lgi4* in peripheral nerve development. *Nat Neurosci* 2006; 9: 76-84.

Bisulli F, Tinuper P, Marini C, Avoni P, Carraro G, Nobile C, et al. Partial epilepsy with prominent auditory symptoms not linked to chromosome 10q. *Epileptic Disorders* 2002; 4 (3): 183-8.

Boycott KM, Flavelle S, Bureau A, Glass HC, Fujiwara TM, Wirrel E, et al. Homozygous deletion of the very low density lipoprotein receptor gene causes autosomal recessive cerebellar hypoplasia with cerebral gyral simplification. *Am J Hum Genet* 200; 577:477–83

Brodtkorb E, Gu W, Nakken KO, Fischer C, Steinlein OK. Familial temporal epilepsy with aphasic seizures and linkage to chromosome 10q22-q24. *Epilepsia* 2002; 43(3): 228-35.

Brodtkorb E, Steinlein OK, Sand T. Asymmetry of Long-latency Auditory evoked potentials in *LGII*-related Autosomal Dominant Lateral Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsia* 2005; 46: 1692-4.

Brunelli S, Faiella A, Capra V, Nigro V, Simeone A, Cama A, et al. Germline mutation in the homeobox gene *EMX2* in patients with severe schizencephaly. *Nature Genet* 1996; 12: 94-6.

Bruton CJ. The neuropathology of temporal lobe epilepsy. Oxford: Oxford University Press, 1988.

Cardoso C, Leventer RJ, Matsumoto N, Kuc JA, Ramocki MB, Mewborn SK, et al. The location and type of mutation predict malformation severity in isolated lissencephaly caused by abnormalities within the *LIS1* gene. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 3019-28.

Cardoso C, Leventer RJ, Dowling JJ, Ward HL, Chung J, Petras KS, et al. Clinical and molecular basis of classical lissencephaly: mutations in the *LIS1* gene (*PAFAH1B1*). *Hum Mutation* 2002; 19: 4-15.

Cecchi C, Boncinelli E. Emx homeogenes and mouse brain development. *Trends Neurosci* 2000; 23: 347-52.

Chabrol E, Gourfinkel-An I, Scheffer IE, Picard F, Couarch P, Berkovic SF, et al.. Absence of mutations in the *LGII* receptor *ADAM22* gene in autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Epilepsy Research* 2007; 76: 41-8.

Chernova OB, Somerville RP, Cowell JK. A novel gene, *LGII*, from 10q24 is rearranged and downregulated in malignant brain tumors. *Oncogene* 1998; 17: 2873-81.

Chong SS, Pack SD, Roschke AV, Tanigami A, Carrozzo R, Smith AC, et al. A revision of the lissencephaly and Miller-Dieker syndrome critical regions in chromosome 17p13.3. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 147-55.

D'Agostino MD, Bernasconi A, Das D, Bastos A, Valerio RM, Palmini A, et al. Subcortical band heterotopia (SBH) in males: clinical, imaging and genetic findings in comparison with females. *Brain* 2002; 125: 2507-22.

D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curren TA, et al. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 1995; 374: 719-23.

de Lanerolle NC, Lee TS. New facets of the neuropathology and molecular profile of human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy and Behavior* 2005; 7: 190-203.

Des Portes V, Francis F, Pinard JM, Desguerre I, Moutard ML, Snoek I, et al. Doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1063-70.

Dobyns WB, Curry CJ, Hoyme HE, Turlington L, Ledbetter DH. Clinical and molecular diagnosis of Miller-Dieker syndrome. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 584-94.

Dobyns WB, Elias ER, Newlin AC, Pagon RA, Ledbetter DH. Causal heterogeneity in isolated lissencephaly. *Neurology* 1992; 42: 1375-88.

Dobyns WB, Truwit CL, Ross ME, Matsumoto N, Pilz DT, Ledbetter DH. Differences in the gyral pattern distinguish chromosome 17-linked and X-linked lissencephaly. *Neurology* 1999; 53: 270-7.

Dubeau F, et al. Periventricular nodular heterotopia: clinical manifestations and strategies for surgical treatment of intractable seizures. *Epilepsia* 1993; 34: 127.

Dubeau F, Tampieri D, Lee N, Andermann E, Carpenter S, Leblanc R., et al. Periventricular and subcortical nodular heterotopia. A study of 33 patients. *Brain* 1995; 118: 1273-87.

Eksioglu YZ, Scheffer IE, Cardenas P, Knoll J, DiMario F, Ramsby G, et al. Periventricular heterotopia: an X-linked dominant epilepsy locus causing aberrant cerebral cortical development. *Neuron* 1996; 16: 77-87.

Faiella A, Brunelli S, Granata T, D'Incerti L, Cardini R, Lenti C, et al. A number of schizencephalic patients including 2 brothers are heterozygous for germline mutations in the homeobox gene *EMX2*. *Eur J Hum Genet* 1997; 5: 186-90.

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

Feng Y, Olson EC, Stukenberg PT, Flanagan LA, Kirschner MW, Walsh CA. *LIS1* regulates CNS lamination by interaction with mNudE, a central component of the centrosome. *Neuron* 2000; 28: 665-79.

Ferland RJ, Gaitanis JN, Apse K, Tantravahi U, Walsh CA, Sheen VL. Periventricular nodular heterotopia and Williams syndrome. *Am J Med Genet A* 2006; 140: 1305-11.

Fertig E, Lincoln A, Martinuzzi A, Mattson RH, Hisama FM. Novel *LGII* mutation in a family with autosomal dominant partial epilepsy with auditory features. *Neurology* 2003; 60: 1687-90.

Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 2006;7(2):85-97.

Fishell G, Mason CA, Hatten ME. Dispersion of neural progenitors within the germinal zones of the forebrain. *Nature* 1993; 362: 636-8.

Fogli A, Guerrini R, Moro F, Fernandez-Alvarez E, Livet MO, Renieri A, et al. Intracellular levels of the LIS1 protein correlate with clinical and neuroradiological findings in patients with classical lissencephaly. *Annals of Neurology* 1999; 45: 154-61.

Fox JW, Lamperti ED, Eksioglu YZ, Hong SE, Feng Y, Graham DA, et al. Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* 1998; 21: 1315-25.

Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet MC, et al. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* 1999; 23: 247-56.

Fukata Y, Adesnik H, Iwanaga T, Bredt DS, Nicoll RA, Fukata M. Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulate synaptic transmission. *Science* 2006 313: 1792-5.

Galaburda AM, Sherman GF, Rosen GD, Aboitiz F, Geschwind N. Developmental dyslexia: four consecutive patients with cortical anomalies. *Ann Neurol* 1985; 18:222–33

Garcia-Higuera I, Fenoglio J, Li Y, Lewis C, Panchenko MP, Reiner O, et al. Folding of proteins with WD-repeats: comparison of six members of the WD-repeat, superfamily to the G protein beta subunit. *Biochemistry* 1996; 35: 13985-94.

Gargiulo A, Auricchio R, Barone MV, Cotugno G, Reardon W, Milla PJ, et al. Filamin A Is Mutated in X-Linked Chronic Idiopathic Intestinal Pseudo-Obstruction with Central Nervous System Involvement. *American J Human Genetics* 2007; 80: 751-8.

Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 1999a; 23: 257-71.

Gleeson JG, Minnerath SR, Fox JW, Allen KM, Luo RF, Hong SE, et al. Characterizations of mutations in the gene doublecortin in patients with double cortex syndrome. *Ann Neurol* 1999b; 45: 146-53.

Gleeson JG, Luo R, Grant P, Guerrini R, Ruttenlocher PR, Berg MJ, et al. Genetic and neuroradiologic heterogeneity of double cortex syndrome. *Ann Neurol* 2000a; 47: 265-69.

Gleeson JG, Minnerath S, Kuzniecky RI, Dobyns WB, Young ID, Ross ME, et al. Somatic and germline mosaic mutations in the doublecortin gene are associated with variable phenotypes. *Am J Hum Genet* 2000b; 67: 574-81.

Gomes MM. Epilepsias: uma prioridade nacional em cuidados de saúde. *Rev Bras Neurol* 1994; 30(5): 141-7.

- Gomes MM. Frequência populacional da epilepsia. *Rev Bras Neurol* 1997; 33 (1): 3-7.
- Granata T, Battaglia G, D'Incerti L, Franceschetti S, Spreafico R, Battino D, et al. Schizencephaly: neuradiologic and epileptologic findings. *Epilepsia* 1996; 37: 1185-93.
- Granata T, Fariana L, Faiella A, Cardini R, D'Incerti L, Boncinelli E, et al. Familial schizencephaly associated with *EMX2* mutation. *Neurology* 1997; 48: 1403-6.
- Gu W, Brodtkorb E, Steinlein OK. *LGII* is mutated in familial temporal lobe epilepsy characterized by aphasic seizures. *Ann Neurol* 2002; 52: 364-7.
- Gu W, Sander T, Becker T, Steinlein OK. Genotypic association of exonic *LGI4* polymorphisms and childhood absence epilepsy. *Neurogenetics*; 2004 5(1): 41-4.
- Gu W, Brodtkorb E, Piepoli T, Finocchiaro G, Steinlein OK. *LGII*: a gene involved in epileptogenesis and glioma progression? *Neurogenetics*; 2005; 6: 59-66.
- Guerreiro MM, Hage SRV, Guimarães CA, Abramides DV, Fernandes W, Pacheco, et al. Developmental language disorder associated with polymicrogyria. *Neurology* 2002; 59(2): 245-50.
- Guerrini R, Dravet C, Raybaud C, Roger J, Bureau M, Battaglia, et al. Neurological findings and seizure outcome in children with bilateral opercular macrogyric-like changes detected by MRI. *Dev Med Child Neuro* 1992; 134:694–705.
- Guerrini R, Dubeau F, Dulac O, Barkovich AJ, Kuzniecky R, Fett C, et al. Bilateral parasagittal parietooccipital polymicrogyria and epilepsy. *Ann Neurol* 1997; 41:65–73.
- Guerrini R, Dobyns WB. Bilateral periventricular nodular heterotopia with mental retardation and frontonasal malformation. *Neurology* 1998; 51: 499-503.
- Guerrini R, Barkovich AJ, Sztriha L, Dobyns WB. Bilateral frontal polymicrogyria: a newly recognized brain malformation syndrome. *Neurology* 2000; 54:909–13.
- Hattori M, Adachi H, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K. Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase [published erratum appears in *Nature* 1994; 370(6488):391]. *Nature* 1994; 370: 216-8.

Hedera P, Abou-Khalil B, Crunk AE, Taylor KA, Haines JL, Sutcliffe SS, et al. Autosomal Dominant Lateral Temporal Epilepsy: two families with novel mutations in the *LGII* gene. *Epilepsia* 2004; 45(3): 218-22.

Hirth F, Therianos S, Loop T, Gehring WJ, Reichert H, Furukubo-Tokunaga K, et al. Developmental defects in brain segmentation caused by mutations of the homeobox genes *orthodenticle* and *empty spiracles* in *Drosophila*. *Neuron* 1995; 15: 769-78.

Hirotsune S, Takahara T, Sasaki N, Hirose K, Yoshiki A, Ohashi T, et al. The *reeler* gene encodes a protein with an EGF-like motif expressed by pioneer neurons. *Nat Genet* 1995; 10: 77-83.

