



MARINA COELHO GONSALES

**“ESTUDOS MOLECULARES EM EPILEPSIAS DA INFÂNCIA E DA
ADOLESCÊNCIA: AVALIANDO O POTENCIAL DE APLICAÇÃO
CLÍNICA DOS TESTES DE GENÉTICA MOLECULAR”**

CAMPINAS
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MARINA COELHO GONSALES

**“ESTUDOS MOLECULARES EM EPILEPSIAS DA INFÂNCIA E DA
ADOLESCÊNCIA: AVALIANDO O POTENCIAL DE APLICAÇÃO
CLÍNICA DOS TESTES DE GENÉTICA MOLECULAR”**

Orientadora: Profa. Dra. Iscia Teresinha Lopes Cendes

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

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA MARINA COELHO GONSALES E ORIENTADA PELA PROF^ª. DR^ª. ISCIA TERESINHA LOPES CENDES

Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

G588e Gonsales, Marina Coelho, 1985-
Estudos moleculares em epilepsias da infância e da
adolescência : avaliando o potencial de aplicação clínica
dos testes de genética molecular / Marina Coelho
Gonsales. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Iscia Teresinha Lopes Cendes.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neurogenética. 2. Mutação. 3. Canais iônicos. 4.
Receptores de GABA. 5. EFHC1. I. Lopes-Cendes, Iscia
Teresinha, 1964-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Molecular studies in childhood and adolescence epilepsies :
evaluating the potential clinical applicability of molecular genetic testing

Palavras-chave em inglês:

Neurogenetics

Mutation

Ion channels

Receptors, GABA

EFHC1

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Iscia Teresinha Lopes Cendes [Orientador]

Ana Lucia Brunialti Godard

Marilia de Arruda Cardoso Smith

Monica Barbosa Melo

Li Li Min

Data da defesa: 31-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MARINA COELHO GONSALES

Orientador (a) PROF(A). DR(A). ISCIA TERESINHA LOPES CENDES

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). ISCIA TERESINHA LOPES CENDES



2. PROF(A). DR(A). ANA LUCIA BRUNIALTI GODARD



3. PROF(A). DR(A). MARILIA DE ARRUDA CARDOSO SMITH



4. PROF(A).DR(A). MONICA BARBOSA DE MELO



5. PROF(A).DR(A). LI LI MIN



Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 31 de julho de 2013

DEDICATÓRIA

*A minha mãe Miriam, ao meu irmão Murilo
e ao meu namorado Alexandre, que estiveram ao
meu lado acompanhando cada etapa desta jornada.*

Este trabalho é fruto de anos de dedicação e esforço conjunto. Gostaria de agradecer aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta tese:

A minha mãe, pelo amor e carinho incondicionais, por me fornecer as bases para ser a pessoa que sou hoje, e por todos os esforços que realizou para que eu pudesse trilhar o caminho que escolhi.

Ao meu irmão, por todo o apoio e companheirismo, por me aturar nos momentos difíceis e por sempre demonstrar interesse no que faço.

Ao Alexandre, companheiro de todos os momentos, que sempre torceu por mim, me deu forças e vivenciou toda a minha jornada acadêmica. E mesmo não estando presente fisicamente na reta final, acompanhou de longe mais uma conquista. Obrigada por todo amor, dedicação e respeito ao longo desses anos, te amo imensamente!

À Dra. Iscia, por ter aberto as portas de seu laboratório para mim há oito anos, e desde então por ter aberto tantas outras portas e fornecido oportunidades que me permitiram crescer pessoal e profissionalmente. Agradeço por acreditar e confiar em mim.

Aos membros da banca examinadora, por todas as contribuições e comentários pertinentes que ajudaram a enriquecer este trabalho.

Aos colaboradores deste projeto, pelos esforços para o recrutamento dos pacientes e obtenção dos dados clínicos.

Aos pacientes e familiares, pelo consentimento em participar da pesquisa, permitindo que este trabalho fosse realizado.

A todos que fazem ou fizeram parte do nosso querido laboratório (incluo aqui os laboratórios de Genética Molecular, Citogenética, Zebrafish e Bioinformática), lugar tão especial que consegue reunir pessoas maravilhosas ao longo dos anos. Em especial:

Aos excelentes alunos de iniciação científica e estágio (Felipe, Camila, Maiara e Thiago), que me acompanharam e ajudaram na execução dos experimentos deste trabalho.

Aos colegas e amigos de tantos anos: Simone, Romênia, Danizinha, Luciana, Milena, Aline, Renato Zé Bola, Fernando, Ilária, Fábio Rossi, Danyella, Cláudia, Secolin, e muitos outros: obrigada por tornarem o ambiente de trabalho um lugar muito mais agradável.

AGRADECIMENTOS

Aos que chegaram mais tarde no laboratório, mas logo ganharam minha amizade: Simoni, Alexandre, Taty, Karina, Marcella, Paty, Luciana Rezende.

Aos queridos colegas do memorável *Gondola Group*: Jan, Noora, Marie, Hugo, Diana, Helene e aos tutores Friedman e Kokaia, pela incrível experiência de criar um projeto científico multidisciplinar tão rico; e também aos outros companheiros da ilha veneziana, pelas semanas de ótima convivência.

À Profa. Marianne Voz e ao pessoal do laboratório de biologia molecular do GIGA de Liège, por todos os ensinamentos, e aos brasileiros do CHU Gustavo e Clarissa, pela companhia e almoços em português.

Às pessoas tão especiais que conheci em Liège: Tany, Maria(s), Julie, Ivana, Joana, Cristian, David, Pao-Chi, Celia, Lucia, Edoardo, Nadia, Herman, Alexa, Jéssica, e tantas outras, pelos momentos inesquecíveis e por tornarem minha estadia muito mais alegre.

Aos companheiros das aulas de inglês, que fizeram o esforço de acordar cedo nas manhãs de sábado valer a pena.

Aos amigos de infância, que até hoje fazem parte essencial de minha vida, mesmo estando tão distantes geograficamente: Isabel, Mariana e Daniel.

Aos amigos do ensino médio, que em meio a encontros e desencontros ainda ocupam lugar especial no meu coração: José Octávio, Stefan, Filéps, Flávia e Klaus.

Aos colegas de graduação da turma de biologia 03D UNICAMP, que apesar dos diferentes rumos tomados, continuam a compartilhar a paixão pela Ciência.

Aos amigos de ontem e de sempre do extinto fórum SS, pelos anos de amizade mantidos independente da distância.

Às agências de fomento CNPq, FAPESP e CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos funcionários das secretarias do departamento de Genética Médica e da pós-graduação, por todo apoio e serviços prestados.

E por último deixo o meu agradecimento mais especial a Deus, por sempre me dar forças para prosseguir apesar das dificuldades.

	PÁG.
<i>RESUMO</i>	<i>xiii</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>xv</i>
<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i>	<i>xvii</i>
<i>LISTA DE QUADROS E TABELAS</i>	<i>xx</i>
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	<i>xxiii</i>
1. INTRODUÇÃO	27
1.1. EPILEPSIA	28
1.2. GENÉTICA DAS EPILEPSIAS	31
1.3. TESTES GENÉTICOS EM EPILEPSIAS.....	35
1.4. ESPECTRO DA EPILEPSIA GENERALIZADA COM CRISES FEBRIS	36
1.4.1. GENE <i>SCN1A</i>	38
1.4.2. GENE <i>SLC2A1</i>	40
1.5. EPILEPSIAS IDIOPÁTICAS GENERALIZADAS COMUNS	41
1.5.1. GENE <i>EFHC1</i>	42
1.5.2. GENE <i>GABRA1</i>	45
1.5.3. GENE <i>SLC2A1</i>	46
1.6. CONSIDERAÇÕES GERAIS	46
2. OBJETIVOS	47
3. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1. ASPECTOS ÉTICOS.....	50
3.2. CASUÍSTICA	50
3.3. MÉTODOS	51
3.3.1. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	51
3.3.2. AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE INTERESSE.....	52
3.3.3. DETECÇÃO DE MUTAÇÕES.....	55
3.3.4. ANÁLISES DOS DADOS	56
3.3.5. ANÁLISES DE PREDIÇÃO DE POTENCIAL DELETÉRIO	57
3.3.6. INVESTIGAÇÃO EM GRUPO CONTROLE.....	60
3.3.7. <i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i> (MLPA).....	60
3.3.8. COMPILAÇÃO DE MUTAÇÕES DESCRITAS	62

	<i>PÁG.</i>
4. <i>RESULTADOS</i>	63
4.1. ESPECTRO DA EPILEPSIA GENERALIZADA COM CRISES FEBRIS	64
4.1.1. GENE <i>SCN1A</i>	64
4.1.1.1. TRIAGEM DE MUTAÇÕES EM PACIENTES.....	64
4.1.1.2. COMPILAÇÃO DE MUTAÇÕES DESCRITAS	77
4.1.2. GENE <i>SLC2A1</i>	83
4.1.2.1. TRIAGEM DE MUTAÇÕES EM PACIENTES.....	83
4.1.2.2. COMPILAÇÃO DE MUTAÇÕES DESCRITAS	83
4.2. EPILEPSIAS IDIOPÁTICAS GENERALIZADAS COMUNS	85
4.2.1. GENE <i>SCL2A1</i>	85
4.2.1.1. TRIAGEM DE MUTAÇÕES EM PACIENTES.....	85
4.2.1.2. COMPILAÇÃO DE MUTAÇÕES DESCRITAS	85
4.2.2. GENE <i>EFHC1</i>	88
4.2.2.1. TRIAGEM DE MUTAÇÕES EM PACIENTES.....	88
4.2.2.2. COMPILAÇÃO DE MUTAÇÕES DESCRITAS	92
4.2.3. GENE <i>GABRA1</i>	96
4.2.3.1. TRIAGEM DE MUTAÇÕES EM PACIENTES.....	96
4.2.3.2. COMPILAÇÃO DE MUTAÇÕES DESCRITAS	96
5. <i>DISCUSSÃO</i>	97
5.1. EPILEPSIAS GENERALIZADAS COM CRISES FEBRIS	98
5.1.1. GENE <i>SCN1A</i>	98
5.1.2. GENE <i>SLC2A1</i>	108
5.2. EPILEPSIAS IDIOPÁTICAS GENERALIZADAS COMUNS	109
5.2.1. GENE <i>SLC2A1</i>	109
5.2.2. GENE <i>EFHC1</i>	112
5.2.3. GENE <i>GABRA1</i>	118
5.3. CONSIDERAÇÕES GERAIS	119
6. <i>CONCLUSÕES</i>	121
7. <i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	125
8. <i>ANEXOS E APÊNDICES</i>	135

RESUMO

As epilepsias são distúrbios cerebrais caracterizados por uma predisposição persistente para a geração de crises epiléticas, que são interrupções transitórias no funcionamento normal do sistema nervoso. Acredita-se que a maioria das epilepsias relacionadas com idade de início precoce possui etiologia presumivelmente genética. Sendo assim, elas representam um grupo para o qual o uso de testes genéticos seria potencialmente benéfico. Os objetivos principais deste trabalho foram: a caracterização das bases moleculares de diferentes formas de epilepsia da infância e da adolescência e a avaliação do potencial dos genes candidatos estudados para a utilização em testes genéticos para fins clínicos. A estratégia empregada foi a triagem de mutações nos seguintes genes: *SCN1A*, em pacientes com síndromes de Dravet e de Doose; *SCL2A1* em pacientes com síndrome de Doose e epilepsias idiopáticas generalizadas (EIGs), especialmente a epilepsia mioclônica juvenil (EMJ); e *EFHC1* e *GABRA1*, em pacientes com EMJ e outras formas comuns de EIGs. A triagem de mutações foi realizada por sequenciamento automático pela técnica de Sanger. As alterações potencialmente deletérias foram investigadas em um grupo controle composto por 100 indivíduos sem epilepsia. O potencial deletério das substituições que resultam em troca do resíduo de aminoácido na proteína codificada foi estimado utilizando-se diferentes algoritmos de predição. As mutações previamente descritas na literatura foram compiladas e analisadas quanto a sua provável localização na proteína e predição de efeito deletério. Análises por *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) foram realizadas para a detecção de variações no número de cópias de *SCN1A*. A análise de mutações no gene *SCN1A* revelou alterações potencialmente deletérias em 81% dos pacientes com síndrome de Dravet, e em apenas um paciente com síndrome de Doose. Esses dados, juntamente com os resultados das análises de compilação das mutações descritas na literatura, sugerem que o teste genético em *SCN1A* para fins clínicos seria altamente recomendável em indivíduos com síndrome de Dravet, mas não para os com síndrome de Doose típica. O gene *SLC21A* não parece estar envolvido na etiologia da síndrome de Doose e das EIGs em nossa casuística. A frequência de alterações potencialmente deletérias no gene *EFHC1* em indivíduos com EMJ foi relativamente baixa, sugerindo que esse gene não seja o principal causador dessa epilepsia, embora possa ser um fator de predisposição. Por fim, o gene *GABRA1* não parece conferir predisposição para as EIGs comuns em nossa casuística.

ABSTRACT

Epilepsy is a brain disorder characterized by a long lasting predisposition to generate epileptic seizures, which are transient interruptions of normal brain function. Most epilepsies with early onset presumably have a genetic etiology. Thus, they represent a group for which the use of genetic testing would be potentially beneficial. The main goals of this study were to characterize the molecular basis of different forms of epilepsy in childhood and adolescence and to evaluate the potential clinical use of genetic testing in the context of these disorders. To achieve these goals we searched for mutations in the following genes: *SCN1A* in patients with Dravet and Doose syndromes; *SLC2A1* in patients with Doose syndrome and idiopathic generalized epilepsies (IGEs), particularly juvenile myoclonic epilepsy (JME); and *EFHC1* and *GABRA1* in patients with JME and other common forms of IGEs. Mutation screening was performed by automated Sanger sequencing using capillary electrophoresis. Potentially deleterious nucleotide changes found were subsequently investigated in a control group of 100 individuals without epilepsy. In addition, the deleterious potential of amino acid changes identified was estimated using different prediction algorithms. Mutations previously described in the literature were compiled and analyzed regarding their putative location on the protein and predicted deleterious effect. Furthermore, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) analyzes were performed to detect the presence of copy number variations in *SCN1A*. Our results showed potentially deleterious variants in *SCN1A* in 81% of patients with Dravet syndrome, but only in one patient with Doose syndrome. These data, along with the results of the compilation of mutations reported in the literature suggest that genetic testing for *SCN1A* is clinically relevant in Dravet syndrome, but not in typical Doose syndrome. *SLC2A1* does not seem to be involved in the etiology of Doose syndrome and IGEs in our cohort. The frequency of potentially deleterious changes in *EFHC1* in individuals with JME was relatively low, suggesting that this gene is not the main cause of this form of epilepsy, although it may be a predisposing factor. Lastly, *GABRA1* does not seem to confer predisposition to common IGEs in our cohort.

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>ARX</i>	gene contendo homeobox relacionado ao domínio <i>aristaless</i>
<i>ATPIA2</i>	gene que codifica a subunidade alfa 2 da proteína ATPase sódio-potássio
<i>BRD2</i>	gene que codifica a proteína contendo bromodominio 2
<i>CACNA1A</i>	gene que codifica o canal de cálcio voltagem-dependente tipo P/Q
<i>CACNB4</i>	gene que codifica a subunidade beta 4 do canal de cálcio voltagem-dependente
<i>CHRNA2</i>	gene que codifica a subunidade alfa 2 do receptor colinérgico nicotínico
<i>CHRNA4</i>	gene que codifica a subunidade alfa 4 do receptor colinérgico nicotínico
<i>CHRNA7</i>	gene que codifica a subunidade alfa 7 do receptor colinérgico nicotínico
<i>CLCN2</i>	gene que codifica o canal de cloro voltagem-dependente tipo 2
<i>CX36</i>	gene que codifica o subtipo 36 da conexina
CTCG	crises tônico-clônicas generalizadas
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
dNTP	<i>deoxyribonucleotide triphosphates</i> (desoxirribonucleotídeos trifosfato)
EAI	epilepsia ausência da infância
EAJ	epilepsia ausência juvenil
EEG	eletroencefalograma
EIG	epilepsia idiopática generalizada
<i>EFHC1</i>	gene que codifica a proteína contendo um domínio EF-hand (C-terminal)
EMJ	epilepsia mioclônica juvenil
GABA _A	ácido gama-aminobutírico tipo A
<i>GABRA1</i>	gene que codifica a subunidade alfa 1 do receptor de ácido gama-aminobutírico tipo A

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>GABRB1</i>	gene que codifica a subunidade beta 1 do receptor de ácido gama-aminobutírico tipo A
<i>GABRD</i>	gene que codifica a subunidade delta do receptor de ácido gama-aminobutírico tipo A
<i>GABRG2</i>	gene que codifica a subunidade gama 2 do receptor de ácido gama-aminobutírico tipo A
GEFS+	<i>generalized epilepsy with febrile seizures plus</i> (epilepsia generalizada com crises febris <i>plus</i>)
GLUT1	proteína transportadora de glicose do tipo 1
<i>GRIK1</i>	gene que codifica o receptor de cainato 1
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i> (Liga Internacional de Epilepsia)
Kb	quilobases
<i>KCNA1</i>	gene que codifica o canal de potássio voltagem-dependente K _v 1.1
<i>KCNMA1</i>	gene que codifica a subunidade alfa 1 do canal de potássio ativado por cálcio
<i>KCNQ2</i>	gene que codifica o canal de potássio voltagem-dependente K _v 7.2
<i>KCNQ3</i>	gene que codifica o canal de potássio voltagem-dependente K _v 7.3
<i>LGII</i>	gene <i>leucine rich, glioma inactivated 1</i>
MLPA	<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
MAS	<i>multiple sequence alignment</i> (alinhamento de múltiplas sequências)
Na _v 1.1	subunidade alfa 1 do canal de sódio voltagem-dependente
<i>PCDH19</i>	gene que codifica a protocaderina 19
PSIC	<i>position-specific independent counts</i>
PWM	<i>position weight matrices</i> (matrizes de peso posicional)
RF	<i>random forest</i> (floresta aleatória)

LISTA DE ABREVIATURAS

RNA _m	<i>ribonucleic acid</i> (ácido ribonucléico) mensageiro
rpm	rotações por minuto
<i>SCN1A</i>	gene que codifica a subunidade alfa 1 do canal de sódio voltagem-dependente
<i>SCN1B</i>	gene que codifica a subunidade beta 1 do canal de sódio voltagem-dependente
<i>SCN2A</i>	gene que codifica a subunidade alfa 2 do canal de sódio voltagem-dependente
<i>SCN9A</i>	gene que codifica a subunidade alfa 9 do canal de sódio voltagem-dependente
<i>SLC2A1</i>	gene que codifica a proteína transportadora de glicose do tipo 1
<i>STK9/CDKL5</i>	gene que codifica a quinase dependente de ciclina
<i>STXBP1</i>	gene que codifica a proteína ligante de syntaxina 1
SNC	sistema nervoso central
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> (polimorfismo de base única)
SVM	<i>support vector machine</i> (máquina de vetores de suporte)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reação da cadeia da polimerase)

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	<i>PÁG.</i>
Quadro 1. Síndromes eletroclínicas organizadas por faixa etária de início.....	30
Quadro 2. Métodos utilizados na identificação de genes candidatos em epilepsias.....	32
Quadro 3. Principais genes relatados como associados a epilepsias até o momento.....	34
Quadro 4. <i>Loci</i> gênicos e genes identificados para EMJ e outras EIGs comuns.....	43
Tabela 1. Sequências dos <i>primers</i> para amplificação dos éxons do gene <i>SCN1A</i>	53
Tabela 2. Sequências dos <i>primers</i> para amplificação dos éxons do gene <i>SLC2A1</i>	54
Tabela 3. Sequências dos <i>primers</i> para amplificação dos éxons do gene <i>EFHC1</i>	54
Tabela 4. Sequências dos <i>primers</i> para amplificação dos éxons do gene <i>GABRA1</i>	54
Tabela 5. Alterações potencialmente deletérias encontradas no gene <i>SCN1A</i> nos pacientes com síndrome de Dravet estudados.	64
Tabela 6. Predição do potencial deletério das alterações <i>missense</i> encontradas no gene <i>SCN1A</i> em pacientes com síndrome de Dravet.....	67
Tabela 7. Predição do efeito nos motivos que sinalizam para o processo de <i>splicing</i> das alterações em junções éxon-íntron do gene <i>SCN1A</i> em pacientes com síndrome de Dravet.....	69
Tabela 8. Resultados das análises de predição do potencial deletério da alteração p.I1955T no gene <i>SCN1A</i>	73
Tabela 9. Frequências alélicas da alteração c.5864T>C em estudos populacionais.....	75
Tabela 10. Resultados das análises de predição do potencial deletério da alteração p.A1067T no gene <i>SCN1A</i>	75
Tabela 11. Resultados das análises de predição do potencial deletério da alteração p.A23V no gene <i>SCN1A</i>	76
Tabela 12. Frequências alélicas da alteração c.68C>T em estudos populacionais.....	76
Tabela 13. Alterações em <i>SCN1A</i> em pacientes com síndrome de Doose descritas na literatura.....	81
Tabela 14. Predição do potencial deletério das alterações <i>missense</i> descritas na literatura no gene <i>SCN1A</i> em pacientes com síndrome de Doose.....	82

	PÁG.
Tabela 15. Frequências alélicas da alteração c.3521C>G em estudos populacionais	83
Tabela 16. Alterações nucleotídicas encontradas no gene <i>SCL2A1</i> nos pacientes com síndrome de Doose estudados.....	83
Tabela 17. Alterações em <i>SLC2A1</i> em pacientes com síndrome de Doose descritas na literatura.....	83
Tabela 18. Predição do potencial deletério das alterações <i>missense</i> descritas na literatura no gene <i>SLC2A1</i> em pacientes com síndrome de Doose.....	84
Tabela 19. Alterações nucleotídicas encontradas no gene <i>SCL2A1</i> nos pacientes com EIGs estudados.....	85
Tabela 20. Frequências alélicas da alteração c.179C>T em estudos populacionais.....	85
Tabela 21. Alterações em <i>SLC2A1</i> em pacientes com EMJ e outras EIGs comuns descritas na literatura.....	86
Tabela 22. Predição do potencial deletério das alterações no gene <i>SLC2A1</i> em pacientes com EIGs descritas na literatura.....	87
Tabela 23. Alterações potencialmente deletérias encontradas no gene <i>EFHC1</i> e suas frequências nos pacientes com EMJ estudados e em 100 indivíduos controles.....	88
Tabela 24. Polimorfismos codificantes encontrados no gene <i>EFHC1</i> e suas frequências nos pacientes com EMJ e outras EIGs estudados e em 100 indivíduos controles.....	90
Tabela 25. Predição do potencial deletério das alterações não consideradas SNPs no gene <i>EFHC1</i> em pacientes com EIGs.....	90
Tabela 26. Predição do potencial deletério dos polimorfismos codificantes encontrados no gene <i>EFHC1</i> em pacientes com EIGs.....	91
Tabela 27. Frequências alélicas das alterações encontradas em <i>EFHC1</i> em estudos populacionais	92
Tabela 28. Alterações em <i>EFHC1</i> em pacientes com EIGs descritas na literatura.....	92

	PÁG.
Tabela 29. Frequências alélicas das alterações encontradas em <i>EFHC1</i> em estudos populacionais.	93
Tabela 30. Polimorfismos codificantes em <i>EFHC1</i> em pacientes com EMJ e outras EIGs comuns descritas na literatura.....	93
Tabela 31. Predição do potencial deletério das alterações não consideradas SNPs no gene <i>EFHC1</i> em pacientes com EIGs descritas na literatura.	94
Tabela 32. Predição do potencial deletério dos polimorfismos codificantes no gene <i>EFHC1</i> em pacientes com epilepsias idiopáticas generalizadas descritas na literatura.	95
Tabela 33. Alterações nucleotídicas encontradas no gene <i>GABRA1</i> em pacientes com EIGs.	96
Tabela 34. Alterações em <i>GABRA1</i> em pacientes com EIGs comuns descritas na literatura.	96

	PÁG.
Figura 1. Representação esquemática do gene <i>SCN1A</i>	38
Figura 2. Representação esquemática da subunidade α -1 do canal de sódio voltagem-dependente neuronal ($Na_v1.1$).....	38
Figura 3. Representação esquemática do gene <i>SLC2A1</i>	40
Figura 4. Representação esquemática da proteína transportadora de glicose do tipo 1 (GLUT1).	40
Figura 5. Representação esquemática do gene <i>EFHC1</i>	44
Figura 6. Representação esquemática da proteína EFHC1/mioclonina.	44
Figura 7. Representação esquemática do gene <i>GABRA1</i>	45
Figura 8. Representação esquemática do receptor do ácido γ -aminobutírico tipo A ($GABA_A$).....	45
Figura 9. Esquema representando os genes investigados para os diferentes fenótipos de epilepsias da infância e adolescência estudados	52
Figura 10. Princípio da técnica de multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA).....	65
Figura 11. Gráfico representativo dos tipos de alterações potencialmente deletérias encontradas no gene <i>SCN1A</i> nos pacientes com síndrome de Dravet estudados.....	65
Figura 12. Alterações potencialmente deletérias <i>missense</i> detectadas por sequenciamento automático do gene <i>SCN1A</i> em pacientes com síndrome de Dravet.....	66
Figura 13. Alterações potencialmente deletérias em regiões de sítio de <i>splicing</i> detectadas por sequenciamento automático do gene <i>SCN1A</i> em pacientes com síndrome de Dravet.	68
Figura 14. Eletroferogramas ilustrando a deleção c.1242delA no gene <i>SCN1A</i> detectada por sequenciamento automático. A) ambos os alelos sequenciados utilizando o <i>primer</i> de sentido reverso; B) alelo selvagem; C) alelo mutante, contendo a deleção do nucleotídeo destacado em B).	70

- Figura 15.** Eletroferogramas ilustrando a inserção c.3719_3720insGATA no gene *SCN1A* detectada por sequenciamento automático. A) ambos os alelos sequenciados utilizando o *primer* de sentido direto; B) alelo selvagem; C) alelo mutante, contendo a inserção dos quatro nucleotídeos destacados..... 71
- Figura 16.** Eletroferogramas ilustrando a deleção c.5329delG no gene *SCN1A* detectada por sequenciamento automático. A) ambos os alelos sequenciados utilizando o *primer* de sentido direto; B) alelo selvagem; C) alelo mutante, contendo a deleção do nucleotídeo destacado em B) 71
- Figura 17.** Eletroferogramas ilustrando a deleção c.296_313delTCTTCCGGTTCAGTGCCA no gene *SCN1A* detectada por sequenciamento automático. A) ambos os alelos sequenciados utilizando o *primer* de sentido direto; B) alelo selvagem; C) alelo mutante, contendo a deleção dos 18 nucleotídeos destacados em B) 72
- Figura 18.** Deleção c.5489_5491delAGT detectada por sequenciamento automático do gene *SCN1A* em pacientes com síndrome de Dravet. A) Eletroferograma correspondente ao sequenciamento de ambos os alelos simultaneamente utilizando o *primer* de sentido direto; B) Eletroferograma correspondente ao sequenciamento do alelo selvagem; C) Eletroferograma correspondente ao sequenciamento do alelo mutante, contendo a deleção dos três nucleotídeos destacados em B). 73
- Figura 19.** Gráfico referente ao resultado das análises de MLPA mostrando uma deleção no éxon 2 do gene *SCN1A* identificada em dois indivíduos com síndrome de Dravet. 74
- Figura 20.** Alteração *nonsense* detectada por sequenciamento automático do gene *SCN1A* em pacientes com síndrome de Dravet..... 75

	PÁG.
Figura 21. Gráfico representativo dos tipos de mutações no gene <i>SCN1A</i> relatadas na literatura.	78
Figura 22. Gráfico representativo dos tipos de mutações no gene <i>SCN1A</i> relatadas na literatura em pacientes com síndrome de Dravet.	78
Figura 23. Distribuição das substituições de aminoácidos descritas em pacientes com síndrome de Dravet ao longo da proteína Na _v 1.1.	79
Figura 24. Distribuição da frequência de mutações por resíduo de aminoácido ao longo da proteína Na _v 1.1 para as substituições descritas em pacientes com síndrome de Dravet.	80
Figura 25. Distribuição da frequência de mutações por resíduo de aminoácido ao longo da proteína Na _v 1.1, agrupadas por segmentos, para as substituições descritas em pacientes com síndrome de Dravet.	81
Figura 26. Alterações potencialmente deletérias detectada por sequenciamento automático no gene <i>EFHC1</i> em pacientes com EMJ.	89
Figura 27. Provável localização das alterações encontradas na proteína Na _v 1.1 nos pacientes com síndrome de Dravet estudados.	98
Figura 28. Nucleotídeos conservados nos sítios de <i>splicing</i> canônicos (adaptado de 121).	99
Figura 29. Possíveis perdas na subunidade α -I do canal de sódio resultantes das alterações c.1242delA (a), c.3719_3720insGATA (b) e c.5329delG (c) em <i>SCN1A</i>	101
Figura 30. Substituição de um trecho contendo dois resíduos de aminoácido (glicina e fenilalanina) por uma leucina na subunidade α -I do canal de sódio promovida pela deleção c.5489_5491delAGT em <i>SCN1A</i>	102

Figura 31. Resíduos de aminoácidos deletados na subunidade α -I do canal de sódio como resultado da deleção c.296_313delTCTTCCGGTTCAGTGCCA em <i>SCN1A</i>	102
Figura 32. Possível perda na subunidade α -I do canal de sódio resultantes da alteração c.5177G>A em <i>SCN1A</i>	103
Figura 33. Provável localização da alteração p.A23V encontrada na subunidade α -I do canal de sódio em um dos pacientes com síndrome de Doose estudados.....	106
Figura 34. Provável localização das alterações descritas na literatura na proteína GLUT1 em pacientes com EIG estudados.....	111
Figura 35. Provável localização das alterações encontradas na proteína EFHC1/mioclonina nos pacientes com EMJ e outras EIGs.....	112
Figura 36. Provável localização das alterações potencialmente deletérias na proteína EFHC1/mioclonina descritas em pacientes com EMJ e outras EIGs.	116
Figura 37. Distribuição das substituições de aminoácidos descritas em pacientes com EIG ao longo da proteína EFHC1/mioclonina.....	116
Figura 38. Relação entre efeito deletério de variantes genéticas e suas frequências alélicas.....	120

1. INTRODUÇÃO

1.1. EPILEPSIA

Epilepsia é o nome dado ao distúrbio cerebral caracterizado por uma predisposição persistente para a geração de crises epiléticas (1). Tais crises são interrupções transitórias no funcionamento normal do sistema nervoso em decorrência de atividade excessiva ou síncrona dos neurônios. A epilepsia não constitui uma entidade nosológica única, mas sim uma variedade de distúrbios refletindo disfunção cerebral proveniente de diversas causas. Mais de 65 milhões de pessoas no mundo são acometidas por epilepsia (2), fato que a caracteriza como uma das condições neurológicas mais frequentes e, conseqüentemente, um problema de saúde pública mundial (1).

Dada a ampla diversidade de manifestações clínicas, etiologias e de prognóstico das diferentes formas de epilepsia, suas definições e nomenclaturas estão em constante debate entre a comunidade médico-científica internacional. Atualmente, a classificação das epilepsias e das crises epiléticas segue as diretrizes padronizadas pela Liga Internacional de Epilepsia (ILAE, do inglês *International League Against Epilepsy*) em 1981 (3) e 1989 (4). Segundo essa classificação, as crises epiléticas podem ser consideradas generalizadas, quando a descarga epilética envolve todo o córtex cerebral, ou focais, quando a ativação neuronal inicia-se em uma região cortical restrita. Com relação à etiologia, as epilepsias são classificadas em: “idiopáticas”, aquelas sem presumível lesão estrutural do sistema nervoso e que apresentam maior predisposição genética; “sintomáticas”, as quais possuem etiologias conhecidas; e “criptogênicas”, que apresentam presumível base orgânica, mas sem etiologia definida.

Alguns desses conceitos e terminologias foram recentemente revisados (5), embora ainda não adotados oficialmente. De acordo com as novas propostas de definição das crises epiléticas, as crises generalizadas são consideradas aquelas que se iniciam em algum ponto dentro de redes distribuídas bilateralmente e rapidamente as envolvem, enquanto as crises focais são as que se originam em redes limitadas a um hemisfério. Também se recomenda a substituição dos termos “idiopática”, “sintomática” e “criptogênica” por “genética”, “estrutural/metabólica” e “desconhecida”, incluindo algumas modificações em suas definições. O conceito de epilepsia genética se aplica aos casos em que a epilepsia é o resultado direto de um defeito genético conhecido ou presumido, e em que as crises são o

principal sintoma. Nas epilepsias com etiologia estrutural/metabólica, existe comprovadamente um distúrbio estrutural ou metabólico associado a um aumento substancial do risco de se desenvolver epilepsia. Por fim, a etiologia desconhecida compreende os casos em que não há causa determinada até o momento. É importante ressaltar que, na nova classificação proposta, a definição “genética” não exclui a existência de fatores extrínsecos contribuindo para a expressão da doença, da mesma forma que se admite a existência de componentes genéticos nas epilepsias consideradas “estruturais/metabólicas”. No entanto, na última condição, destaca-se a existência de um distúrbio separado.

Tanto na classificação vigente quanto na nova proposta, o termo “síndrome” é empregado para designar um grupo de distúrbios epiléticos que são identificados de forma confiável por um aglomerado de características eletroclínicas (5). Essas características incluem tipo de crise, etiologia, anatomia, fatores precipitantes, idade de início, gravidade, cronicidade, ciclo circadiano e, às vezes, prognóstico (4). O quadro 1 apresenta as síndromes eletroclínicas organizadas por faixa etária de início, sem refletir a etiologia.

Grande parte das síndromes eletroclínicas envolve início precoce. De fato, aproximadamente 50% dos casos de epilepsia se iniciam durante a infância ou adolescência (6). As epilepsias infantis e juvenis requerem atenção especial e pleno entendimento em sua avaliação, pois as consequências psicológicas e cognitivas podem ter um impacto importante sobre o ajuste acadêmico e social da criança, e os efeitos psicossociais na infância podem estender-se à idade adulta (7). Além disso, o diagnóstico dessas epilepsias pode ter grande influência não só na vida da criança afetada, como também na de seus familiares (8). Visto que a maioria das epilepsias relacionadas com idade de início precoce possui etiologia presumivelmente genética (4), elas representam um grupo para o qual o uso de testes clínicos seria potencialmente benéfico.

Quadro 1. Síndromes eletroclínicas organizadas por faixa etária de início (5).

Período neonatal
Epilepsia familiar neonatal benigna
Encefalopatia mioclônica precoce
Síndrome de Ohtahara
Lactente
Epilepsia do lactente com crises focais migratórias
Síndrome de West
Epilepsia mioclônica do lactente
Epilepsia benigna do lactente
Epilepsia familiar benigna do lactente
Síndrome de Dravet
Encefalopatia mioclônica em distúrbios não progressivos
Infância
Crises febris <i>plus</i> (pode começar no lactente)
Síndrome de Panayiotopoulos
Epilepsia mioclônica com crises atônicas (anteriormente astáticas)
Epilepsia benigna com espículas centrotemporais
Epilepsia do lobo frontal noturna autossômica dominante
Epilepsia occipital da infância de início tardio (tipo Gastaut)
Epilepsia com ausências mioclônicas
Síndrome de Lennox-Gastaut
Encefalopatia epiléptica com espícula-onda contínua durante o sono lento
Síndrome de Landau-Kleffner
Epilepsia ausência da infância
Adolescência – Fase Adulta
Epilepsia ausência juvenil
Epilepsia mioclônica juvenil
Epilepsia somente com crises tônico-clônicas generalizadas
Epilepsias mioclônicas progressivas
Epilepsia autossômica dominante com características auditivas
Outras epilepsias familiares do lobo temporal
Correlação menos específica com a idade
Epilepsia focal familiar com focos variáveis (da infância à idade adulta)
Epilepsias reflexas

1.2. GENÉTICA DAS EPILEPSIAS

Conforme supracitado, algumas epilepsias podem ser geneticamente determinadas, como é o caso das consideradas “idiopáticas” pela classificação vigente, ou das denominadas “genéticas” na nova proposta de nomenclatura. Quando mutações em um único gene são suficientes para levar ao surgimento de crises epiléticas, a epilepsia é caracterizada como monogênica ou Mendeliana, em referência ao padrão de herança do traço epilético (9). Em contraste, quando o fenótipo epilético é determinado por vários defeitos genéticos menores, a herança é considerada complexa (10).

Mesmo nos casos em que a epilepsia não é causada diretamente por alterações genéticas, acredita-se que a ocorrência de crises epiléticas esteja intimamente relacionada ao limiar de susceptibilidade do indivíduo à epilepsia, o qual seria resultado da interação entre inúmeros fatores de predisposição, incluindo componentes genéticos. Sendo assim, determinados fatores genéticos, quando associados a distúrbios epileptogênicos específicos e a fatores precipitantes, propiciam alterações em determinadas vias moleculares envolvidas no funcionamento dos circuitos elétricos cerebrais e resultam na manifestação de crises epiléticas (9).

Muitos esforços têm sido realizados para a elucidação dessas vias moleculares, a fim de expandir o conhecimento acerca do processo epileptogênico e fornecer estratégias terapêuticas mais eficientes aos indivíduos acometidos. Com os avanços das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível o mapeamento e a descoberta de genes associados às diferentes formas de epilepsias. Um resumo dos principais métodos utilizados na identificação de genes candidatos em epilepsias encontra-se no quadro 2.

Quadro 2. Métodos utilizados na identificação de genes candidatos em epilepsias (11).

Método	Estratégia básica	Vantagens e Desvantagens	Aplicação à Epilepsia
Clonagem posicional	[1] Delimitar o gene da doença a uma região cromossômica restrita por meio da avaliação de marcadores genéticos co-segregando com a doença em famílias, [2] sequenciar genes na região de ligação para identificar mutações	Excelente para a identificação de genes Mendelianos; baixo poder para genes de doenças complexas	A maioria dos genes previamente descobertos foi identificada com essa abordagem
Estudo de associação	Avaliar a diferença na frequência alélica entre os indivíduos afetados e não afetados	Melhor poder que a clonagem posicional de genes com baixa penetrância; suscetível à estratificação da população, não se aplica a variantes raras	
Genes candidatos	Restrito a variantes em genes que hipoteticamente afetam a doença	Bom se a biologia é conhecida, mas variantes e genes patogênicos podem ser perdidos devido à restrição a candidatos	Grande número de estudos, mas poucos resultados replicados
SNPs em escala genômica	Polimorfismos de base única (SNPs) avaliados em escala genômica, para detectar tanto variantes causais quanto variantes em desequilíbrio de ligação com as variantes causais	Sem suposições de genes; poderoso para alelos comuns com risco moderado, mas não para variantes raras com alto risco	Um estudo negativo publicado até o momento; outros em andamento
Variações de número de cópias	Tipagem de SNPs ou sequenciamento paralelo em massa para identificar pequenas deleções ou duplicações com frequência aumentada em indivíduos afetados	Maior probabilidade de significância funcional; estratégia de detecção em escala genômica	Várias novas descobertas, mas os riscos associados ainda não foram determinados
Sequenciamento paralelo em massa	Sequenciamento de alto desempenho de nova geração, visando detectar variantes associadas a doenças em escala genômica	Aplicável a variantes raras com alto risco; grande número de variantes detectadas; métodos para análise estatística em desenvolvimento	
Genoma completo	Cobre a sequência genômica completa	Ainda de alto custo (embora esteja decaindo)	Estudos em andamento
Exoma completo	Restrito a sequências codificantes de proteínas	Custo menor e focado nas regiões genômicas de alta funcionalidade, mas pode ignorar variantes importantes	Estudos em andamento

Nas últimas duas décadas, um número crescente de mutações associadas a epilepsias tem sido identificado, principalmente em síndromes epiléticas monogênicas raras, como a síndrome de Dravet (10,12). No entanto, apenas 1 a 2% das epilepsias consideradas idiopáticas parecem ser monogênicas, sugerindo que a maioria seja poligênica, como no caso das epilepsias idiopáticas generalizadas mais comuns (10,13).

Os principais genes relatados como associados a epilepsias até o momento são representados no quadro 3. A maioria deles codifica subunidades de canais iônicos, e grande parte dos outros genes identificados codifica proteínas que interagem com esses canais (10). Essa constatação é bastante plausível, uma vez que os canais iônicos fornecem a base para os processos de excitabilidade neuronal e, portanto, alterações nessas proteínas perturbariam o equilíbrio na comunicação entre os neurônios e poderiam resultar em descargas epiléticas (14). Ainda assim, é reconhecida a existência de genes envolvidos em outras vias metabólicas estando associados à epileptogênese, sendo que esses podem apresentar funções importantes ainda pouco exploradas.

Além de contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela atividade epilética, a identificação de mutações em genes implicados nas diferentes formas de epilepsia fornece informações valiosas que podem ser utilizadas no estabelecimento de testes genéticos específicos para fins clínicos.

Quadro 3. Principais genes relatados como associados a epilepsias até o momento (15).

Epilepsias de período neonatal	Gene	Proteína
Crises neonatais benignas familiares	<i>KCNQ2</i> <i>KCNQ3</i>	Canal de potássio Canal de potássio
Crises neonatais-infantis benignas familiares	<i>SCN2A</i>	Canal de sódio
Síndrome de Ohtahara	<i>STXBP1</i> <i>ARX</i>	Proteína ligante de syntaxina Proteína homeobox
Espasmos de início precoce	<i>STK9/CDKL5</i>	Quinase dependente de ciclina
Espasmos infantis ligados ao cromossomo X	<i>ARX</i>	Proteína
Epilepsias com crises febris proeminentes	Gene	Proteína
Síndrome de Dravet	<i>SCN1A</i>	Canal de sódio
Epilepsia generalizada com crises febris <i>plus</i>	<i>SCN1A</i> <i>SCN1B</i> <i>GABRG2</i>	Canal de sódio Canal de sódio Receptor GABA _A
Epilepsia ausência da infância com crises febris	<i>GABRG2</i>	Receptor GABA _A
Epilepsia e retardo mental restritos ao sexo feminino	<i>PCDH19</i>	Protocaderina
Epilepsias idiopáticas generalizadas	Gene	Proteína
Epilepsia ausências de início precoce	<i>SLC2A1</i>	Transportador de glicose
Epilepsia mioclônica juvenil	<i>GABRA1</i> <i>EFHC1</i>	Receptor GABA _A Proteína com domínio EF-hand
Epilepsias focais	Gene	Proteína
Epilepsia do lobo frontal noturna autossômica dominante	<i>CHRNA2</i> <i>CHRNA4</i> <i>CHRNB2</i>	Receptor nicotínico Receptor nicotínico Receptor nicotínico
Epilepsia autossômica dominante com características auditivas	<i>LGII</i>	Proteína rica em leucina
Epilepsias associadas a outros distúrbios paroxísticos	Gene	Proteína
Epilepsia generalizada com discinesia paroxística	<i>KCNMA1</i>	Canal de potássio
Epilepsia com discinesia paroxística induzida por exercícios	<i>SLC2A1</i>	Transportador de glicose
Epilepsia ausência e ataxia episódica	<i>CACNA1A</i>	Canal de cálcio
Epilepsia focal e ataxia episódica	<i>KCNA1</i>	Canal de potássio
Enxaqueca hemiplégica familiar e epilepsia	<i>ATP1A2</i>	ATPase sódio-potássio

1.3. TESTES GENÉTICOS EM EPILEPSIAS

O teste genético consiste no uso de informações genéticas tanto para proporcionar diagnósticos mais claros em pessoas já acometidas ou com suspeita da doença (teste diagnóstico), quanto para prever o possível início da doença em pessoas com risco aumentado devido à história familiar positiva (teste preditivo) (15). A identificação de um grande número de genes envolvidos na etiologia de doenças humanas resultou em um acentuado aumento do uso desses testes na prática clínica. Mais de 2.000 testes genéticos estão atualmente disponíveis para uso clínico*, sendo a maioria destinada a distúrbios genéticos raros que seguem padrões de herança mendeliana. No entanto, o significado clínico dos testes genéticos pode ser desafiador, visto que nem sempre os resultados são de interpretação trivial e, em alguns casos, o significado da variação genética observada é incerto (16).

Controvérsias em relação à utilidade clínica dos testes genéticos para síndromes epilépticas foram recentemente suscitadas. Apesar de existir uma contribuição clara de testes genéticos para o estabelecimento do diagnóstico mais exato e para uma melhor compreensão da etiologia da epilepsia (15,17), alguns autores questionam se esses testes também contribuem para uma melhora no tratamento dos pacientes (17). Com relação a esta questão, um estudo recente avaliando o impacto dos testes genéticos sobre manejo de pacientes revelou melhorias no controle de crises e no progresso do desenvolvimento das crianças, como consequência da mudança de medicação após um resultado de teste genético positivo (18).

A utilidade do teste clínico pode variar conforme o tipo de epilepsia e de acordo com o padrão de herança genético apresentado. Atualmente, um dos genes considerados mais relevantes clinicamente é o *SCN1A*, envolvido na etiologia do **espectro das epilepsias generalizadas com crises febris**. Já no caso das **epilepsias idiopáticas generalizadas** mais comuns, como a epilepsia mioclônica juvenil, ainda que tenham sido descritas mutações em genes candidatos, o potencial destes para utilização em testes clínicos ainda não foi avaliado.

* Genetests: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GeneTests/?db=GeneTests>

1.4. ESPECTRO DA EPILEPSIA GENERALIZADA COM CRISES FEBRIS

O termo epilepsia generalizada com crises febris *plus* (GEFS+, na sigla em inglês para *generalized epilepsy with febrile seizures plus*) foi utilizado pela primeira vez por Scheffer e Berkovic (19) para designar uma síndrome epiléptica caracterizada por crises febris que persistem além dos seis anos de idade e por crises afebris variáveis. Essas crises afebris incluem crises tônico-clônicas generalizadas (CTCG), que são caracterizadas por queda súbita e rigidez muscular (fase tônica) seguidas por episódios rápidos de contrações e relaxamento dos músculos (fase clônica); mioclonias, que são curtos abalos musculares; e crises de ausência, nas quais ocorre breve interrupção da consciência. Essa síndrome abrange um vasto espectro de fenótipos, incluindo desde manifestações brandas, como as crises febris simples, até expressões clínicas mais graves, como as **síndromes de Dravet e de Doose** (19,20).

A **síndrome de Dravet** é uma encefalopatia epiléptica rara, com incidência estimada de aproximadamente uma em cada 40.000 crianças com menos de sete anos (21). O início da síndrome se dá no primeiro ano de vida, quando ocorrem crises febris clônicas, posteriormente acompanhadas por mioclonias, crises de ausência atípicas e crises focais complexas (22,23). O desenvolvimento neurológico é normal antes do início das crises, mas retardo psicomotor e outros déficits neurológicos são observados por volta do segundo ano de idade. Além disso, a síndrome de Dravet é altamente resistente ao tratamento medicamentoso (23). O eletrencefalograma (EEG), que consiste no registro da atividade elétrica cerebral, mostra ondas cerebrais de morfologia alterada, os chamados paroxismos epileptiformes, do tipo espícula e poliespícula-onda, de modo generalizado, com presença de anormalidades focais e fotosensibilidade (4).

Antes da inclusão da síndrome de Dravet no espectro de GEFS+ (20), o fenótipo considerado como mais grave era a **síndrome de Doose**, também conhecida como epilepsia mioclônico-astática ou epilepsia mioclônico-atônica, de acordo com as novas propostas de nomenclatura. A síndrome de Doose possui incidência de aproximadamente uma em cada 10.000 crianças, constituindo 1 a 2% das epilepsias de início na infância (24). As crises se iniciam durante os cinco primeiros anos de idade, com pico entre três e quatro anos, em crianças com desenvolvimento prévio normal. Existe uma predominância das crises

mioclônico-astáticas (mioclônico-atônicas), caracterizadas por um abalo simétrico breve com subsequente perda do tônus muscular e queda súbita. São observadas também CTCG e crises de ausência atípicas (25,26). Embora não seja comum, crises febris simples podem preceder as crises afebris em alguns casos (25,26). Outra característica dessa síndrome é a apresentação de padrões de EEG generalizados, com complexos de espícula e poliespícula-onda, bilaterais e síncronos, além de atividade teta rítmica de frequência entre 4 e 7 Hz, denominada ritmo de Doose (27). A evolução clínica e cognitiva é altamente variável, incluindo desde remissão de crises até atrasos graves de desenvolvimento (25,27).

Os estudos das bases genéticas de GEFS+ demonstraram um padrão de herança autossômico dominante em algumas famílias e complexo em outras (19,28), e a identificação de mutações em diferentes genes revelou a existência de heterogeneidade genética. O primeiro gene identificado para esse tipo de epilepsia foi o *SCN1B* (29), que codifica a subunidade β_1 de um canal de sódio voltagem-dependente. Posteriormente, um segundo *locus* foi mapeado no cromossomo 2 (30,31) e mutações no gene da subunidade α_1 do canal de sódio neuronal (*SCN1A*) foram descritas (32-35). Também foram identificadas mutações em genes que codificam outras subunidades de canal de sódio, *SCN2A* (36) e *SCN9A* (37), além de receptores do neurotransmissor ácido γ -aminobutírico (GABA) codificados pelos genes *GABRG2* (38-40) e *GABRD* (41). Dentre esses genes, o mais amplamente descrito é o *SCN1A*, cujas mutações foram observadas em aproximadamente 5 a 10% das famílias com GEFS+ previamente relatadas (42).

Posteriormente, foi demonstrado que a maioria das mutações encontradas em *SCN1A* está associada com o fenótipo da síndrome de Dravet (43), com mutações detectadas em 70 a 80% dos pacientes estudados, sendo a maioria delas *de novo* (44). Além disso, raramente mutações nos outros genes descritos para GEFS+ são identificadas em pacientes com síndrome de Dravet, mostrando que *SCN1A* é o principal gene envolvido com esse fenótipo (45).

Nos estudos que demonstraram mutações em genes candidatos nas famílias com GEFS+, foram relatados membros afetados com síndrome de Doose, corroborando a hipótese de uma possível etiologia genética também para esse fenótipo (29,32). Entretanto,

apenas um membro de cada família investigada apresentava síndrome de Doose, incluindo algumas características atípicas (46,47).

1.4.1. GENE *SCN1A*

O gene *SCN1A* possui 26 éxons codificantes (figura 1) e codifica a subunidade α -1 do canal de sódio voltagem-dependente neuronal ($Na_v1.1$) (figura 2). Essa proteína consiste em quatro domínios (DI-IV) contendo seis segmentos transmembrana cada. A subunidade α do canal de sódio é a responsável pela formação do poro transmembrana que permite a entrada de íons sódio para o meio intracelular dos neurônios (48).

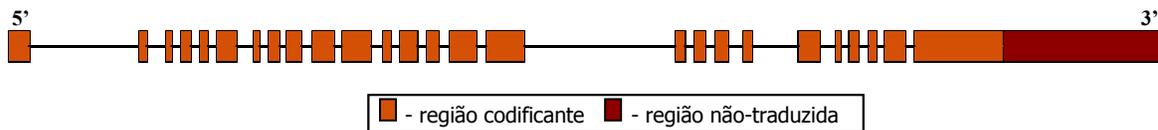


Figura 1. Representação esquemática do gene *SCN1A*.

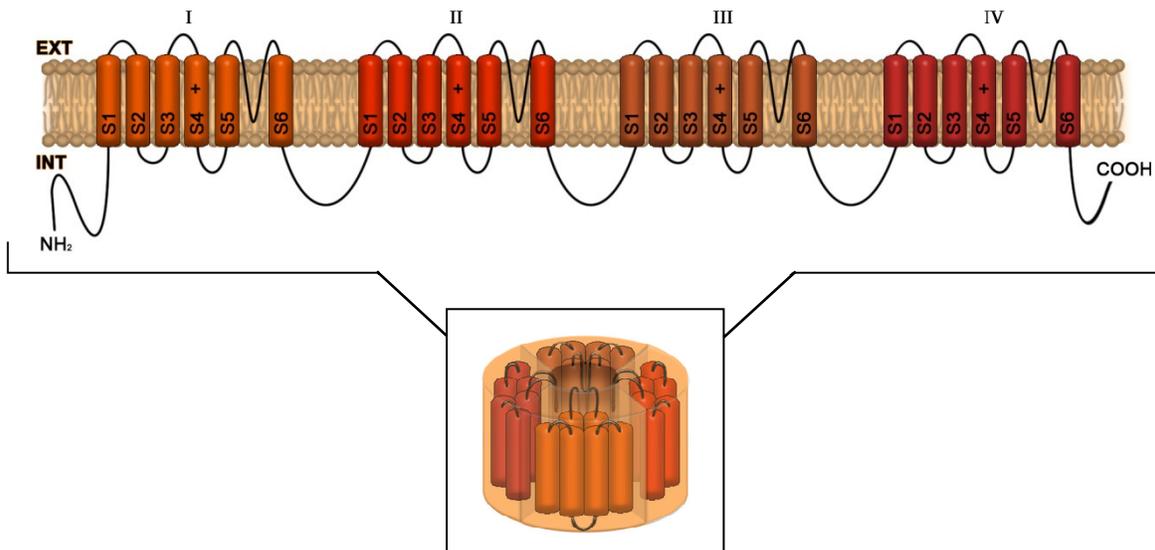


Figura 2. Representação esquemática da subunidade α -1 do canal de sódio voltagem-dependente neuronal ($Na_v1.1$).

Os canais de sódio voltagem-dependentes desempenham um importante papel na geração e propagação de potenciais de ação, uma vez que estes são provocados pela despolarização da membrana celular, em consequência do influxo de sódio na célula (49). Portanto, mutações nessa proteína podem causar excitabilidade neuronal anormal (50).

A expressão do gene *SCN1A* ocorre predominantemente nos interneurônios inibitórios GABAérgicos, ou seja, aqueles que secretam o neurotransmissor GABA (51). Dessa forma, acredita-se que a hiperexcitabilidade neuronal observada nos casos de perda de função do canal de sódio, como observado na síndrome de Dravet e em alguns dos casos de GEFS+, seria resultado de uma disfunção nos circuitos inibitórios neuronais (52).

No entanto, também são observadas alterações que resultam em ganho de função em indivíduos com GEFS+. Acredita-se que nesses casos ocorra perda da capacidade de inativação do canal iônico, prolongando a despolarização neuronal (53). Sendo assim, as bases da hiperexcitabilidade neuronal em GEFS+ ainda não estão claramente definidas.

Como as investigações do gene *SCN1A* em pacientes com síndrome de Doose esporádicos demonstraram baixa frequência de mutações, sendo que nos poucos casos positivos é difícil determinar a patogenicidade das alterações encontradas (46,47), questionamentos a respeito da base genética comum entre essa e as outras epilepsias do espectro de GEFS+ têm sido levantados (46). Sendo assim, é possível que outros fatores genéticos estejam envolvidos na etiologia da síndrome de Doose.

Recentemente, outro gene foi implicado na etiologia da síndrome de Doose, o gene *SLC2A1* (54). Mutações nesse gene são a causa de uma encefalopatia rara conhecida como síndrome da deficiência de GLUT1, caracterizada por deficiência mental progressiva, epilepsia, distúrbios motores, e microcefalia adquirida (55). Dadas algumas semelhanças fenotípicas entre as síndromes de Doose e da deficiência de GLUT1, tais como a ocorrência de crises de ausência e mioclônicas no início da vida e a resposta favorável à dieta cetogênica, um grupo de pesquisadores formulou a hipótese de que mutações no gene *SLC2A1* poderiam causar também a síndrome de Doose. De fato, o estudo demonstrou que 5% dos 84 pacientes com síndrome de Doose estudados apresentaram mutações nesse gene (54).

1.4.2. GENE *SLC2A1*

O gene *SLC2A1* possui 10 éxons codificantes (figura 3) e codifica a proteína transportadora de glicose do tipo 1 (GLUT1), que é membro da família 2 de carreadores de soluto (figura 4). Essa proteína possui 12 segmentos transmembrana dispostos em um arranjo de poro que permite a passagem do soluto para o citossol da célula (figura). A GLUT1 é a principal responsável pelo transporte de glicose através da barreira hematoencefálica (55). Sendo assim, defeitos nessa proteína podem ocasionar níveis inadequados de glicose cerebral, resultando em encefalopatia metabólica grave (56).

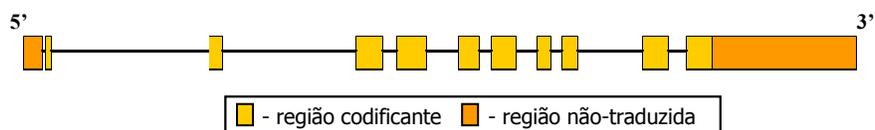


Figura 3. Representação esquemática do gene *SLC2A1*.

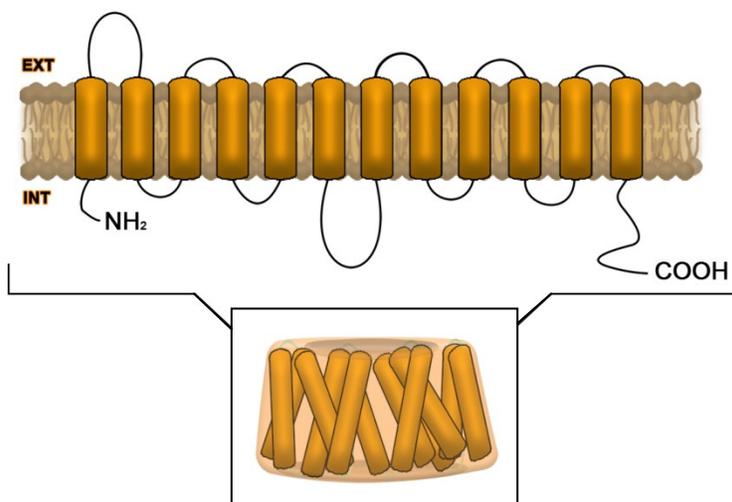


Figura 4. Representação esquemática da proteína transportadora de glicose do tipo 1 (GLUT1).

1.5. EPILEPSIAS IDIOPÁTICAS GENERALIZADAS COMUNS

Outro grupo de epilepsias que potencialmente se beneficiaria do estabelecimento de testes genéticos para fins clínicos é o das epilepsias idiopáticas generalizadas (EIGs). As EIGs, como o nome indica, possuem base presumivelmente genética e apresentam crises inicialmente generalizadas, sendo os principais tipos: crises típicas de ausência, mioclonias e CTCG. O início das manifestações clínicas ocorre durante a infância e a adolescência, variando dependendo da síndrome. O EEG mostra descargas generalizadas de espícula, poliespícula ou espícula/poliespícula-onda. Essas descargas são frequentemente precipitadas por hiperventilação, privação do sono e fotoestimulação intermitente (57).

A forma de EIG mais comum é a **epilepsia mioclônica juvenil** (EMJ), representando 5% a 10% de todas as epilepsias (58). As manifestações clínicas se iniciam entre os nove e 27 anos de vida e são caracterizadas por abalos mioclônicos, geralmente simétricos, ocorrendo de forma isolada ou repetitiva, comprometendo principalmente os membros superiores e que acontecem frequentemente ao despertar (4). As crises mioclônicas podem ser seguidas por crises CTCG e por crises de ausência (59). Em muitos casos, as crises são precipitadas por fatores desencadeantes como privação de sono, exaustão física e abuso de álcool. A resposta à medicação correta costuma ser favorável (4).

Outra EIG comum é a **epilepsia ausência juvenil** (EAJ). Sua característica principal é a ocorrência de crises de ausência típicas, as quais se manifestam como perda total da consciência de forma breve e abrupta. As crises se iniciam na puberdade, por volta dos nove a 13 anos de idade, embora possa ocorrer entre cinco e 20 anos (60). A ocorrência de crises é esporádica, com menor frequência do que na **epilepsia ausência da infância** (EAI), cujo início é mais precoce. Crises do tipo CTCG e mioclonias ocorrem em cerca de 80% e 16% dos indivíduos acometidos por EAJ, respectivamente (61). Também é frequente a ocorrência de automatismos. O EEG apresenta descargas do tipo espícula-onda maiores que 3 Hz (57). A resposta ao tratamento em geral é excelente (4).

A **epilepsia com CTCG ao despertar**, por sua vez, apresenta início na segunda década de vida. O tipo de crise mais frequente é a CTCG, que ocorre exclusiva ou predominantemente precedendo o despertar, independente do período do dia. Podem ocorrer também crises de ausência ou mioclonias. O EEG demonstra algum dos padrões característicos das EIGs, e há significativa correlação com fotosensibilidade (4).

Estudos de ligação revelaram vários *loci* gênicos envolvidos com essas EIG, especialmente a EMJ (quadro 4). Genes candidatos também foram identificados, dentro e fora das regiões cromossômicas previamente descritas, por meio de estudos de associação e/ou triagem de mutações em pacientes com diferentes formas de EIG (quadro 4). No entanto, nem todos esses genes possuem alterações causais identificadas, sendo que apenas três genes apresentam mutações segregando com membros afetados de famílias com EMJ: *GABRA1*, *CLCN2* e *EFHC1* (62). Levando em consideração que o artigo descrevendo as primeiras mutações no gene *CLCN2* foi recentemente retraído (63), e aspectos do trabalho ainda permanecem controversos (64), os genes candidatos de maior relevância para a EMJ atualmente são *EFHC1* e *GABRA1*.

1.5.1. GENE *EFHC1*

O gene *EFHC1* possui 11 éxons codificantes (figura 5) e codifica a proteína EFHC1, também conhecida como mioclonina 1. Essa proteína possui três domínios DM10 e um domínio *EF Hand* na porção C-terminal (65) (figura 6). Os domínios DM10 possuem função desconhecida e são constituídos por aproximadamente 105 resíduos de aminoácidos, organizados em sete folhas beta e duas alfa hélices, uma após a primeira folha beta, e outra após a última (66). O domínio *EF-hand* possui conformação de hélice-volta-hélice, com duas alfa hélices perpendiculares denominadas E e F unidas por um sítio ligação a cálcio (66).

Quadro 4. Loci gênicos e genes identificados para EMJ e outras EIGs comuns.

Loci gênico identificado por ligação	Genes identificados por associação	Genes com mutações identificadas	Proteína codificada	Fenótipo
3q26 (67)		<i>CLCN2</i> (68)	Canal de cloreto	EAI, EAJ, EMJ, ECTCG
5q34 (69)		<i>GABRA1</i> (69)	Receptor do GABA _A	EMJ
6p12 (70,71)		<i>EFHC1</i> (65)	Proteína com domínio <i>EF-hand</i>	EMJ
6p21 (72,73)	<i>GABRB1</i> (74) <i>GRIK1</i> (75) <i>BRD2</i> (76)		Receptor do GABA _B Receptor de glutamato Regulador da transcrição	EMJ, EIGs não-EMJ, EAJ
8q24 (77)	<i>KCNQ3</i> (78)		Canal de potássio	EAI, EMJ
15q13-14 (79)	<i>CX36</i> (80) <i>CHRNA7</i> (81)		Conexina 36 Receptor nicotínico	EMJ
18q12 (82)	<i>ME2</i> (83) <i>KCNN3</i> (84)		Enzima málica 2 Canal de potássio dependente de cálcio	EMJ, EAJ, ECTCG EMJ
		<i>GABRD</i> (85)	Receptor de GABA _A	EMJ
		<i>CACNB4</i> (86)	Canal de cálcio	EAI, EAJ e EMJ com AE

EAI: epilepsia ausência da infância; EAJ: epilepsia ausência juvenil; EMJ: epilepsias mioclônica juvenil; ECTCG: epilepsia com crises tônico-clônico generalizadas; EIGs: epilepsias idiopáticas generalizadas; AE: ataxia episódica

Embora as funções da proteína EFHC1 ainda sejam pouco conhecidas, sabe-se ela está associada a microtúbulos e, conseqüentemente, envolvida na regulação da divisão celular (87). A proteína EFHC1 também está ligada ao processo de migração radial durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) e a perda de sua função poderia levar a alterações na arquitetura cortical e sub-cortical.

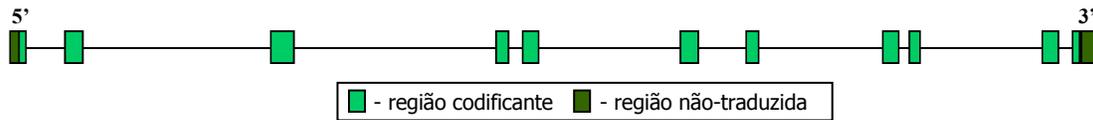


Figura 5. Representação esquemática do gene *EFHC1*.

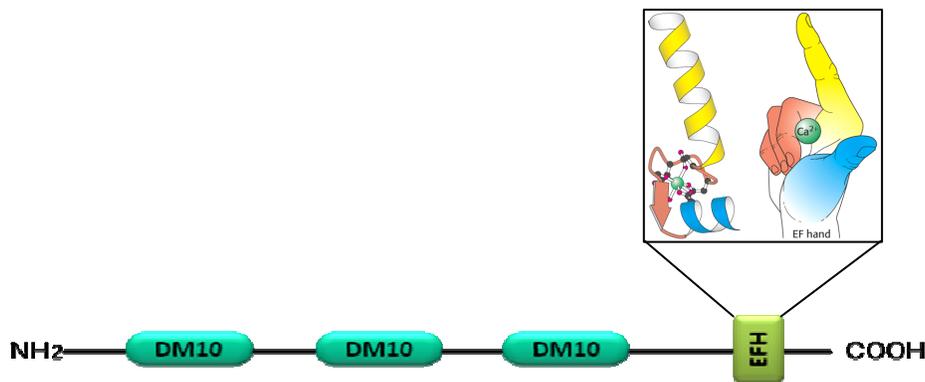


Figura 6. Representação esquemática da proteína EFHC1/mioclona.

Mutações no gene *EFHC1* foram implicadas com a etiologia de EMJ (65, 88-91) e EAJ (91), sendo consideradas a causa mais frequente de EMJ identificada até o momento (89). No trabalho que descreveu as primeiras mutações nesse gene, foi demonstrada associação dessa proteína com canais de cálcio voltagem-dependente do tipo R. Acredita-se que, através do aumento do influxo de íons cálcio por estes canais, essa proteína estaria relacionada com a morte celular programada (apoptose) em neurônios. Sendo assim, mutações na proteína EFHC1 resultam em um comprometimento significativo da atividade apoptótica, o que poderia impedir a eliminação de neurônios com homeostase de cálcio alterada durante o desenvolvimento do SNC, levando à EMJ.

A principal mutação descrita nesse gene, que resulta na troca de resíduo de aminoácido p.A322D, foi observada segregando em indivíduos afetados de uma família franco-canadense acometida por EMJ (69). Estudos funcionais realizados pelos autores que descreveram a mutação mostraram uma diminuição da amplitude de correntes ativadas por GABA. Sendo assim, a hiperexcitabilidade neuronal decorrente dessa redução da resposta inibitória mediada por GABA poderia ter uma implicação direta na origem de crises epiléticas.

1.5.3. GENE *SLC2A1*

Recentemente, foram identificadas também mutações em *SLC2A1*, gene envolvido na síndrome de deficiência de GLUT1 e candidato para síndrome de Doose, em famílias com diferentes fenótipos de EIGs, especialmente em indivíduos com crises de ausência de início precoce (56, 93, 94 e 95). Essa descoberta contribuiu para ampliar ainda mais o espectro de fenótipos envolvidos com a deficiência de GLUT1, além de apontar um novo gene candidato para a investigação das bases genéticas das EIGs.

1.6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A identificação de genes envolvidos na etiologia de diversas formas de epilepsia, em especial as de início precoce, não só expande o conhecimento acerca das vias moleculares envolvidas na epileptogênese, como pode ter grande repercussão no diagnóstico, prognóstico e tratamento das crises.

Apesar dos grandes avanços na elucidação das bases genéticas do espectro de GEFS+, com ênfase na síndrome de Dravet, e das EIGs mais comuns, como a EMJ, permanecem ainda controversas várias questões a respeito do valor prognóstico das mutações encontradas nos genes candidatos e da utilidade de testes genéticos para fins clínicos nessas síndromes. Tais questões possuem implicações importantes, inclusive na elaboração de recomendações internacionais para o diagnóstico molecular das epilepsias.

2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste projeto foram:

- Caracterizar as bases moleculares de diferentes formas de epilepsia de início precoce (infância e adolescência);
- Avaliar o potencial dos genes estudados para a utilização em testes genéticos para fins clínicos.

Os objetivos específicos foram:

- Investigar a presença de mutações nos genes candidatos:
 - *SCN1A*, em uma amostra de pacientes com **síndrome de Dravet** e **síndrome de Doose**;
 - *SCL2A1*, em uma amostra de pacientes com **síndrome de Doose**, **EMJ**, **EAJ**, **EAI** e **CTCG ao despertar**.
 - *EFHC1* e *GABRA1*, em uma amostra de pacientes com **EMJ**, **EAJ**, **EAI** e **CTCG ao despertar**.
- Analisar a repercussão molecular das mutações encontradas;
- Compilar e analisar a repercussão molecular de mutações descritas na literatura nos genes candidatos em questão.

3. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Anexos 1 e 2), além dos comitês de ética em pesquisa das outras universidades participantes do estudo. Todos os pacientes e familiares que concordaram em participar da pesquisa assinaram um formulário de consentimento livre e esclarecido (Anexo 3).

Para assegurar que toda a manipulação de informação clínica e molecular fosse confidencial, questionários clínicos e amostras de sangue e de DNA foram identificados por um código comum designado no momento de entrada do indivíduo no estudo. As informações geradas durante este projeto que possam ter implicações na confirmação diagnóstica de indivíduos sintomáticos serão comunicadas aos profissionais responsáveis pelo acompanhamento dos pacientes.

3.2. CASUÍSTICA

Foi incluído no estudo um total de 171 pacientes com diagnóstico de epilepsia generalizada, sendo 21 deles diagnosticados com **síndrome de Dravet**, 16 com **síndrome de Doose**, 102 com **EMJ**, 14 com **CTCG** ao despertar, 13 com **EAJ**, dois com **EAI** e três com outras EIGs.

Os pacientes com síndromes de Dravet e de Doose foram recrutados nos ambulatórios do Departamento de Neurologia da UNICAMP, do serviço de epilepsia do Hospital das Clínicas da FMUSP e do Hospital São Lucas da PUCRS, sob responsabilidade da Dra. Marilisa Guerreiro e da Dra. Maria Augusta Montenegro, da Dra. Maria Luiza Manrezza e do Dr. André Palmimi, respectivamente.

Dentre os pacientes com EIGs, 52 com EMJ e todos os com outros fenótipos foram selecionados nos ambulatórios da UNICAMP, sob responsabilidade do Dr. Fernando Cendes e do Dr. Luiz Betting. Os outros 50 pacientes com EMJ foram recrutados no Ambulatório de Neurologia da UFAL, sob responsabilidade do Dr. Daniel Gitai.

Os diagnósticos foram realizados com base nos critérios de classificação internacional propostos pela ILAE (4). Resumos das características demográficas e clínicas

desses pacientes estão disponíveis nos apêndices 1, 2 e 3. Para os pacientes com síndrome de Dravet identificados de 1 a 4, de 6 a 12 e 14, e para os com síndrome de Doose identificados de 1 a 10, 12 e 13, informações clínicas detalhadas estão descritas na literatura (96). Esses pacientes foram inicialmente investigados em meu mestrado, porém algumas análises apresentadas no presente estudo ainda não haviam sido realizadas.

3.3. MÉTODOS

3.3.1. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

A extração do DNA genômico foi feita a partir das amostras de sangue periférico coletadas dos pacientes e familiares, quando disponíveis, utilizando o protocolo manual de extração com fenol clorofórmio descrito a seguir:

Aproximadamente 20mL de sangue venoso foram colhidos de cada indivíduo recrutado para o estudo. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 2500 rpm e a fase intermediária, contendo os leucócitos, foi transferida para um tubo de propileno com fundo cônico. O próximo passo foi adicionar as soluções de RSB 1x, até completar o volume de 11mL, e 60µL de Nonidet®. Após homogeneização ao agitador durante 10 minutos, a solução foi centrifugada a 2500 rpm por mais 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados 3mL de solução SDS 10%, 0,5mL de RSB 1x e 80µL de proteinase K (100mg/mL) e as amostras foram incubadas a 37° por 24h. Após a incubação, foram acrescentados 3mL de fenol, seguido por homogeneização durante 10 minutos e centrifugação por mais 10 minutos a 2500 rpm. Descartou-se a fração inferior do tubo. O processo foi repetido com 1,5mL de fenol e 1,5mL de solução de clorofórmio álcool isoamílico. A fração inferior do tubo foi novamente descartada e, em seguida, acrescentaram-se 3mL de solução de clorofórmio álcool isoamílico, seguido de homogeneização e centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos. O DNA foi precipitado com 6mL de etanol absoluto e armazenado em tubos cônicos de 1,5mL com aproximadamente 200µL de TE 1x.

3.3.2. AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE INTERESSE

Para a amplificação e sequenciamento dos fragmentos de interesse dos genes *SCN1A*, *SLC2A1*, *EFHC1* e *GABRA1*, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que flanqueiam os éxons codificantes e as junções éxon-ítron. Os *primers* utilizados neste estudo foram previamente desenhados com o auxílio dos programas *Gene Runner*[®] e *Primer 3*[®]. Foram utilizados ao total 49 pares de *primers*, sendo 29 para a amplificação do gene *SCN1A*, nove para o gene *SLC2A1*, 11 para o gene *EFHC1* e nove para o gene *GABRA1*. As sequências nucleotídicas dos *primers* estão apresentadas nas Tabelas 1, 2, 3 e 4.

A triagem de mutações nos genes candidatos foi realizada conforme esquematizado na figura 9. Para os pacientes com EMJ provenientes da UFAL, foi realizada investigação apenas do gene *EFHC1*.