Holtmann M, Woermann FG, Boenigk HE. Multiple pterygium syndrome, bilateral periventricular nodular heterotopia and epileptic seizures-a syndrome ? *Neuropediatrics* 2001; 32: 264-6.

Huttenlocher PR, Tavarath S, Mojtahedi S. Periventricular heterotopia and epilepsy. *Neurology* 1994; 44: 51-5.

Ho YS, Swenson L, Derewenda U, Serre L, Wei Y, Dauter Z et al. Brain acetylhydrolase that inactivate platelet-activating factor is a G –protein-like trimer. *Nature* 1997; 385: 89-93.

Hong SE, Shugart YY, Huang DT, Shahwan SA, Grant PE, Hourihane JOB, et al. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human *RELN* mutations. *Nature Genet* 2000; 26: 93-6.

Intiso D, Cioffi R, Di Viesti P, Simone P, Tonali P. Bilateral periventricular nodular heterotopia associated with coeliac disease and palatoschisis. *Ital J Neurol Sci* 1998; 19: 180-3.

Jan MM. Outcome of bilateral periventricular nodular heterotopia in monozygotic twins with megalencephaly. *Dev Med Child Neurol* 1999; 41: 486-8.

Jansen A, Andermann E. Genetics of polymicrogyria syndromes. *J Med Genet* 2005; 42: 369-78.

Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B, Winawer M, Baker-Cummings, Pedley TA, et al. Mutations in *LGII* cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet* 2002; 30: 335-41.

Keays DA, Tian G, Poirier K, Huang G, Siebold C, Cleak J, et al. Mutations in α -Tubulin Cause Abnormal Neuronal Migration in Mice and Lissencephaly in Humans. *Cell* 2007 12; 128(1): 45–57.

Kerjan G, Gleeson JG. Genetic mechanisms underlying abnormal neuronal migration in classical lissencephaly. *Trends in Genetics* 2007; 23 (12): 623-30

Kitamura K, Yanazawa M, Sugiyama N, Miura H, Iizuka-Kogo A, Kusaka M, et al. Mutation of *ARX* causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. *Nat Genet* 2002; 32:359–69

Kobe B, Deisenhofer J. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 415-21.

Kobe B, Deisenhofer J. Proteins with leucine-rich repeats. *Curr Opin Struct Biol* 1995; 5: 409-16.

Kunapuli P, Chitta KS, Cowel JK. Suppression of the cell proliferation and invasion phenotypes in glioma cells by the *LGII* gene. *Oncogene* 2003; 22: 3985-91.

Kunapuli P, Kasyapa CS, Hawthorn L, Cowel JK. *LGII*, a putative tumour metastasis suppressor gene, controls in vitro invasiveness and expression of matrix metalloproteinases in glioma cells through the Erk1/2 pathway. *J Biol Chem* 2004; 279: 23151-7.

Kuzniecky R, Andermann F, Guerrini R, Study CMC. Congenital bilateral perisylvian syndrome: study of 31 patients. *The Lancet* 1993a 341: 608–12

Kuzniecky R, Murro A, King D, Morawetz R, Smith J, Powers R et al. Magnetic resonance imaging in childhood intractable partial epilepsies: pathologic correlations. *Neurology* 1993b; 43: 681-7.

Kyndt F, Gueffet J, Probst V, Jaafar P, Legendre A, Le Bouffant F, et al. Mutations in the Gene Encoding Filamin A as a Cause for Familial Cardiac Valvular Dystrophy. *Circulation* 2007; 115: 40-9

Ledbetter SA, Kuwano A, Dobyns WB, Ledbetter, DH. Microdeletions of chromosome 17p13 as a cause of isolated lissencephaly. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 182-9.

Lee, AJ; Lupski, JR. Genomic Rearrangements and gene copy-number alterations as a cause of nervous system disorders. *Neuron* 2006; 52:103-21.

Leventer RJ, Cardoso C, Ledbetter DH, Dobyns WB. *LIS1* missense mutations cause milder lissencephaly phenotypes including a child with normal IQ. *Neurology* 2001; 57: 416-22.

Li X, Park WJ, Pyeritz RE, Jabs EW. Effect on splicing of a silent *FGFR2* in Crouson syndrome. *Nature Genet* 1995, 9: 232-3.

Lo Nigro C, Chong CS, Smith AC, Dobyns WB, Carrozo R, Ledbetter DH, et al. Point mutations and a intragenic deletion in *LIS1*, the lissencephaly causative gene in isolated lissencephaly sequence and Miller-Dieker syndrome. *Hum Mol Genet* 1997, 6: 157-64.

Mallamaci A, Ianonne R, Briata P, Pintonello L, Mercurio S, Boncinelli E, et al. *EMX2* protein in the developing mouse brain and olfactory area. *Mech Dev* 1998; 77: 165-72.

Meisler MH, Kearney J, Ottman R, Escayg A. Identification of epilepsy genes in human and mouse. *Annu Rev Genet* 2001; 35: 567-88.

Michelucci R, Poza JJ, Sofia V, de Feo MR, Binelli S, Bisulli F, et al. Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: clinical spectrum, new epileptin mutations and genetic heterogeneity in seven european families. *Epilepsia* 2003; 44 (10): 1289-97.

Matsumoto N, Leventer RJ, Kuc JA, Mewborn SK, Dudleycek LL, Ramocki MB, et al. Mutation analysis of the *DCX* gene and genotype/phenotype correlation in subcortical band heterotopia. *Eur J Hum Genet* 2001; 9: 5-12.

Morante-Redolat JM, Gorostidi-Pagola A, Piquer-Sirerol S, Sáenz A, Pozza JJ, Galán J, et al. Mutations in the *LGII/Epitempin* gene on 10q24 cause autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1119-27.

Morelli CVM. Identificação do locus responsável pela epilepsia de lobo temporal mesial familiar através de estudos de ligação. – Campinas. 2006. (Dissertação – Doutorado – Universidade Estadual de Campinas).

Moro F, Carrozzo R, Veggioti P, Tortorella G, Toniolo D, Volzone A, et al. Familial periventricular heterotopia: missense and distal truncating mutations of the *FLN1* gene. *Neurology* 2002; 58: 916-21.

Nakayama J, Fu YH, Clark AM, Nakahara S, Hamano K, Iwasaki N, et al. A nonsense mutation of the *MASSI* gene in a family with febrile seizure and afebrile seizures. *Ann Neurol* 2002; 52: 654-7.

Neal J, Apse K, Sahin M, Walsh CA, Sheen VL. Deletion of chromosome 1p36 is associated with periventricular nodular heterotopia. *Am J Med Genet A* 2006; 140: 1692-5.

Olson EC, Walsh C. Smooth, rough and upside-down neocortical development. *Curr Op Genet Develop* 2002; 12: 320-7.

O'Rourke NA, Sullivan DP, Kaznowski CE, Jacobs AA, McConnell, SK. Tangential migration of neurons in the developing cerebral cortex. *Development* 1995; 121: 2165-76.

Ottman R, Risch N, Hauser AW, Pedley TA, Lee JH, Barker-Cummings C, et al. Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q. *Nat Genetics* 1995; 10: 56-60.

Ottman R, Winawer MR, Kalachikov S, Baker-Cummings C, Gilliam TC, Pedley TA, et al. *LGII* mutations in autosomal dominant partial epilepsy with auditory features. *Neurology* 2004; 62: 1120-6.

Palmini A, Andermann E, Andermann F. Prenatal events and genetic factors in epilepsy patients with neuronal migration disorders. *Epilepsia* 1994; 35: 965-73.

Parrini E, Ramazzotti A, Dobyns WB, Mei D, Moro F, Veggiotti P, et al. Periventricular heterotopia: phenotypic heterogeneity and correlation with Filamin A mutations. *Brain* 2006; 29: 1892–1906.

Piao X, Hill RS, Bodell A, Chang BS, Basel-Banagaite L, Straussberg R, et al. G protein - coupled receptor-dependent development of human frontal cortex. *Science* 2004; 303: 2033-6.

Pilz D, Matsumoto N, Minnerath S, Mills P, Gleeson J, Allen K, et al. *LIS1* and *XLS1* (doublecortin) mutations cause most human classical lissencephaly, but different patterns of malformation. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 2029-37.

Pilz DT, Kuc J, Matsumoto N, Bodurtha J, Bernadi B, Tassinari CA, et al. Subcortical band heterotopia in rare affected males can be caused by missense mutations in *DCX (XLIS)* or *LIS1*. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1757-60.

Pinard JM, Motte J, Chiron C, Brian R, Andermann E. Subcortical laminar heterotopia and lissencephaly in two families: a single X linked dominant gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57: 914-20.

Pizutti A, Flex E, Bonaventura CD, Dottorini T, Egeo G, Manfredi M, et al. Epilepsy with auditory features: a *LGII* gene mutation suggests a loss-of-function mechanism. *Ann Neurol* 2003; 53: 396-99.

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*). *Human Mutation* 2007; 28(11): 1055-64.

Poussaint TY, Fox JW, Dobyns WB, Radtke R, Scheffer IE, Berkovic SF, et al. Periventricular nodular heterotopia in patients with filamin-1 gene mutations: neuroimaging findings. *Pediatr Radiol* 2000; 30: 748-55.

Poza JJ, Sáenz A, Martínez-Gil A, Cheron N, Cobo AM, Urtasun M, et al. Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: clinical and genetic study of a large Basque pedigree linked to chromosome 10q. *Ann Neurol* 1999; 45:182-8.

Raymond AA, Fish DR, Sisodiya SM, Alsanjari N, Stevens JM, Shorvon SD, et al. Abnormalities of gyration, heterotopias, tuberous sclerosis, focal cortical dysplasia, microdysgenesis, dyembryoplastic neuroepithelial tumour and dysgenesis of the archicortex in epilepsy. Clinical, EEG and neuroimaging features in 100 adult patients. *Brain* 1995; 118: 629-60.

Reiner O, Carrozzo R, Shen Y, Wehnert M, Faustinel F, Dobyns WB, et al. Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature*; 1993, 364: 717-21.

Richard I, Beckmann JS. How neutral are synonymous codon mutations ? *Nature Genet* 1995; 10: 259.

Robertson PS, Twigg SFR, Sutherland-Smith AJ, Biancalana V, Gorlin RJ, Horn D, et al. Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans. *Nature Genet* 2003; 33: 487-91.

Ross ME, Walsh CA. Human brain malformation and their lessons for neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 1041-70.

Sakamoto M, Ono J, Okada S, Masuno M, Nakamura Y, Kurahashi H, et al. Alteration of the LIS1 gene in Japanese patients with isolated lissencephaly sequence or Miller-Dieker syndrome. *Hum Genet* 1998; 103: 586-89.

Sapir T, Eisenstein M, Burgess HA, Horesh D, Cahana A, Aoki J, et al. Analysis of lissencephaly causing LIS1 mutations. *Eur J Biochem* 1999; 266: 1011-20.

Sasaki S, Shionoya A, Ishida M, Gambello MJ, Yingling J, Wynshaw-Boris A, et al. A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system. *Neuron* 2000; 28: 681-96.

Scheel H, Tomiuk S, Hoffmann K. A common protein interaction domain links two recently identified epilepsy genes. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1757-62.