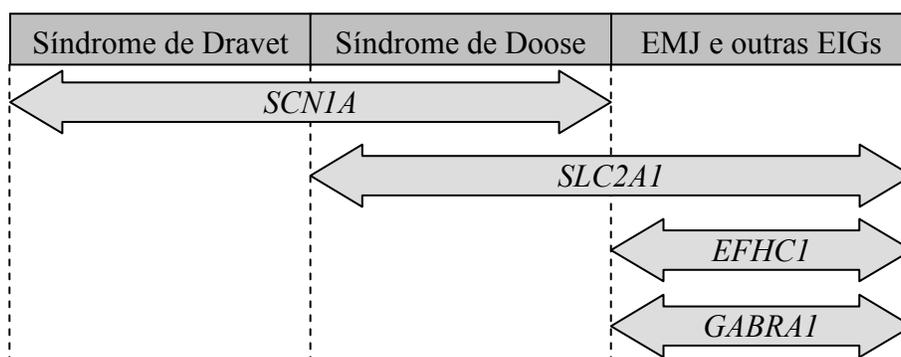


Figura 9. Esquema representando os genes investigados para os diferentes fenótipos de epilepsias da infância e adolescência estudados.

A amplificação foi feita por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*). As reações foram realizadas para um volume final de 12,5µL, contendo 3,5 pmoles de cada *primer* específico, 7,5nmol de dNTP mix contendo os quatro nucleotídeos em quantidades equimolares, 1 unidade de Taq DNA polimerase (*Fermentas*[®]), 25 nmoles de MgCl₂ e 50ng de DNA.

Tabela 1. Sequências dos *primers* para amplificação dos éxons do gene *SCN1A*.

Éxon	Sequência Direta (5' – 3')	Sequência Reversa (5' – 3')
1	ATCCTCTAGCTCATGTTTCATG	TAATTTGGCATGTGTTGGTG
2	ATTGTGATTGTGCTGGTTTCTC	TGAGGCTAATATGACAAAGATGC
3	AGAAGACTTGCCACAATGC	CATTGTCCTCTTGCTGCGTA
4	CTGATGGAGTGATAAGAAATTGG	TCCACTTAGACCTTTGTTGTGC
5	TCGGTAATTCCAGGTAAGAAGTG	GAATGTCAAGCAGAGAAGGATG
6	AGCGTTGCAAACATTCTTGG	GGATATCCAGCCCCTCAAGT
7	CTGACCTTCCTGTTCTCATTTG	AATTAGTTGGCTGTTATCTTCAGTT
8	GGCAGCAGAACGACTTGTA	CAATCCTTGGCATCACTCTG
9	TTGAAAGTTGAAGCCACCAC	CCTCATAACAACCACCTGCTC
10	AGCCATGCAAATACTTCAGC	CAACCATGCATCAGTAAACTCAG
11	CTGTTATGAATGCTGAAATCTCC	TGGTGCAGCAATAGTGAGC
12	GTCACCATTGGTTGTTTGC	TGCACTATTCCCAACTCACA
13	GGCTCTATGTGTGTGTCTGATG	GAAGGATGGTTGAAAGACTGC
14	TCTACTTCGCGTTTCCACAA	TGCTATGCAAGAACCCTGAT
15	GACGGTTAGGGCAGATCAGA	GCCATGCTGGTGTATTTC
16a	TGCTGTGGTGTTCCTTCTC	ACTGCTGCCAGTTCCTATAACC
16b	TGGATAGGATGCACAAAGGAG	GAGCATGGTTTCTAGTGAATGG
17	AAGGGTTAGCACAGACAATG	CAAGCTGCACTCCAAATG
18	AAGGATATTATGGAAGCAGAGACA	GGATACTAAGACAATGAAACAAAGG
19	TTTCTCTGCCCTCCTATTCC	GCCCTTGTCTTCCAGAAATG
20	TGTCTGAACATTTATCCTCTGAA	TGGCTATATAACAATACTTCAGGTTC
21	GGAAAGACCAGAGATTACTAGGG	CCATCTGGGCTCATAAACTTG
22	TGTCTTGGTCCAAAATCTGTG	TTGGTCGTTTATGCTTTATTTCG
23	GCACCAGTGACATTTCCAG	ATGACAGAGGAAGAGGAAGG
24	GGACACAGTTTTAACCAGTTTG	AGATGATGCTCTACAAGTGAAAG
25	GCTAATGCACATGAGAAAACCTCC	TGATTGCTGGGATGATCTTG
26a	ACGCATGATTTCTTCACTGG	CAGGATGACCGCGATGTA
26b	TAAGGGAGACTGTGGGAACC	AAGGTGGCGTCTGTAAGCA
26c	GGTCTCCTATCAGCCAATCAC	CAGTTTGGCATTGACCTCCT

Tabela 2. Sequências dos *primers* para amplificação dos éxons do gene *SLC2A1*.

Éxon	Sequência Direta (5' – 3')	Sequência Reversa (5' – 3')
1	TCAGAGTCGCAGTGGGAG	GCTAGATCCGAAGCCCAT
2	CTGGGAGAAAGACTGGTGTG	GAGAGGCAGACAGTACAGTGC
3	GGCTCAAGAACATGCAGTG	GGCTGGGTCAGAGGTAATAC
4	GGAGGTAGGGGAGACTTATC	CTGTGTTCTCTGGACCTGTG
5 e 6	GGCAGAGCCTCTAGAACTGG	GGGGTCTAAAGGGAAACTTC
7	TCTGCCTGAGTATTTGTCCC	GCCTAGTGCCCTTCTGAAC
8	ATCTTCCCCACTGGTCTTTG	CAACTTCAGGAGCCAGAAAG
9	CAACAAATCCAGGACCATCC	GTTGAGGTCAGCATTCTTGG
10	ATGATAGCATCCCTGGGTAG	GGACATCATTGCTGGCTG

Tabela 3. Sequências dos *primers* para amplificação dos éxons do gene *EFHC1*.

Éxon	Sequência Direta (5' – 3')	Sequência Reversa (5' – 3')
1	CGGATGTTTAGCGTTACCATG	TCAGGACAGAAGACGTGTTTG
2	CCATGCCCAGCCTTAATGTTG	AGCCCTTTGGAAATTCTGTGG
3	CTGTGTGGTTCTGTTTTCAAG	CTCAGACCCCACAACCTTCAA
4	GCCTGGCCCATACTTATTT	GCCTATTGTGGTTCCTATGTC
5	CAGCTAGTCTTCCATCGTTG	CATTAGGAGTGGGAAAGGATC
6	CCTCAGGTTCTCAAGAATGCC	AGTTAGATTGAGGGTCTTCTC
7	ATGATGCAAAATCCACAGAGG	CTCTGACAGCTGTTAATCTAC
8	ATATCTATACCTGGCCCCTA	ATTGTCGACATCTGTAGCCAA
9	GCTACAGATGTCGACAATAAG	TTCCCACCTGGTGAGAGAAAT
10	GCTTCCCTGATTCATCAAG	AAATCTGGCCAGTTGTAGTG
11	GGCTCGGGATCATTATGCATA	GTTTCGACTTCAGTAGGAGTG

Tabela 4. Sequências dos *primers* para amplificação dos éxons do gene *GABRA1*.

Éxon	Sequência Direta (5' – 3')	Sequência Reversa (5' – 3')
1	TATCCCAGTGAGGTCATTTC	CTCCTCTTTATTCTTAGCTGG
2	AACATTCCTTTTTACCTTGTG	TAGAGGTAAATTAAGGCTGTG
3	CCATTTGGGTGTCAGTATGTG	ACACAGAAAGACACAAAAGTA
4	GCGTTAGATATTTGCATTGCA	ATGATTGCCTACAAGTGGAAAG
5	TCTAATCTATATGGCTCTTGT	TTTTCTCACAGATATAGCTAG
6	GCTGATGAAAGGTACCAACTA	CTCCTAGACTTGTGTTACTGA
7	GAGAAAGGATGTGTCTAATTC	TTTCTCTTTCAGTGTACAG
8	GTCATGATACTGTTGATTTC	CCACAGGCCAAAACATCTCAT
9	GCTTCTCACTGTTTACTAAAC	CAAATTCCTTAAGACAGAGGC

As condições para a realização das PCRs foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos à temperatura de anelamento específica dos pares de *primers* e 1 minuto a 72°C; e, depois dos ciclos, extensão final a 72°C por 10 minutos. Para determinar a temperatura de anelamento ideal dos pares de *primers*, foram realizados PCRs com gradientes de temperatura. As temperaturas utilizadas foram: 55°C para amplificação dos fragmentos do gene *SCN1A*, 56°C para os genes *SLC2A1* e *GABRA1*, e 57°C para *EFHC1*.

A fim de aumentar a especificidade de amplificação foi utilizada a técnica de *touchdown* PCR (97), em que a temperatura de anelamento inicial da reação é superior à temperatura ideal dos *primers* em 10°C, sendo que ela é gradativamente diminuída nos ciclos subsequentes até que se atinja a temperatura ideal. Essa estratégia minimiza o surgimento de fragmentos inespecíficos, pois favorece a amplificação específica da região alvo. Outra estratégia utilizada para aperfeiçoar o processo de amplificação dos fragmentos de interesse foi a adição de albumina a 1% do volume final, que tem como objetivo diminuir o efeito de inibidores da PCR (98).

3.3.3. DETECÇÃO DE MUTAÇÕES

A detecção de mutações foi feita por meio da técnica de sequenciamento automático pelo método de Sanger (99). Antes das reações de sequenciamento, os produtos amplificados foram purificados com Exo-SAP (exonuclease I e fosfatase alcalina de camarão) para remover excesso de *primers* e de nucleotídeos. Adicionou-se 0,5µl de Exo-SAP a 1,5µl de produto da PCR. As amostras foram incubadas a 37°C por 15 minutos e depois aquecidas a 80°C por mais 15 minutos.

A reação de sequenciamento propriamente dita foi feita para um volume final de 10µl, contendo 4µl de solução pré-mix, 0,5µl de *primer* (10pmol/µl), sendo os mesmos usados para a PCR, porém dessa vez utilizados separadamente em cada reação, e 2µl do produto tratado com Exo-SAP. As condições para a realização do sequenciamento foram: 35 ciclos de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C e 1 minuto a 60°C.

Após a reação de sequenciamento, as amostras foram purificadas utilizando EDTA e etanol, conforme o protocolo sugerido pelo fabricante, e submetidas à eletroforese capilar no sequenciador automático ABI 3500xL (*Life Technologies*).

No caso de inserções e deleções, que oferecem dificuldade na visualização do eletroferograma, foi realizada clonagem em *Escherichia coli* (DH5 α) utilizando o vetor pGEM®-T Easy (Promega, Madison, WI, USA) conforme as instruções do fabricante. Diferentes clones foram então sequenciados, a fim de se obter a sequência nucleotídica de cada alelo isolado.

3.3.4. ANÁLISES DOS DADOS

A análise dos dados provenientes das reações de sequenciamento foi feita utilizando o programa *DNA Baser* (*Heracle Biosoft*®), que permite o alinhamento de múltiplos eletroferogramas e evidencia sequências discrepantes. Em seguida, as alterações identificadas foram comparadas com bancos de dados de variantes do *Ensembl*^{*} e NCBI[†], a fim de determinar se são polimorfismos comuns na população. Além disso, quando disponíveis, foram verificados os dados de frequência alélica dos mutantes provenientes de projetos que envolvem o sequenciamento de genomas de um grande número de indivíduos, tais como *Clinseq*, *NHLBI-ESP*, *ESP6500* e *1000GENOMES*.

A descrição das alterações encontradas foi feita de acordo com nomenclatura convencional para a descrição de variantes humanas (100) e com base nas seguintes isoformas de cada gene: GenBank AB093548 (*SCN1A*), NCBI Reference Sequence NM_006516.2 (*SLC2A1*), NCBI Reference Sequence NM_018100.3 (*EFHCI*) e Ensembl Reference Sequence ENST00000428797 (*GABRA1*).

* <http://ensembl.org>

† <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

3.3.5. ANÁLISES DE PREDIÇÃO DE POTENCIAL DELETÉRIO

As alterações que resultam em troca de aminoácido na proteína codificada foram submetidas a análises computacionais, a fim de estimar seu efeito na estrutura e função da proteína, utilizando os programas SIFT^{*}, Polyphen 2[†], Pmut[‡], PhD-SNP[§], MutPred^{**}, SNAP^{††} e SNP&GO^{‡‡}. Essas análises levam em consideração as diferenças físico-químicas entre o aminoácido original e o alterado, a posição da alteração e o nível de conservação entre sequências homólogas (101).

O programa SIFT faz um alinhamento de múltiplas sequências (MSA - *multiple sequence alignment*) e considera a posição da variante e o tipo de alteração de aminoácido. Com base em inferências sobre similaridade da sequência, ele calcula a probabilidade da variante ser tolerada.

O Polyphen 2 usa uma combinação de atributos de sequência e estrutura e prediz o efeito da mutação utilizando um classificador Bayesiano ingênuo. As características baseadas em sequência incluem valores obtidos pelo programa PSIC (*position-specific independent counts*), propriedades de MSA e posição da alteração em relação aos domínios definidos pelo banco de dados de famílias de proteínas Pfam. As características baseadas em estrutura são acessibilidade ao solvente e fator-B da proteína obtido por cristalografia.

O Pmut é baseado no uso de diferentes tipos de informação de sequência para caracterizar mutações, e utiliza redes neurais treinadas com um vasto banco de dados de mutações associadas a doenças para processar essa informação. O programa recupera do banco de dados uma série de parâmetros, tais como volume, propensões de estrutura secundária, descritores de hidrofobicidade e potencial da sequência. O programa também obtém descritores de MSAs por PSI-Blast utilizando o banco de dados do SwissProt.

* <http://sift.bii.a-star.edu.sg>

† <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>

‡ <http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut>

§ <http://gpcr2.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/PhD-SNP/PhD-SNP.cgi>

** <http://mutpred.mutdb.org>

†† <http://rostlab.org/services/snap>

‡‡ <http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go>

O PhD-SNP se baseia no princípio de máquina de vetores de suporte (SVM - *support vector machine*), método que analisa dados e reconhece padrões. O algoritmo em questão é treinado com as variantes do banco de dados Swiss-Prot, e é baseado em análises de sequência única e de perfis de sequência. No primeiro tipo de análise, a classificação da variante como patogênica ou neutra é feita com base na natureza da substituição e propriedades das sequências ao seu redor. No segundo tipo, são utilizadas informações obtidas de MSAs, classificando a variante conforme a razão entre as frequências do tipo selvagem e do mutante.

O MutPred é um método de classificação baseado em floresta aleatória (RF - *Random Forest*) e utiliza diversos atributos relacionados a estrutura, função e evolução da proteína. Os atributos evolutivos são definidos pelo método do SIFT, PSI-BLAST (*Position-Specific Iterated Basic Local Alignment Search Tool*), transição de frequências e perfis do Pfam. As descrições estruturais incluem predições de estrutura secundária, acessibilidade de solvente, hélice transmembrana, estrutura condensada, estabilidade, fator-B e desordem. Os atributos de função incluem predições de resíduos de ligação ao DNA, sítios catalíticos, alvos de ligação da calmodulina e sítios de modificações pós-traducionais. O programa retorna como resultado valores de probabilidade das alterações serem deletérias. No presente estudo, substituições com valores inferiores a 0,5 foram consideradas “neutras”, entre 0,5 e 0,75 foram denominadas “possivelmente deletérias” e acima ou iguais a 0,75 foram classificadas como “provavelmente deletérias”.

O SNAP é uma ferramenta baseada em rede neural que classifica a variante utilizando informações evolutivas provenientes de perfis de frequência, PSI-BLAST e PSIC, frequências de transição para mutações, características biofísicas da substituição, estrutura secundária, valores de acessibilidade do solvente, flexibilidade da cadeia, informação evolutiva da família da proteína, informações sobre domínios obtidas pelo Pfam e anotações do Swiss-Prot.

O SNP&GO é um classificador do tipo SVM que se baseia em informações acerca do tipo de mutação e suas sequências adjacentes, perfis de sequência obtidos de MSAs, predições do programa Panther e informações sobre função da proteína definidas por termos de ontologia gênica (GO - Gene Ontology).

Foi utilizada também a escala Grantham para medir a diferença entre os resíduos de aminoácido selvagem e mutante com base em suas composições, polaridades e volumes moleculares (102). Com base nos valores obtidos nessa escala, as substituições foram classificadas em “conservadas” (<50), “moderadas” (51–100), “radicais” (101–150) e “muito radicais” (>151) (103).

Para estimar possíveis abolições de sítios constitutivos de *splicing*, que poderiam levar ao processamento aberrante do mRNA, foram utilizados os algoritmos Human Splicing Finder^{*}, MaxEntScan[†], SpliceView[‡] e Sroogle[§]. Esses programas realizam cálculos baseados em matrizes de peso posicional (PWM - *position weight matrices*) (104). Esse tipo de análise segue o princípio de que um sítio de *splicing* em potencial pode ser definido como uma sequência de bases nucleotídicas, para cada qual é dado um peso com base em sua frequência e na importância relativa de sua posição na sequência. Assim, a importância de um sítio é dada pela soma dos pesos de cada nucleotídeo contido em sua sequência, acrescida a uma constante utilizada para normalização. Esse valor atribuído, quando superior a um dado limiar, sugere que o sítio em questão é um potencial doador ou aceptor de *splicing*. No caso dos sítios doadores de *splicing*, os nucleotídeos mais conservados são os três últimos do éxon e os seis primeiros do íntron. Por tanto, a matriz utilizada nos cálculos desses algoritmos, em geral, possuem nove nucleotídeos.

Para uma dada mutação localizada na junção éxon-íntron, os programas calculam um valor consenso com base nos critérios supramencionados, tanto para a sequência do tipo selvagem como para a mutante. O programa Human Splicing Finder, por exemplo, calcula a diferença entre esses dois valores e considera que reduções de ao menos 10% provavelmente possuem impacto significativo no processo de *splicing* (105).

* <http://www.umd.be/HSF/>

† http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html

‡ http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwspliceview_ex.html

§ <http://sroogle.tau.ac.il/>

O programa MaxEnt utiliza também o modelo de distribuição de máxima entropia (106), que parte do princípio de que a distribuição que mais se aproxima da realidade dentre todas as distribuições hipotéticas que satisfazem um conjunto de restrições é a que apresenta maior entropia de Shannon, a qual mede a incerteza associada a uma variável aleatória e pode ser calculada a partir de uma determinada equação.

3.3.6. INVESTIGAÇÃO EM GRUPO CONTROLE

As alterações potencialmente deletérias identificadas nos pacientes estudados foram investigadas em 100 indivíduos não afetados, a fim de averiguar a possibilidade de serem polimorfismos encontrados na população. Os indivíduos incluídos no grupo controle não possuem história familiar de epilepsia e são provenientes da região Sudeste.

3.3.7. *Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)*

Para detectar variações no número de cópias em *SCN1A*, foi utilizada a técnica MLPA, conforme demonstrado na figura 10. Para cada região alvo, é utilizado um par de sondas que possuem sequências específicas complementares ao fragmento de interesse, juntamente com regiões não complementares ao fragmento: sequências alvos para primers universais (X e Y), e uma outra região de tamanho variável denominada sequência *stuffer*.

Após desnaturação do DNA genômico, ocorre a hibridização entre os fragmentos alvos e os pares de sondas. Em seguida, a enzima ligase é adicionada a reação, sendo responsável pela ligação das duas sondas adjacentes e originando um fragmento único. Esse fragmento gerado serve de molde para subsequente amplificação por PCR utilizando primers universais. O produto de amplificação é submetido a eletroforese capilar, para posterior. A quantidade de sondas ligadas será proporcional a variação do número de cópias do fragmento alvo, e as deleções ou duplicações são detectadas de acordo com a altura dos picos no eletroferograma.

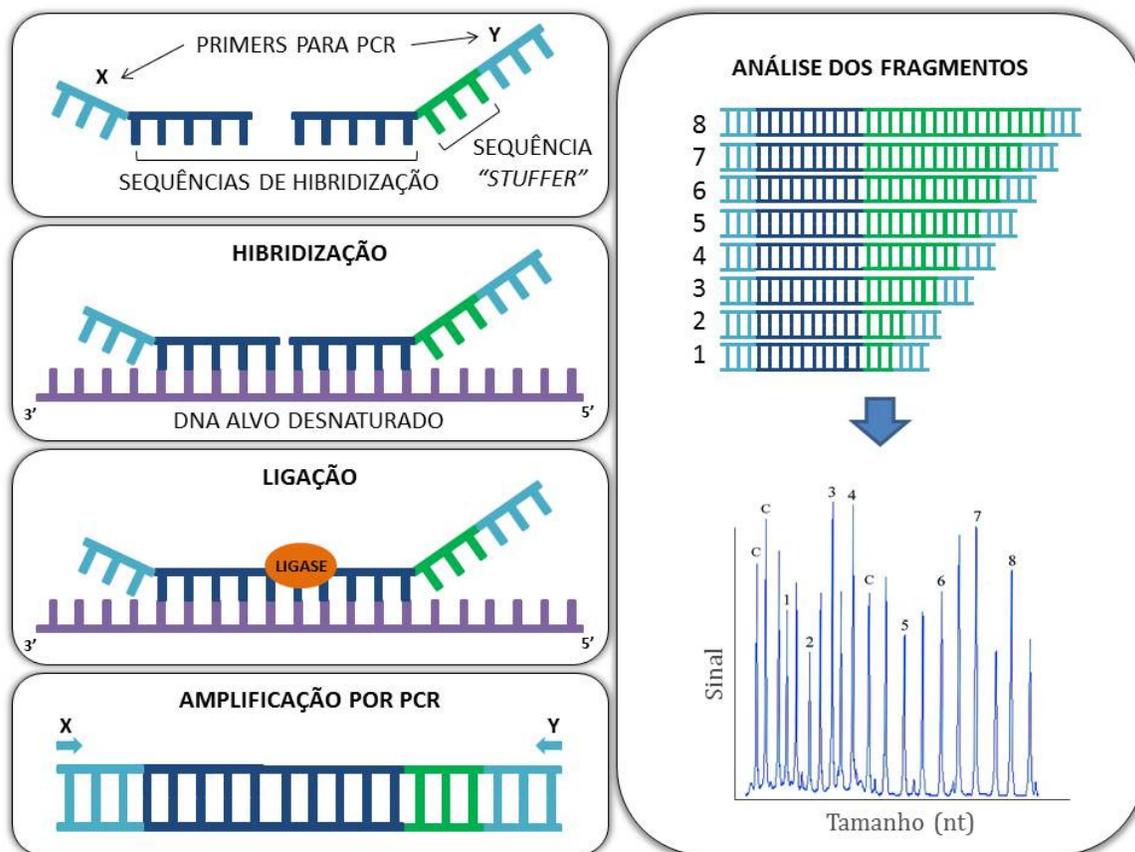


Figura 10. Princípio da técnica de *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA).

O kit utilizado para as análises por MLPA do gene *SCN1A* foi o SALSA P137-2 (*MRC-Holland*). As reações foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante e os fragmentos foram separados no aparelho ABI 3500xL. A análise dos dados foi realizada por meio dos softwares ABI Gene Mapper (*Life Technologies*) e Coffalyser (*MRC-Holland*), um programa baseado em excel que realiza a normalização dos picos gerados.

3.3.8. COMPILAÇÃO DE MUTAÇÕES DESCRITAS

As mutações previamente descritas na literatura nos genes *SCN1A*, *SLC2A1*, *EFHC1* e *GABRA1* para os fenótipos estudados foram compiladas. Para as alterações que resultam em troca do resíduo de aminoácido na proteína codificada, foram realizadas análises de predição de efeito deletério de acordo com os algoritmos mencionados.

Essas alterações também foram investigadas em bancos de dados do *Ensembl** referentes a projetos que envolvem o sequenciamento em larga escala de diferentes populações, como *Clinseq*, *NHLBI-ESP*, *ESP6500* e *1000GENOMES*.

* <http://ensembl.org>

4. RESULTADOS

4.1. ESPECTRO DA EPILEPSIA GENERALIZADA COM CRISES FEBRIS

4.1.1. GENE *SCN1A*

4.1.1.1. TRIAGEM DE MUTAÇÕES EM PACIENTES

Os pacientes com síndromes de Dravet e de Doose de nossa casuística foram submetidos à triagem de mutações no gene *SCN1A*. Foram identificadas alterações potencialmente deletérias em heterozigose em 17 dos 21 pacientes com **síndrome de Dravet** estudados, perfazendo 81% dos indivíduos com esse fenótipo. Dentre eles, duas gêmeas monozigóticas apresentaram a mesma alteração. Sendo assim, o total de alterações potencialmente deletérias identificadas foi de 16 (tabela 5). As frequências de cada tipo de mutação estão representadas na figura 11.

Tabela 5. Alterações potencialmente deletérias encontradas no gene *SCN1A* nos pacientes com síndrome de Dravet estudados.

Tipo de mutação	Éxon/Íntron	Alteração nucleotídica	Alteração protéica
Troca de sentido (<i>missense</i>)	Éxon 6	c.829T>C	p.C277R
	Éxon 7	c.971A>C	p.H324P
	Éxon 13	c.2360T>G	p.M787R
	Éxon 21	c.4093G>T	p.G1365C
	Éxon 26	c.5179G>T	p.D1727Y
c.5434T>C		p.W1812R	
Sítio de recomposição (<i>splicing</i>)	Íntron 2	IVS2+1A>G	-
	Íntron 4	IVS4+1G>A	-
	Íntron 8	IVS8+3G>T	-
	Íntron 21	IVS21+1G>A	-
Mudança na matriz de leitura (<i>frameshift</i>)	Éxon 9	c.1242delA	p.I415X
	Éxon 19	c.3719_3720insGATA	p.I1240fsX1244
	Éxon 26	c.5329delG	p.V1777fsX1778
Deleções <i>in-frame</i>	Éxon 2	c.296_313delTCTTCCGGTTCAGT GCCA	p.I99_A104del
	Éxon 26	c.5489_5491delAGT	p.Q1830_F1831delinsL
Sem sentido (<i>nonsense</i>)	Éxon 26	c.5177G>A	p.W1726X

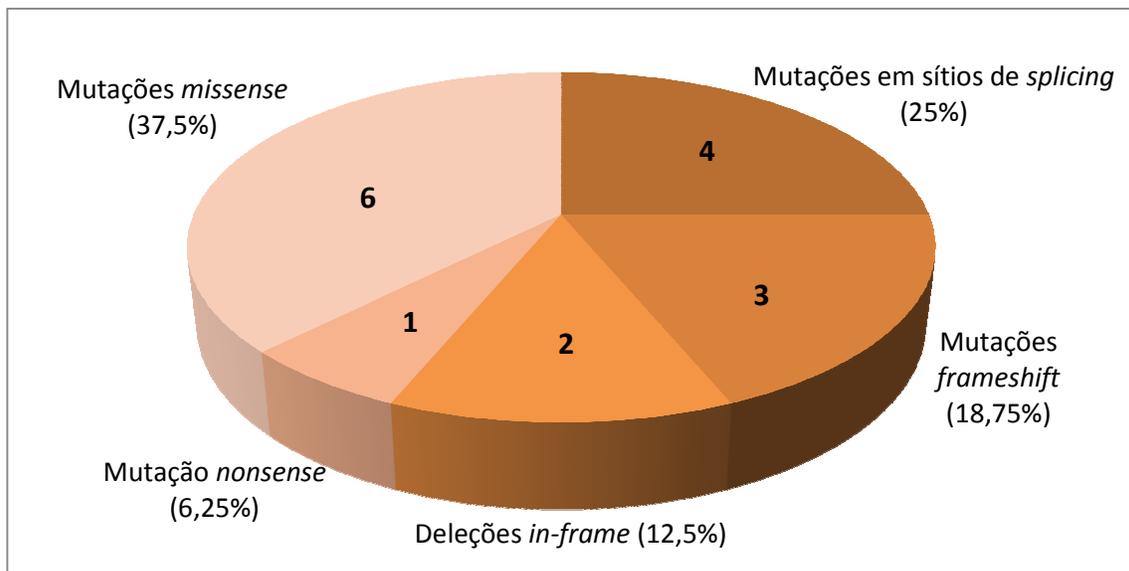


Figura 11. Gráfico representativo dos tipos de alterações potencialmente deletérias encontradas no gene *SCN1A* nos pacientes com síndrome de Dravet estudados.

As mutações do tipo “sentido trocado”, comumente referidas pelo termo em inglês *missense*, são substituições de base única que resultam em troca do resíduo de aminoácido na proteína codificada. A figura 12 ilustra as seis mutações *missense* identificadas nos pacientes com síndrome de Dravet de nossa casuística. Três delas (c.829T>C, c.971A>C e c.5434T>C) foram descritas previamente em minha dissertação de mestrado, enquanto as outras três são inéditas (c.2360T>G, c.4093G>T e c.5178G>T).

As análises de predição de efeito deletério das alterações identificadas anteriormente em nossa casuística haviam sido realizadas com apenas três algoritmos preditivos e a escala de Grantham. Sendo assim, os resultados das análises utilizando os demais programas estão apresentados na tabela 6, juntamente com as predições referentes às alterações inéditas.

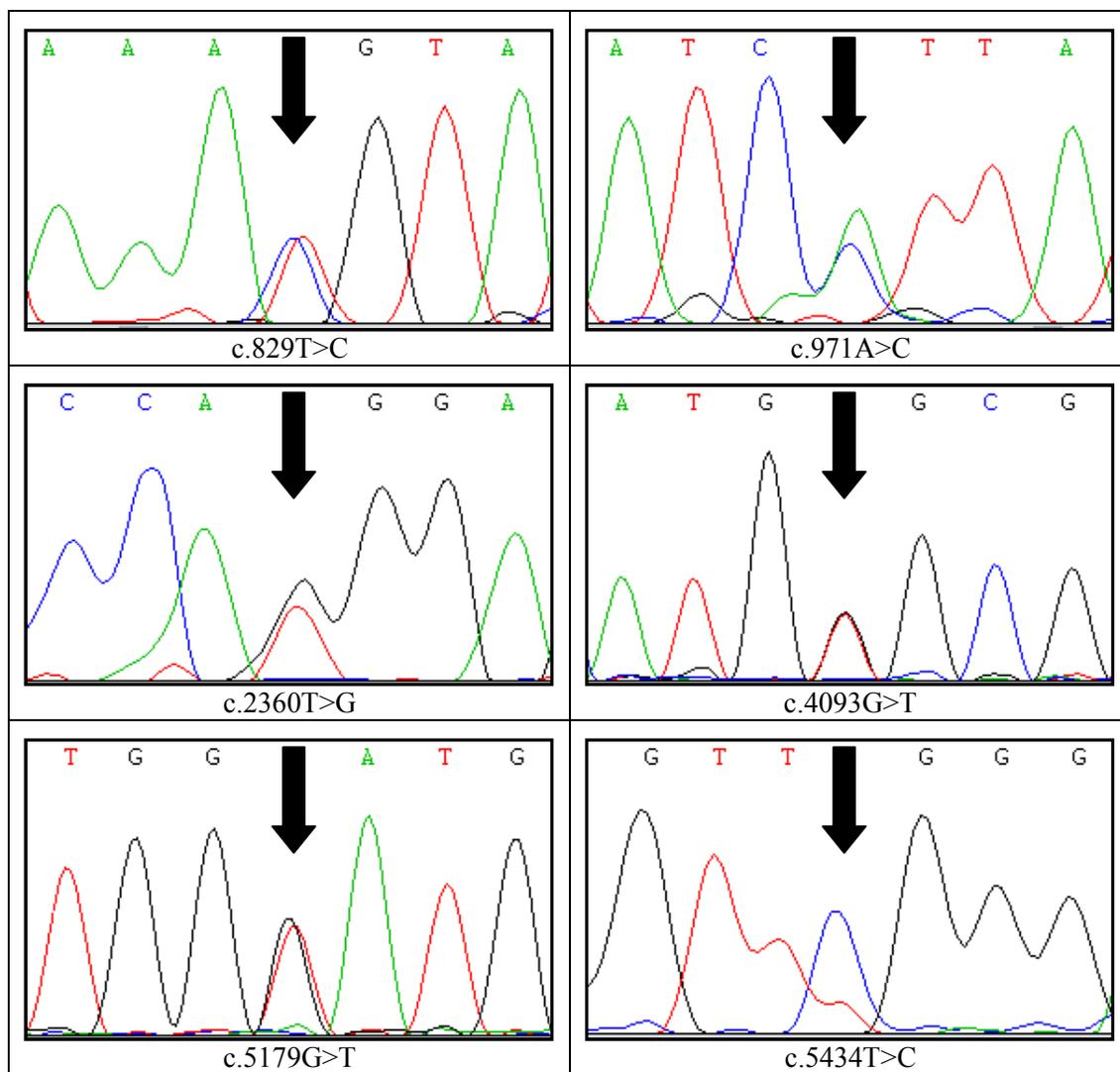


Figura 12. Alterações potencialmente deletérias *missense* detectadas por sequenciamento automático do gene *SCN1A* em pacientes com síndrome de Dravet.

Tabela 6. Predição do potencial deletério das alterações *missense* encontradas no gene *SCN1A* em pacientes com síndrome de Dravet.

Alteração nucleotídica	Alteração protéica	Predição de potencial deletério							
		Escala de Grantham	PolyPhen 2	SNAP	Pmut	MutPred	PhD-SNP	SIFT	SNPs&GO
c.829T>C	p.C277R	180	Provavelmente deletéria	Não-neutra	Patológica	Provavelmente deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria
c.971A>C	p.H324P	77	Benigna	Não-neutra	Patológica	Possivelmente deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria
c.2360T>G	p.M787R	91	Possivelmente deletéria	Não-neutra	Patológica	Possivelmente deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria
c.4093G>T	p.G1365C	159	Provavelmente deletéria	Não-neutra	Patológica	Provavelmente deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria
c.5179G>T	p.D1727Y	160	Provavelmente deletéria	Não-neutra	Patológica	Possivelmente deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria
c.5434T>C	p.W1812R	101	Provavelmente deletéria	Não-neutra	Patológica	Provavelmente deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria

As quatro alterações potencialmente deletérias identificadas nas junções éxon-íntron estão ilustradas na figura 13. Essas alterações estão localizadas em sítios doadores de *splicing* (ou recomposição), que é o processo de remoção dos íntrons no transcrito que dará origem ao RNAm maduro. As mutações IVS2+1A>G, IVS4+1G>A e IVS8+3G>T foram detectadas durante o meu mestrado, sendo que as duas primeiras já haviam sido relatadas na literatura (107 e 108).

Foram realizadas análises de predição do efeito dessas variantes nos motivos que sinalizam para o processo de *splicing*. Os valores calculados pelos diferentes programas para os alelos selvagem e mutante das alterações IVS4+1G>A, IVS8+3G>T e IVS21+1G>A encontram-se na tabela 7. Nos três casos, houve diminuição nos valores referentes aos potenciais sinais de *splicing* ou até mesmo falha no reconhecimento da sequência mutante como potencial sítio de *splicing*. Já a mutação restante (IVS2+1A>G) não pôde ser analisada, pois os algoritmos utilizados não possuem a capacidade de identificar o sítio doador constitutivo do íntron 2.

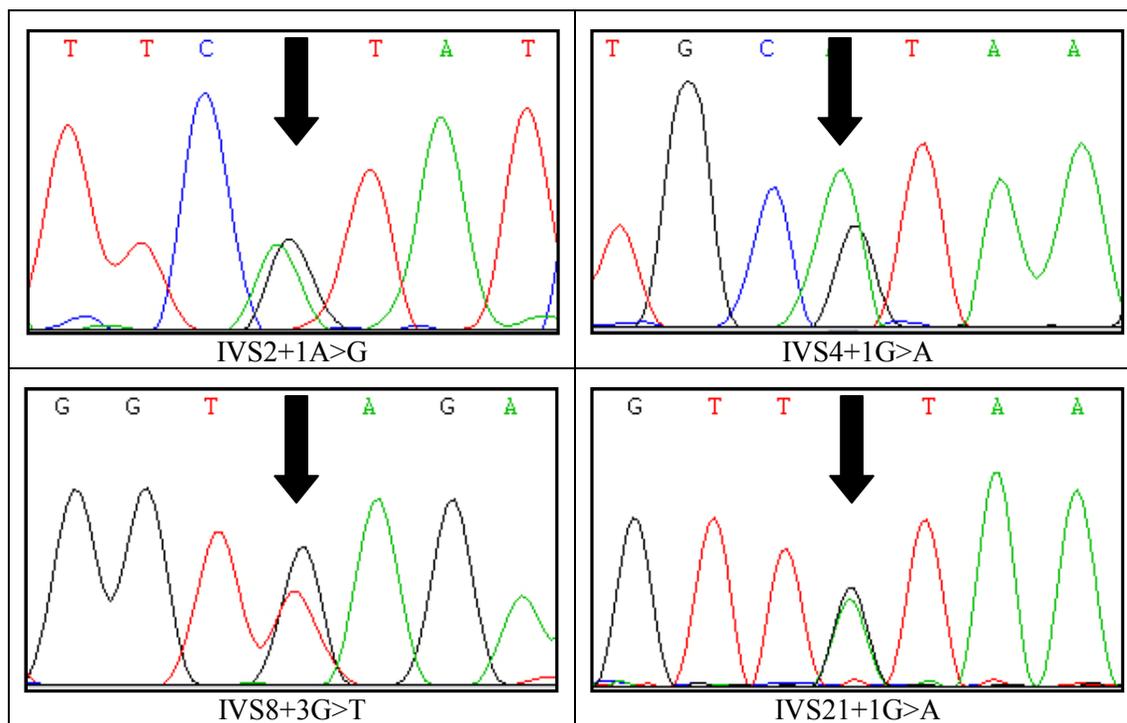


Figura 13. Alterações potencialmente deletérias em regiões de sítio de *splicing* detectadas por sequenciamento automático do gene *SCN1A* em pacientes com síndrome de Dravet.

Tabela 7. Predição do efeito nos motivos que sinalizam para o processo de *splicing* das alterações em junções éxon-íntron do gene *SCN1A* em pacientes com síndrome de Dravet.

Alteração nucleotídica	Valores de sinais de <i>splicing</i>											
	Human Splicing Finder			Sroogle			SpliceView			Max-EntScan		
	VS	VM	Variação	VS	VM	Variação	VS	VM	Variação	VS	VM	Variação
IVS4+1G>A	82,15	55,31	-32,67%	73,48	NC	NC	79	NC	NC	9,73	1,55	-84,07%
IVS8+3G>T	91,76	87,89	-4,21%	81,12	76,00	-6,31%	85	77	-9,41%	7,54	3,13	-58,49%
IVS21+1G>A	82,62	55,79	-32,48%	75,80	NC	NC	80	NC	NC	8,3	0,11	-98,67

VS: valor calculado para o alelo selvagem; VM: valor calculado para o alelo mutante; NC: não calculado

Também foram observadas em nossa casuística de síndrome de Dravet duas deleções e uma inserção que resultam em mudança na matriz de leitura e, portanto, são classificadas como mutações *frameshift* (figuras 14, 15 e 16). A inserção c.3719_3720insGATA foi identificada durante o mestrado, porém ainda não havia sido confirmada por clonagem e sequenciamento dos alelos separadamente. Já as deleções c.1242delA e c.5329delG são inéditas. As três alterações resultam na geração de códon de terminação de cadeia prematuro.

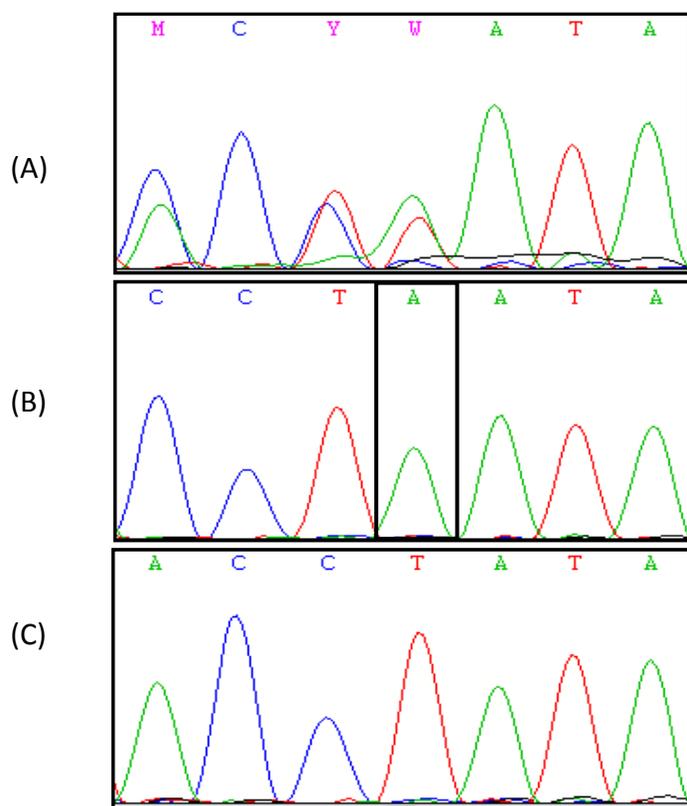


Figura 14. Eletroferogramas ilustrando a deleção c.1242delA no gene *SCN1A* detectada por sequenciamento automático. A) ambos os alelos sequenciados utilizando o *primer* de sentido reverso; B) alelo selvagem; C) alelo mutante, contendo a deleção do nucleotídeo destacado em B).

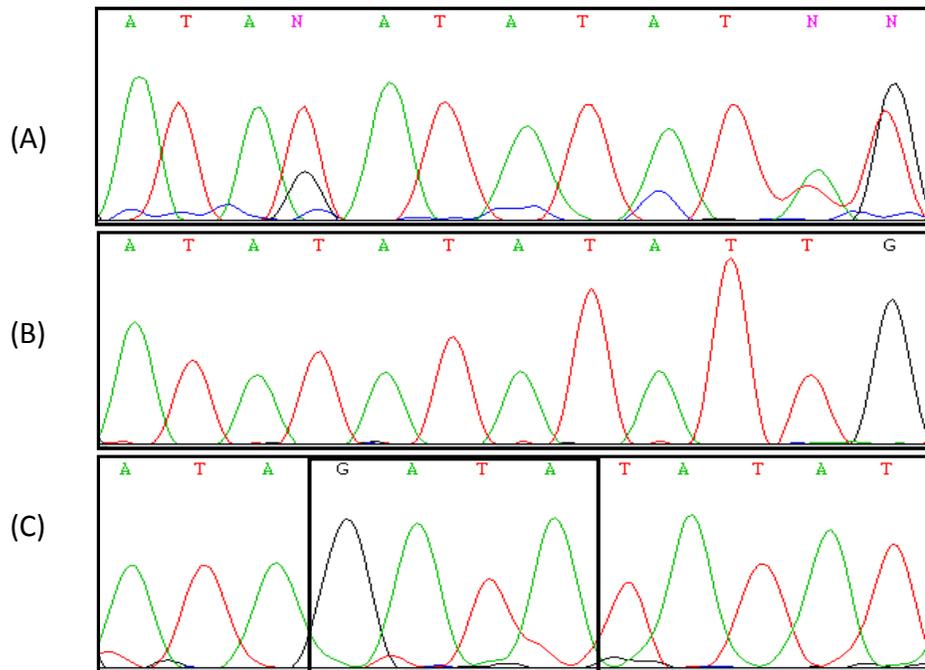


Figura 15. Eletroferogramas ilustrando a inserção c.3719_3720insGATA no gene *SCN1A* detectada por sequenciamento automático. A) ambos os alelos sequenciados utilizando o *primer* de sentido direto; B) alelo selvagem; C) alelo mutante, contendo a inserção dos quatro nucleotídeos destacados.

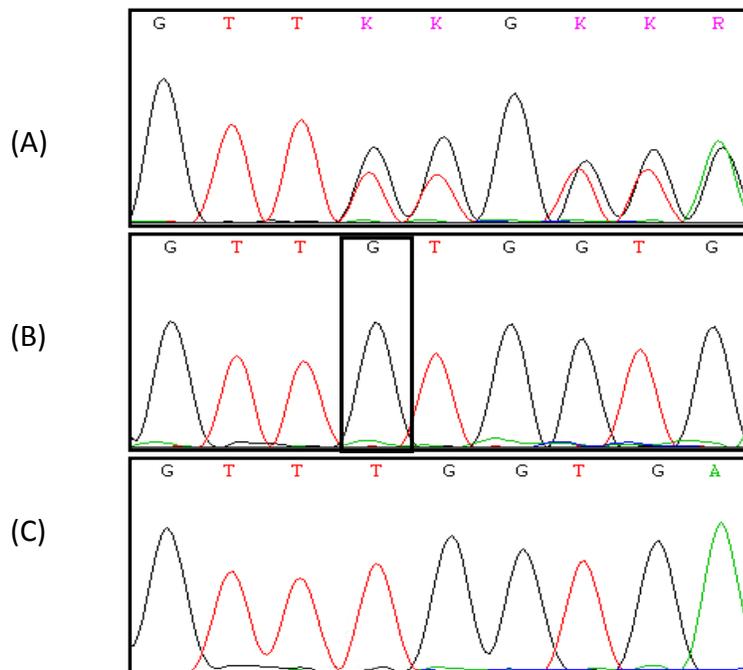


Figura 16. Eletroferogramas ilustrando a deleção c.5329delG no gene *SCN1A* detectada por sequenciamento automático. A) ambos os alelos sequenciados utilizando o *primer* de sentido direto; B) alelo selvagem; C) alelo mutante, contendo a deleção do nucleotídeo destacado em B).

As outras duas deleções identificadas não promovem mudança na matriz de leitura, ou seja, são *in-frame* (figuras 17 e 18). A alteração c.296_313delTCTTCCGGTTCAGTGCCA resulta na deleção de seis resíduos de aminoácido (isoleucina, fenilalanina, arginina, fenilalanina, serina e alanina) nas posições 99 a 104 da proteína (p.I99_A104del). A deleção c.5489_5491delAGT, por sua vez, promove a substituição de dois resíduos de aminoácido, glutamina e fenilalanina, por uma leucina (p.Q1830_F1831delinsL). Ambas as deleções *in-frame* são inéditas.

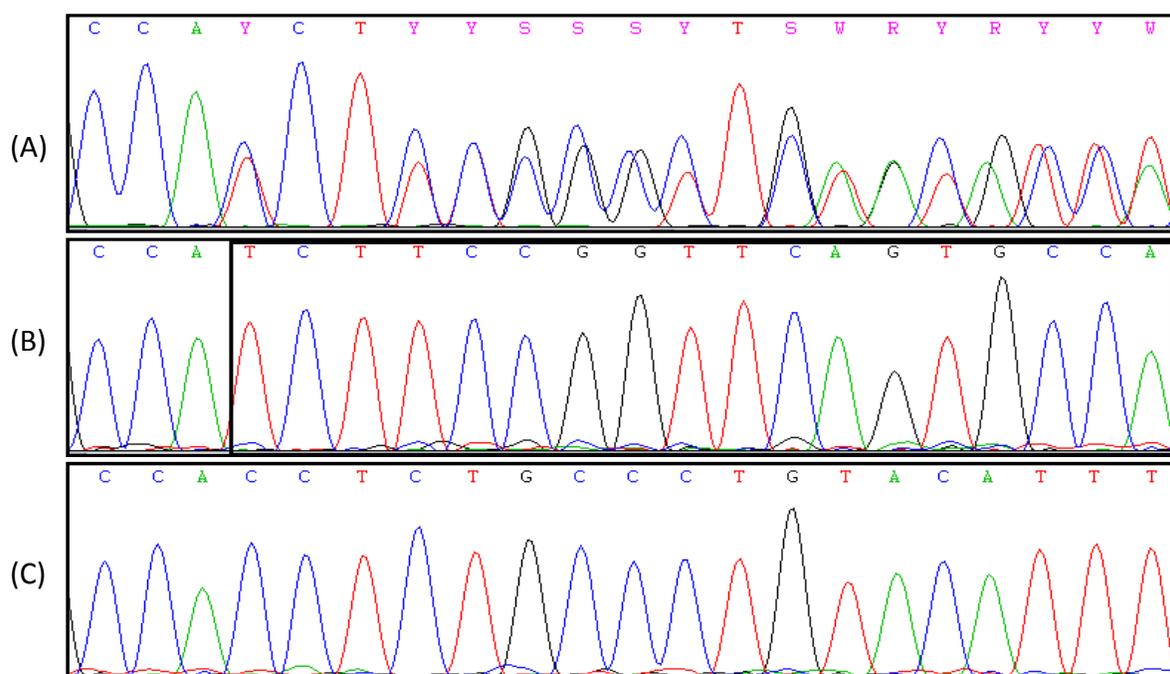


Figura 17. Eletroferogramas ilustrando a deleção c.296_313delTCTTCCGGTTCAGTGCCA no gene *SCN1A* detectada por sequenciamento automático. A) ambos os alelos sequenciados utilizando o *primer* de sentido direto; B) alelo selvagem; C) alelo mutante, contendo a deleção dos 18 nucleotídeos destacados em B).

Interessantemente, a deleção c.296_313delTCTTCCGGTTCAGTGCCA foi identificada também por MLPA (figura 19), e está presente em gêmeas monozigóticas. Além dessa deleção, as pacientes apresentam uma alteração *missense* em heterozigose no éxon 26 (c.5864T>C). Essa alteração promove a substituição de uma isoleucina por uma treonina na posição 1955 (p.I1955T). Segundo os resultados das análises de predição, apresentados na tabela 8, ela é considerada benigna pela maioria dos programas utilizados. Além disso, essa alteração está presente também na mãe não afetada e em um indivíduo controle. A frequência do alelo mutante em estudos populacionais encontra-se na tabela 9.

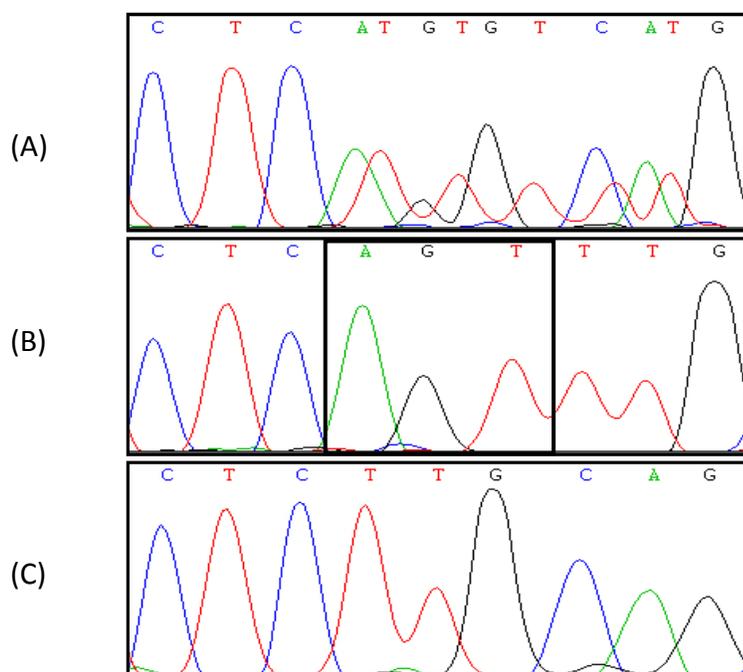


Figura 18. Eletroferogramas ilustrando a deleção c.5489_5491delAGT no gene *SCN1A* detectada por sequenciamento automático. A) alelos simultaneamente sequenciados utilizando o *primer* de sentido direto; B) alelo selvagem; C) alelo mutante, contendo a deleção dos três nucleotídeos destacados em B).

Tabela 8. Resultados das análises de predição do potencial deletério da alteração p.I1955T no gene *SCN1A*.

Escala de Grantham	PolyPhen	SNAP	Pmut	MutPred	PhD-SNP	SIFT	SNPs&GO
89	Benigna	Não-neutra	Deletéria	Neutra	Neutra	Tolerada	Neutra

Tabela 9. Frequências alélicas da alteração c.5864T>C em estudos populacionais.

Projeto	População investigada	Cromossomos investigados	Frequência alélica
NHLBI-ESP	Norte-americana	4548	1,1%
ESP6500	Afroamericana	4406	2,7%
	Euroamericana	8600	0%
1000GENOMES	Geral	2184	0,6%
	Africana em geral	492	2,4%
	Luhyas (África)	194	4,5%
	Iorubas (África)	176	1,5%

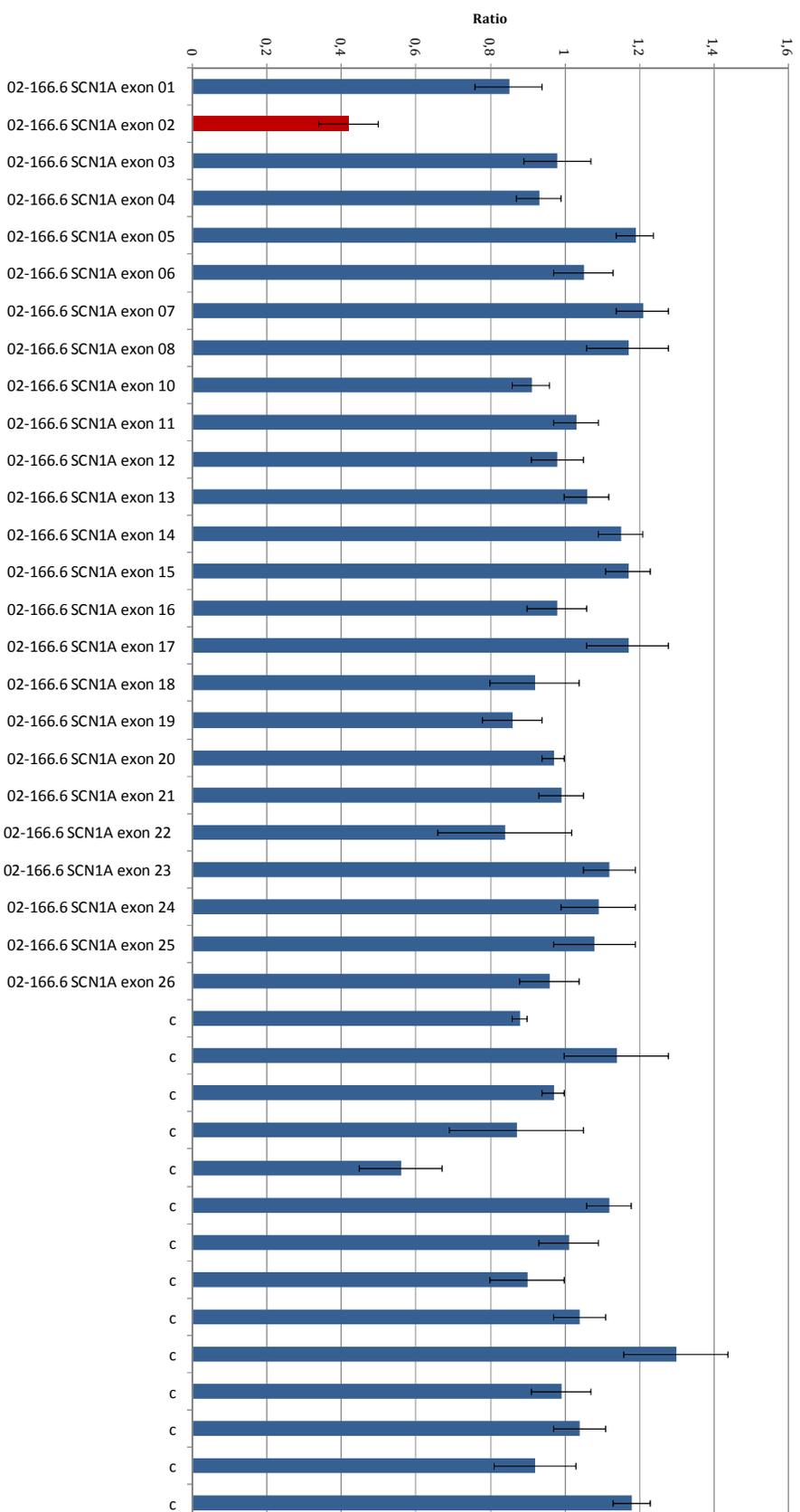


Figura 19. Gráfico referente ao resultado das análises de MLPA mostrando uma deleção no éxon 2 do gene *SCN1A* identificada em dois indivíduos com síndrome de Dravet.

A última alteração identificada em pacientes com síndrome de Dravet é uma mutação do tipo “sem sentido”, conhecida como *nonsense*, em que a substituição de um nucleotídeo resulta na troca do códon referente a um aminoácido por um códon de parada, promovendo o término prematuro da síntese da cadeia polipeptídica (figura 20).

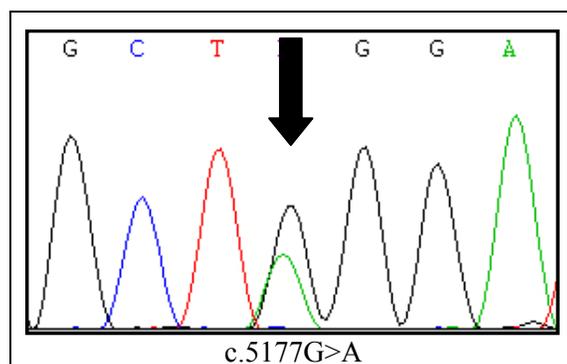


Figura 20. Alteração *nonsense* detectada por sequenciamento automático do gene *SCN1A* em pacientes com síndrome de Dravet.

Para averiguar se as alterações potencialmente deletérias identificadas em pacientes com síndrome de Dravet estão presentes em indivíduos sem epilepsia, um grupo de 100 indivíduos controles foi investigado. Nenhum dos alelos mutantes foi encontrado nesse grupo e nem nos pais dos pacientes, exceto pela alteração *missense* identificada nas gêmeas monozigóticas (c.5864T>C).

Além das alterações potencialmente deletérias supracitadas, foi observada a alteração *missense* c.3199G>A, já relatada como polimorfismo de base única (SNP, do inglês *single nucleotide polymorphism*) em bancos de dados (variante rs2298771) e que possui frequência alélica de 21% na população geral estudada pelo projeto *1000GENOMES*. Essa alteração promove a troca de um alanina por uma treonina na posição 1067 (p.A1067T) e é considerada benigna pelos algoritmos de predição de efeito deletério (tabela 10).

Tabela 10. Resultados das análises de predição do potencial deletério da alteração p.A1067T no gene *SCN1A*.

Escala de Grantham	PolyPhen	SNAP	PMut	MutPred	PhD-SNP	SIFT	SNPs&GO
58	Benigna	Neutra	Neutra	Neutra	Neutra	Tolerada	Neutra

Também foram encontradas quatro mutações silenciosas, ou seja, que não resultam em troca de resíduo de aminoácido na proteína codificada: c.345T>C (rs61741123), c.670T>C, c.1212A>G (rs7580482) e c.2292 T>C (rs6432860).

Com relação às análises de variações no número de cópias em *SCN1A* pela técnica de MLPA, não foram detectadas alterações além da deleção de 18 pares de bases nas gêmeas monozigóticas com síndrome de Dravet.

Na investigação de mutações em *SCN1A* nos indivíduos com **síndrome de Doose**, apenas um dos 16 pacientes estudados apresentou alteração potencialmente deletéria (6,25%). Trata-se de uma mutação do tipo *missense* em heterozigose (c.68C>T) que promove a troca de uma alanina por uma valina na posição 23 da proteína (p.A23V). Os resultados das análises de predição de potencial deletério dessa alteração estão apresentados na tabela 11. O alelo mutante não foi identificado em nosso grupo controle de 100 indivíduos, e sua frequência alélica em estudos populacionais encontra-se na tabela 12.

Tabela 11. Resultados das análises de predição do potencial deletério da alteração p.A23V.

Escala de Grantham	PolyPhen	SNAP	Pmut	MutPred	PhD-SNP	SIFT	SNPs&GO
64	Provavelmente deletéria	Neutra	Patológica	Neutra	Deletéria	Tolerada	Deletéria

Tabela 12. Frequências alélicas da alteração c.68C>T em estudos populacionais.

Projeto	População investigada	Cromossomos investigados	Frequência alélica
NHLBI-ESP	Norte-americana	4548	0,04%
ESP6500	Afroamericana	4406	0,2%
	Euroamericana	8600	0%
1000GENOMES	Geral	2184	0,04%
	Africana em geral	492	0,2%
	Afroamericana	122	0,8%

O polimorfismo c.3199G>A e as alterações silenciosas encontrados em pacientes com síndrome de Dravet também foram observados nos pacientes com síndrome de Doose.

As análises utilizando a técnica de MLPA não revelaram alterações de número de cópias em *SCN1A* nos pacientes com síndrome de Doose.

4.1.1.2. COMPILAÇÃO DE MUTAÇÕES DESCRITAS NA LITERATURA

A compilação de mutações descritas na literatura em *SCN1A* revelou um total de 1043 alterações nucleotídicas em pacientes com diferentes fenótipos, incluindo, além dos relacionados ao espectro de GEFS+, encefalopatias epiléticas em geral, epilepsia intratável da infância com CTG, epilepsias criptogênicas focal e generalizada, epilepsia do lobo frontal noturna autossômica dominante, síndrome de Panayiotopoulos, enxaqueca hemiplégica familiar, autismo, epilepsia ausência juvenil com crises febris, epilepsia mioclônica juvenil e síndrome de Lennox-Gastaut.

Considerando apenas o fenótipo de **síndrome de Dravet**, ou seja, excluindo as mutações específicas de outros fenótipos e de indivíduos não classificados, o número de mutações é de 774 (74% do total de mutações descritas). As frequências dos tipos de mutações descritas na literatura em *SCN1A* para todos os fenótipos e apenas para a síndrome de Dravet encontram-se nas figuras 21 e 22, respectivamente.

Dentre as alterações *missense*, tipo mais frequente observado, as que resultam em trocas de resíduos de aminoácido repetidas foram analisadas apenas uma vez cada. Os resultados das análises de predição de efeito deletério estão apresentadas no apêndice 4.

As substituições derivadas das mutações *missense* foram distribuídas conforme sua provável localização nos diferentes segmentos da proteína Na_v1.1. Para evitar um possível viés nessas análises, foram excluídas as quatro alterações consideradas polimorfismos por alguns autores e outras 13 que foram preditas como benignas por mais da metade dos programas utilizados. Sendo assim, foram avaliadas 332 trocas de resíduos de aminoácidos, incluindo as identificadas no presente estudo. A distribuição das substituições de resíduos de aminoácidos ao longo da proteína está representada na figura 23.

Como cada região protéica possui uma quantidade diferente de aminoácidos, uma segunda análise foi realizada levando-se em consideração o tamanho de cada segmento. A distribuição da frequência de mutações por resíduo de aminoácido ao longo da proteína encontra-se na figura 24.

Uma terceira análise foi realizada agrupando os segmentos em comum de cada domínio (S1, S2, S3, S4, S5 e S6), as regiões entre esses segmentos (S1-S2, S2-S3, S3-S4, S4-S5 e S5-S6), as regiões entre os domínios (D-D) e as porções terminais (C- e T-terminal). A figura 25 mostra o gráfico representativo dessa distribuição.

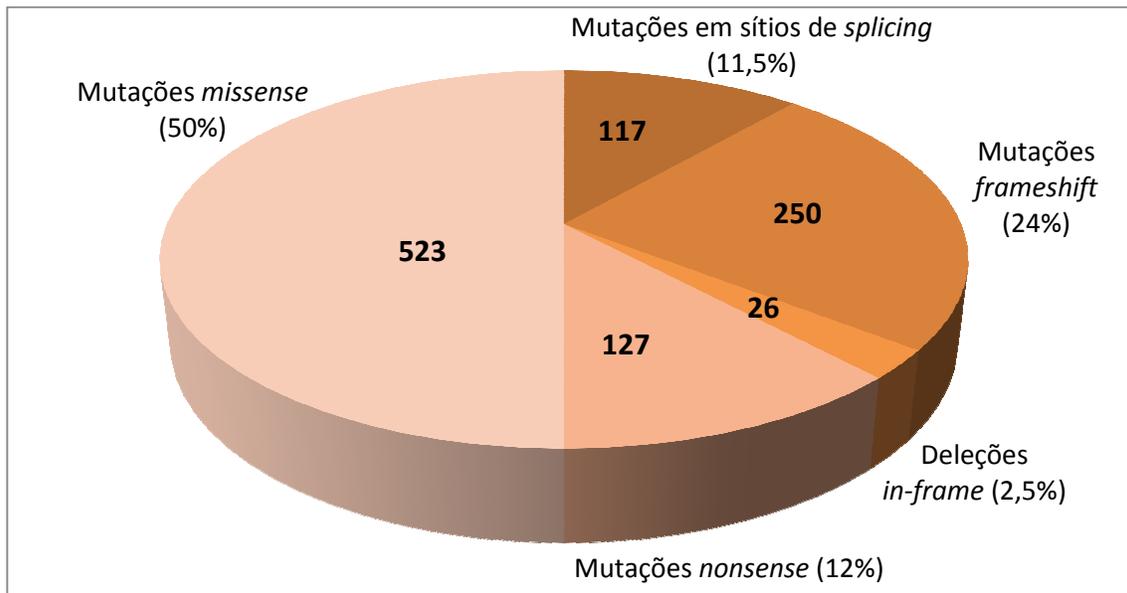


Figura 21. Gráfico representativo dos tipos de mutações no gene *SCN1A* relacionadas na literatura.

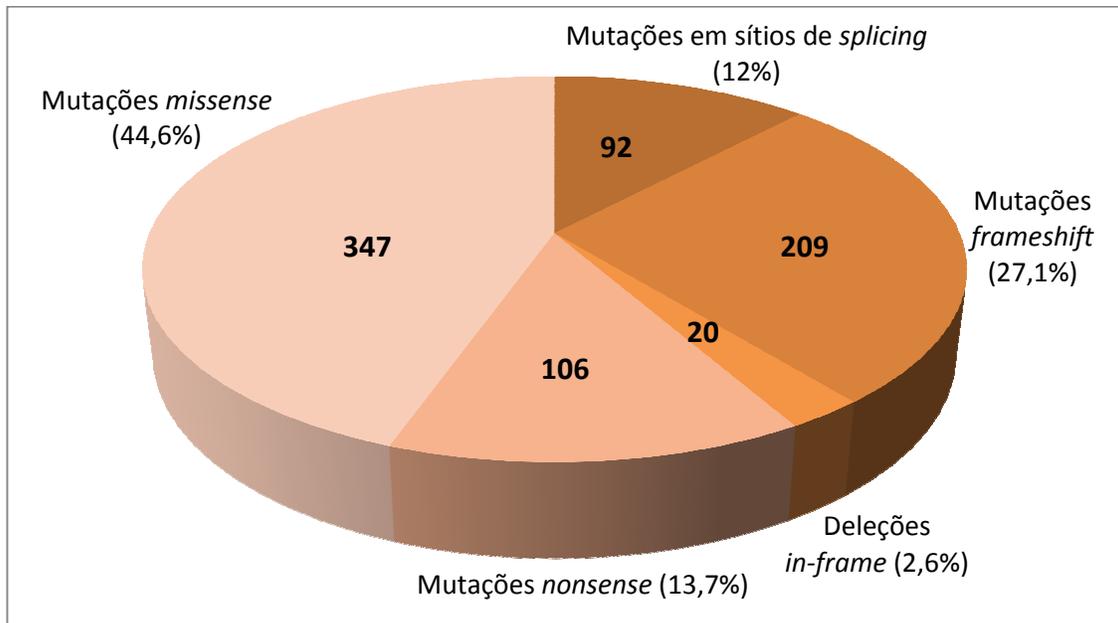


Figura 22. Gráfico representativo dos tipos de mutações no gene *SCN1A* relacionadas na literatura em pacientes com síndrome de Dravet.

Figura 23. Distribuição das substituições de aminoácidos descritas em pacientes com síndrome de Dravet ao longo da proteína Na_v1.1.



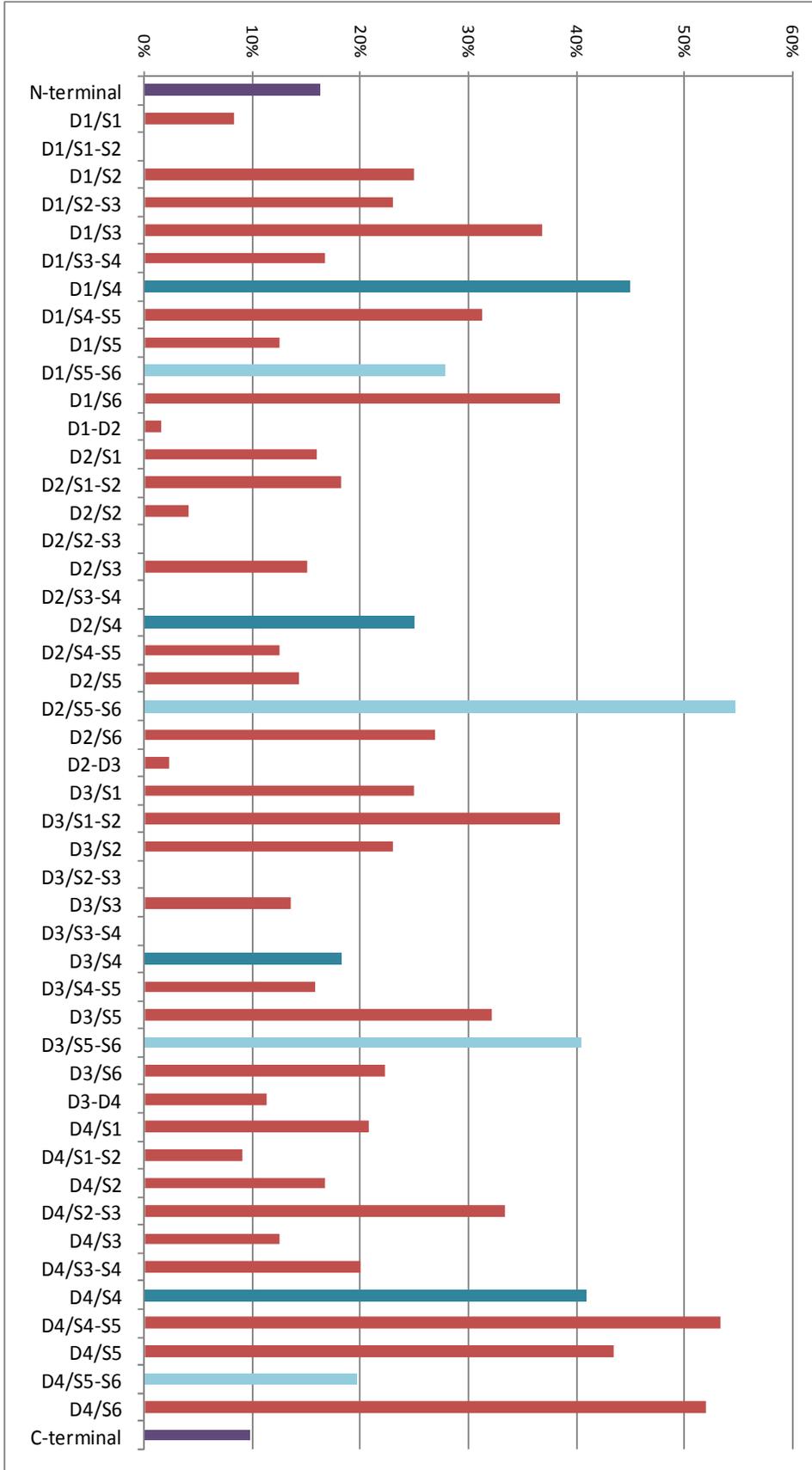


Figura 24. Distribuição da frequência de mutações por resíduo de aminoácido ao longo da proteína Na_v.1.1 para as substituições descritas em pacientes com síndrome de Dravet.

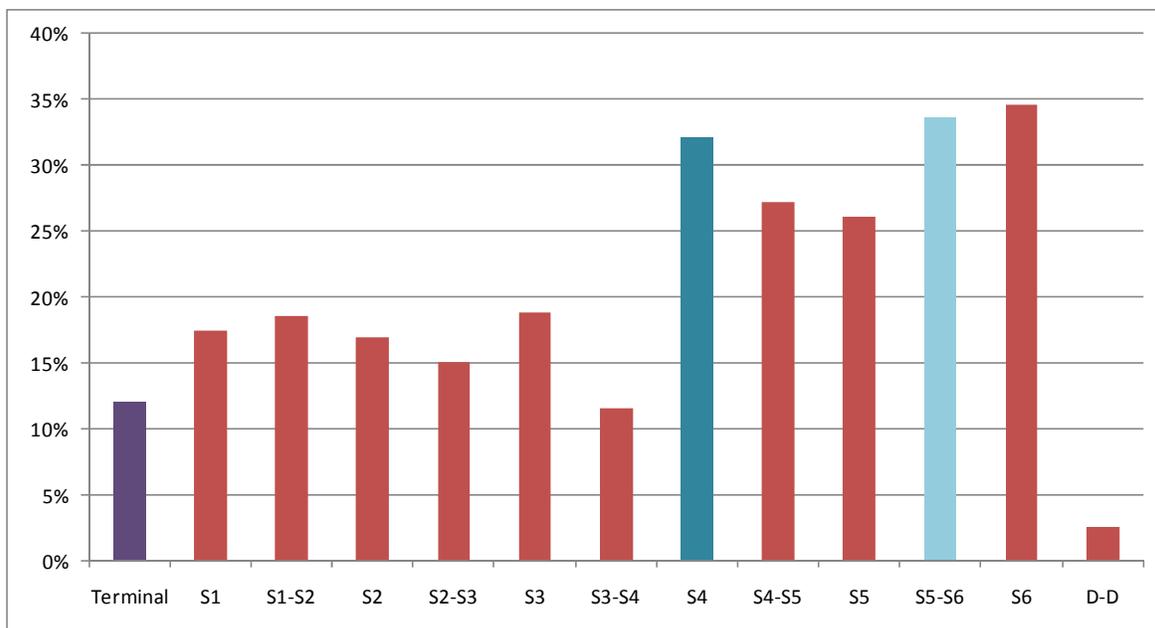


Figura 25. Distribuição da frequência de mutações por resíduo de aminoácido ao longo da proteína Na_v1.1, agrupadas por segmentos, para as substituições descritas em pacientes com síndrome de Dravet.