Schulte U, Thumfart JO, Klocker N, Sailer CA, Bildl W, Biniossek M, et al. The epilepsy-linked Lgi1 protein assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by $\text{Kv}\beta 1$. *Neuron* 2006; 49: 697-706.

Semah F, Picot MC, Adam MD, Broglin D, Arzimanoglou A, Bazin B, et al. Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence ? *Neurology* 1998; 51: 1256-62.

Sheen VL, Dixon PH, Fox JW, Hong SE, Linton L, Sisodiya SM, et al. Mutations in the X-linked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1775-83.

Sheen VL, Topçu M, Berkovic S, Yalnizoglu D, Blatt I, Bodell A, et al. Autosomal recessive form of periventricular heterotopia. *Neurology* 2003, 60: 1108-12.

Sheen VL, Wheless JW, Bodell A, Braverman E, Cotter PD, Rauen KA, et al. Periventricular heterotopia associated with chromosome 5p anomalies. *Neurology* 2003b; 60: 1033-6.

Sheen VL, Ganesh VS, Topcu M, Sebire G, Bodell A, Hill RS, et al. Mutations in *ARFGEF2* implicate vesicle trafficking in neural progenitor proliferation and migration in the human cerebral cortex. *Nature Genetics* 2004; 36(1): 69-76.

Sheen VL, Jansen A, Chen MH, Parrini E, Morgan T, Ravenscroft R, et al. Filamin A mutations cause periventricular heterotopia with Ehlers-Danlos syndrome. *Neurology* 2005; 64:254-62

Sicca F, Kelemen A, Genton P, Das S, Mei D, Moro F, et al. Mosaic mutations of the LIS1 gene cause subcortical band heterotopia. *Neurology* 2003; 61: 1042-6.

Sidman RL, Rakic P. Neuronal migration with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res* 1973; 62: 1-35.

Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K, Neer EJ. The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci* 1999; 24: 181-5.

Skradski SL, Clark AM, Jiang H, White HS, Fu YH, Ptacek LJ. A novel gene causing a mendelian audiogenic mouse epilepsy. *Neuron* 2001; 31: 537-44.

Sossey-Alaoui K, Hartung AJ, Guerrini R, Manchester DK, Posar A, Puche-Mira A, et al. Human doublecortin (DCX) and the homologous gene in mouse encode a putative Ca^{2+} -dependent signaling protein which is mutated in human X-linked neuronal migration defects. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1327-32.

Spencer SS. Neural networks in human epilepsy: evidence of and implications for treatment. *Epilepsia* 2002; 43: 219-227.

Sutula TP. Experimental models of temporal lobe epilepsy: new insights from the study of kindling and synaptic reorganization. *Epilepsia* 1990; 31: 45-54.

Tan SS, Breen S. Radial mosaicism and tangential cell dispersion both contribute to mouse neocortical development. *Nature* 1993; 362: 638-40.

Tessa C, Michelucci C, Nobile C, Giannelli M, Della Nave R, Testoni S, et al. Structural anomaly of left lateral temporal lobe in epilepsy due to mutated *LGII*. *Neurology* 2007; 69: 1298-1300.

Tietjen I, Erdogan F, Currier S, Apse K, Chang BS, Hill RS, et al. *EMX2* – Independent familial schizencephaly: Clinical and genetic analyses. *Am J Medical Genet* 2005; 135A:166-70.

Tietjen I, Bodell A, Apse K, Mendonza AM, Chang BS, Shaw GM, et al. Comprehensive *EMX2* genotyping of a large schizencephaly case series. *Am J Med Genet A*. 2007; 143: 1313-6.

Uyanik G, Morris-Rosendahl DJ, Stiegler J, Klapceki J, Gross C, Berman Y, et al. Location and type of mutation in the *LIS1* gene do not predict phenotypic severity. *Neurology* 2007; 69: 442-7.

Vadlamudi L, Scheffer IE, Berkovic SF. Genetics of temporal lobe epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74: 1359–61.

van Slegtenhorst M, Nellist M, Nagelkerken B, Cheadle J, Snell R, van den Ouweland A, et al. Interaction between hamartin and tuberin, the *TSC1* and *TSC2* gene products. Hum Molec Genet 1998; 7: 1053-7.

Walsh C, Cepko CL. Clonal dispersion of neuronal clones across functional regions of the cerebral cortex. Science 1992; 255: 434-40.

Wieck G, Leventer RJ, Squier WM, Jansen A, Andermann E, Dubeau F, et al. Periventricular nodular heterotopia with overlying polymicrogyria. Brain 2005; 128: 2811-21

Wolpert SM, Barnes PD. MRI in Pediatric Neuroradiology. Mosby Year Book, St. Louis, 1992.

Wyllie E, Comair Y, Ruggieri P, Raja S, Prayson R. Epilepsy surgery in the setting of periventricular leukomacia and focal cortical dysplasia. Neurology 1996; 46: 839-41.

Zeharia A, Shuper A, Mimouni M, Kornreich L, Rachmel A, Lerman-Sagie T, et al. Periventricular brain heterotopias in a child with adrenocortical insufficiency, achalasia, alacrima and neurologic abnormalities (Allgrove syndrome). J Child Neurol 1999; 14: 331-4.

7- ANEXOS

ANEXO I – Protocolo de Genotipagem Automática

1- Seleção dos marcadores

Para a análise genômica randômica foram utilizados *primers* comerciais do conjunto *ABI Prism® Linkage Mapping Set*. Estes *primers* são especialmente escolhidos e sintetizados pelo fabricante, distando cerca de 10cM, possuindo heteroziguidade geralmente acima de 0.70 e temperaturas de anelamento semelhantes.

Para saturação de regiões cujo valor de *lod-score* encontrados na análise genômica randômica indicam possível ligação, foram selecionados marcadores não distando 2cM entre si e que tenham heteroziguidade acima de 0.75. No entanto, por limitações de resolução dos mapas de ligação disponíveis (*Genethon*, *Marshefield* e *Decode*) nem sempre as duas características puderam ser seguidas.

2- Genotipagem Automática

O seqüenciador automático MegaBACE 1000 foi adaptado para genotipagem através de um conjunto específico de filtros e com a aquisição do *software Fragment Profiler v1.2*, para a análise da genotipagem. As amostras foram amplificadas em placas de 96 amostras contendo um volume final de 7,50µl, composto de 0,6µl de DNA genômico 50ng; 0,5µl de *primer mix* (5 µM cada primer); 0,75µl *GeneAmp dNTP mix* (2,5mM) 0,06µl de *AmpliTaQ Gold DNA polimerase* (5 unidades/µl); 0,75µl Tampão10x *GeneAmp PCR*; 0,75µl de $MgCl_2$ (2,5mM) e 4,09µl H_2O . As reações da PCR foram conduzidas em 95°C por 12min.; 10 ciclos de 94°C por 15s, 55°C por 15s, 72°C por 30s; 20 ciclos de 89°C por 15s, 55°C por 15s, 72°C por 30s; e 72°C por 10min. Em outra placa de 96 amostras, os produtos da PCR foram diluídos em água: 20x para fluoróforos FAM e VIC e 10x para fluoróforo NED. Em seguida, 2µl de cada diluição foi distribuída em outra placa de 96 amostras previamente preparada com um mistura contendo 7,75µl de *Genotyping Loading Solution* (0,1% de *Tween 20* em H_2O) + 0,25µl de *MegaBACE Size standards ET550-R*, perfazendo um volume final de 10µl por amostra em placa própria para o MegaBACE. As amostras foram desnaturadas a 95°C por 3 minutos antes de serem injetadas no MegaBACE.

3- Análise dos dados

Após a análise dos esferogramas pelo *software Fragment Profiler v1.2* da genotipagem automática, os dados de cada indivíduo são analisados por métodos paramétricos de análise de ligação genética, através do cálculo de *lod-score* de dois pontos pelo programa de computador LINKAGE[®]. Em resumo: arquivos contendo a informação genealógica, clínica e genotipagem dos marcadores foram criados utilizando a ferramenta *Makeped*. Em seguida foram construídos arquivos contendo informações a respeito do modo de herança, frequência gênica e frequência dos alelos dos marcadores genotipados através da ferramenta *Prelink* do programa LINKAGE[®]. O cálculo do *lod-score* é automaticamente realizado para diferentes valores de fração de recombinação baseado no método de “*maximum likelihood*”. Para doenças com herança autossômica, *lod-scores* iguais ou acima de 3,00 indicam confirmação de ligação (probabilidade 1:1000 em favor de ligação) e *lod-scores* menores ou iguais a -2,00 excluem ligação (probabilidade de 1:100 contra ligação).

ANEXO II - Protocolo de DHPLC e sequenciamento automático

A triagem de mutações está foi realizada através da técnica de DHPLC que detecta a presença de mutações através da retenção diferencial de homoduplex e heteroduplex formados por moléculas de DNA parcialmente desnaturadas em uma cromatografia líquida de fase reversa. As fitas de heteroduplex são menos estáveis do que as fitas com pareamento perfeito (homoduplex), causando esta retenção diferencial na coluna em determinadas temperaturas. Para a formação dos heteroduplex, os produtos de PCR foram desnaturados por 5 minutos a 95°C e deixados em repouso por 45 minutos em temperatura ambiente. Após este reanelamento por resfriamento gradual, o produto de PCR é analisado pelo sistema WAVE® 4500 (Transgenomic). A triagem de mutações é realizada com temperaturas específicas para cada fragmento definidas pelo software WAVEMAKER™, sendo que a porcentagem de tampão utilizado na coluna varia para cada fragmento. Aliquotas de 5µl do produto amplificado de cada exon foram injetadas em coluna DNASep® com fluxo de 0.9ml/min.

A triagem de mutações foi realizada através da análise dos perfis cromatográficos gerados no software WAVEMAKER™. Cada pico observado no programa representa um tipo de fragmento de DNA presente na amostra. Portanto, em um indivíduo com alteração pode ocorrer a formação de quatro picos, representando dois homoduplex e dois heteroduplex presentes na amostra. Geralmente estes picos podem apresentar-se unidos, gerando um cromatograma com dois ou três picos. Os indivíduos sem alteração apresentarão um pico, representando o homoduplex.

Sequenciamento automático

Os fragmentos de PCR com perfil cromatográfico diferente do padrão normal foram submetidos ao sequenciamento automático através do MegaBace1000 (Amersham Biosciences). A reação de sequenciamento consistiu de 4 µL de solução pré-mix, 1µL de primer (5 pmol/µL) e 1µL do produto de amplificação para um volume final de 15 µL. O programa utilizado para o sequenciamento foi: 35 ciclos de 95°C por 20 segundos, 50 °C

por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto. A purificação da reação de seqüenciamento foi realizada com etanol e acetato de amônio 7.5mM como sugerido pelo fabricante. Também foi utilizado o seqüenciador automático da Applied Biosystems - Modelo ABI 3100. A reação de sequenciamento consistiu de 2,0 µL de Big Dye, 1,0 µL de DNA (de 200ng/µL a 600ng/µL), 1,0 µL de cada “primer” (5 pmol/µL), 2µL de tampão para um volume final de 10 µL, utilizando-se o seguinte programa: 40 ciclos repetitivos de 96 °C por 45 segundos, 50 °C por 30 segundos e 60 °C por quatro minutos. Em seguida a reação de sequenciamento é purificada segundo recomendações do fornecedor.