Para o fenótipo da **síndrome de Doose**, a compilação de mutações em *SCN1A* relatadas na literatura revelou sete alterações potencialmente deletérias, todas em apenas um indivíduo cada. Essas variantes e suas respectivas alterações protéicas encontram-se na tabela 13. Os resultados das análises de predição de efeito deletério das alterações *missense* descritas estão representados na tabela 14. A única alteração identificada em estudos populacionais foi a c.3521C>G, cuja frequência alélica encontra-se na tabela 15.

Tabela 13. Alterações em *SCN1A* em pacientes com síndrome de Doose descritas na literatura.

Tipo de mutação	Éxon	Alteração nucleotídica	Alteração protéica	Referências
Troca de sentido (<i>missense</i>)	6	c.940T>C	p.W314R	109
	9	c.1177C>T	p.R393C	110
	17	c.3521C>G	p.T1174S	111
	23	c.4439G>T	p.G1480V	110
	26	c.5060T>C	p.F1687S	42
		c.5213A>G	p.D1742G	112
Mudança na matriz de leitura (<i>frameshift</i>)	9	c.1299_1300insC	p.E435GfsX15	113

Tabela 14. Predição do potencial deletério das alterações *missense* descritas na literatura no gene *SCN1A* em pacientes com síndrome de Doose.

Alteração nucleotídica	Alteração protéica	Predição de potencial deletério							
		Escala de Grantham	PolyPhen 2	SNAP	Pmut	MutPred	PhD-SNP	SIFT	SNPs&GO
c.940T>C	p.W314R	101	Provavelmente deletéria	Patológica	Não-neutra	Possivelmente deletéria	Deletéria	Tolerada	Deletéria
c.1177C>T	p.R393C	180	Provavelmente deletéria	Patológica	Não-neutra	Possivelmente deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria
c.3521C>G	p.T1174S	58	Benigna	Neutra	Neutra	Neutra	Neutra	Tolerada	Neutra
c.4439G>T	p.G1480V	109	Provavelmente deletéria	Patológica	Não-neutra	Provavelmente deletéria	Neutra	Deletéria	Deletéria
c.5060T>C	p.F1687S	155	Provavelmente deletéria	Patológica	Não-neutra	Possivelmente deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria
c.5213A>G	p.D1742G	94	Provavelmente deletéria	Patológica	Não-neutra	Possivelmente deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria

82

Tabela 15. Frequências alélicas da alteração c.3521C>G em estudos populacionais.

Projeto	População investigada	Cromossomos investigados	Frequência alélica
Clinseq	Europeia	1323	0,4%
NHLBI-ESP	Norte-americana	4550	0,1%
ESP6500	Afroamericana	4406	0,04%
	Euroamericana	8600	0,2%

4.1.2. GENE *SLC2A1*

4.1.2.1. TRIAGEM DE MUTAÇÕES EM PACIENTES

A triagem de mutações no gene *SLC2A1* realizada nos pacientes com **síndrome de Doose** não revelou alterações potencialmente deletérias. Foram identificadas apenas seis substituições de base única que não promovem troca de resíduo de aminoácido na proteína codificada (tabela 16). Dentre elas, uma é inédita (c.1149T>C) e as outras cinco estão presentes em bancos de dados de SNPs.

Tabela 16. Alterações nucleotídicas encontradas no gene *SCL2A1* nos pacientes com síndrome de Doose estudados.

Éxon	Alteração nucleotídica	Identificação da variante	Número de pacientes com alteração
2	c.45C>T	rs1385129	7
4	c.399C>T	rs11537641	4
5	c.588G>A	rs2229682	4
7	c.966C>T	rs2229680	3
8	c.1065A>G	rs2228490	1
9	c.1149T>C	-	1

4.1.2.2. COMPILAÇÃO DE MUTAÇÕES DESCRITAS NA LITERATURA

Um total de três mutações no gene *SLC2A1* foi identificado até o momento em pacientes com síndrome de Doose em dois estudos recentes (tabela 17). Todas são do tipo *missense*, e os resultados da predição de potencial deletério dessas substituições encontram-se na tabela 18.

Tabela 17. Alterações em *SLC2A1* em pacientes com síndrome de Doose descritas na literatura.

Éxon	Alteração nucleotídica	Alteração protéica	Número de pacientes com alteração	Referências
7	c.971C>T	p.S324L	2	54, 56
8	c.997C>T	p.R333W	2	54
9	c.1199G>A	p.R400H	1	54

Tabela 18. Predição do potencial deletério das alterações *missense* descritas na literatura no gene *SLC2A1* em pacientes com síndrome de Doose.

Alteração nucleotídica	Alteração protéica	Predição de potencial deletério							
		Escala de Grantham	PolyPhen 2	SNAP	Pmut	MutPred	PhD-SNP	SIFT	SNPs&GO
c.971C>T	p.S324L	145	Provavelmente deletéria	Não-neutra	Neutra	Provavelmente deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria
c.997C>T	p.R333W	101	Provavelmente deletéria	Não-neutra	Patológica	Provavelmente deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria
c.1199G>A	p.R400H	29	Provavelmente deletéria	Não-neutra	Patológica	Provavelmente deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria

4.2. EPILEPSIAS IDIOPÁTICAS GENERALIZADAS COMUNS

4.2.1. GENE *SCL2A1*

4.2.1.1. TRIAGEM DE MUTAÇÕES EM PACIENTES

Além da análise de mutações no gene *SCL2A1* realizada nos pacientes com síndrome de Doose de nossa casuística, os pacientes com **EMJ** e **outras EIGs** também foram submetidos à triagem de mutações nesse gene. Entretanto, não foram identificadas alterações potencialmente deletérias, apenas sete alterações silenciosas em heterozigose, todas previamente relatadas em bancos de dados de SNPs (tabela 19).

Tabela 19. Alterações nucleotídicas encontradas no gene *SCL2A1* nos pacientes com EIGs estudados.

Éxon/Íntron	Alteração nucleotídica	Identificação da variante	Número de pacientes com alteração
Éxon 2	c.27G>A	rs34025424	1
	c.45C>T	rs1385129	34
Éxon 4	c.399C>T	rs11537641	18
Éxon 5	c.588G>A	rs2229682	21
Éxon 7	c.966C>T	rs2229680	6
Éxon 8	c.1011C>T	rs2229681	2
	c.1065A>G	rs2228490	2

4.2.1.2. COMPILAÇÃO DE MUTAÇÕES DESCRITAS NA LITERATURA

Foram descritas até o momento 22 alterações no gene *SLC2A1* em pacientes com EIGs, representadas na tabela 21. Uma delas, c.971C>T, também foi identificada em pacientes com síndrome de Doose (tabela 15). As análises de predição de efeito deletério dessas alterações encontram-se na tabela 22. Apenas a alteração c.179C>T já foi detectada em estudos populacionais, e sua frequência alélica está apresentada na tabela 20.

Tabela 20. Frequências alélicas da alteração c.179C>T em estudos populacionais.

Projeto	População investigada	Cromossomos investigados	Frequência alélica
NHLBI-ESP	Norte-americana	4550	0,02%
ESP6500	Afroamericana	4406	0,02%

Tabela 21. Alterações em *SLC2A1* em pacientes com EMJ e outras EIGs comuns descritas na literatura.

Tipo de mutação	Éxon/ Íntron	Alteração nucleotídica	Alteração protéica	Fenótipos	Referências
Troca de sentido (<i>missense</i>)	Éxon 3	c.179C>T	p.T60M	EAJ, EMJ	114
		c.230T>C	p.M77T	CTCG	114
	Éxon 4	c.277C>T	p.R93W	EAIP	115
		c.[283T>A; 284C>T]	p.S95I	DPE-E	93
		c.376C>T	p.R126C	EAIP, GLUT1- CMA	116, 117
		c.457C>T	p.R153C	EAIP	115
		c.476T>G	p.L159R	EAIP	115
		Éxon 5	c.627G>C	p.E209D	EAIP
	c.643C>T		p.L215F	EAIP	115
	c.652C>A		p.R218S	EAJ	114
	c.668G>C		p.R223P	EAIP, EAJ, EAIA, CF	56, 116
	Éxon 6	c.694C>T	p.R232C	EAI, EAJ, EAI/EMJ, EAIP e EAIA	95
		c.728A>T	p.E243V	EAJ	114
	Éxon 7	c.971C>T	p.S324L	EAIP, EAI, EAJ, EAI/EMJ	56, 116
	Éxon 8	c.1006C>G	p.L336V	EAIP	118
Éxon 9	c.1232A>G	p.N411S	EAI/EMJ	114	
Éxon 10	c.1372C>T	p.R458W	EAI	114	
Sítio de recomposição (<i>splicing</i>)	Íntron 5	c.680-11G>A	p.227- 228insPP V	EAIP	116
Mudança na matriz de leitura (<i>frameshift</i>)	Deleção éxons 3 e 4	-	-	EAIP	115
Deleções <i>in-frame</i>	Éxon 8	c.1022_1033d el	p.Q282_S 285del	DPE-E	94
	Éxon 9	c1134-1136del CTT	p.F379del	EAIP	115
Sem sentido (<i>nonsense</i>)	Éxon 9	c.1189C>T	p.Q397X	EAIP	118

EAJ: epilepsia ausência juvenil; EMJ: epilepsia mioclônica juvenil; CTCG: crises tônico-clônico generalizadas; EAIP: epilepsia ausência de início precoce; EAIA: epilepsia ausência de início na fase adulta; DPE-E: discinesia paroxística induzida por exercício com epilepsia; GLUT1-CMA: síndrome de deficiência de GLUT1 com crises mioclônicas e de ausência; EAI: epilepsia ausência da infância.

Tabela 22. Predição do potencial deletério das alterações no gene *SLC2A1* em pacientes com EIGs descritas na literatura.

Alteração nucleotídica	Alteração protéica	Predição de potencial deletério						
		Escala de Grantham	PolyPhen 2	SNAP	MutPred	PhD-SNP	SIFT	SNPs&GO
c.179C>T	p.T60M	81	Possivelmente deletéria	Neutra	Neutra	Neutra	Tolerada	Deletéria
c.230T>C	p.M77T	81	Possivelmente deletéria	Não-neutra	Possivelmente deletéria	Neutra	Tolerada	Deletéria
c.277C>T	p.R93W	101	Provavelmente deletéria	Não-neutra	Provavelmente deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria
c.[283T>A; 284C>T]	p.S95I	142	Provavelmente deletéria	Neutra	Possivelmente deletéria	Deletéria	Tolerada	Deletéria
c.376C>T	p.R126C	180	Provavelmente deletéria	Não-neutra	Provavelmente deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria
c.457C>T	p.R153C	180	Provavelmente deletéria	Não-neutra	Provavelmente deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria
c.476T>G	p.L159R	102	Provavelmente deletéria	Não-neutra	Provavelmente deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria
c.627G>C	p.E209D	45	Possivelmente deletéria	Não-neutra	Provavelmente deletéria	Neutra	Deletéria	Deletéria
c.643C>T	p.L215F	22	Benigna	Neutra	Provavelmente deletéria	Neutra	Tolerada	Deletéria
c.652C>A	p.R218S	110	Possivelmente deletéria	Neutra	Neutra	Neutra	Tolerada	Deletéria
c.668G>C	p.R223P	103	Benigna	Não-neutra	Provavelmente deletéria	Deletéria	Tolerada	Deletéria
c.694C>T	p.R232C	180	Provavelmente deletéria	Neutra	Possivelmente deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria
c.728A>T	p.E243V	121	Possivelmente deletéria	Neutra	Possivelmente deletéria	Neutra	Deletéria	Deletéria
c.971C>T	p.S324L	145	Provavelmente deletéria	Não-neutra	Provavelmente deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria
c.1006C>G	p.L336V	32	Provavelmente deletéria	Neutra	Provavelmente deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria
c.1232A>G	p.N411S	46	Provavelmente deletéria	Neutra	Provavelmente deletéria	Deletéria	Tolerada	Deletéria
c.1372C>T	p.R458W	101	Provavelmente deletéria	Não-neutra	Provavelmente deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria

4.2.2. GENE *EFHC1*

4.2.2.1. TRIAGEM DE MUTAÇÕES EM PACIENTES

A triagem de mutações no gene *EFHC1* em pacientes com **EMJ** e **outras EIGs** revelou um total de 11 alterações do tipo *missense* em heterozigose, sendo sete potencialmente deletérias (tabela 23 e figura 26) e quatro previamente relatadas como polimorfismos (tabela 24). As sete alterações não consideradas SNPs foram identificadas em dez indivíduos com EMJ, perfazendo aproximadamente 10% dos pacientes com esse fenótipo. Os resultados das análises de predição de potencial patogênico das alterações identificadas encontram-se nas tabelas 25 e 26.

Tabela 23. Alterações potencialmente deletérias encontradas no gene *EFHC1* e suas frequências nos pacientes com EMJ estudados e em 100 indivíduos controles.

Éxon	Alteração nucleotídica	Alteração protéica	Pacientes com alteração	Frequência alélica em relação ao fenótipo	Frequência alélica em controles
3	c.475C>G *	R159G	1	0,5% (EMJ)	0,5%
4	c.662G>A	R221H	1	0,5% (EMJ)	0,5%
	c.685T>C	F229L	3	1,5% (EMJ)	0,5%
5	c.887G>A*	R296H	2	1% (EMJ)	0%
	c.896A>G *	K299R	1	0,5% (EMJ)	0%
10	c.1765G>A*	E589K	1	0,5% (EMJ)	0%
	c.1820A>G *	N607S	1	0,5% (EMJ)	0%

*alterações inéditas em pacientes com EMJ; EMJ: epilepsia mioclônica juvenil

As variantes c.475C>G, c.662G>A, c.685T>C, c.887G>A, c.1765G>A e c.1820A>G já foram identificadas em projetos que envolvem o sequenciamento de genomas de um grande número de pessoas, e suas frequências alélicas encontram-se na tabela 27.

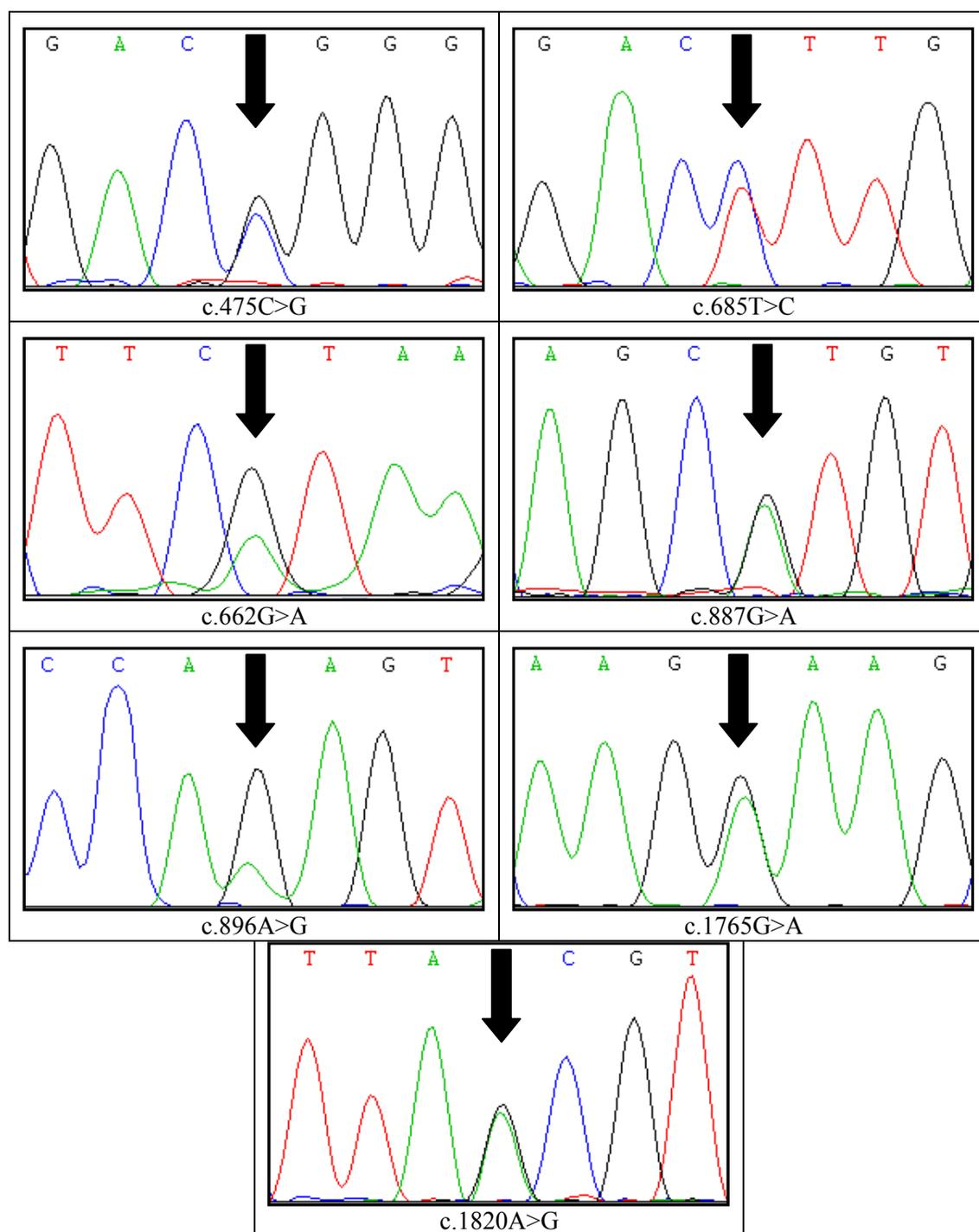


Figura 26. Alterações potencialmente deletérias detectada por sequenciamento automático no gene *EFHC1* em pacientes com EMJ.

Tabela 24. Polimorfismos codificantes encontrados no gene *EFHC1* e suas frequências nos pacientes com EMJ e outras EIGs estudados e em 100 indivíduos controles.

Éxon	Alteração nucleotídica	Alteração protéica	Identificação da variante	Número de pacientes com alteração	Frequência em relação ao fenótipo	Frequência em controles
3	c.475C>T	R159W	rs3804506	15	15% (EMJ) 7% (CTCGd) 15% (EAJ)	15%
				1		
				2		
	c.545G>A	R182H	rs3804505	5	5% (EMJ)	8%
8	c.1343T>C	M448T	rs1266787	8	8% (EMJ)	8%
11	c.1855A>C	I619L	rs17851770	14	14% (EMJ) 7% (CTCGd)	9%
				1		

EMJ: epilepsia mioclônica juvenil; CTCGd: crises tônico-clônicas generalizadas ao despertar; EAJ: epilepsia ausência juvenil.

Tabela 25. Predição do potencial deletério das alterações não consideradas SNPs no gene *EFHC1* em pacientes com EIGs.

06

Alteração nucleotídica	Alteração protéica	Predição de potencial deletério							
		Escala de Grantham	PolyPhen	SNAP	Pmut	MutPred	PhD-SNP	SIFT	SNPs&GO
c.475C>G	p.R159G	125	Benigna	Não-neutra	Patológica	Neutra	Neutra	Tolerada	Neutra
c.662G>A	p.R221H	29	Benigna	Não-neutra	Patológica	Provavelmente deletéria	Deletéria	Tolerada	Neutra
c.685T>C	p.F229L	22	Possivelmente deletéria	Não-neutra	Benigna	Possivelmente deletéria	Neutra	Tolerada	Neutra
c.887G>A	p.R296H	29	Benigna	Não-neutra	Patológica	Possivelmente deletéria	Deletéria	Deletéria	Neutra
c.896A>G	p.K299R	26	Possivelmente deletéria	Neutra	Benigna	Possivelmente deletéria	Neutra	Tolerada	Neutra
c.1765G>A	p.E589K	56	Benigna	Neutra	Patológica	Possivelmente deletéria	Neutra	Tolerada	Neutra
c.1820A>G	p.N607S	46	Benigna	Neutra	Patológica	Possivelmente deletéria	Neutra	Tolerada	Neutra

Tabela 26. Predição do potencial deletério dos polimorfismos codificantes encontrados no gene *EFHCI* em pacientes com EIGs.

Alteração nucleotídica	Alteração protéica	Predição de potencial deletério							
		Escala de Grantham	PolyPhen 2	SNAP	Pmut	MutPred	PhD-SNP	SIFT	SNPs&GO
c.475C>T	p.R159W	101	Provavelmente deletéria	Não-neutra	Patológica	Neutra	Neutra	Tolerada	Neutra
c.545G>A	p.R182H	29	Benigna	Neutra	Patológica	Neutra	Neutra	Tolerada	Neutra
c.1343T>C	p.M448T	81	Benigna	Não-neutra	Patológica	Neutra	Neutra	Tolerada	Neutra
c.1855A>C	p.I619L	5	Benigna	Neutra	Benigna	Neutra	Neutra	Tolerada	Neutra

Tabela 27. Frequências alélicas das alterações encontradas em *EFHCI* em estudos populacionais.

Projeto	População investigada	Cromossomos investigados	Frequência alélica					
			c.475C>G	c.662G>A	c.685T>C	c.887G>A	c.1765G>A	c.1820A>G
Clinseq	Européia	1323	0%	-	0,3%	0,1%	0,1%	-
NHLBI-ESP	Norte-americana	4550	0%	0,8%	0,4%	0,4%	-	0,2%
ESP6500	Afroamericana	4406	0%	2,4%	0,04%	1,2%	-	0,5%
	Euroamericana	8600	0%	0%	0,5%	0%	-	0%
1000GENOMES	Geral	2184	0%	0,4%	0,1%	0,3%	-	0,3%
	Africana em geral	492	0%	1,4%	0%	1,4%	-	1,2%
	Luhyas (África)	194	0%	0%	0%	2,1%	-	2,1%
	Iorubas (África)	176	4,2%*	3,4%	0%	1,1%	-	0,6%
	Européia em geral	758	0%	0%	0,3%	0%	-	0%
	Toscana (Itália)	196	0%	0%	1%	0%	-	0%
	Porto Rico	110	0%	1,8%	0%	0%	-	0%

* projeto piloto com 118 cromossomos investigados

4.2.2.2. COMPILAÇÃO DE MUTAÇÕES DESCRITAS NA LITERATURA

Foi realizada também uma compilação das mutações em *EFHCI* em pacientes com EMJ e outras EIGs relatadas na literatura. Dentre elas, 16 foram descritas como tendo uma possível implicação patogênica (tabela 28), sendo que dados dos projetos de sequenciamento populacional em larga escala estão disponíveis para algumas delas (tabelas 27 e 29). Outras seis alterações foram descritas e são consideradas polimorfismos comuns na população (tabela 30). Os resultados das análises de predição de potencial deletério dessas alterações estão apresentados nas tabelas 31 e 32.

Tabela 28. Alterações em *EFHCI* em pacientes com EIGs descritas na literatura.

Éxon	Alteração nucleotídica	Alteração protéica	Número de pacientes com alteração	Referência
-	_364^- 362delGAT	5' UTR	1 (EMJ)	89
2	c.229C>A	P77T	5 (EMJ)	65, 90
3	c.352C>T	R118C	3 (EMJ)	119
	c.458G>A	R153Q	1 (EMJ)	119
	c.520A>G	I174V	1 (EAJ)	91
	c.544C>T	R182C	1 (EMJ)	119
	c.628G>A	D210N	3 (EMJ)	65, 90
4	c.662G>A	R221H	6 (EMJ)	65, 90, 120
	c.685T>C	F229L	10 (EMJ), 5 (EIG)	65, 88, 90, 91
5	c.755C>A	T252K	2 (EMJ)	89, 90
	c.757G>T	D253Y	3 (EMJ)	65, 90
	c.776G>A	C259Y	1 (EAJ)	91
6	c.1057C>T	R353W	2 (EMJ), 1 (IGE)	88
7	c.1180G>T	A394S	1 (EIG)	91
9	c.1523C>G	T508R	1 (EMJ)	89
-	2014T>C	3' UTR	1(EMJ)	91

Tabela 29. Frequências alélicas das alterações encontradas em *EFHCI* em estudos populacionais.

Projeto	População investigada	Cromossomos investigados	Frequência alélica				
			c.229C>A	c.458G>A	c.544C>T	c.1057C>T	c.1523C>G
Clinseq	Européia	1323	-	0,1%	0,1%	-	-
NHLBI-ESP	Norte-americana	4550	0,9%	0,04%	-	-	-
ESP6500	Afroamericana	4406	2,4%	0%	0,02%	0,04%	-
	Euroamericana	8600	0%	0,3%	0%	0%	-
1000GENOMES	Geral	2184	0,4%				
	Africana em geral	492	1,4%				
	Iorubas (África)	176	3,4%	-	-	-	0%
	Porto Rico	110	1,8%				

93

Tabela 30. Polimorfismos codificantes em *EFHCI* em pacientes com EMJ e outras EIGs comuns descritas na literatura.

Éxon	Alteração nucleotídica	Alteração protéica	Identificação da variante	Referência
3	c.457C>T	p.R159W	rs3804506	65, 88, 90, 91, 120, 121
	c.545G>A	p.R182H	rs3804505	65, 88, 90, 91, 120, 121
4	c.661T>C	p.R221C	-	71
5	c.884G>A	p.R294H	rs1570624	91, 120
6	c.1062G>A	p.E357K	-	120
8	c.1343T>C	p.M448T	rs1266787	88, 90, 91, 120, 121
11	c.1855A>C	p.I619L	rs17851770	65, 88, 90, 120, 121

Tabela 31. Predição do potencial deletério das alterações não consideradas SNPs no gene *EFHC1* em pacientes com EIGs descritas na literatura.

Alteração nucleotídica	Alteração protéica	Predição de potencial deletério							
		Escala de Grantham	PolyPhen 2	SNAP	Pmut	MutPred	PhD-SNP	SIFT	SNPs&GO
c.229C>A	p.P77T	38	Benigna	Não-neutra	Neutra	Possivelmente deletéria	Neutra	Tolerada	Neutra
c.352C>T	p.R118C	180	Provavelmente deletéria	Não-neutra	Patológica	Provavelmente deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria
c.458>A	p.R153Q	43	Possivelmente deletéria	Não-neutra	Patológica	Provavelmente deletéria	Neutra	Tolerada	Deletéria
c.520A>G	p.I174V	29	Benigna	Neutra	Neutra	Provavelmente deletéria	Neutra	Tolerada	Neutra
c.544C>T	p.R182C	180	Provavelmente deletéria	Não-neutra	Patológica	Neutra	Deletéria	Deletéria	Neutra
c.628G>A	p.D210N	23	Provavelmente deletéria	Não-neutra	Neutra	Provavelmente deletéria	Deletéria	Deletéria	Neutra
c.755C>A	p.T252K	78	Benigna	Neutra	Patológica	Provavelmente deletéria	Deletéria	Tolerada	Neutra
c.757G>T	p.D253Y	160	Possivelmente deletéria	Neutra	Patológica	Provavelmente deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria
c.776G>A	p.C259Y	194	Benigna	Não-neutra	Patológica	Provavelmente deletéria	Deletéria	Tolerada	Neutra
c.1057C>T	p.R353W	101	Possivelmente deletéria	Não-neutra	Patológica	Provavelmente deletéria	Neutra	Deletéria	Neutra
c.1180G>T	p.A394S	99	Benigna	Não-neutra	Neutra	Provavelmente deletéria	Neutra	Tolerada	Neutra
c.1523C>G	p.T508R	71	Benigna	Não-neutra	Patológica	Provavelmente deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria

Tabela 32. Predição do potencial deletério dos polimorfismos codificantes no gene *EFHC1* em pacientes com epilepsias idiopáticas generalizadas descritas na literatura.

Alteração nucleotídica	Alteração protéica	Predição de potencial deletério							
		Escala de Grantham	PolyPhen 2	SNAP	Pmut	MutPred	PhD-SNP	SIFT	SNPs&GO
c.475C>T	p.R159W	101	Provavelmente deletéria	Não-neutra	Patológica	Neutra	Neutra	Tolerada	Neutra
c.545G>A	p.R182H	29	Benigna	Neutra	Patológica	Neutra	Neutra	Tolerada	Neutra
c.661T>C	p.R221C	180	Provavelmente deletéria	Não-neutra	Patológica	Neutra	Deletéria	Deletéria	Neutra
c.884G>A	p.R294H	29	Provavelmente deletéria	Não-neutra	Patológica	Neutra	Deletéria	Deletéria	Deletéria
c.1062G>A	p.E357K	56	Benigna	Neutra	Patológica	Neutra	Neutra	Tolerada	Neutra
c.1343T>C	p.M448T	81	Benigna	Não-neutra	Patológica	Neutra	Neutra	Tolerada	Neutra
c.1855A>C	p.I619L	5	Benigna	Neutra	Benigna	Neutra	Neutra	Tolerada	Neutra

4.2.3. GENE *GABRA1*

4.2.3.1. TRIAGEM DE MUTAÇÕES EM PACIENTES

Os pacientes com **EMJ** e **outras EIGs** de nossa casuística foram submetidos à análise de mutações no gene *GABRA1*. Não foram identificadas alterações potencialmente deletérias, apenas quatro alterações de base única em heterozigose, todas presentes em bancos de dados de SNP (tabela 33).

Tabela 33. Alterações nucleotídicas encontradas no gene *GABRA1* em pacientes com EIGs.

Éxon/Íntron	Alteração nucleotídica	Identificação da variante	Número de pacientes com alteração
Íntron 1	IVS1+9A>T	rs41275339	7
Éxon 2	c.96A>G	rs76224028	1
	c.156T>C	rs35166395	44
Éxon 9	c.1323G>A	rs138259457	1

Dentre as alterações encontradas, a primeira (IVS1+9A>T) está localizada próxima à junção éxon-íntron. As outras três são silenciosas, ou seja, não modificam o aminoácido codificado. As três alterações silenciosas foram identificadas em um mesmo indivíduo com EMJ, sendo que uma delas, c.156T>C, foi encontrada também em outros pacientes, inclusive em homozigose.

4.2.3.2. COMPILAÇÃO DE MUTAÇÕES DESCRITAS NA LITERATURA

Duas mutações deletérias no gene *GABRA1* foram descritas em pacientes com EIGs até o momento, sendo uma em uma família de indivíduos afetados com EMJ, e a outra em um paciente com EAI (tabela 34).

Tabela 34. Alterações em *GABRA1* em pacientes com EIGs comuns descritas na literatura.

Éxon	Alteração nucleotídica	Alteração protéica	Fenótipo do paciente	Referência
8	c.965C>A	p.A322D	EMJ	69
8	c.975delC	p.S326fs328X	EAI	122

5. DISCUSSÃO

5.1. EPILEPSIAS GENERALIZADAS COM CRISES FEBRIS

5.1.1. GENE *SCN1A*

A triagem de mutações no gene *SCN1A* mostrou-se altamente eficaz para pacientes com **síndrome de Dravet**, revelando 16 alterações potencialmente deletérias em 81% dos pacientes estudados. O tipo mais frequente de mutação encontrado em nossa casuística foi o *missense* (37,5%), que promove substituição de resíduo de aminoácido na cadeia protéica. A provável localização dessas alterações na proteína $Na_v1.1$ está ilustrada na figura 27.

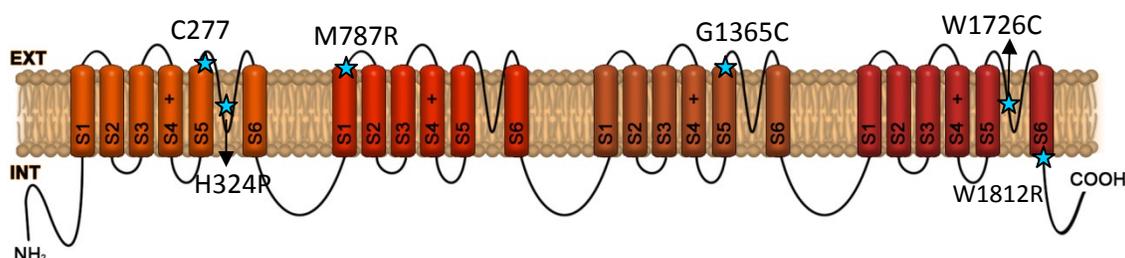


Figura 27. Provável localização das alterações encontradas na proteína $Na_v1.1$ nos pacientes com síndrome de Dravet estudados.

Observa-se predominância de substituições nas regiões responsáveis pela formação do poro, que compreende os resíduos de aminoácido localizados entre os segmentos cinco e seis de cada domínio. Essa região é de extrema importância para o funcionamento adequado da proteína, e alterações no poro do canal podem impossibilitar o influxo de íons sódio nas células.

Além disso, as seis substituições foram consideradas deletérias por todos os algoritmos de predição de potencial patogênico utilizados, exceto pela alteração p.H324P, considerada benigna apenas pelo programa Polyphen 2. Uma possível justificativa para a disparidade desse resultado em particular com relação aos outros é que o Polyphen 2 alinhou poucas sequências com a referência para a posição dessa alteração, sendo que muitos dos registros indicando um resíduo de aminoácido distinto eram inativos ou repetitivos. Como o próprio programa sugere, o número de sequências alinhadas pode ser usado para avaliar a confiabilidade dos cálculos realizados. Neste caso, a confiabilidade do resultado apresentado é questionável.

Outra ferramenta utilizada para avaliar o potencial deletério das substituições na proteína foi a escala de Grantham, que mede a diferença entre dois resíduos de aminoácido com base em suas composições, polaridades e volumes moleculares. Os valores encontrados foram todos superiores a 50, indicando que não são alterações conservadoras. As alterações p.H324P e p.M787R foram consideradas moderadas, p.W1812R radical, e p.C277R, p.G1365C, p.D1727Y e p.W1812R muito radicais.

Sendo assim, os dados apresentados sugerem que as alterações *missense* identificadas em nossa casuística comprometem funcionamento normal da proteína Na_v1.1 e possivelmente estão relacionadas com o fenótipo da síndrome de Dravet.

Quatro alterações potencialmente deletérias foram identificadas em junções éxon-íntron, envolvendo os primeiros nucleotídeos dos íntrons 2, 4, 8 e 21. Esses nucleotídeos são altamente conservados, pois estão localizados em uma das regiões essenciais para o processo de *splicing*. O processamento correto do pré-RNA que dará origem ao RNA maduro depende da identificação dos motivos que sinalizam o final de um éxon e início do íntron, região denominada de sítio doador de *splicing*, e o final do íntron e início do éxon seguinte, conhecido como sítio aceptor de *splicing*. As sequências nucleotídicas dos sítios doadores e aceptores canônicos, ou seja, predominantes na maioria dos eucariotos, estão representadas na figura 28 (123)

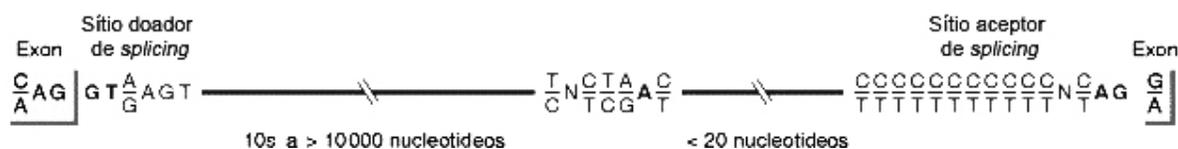


Figura 28. Nucleotídeos conservados nos sítios de *splicing* canônicos (adaptado de 123).

As análises das alterações IVS4+1G>A, IVS8+3G>T e IVS21+1G>A revelaram reduções nos valores de sinais de *splicing* do alelo mutante em relação ao selvagem, sendo que IVS4+1G>A e IVS21+1G>A apresentaram reduções mais drásticas, e não foram reconhecidas como potenciais sítios de *splicing* pelos programas Sroogle e Splice View (tabela 7). A alteração IVS8+3G>T, por sua vez, apresentou uma diminuição menos

significativa. Tal resultado provavelmente decorre do fato dessa mutação estar localizada no terceiro nucleotídeo do íntron, que é menos conservado que o primeiro, onde estão localizadas as outras alterações. Ainda assim, o terceiro nucleotídeo do íntron costuma ser uma adenina ou guanina, mas não uma timina, como observado na mutação em questão (figura 28).

A alteração IVS2+1A>G, no entanto, não pôde ser analisada pelos programas de predição, uma vez que ela envolve uma sequência não canônica do sítio doador de *splicing*, ou seja, que não faz parte da via de processamento do mRNA mais comum encontrada em eucariotos. Nesse caso, a sequência de sinalização para o *splicing* utilizada contém os nucleotídeos AT e AC como sítios doadores e receptores, respectivamente. Esse motivo já foi descrito e é extremamente raro em mamíferos (124 e 125). Portanto, é difícil inferir o real efeito da mutação IVS2+1A>G no processo de *splicing*.

As alterações em sítios de *splicing* identificadas em nossa casuística possivelmente alteram a sequência normal de sinalização e resultam em processamento aberrante, podendo afetar a estrutura e a função da proteína. No entanto, para elucidar essa questão são necessários estudos funcionais ou envolvendo RNAm, que é de difícil obtenção, uma vez que o gene *SCN1A* é expresso apenas no SNC.