ANEXO III - Termos de consentimento livre e esclarecido

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 1 de 3

Título do projeto: Estudos de mutações em genes responsáveis por diferentes formas de desordens do desenvolvimento cortical

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa envolvendo pacientes e famílias com suspeita clínica de malformações cerebrais. O objetivo geral do estudo é comprovar a presença de defeitos no DNA que podem ser os responsáveis por estas malformações em nossa amostra de pacientes. Esses estudos poderão levantar dados que possibilitarão um conhecimento mais aprofundado sobre as estas malformações de um modo geral. Tanto as amostras de DNA, de linhas celulares e a informação médica que forem obtidas para este estudo, poderão ser compartilhadas com outros pesquisadores, podendo assim ser utilizadas eventualmente para outros fins de pesquisa destas desordens. O sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos através da utilização de um código para a identificação dos indivíduos participantes.

PROCEDIMENTO:

Entendo que se eu concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e familiares. Eu serei submetido a um exame físico e neurológico para confirmar meu estado clínico. Além disso, poderei ser submetido a exames subsidiários laboratoriais, e/ou de imagem (como tomografia computadorizada ou a uma ressonância magnética de crânio). Uma amostra de sangue será colhida (20 a 30 ml, o equivalente a duas colheres de sopa). Hospitalização não será necessária. Os procedimentos mencionados acima, serão realizados dentro do primeiro ano após o consentimento em participar no estudo e, com exceção da coleta de amostra de sangue, fazem parte dos cuidados médicos de rotina para um paciente com digenesia cortical. Porém, a pesquisa laboratorial utilizando as amostras de sangue poderá ser feita durante um período máximo de 30 anos após a coleta. As células que por ventura forem isoladas do sangue do propósito serão preservadas para utilização durante todo o estudo e depois que ele se completar serão destruídas.

RISCO E DESCONFORTO

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

Título do projeto: Estudos de mutações em genes responsáveis por diferentes formas de desordens do desenvolvimento cortical

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

VANTAGENS:

Entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a participação neste estudo e que o diagnóstico e o tratamento provavelmente não serão modificados. Os resultados dos testes moleculares que por ventura forem obtidos, estarão disponíveis através do acompanhamento no ambulatório de origem.

SIGILO

Entendo que toda a informação médica, assim como o resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, farão parte do prontuário médico do propósito 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

Entendo que posso requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. A DRa Iscia Lopes Cendes, tel (019) 3788-8907 estará disponível para responder minhas questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contactar a secretaria da comissão de ética da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (019) 3788-7232.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO

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

Título do projeto: Estudos de mutações em genes responsáveis por diferentes formas de desordens do desenvolvimento cortical

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

Eu confirmo que o (a) Dr. (a) _____

me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos que serão realizados, os riscos, desconforto e possíveis vantagens advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

Nome do participante ou responsável

Assinatura do participante ou responsável

data

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____

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

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado

data

Título do projeto: Estudos Genéticos em Epilepsia

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

OBJETIVO DA PESQUISA:

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

PROCEDIMENTO:

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

RISCO E DESCONFORTO:

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

Título do projeto: Estudos Genéticos em Epilepsia

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

VANTAGENS:

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

SIGILO:

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

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

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

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

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

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

Título do projeto: Estudos Genéticos em Epilepsia

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

Eu confirmo que o(a) Dr(a). _____

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

Nome do participante ou responsável

Assinatura do participante ou responsável

data

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____

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

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado

data

ANEXO IV - Valores de *lod-score* para os marcadores microsatélites testados

Tabela 1. Valores de *lod-score* para marcadores do cromossomo 1.

<i>Marcador</i>	<i>Frequência de Recombinação (cM)</i>								
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
D1S468	-1,64	-0,59	-0,48	-0,47	-0,50	-0,52	-0,49	-0,42	-0,30
D1S214	-0,75	-0,67	-0,58	-0,49	-0,41	-0,33	-0,25	-0,18	-0,11
D1S2667	-2,06	-1,31	-1,07	-0,91	-0,77	-0,62	-0,49	-0,35	-0,22
D1S2697	-0,75	-0,67	-0,58	-0,49	-0,41	-0,33	-0,25	-0,18	-0,11
D1S199	-1,62	-0,50	-0,26	-0,14	-0,08	-0,04	-0,03	-0,02	-0,01
D1S234	-0,74	-0,37	-0,21	-0,12	-0,06	-0,03	-0,01	-0,00	0,00
D1S255	-1,97	-0,81	-0,55	-0,38	-0,26	-0,17	-0,1	-0,05	-0,02
D1S2797	-1,91	-0,34	0,03	0,22	0,32	0,34	0,32	0,26	0,17
D1S2890	-2,03	-0,77	-0,45	-0,27	-0,15	-0,06	-0,00	0,03	0,04
D1S230	-1,38	-1,11	-0,86	-0,65	-0,47	-0,33	-0,21	-0,12	-0,06
D1S2841	-1,14	-0,72	-0,51	-0,36	-0,25	-0,17	-0,10	-0,06	-0,02
D1S207	0,40	0,45	0,46	0,45	0,42	0,38	0,32	0,26	0,18
D1S2868	-0,98	-0,82	-0,65	-0,49	-0,34	-0,22	-0,13	-0,06	-0,02
D1S206	-0,16	-0,13	-0,11	-0,09	-0,07	-0,05	-0,04	-0,02	-0,01
D1S2726	-0,60	-0,35	-0,21	-0,12	-0,06	-0,03	-0,01	-0,00	0,00
D1S252	-2,26	-1,50	-1,02	-0,67	-0,42	-0,24	-0,11	-0,04	0,01
D1S498	-1,53	-1,01	-0,65	-0,39	-0,21	-0,08	0,01	0,05	0,07
D1S484	-2,20	-1,60	-1,17	-0,84	-0,58	-0,38	-0,23	-0,12	-0,05
D1S2878	-1,88	-0,42	-0,13	0,02	0,10	0,14	0,14	0,13	0,1
D1S196	-1,03	-0,59	-0,36	-0,23	-0,16	-0,12	-0,09	-0,08	-0,07
D1S249	-2,27	-1,54	-1,03	-0,69	-0,45	-0,28	-0,16	-0,08	-0,03
D1S213	-1,89	-1,39	-1,05	-0,80	-0,59	-0,43	-0,29	-0,18	-0,1
D1S2800	-1,86	-0,95	-0,47	-0,16	0,04	0,16	0,22	0,22	0,19
D1S2785	-4,14	-2,34	-1,57	-1,08	-0,73	-0,47	-0,28	-0,14	-0,06
D1S2842	-2,66	-1,96	-1,45	-1,06	-0,77	-0,53	-0,35	-0,21	-0,11
D1S2836	-4,09	-2,48	-1,71	-1,18	-0,78	-0,48	-0,26	-0,11	-0,02

Tabela 2. Valores de *lod-score* para marcadores do cromossomo 2.

<i>Marcador</i>	<i>Frequência de Recombinação (cM)</i>								
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
D2S319	-1,56	-0,36	0,08	0,31	0,43	0,47	0,45	0,38	0,28
D2S2211	0,55	0,47	0,40	0,32	0,24	0,17	0,11	0,06	0,03
D2S162	-1,35	-0,65	-0,35	-0,13	0,04	0,15	0,20	0,21	0,18
D2S168	-3,30	-1,71	-0,99	-0,56	-0,27	-0,08	0,03	0,1	0,11
D2S305	-0,99	-0,70	-0,51	-0,37	-0,27	-0,19	-0,13	-0,09	-0,05
D2S165	-3,93	-2,85	-2,10	-1,60	-1,21	-0,89	-0,62	-0,39	-0,22
D2S367	-2,95	-1,88	-1,43	-1,19	-1,04	-0,89	-0,72	-0,52	-0,32
D2S2259	-4,56	-2,28	-1,60	-1,17	-0,84	-0,58	-0,38	-0,22	-0,12
D2S391	-0,99	-0,95	-0,90	-0,83	-0,72	-0,60	-0,46	-0,33	-0,21
D2S337	-2,28	-1,78	-1,40	-1,07	-0,79	-0,55	-0,37	-0,22	-0,12
D2S2368	-1,95	-1,51	-1,29	-1,12	-0,96	-0,79	-0,60	-0,41	-0,24
D2S286	0,81	0,66	0,49	0,31	0,12	-0,05	-0,18	-0,23	-0,21
D2S2333	0,30	0,14	-0,01	-0,15	-0,24	-0,28	-0,27	-0,21	-0,14
D2S2216	0,55	0,47	0,40	0,32	0,24	0,17	0,11	0,06	0,03
D2S160	-2,81	-1,42	-1,06	-0,82	-0,62	-0,45	-0,30	-0,18	-0,1
D2S347	-1,12	-0,57	-0,23	-0,01	0,12	0,19	0,20	0,18	0,13
D2S112	0,28	0,35	0,40	0,42	0,41	0,38	0,33	0,27	0,19
D2S151	1,12	1,16	1,20	1,17	1,07	0,93	0,75	0,54	0,33
D2S142	-3,64	-2,08	-1,45	-1,01	-0,68	-0,43	-0,25	-0,12	-0,04
D2S2330	-1,99	-1,00	-0,57	-0,30	-0,12	-0,01	0,05	0,07	0,07
D2S335	-3,07	-2,04	-1,48	-1,07	-0,75	-0,51	-0,32	-0,18	-0,08
D2S364	-3,45	-2,13	-1,53	-1,11	-0,79	-0,54	-0,34	-0,19	-0,08
D2S117	-1,73	-1,35	-1,13	-0,95	-0,78	-0,61	-0,44	-0,29	-0,17
D2S325	-2,18	-1,23	-0,91	-0,68	-0,49	-0,34	-0,21	-0,12	-0,05
D2S2382	-0,41	-0,15	-0,01	0,06	0,09	0,09	0,08	0,05	0,03
D2S126	-3,30	-1,43	-0,76	-0,38	-0,14	0,00	0,08	0,11	0,1
D2S396	-3,22	-1,66	-1,05	-0,64	-0,35	-0,14	-0,00	0,07	0,09
D2S206	-3,15	-1,45	-0,88	-0,51	-0,25	-0,07	0,04	0,1	0,10
D2S125	-0,87	-0,78	-0,64	-0,50	-0,36	-0,25	-0,15	-0,08	-0,03

Tabela 3. Valores de *lod-score* para marcadores do cromossomo 3.

<i>Marcador</i>	<i>Frequência de Recombinação (cM)</i>								
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
D3S1297	-0,86	-0,45	-0,24	-0,09	-0,00	0,05	0,07	0,05	0,01
D3S1304	0,15	0,08	-0,02	-0,13	-0,24	-0,31	-0,31	-0,26	-0,18
D3S1263	-0,33	-0,26	-0,27	-0,31	-0,35	-0,37	-0,35	-0,28	-0,19
D3S2338	-0,56	-0,34	-0,27	-0,28	-0,32	-0,37	-0,36	-0,30	-0,20
D3S1277	-3,01	-2,03	-1,54	-1,17	-0,87	-0,63	-0,44	-0,28	-0,16
D3S1289	-3,39	-1,52	-0,91	-0,56	-0,32	-0,17	-0,07	-0,02	0,01
D3S1300	-1,05	-0,59	-0,28	-0,08	0,03	0,08	0,09	0,08	0,05
D3S1285	0,26	0,39	0,45	0,48	0,48	0,45	0,41	0,34	0,25
D3S1566	-2,96	-1,43	-0,81	-0,44	-0,19	-0,03	0,06	0,11	0,11
D3S3681	-2,78	-1,07	-0,54	-0,24	-0,06	0,05	0,08	0,08	0,04
D3S1271	-2,69	-1,57	-1,04	-0,70	-0,47	-0,32	-0,22	-0,15	-0,1
D3S1278	-1,70	-1,11	-0,76	-0,51	-0,33	-0,21	-0,13	-0,08	-0,05
D3S1267	-2,18	-0,91	-0,42	-0,11	0,08	0,18	0,23	0,22	0,18
D3S1292	-3,51	-1,18	-0,60	-0,24	-0,01	0,12	0,19	0,21	0,17
D3S1569	-3,20	-1,59	-0,93	-0,52	-0,24	-0,06	0,05	0,1	0,11
D3S1279	-3,37	-1,68	-1,00	-0,59	-0,32	-0,14	-0,03	0,03	0,05
D3S1614	-0,81	-0,47	-0,23	-0,07	0,04	0,10	0,13	0,14	0,11
D3S1565	-0,98	-0,14	0,18	0,34	0,40	0,40	0,36	0,28	0,19
D3S1262	-4,55	-2,62	-1,83	-1,30	-0,91	-0,62	-0,40	-0,23	-0,11
D3S1580	-4,13	-2,59	-1,75	-1,17	-0,74	-0,43	-0,21	-0,07	0,01
D3S1601	-3,16	-1,63	-1,15	-0,81	-0,56	-0,37	-0,22	-0,12	-0,05
D3S1311	-2,82	-1,33	-0,87	-0,57	-0,35	-0,19	-0,08	-0,01	0,02

Tabela 4. Valores de *lod-score* para marcadores do cromossomo 4.

<i>Marcador</i>	<i>Frequência de recombinação (cM)</i>								
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
D4S412	-2,44	-0,91	-0,54	-0,26	-0,07	0,05	0,11	0,12	0,09
D4S2935	0,38	0,48	0,44	0,35	0,22	0,09	-0,03	-0,10	-0,11
D4S403	-1,45	-0,12	0,15	0,29	0,37	0,39	0,35	0,26	0,16
D4S419	-0,86	-0,48	-0,34	-0,25	-0,17	-0,1	-0,04	-0,01	0,01
D4S391	-2,38	-1,09	-0,74	-0,51	-0,34	-0,21	-0,11	-0,03	0,01
D4S405	-2,08	-1,52	-1,01	-0,68	-0,44	-0,27	-0,15	-0,07	-0,02
D4S1592	-0,39	0,03	0,29	0,39	0,42	0,40	0,35	0,28	0,20
D4S392	-2,26	-1,28	-0,70	-0,32	-0,07	0,08	0,15	0,17	0,15
D4S2964	-2,57	-2,16	-1,69	-1,32	-1,01	-0,72	-0,48	-0,28	-0,13
D4S1534	-2,36	-1,36	-0,88	-0,60	-0,40	-0,25	-0,15	-0,08	-0,03
D4S414	0,48	0,37	0,27	0,18	0,11	0,06	0,03	0,00	-0,01
D4S1572	-2,08	-1,64	-1,35	-1,12	-0,92	-0,75	-0,58	-0,42	-0,27
D4S406	-4,89	-1,66	-0,86	-0,42	-0,16	-0,01	0,07	0,10	0,10
D4S402	-3,82	-2,52	-1,87	-1,39	-1,01	-0,71	-0,47	-0,28	-0,15
D4S1575	-0,98	-0,14	0,05	0,13	0,16	0,17	0,15	0,13	0,09
D4S424	-2,95	-1,68	-0,93	-0,51	-0,26	-0,1	-0,01	0,03	0,04
D4S413	-3,02	-1,54	-0,89	-0,47	-0,20	-0,03	0,07	0,11	0,11
D4S1597	-3,84	-1,89	-1,24	-0,85	-0,56	-0,35	-0,19	-0,09	-0,02
D4S1539	-0,50	-0,26	-0,17	-0,12	-0,11	-0,09	-0,08	-0,07	-0,05
D4S415	-2,90	-1,21	-0,80	-0,59	-0,45	-0,33	-0,22	-0,13	-0,06
D4S1535	0,38	0,48	0,44	0,35	0,22	0,09	-0,03	-0,10	-0,11
D4S426	-2,71	-1,83	-1,32	-0,98	-0,74	-0,55	-0,40	-0,26	-0,14

Tabela 5. Valores de *lod-score* para marcadores do cromossomo 5.

<i>Marcador</i>	<i>Frequência de recombinação (cM)</i>								
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
D5S1981	-4,39	-2,36	-1,39	-0,82	-0,45	-0,20	-0,05	0,04	0,07
D5S406	-2,65	-2,13	-1,71	-1,34	-1,02	-0,74	-0,51	-0,33	-0,19
D5S630	-3,17	-2,12	-1,55	-1,12	-0,78	-0,51	-0,30	-0,15	-0,06
D5S416	-2,07	-1,68	-1,27	-0,95	-0,69	-0,49	-0,33	-0,21	-0,12
D5S419	-0,37	-0,29	-0,29	-0,32	-0,35	-0,35	-0,31	-0,24	-0,15
D5S426	-2,14	-1,61	-1,34	-1,13	-0,94	-0,74	-0,54	-0,37	-0,22
D5S418	-1,17	-0,68	-0,38	-0,20	-0,08	-0,01	0,02	0,03	0,03
D5S407	-3,18	-2,13	-1,72	-1,40	-1,10	-0,83	-0,58	-0,37	-0,20
D5S647	-3,30	-2,02	-1,52	-1,20	-0,95	-0,72	-0,52	-0,34	-0,20
D5S424	-2,88	-2,12	-1,64	-1,28	-0,97	-0,71	-0,48	-0,29	-0,15
D5S641	-2,62	-1,78	-1,43	-1,23	-1,07	-0,92	-0,73	-0,53	-0,32
D5S1725	-2,72	-1,85	-1,28	-0,87	-0,56	-0,34	-0,18	-0,08	-0,01
D5S428	-2,89	-1,86	-1,44	-1,15	-0,92	-0,71	-0,51	-0,33	-0,19
D5S618	-3,32	-2,49	-1,88	-1,39	-0,99	-0,67	-0,42	-0,23	-0,10
D5S815	-1,14	-0,88	-0,66	-0,48	-0,34	-0,23	-0,14	-0,08	-0,03
D5S644	-4,45	-2,61	-1,80	-1,26	-0,87	-0,57	-0,35	-0,18	-0,07
D5S652	-3,58	-2,33	-1,61	-1,12	-0,77	-0,50	-0,31	-0,17	-0,07
D5S2498	-4,73	-3,10	-2,23	-1,65	-1,21	-0,85	-0,57	-0,35	-0,18
D5S433	-3,27	-1,94	-1,48	-1,16	-0,90	-0,68	-0,49	-0,33	-0,20
D5S2027	-0,25	-0,19	-0,14	-0,10	-0,07	-0,05	-0,03	-0,02	-0,01
D5S471	-0,48	-0,28	-0,17	-0,11	-0,07	-0,05	-0,03	-0,02	-0,01
D5S2115	-1,71	-1,35	-1,14	-0,93	-0,71	-0,51	-0,35	-0,22	-0,13
D5S436	-3,27	-2,00	-1,34	-0,89	-0,58	-0,36	-0,21	-0,10	-0,04
D5S410	-1,28	-0,93	-0,68	-0,49	-0,35	-0,24	-0,15	-0,09	-0,04
D5S422	-2,15	-1,36	-0,93	-0,65	-0,45	-0,30	-0,18	-0,10	-0,04
D5S400	-4,36	-2,36	-1,52	-1,0	-0,64	-0,39	-0,21	-0,1	-0,03
D5S408	-3,26	-1,11	-0,50	-0,18	0,00	0,10	0,14	0,15	0,12

Tabela 6. Valores de *lod-score* para marcadores do cromossomo 6.

<i>Marcador</i>	<i>Frequência de recombinação (cM)</i>								
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
D6S1574	-3,29	-1,44	-0,97	-0,65	-0,40	-0,21	-0,08	0,01	0,05
D6S309	-2,76	-1,81	-1,26	-0,87	-0,58	-0,36	-0,19	-0,08	-0,01
D6S470	-1,92	-1,31	-0,87	-0,54	-0,31	-0,14	-0,03	0,04	0,06
D6S289	-0,75	0,13	0,31	0,36	0,34	0,29	0,21	0,13	0,05
D6S422	-0,57	0,42	0,66	0,72	0,68	0,60	0,49	0,36	0,23
D6S276	-1,68	-0,45	-0,07	0,14	0,24	0,28	0,26	0,22	0,15
D6S1610	-0,69	0,05	0,33	0,46	0,51	0,49	0,44	0,36	0,26
D6S282	-2,15	-0,99	-0,45	-0,13	0,07	0,18	0,23	0,23	0,19
D6S257	-2,84	-1,06	-0,49	-0,16	0,05	0,18	0,24	0,25	0,21
D6S460	-3,71	-1,69	-0,95	-0,49	-0,19	0,00	0,11	0,16	0,15
D6S462	-2,79	-0,75	-0,37	-0,18	-0,06	0,01	0,05	0,06	0,06
D6S434	-2,77	-1,21	-0,63	-0,29	-0,08	0,05	0,12	0,14	0,12
D6S287	2,01	2,07	2,02	1,88	1,69	1,45	1,17	0,86	0,54
D6S262	-2,19	-0,55	-0,10	0,12	0,24	0,29	0,29	0,26	0,20
D6S308	-0,28	-0,21	-0,16	-0,12	-0,08	-0,06	-0,04	-0,02	-0,01
D6S441	-1,20	-0,59	-0,30	-0,12	-0,03	0,02	0,03	0,02	-0,00
D6S1581	-0,51	-0,41	-0,31	-0,22	-0,16	-0,12	-0,09	-0,07	-0,05
D6S264	-0,67	-0,45	-0,24	-0,07	0,03	0,08	0,09	0,07	0,04
D6S446	-1,73	-0,56	-0,22	-0,04	0,06	0,11	0,12	0,10	0,07
D6S281	-1,85	-1,35	-0,99	-0,71	-0,48	-0,31	-0,18	-0,09	-0,04

Tabela 7. Valores de *lod-score* para marcadores do cromossomo 7.