Dentre as inserções e deleções identificadas, três promovem alteração na matriz de leitura (*frameshift*). Todas resultam em mudança dos resíduos de aminoácido na sequência da proteína a partir do ponto da alteração e promovem o término prematuro da cadeia, em decorrência do surgimento de um códon de parada precoce.

Caso os transcritos aberrantes provenientes das sequências mutadas sejam traduzidos, eles resultariam em perda de aproximadamente 3/4 da proteína para a deleção c.1242delA, quase metade da proteína para a inserção c.3719_3720insGATA, e perda da porção C-terminal, fundamental para a ancoragem da proteína à membrana e para a regulação, no caso da deleção c.5329delG (Figura 29).

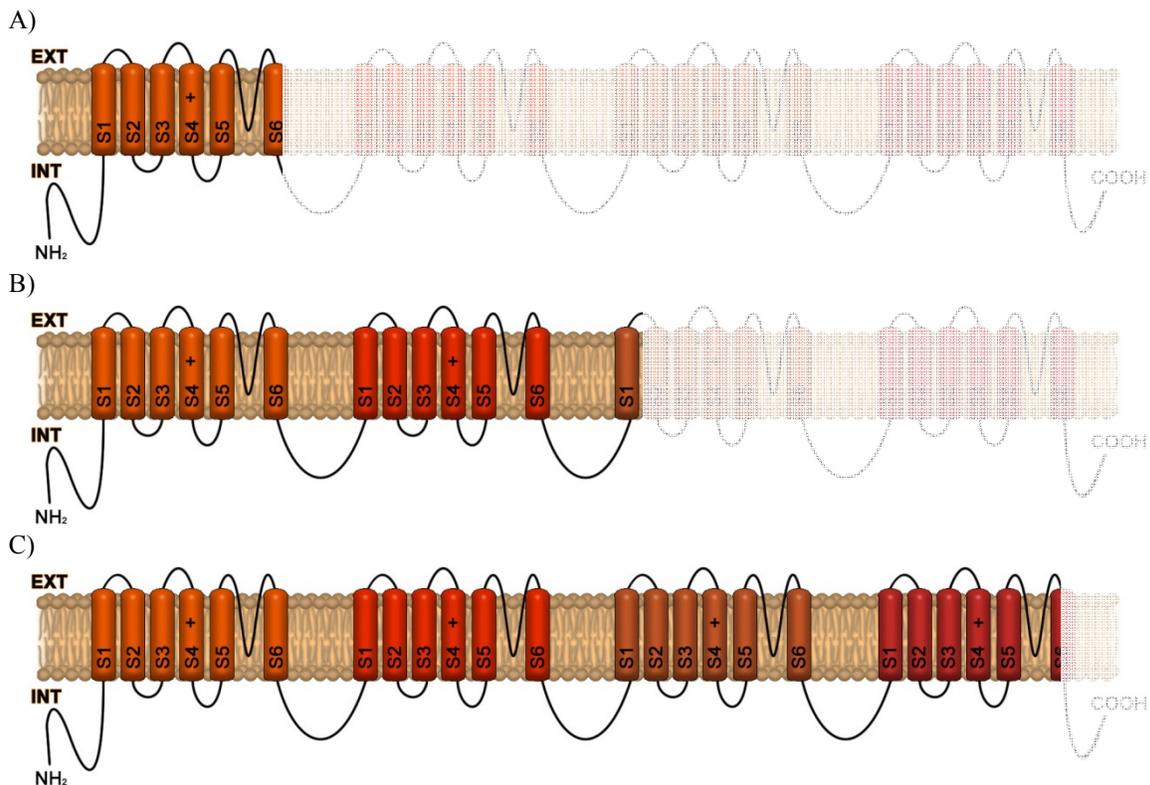


Figura 29. Possíveis perdas na subunidade α -I do canal de sódio resultantes das alterações c.1242delA (a), c.3719_3720insGATA (b) e c.5329delG (c) em *SCN1A*.

A deleção c.5329delG foi identificada em um indivíduo que já havia sido analisado durante o mestrado. No entanto, o aparelho utilizado para o sequenciamento das amostras na época, o MegaBace, não permitiu a detecção dessa mutação, que está localizada no final da sequência do fragmento amplificado.

As outras duas deleções identificadas promovem a eliminação de resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica sem alteração na matriz de leitura, podendo comprometer a estrutura e funcionalidade da proteína.

No caso da alteração c.5489_5491delAGT, ocorre a substituição de um trecho contendo dois resíduos de aminoácido, uma glicina e uma fenilalanina, por uma leucina na porção C-terminal da proteína (figura 30).

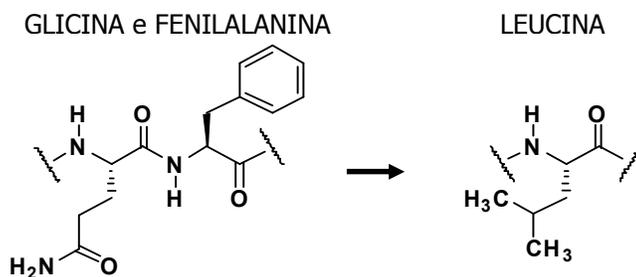


Figura 30. Substituição de um trecho contendo dois resíduos de aminoácido (glicina e fenilalanina) por uma leucina na subunidade α -I do canal de sódio promovida pela deleção c.5489_5491delAGT em *SCN1A*.

Já a deleção c.296_313delTCTTCCGGTTCAGTGCCA promove a eliminação de seis resíduos de aminoácido: isoleucina, fenilalanina, arginina, fenilalanina, serina e alanina, na região N-terminal da proteína (figura 31).

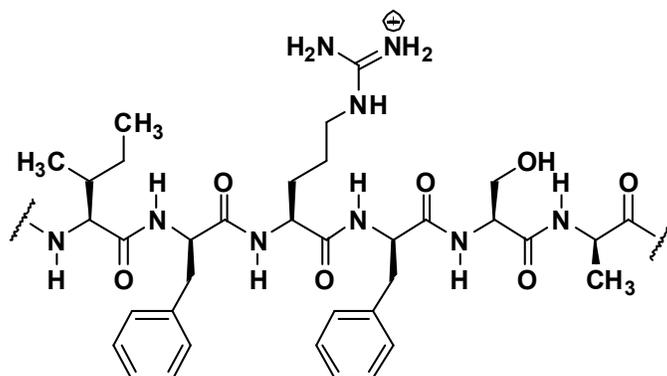


Figura 31. Resíduos de aminoácidos deletados na subunidade α -I do canal de sódio como resultado da deleção c.296_313delTCTTCCGGTTCAGTGCCA em *SCN1A*.

Ambas as deleções estão localizadas em regiões importantes e conservadas da proteína, as porções N- e C- terminais e, por tanto, podem ter implicações deletérias.

Curiosamente, a deleção c.296_313delTCTTCCGGTTCAGTGCCA foi identificada também por MLPA, apesar da técnica visar à detecção de alterações de número de cópias maiores que 1Kb. A provável explicação é que a alteração envolve a sequência alvo das sondas utilizadas para o éxon 2. Sendo assim, essas sondas são impedidas de anelar adequadamente ao DNA e, conseqüentemente, não são amplificadas. Em decorrência disso, observa-se o pico reduzido desse par de sondas no gráfico da figura 19.

As gêmeas monozigóticas portadoras dessa deleção apresentaram também outra alteração (c.5864T>C), herdada da mãe não afetada e presente em 1% dos indivíduos controles investigados. Essa variante já foi identificada em projetos que envolvem o sequenciamento de genomas de um grande número de pessoas (tabela 9). Embora o alelo mutante apresente frequência menor que 1% na população em geral, ele possui frequência superior a 2% em populações africanas. Além disso, essa alteração é considerada benigna pela maioria dos algoritmos de predição de potencial patogênico. Sendo assim, as evidências indicam que essa variante não é deletéria, mesmo tendo sido identificada em indivíduos com síndrome de Dravet; e que a provável causa da síndrome nas duas pacientes é a deleção de 18 pares de base.

A alteração restante identificada nos pacientes com síndrome de Dravet de nossa casuística é uma mutação *nonsense* (c.5177G>A). Essa substituição gera um códon de terminação precoce e corresponde à região de formação do poro da proteína. A tradução do transcrito oriundo da sequência mutada promoveria a perda da porção C-terminal (figura 32).

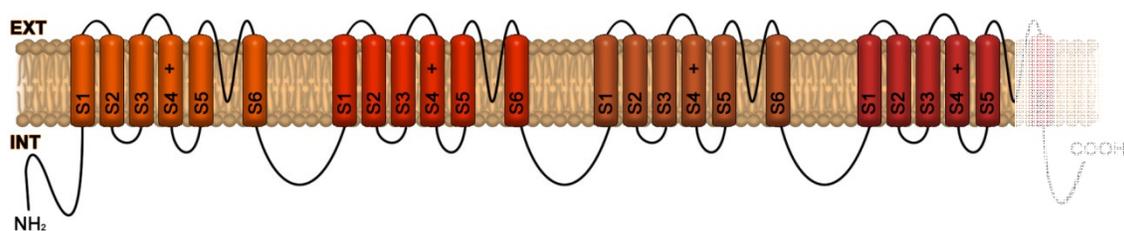


Figura 32. Possível perda na subunidade α-I do canal de sódio resultantes da alteração c.5177G>A em *SCN1A*.

Nenhuma das alterações potencialmente deletérias foi encontrada nos pais dos portadores e nem no grupo de indivíduos controles analisado, mostrando serem mutações *de novo* e reforçando a hipótese de serem variantes raras associadas ao fenótipo grave da síndrome de Dravet.

Segundo a compilação de mutações descritas na literatura em *SCN1A* em pacientes com síndrome de Dravet, mutações que alteram resíduos de aminoácido são as mais

frequentes nesse fenótipo (44,6%), como também observado em nossa casuística. Esse tipo de mutação inicialmente era considerado associado aos fenótipos mais brandos do espectro de GEFS+, enquanto mutações que resultam em proteínas truncadas representariam o tipo predominante nos fenótipos mais graves. Porém, os resultados de nossas análises demonstram que essa correlação está equivocada, e mutações do tipo “sentido trocado” também estão envolvidas na etiologia da síndrome de Dravet.

Dentre as mutações *missense* descritas, quatro relatadas em pacientes com síndrome de Dravet foram posteriormente consideradas polimorfismos por outros autores. De fato, essas alterações foram classificadas como benignas pela maioria dos algoritmos de predição utilizados. Outras alterações foram preditas como benignas por mais da metade dos programas, e também foram retiradas das análises posteriores. Algumas mutações *missense* distintas correspondem à mesma substituição na proteína, portanto as redundâncias foram removidas. Assim, foi analisado um total de 332 substituições, incluindo as identificadas no presente estudo.

Com relação à distribuição dessas substituições ao longo da proteína, considerando apenas o número de mutações por segmento protéico, observa-se um nítido predomínio de alterações nas regiões de formação do poro, entre os segmentos S5 e S6, e nas porções N- e C- terminais, além do segmento responsável pela detecção de voltagem (S4) em alguns domínios como o I e o IV (figura 23).

No entanto, ao levar em consideração a quantidade de resíduos de aminoácido presente em cada região, a diferença observada na frequência de mutações nas regiões mais conservadas da proteína é atenuada. Ainda assim, a região S5-S6 do segundo domínio se destaca como apresentando maior quantidade de mutações.

Porém, essa abordagem evidencia a frequência de alterações em segmentos pequenos, como é o caso das regiões DIV/S4-S5 (15 resíduos de aminoácido), DIII/S1-S2 (13 resíduos), DI/S3 (19 resíduos), DIV/S2-S3 (6 resíduos) e DI/S4-S5 (16 resíduos). Já segmentos maiores como DI/S4-S5 (126 resíduos) e as regiões N- e C- terminais (123 e 223 resíduos, respectivamente) apresentam uma considerável redução na frequência de mutações.

Quando as frequências de mutações por resíduo de aminoácido são agrupadas por segmentos em comum de cada domínio, a análise da distribuição ao longo da proteína novamente revela maior frequência nas regiões de formação do poro (S5, S5-S6, S6) e no sensor de voltagem (S4).

Curiosamente, também é observada uma alta frequência de mutações em S4-S5, que pode refletir a questão do tamanho dos segmentos mencionada anteriormente, ou ainda indicar uma região protéica conservada e importante funcionalmente.

Por outro lado, as regiões N- e C- terminais, que são motivos reconhecidamente importantes para a sinalização e regulação protéica, apresentaram frequência de mutações por resíduo de aminoácido relativamente baixa. Como a estrutura da proteína Na_v1.1 humana ainda não é completamente conhecida, assume-se que a porção N-terminal corresponde ao início da sequência até o segmento DI/S1, e a região C-terminal compreende a porção a partir de DII/S6 até o final. Sendo assim, não são conhecidos os reais domínios funcionais dessas regiões, dado que poderia restringir as análises de frequência de mutação por domínio e gerar resultados mais precisos.

As análises de predição de potencial deletério utilizando múltiplos algoritmos mostraram um consenso para a maioria das mutações (apêndice 4). As alterações consideradas como benignas por muitos algoritmos podem se tratar na realidade de polimorfismos ou alterações não deletérias equivocadamente associadas com a etiologia de síndrome de Dravet. No entanto, essa hipótese só pode ser verificada com estudos funcionais.

Em geral, a alta frequência de alterações potencialmente deletérias em *SCN1A* observada nos pacientes com síndrome de Dravet, tanto em nossa casuística quanto na literatura, indica que o teste genético para fins clínicos é altamente recomendável em indivíduos com esse fenótipo.

Com relação à análise do gene *SCN1A* em pacientes com **síndrome de Doose**, apenas uma alteração potencialmente deletéria foi identificada em nossa casuística (c.68C>T). A substituição de resíduo de aminoácido decorrente dessa alteração está localizada na porção N-terminal da proteína, que, como já mencionado, é funcionalmente importante. A figura 33 mostra a provável localização dessa substituição na proteína.

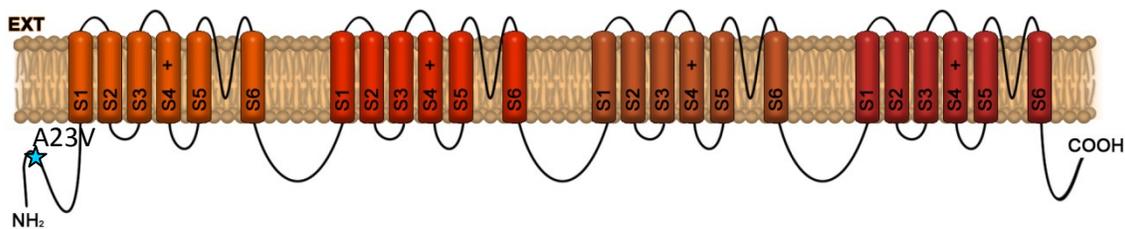


Figura 33. Provável localização da alteração p.A23V encontrada na subunidade α -I do canal de sódio em um dos pacientes com síndrome de Doose estudados

Diferentemente do observado nas análises de predição de efeito deletério para as mutações identificadas em síndrome de Dravet, não houve um consenso nos resultados obtidos para a substituição em questão (tabela 11). Aproximadamente metade dos programas considera a alteração deletéria, enquanto a outra metade a classifica como benigna. O valor obtido na escala de Grantham a qualifica como moderada.

Levando-se em consideração que a síndrome de Doose é um fenótipo menos grave que a síndrome de Dravet, é plausível que a alteração identificada na primeira síndrome não seja tão drástica quanto as mutações observadas na segunda.

Essa alteração foi investigada em nosso grupo de indivíduos controle e o alelo mutante não foi encontrado. Nos estudos envolvendo o sequenciamento de genomas em diferentes populações, essa variante apresentou frequência alélica inferior a 1% (tabela 12). Sendo assim, é considerada uma variante rara na população.

É importante ressaltar, porém, que a caracterização clínica do indivíduo portador da alteração ainda não está bem definida, o que dificulta o diagnóstico acurado. Esse paciente apresentou crises febris, mioclônicas e CTCG, porém a idade de início das crises (4 anos e meio) não é condizente com um diagnóstico de síndrome de Dravet.

Quanto à literatura referente ao envolvimento do gene *SCN1A* na etiologia da síndrome de Doose, após os estudos iniciais de mutações nesse gene em famílias com GEFS+, poucos trabalhos foram bem sucedidos. Três dos estudos posteriormente realizados, investigando quatro, 22 e três pacientes esporádicos com síndrome de Doose,

falharam em identificar mutações causativas (42, 46 e 126). Nesse último estudo, uma mutação foi identificada apenas em um paciente proveniente de uma família com GEFS+, sendo que a mutação foi herdada da mãe afetada com crises febris *plus*.

Em outro estudo com uma grande família de GEFS+ segregando uma mutação em *SCN1A*, um dos indivíduos portadores da alteração apresentava crises mioclônicas, astáticas e febris, porém o diagnóstico de síndrome de Doose não foi explicitado (112).

Dentre os estudos com pacientes esporádicos que tiveram sucesso em identificar alterações potencialmente deletérias em *SCN1A*, um deles revelou mutação apenas em um paciente com caso de diagnóstico intermediário entre síndrome de Doose e epilepsia idiopática generalizada grave da infância (EIGGI), dos 20 indivíduos com crises mioclônico-astáticas dominantes estudados (113). Outro estudo revelou duas mutações *de novo* em dois dos 10 pacientes com síndrome de Doose investigados (110), ambos apresentando crises febris, sendo que uma delas já foi identificada em pacientes com síndrome de Dravet.

Por fim, dois estudos recentes relataram uma mutação em um paciente cada (109 e 111), ambas de herança materna, sendo que a segunda também foi encontrada em um indivíduo controle e em outros fenótipos, como enxaqueca hemiplégica familiar, EMJ, um caso não típico de síndrome de Dravet e epilepsia mioclônica intratável com autismo (32, 127, 128, 129).

As análises de predição de efeito deletério das mutações *missense* apresentaram, em geral, consenso nos resultados obtidos. Cinco das seis alterações foram consideradas deletérias, porém uma foi considerada benigna. A alteração benigna foi a última mencionada, também encontrada em um indivíduo controle e em outras epilepsias. Consequentemente, essa alteração pode ser uma variante normal, ou conferir um risco discretamente aumentado para os fenótipos envolvidos.

Considerando que apenas uma baixa porcentagem dos pacientes com síndrome de Doose investigados até o momento apresentou mutações em *SCN1A*, e que parte os resultados positivos é referente à pacientes com fenótipos não típicos, inclusive no presente estudo, o teste genético em *SCN1A* não parece ser indicado para pacientes com síndrome de Doose.

Embora as síndromes de Dravet e de Doose façam parte de um mesmo espectro clínico, a etiologia desses fenótipos não parece apresentar as mesmas bases genéticas. Acredita-se que a presença de mutações no gene *SCN1A* em pacientes com síndrome de Dravet possa estar relacionada a sensibilidade a febre, característica clínica também observadas em indivíduos com GEFS+, que apresentam mutações em *SCN1A*, mas não proeminente na síndrome de Doose (46). De fato, todos os indivíduos de nossa casuística de síndrome de Dravet apresentaram crises em vigência de episódio febril de baixa intensidade, enquanto poucos pacientes com síndrome de Doose são sensíveis a febre, incluindo o paciente em que foi identificada a alteração potencialmente deletéria.

5.1.2. GENE *SLC2A1*

Mutações no gene *SLC2A1* têm sido amplamente descritas em pacientes com síndrome da deficiência de GLUT1 (130 e 131). No entanto, somente nos últimos três anos esse gene passou a ser investigado em pacientes com o fenótipo da síndrome de Doose, devido a sua similaridade com a síndrome da deficiência de GLUT1 quanto ao tipo de crises epiléticas e à resposta à dieta cetogênica (54).

Levando-se em consideração que o teste genético em *SCN1A* não se mostrou eficiente para a maior parte dos pacientes com síndrome de Doose de nossa casuística, o gene *SLC2A1* surgiu como potencial candidato para novas investigações.

Entretanto, a triagem de mutações nesse gene não forneceu indícios de que ele esteja relacionado com essa síndrome nos pacientes estudados, uma vez que não foram identificadas alterações potencialmente deletérias.

Como a descoberta de mutações em *SLC2A1* relacionadas com a síndrome de Doose é recente, a literatura acerca desse assunto não é vasta. Sendo assim, apenas dois estudos relataram mutações em pacientes com síndrome de Doose até o momento (tabela 17). O primeiro deles identificou a mutação c.971C>T em dois pacientes com esse fenótipo em uma família apresentando diferentes formas de EIGs (56). No segundo estudo, foram investigados 84 indivíduos com síndrome de Doose, incluindo um dos pacientes do estudo anterior. Além da mutação previamente descrita, foram encontradas duas alterações (c.997C>T e c.1199G>A) em um total de quatro pacientes (4,76%).

As três mutações descritas na literatura foram consideradas deletérias por todos os algoritmos de predição de potencial patogênico utilizados, embora a escala de Grantham considere a substituição p.R400H conservada. Esses resultados sugerem uma possível implicação deletéria dessas mutações na função da proteína. Para uma das substituições, p.S324L, estudos funcionais revelaram que o transporte de glicose é reduzido em comparação com o tipo selvagem (116). Esse dado comprova a eficiência dos algoritmos de predição para alterações na proteína em questão para o fenótipo da síndrome de Doose.

Apesar de um estudo apontar mutações em *SLC2A1* em quase 5% dos pacientes com síndrome de Doose investigados, nossos dados não indicam envolvimento desse gene na etiologia da síndrome em nossa casuística. Essas evidências sugerem que a síndrome apresenta heterogeneidade genética. Sendo assim, permanecem desconhecidas as possíveis bases genéticas envolvidas na fisiopatologia da maioria dos pacientes investigados no presente estudo.

5.2. EPILEPSIAS IDIOPÁTICAS GENERALIZADAS COMUNS

5.2.1. GENE *SLC2A1*

Além de estarem associadas com as síndromes da deficiência de GLUT1 e de Doose, mutações no gene *SLC2A1* também foram identificadas em pacientes com diferentes formas de EIGs. Por tanto, esse gene foi investigado também em nossa casuística de pacientes com esses fenótipos provenientes dos ambulatórios da UNICAMP.

No entanto, foram encontradas apenas alterações de base única que não promovem troca de resíduo de aminoácido na proteína, assim como observado para os pacientes com síndrome de Doose de nossa casuística. Sendo assim, esse gene não parece contribuir significativamente para a etiologia das EIGs em nossa população.

Em comparação com a síndrome de Doose, a descoberta de mutações em *SLC2A1* em pacientes com EIGs também é recente, porém a literatura disponível sobre o assunto é mais ampla, como se pode observar na tabela 21.

Os dois primeiros estudos que demonstraram correlação entre esse gene e fenótipos das EIGs relataram grandes famílias com ocorrência de discinesia paroxística induzida por

exercício (DPE) segregando mutações em que alguns indivíduos que apresentavam crises de ausência, mioclônicas, CTCG e febris (93 e 94).

Posteriormente, foram identificadas quatro mutações funcionalmente testadas em 34 pacientes com epilepsia ausência de início precoce (EAIP) (116). Foram estudadas também duas famílias com EAIP segregando mutações em *SLC2A1*, sendo que 12 dos 15 pacientes com mutações apresentavam epilepsia, incluindo tanto fenótipos das EIGs quanto síndrome de Doose (56).

Um recente estudo envolvendo 95 indivíduos com EIGs familiares revelou uma mutação em *SLC2A1* em uma família na qual oito indivíduos portadores da mutação apresentam os seguintes fenótipos: EAI, EAJ, EMJ, EAIP e epilepsia ausência de início na fase adulta (EAIA) (95). Apesar de outros quatro membros não afetados serem portadores da alteração, a mesma não foi identificada em 846 controles.

Recentemente também, um mesmo grupo de pesquisadores apresentou dois trabalhos nos quais identificou seis mutações funcionalmente validadas em sete de 504 indivíduos com EIGs, e outras sete alterações em um indivíduo cada dentre 55 pacientes com EAIP investigados (114 e 115).

Com relação à distribuição das substituições dos resíduos de aminoácido na proteína codificada decorrentes das alterações descritas na literatura, apresentada na figura 34, observa-se um predomínio de mutações nas regiões entre as porções transmembrana, em especial nas regiões voltadas ao citoplasma. Destaca-se o segmento entre as hélices 6 e 7, que pode representar um domínio funcional potencialmente relacionado ao controle do transporte de glicose.

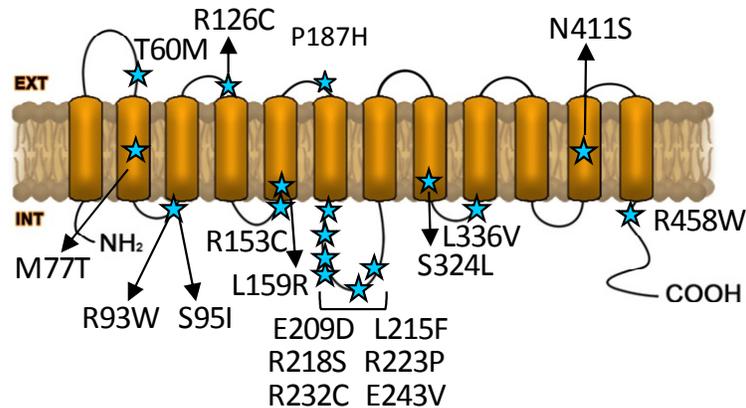


Figura 34. Provável localização das alterações descritas na literatura na proteína GLUT1 em pacientes com EIG estudados.

As análises de predição de potencial deletério foram mais consistentes do que as realizadas para as alterações no gene *EFHC1* em pacientes com EMJ, porém não obtiveram completo consenso. Mesmo algumas alterações que comprovadamente provocam significativa redução no transporte de glicose em estudos funcionais, como as alterações p.E243V e p.N411S, foram consideradas benignas por um algoritmo distinto cada. Esse dado pode ser reflexo novamente do fenótipo menos grave das EIGs, que possivelmente requerem alterações menos drásticas nas proteínas envolvidas nos mecanismos fisiopatológicos dessas epilepsias.

Nos estudos funcionais descritos, foram observadas tanto variantes com alto impacto deletério quanto alterações mais brandas, que apresentaram padrões de herança variáveis. No entanto, não se observou uma correlação entre gravidade da epilepsia ou do prognóstico das crises e gravidade do efeito funcional nos ensaios *in vitro*.

Entretanto, mesmo com resultados positivos, alguns estudos não identificaram mutações em pacientes com EIGs, como é o caso do presente trabalho. Recentes estudos envolvendo casuísticas de 20 e 84 pacientes com EAIP (132 e 133, respectivamente) e outro estudo envolvendo 124 pacientes com EAI e EAJ (118) também não revelaram alterações potencialmente deletérias em *SLC2A1*. Esses dados demonstram que esse gene parece oferecer predisposição às EIGs em apenas algumas populações, refletindo a heterogeneidade genética dessas epilepsias.

Em geral, tem sido relatado na literatura um predomínio de mutações em fenótipos relacionados a crises de ausência de início precoce. No entanto, poucos pacientes de nossa casuística, tanto de síndrome de Doose quanto das EIGS, apresentam essa característica, o que pode justificar a ausência de mutações identificadas em *SLC2A1*.

5.2.2. GENE *EFHC1*

Foram identificadas sete alterações potencialmente deletérias no gene *EFHC1* em 10% dos pacientes com EMJ de nossa casuística, tanto em pacientes com história familiar de epilepsia como em esporádicos. Os indivíduos portadores dessas mutações não apresentaram características clínicas distintas evidentes em relação aos demais, porém análises mais cautelosas poderão elucidar possíveis diferenças fenotípicas.

Dentre essas alterações identificadas, cinco são inéditas em indivíduos com EIGs e as outras duas já foram descritas na literatura (65, 88, 91 e 120). A figura 35 ilustra a provável localização das substituições de resíduo de aminoácido na proteína EFHC1/mioclonina decorrentes dessas alterações.

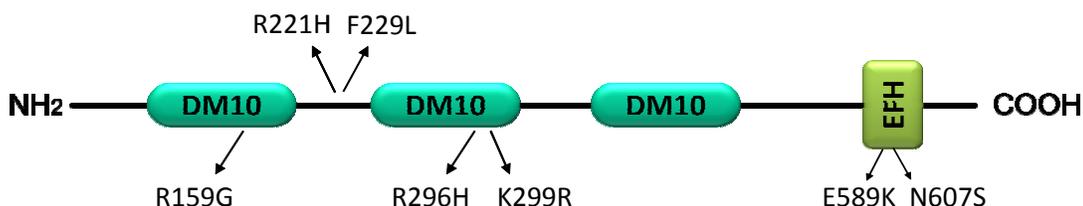


Figura 35. Provável localização das alterações encontradas na proteína EFHC1/mioclonina nos pacientes com EMJ e outras EIGs.

As substituições encontram-se distribuídas ao longo da proteína: nos dois primeiros domínios DM10, na região entre eles e no motivo *EF-hand*. Não parece haver uma região preferencial para a ocorrência de mutações.

Quatro das cinco alterações inéditas em pacientes não foram encontradas em nosso grupo controle (c.887G>A, c.896A>G e c.1765G>A, c.1820A>G). É importante ressaltar, porém, que apenas a alteração c.896A>G foi encontrada na casuística proveniente da

UNICAMP, e as outras três foram identificadas em pacientes de Alagoas. Sendo assim, é possível que o grupo de indivíduos controle da região de São Paulo não seja representativo da população de Alagoas. Essas três variantes encontradas nos pacientes da UFAL já foram identificadas nos projetos de sequenciamento em larga escala com frequência inferior a 1% quando consideradas as populações gerais investigadas (tabela 27). No entanto, as variantes c.887G>A e c.1820A>G apresentaram frequência alélica superior a 1% se considerada apenas a população de algumas tribos africanas. Sendo assim, pode-se especular uma ancestralidade africana dos pacientes portadores dessas alterações.

A quinta variante inédita em pacientes com EMJ (c.475C>G), também identificada em um paciente de Alagoas, foi encontrada em apenas um indivíduo do nosso grupo controle. Porém, essa alteração foi observada com uma frequência alélica de 4,2% em um estudo piloto do projeto 1000 GENOMES que analisou 118 cromossomos da população dos iorubas. Além disso, é interessante notar que essa substituição envolve o mesmo nucleotídeo alterado no polimorfismo c.475C>T, sugerindo que o resíduo de aminoácido correspondente não seja muito conservado evolutivamente.

As substituições c.662G>A e c.685T>C foram identificadas em heterozigose em 1% dos indivíduos controles analisados, o que representa uma frequência alélica de 0,5%. A alteração c.662G>A apresentou-se ausente em 120 e 401 indivíduos controles em dois estudos distintos (120 e 90, respectivamente). Em projetos de sequenciamento em larga escala (tabela 22), o alelo mutante foi detectado com frequência inferior a 1% em populações norte-americanas em geral e nas com descendência européia, porém superior a 1% nas populações africanas, afroamericanas e em um grupo pequeno de Porto Rico, mostrando uma variação na frequência alélica dependente da composição étnica da população investigada.

A alteração c.685T>C não foi identificada em 100 e em 401 controles de dois estudos (88 e 90, respectivamente), mas foi detectada em 4 dentre 368 indivíduos controles, com frequência alélica estimada de 0,5% em outro estudo (91), o que levou os autores a considerarem pouco provável dessa alteração de ser patológica. Segundo dados dos projetos de sequenciamento em diferentes populações (tabela 23), essa variante foi identificada em uma frequência igual ou inferior a 0,5% em na maioria dos estudos, porém com 1% em uma população italiana.

Entretanto, ensaios funcionais demonstraram que ambas as alterações c.662G>A e c.685T>C estão implicadas no surgimento de EMJ, tanto por reduzir o efeito de morte celular, prevenindo a apoptose de neurônios com homeostase de cálcio precária durante o desenvolvimento do SNC (65), quanto induzindo defeitos no fuso mitótico e afetando a morfologia de células radiais da glia e de neurônios migratórios (87).

A fim de se estimar o efeito das alterações potencialmente deletérias na função da proteína, foram utilizados algoritmos de predição. No entanto, observou-se uma divergência nos resultados obtidos. Embora todas as substituições tenham sido consideradas deletérias por pelo menos dois programas, não houve uma consistência entre os programas quanto a essa classificação.

A falta de consenso observada deve-se provavelmente ao fato de que cada algoritmo utiliza métodos de análise e atributos diferentes para fornecer seus resultados, e as alterações promovidas na proteína devem atuar predominantemente em determinadas propriedades. Dessa forma, algumas substituições podem alterar significativamente características físico-químicas de resíduos de aminoácidos não muito conservados evolutivamente, enquanto outras alterações podem envolver posições conservadas, mas sem alteração drástica estrutural. Conseqüentemente, os programas que se baseiam mais em conservação de sequência considerarão o primeiro tipo de substituição benigno e o segundo deletério, enquanto aqueles que priorizam as informações sobre estrutura classificarão a primeira alteração como deletéria e a segunda benigna.

Como os fenótipos das EIGs não são muito graves, é possível que as alterações responsáveis não sejam tão drásticas. Sendo assim, os programas de predição de efeito deletério apresentam dificuldades em inferir a real implicação dessas alterações na função da proteína. Até mesmo para as substituições comprovadamente deletérias por meio de ensaios funcionais, alguns algoritmos as consideraram benignas, o que demonstra a necessidade de estudos adicionais para comprovar o potencial deletério das alterações identificadas em nossa casuística.

Foram identificados também quatro polimorfismos codificantes, ou seja, que promovem substituição de resíduo de aminoácido na proteína codificada (tabela 17), sendo que todos já foram descritos em outros estudos investigando pacientes com EMJ (65, 88,

90, 91, 120 e 121) e são considerados variantes naturais que não afetam morte celular segundo os estudos funcionais realizados (65 e 87). Essas alterações foram identificadas em nosso grupo controle com uma frequência semelhante à observada nos pacientes, além de terem sido observadas em indivíduos controles nos estudos mencionados.

É interessante notar que a análise de predição de potencial deletério não atingiu um consenso até mesmo para esses polimorfismos, apenas para a substituição p.I619L. Isso reflete novamente a dificuldade dos algoritmos de predição utilizados em inferirem o efeito dessas alterações na função protéica. Dentre os programas empregados, o que melhor distinguiu entre as alterações consideradas potencialmente deletérias e os polimorfismos foi o MutPred. Por outro lado, o programa SNP&GO apresentou o pior desempenho, considerando todas as alterações benignas, seguido pelo SIFT, que identificou apenas uma alteração como deletéria. Os programas SNAP e Pmut, por sua vez, classificaram vários polimorfismos como deletérios.

A compilação de mutações descritas na literatura em *EFHCI* em pacientes com EMJ e outras EIGs revelou um total de 16 alterações potencialmente deletérias, das quais duas estão nas regiões não traduzidas 5' e 3' e 14 são alterações *missense* (tabela 26). A maioria das alterações relatadas foi descrita em pacientes com EMJ, duas foram observadas em dois pacientes com EAJ (c.520A>G e c.776G>A) e uma em um paciente com EIG com CTCG (c.1180G>T). Outra alteração (c.685T>C) foi identificada, além de em dez pacientes com EMJ, em cinco indivíduos com EIG de fenótipos não especificados pelos autores.

Ao total, foram 48 indivíduos com mutações descritos na literatura. A frequência de pacientes com alterações é difícil ser estimada, pois foram mais de 300 famílias estudadas, sendo que nem sempre o número de membros afetados é informado, além de outros aproximadamente 100 indivíduos com EIGs investigados separadamente. Sendo assim, estima-se que a frequência de indivíduos com EIGs relatados até o momento que apresentem mutações em *EFHCI* não ultrapasse muito 10%, como observado em nossa casuística.

As prováveis localizações das substituições de resíduos de aminoácido proveniente dessas alterações descritas na literatura estão representadas na figura 36.

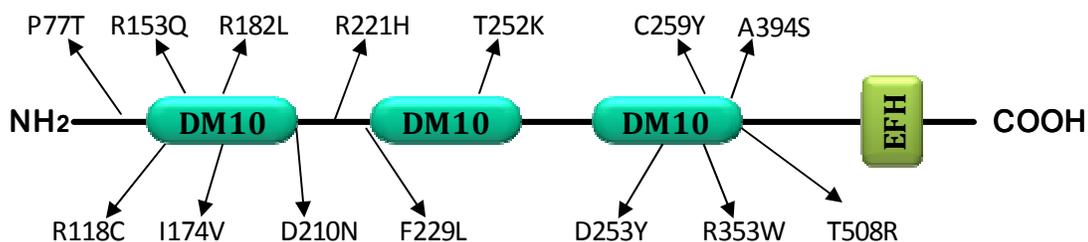


Figura 36. Provável localização das alterações potencialmente deletérias na proteína EFHC1/mioclonina descritas em pacientes com EMJ e outras EIGs.

Também não foi observada uma região preferencial de ocorrência de mutações na sequência protéica, uma vez que alterações foram observadas no início da proteína, nos três domínios DM10, na região entre eles e no motivo *EF-hand*. Um gráfico representativo das distribuições das substituições descritas na literatura, juntamente com as identificadas no presente estudo, encontra-se na figura 37.