<i>Marcador</i>	<i>Frequência de recombinação (cM)</i>								
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
D7S531	-0,77	-0,60	-0,47	-0,36	-0,27	-0,20	-0,14	-0,1	-0,06
D7S517	-1,40	-1,12	-0,88	-0,68	-0,51	-0,38	-0,27	-0,18	-0,10
D7S513	-1,71	-1,09	-0,93	-0,88	-0,86	-0,82	-0,72	-0,56	-0,37
D7S507	-0,87	-0,91	-0,90	-0,84	-0,74	-0,61	-0,48	-0,34	-0,22
D7S493	-2,55	-1,82	-1,40	-1,09	-0,84	-0,63	-0,45	-0,30	-0,18
D7S516	-1,14	-1,11	-1,05	-0,95	-0,81	-0,66	-0,50	-0,36	-0,23
D7S484	-0,18	-0,09	-0,07	-0,09	-0,11	-0,13	-0,13	-0,12	-0,08
D7S510	-3,63	-1,95	-1,50	-1,16	-0,88	-0,63	-0,43	-0,27	-0,15
D7S519	-1,42	-1,19	-1,02	-0,83	-0,63	-0,43	-0,27	-0,15	-0,06
D7S502	-2,06	-1,48	-1,08	-0,77	-0,53	-0,35	-0,21	-0,11	-0,04
D7S669	-4,66	-2,41	-1,65	-1,17	-0,82	-0,56	-0,36	-0,21	-0,11
D7S630	-2,15	-1,84	-1,58	-1,32	-1,04	-0,78	-0,55	-0,35	-0,20
D7S657	-1,45	-1,44	-1,34	-1,16	-0,93	-0,70	-0,49	-0,31	-0,18
D7S515	-3,13	-1,47	-0,86	-0,48	-0,24	-0,08	0,02	0,07	0,08
D7S486	0,04	0,04	0,03	0,02	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00
D7S530	-0,30	-0,15	-0,05	0,03	0,08	0,11	0,12	0,12	0,1
D7S640	-3,06	-1,96	-1,55	-1,23	-0,95	-0,69	-0,47	-0,29	-0,15
D7S684	-2,56	-1,75	-1,31	-1,00	-0,76	-0,57	-0,40	-0,27	-0,17
D7S661	-1,01	-0,81	-0,64	-0,50	-0,39	-0,29	-0,21	-0,14	-0,08
D7S636	-1,92	-1,40	-1,08	-0,83	-0,62	-0,45	-0,31	-0,20	-0,11
D7S798	-2,25	-1,08	-0,77	-0,55	-0,37	-0,23	-0,12	-0,05	0,00
D7S2465	-2,21	-0,98	-0,51	-0,23	-0,05	0,05	0,09	0,1	0,08

Tabela 8. Valores de *lod-score* para marcadores do cromossomo 8.

<i>Marcador</i>	<i>Frequência de recombinação (cM)</i>								
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
D8S264	-1,73	-1,20	-0,79	-0,48	-0,27	-0,13	-0,05	-0,02	-0,01
D8S277	-1,01	-0,51	-0,23	-0,07	0,02	0,06	0,07	0,05	0,02
D8S550	-2,17	-0,75	-0,29	-0,04	0,11	0,18	0,19	0,17	0,12
D8S549	-2,80	-1,35	-0,86	-0,57	-0,38	-0,25	-0,16	-0,09	-0,04
D8S258	-2,54	-1,15	-0,72	-0,46	-0,29	-0,18	-0,11	-0,06	-0,03
D8S1771	-1,00	-0,79	-0,62	-0,48	-0,36	-0,27	-0,19	-0,12	-0,07
D8S505	-3,16	-2,51	-1,91	-1,41	-1,02	-0,71	-0,46	-0,28	-0,14
D8S285	-1,75	-0,53	-0,18	0,01	0,11	0,17	0,18	0,17	0,13
D8S260	-1,00	0,18	0,46	0,58	0,61	0,58	0,51	0,41	0,29
D8S270	-3,12	-0,66	-0,16	0,08	0,21	0,27	0,28	0,26	0,20
D8S1784	-2,61	-1,70	-1,18	-0,84	-0,59	-0,41	-0,27	-0,17	-0,10
D8S514	-2,20	-1,56	-1,12	-0,79	-0,53	-0,34	-0,19	-0,09	-0,02
D8S284	-3,57	-2,32	-1,52	-0,98	-0,60	-0,33	-0,15	-0,03	0,03
D8S272	-0,44	-0,33	-0,24	-0,18	-0,13	-0,08	-0,05	-0,03	-0,01

Tabela 9. Valores de *lod-score* para marcadores do cromossomo 9.

<i>Marcador</i>	<i>Frequência de recombinação (cM)</i>								
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
D9S288	-2,94	-1,34	-0,98	-0,82	-0,76	-0,72	-0,67	-0,57	-0,41
D9S286	-3,83	-2,30	-1,67	-1,25	-0,94	-0,69	-0,50	-0,34	-0,21
D9S285	-4,11	-3,00	-2,33	-1,84	-1,44	-1,10	-0,80	-0,54	-0,32
D9S157	-4,11	-2,80	-2,13	-1,66	-1,29	-0,98	-0,72	-0,49	-0,30
D9S171	-4,54	-3,08	-2,28	-1,77	-1,39	-1,06	-0,77	-0,52	-0,30
D9S161	-1,54	-0,75	-0,36	-0,15	-0,04	0,02	0,05	0,04	0,03
D9S1817	-1,67	-0,63	-0,37	-0,23	-0,15	-0,08	-0,04	-0,01	0,00
D9S273	-1,17	-0,67	-0,41	-0,24	-0,12	-0,05	-0,00	0,02	0,03
D9S175	-4,81	-2,31	-1,51	-1,06	-0,75	-0,50	-0,31	-0,17	-0,07
D9S167	-4,28	-2,12	-1,43	-1,05	-0,79	-0,57	-0,39	-0,23	-0,12
D9S283	-9,50	-4,64	-3,01	-1,97	-1,27	-0,78	-0,43	-0,20	-0,05
D9S287	-1,22	-0,99	-0,71	-0,49	-0,33	-0,21	-0,12	-0,06	-0,02
D9S1690	-3,63	-1,97	-1,43	-1,03	-0,72	-0,48	-0,29	-0,16	-0,07
D9S1677	-4,35	-2,63	-1,88	-1,43	-1,09	-0,82	-0,60	-0,40	-0,24
D9S1776	-2,67	-1,63	-1,00	-0,60	-0,33	-0,15	-0,04	0,03	0,05
D9S1682	-1,81	-1,41	-1,06	-0,78	-0,56	-0,39	-0,26	-0,16	-0,09
D9S290	-2,16	-0,41	0,01	0,23	0,34	0,38	0,38	0,33	0,25
D9S164	-2,13	-1,52	-1,13	-0,85	-0,63	-0,45	-0,31	-0,20	-0,11
D9S1826	-0,60	0,73	0,87	0,87	0,80	0,70	0,58	0,44	0,29
D9S158	-0,13	0,11	0,25	0,32	0,36	0,35	0,32	0,27	0,20

Tabela 10. Valores de *lod-score* para marcadores do cromossomo 10.

<i>Marcador</i>	<i>Frequência de recombinação (cM)</i>								
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
D10S249	-3,53	-1,76	-1,12	-0,69	-0,40	-0,20	-0,07	0,01	0,05
D10S591	-1,93	-0,75	-0,41	-0,23	-0,14	-0,09	-0,07	-0,07	-0,06
D10S189	-0,90	-0,53	-0,31	-0,19	-0,11	-0,07	-0,04	-0,03	-0,02
D10S547	-0,26	-0,08	0,03	0,1	0,13	0,15	0,15	0,13	0,1
D10S1653	-0,65	-0,41	-0,22	-0,08	0,03	0,09	0,13	0,14	0,12
D10S548	-2,07	-1,59	-1,16	-0,80	-0,52	-0,32	-0,18	-0,09	-0,04
D10S197	-0,98	-0,67	-0,41	-0,21	-0,06	0,03	0,09	0,10	0,09
D10S208	-0,78	-0,54	-0,31	-0,12	0,02	0,11	0,16	0,17	0,14
D10S196	-2,43	-2,14	-1,86	-1,55	-1,22	-0,90	-0,62	-0,40	-0,22
D10S1652	-3,30	-2,29	-1,72	-1,30	-0,97	-0,71	-0,49	-0,32	-0,18
D10S537	-2,52	-1,01	-0,57	-0,33	-0,19	-0,11	-0,06	-0,03	-0,02
D10S1686	-0,26	0,02	0,17	0,24	0,28	0,28	0,26	0,22	0,16
D10S185	-4,02	-1,66	-0,85	-0,40	-0,11	0,07	0,16	0,20	0,18
D10S192	-2,62	-1,60	-0,96	-0,54	-0,27	-0,09	0,02	0,07	0,09
D10S1693	-1,18	-0,86	-0,63	-0,46	-0,32	-0,21	-0,13	-0,07	-0,03
D10S587	-3,88	-2,37	-1,85	-1,51	-1,23	-0,97	-0,73	-0,51	-0,31
D10S217	0,63	0,64	0,62	0,58	0,53	0,47	0,40	0,32	0,23
D10S1651	-0,28	0,04	0,22	0,32	0,36	0,35	0,30	0,23	0,15
D10S212	0,05	0,11	0,14	0,15	0,15	0,14	0,12	0,10	0,07

Tabela 11. Valores de *lod-score* para marcadores do cromossomo 11.

<i>Marcador</i>	<i>Frequência de recombinação (cM)</i>								
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
D11S4046	-2,47	-2,02	-1,62	-1,26	-0,95	-0,69	-0,48	-0,31	-0,18
D11S1338	-2,65	-1,93	-1,59	-1,31	-1,04	-0,78	-0,55	-0,36	-0,20
D11S902	-3,96	-2,62	-2,14	-1,76	-1,41	-1,07	-0,77	-0,50	-0,29
D11S904	-2,18	-1,87	-1,51	-1,17	-0,86	-0,61	-0,41	-0,25	-0,13
D11S935	-1,13	-1,15	-1,16	-1,14	-1,06	-0,91	-0,71	-0,50	-0,31
D11S905	-0,02	-0,09	-0,21	-0,36	-0,51	-0,64	-0,67	-0,57	-0,38
D11S4191	-0,95	-0,81	-0,76	-0,73	-0,68	-0,59	-0,45	-0,31	-0,18
D11S987	-3,15	-1,96	-1,61	-1,35	-1,09	-0,82	-0,58	-0,37	-0,20
D11S1314	-3,78	-2,34	-1,67	-1,17	-0,78	-0,49	-0,28	-0,13	-0,03
D11S937	-3,58	-1,42	-0,85	-0,47	-0,21	-0,04	0,06	0,11	0,12
D11S901	-3,16	-1,92	-1,34	-0,94	-0,65	-0,43	-0,27	-0,14	-0,06
D11S4175	-0,78	-0,57	-0,42	-0,30	-0,21	-0,14	-0,09	-0,05	-0,02
D11S898	-1,66	-1,03	-0,63	-0,35	-0,17	-0,05	0,03	0,07	0,07
D11S908	-2,32	-1,28	-0,78	-0,46	-0,24	-0,10	-0,02	0,03	0,04
D11S925	-2,22	-1,31	-0,82	-0,51	-0,29	-0,14	-0,05	0,01	0,03
D11S4151	-3,77	-2,33	-1,73	-1,30	-0,97	-0,71	-0,50	-0,33	-0,20
D11S912	-3,64	-2,16	-1,57	-1,15	-0,84	-0,60	-0,42	-0,29	-0,18
D11S1320	-2,08	-1,65	-1,24	-0,91	-0,64	-0,44	-0,29	-0,17	-0,09
D11S968	-0,04	0,04	0,08	0,10	0,11	0,11	0,1	0,08	0,06

Tabela 12. Valores de *lod-score* para marcadores do cromossomo 12.

<i>Marcador</i>	<i>Frequência de recombinação (cM)</i>								
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
D12S352	-1,82	-1,39	-1,03	-0,75	-0,52	-0,35	-0,22	-0,12	-0,05
D12S99	-3,36	-2,59	-2,13	-1,78	-1,47	-1,15	-0,85	-0,58	-0,34
D12S336	-1,12	-0,52	-0,28	-0,15	-0,08	-0,03	-0,01	0,00	0,00
D12S364	-2,78	-1,93	-1,62	-1,45	-1,32	-1,18	-0,97	-0,72	-0,46
D12S310	-3,04	-1,97	-1,66	-1,48	-1,34	-1,15	-0,92	-0,66	-0,41
D12S1617	-1,23	-0,97	-0,77	-0,59	-0,44	-0,31	-0,20	-0,12	-0,06
D12S345	-1,10	-0,79	-0,55	-0,38	-0,24	-0,14	-0,07	-0,02	0,01
D12S85	-1,76	-1,52	-1,33	-1,12	-0,90	-0,69	-0,50	-0,33	-0,19
D12S368	-0,36	-0,42	-0,52	-0,65	-0,77	-0,85	-0,81	-0,66	-0,44
D12S83	-4,09	-2,60	-1,91	-1,40	-1,0	-0,68	-0,44	-0,25	-0,12
D12S326	-4,21	-2,65	-1,91	-1,37	-0,96	-0,64	-0,40	-0,22	-0,1
D12S1710	-3,61	-2,32	-1,56	-1,06	-0,70	-0,44	-0,25	-0,12	-0,03
D12S351	-4,48	-2,84	-2,03	-1,46	-1,04	-0,72	-0,47	-0,28	-0,14
D12S346	-1,91	-1,05	-0,65	-0,39	-0,21	-0,1	-0,03	0,01	0,03
D12S78	-1,63	-1,04	-0,75	-0,57	-0,43	-0,33	-0,25	-0,17	-0,11
D12S79	-1,17	-0,77	-0,49	-0,31	-0,18	-0,11	-0,06	-0,04	-0,03
D12S86	-1,82	-1,39	-1,03	-0,75	-0,52	-0,35	-0,22	-0,12	-0,05
D12S1659	-1,60	-1,18	-0,87	-0,65	-0,47	-0,34	-0,23	-0,15	-0,08
D12S1723	-1,73	-1,23	-1,03	-0,88	-0,72	-0,57	-0,43	-0,31	-0,20
D12S357	-3,39	-2,34	-1,78	-1,36	-1,01	-0,73	-0,50	-0,32	-0,18

Tabela 13. Valores de *lod-score* para marcadores do cromossomo 13.

<i>Marcador</i>	<i>Frequência de recombinação (cM)</i>								
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
D13S175	-1,57	-1,23	-0,91	-0,63	-0,42	-0,26	-0,14	-0,07	-0,02
D13S217	-2,37	-1,27	-0,99	-0,83	-0,69	-0,54	-0,39	-0,26	-0,14
D13S171	-1,29	-1,13	-0,86	-0,60	-0,39	-0,24	-0,13	-0,06	-0,01
D13S218	-2,00	-1,34	-0,93	-0,62	-0,38	-0,21	-0,10	-0,04	-0,01
D13S263	-1,30	-1,13	-0,95	-0,77	-0,59	-0,43	-0,30	-0,19	-0,10
D13S153	-1,22	-0,36	-0,08	0,1	0,19	0,22	0,21	0,16	0,10
D13S156	-1,89	-0,92	-0,49	-0,28	-0,16	-0,1	-0,06	-0,04	-0,03
D13S170	-1,51	-1,31	-1,14	-0,97	-0,80	-0,64	-0,49	-0,34	-0,21
D13S265	-3,65	-2,66	-1,99	-1,50	-1,11	-0,80	-0,56	-0,37	-0,22
D13S159	-3,01	-1,65	-1,13	-0,80	-0,59	-0,44	-0,32	-0,23	-0,15
D13S158	-2,75	-2,02	-1,54	-1,19	-0,90	-0,66	-0,46	-0,30	-0,17
D13S173	-2,16	-1,43	-1,13	-0,94	-0,79	-0,65	-0,51	-0,38	-0,25
D13S1265	-2,50	-0,94	-0,38	-0,06	0,14	0,24	0,28	0,27	0,21
D13S285	-1,57	-1,23	-0,91	-0,63	-0,42	-0,26	-0,14	-0,07	-0,02

Tabela 14. Valores de *lod-score* para marcadores do cromossomo 14.

<i>Marcador</i>	<i>Frequência de recombinação (cM)</i>								
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
D14S261	-0,98	-0,50	-0,30	-0,19	-0,13	-0,09	-0,06	-0,04	-0,03
D14S283	-1,35	-0,95	-0,65	-0,44	-0,30	-0,19	-0,12	-0,07	-0,04
D14S275	-3,78	-2,00	-1,22	-0,75	-0,44	-0,24	-0,10	-0,02	0,02
D14S70	-1,91	-1,35	-0,98	-0,72	-0,52	-0,37	-0,26	-0,17	-0,1
D14S288	-1,47	-1,19	-0,98	-0,80	-0,63	-0,48	-0,35	-0,24	-0,15
D14S63	-1,58	-0,72	-0,26	0,01	0,16	0,23	0,23	0,19	0,11
D14S258	-0,86	-0,56	-0,35	-0,21	-0,11	-0,04	0,00	0,03	0,03
D14S74	-3,15	-1,83	-1,29	-0,93	-0,68	-0,49	-0,34	-0,23	-0,14
D14S68	-0,28	-0,17	-0,09	-0,05	-0,02	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01
D14S280	-1,85	-1,45	-1,13	-0,87	-0,66	-0,49	-0,35	-0,23	-0,13
D14S65	-2,92	-1,96	-1,35	-0,92	-0,60	-0,37	-0,20	-0,09	-0,02
D14S985	-0,92	-0,58	-0,35	-0,20	-0,1	-0,03	0,01	0,03	0,03
D14S292	-2,82	-1,79	-1,45	-1,19	-0,97	-0,76	-0,56	-0,39	-0,24

Tabela 15. Valores de *lod-score* para marcadores do cromossomo 15.

<i>Marcador</i>	<i>Frequência de recombinação (cM)</i>								
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
D15S128	-0,81	-0,02	0,15	0,20	0,20	0,17	0,13	0,08	0,04
D15S1002	-2,10	-0,61	-0,14	0,11	0,24	0,30	0,31	0,27	0,21
D15S165	-0,37	0,74	0,89	0,89	0,82	0,71	0,56	0,39	0,22
D15S1007	-0,11	0,62	0,80	0,84	0,79	0,70	0,56	0,40	0,23
D15S971	-1,12	-0,23	0,04	0,16	0,21	0,21	0,17	0,12	0,06
D15S1012	-3,33	-1,77	-1,13	-0,73	-0,46	-0,28	-0,15	-0,06	-0,01
D15S994	-1,29	0,73	0,91	0,93	0,88	0,77	0,63	0,47	0,31
D15S659	-3,11	-0,99	-0,45	-0,17	-0,01	0,08	0,12	0,12	0,10
D15S978	-1,47	-1,13	-0,88	-0,69	-0,54	-0,42	-0,31	-0,22	-0,14
D15S1016	-3,22	-2,08	-1,50	-1,09	-0,78	-0,54	-0,36	-0,22	-0,12
D15S117	-3,10	-1,99	-1,47	-1,12	-0,84	-0,62	-0,45	-0,30	-0,18
D15S153	-0,79	-0,58	-0,53	-0,55	-0,62	-0,67	-0,65	-0,53	-0,35
D15S131	-4,31	-2,90	-2,20	-1,69	-1,29	-0,95	-0,68	-0,45	-0,26
D15S205	-1,98	-1,47	-1,12	-0,85	-0,64	-0,46	-0,32	-0,20	-0,11
D15S127	-1,53	-0,86	-0,50	-0,27	-0,12	-0,03	0,02	0,05	0,04
D15S130	-2,10	-0,61	-0,14	0,11	0,24	0,30	0,31	0,27	0,21
D15S120	-0,37	0,74	0,89	0,89	0,82	0,71	0,56	0,39	0,22

Tabela 16. Valores de *lod-score* para marcadores do cromossomo 16.

<i>Marcador</i>	<i>Frequência de recombinação (cM)</i>								
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
D16S423	0,40	0,42	0,41	0,39	0,35	0,29	0,21	0,14	0,07
D16S404	-0,95	-0,39	-0,20	-0,10	-0,05	-0,01	0,00	0,00	-0,00
D16S3075	-1,70	-1,43	-1,17	-0,92	-0,70	-0,53	-0,39	-0,28	-0,18
D16S3103	-1,55	-1,29	-1,05	-0,84	-0,66	-0,51	-0,38	-0,27	-0,18
D16S3046	-4,44	-2,99	-2,15	-1,57	-1,14	-0,81	-0,56	-0,37	-0,22
D16S3068	-3,77	-1,79	-1,03	-0,58	-0,28	-0,1	0,01	0,07	0,08
D16S3136	-3,20	-1,48	-0,88	-0,52	-0,28	-0,12	-0,02	0,04	0,06
D16S415	-0,47	-0,24	-0,09	0,01	0,07	0,11	0,12	0,11	0,09
D16S503	-2,81	-0,68	-0,17	0,11	0,26	0,34	0,36	0,32	0,25
D16S515	-3,29	-1,23	-0,63	-0,31	-0,12	-0,01	0,04	0,05	0,04
D16S516	-3,84	-2,33	-1,61	-1,13	-0,78	-0,52	-0,32	-0,18	-0,08
D16S3091	-3,34	-1,97	-1,42	-1,05	-0,76	-0,54	-0,37	-0,23	-0,12
D16S520	-1,70	-1,43	-1,17	-0,92	-0,70	-0,53	-0,39	-0,28	-0,18

Tabela 17. Valores de *lod-score* para marcadores do cromossomo 17.

<i>Marcador</i>	<i>Frequência de recombinação (cM)</i>								
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
D17S849	-3,79	-2,06	-1,33	-0,88	-0,57	-0,35	-0,19	-0,08	-0,01
D17S831	-2,65	-1,12	-0,66	-0,37	-0,18	-0,05	0,02	0,06	0,07
D17S938	-2,15	-1,35	-0,89	-0,58	-0,36	-0,20	-0,09	-0,02	0,01
D17S1852	-1,64	-0,79	-0,35	-0,08	0,09	0,18	0,21	0,20	0,15
D17S796	-3,22	-2,30	-1,74	-1,32	-0,98	-0,70	-0,47	-0,29	-0,16
D17S799	0,43	0,53	0,55	0,54	0,49	0,43	0,35	0,27	0,18
D17S921	-0,1	-0,07	-0,05	-0,04	-0,03	-0,02	-0,01	-0,01	-0,00
D17S1857	-0,75	-0,53	-0,37	-0,25	-0,16	-0,09	-0,04	-0,01	0,01
D17S798	-0,90	-0,62	-0,42	-0,27	-0,16	-0,08	-0,02	0,01	0,03
D17S1868	0,32	0,30	0,27	0,24	0,21	0,18	0,15	0,12	0,08
D17S787	-1,80	-0,88	-0,47	-0,22	-0,07	0,02	0,07	0,09	0,08
D17S944	-0,32	0,09	0,23	0,28	0,28	0,25	0,20	0,13	0,07
D17S949	-0,66	-0,53	-0,43	-0,35	-0,27	-0,21	-0,16	-0,11	-0,07
D17S785	-0,42	-0,20	-0,07	0,00	0,04	0,04	0,03	0,01	-0,01
D17S784	-1,96	-1,16	-0,77	-0,52	-0,35	-0,22	-0,13	-0,07	-0,03
D17S928	-3,79	-2,06	-1,33	-0,88	-0,57	-0,35	-0,19	-0,08	-0,01

Tabela 18. Valores de *lod-score* para marcadores do cromossomo 18.