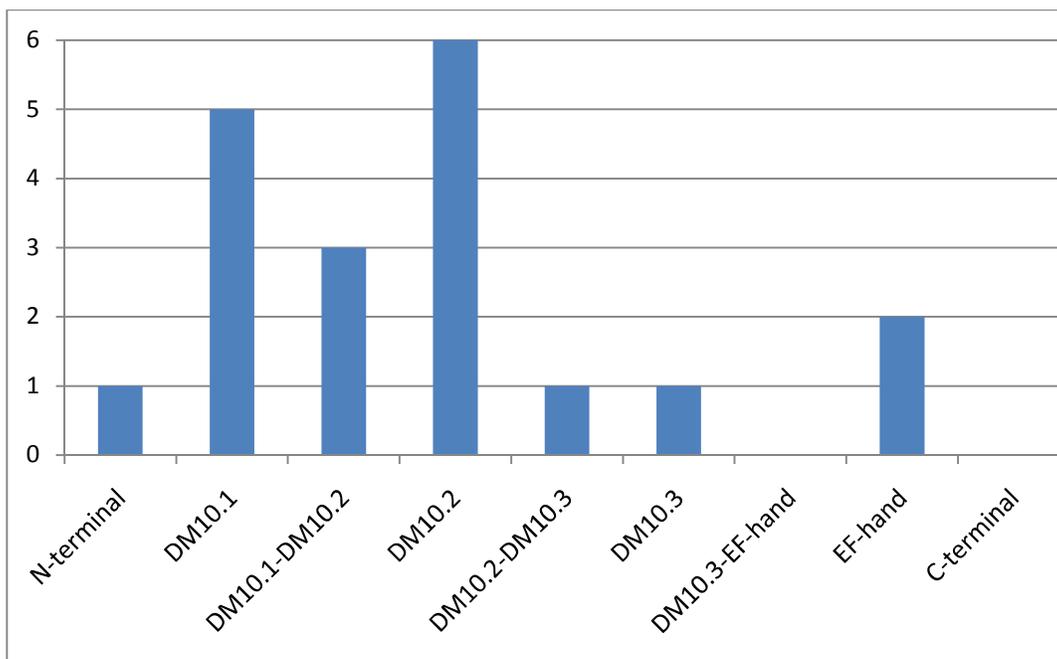


Figura 37. Distribuição das substituições de aminoácidos descritas em pacientes com EIG ao longo da proteína EFHC1/mioclonina.

Parece haver um predomínio de alterações na metade inicial da proteína, sendo que apenas o presente estudo identificou mutações no motivo *EF-hand*. No entanto, o baixo

número de mutações descritas até o momento não permite a realização de análises conclusivas.

Nenhuma das mutações, exceto a c.685T>C, como supracitado, foi encontrada nos grupos controles analisados nos respectivos estudos. Apenas as alterações c.662G>A e c.685T>C foram identificadas em nossa casuística.

Além dos dados de projetos de sequenciamento populacional em larga escala para as alterações c.662G>A e c.685T>C, discutidos anteriormente, estão disponíveis informações apenas para as alterações c.229C>A, c.458G>A, c.544C>T e c.1057C>T. A substituição c.229C>A foi identificada em quase 1% na população norte-americana estudada no projeto *NHLBI-ESP*, porém com frequência superior a 1% nas populações afroamericanas, africanas e em um grupo proveniente do Porto Rico. Sendo assim, a frequência dessa alteração parece ser dependente da etnia da população. Já as outras alterações apresentaram frequência alélica inferior a 1% nos diferentes estudos.

Assim como nas análises de potencial deletério realizadas para as alterações identificadas em nossa casuística, não foi possível alcançar um consenso nos resultados das predições para a maioria das alterações, apenas para p.R118C. Conforme discutido previamente, é possível que as mutações em *EFHCI* não sejam extremamente drásticas ou estejam localizadas em regiões menos conservadas da proteína. Novamente, o programa MutPred foi o que apresentou melhor desempenho nas análises de predição, pois conseguiu distinguir com melhor exatidão os polimorfismos das alterações potencialmente deletérias.

Dentre os sete polimorfismos que alteram resíduos de aminoácido na proteína codificada relatados na literatura, todos foram encontrados nos grupos controle estudados com frequência maior que 1%. Conforme supracitado, quatro deles também foram identificados em nossa casuística e em nosso grupo controle. Com exceção do programa MutPred, os algoritmos de predição de efeito deletério apresentaram resultados discrepantes.

Embora a frequência de mutações observada em *EFHCI* seja de aproximadamente 10% em pacientes com EMJ, esse valor pode estar superestimado, uma vez que o potencial deletério das alterações identificadas não pôde ser inferido adequadamente. É provável que as alterações nesse gene implicadas nos fenótipos das EIGs comuns sejam discretas e

estejam associadas a outros fatores, como é característico das doenças complexas. Além disso, destaca-se a heterogeneidade genética da EMJ e EIGs relacionadas, sendo que outros genes podem estar envolvidos com a etiologia das epilepsias nos indivíduos que não apresentam alterações deletérias em *EFHC1*.

5.2.3. GENE *GABRA1*

As três alterações localizadas na região codificante do gene *GABRA1* que foram identificadas em pacientes com EMJ e outras EIGs não resultam em troca do resíduo de aminoácido na proteína codificada, sendo que todas já estão descritas em bancos de dados como polimorfismos. Uma delas (c.156 T>C), também havia sido relatada em um estudo de triagem de mutações em *GABRA1* em pacientes com EMJ, sem provável implicação na etiologia da doença.

Embora mutações que não resultam em troca de resíduo de aminoácido possam afetar o processo de enovelamento da proteína quando um códon frequente é substituído por um raro (134), as alterações em *GABRA1* encontradas em nossa casuística não podem ser consideradas deletérias sem a realização de estudos adicionais.

A alteração identificada próxima ao sítio doador de *splicing* não afeta os nucleotídeos mais conservados dessa região (figura 28). Sendo assim, a possibilidade dessa variante comprometer o processo de *splicing* é baixa.

A principal mutação descrita na literatura para esse gene, que promove a troca de um resíduo de alanina por um de ácido aspártico na posição 322 (p.A322D), não foi observada em nossa casuística. Essa mutação foi identificada em todos os oito indivíduos afetados de uma família franco-canadense com EMJ (69). No entanto, ela parece contribuir para uma porcentagem baixa de casos de EMJ, uma vez que outro trabalho também revelou ausência dessa mutação nos pacientes estudados (135).

Outra alteração em *GABRA1* descrita na literatura, c.975delC (S326fs328X), originalmente identificada em um paciente com EAI (122), também não foi observada em nossos pacientes.

Apesar do gene *GABRA1* ainda não poder ser completamente desassociado a EMJ e outras EIGs em nossa amostra, os resultados obtidos indicam que esse não parece ser um dos genes de maior predisposição para esses fenótipos em nossa população.

5.3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O presente estudo apresentou estratégias para identificar e analisar a repercussão molecular de alterações em genes candidatos que podem ser extrapoladas para estudos de outras doenças humanas. O uso de algoritmos de predição de efeito deletério mostrou-se particularmente eficiente para genes envolvidos em doenças mendelianas. Já para as doenças complexas, a eficiência dos programas utilizados é variável. Nesses casos, a acurácia dos algoritmos de predição pode variar de acordo com a doença e os genes estudados, sendo que análises utilizando alterações previamente descritas podem contribuir para a determinação dos programas mais adequados para cada caso.

Uma das doenças estudadas no presente trabalho, a síndrome de Dravet, apresenta um padrão de herança mendeliano, em que variantes raras no gene *SCN1A* apresentam um alto efeito deletério, como constatado por meio das análises de predição realizadas. Por outro lado, as análises de predição de efeito deletério no gene *EFHC1* não alcançaram um consenso, revelando a alta complexidade da EMJ e EIGs relacionadas. Além disso, muitas das alterações identificadas em *EFHC1* em pacientes também foram observadas em estudos populacionais, mesmo que com frequência alélica inferior a 1%. Uma possível explicação seria que, pelo fato da EMJ ser uma doença complexa e mais comum que a síndrome de Dravet, variantes com baixa frequência na população teriam efeito deletério intermediário (figura 38).

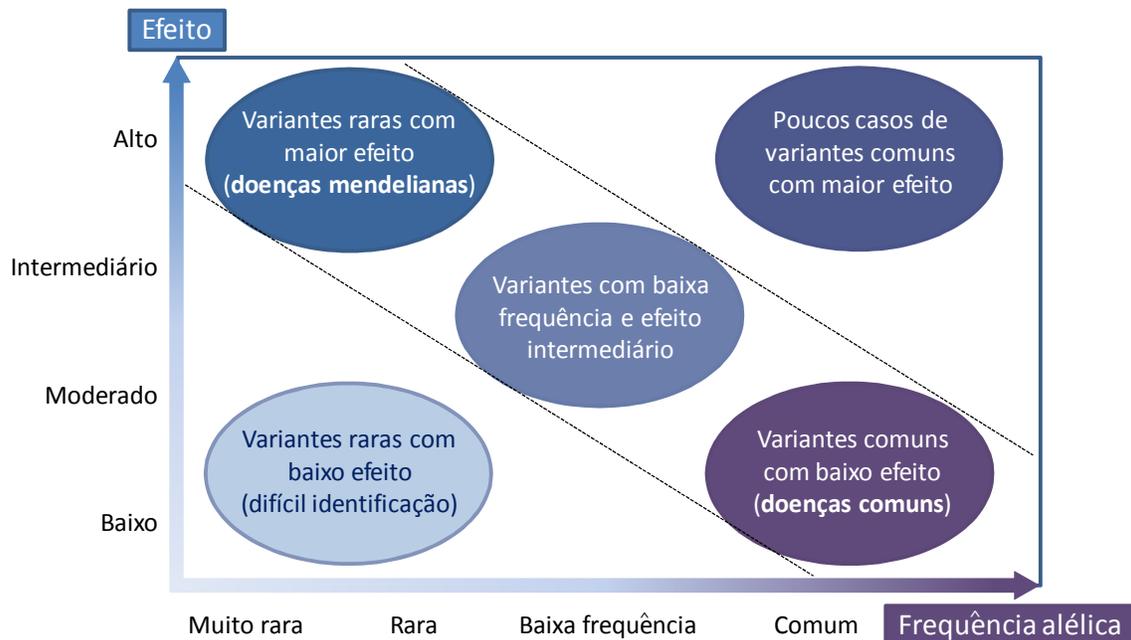


Figura 38. Relação entre efeito deletério de variantes genéticas e suas frequências alélicas (adaptado de 136).

No entanto, mesmo quando compilada toda a literatura disponível, apenas 16 alterações potencialmente deletérias foram identificadas em *EFHC1* para EMJ e outras EIGs em mais de 400 pacientes estudados, contrastando fortemente com as 774 alterações descritas em *SCN1A* para a síndrome de Dravet. Esses resultados mostram que o gene *EFHC1* não parece estar agindo como principal causador de EMJ e outras EIGs, embora possa ser um fator de predisposição.

Os genes *SLC2A1* e *GABRA1*, por sua vez, não parecem conferir predisposição para os fenótipos estudados em nossa casuística, visto que não foram identificadas alterações potencialmente deletérias.

Por fim, as bases genéticas da síndrome de Doose permanecem desconhecidas, uma vez que não foram identificadas alterações potencialmente deletérias nos principais genes candidatos apontadas para esse fenótipo na literatura até o momento.

6. CONCLUSÕES

- Como alterações potencialmente deletérias no gene *SCN1A* foram identificadas em 81% dos pacientes com **síndrome de Dravet** estudados no presente trabalho, e quando compilada toda a literatura mundial sobre o assunto observa-se que foram relatadas 774 mutações nesse gene em indivíduos com essa síndrome, o teste genético em *SCN1A* para fins clínicos é altamente recomendável para esse fenótipo.
- Apenas um paciente com **síndrome de Doose** em nossa casuística apresentou alteração potencialmente deletéria em *SCN1A*. Em toda literatura disponível, foram descritos apenas outros seis indivíduos acometidos por essa síndrome com mutação nesse gene, e alguns deles não apresentavam características clínicas típicas. Sendo assim, o teste genético em *SCN1A* para fins clínicos não seria indicado para indivíduos com esse fenótipo.
- O gene *SLC2A1* não parece estar envolvido com a etiologia da **síndrome de Doose** em nossa casuística, uma vez que não foram identificadas alterações potencialmente deletérias. Poucos pacientes com esse fenótipo foram relatados portando mutações nesse gene até o momento, o que não justifica a aplicação do mesmo para fins clínicos atualmente.

- O gene *SLC2A1* também não parece contribuir para a etiologia das EIGs em nossa população, e parece estar mais associado ao fenótipo das epilepsias com ausência de início precoce. Sendo assim, excetuando-se os casos que correspondem a esse fenótipo, o teste genético em *SLC2A1* em pacientes com EIGs em geral não parece ser eficaz.
- A relativamente baixa frequência de alterações potencialmente deletérias no gene *EFHC1* em indivíduos com **EIGs comuns** (aproximadamente 10% para EMJ), tanto no presente estudo quanto nos descritos na literatura, sugere que esse gene não seja o principal causador dessas epilepsias, embora possa ser um fator de predisposição, em especial para EMJ. Considerando também o fato de que a interpretação dos resultados das triagens nesse gene não é trivial, o teste genético em *EFHC1* não parece ser eficaz.
- O gene *GABRA1* não parece conferir predisposição para as **EIGs comuns** de nossa casuística, e parece ser o agente causador de EMJ e EAI em apenas alguns poucos indivíduos descritos na literatura. Por tanto, o teste genético em *GABRA1* para fins clínicos em EIGs não é recomendável.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fisher RS, Boas WE, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P *et al.* Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the international league against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 2005; 46(4):470-2.
2. IOM (Institute of Medicine). *Epilepsy across the spectrum: Promoting health and understanding*. Washington, DC: The National Academies Press. 2012.
3. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia* 1981; 22 (4): 489–501.
4. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* 1989; 30:389-99.
5. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH *et al.* Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia* 2010, 51(4): 676–685.
6. Banerjee PN, Hauser WA. *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. 2007; p 45-56.
7. Chaix Y, Laguitton V, Lauwers-Cancès V, Daquin G, Cancès C, Démonet JF *et al.* Reading abilities and cognitive functions of children with epilepsy: Influence of epileptic syndrome. *Brain & Development* 2006; 28:122–30.
8. Sillanpää M, Cross JH. The psychosocial impact of epilepsy in childhood. *Epilepsy & Behavior* 2009; 15:S5–S10.
9. Gitaí DLG, Romcy-Pereira RN, Gitaí LLG, Leite JP, Garcia-Cairasco N, Paço-Larson M L. Genes e epilepsia I: epilepsia e alterações genéticas. *Rev Assoc Med Bras* 2008; 54(3): 272-8.
10. Weber YG, Lerche H. Genetic mechanisms in idiopathic epilepsies. *Developmental Medicine & Child Neurology* 2008; 50: 648–654.
11. Ottman R, Risch N. Genetic Epidemiology and Gene Discovery in Epilepsy. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012.
12. Scheffer IE, Zhang YH, Geetz J, Dibbens L. Genetics of the epilepsies: Genetic twists in the channels and other tales. *Epilepsia* 2010; 51(Suppl. 1):33–36.
13. Michelucci R, Pasini E, Riguzzi P, Volpi L, Dazzo E, Nobile C. Genetics of Epilepsy and Relevance to Current Practice. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2012; 12:445–455.
14. Lerche H, Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F. Ion Channels and Epilepsy. *American Journal of Medical Genetics* 2001; 106:146-159.
15. Ottman R, Hirose S, Jain S, Lerche H, Lopes-Cendes I, *et al.* Genetic testing in the epilepsies—Report of the ILAE Genetics Commission. *Epilepsia* 2010; 51(4):655–670.
16. Beaudet AL. Which way for genetic-test regulation? Leave test interpretation to specialists. *Nature* 2010; 466, 816–817.

17. Delgado-Escueta AV, Bourgeois BFD. Debate: Does genetic information in humans help us treat patients? *Epilepsia* 2008; 49(Suppl. 9):13–24.
18. Brunklaus A, Dorris L, Ellis R, Reavey E, Lee E. The clinical utility of an SCN1A genetic diagnosis in infantile-onset epilepsy. *Developmental Medicine & Child Neurology* 2013; 55: 154–161.
19. Scheffer IE, Berkovic SF. Generalized epilepsy with febrile seizures plus: a genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes. *Brain*. 1997; 120:479–90.
20. Singh R, Andermann E, Whitehouse WP, Harvey AS, Keene DL, Seni MH *et al*. Severe myoclonic epilepsy of infancy: extended spectrum of GEFS+? *Epilepsia*. 2001; 42, 837–44.
21. Hurst DL. Epidemiology of Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy. *Epilepsia*. 1990; 31(4):397–400.
22. Dravet C. Les épilepsies graves de l'enfant. *Vie Med*. 1978 ; 8: 543–8.
23. Dravet C, Bureau M, Guerrini R, Giraud N, Roger J. Severe myoclonic epilepsy in infants In: Roger J, Dravet C, Bureau M, Dreifus FE, Perret A, Wolf P. *Epileptic Syndromes in Infancy, Childhood and Adolescence*. London: John Libbey; 1992. p.75–102.
24. Kelley SA, Kossoff EH. Doose syndrome (myoclonic–astatic epilepsy): 40 years of progress. *Developmental medicine & child neurology* 2010; 52: 988–993.
25. Kaminska A, Ickowicz A, Plouin P, Bru MF, Dellatolas G, Dulac O. Delineation of cryptogenic Lennox–Gastaut syndrome and myoclonic astatic epilepsy using multiple correspondence analysis. *Epilepsy Res*. 1999; 36(1):15–29.
26. Doose H. Myoclonic-astatic epilepsy. *Epilepsy Res*. 1992; Suppl 6:163–8.
27. Doose, H; Gerken, H; Leonhardt, R; Voelzke, E; Voelz, C. Centrencephalic myoclonic-astatic petit mal. Clinical and genetic investigations. *Neuropediatric*. 1970; 2: 59–78.
28. Singh R, Scheffer IE, Crossland K, Berkovic SF. Generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+): a common, childhood onset, genetic epilepsy syndrome. *Ann. Neurol*. 1999; 45:75–81.
29. Wallace RH, Wang DW, Singh R *et al*. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel beta1 subunit gene SCN1B. *Nat Genet*. 1998; 19:366–70.
30. Baulac S, Gourfinkel-An I, Picard F, Rosenberg-Bourgi M, Prud'homme JF, Baulac M *et al*. A second locus for familial generalized epilepsy with febrile seizures plus maps to chromosome 2q21–q33. *Am J Hum Genet*. 1999; 65(4):1078–85.
31. Lopes-Cendes I, Scheffer IE, Berkovic SF, Rousseau M, Andermann E, Rouleau GA. A new locus for generalized epilepsy with febrile seizures plus maps to chromosome 2. *Am J Hum Genet*. 2000; 66(2):698–701.
32. Escayg A, Heils A, Macdonald BT *et al*. A novel SCN1A mutation associated with generalized epilepsy with febrile seizures plus and prevalence of variants in patients with epilepsy. *Am. J. Hum. Genet*. 2001; 68: 866–73.

33. Wallace RH, Scheffer IE, Barnett S, Richards M, Dibbens L, Desai RR *et al.* Neuronal sodium-channel alpha1-subunit mutations in generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Am. J. Hum. Genet.* 2001 ; 68: 859–65.
34. Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, Ito M, Fukuma G, Mazaki-Miyazaki E, Nagafuji H *et al.* Nav1.1 mutations cause febrile seizures associated with afebrile partial seizures. *Neurology.* 2001; 57: 703–705.
35. Ito M, Nagafuji H, Okazawa H, Yamakawa K *et al.* Autosomal dominant epilepsy with febrile seizures plus with missense mutations of the (Na⁺)-channel α -1 subunit gene, *SCN1A*. *Epilepsy Res.* 2002; 48: 15–23.
36. Sugawara T, Tsurubuchi Y, Agarwala KL, Ito M *et al.* A missense mutation of the Na1 channel alpha II subunit gene Na(v)1.2 in a patient with febrile and afebrile seizures causes channel dysfunction, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001; 98:6384–9.
37. Singh NA, Pappas C, Dahle EJ, Claes LR, Pruess TH, De Jonghe P, Thompson J, Dixon M, Gurnett C, Peiffer A, White HS, Filloux F, Leppert MF. A role of SCN9A in human epilepsies, as a cause of febrile seizures and as a potential modifier of Dravet syndrome. *PLoS Genet.* 2009; 5(9): e1000649.
38. Wallace RH, Marini C, Petrou S, Harkin LA, Bowser DN, Panchal RG *et al.* Mutant GABA(A) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nat Genet.* 2001; 28(1):49-52.
39. Baulac S, Huberfeld G, Gourfinkel-An I, Mitropoulou G, Beranger A, Prud'homme JF *et al.* First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. *Nat Genet.* 2001;28(1):46-8.
40. Harkin LA, Bowser DN, Dibbens LM, Singh R, Phillips F, Wallace RH *et al.* Truncation of the GABA(A)-receptor gamma2 subunit in a family with generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Am J Hum Genet.* 2002; 70(2):530-6.
41. Dibbens LM, Feng HJ, Richards MC, Harkin LA, Hodgson BL, Scott D *et al.* GABRD encoding a protein for extra- or peri-synaptic GABAA receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies. *Hum Mol Genet.* 2004; 13(13):1315-9.
42. Marini C, Mei D, Temudo T, Ferrari AR, Buti D, Dravet C. Idiopathic epilepsies with seizures precipitated by fever and *SCN1A* abnormalities. *Epilepsia.* 2007; (9):1678-85.
43. Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B, Lagae L, Van Broeckhoven C, De Jonghe P. De novo mutations in the sodium channel gene *SCN1A* cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am. J. Hum. Genet.* 2001; 68: 1327–32.
44. Depienne C, Trouillard O, Saint-Martin C, *et al.* Spectrum of *SCN1A* gene mutations associated with Dravet syndrome: analysis of 333 patients. *J Med Genet* 2009; 46:183–191.
45. Marini C, Scheffer IE, Nabbout R, Suls A, De Jonghe P, Zara F, Guerrini R. The genetics of Dravet syndrome. *Epilepsia* 2011; 52 Suppl 2:24-9.

46. Nabbout R, Kozlovski A, Gennaro E, Bahi-Buisson N *et al* Absence of mutations in major GEFS+ genes in myoclonic astatic epilepsy. *Epilepsy Res* 2003; (2-3):127-33.
47. Tang S, Pal D. Dissecting the genetic basis of myoclonic-astatic epilepsy. *Epilepsia* 2012; 53(8):1303–1313.
48. Lent R. Cem bilhões de neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência. Atheneu, 2004. p 77, 78, 101, 114.
49. Hu W, Tian C, Li T, Yang M, Hou H, Shu Y. Distinct contributions of Na(v)1.6 and Na(v)1.2 in action potential initiation and backpropagation. *Nat Neurosci* 2009; 12(8):996-1002.
50. Steinlein, OK. Channelopathies can cause epilepsy in man. *European Journal of Pain*. 2002; 6: 27-34.
51. Duflocq A, Le Bras B, Bullier E, Couraud F, Davenne M. Nav1.1 is predominantly expressed in nodes of Ranvier and axon initial segments. *Mol Cell Neurosci* 2008; 39(2):180-92.
52. Yu FH, Mantegazza M, Westenbroek RE, Robbins CA, Kalume F, Burton KA, Spain WJ, McKnight GS, Scheuer T, Catterall WA. Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat Neurosci* 2006; 9(9):1142-9.
53. Lossin C, Wang DW, Rhodes TH, Vanoye CG, George AL. Molecular Basis of an Inherited Epilepsy. *Neuron* 2002; 34: 877–884.
54. Mullen, S. A., Marini, C., Suls, A., *et al.*. Glucose Transporter 1 Deficiency as a Treatable Cause of Myoclonic Astatic Epilepsy. *Arch Neurol* 2011; 68(9):1152-5.
55. De Vivo DC, Trifiletti RR, Jacobson RI, Ronen GM, Behmand RA, Harik SI. Defective glucose transport across the blood-brain barrier as a cause of persistent hypoglycorrhachia, seizures, and developmental delay. *N Engl J Med* 1991; 325:703–709.
56. Mullen S. A., MBBS; Suls, A., PhD; De Jonghe, P., MD, PhD; *et al.* Absence epilepsies with widely variable onset are a key feature of familial GLUT1 deficiency. *Neurology*, 2010; 75(5):432-40.
57. Panayiotopoulos CP. *The Epilepsies: Seizures, Syndromes and Management*. Oxfordshire (UK): Bladon Medical Publishing; 2005; Chapter 10: Idiopathic Generalised Epilepsies.
58. Janz, D. Juvenile myoclonic epilepsy. *Cleve Clinical Journal of Medicine*. 1989; 56: 23-33.
59. Leppik I. Classification of the Myoclonic Epilepsies. *Epilepsia* 2003; 44(Suppl. 11):2–6.
60. Obeid T, El Rab MO, Daif AK, *et al.* Is HLA-DRW13 (W6) associated with juvenile myoclonic epilepsy in arab patients? *Epilepsia* 1994;35(2):319-21.
61. Silva, A. E. S. M.; Guerreiro, M. M. Epilepsias benignas da infância. In: Guerreiro CAM, Guerreiro MM, Cendes F, Lopes-Cendes I (eds). *Epilepsia*, 3a ed. São Paulo: Lemos Editorial; 2000, p. 183-92.
62. Delgado-Escueta AV. Advances in Genetics of Juvenile Myoclonic Epilepsies. *Epilepsy Curr*. 2007; 7(3): 61–67.

63. Kleefuß-Lie, A. *et al.* CLCN2 variants in idiopathic generalized epilepsy. *Nat. Genet.* 2009; 41, 954–955.
64. Niemeyer MI, Cid LP, Sepúlveda FV, Blanz J, Auberson M, Jentsch TJ. No evidence for a role of CLCN2 variants in idiopathic generalized epilepsy. *Nat. Genet.* 2010; 42, 3.
65. Suzuki, T, Delgado-Escueta, AV, Aguan K, *et al.* Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nat. Genet.* 2004; 36(8): 842-849.
66. King SM. Axonal protofilament ribbons, DM10 domains, and the link to juvenile myoclonic epilepsy. *Cell Motil Cytoskeleton* 2006; 63(5):245-53.
67. Sander T, Schulz H, Saar K, *et al.* Genome search for susceptibility loci of common idiopathic generalised epilepsies. *Hum Mol Genet* 2000; 9(10):1465-72.
68. Haug, K., Warnstedt, M., Alekov, A.K., *et al.* Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. *Nat. Genet.* 2003; 33(4): 527-532.
69. Cossette P, Liu L, Brisebois K, *et al.* Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat. Genet.* 2002; 30: 184-189.
70. Serratoso JM, Delgado-Escueta AV, Medina MT, Zhang Q, Iranmanesh R, Sparkes RS. Clinical and genetic analysis of a large pedigree with juvenile myoclonic epilepsy. *Ann Neurol* 1996; 39(2):187-95.
71. Bai D, Alonso ME, Medina MT, *et al.* Juvenile myoclonic epilepsy: linkage to chromosome 6p12 in Mexican families. *Am J Med Genet* 2002; 113:268-74.
72. Liu AW, Delgado-Escueta AV, Serratoso JM, *et al.* Juvenile myoclonic epilepsy locus in chromosome 6p21.2-p11: linkage to convulsions and electroencephalography trait. *Am J Hum Genet* 1995; 57(2):368-81.
73. Greenberg DA, Durner M, Keddache M, *et al.* Reproducibility and complications in gene searches: linkage on chromosome 6, heterogeneity, association, and maternal inheritance in juvenile myoclonic epilepsy. *Am J Hum Genet* 2000; 66:508-16.
74. Peters HC, Kämmer G, Volz A, Kaupmann K, Ziegler A, Bettler B, Epplen JT, Sander T, Riess O. Mapping, genomic structure, and polymorphisms of the human GABABR1 receptor gene: evaluation of its involvement in idiopathic generalized epilepsy. *Neurogenetics* 1998; 2(1):47-54.
75. Sander T, Kretz R, Williamson MP, *et al.* Linkage analysis between idiopathic generalized epilepsies and the GABA(A) receptor alpha5, beta3 and gamma3 subunit gene cluster on chromosome 15. *Acta Neurol Scand* 1997; 96(1):1-7.
76. Pal DK, Evgrafov OV, Tabares P, Zhang F, Durner M, Greenberg DA. BRD2 (RING3) is a probable major susceptibility gene for common juvenile myoclonic epilepsy. *Am J Hum Genet.* 2003; 73(2):261-70.

77. Fong GC, Shah PU, Gee MN, et al. Childhood absence epilepsy with tonic-clonic seizures and electroencephalogram 3-4-Hz spike and multispike-slow wave complexes: linkage to chromosome 8q24. *Am J Hum Genet* 1998; 63(4):1117-29.
78. Vijai J, Kapoor A, Ravishankar HM, Cherian PJ, Girija AS, Rajendran B, Rangan G, Jayalakshmi S, Mohandas S, Radhakrishnan K, Anand A. Genetic association analysis of KCNQ3 and juvenile myoclonic epilepsy in a South Indian population. *Hum Genet.* 2003; 113(5):461-3.
79. Elmslie FV, Rees M, Williamson MP, Kerr M, Kjeldsen MJ, *et al.* Genetic mapping of a major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q. *Hum Mol Genet.* 1997; 6(8):1329-34.
80. Mas C, Taske N, Deutsch S, Guipponi NI *et al.* Association of the connexin36 gene with juvenile myoclonic epilepsy. *J. Med. Genet.* 2004; 41.
81. Taske NL, Williamson MP, Makoff A, et al. Evaluation of the positional candidate gene CHRNA7 at the juvenile myoclonic epilepsy locus (EJM2) on chromosome 15q13-14. *Epilepsy Res* 2002; 49(2):157-72.
82. Durner M, Keddache MA, Tomasini L, et al. Genome scan of idiopathic generalized epilepsy: evidence for major susceptibility gene and modifying genes influencing the seizure type. *Ann Neurol* 2001; 49(3):328-35.
83. Greenberg DA, Cayanis E, Strug L, Marathe S, Durner M, *et al.* Malic enzyme 2 may underlie susceptibility to adolescent-onset idiopathic generalized epilepsy. *Am J Hum Genet* 2005; 76(1):139-46.
84. Vijai J, Kapoor A, Ravishankar HM, Cherian PJ, Kuruttukulam G *et al.* Protective and susceptibility effects of hSKCa3 allelic variants on juvenile myoclonic epilepsy. *J Med Genet.* 2005; 42(5):439-42.
85. Dibbens LM, Feng HJ, Richards MC, Harkin LA, Hodgson BL, Scott D et al. GABRD encoding a protein for extra- or peri-synaptic GABAA receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies. *Hum Mol Genet.* 2004; 13(13):1315-9.
86. Escayg A, De Waard M, Lee DD, Bichet D, Wolf P, *et al.* Coding and noncoding variation of the human calcium-channel beta4-subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. *Am J Hum Genet.* 2000; 66(5):1531-9.
87. de Nijs L, Léon C, Nguyen L *et al.* EFHC1 interacts with microtubules to regulate cell division and cortical development. *Nat. Neurosci.* 2009;12(10):1266-74.
88. Annesi F, Gambardella A, Michelucci R., *et al.* Mutational analysis of EFHC1 gene in Italian families with juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsia.* 2007; 48(9): 1686-90.M
89. Medina MT, Suzuki T, Alonso ME *et al.* Novel mutations in Myoclonin1/EFHC1 in sporadic and familial juvenile myoclonic epilepsy. *Neurology.* 2008; 70(22 Pt 2): 2137-2144.
90. Bai D, Bailey JN, Durón RM *et al.* DNA variants in coding region of EFHC1: SNPs do not associate with juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsia.* 2009; 50(5): 1184-1190.

91. Stogmann E, Lichtner P, Baumgartner C, *et al.* Idiopathic generalized epilepsy phenotypes associated with different EFHC1 mutations. *Neurology*. 2006; 67(11): 2029-2031.
92. Macdonald RL, Kang JQ. Molecular pathology of genetic epilepsies associated with GABAA receptor subunit mutations. *Epilepsy Curr*. 2009; 9(1):18-23.
93. Suls A, Dedeken P, Goffin K, Van Esch H, Dupont P *et al.* Paroxysmal exercise-induced dyskinesia and epilepsy is due to mutations in SLC2A1, encoding the glucose transporter GLUT1. *Brain* 2008; 131: 1831-1844.
94. Weber YG, Storch A, Wuttke TV, Brockmann K *et al.* GLUT1 mutations are a cause of paroxysmal exertion-induced dyskinesias and induce hemolytic anemia by a cation leak. *The Journal of Clinical Investigation*, 2008; 118: 2157-68.
95. Striano P, Weber YG, Toliat MR, *et al.* GLUT1 mutations are a rare cause of familial idiopathic generalized epilepsy. *Neurology*, 2012; 78(8):557-62.
96. Preto PM, Guimarães CA, Yasuda CL, Schmutzler KMRS, Gonzales M. Clinical and EEG profile in Dravet and Doose syndromes. *Journal of Pediatric Epilepsy* 2012; 1:43–49.
97. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res*. 1991; 19:4008.
98. Kreader CA. Relief of Amplification Inhibition in PCR with Bovine Serum Albumin or T4 Gene 32 Protein. *Applied and Environmental Microbiology* 1995; 62(03):1102-1106.
99. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74(12):5463-7.
100. den Dunnen JT, Antonarakis E. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 2001; 109:121–124.
101. Thusberg J, Olatubosun A, Vihinen M. Performance of Mutation Pathogenicity Prediction Methods on Missense Variants. *Human Mutation* 2011; 32(4):358–368.
102. Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science*. 1974; 187: 902-4.
103. Li WH, Wu CI, Luo CC. Nonrandomness of point mutation as reflected in nucleotide substitutions and its evolutionary implications. *J. Mol. Evol.* 1984; 21:58-71.
104. Shapiro MB, Senapathy P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res*. 1987; 15(17):7155-74.
105. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Research* 2009; 1–14.
106. Yeo G, Burge CB. Maximum Entropy Modeling of Short Sequence Motifs with Applications to RNA Splicing Signals. *Journal of Computational Biology* 2004; 11:377-394.

107. Selmer KK, Lund C, Brandal K, Undlien DE, Brodtkorb E. SCN1A mutation screening in adult patients with Lennox–Gastaut syndrome features. *Epilepsy & Behavior* 2009;16:555–557.
108. Fujiwara T, Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, Takahashi Y, Fukushima K et al. Mutations of sodium channel α subunit type 1 (SCN1A) in intractable childhood epilepsies with frequent generalized tonic-clonic seizures. *Brain* 2003; 126, 531-546.
109. Zuberi SM, Brunklaus A, Birch R, Reavey E, Duncan J, Forbes GH. Genotype–phenotype associations in SCN1A-related epilepsies. *Neurology* 2011; 76:594–600.
110. Harkin LA, McMahon JM, Iona X, Dibbens L, Pelekanos JT *et al.* The spectrum of SCN1A-related infantile epileptic encephalopathies. *Brain* 2007; 130, 843-852.
111. Yordanova I, Todorov T, Dimova P, Hristova D, Tincheva R *et al.* One novel Dravet syndrome causing mutation and one recurrent MAE causing mutation in SCN1A gene. *Neuroscience Letters* 2011; 949:180–183.
112. Pineda-Trujillo N, Carrizos J, Cornejo W, Arias W, Franco C *et al.* A novel SCN1A mutation associated with severe GEFS+ in a large South American pedigree. *Seizure* 2005; 14: 123—128.
113. Ebach K, Joos H, Doose H, Stephani U, Kurlemann G *et al.* SCN1A mutation analysis in myoclonic astatic epilepsy and severe idiopathic generalized epilepsy of infancy with generalized tonic-clonic seizures. *Neuropediatrics* 2005; 36(3):210-3.
114. Arsov T, Mullen SA, Rogers S, Phillips AM, Lawrence KM *et al.* Glucose Transporter 1 Deficiency in the Idiopathic Generalized Epilepsies. *Ann neurol* 2012; 72:807–815.
115. Arsov T, Mullen SA, Damiano JA, Lawrence KM, Huh LL *et al.* Early onset absence epilepsy: 1 in 10 cases is caused by GLUT1 deficiency. *Epilepsia* 2012; 53(12):e204–e207.
116. Suls A, MSc, Mullen SA, Weber YG, Verhaert K, *et al.* Early-Onset Absence Epilepsy Caused by Mutations in the Glucose Transporter GLUT1. *Ann Neurol* 2009; 66:415–419.
117. Gökben S, Yılmaz S, Klepper J, Serdaroğlu G, Tekgül H. Video/EEG recording of myoclonic absences in GLUT1 deficiency syndrome with a hot-spot R126C mutation in the SLC2A1 gene. *Epilepsy & Behavior* 2011; 21:200–202.
118. Muhle H, Ingo Helbig I, Froslevb TG, Suls A, von Spiczak S *et al.* The role of SLC2A1 in early onset and childhood absence epilepsies. *Epilepsy Research* 2013; 105: 229-233.
119. Jara-Prado A, Martínez-Juárez IE, Ochoa A, González VM, Fernández-González-Aragón Mdel C *et al.* Novel Myoclonin1/EFHC1 mutations in Mexican patients with juvenile myoclonic epilepsy. *Seizure* 2012; 21: 550–554.
120. Ma S, Blair MA, Abou-Khalil B, Lagrange AH, Gurnett CA, Hedera P. Mutations in the GABRA1 and EFHC1 genes are rare in familial juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy Research* 2006; 71:129–134.
121. Pinto D, Louwaars S, Westland B, Volkens L, de Haan GJ *et al.* Heterogeneity at the JME 6p11–12 Locus: Absence of Mutations in the EFHC1 Gene in Linked Dutch Families. *Epilepsia* 2006; 47(10):1743–1746.