<i>Marcador</i>	<i>Frequência de recombinação (cM)</i>								
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
D18S59	-0,23	-0,07	0,02	0,08	0,12	0,13	0,13	0,12	0,09
D18S63	-0,95	-0,51	-0,24	-0,07	0,04	0,1	0,11	0,10	0,07
D18S452	-2,50	-0,48	-0,03	0,18	0,27	0,30	0,28	0,24	0,18
D18S464	-2,83	-1,65	-1,08	-0,72	-0,46	-0,28	-0,15	-0,06	-0,01
D18S53	-3,47	-2,36	-1,75	-1,29	-0,94	-0,65	-0,43	-0,26	-0,14
D18S478	-2,38	-1,93	-1,55	-1,21	-0,91	-0,65	-0,43	-0,26	-0,14
D18S1102	-3,35	-1,64	-0,97	-0,55	-0,27	-0,08	0,04	0,09	0,10
D18S474	-1,64	-1,32	-1,13	-0,97	-0,81	-0,65	-0,49	-0,34	-0,21
D18S64	-2,76	-1,77	-1,29	-0,96	-0,70	-0,51	-0,35	-0,23	-0,14
D18S68	-2,81	-1,62	-1,09	-0,76	-0,51	-0,34	-0,21	-0,13	-0,08
D18S61	-3,79	-2,46	-1,88	-1,48	-1,16	-0,88	-0,64	-0,43	-0,25
D18S1161	-2,66	-1,98	-1,59	-1,32	-1,10	-0,91	-0,73	-0,55	-0,36
D18S462	-2,55	-1,32	-1,05	-0,91	-0,80	-0,70	-0,58	-0,44	-0,30
D18S70	-2,55	-1,44	-0,94	-0,63	-0,41	-0,26	-0,15	-0,08	-0,03

Tabela 19. Valores de *lod-score* para marcadores do cromossomo 19.

<i>Marcador</i>	<i>Frequência de recombinação (cM)</i>								
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
D19S209	-2,40	-1,64	-1,20	-0,90	-0,67	-0,49	-0,35	-0,24	-0,15
D19S216	-2,95	-1,89	-1,34	-0,97	-0,70	-0,49	-0,34	-0,21	-0,12
D19S884	-2,52	1,05	1,42	1,48	1,39	1,22	0,98	0,72	0,44
D19S221	-0,12	0,01	0,11	0,18	0,21	0,21	0,19	0,15	0,11
D19S226	-1,17	-0,92	-0,73	-0,58	-0,47	-0,37	-0,28	-0,20	-0,13
D19S414	-2,83	-2,10	-1,67	-1,34	-1,06	-0,81	-0,60	-0,42	-0,26
D19S220	-1,13	-0,95	-0,77	-0,60	-0,46	-0,34	-0,23	-0,15	-0,09
D19S420	-1,83	-1,61	-1,40	-1,20	-1,00	-0,81	-0,62	-0,44	-0,28
D19S902	-0,07	0,08	0,13	0,14	0,12	0,09	0,06	0,03	0,01
D19S571	0,18	0,07	-0,05	-0,17	-0,24	-0,27	-0,26	-0,23	-0,18
D19S418	-0,69	-0,27	-0,07	0,04	0,09	0,10	0,09	0,07	0,04
D19S210	-2,40	-1,64	-1,20	-0,90	-0,67	-0,49	-0,35	-0,24	-0,15

Tabela 20. Valores de *lod-score* para marcadores do cromossomo 20.

<i>Marcador</i>	<i>Frequência de recombinação (cM)</i>								
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
D20S117	-3,58	-1,73	-1,06	-0,65	-0,38	-0,20	-0,08	-0,01	0,02
D20S889	-1,27	-0,92	-0,68	-0,50	-0,36	-0,25	-0,16	-0,1	-0,05
D20S115	0,54	0,59	0,57	0,51	0,43	0,33	0,23	0,14	0,06
D20S186	-1,31	-0,99	-0,76	-0,60	-0,47	-0,36	-0,27	-0,19	-0,12
D20S112	-2,97	-1,09	-0,55	-0,25	-0,07	0,04	0,09	0,11	0,09
D20S195	-2,06	-0,78	-0,35	-0,20	-0,18	-0,25	-0,36	-0,44	-0,41
D20S107	-2,99	-2,05	-1,41	-0,95	-0,61	-0,37	-0,20	-0,08	-0,01
D20S119	-2,09	-0,95	-0,46	-0,19	-0,03	0,06	0,11	0,11	0,1
D20S178	-1,46	-1,20	-0,97	-0,74	-0,51	-0,32	-0,17	-0,07	-0,01
D20S196	-0,71	-0,24	-0,01	0,11	0,17	0,18	0,16	0,12	0,07
D20S100	-3,05	-1,58	-0,99	-0,65	-0,43	-0,27	-0,15	-0,06	-0,01
D20S171	-2,06	-1,38	-0,99	-0,70	-0,48	-0,32	-0,20	-0,13	-0,07
D20S173	-1,96	-1,14	-0,68	-0,38	-0,17	-0,04	0,04	0,08	0,08

Tabela 21. Valores de *lod-score* para marcadores do cromossomo 21.

<i>Marcador</i>	<i>Frequência de recombinação (cM)</i>								
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
D21S1256	-4,29	-1,81	-1,24	-0,91	-0,68	-0,50	-0,36	-0,24	-0,15
D21S1914	-8,95	-2,66	-1,54	-0,90	-0,49	-0,23	-0,05	0,04	0,08
D21S263	-3,02	-1,12	-0,66	-0,41	-0,26	-0,16	-0,09	-0,05	-0,02
D21S1252	-6,17	-1,45	-0,56	-0,12	0,11	0,24	0,29	0,28	0,22
D21S266	-1,25	0,89	1,01	0,98	0,89	0,75	0,59	0,42	0,26

Tabela 22. Valores de *lod-score* para marcadores do cromossomo 22.

<i>Marcador</i>	<i>Frequência de recombinação (cM)</i>								
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
D22S420	-3,73	-2,04	-1,34	-0,87	-0,55	-0,32	-0,19	-0,12	-0,10
D22S539	-5,32	-0,69	-0,18	0,02	0,1	0,11	0,09	0,06	0,04
D22S315	-5,70	-2,38	-1,46	-0,93	-0,59	-0,37	-0,23	-0,14	-0,08
D22S280	-6,82	-2,83	-1,61	-0,94	-0,53	-0,29	-0,15	-0,08	-0,05
D22S283	-5,08	-2,96	-2,28	-1,90	-1,65	-1,44	-1,20	-0,90	-0,57
D22S423	-5,76	-2,84	-1,94	-1,36	-0,96	-0,66	-0,44	-0,27	-0,15
D22S274	-1,58	-1,46	-1,34	-1,17	-0,94	-0,70	-0,50	-0,33	-0,19

ANEXO V- Parecer do CEP e do CONEP



CEP, 13/02/01
(Grupo I)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

☒ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas-S.P.
☎ 0 19 7888936
fax 0 19 7888925
✉ cep@head.fcm.unicamp.br

PARECER PROJETO: Nº 383/2000

I-IDENTIFICAÇÃO:

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

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Fábio Rossi Torres

INSTITUIÇÃO: Departamento de Genética Médica/FCM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP : 16/01/2001

II - OBJETIVOS

Os objetivos do estudo são delimitar se as DCC- Desordens de Desenvolvimento Cortical na amostra de pacientes estão relacionadas com as mutações descritas em literatura e estabelecer a correlação genótipo-fenótipo entre os diversos tipos de mutação e os sintomas clínicos do paciente.

III - SUMÁRIO

A identificação dos pacientes com quadro clínico sugestivo de DDC será feita através de critérios diagnósticos já descritos na literatura . Esta etapa será realizada através da colaboração dos docentes responsáveis pelos ambulatórios de Epilepsia Infantil, Epilepsia e Neurogenética. A caracterização detalhada dos aspectos de neuroimagem se realizara no Laboratório de Neuro-imagem do Departamento de Neurologia da FCM/UNICAMP. Os indivíduos selecionados serão convidados a participar do projeto e será solicitada a assinatura de um formulário de consentimento pós-informação.

Para assegurar que toda a manipulação da informação clínica e molecular seja confidencial, questionários clínicos e amostras de sangue e de DNA serão identificados por um código comum designado no momento em que o indivíduo entrar 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. Dados para serem usados em diagnóstico preditivo de indivíduos assintomáticos, com risco de desenvolver a doença, não serão gerados por este projeto.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

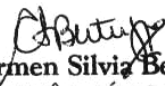
O projeto está bem estruturado. O risco a que o paciente é submetido é mínimo. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é claro e adequado. Acreditamos que o projeto não tenha problemas éticos, estando de acordo com a Resolução 196/96 CNS-MS.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado

VI - DATA DA REUNIÃO

Homologado na II Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 13 de fevereiro de 2001.


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



PARECER Nº 516/2001

Registro CONEP = 2178 (Este nº deverá ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Protocolo CEP = 383/2000

Processo nº 25000.023733/2001-32

Projeto de Pesquisa: *"Estudo das mutações em genes responsáveis por diferentes formas de desordem do desenvolvimento cortical".*

Pesquisador Responsável: Dr Fábio Rossi Torres

Instituição: Universidade Estadual de Campinas / UNICAMP

Área Temática Especial: Genética Humana.

Ao se proceder à análise do protocolo em questão, cabem as seguintes considerações:

a) as informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Res. CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos,

b) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEP da instituição supracitada.

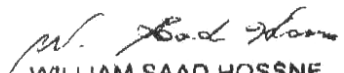
Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta - se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, com as seguintes recomendações a serem acompanhadas pelo CEP :

1- O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE deve ser escrito em uma linguagem mais acessível ao sujeito da pesquisa : os termos técnicos devem ser substituídos e a estrutura das frases simplificadas.

2- O CEP deve acompanhar o processo de recrutamento, uma vez que trata-se de sujeitos vulneráveis - crianças e/ou sujeitos com deficiência mental.

Situação : Projeto aprovado com recomendações.

Brasília, 24 de maio de 2001


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP-MS



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER N° 006/98 - CEP/FCM

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

PESQUISADOR: Iscia Lopes Cendes

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

CEP/FCM, 06/02/98.


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