122. Maljevic S, Krampfl K, Cobilanschi J, *et al.* A Mutation in the GABAA receptor α 1-subunit is associated with absence epilepsy. *Annals of Neurology*; 2006. 59 (6): 983-987.
123. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics* 2, 1999.
124. Jackson JJ. A reappraisal of non-consensus mRNA splice sites. *Nucleic Acids Research* 1991; 19:3795-3798.
125. Buset M, Seledtsov IA, Solovyev VV. Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. *Nucleic Acids Research* 2000; 28:4364-4375.
126. Ohmori I, Ouchida M, Ohtsuka Y, Oka E, Shimizu K. Significant correlation of the SCN1A mutations and severe myoclonic epilepsy in infancy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 295:17-23.
127. Gargus JJ, Tournay A. Novel Mutation Confirms Seizure Locus SCN1A is Also Familial Hemiplegic Migraine Locus FHM3. *Pediatr Neurol* 2007; 37:407-410.
128. Rilstone JJ, Coelho FM, Minassian BA, Andrade DM. Dravet syndrome: Seizure control and gait in adults with different SCN1A mutations. *Epilepsia* 2012; 53(8):1421-1428.
129. Frosk P, Mhanni AA, Rafay MF. SCN1A Mutation Associated With Intractable Myoclonic Epilepsy and Migraine Headache. *J Child Neurol* 2013; 28(3) 389-391.
130. Wang D, Kranz-Eble P, De Vivo DC. Mutational analysis of GLUT1 (SLC2A1) in Glut-1 deficiency syndrome. *Hum Mutat.* 2000; 16(3):224-31.
131. Pascual JM, Wang D, Lecumberri B, Yang H, Mao X, Yang R, De Vivo DC. GLUT1 deficiency and other glucose transporter diseases. *Eur J Endocrinol.* 2004; 150(5):627-33.
132. Giordano L, Vignoli A, Accorse P, Galli J *et al.* A clinical and genetic study of 33 new cases with early-onset absence epilepsy. *Epilepsy Research* 2011; 95, 221—226.
133. Agostinellia S, Traversob M, Accorsic P, Beccariad F, Belcastro V *et al.* Early-onset absence epilepsy: SLC2A1 gene analysis and treatment evolution. *European Journal of Neurology* 2013; 20: 856–859.
134. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV. A “Silent” Polymorphism in the MDR1 Gene Changes Substrate Specificity *Science.* 2007; 315:525-7.
135. Kapoor A, Vijai J, Ravishankar HM, *et al.* Absence of GABRA1 Ala322Asp mutation in juvenile myoclonic epilepsy families from India. *Journal of Genetics*, 2003; 82:17-21.
136. McCarthy MI, *et al.* Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nature Rev. Genet* 2008; 9:356–369.

8. ANEXOS E APÊNDICES

ANEXO 1

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP. 24/07/07.

PARECER CEP: Nº 032/2006

PARECER

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ANÁLISE DE LIGAÇÃO E ASSOCIAÇÃO EM FAMÍLIAS COM EPILEPSIA BENIGNA ROLÂNDICA”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Íscia Terezinha Lopes Cendes

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a Emenda que altera o título para “ANÁLISE MOLECULAR E DE CORRELAÇÃO ENTRE GENÓTIPO E FENÓTIPO EM EPILEPSIAS IDIOPÁTICAS NA INFÂNCIA” e os objetivos, bem como a inclusão do Departamento de Pediatria da Universidade Estadual do Paraná, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

Recomendação: apresentar autorização do responsável do Departamento de Pediatria da Universidade Estadual do Paraná para coleta de dados.

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de julho de 2007.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 - Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

ANEXO 2



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

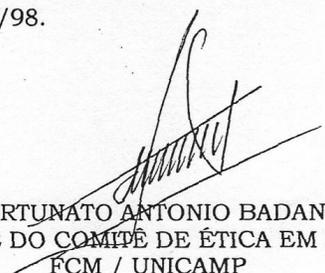
PARECER Nº 006/98 - CEP/FCM

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



ANEXO 3

Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Genética Médica

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 1 de 3

Título do projeto: Estudos Genéticos em Epilepsia

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

OBJETIVO DA PESQUISA:

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

PROCEDIMENTO:

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

RISCO E DESCONFORTO:

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



FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 2 de 3

Título do projeto: Estudos Genéticos em Epilepsia

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação nesse estudo e que o meu diagnóstico e o meu tratamento provavelmente não serão modificados. Contudo, os resultados desse estudo podem, a longo prazo, oferecer vantagens para os indivíduos com epilepsia e suas famílias, possibilitando um melhor diagnóstico e tratamento mais adequado. É importante notar que o diagnóstico pré-sintomático não faz parte dessa pesquisa, mas se eu desejar obter orientação genética, ela será oferecido nos ambulatórios do serviço de genética clínica do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), tel. (19) 3521-8908.

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 (19) 3521-8907 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. (19) 3521-8936.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

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



FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 3 de 3

Título do projeto: Estudos Genéticos em Epilepsia

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

Eu confirmo que o(a) Dr(a). _____
me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos,
desconforto e possíveis vantagens advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e 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

APÊNDICE 1

Dados demográficos e clínicos dos pacientes com síndrome de Dravet

ID Paciente	Sexo	Idade (anos)	Início das crises afebris (anos)	Temperatura CF (°C)	História familiar	Alteração nucleotídica em <i>SCN1A</i>
1	F	21	5	37,5	-	c.5434T>C
2	F	9	7	37-37,3	+	IVS8+3G>T
3	F	14	12	39- 40	+	
4	F	17	12	37,7-38	-	c.829T>C
5	F	NI	NI	NI	NI	c.5489_5491delAGT
6	M	12	3	37,3	-	c.971A>C
7	M	13	3	38	+	c.5329delG
8	M	14	18	NI	-	
9	F	*	4	37,5	-	IVS4+1G>A
10	F	7	3	NI	+	IVS2+1A>G
11	F	13	3	38	-	c.5179G>T
12	F	10	6	38	+	c.1242delA
13	F	NI	NI	NI	NI	c.2360T>G
14	M	10	5	37,8	-	c.3719_3720insGAT A
15	F	10	5	37,2	NI	c.2360T>G
16	F	16	5	+	NI	
17	M	21	4	+	NI	IVS21+1G>A
18	M	4	11	+	-	
19	F	3	NI	+	NI	
20	F	2	6	37	-	c.296_313delTCTTC CGGTTCAAGTGCCA
21	F	2	8	37	-	c.296_313delTCTTC CGGTTCAAGTGCCA

ID: identificação, F: feminino, M: masculino, +: presença, -: ausência, NI: não informado, CF: crise febril

*faleceu em 2006

APÊNDICE 2

Dados demográficos e clínicos dos pacientes com síndrome de Doose

ID Paciente	Sexo	Idade (anos)	Início das crises (anos)	Crise febris	História familiar	Alteração nucleotídica em <i>SCN1A</i>
1	M	11	42	-	+	
2	F	17	72	-	-	
3	M	10	8	+	-	
4	M	13	36	+	+	
5	M	11	30	-	+	
6	M	17	30	-	-	
7	F	19	36	+	+	
8	F	25	35	-	-	
9	M	14	43	-	-	
10	M	9	30	-	+	
11	M	14	36	-	-	
12	F	23	48	+	-	
13	F	13	36	-	+	
14	M	8	36	+	-	
15	M	6	36	+	NI	
16	M	6	56	+	+	c.68C>T

ID: identificação, M: masculino, F: feminino, +: presença, -: ausência, NI: não informado

APÊNDICE 3

Dados clínicos demográficos e dos pacientes com epilepsias idiopáticas generalizadas e resultado dos testes de genética molecular

ID	Fenótipo	Sexo	Idade (anos)	Início das crises (anos)	Tipos de crise	História familiar	Alteração nucleotídica em <i>EFHC1</i>
1	EMJ	M	40	17	Mi, A, TCG	+	
2	EMJ	M	53	17	Mi, TCG	+	(c.475C>T), (c.1855A>C)
3	EMJ	M	NI	NI	NI	+	
4	EMJ	M	29	7	Mi, TCG	+	c.685T>C , (c.1343T>C)
5	EMJ	M	32	15	Mi, TCG	+	
6	EMJ	F	NI	13	Mi, A, TCG	+	
7	EMJ	F	NI	NI	NI	+	
8	EMJ	F	40	6	Mi, TCG	+	
9	EMJ	F	NI	NI	NI	+	(c.545G>A)
10	EMJ	F	35	19	Mi, TCG	+	
11	EMJ	F	31	13	Mi, TCG	+	
12	EMJ	M	NI	NI	NI	-	
13	EMJ	F	33	12	Mi, A, TCG	+	(c.475C>T)
14	EMJ	F	40	NI	NI	+	
15	EMJ	F	32	14	Mi, A, TCG	+	
16	EMJ	F	NI	NI	NI	-	c.685T>C
17	EMJ	M	NI	NI	NI	-	
18	EMJ	F	NI	NI	NI	-	
19	EMJ	F	42	21	Mi, A, TCG	+	(c.1855A>C)
20	EMJ	M	NI	NI	NI	-	
21	EMJ	F	28	17	Mi, TCG	+	(c.545G>A), (c.1343T>C)
22	EMJ	F	30	14	Mi, A, TCG	+	(c.475C>T)
23	EMJ	M	NI	NI	NI	-	c.685T>C
24	EMJ	M	41	18	Mi, TCG	+	(c.475C>T)
25	EMJ	M	NI	NI	NI	-	
26	EMJ	F	40	9	Mi, TCG	+	(c.1855A>C)
27	EMJ	M	NI	NI	NI	-	(c.475C>T)
28	EMJ	F	47	12	Mi, A, TCG	+	
29	EMJ	F	39	13	Mi, A, TCG	+	(c.545G>A), c.896A>G
30	EMJ	F	35	14	Mi, TCG	+	(c.475C>T)

31	EMJ	F	38	12	Mi, A, TCG	+	
32	EMJ	F	NI	NI	NI	+	
33	EMJ	F	40	14	Mi, A, TCG	+	(c.1855A>C)
34	EMJ	F	58	12	Mi, A, TCG	+	
35	EMJ	F	32	12	Mi, A, TCG	+	(c.1855A>C)
36	EMJ	M	NI	NI	NI	-	
37	EMJ	F	26	11	Mi, A, TCG	+	
38	EMJ	M	48	15	Mi, A	+	
39	EMJ	F	NI	NI	NI	-	(c.1855A>C)
40	EMJ	F	62	NI	Mi, A, TCG	+	(c.475C>T)
41	EMJ	F	43	12	Mi, A, TCG	+	
42	EMJ	M	NI	NI	NI	-	(c.475C>T)
43	EMJ	F	52	5	Mi, A, TCG	+	
44	EMJ	F	36	11	Mi, TCG	+	(c.545G>A), (c.1855A>C)
45	EMJ	F	NI	NI	NI	-	(c.1343T>C)
46	EMJ	M	37	16	Mi, A, TCG	+	
47	EMJ	F	30	19	Mi	+	(c.475C>T), (c.545G>A)
48	EMJ	M	NI	NI	NI	-	
49	EMJ	M	40	14	Mi, A, TCG	+	(c.1855A>C)
50	EMJ	M	22	4	Mi, TCG	+	
51	EMJ	F	NI	NI	NI	-	
52	EMJ	F	32	9	Mi, TCG	+	(c.1855A>C)
53	EMJ	F	24	11	Mi, A	-	
54	EMJ	F	36	15	TCG, Mi, A	-	(c.475C>T)
55	EMJ	M	20	13	TCG, Mi	-	
56	EMJ	F	18	13	TCG, Mi, A	-	
57	EMJ	F	21	7	TCG, Mi, A	-	
58	EMJ	M	22	14	TCG, Mi, A	-	c.887G>A, (c.1855A>)
59	EMJ	F	25	15	TCG, Mi	-	
60	EMJ	M	22	14	TCG, Mi, A	-	c.887G>A, (c.1855A>)
61	EMJ	F	12	13	TCG, Mi, A	-	
62	EMJ	F	19	9	TCG, Mi	-	(c.475C>T), c.1820A>G
63	EMJ	F	23	11	TCG, Mi, A	-	
64	EMJ	M	22	14	TCG, Mi	-	(c.1343T>C)
65	EMJ	F	30	10	TCG, Mi	-	

66	EMJ	F	50	15	TCG, Mi	-	
67	EMJ	M	17	9	TCG, Mi	-	c.662G>A
68	EMJ	F	31	7	TCG, Mi, A	-	(c.1343T>C)
69	EMJ	F	27	13	TCG, Mi, A	-	
70	EMJ	M	28	13	TCG E Mi	-	(c.1855A>)
71	EMJ	M	58	21	TCG, Mi, A	-	(c.1343T>C)
72	EMJ	M	29	3	TCG, Mi, A	-	(c.1855A>)
73	EMJ	M	15	12	TCG, A	-	c.475C>G
74	EMJ	F	34	18	TCG, Mi, A	-	
75	EMJ	F	47	13	TCG, Mi	-	
76	EMJ	M	21	14	Mi, A	-	
77	EMJ	F	18	15	TCG, Mi, A	-	
78	EMJ	M	28	4	TCG, Mi, A	-	(c.1343T>C)
79	EMJ	M	26	21	TCG, Mi	-	
80	EMJ	M	59	15	TCG, Mi, A	-	(c.475C>T)
81	EMJ	F	19	19	TCG, Mi, A	-	
82	EMJ	M	26	9	TCG, Mi	-	
83	EMJ	F	17	17	TCG, Mi, A	-	
84	EMJ	F	15	14	TCG, Mi	-	(c.475C>T)
85	EMJ	F	20	15	TCG, Mi, A	-	
86	EMJ	F	11	9	Mi	-	
87	EMJ	F	45	17	TCG, Mi	-	
88	EMJ	F	18	14	TCG, Mi	-	
89	EMJ	M	18	11	TCG, Mi, A	-	c.1765G>A
90	EMJ	M	12	12	TCG, Mi, A	-	
91	EMJ	M	54	39	TCG, Mi	-	(c.1855A>)
92	EMJ	F	19	14	TCG, Mi	-	
93	EMJ	F	18	15	TCG, Mi	-	
94	EMJ	F	16	14	TCG, Mi, A	-	
95	EMJ	F	21	12	TCG, Mi	-	(c.475C>T)
96	EMJ	F	39	12	TCG, Mi, A	-	
97	EMJ	F	32	14	TCG, Mi, A	-	
98	EMJ	M	51	25	TCG, Mi	-	
99	EMJ	F	28	20	TCG, Mi	-	(c.475C>T)
100	EMJ	F	23	14	TCG, Mi	-	
101	EMJ	F	24	16	TCG, Mi, A	-	(c.1343T>C)
102	EMJ	M	17	16	TCG, Mi	-	
103	CTCGd	M	26	12	TCG	+	(c.475C>T)
104	CTCGd	M	30	15	TCG	+	
105	CTCGd	M	28	4	TCG	+	

106	CTCGd	F	33	3	TCG	+	
107	CTCGd	M	NI	NI	NI	+	
108	CTCGd	F	30	3	TCG, A	+	
109	CTCGd	M	NI	NI	NI	+	
110	CTCGd	M	NI	NI	NI	+	
111	CTCGd	M	NI	NI	NI	+	
112	CTCGd	F	40	13	TCG	+	
113	CTCGd	F	46	11	TCG	+	(c.1855A>C)
114	CTCGd	F	42	13	TCG	+	
115	CTCGd	F	34	14	TCG, A	+	
116	CTCGd	M	33	8	TCG	+	
117	EAJ	M	39	16	Mi, A, TCG	+	(c.475C>T)
118	EAJ	F	33	4	Mi, A, TCG	+	
119	EAJ	F	46	4	Mi, A, TCG	+	(c.475C>T)
120	EAJ	F	34	11	A, TCG	+	
121	EAJ	F	NI	NI	NI	+	
122	EAJ	M	NI	NI	NI	+	
123	EAJ	M	28	6	A, TCG	+	
124	EAJ	F	27	10	A, TCG	+	
125	EAJ	F	50	19	A, TCG	+	
126	EAJ	F	NI	NI	NI	-	
127	EAJ	M	32	14	Mi, TCG	+	
128	EAJ	F	38	7	Mi, A, TCG	+	
129	EAJ	M	38	10	A, TCG	+	
130	EAI	F	18	1	A, TCG	+	
131	EAI	F	NI	NI	NI	+	
132	EIG	M	NI	NI	NI	+	
133	EIG	M	NI	NI	NI	+	
134	EIG	F	33	14	TCG, A	+	

ID: identificação do paciente, EMJ: epilepsia mioclônica juvenil, CTCGd: crises tônico-clônicas generalizadas ao despertar, EAJ: epilepsia ausência juvenil, EAI: epilepsia ausência da infância, EIG: epilepsia idiopática generalizada, M: masculino, F: feminino, +: presença, -: ausência, NI: não informado; Mi: mioclonias; TCG: tônico-clônicas generalizadas; A: ausência. As alterações em parênteses representam polimorfismos e as em negrito são potencialmente deletérias

APÊNDICE 4

Predição de potencial deletério das mutações descritas em *SCN1A* em pacientes com síndrome de Dravet

Alteração nucleotídica	Alteração protéica	Região protéica	Predição de potencial deletério			
			Polyphen2	SNAP	SIFT	SNP&GO
c.1A>T	M1L	N-terminal	Possivelmente Deletéria	Neutra	Deletéria	Deletéria
c.2T>C	M1T	N-terminal	Possivelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.80G>C	R27T	N-terminal	Benigna	Não neutra	Tolerada	Deletéria
c.173G>T	G58V	N-terminal	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.181C>T	L61F	N-terminal	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.187T>C	F63L	N-terminal	Provavelmente Deletéria	Neutra	Tolerada	Deletéria
c.234G>T	E78D	N-terminal	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.235G>C	D79H	N-terminal	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.235G>A	D79N	N-terminal	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.251A>G	Y84C	N-terminal	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.269T>C	F90S	N-terminal	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.272T>C	I91T	N-terminal	Provavelmente Deletéria	Neutra	Deletéria	Deletéria
c.292G>C	A98P	N-terminal	Provavelmente Deletéria	Neutra	Tolerada	Deletéria
c.301C>T	R101W	N-terminal	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.302G>A	R101Q	N-terminal	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.307A>G	S103G	N-terminal	Possivelmente Deletéria	Neutra	Deletéria	Deletéria
c.311C>T	A104V	N-terminal	Provavelmente Deletéria	Neutra	Deletéria	Deletéria
c.323T>G	L108R	N-terminal	Benigna	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.335C>T	T112I	N-terminal	Provavelmente Deletéria	Neutra	Deletéria	Deletéria
c.354G>C	R118S	N-terminal	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.371T>A	I124N	DI/S1	Possivelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.379C>G	H127D	DI/S1	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.484A>C	T162P	DI/S2	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.488G>A	G163E	DI/S2	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.512T>G	I171R	DI/S2	Possivelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.523G>A	A175T	DI/S2	Provavelmente	Não neutra	Deletéria	Deletéria

			Deletéria			
c.524C>T	A175V	DI/S2	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.529G>A	G177R	DI/S2-S3	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.530G>A	G177E	DI/S2-S3	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.535T>C	C179R	DI/S2-S3	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.563A>T	D188V	DI/S2-S3	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.568T>C	W190R	DI/S3	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.571A>T	N191Y	DI/S3	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.573C>G	N191K	DI/S3	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.580G>A c.580G>C	DI94N	DI/S3	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.581A>G	DI94G	DI/S3	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.596C>G	T199R	DI/S3	Possivelmente Deletéria	Não neutra	Tolerada	Deletéria
c.604T>G	Y202D	DI/S3	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.635T>C	V212A	DI/S3-S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Tolerada	Deletéria
c.650C>A	T217K	DI/S4	Possivelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.652T>C	F218L	DI/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Tolerada	Deletéria
c.668C>A	A223E	DI/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.677C>A	T226K	DI/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.677C>G	T226R	DI/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.680T>G	I227S	DI/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.680T>C	I227T	DI/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.694G>A	G232S	DI/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.698T>G	L233R	DI/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.715G>A	A239T	DI/S4-S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.716C>T	A239V	DI/S4-S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.719T>C	L240P	DI/S4-S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.728C>A	S243Y	DI/S4-S5	Possivelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.730G>T	V244L	DI/S4-S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.755T>A	I252N	DI/S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria

c.777C>A	S259R	DI/S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.793G>T	G265W	DI/S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.829T>C	C277R	DI/S5-S6 (P1)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.829T>G	C277G	DI/S5-S6 (P1)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.838T>C	W280R	DI/S5-S6 (P1)	Benigna	Não neutra	Tolerada	Deletéria
c.840G>T	W280C	DI/S5-S6 (P1)	Possivelmente Deletéria	Não neutra	Tolerada	Deletéria
c.841C>T	P281S	DI/S5-S6 (P1)	Benigna	Neutra	Tolerada	Deletéria
c.841C>G	P281A	DI/S5-S6 (P1)	Benigna	Neutra	Tolerada	Deletéria
c.842C>T	P281L	DI/S5-S6 (P1)	Benigna	Não neutra	Tolerada	Deletéria
c.866A>T	E289V	DI/S5-S6 (P1)	Benigna	Não neutra	Tolerada	Neutra
c.890C>T	T297I	DI/S5-S6 (P1)	Possivelmente Deletéria	Não neutra	Tolerada	Neutra
c.965G>T	R322I	DI/S5-S6 (P1)	Benigna	Não neutra	Tolerada	Deletéria
c.974A>G	Y325C	DI/S5-S6 (P1)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Tolerada	Deletéria
c.1019C>T	S340F	DI/S5-S6 (P1)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1025C>T	A342V	DI/S5-S6 (P1)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1028G>A	G343D	DI/S5-S6 (P1)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1033T>C	C345R	DI/S5-S6 (P1)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1053T>G	C351W	DI/S5-S6 (P1)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1064G>A	G355D	DI/S5-S6 (P1)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1070A>T	N357I	DI/S5-S6 (P1)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1076A>G	N359S	DI/S5-S6 (P1)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1087A>C	T363P	DI/S5-S6 (P1)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1088C>G	T363R	DI/S5-S6 (P1)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1094T>C	F365S	DI/S5-S6 (P1)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1098T>A	D366E	DI/S5-S6 (P1)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1125G>T	L375F	DI/S5-S6 (P1)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1130G>T	R377L	DI/S5-S6 (P1)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1133T>A	L378Q	DI/S5-S6 (P1)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1136T>G	M379R	DI/S5-S6	Provavelmente	Não neutra	Deletéria	Deletéria

		(P1)	Deletéria			
c.1149C>G	F383L	DI/S5-S6 (P1)	Benigna	Não neutra	Tolerada	Deletéria
c.1150T>C	W384R	DI/S5-S6 (P1)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1154A>G	E385G	DI/S5-S6 (P1)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1177C>A	R393S	DI/S5-S6 (P1)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1177C>T	R393C	DI/S5-S6 (P1)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1178G>A	R393H	DI/S5-S6 (P1)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1187G>A	G396E	DI/S5-S6 (P1)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1198A>G	M400V	DI/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Tolerada	Deletéria
c.1207T>C	F403L	DI/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1207T>G	F403V	DI/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1208T>C	F403S	DI/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1216G>T	V406F	DI/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Tolerada	Deletéria
c.1226T>G	L409W	DI/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1237T>A	Y413N	DI/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1246A>T	N416Y	DI/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1247A>G	N416S	DI/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1264G>A	V422M	DI/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1276T>A	Y426N	DI-DII	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1277A>G	Y426C	DI-DII	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1547C>T	S525F	DI-DII	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.1811G>A*	R604H	DI-DII	Benigna	Neutra	Tolerada	Deletéria
c.1876A>G	S626G	DI-DII	Benigna	Não neutra	Tolerada	Deletéria
c.2021A>G	D674G	DI-DII	Benigna	Neutra	Tolerada	Deletéria
c.2078G>A	R693K	DI-DII	Benigna	Neutra	Tolerada	Neutra
c.2284A>G	N762D	DI-DII	Benigna	Neutra	Tolerada	Deletéria
c.2303C>T	P768L	DII/S1	Possivelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2348T>C	L783P	DII/S1	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2354T>C	M785T	DII/S1	Possivelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2362G>A	E788K	DII/S1-S2	Possivelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2378C>T	T793M	DII/S1-S2	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2435C>G	T812R	DII/S2	Possivelmente	Não neutra	Deletéria	Deletéria

			Deletéria			
c.2525T>G	L842R	DII/S3	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2527A>C c.2527A>C	S843R	DII/S3	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2536G>A	E846K	DII/S3	Possivelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2575C>T	R859C	DII/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2585G>A	R862Q	DII/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2595>	R865G	DII/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2624C>A	T875K	DII/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2626T>A	L876I	DII/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2644A>T	I882F	DII/S4-S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2669T>C	L890F	DII/S4-S5	Possivelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2686G>C	V896L	DII/S5	Possivelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2686G>A	V896I	DII/S5	Possivelmente Deletéria	Neutra	Tolerada	Deletéria
c.2705T>G	F902C	DII/S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2780G>T	C927F	DII/S5-S6 (P2)	Possivelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2791C>T	R931C	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2792G>A	R931H	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2796G>C	W932C	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2798A>C	H933P	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2802G>C	M934I	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2807A>T	D936V	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2815C>T	H939Y	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2816A>C	H939P	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2816A>G	H939R	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2817C>G	H939Q	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2819C>T	S940F	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2825T>C	L942P	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2828T>A	I943N	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2831T>A	V944E	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria

c.2833T>C c.2833T>A	F945L	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2836C>T	R946C	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2837G>A	R946H	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2846G>A	C949Y	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2846G>C	C949S	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2848G>C	G950R	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2849G>A	G950E	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2854T>G	W952G	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2854T>C	W952R	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2860G>A	E954K	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2867T>A	M956K	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2870G>T	W957L	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2875T>C	C959R	DII/S5-S6 (P2)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2878A>G	M960V	DII/S5-S6 (P2)	Possivelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2918T>A	M973K	DII/S6	Benigna	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2928G>A	M976I	DII/S6	Benigna	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2954A>T	N985I	DII/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2956C>T	L986F	DII/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2957T>C	L986P	DII/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2959T>C	F987L	DII/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2970G>T	L990F	DII/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.2993A>G	D998G	DII-DIII	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.3044C>T	A1015V	DII-DIII	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.3166A>G	N1056D	DII-DIII	Benigna	Neutra	Tolerada	Neutra
c.3202G>A	E1068K	DII-DIII	Benigna	Neutra	Tolerada	Deletéria
c.3620T>C	L1207P	DII-DIII	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.3629C>A	T1210K	DII-DIII	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Tolerada	Deletéria
c.3641T>G	I1214R	DIII/S1	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.3661G>A	E1221K	DIII/S1	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.3688C>T	L1230F	DIII/S1	Provavelmente Deletéria	Neutra	Deletéria	Deletéria
c.3692G>C	S1231T	DIII/S1	Provavelmente	Não neutra	Deletéria	Deletéria

			Deletéria			
c.3693T>A	S1231R	DIII/S1	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.3697G>C	G1233R	DIII/S1	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.3714A>C	E1238D	DIII/S1-S2	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.3715G>T	DI239Y	DIII/S1-S2	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.3716A>G	DI239G	DIII/S1-S2	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.3734G>A	R1245Q	DIII/S1-S2	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.3749C>T	T1250M	DIII/S1-S2	Benigna	Neutra	Tolerada	Deletéria
c.3764C>A	A1255D	DIII/S2	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.3776T>G	F1259C	DIII/S2	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.3778A>C	T1260P	DIII/S2	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.3789C>G	F1263L	DIII/S2	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.3794T>C	L1265P	DIII/S2	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.3797A>C	E1266A	DIII/S2	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.3824G>T	G1275V	DIII/S2	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.3851G>C	W1284S	DIII/S3	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.3860T>C	L1287P	DIII/S3	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.3862G>A	D1288N	DIII/S3	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.3924A>T*	E1308D	DIII/S3-S4	Benigna	Neutra	Tolerada	Deletéria
c.3946A>G	R1316G	DIII/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.3948G>T	R1316S	DIII/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.3976G>C	A1326P	DIII/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.3982T>C	S1328P	DIII/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4003G>A	V1335M	DIII/S4-S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4016C>T	A1339V	DIII/S4-S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4032T>G	I1344M	DIII/S4-S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4049T>G	V1350G	DIII/S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4072T>C	W1358R	DIII/S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4073G>C	W1358S	DIII/S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4093G>A	G1365S	DIII/S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria

c.4094G>A	G1365D	DIII/S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4101T>A	N1367K	DIII/S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4109C>T	A1370V	DIII/S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4126T>C	C1376R	DIII/S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4132A>C	N1378H	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4133A>C	N1378T	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4153T>G	F1385V	DIII/S5-S6 (P3)	Benigna	Neutra	Tolerada	Deletéria
c.4168G>A	V1390M	DIII/S5-S6 (P3)	Possivelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4172A>G	N1391S	DIII/S5-S6 (P3)	Benigna	Neutra	Tolerada	Deletéria
c.4181C>T	T1394I	DIII/S5-S6 (P3)	Benigna	Neutra	Deletéria	Deletéria
c.4186T>G	C1396G	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4187G>A	C1396Y	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4216G>A	A1406T	DIII/S5-S6 (P3)	Possivelmente Deletéria	Neutra	Tolerada	Deletéria
c.4228A>T	N1410Y	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4240A>T	N1414Y	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4247A>G	D1416G	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4250A>G	N1417S	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4253T>A	V1418E	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4265A>G	Y1422C	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4267C>T	L1423F	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4277T>G	L1426R	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4280A>C	Q1427P	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4291T>A	F1431I	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4294A>G	K1432E	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Neutra	Deletéria	Deletéria
c.4297G>A	G1433R	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4298G>A	G1433E	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4298G>T	G1433V	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4300T>C	W1434R	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4311A>G	I1437M	DIII/S5-S6	Provavelmente	Não neutra	Deletéria	Deletéria

		(P3)	Deletéria			
c.4321G>C	A1441P	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4348C>A	Q1450K	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4349A>G	Q1450R	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4349A>C	Q1450P	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4352C>T	P1451L	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4351C>T	P1451S	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4360G>A	E1454K	DIII/S5-S6 (P3)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4381C>A	L1461I	DIII/S6	Possivelmente Deletéria	Neutra	Tolerada	Deletéria
c.4384T>C	Y1462H	DIII/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4385A>G	Y1462C	DIII/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4388T>C	F1463S	DIII/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4408G>T	G1470W	DIII/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4424T>C	L1475S	DIII/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4451A>G	DI484G	DIII-DIV	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4453A>T	N1485Y	DIII-DIV	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4490A>G	D1497G	DIII-DIV	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4508A>G	E1503G	DIII-DIV	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
?	L1514S	DIII-DIV	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4568T>C	I1523T	DIII-DIV	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4612G>A	V1538I	DIV/S1	Benigna	Neutra	Tolerada	Deletéria
c.4615C>A	T1539P	DIV/S1	Possivelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4631A>C	DI544A	DIV/S1	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4631A>G	DI544G	DIV/S1	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4633A>G	I1545V	DIV/S1	Benigna	Neutra	Tolerada	Deletéria
c.4634T>G	I1545R	DIV/S1	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4664T>G	M1555R	DIV/S1	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4681G>A	E1561K	DIV/S1-S2	Provavelmente Deletéria	Neutra	Deletéria	Deletéria
c.4723C>T*	R1575C	DIV/S2	Possivelmente Deletéria	Neutra	Tolerada	Deletéria
c.4736T>A	V1579E	DIV/S2	Possivelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria

c.4757G>A	G1586E	DIV/S2	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4762T>C	C1588R	DIV/S2	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4775T>C	L1592P	DIV/S2	Possivelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4786C>T	R1596C	DIV/S2-S3	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4787G>T	R1596L	DIV/S2-S3	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4822G>T	D1608Y	DIV/S3	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4823A>G	D1608G	DIV/S3	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4834G>A	V1612I	DIV/S3	Possivelmente Deletéria	Não neutra	Tolerada	Deletéria
c.4888G>A	V1630M	DIV/S3-S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4888G>C	V1630L	DIV/S3-S4	Benigna	Não neutra	Tolerada	Deletéria
c.4910T>A	V1637E	DIV/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4913T>C	I1638T	DIV/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4913T>A	I1638N	DIV/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4915C>G	R1639G	DIV/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4926G>C	R1642S	DIV/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4934G>A	R1645Q	DIV/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4942C>T	R1648C	DIV/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4943G>A	R1648H	DIV/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4970G>A	R1657H	DIV/S4	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4973C>G	T1658R	DIV/S4-S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4973C>T	T1658M	DIV/S4-S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4979T>C	L1660P	DIV/S4-S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4982T>C	F1661S	DIV/S4-S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.4991T>A	M1664K	DIV/S4-S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5000T>C	L1667P	DIV/S4-S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5002C>G	P1668A	DIV/S4-S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5015A>T	N1672I	DIV/S4-S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5018T>C	I1673T	DIV/S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5020G>C	G1674R	DIV/S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria

c.5024T>G	L1675R	DIV/S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5029C>T	L1677F	DIV/S5	Provavelmente Deletéria	Neutra	Deletéria	Deletéria
c.5048T>C	I1683T	DIV/S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5050T>G	Y1684D	DIV/S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5054C>A	A1685D	DIV/S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5062G>T	G1688W	DIV/S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5075T>C	F1692S	DIV/S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5081A>G	Y1694C	DIV/S5	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5119T>G	F1707V	DVI/S5-S6 (P4)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5138G>A	S1713N	DVI/S5-S6 (P4)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5141T>G	M1714R	DVI/S5-S6 (P4)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5141T>A	M1714K	DVI/S5-S6 (P4)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5162C>G	T1721R	DVI/S5-S6 (P4)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5173G>T	G1725C	DVI/S5-S6 (P4)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5176T>C	W1726R	DVI/S5-S6 (P4)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5180A>G	D1727G	DVI/S5-S6 (P4)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5221T>C	C1741R	DVI/S5-S6 (P4)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5246G>A	G1749E	DVI/S5-S6 (P4)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Tolerada	Deletéria
c.5260G>A	G1754R	DVI/S5-S6 (P4)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5266T>C	C1756R	DVI/S5-S6 (P4)	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5285G>A	G1762E	DIV/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5288T>A	I1763N	DIV/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5308A>T	I1770F	DIV/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5309T>A	I1770N	DIV/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5312T>A	I1771N	DIV/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5318C>T	S1773F	DIV/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5339T>C	M1780T	DIV/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5341T>C	Y1781H	DIV/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5342A>G	Y1781C	DIV/S6	Provavelmente	Não neutra	Deletéria	Deletéria

			Deletéria			
c.5345T>G	I1782S	DIV/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5346C>G	I1782M	DIV/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5347G>A	A1783T	DIV/S6	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5348C>T	A1783V	DIV/S6	Provavelmente Deletéria	Neutra	Deletéria	Deletéria
c.5359G>A	E1787K	C-terminal	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5364C>A	N1788K	C-terminal	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5374G>A	A1792T	C-terminal	Provavelmente Deletéria	Neutra	Deletéria	Deletéria
c.5422T>A	F1808I	C-terminal	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5434T>G	W1812G	C-terminal	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5435G>C	W1812S	C-terminal	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5474T>C	F1825S	C-terminal	Provavelmente Deletéria	Neutra	Deletéria	Deletéria
c.5492T>C	F1831S	C-terminal	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5494G>C	A1832P	C-terminal	Provavelmente Deletéria	Neutra	Deletéria	Deletéria
c.5503C>T	L1835F	C-terminal	Provavelmente Deletéria	Neutra	Deletéria	Deletéria
c.5555T>C	M1852T	C-terminal	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5555T>G	M1852R	C-terminal	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5555T>A	M1852K	C-terminal	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5564C>T	P1855L	C-terminal	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5627T>C	L1876P	C-terminal	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5639G>A	G1880E	C-terminal	Benigna	Neutra	Tolerada	Deletéria
c.5641G>A	E1881K	C-terminal	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5643G>C	E1881D	C-terminal	Benigna	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5657G>A	R1886Q	C-terminal	Possivelmente Deletéria	Neutra	Tolerada	Deletéria
c.5726C>T	T1909I	C-terminal	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5765T>C	I1922T	C-terminal	Provavelmente Deletéria	Não neutra	Deletéria	Deletéria
c.5782C>G*	R1928G	C-terminal	Benigna	Não neutra	Tolerada	Deletéria

*alterações consideradas polimorfismos de base única (SNPs)