

***MARINA COELHO GONSALES***

***ANÁLISE MOLECULAR E DE CORRELAÇÃO ENTRE  
GENÓTIPO E FENÓTIPO EM EPILEPSIAS IDIOPÁTICAS  
NA INFÂNCIA***

***Apoio FAPESP***

***CAMPINAS***

***2009***

**MARINA COELHO GONSALES**

***ANÁLISE MOLECULAR E DE CORRELAÇÃO ENTRE  
GENÓTIPO E FENÓTIPO EM EPILEPSIAS IDIOPÁTICAS  
NA INFÂNCIA***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia  
Médica, área de concentração em Neurociências.*

***Orientadora: Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes***

***Apoio FAPESP***

***CAMPINAS***

***Unicamp***

***2009***

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

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

G588a Gonsales, Marina Coelho  
Análise molecular e de correlação entre genótipo e fenótipo em epilepsias idiopáticas na infância / Marina Coelho Gonsales. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Iscia Lopes Cendes  
Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Epilepsia. 2. Triagem genética. 3. Mutação. I. Cendes, Iscia Lopes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Molecular and genotype-phenotype correlation analysis in childhood idiopathic epilepsies**

**Keywords:** • Epilepsy  
• Genetic screening  
• Mutation

**Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica**  
**Área de concentração: Neurociências**

**Banca examinadora:**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Iscia Lopes Cendes**  
**Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup>. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes**  
**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Luiza Giraldes de Manreza**

**Data da defesa: 18-08-2009**

---

## Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Marina Coelho Gonsales

---

---

Orientador: Prof. Dr. Iscia Teresinha Lopes Cendes

---

---

### Membros:

---

1. Prof. Dr. Maria Luiza Giraldes de Manreza



---

2. Prof. Dr. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes



---

3. Prof. Dr. Iscia Teresinha Lopes Cendes



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

---

Data: 18/08/2009

---

***DEDICATÓRIA***

*Aos meus pais,  
que sempre acreditaram  
em mim e me incentivaram.*

## *AGRADECIMENTOS*

---

Agradeço a todos que contribuíram para que esta dissertação fosse realizada:

Aos meus pais, Miriam e Rafael, e ao meu irmão Murilo, por todo amor e carinho.

Ao Alexandre, por estar sempre ao meu lado nas alegrias e nas dificuldades.

Aos amigos Flávia e Klaus, companheiros de todos os momentos.

À Dra. Iscia, por ter me aceitado como aluna e me dado a oportunidade de trabalhar com algo realmente fascinante, a genética humana.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Vera Lopes, Dra. Maria Luiza Manreza, Dr. Carlos Steiner e Dra. Vera Cristina Terra, pelas sugestões que enriqueceram este trabalho.

Aos pacientes e familiares que aceitaram participar do estudo.

À Dra Paula Preto, à Dra Marilisa Guerreiro, ao Dr Lineu Fonseca e à Dra Gloria Tedrus, pelo esforço clínico e obtenção dos pacientes.

Ao Fábio e à Danizinha, que me acolheram quando entrei no laboratório, e continuaram me apoiando até o final do mestrado.

À Marilza, que me ensinou muito e sempre me ajudou com as coletas de sangue.

À Romênia, grande amiga, que alegra o laboratório e está sempre disposta a ajudar.

Aos demais colegas do laboratório, com os quais convivi durante esses anos de trabalho e que contribuíram não apenas com apoio técnico e científico, mas também com amizade e momentos de descontração: Luciana, Renato, Cláudia, Milena, Rodrigo, Ilária, Simone, Aline, Madalena, Bibiana, Fernando, Nailu, Marcelo, Henrique, Valquiria, Camila, Mariana, Danyella, Patrícia, Vinícius, Fábio Conte, Rafael, Estela, Lidiane, Lilian, Daniela Furgeri, Lucila, Anderson, Marjory, Karina, André, Bernardo, Érika, Társis, Cyntia, Cíntia, Tatiany, Carol, Daniel, Tiago e Neide.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

E por fim, agradeço principalmente a Deus, que me guiou durante esse período.

	<b>PÁG.</b>
<b>RESUMO</b> .....	xv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1. EPILEPSIAS: ASPECTOS GERAIS.....	20
1.2. EPILEPSIAS IDIOPÁTICAS NA INFÂNCIA.....	20
1.2.1. EPILEPSIAS GENERALIZADAS COM CRISES FEBRIS.....	21
1.2.2. EPILEPSIA BENIGNA DA INFÂNCIA COM ESPÍCULAS CENTRO- TEMPORAIS.....	22
1.3. ASPECTOS GENÉTICOS DAS EPILEPSIAS.....	22
1.3.1. EPILEPSIAS GENERALIZADAS COM CRISES FEBRIS.....	23
1.3.2. EPILEPSIA BENIGNA DA INFÂNCIA COM ESPÍCULAS CENTRO- TEMPORAIS.....	26
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	28
<b>3. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
3.1. ASPECTOS ÉTICOS.....	31
3.2. CASUÍSTICA.....	31
3.3. MÉTODOS.....	31
3.3.1. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	31
3.3.2. DESENHO DE <i>PRIMERS</i> .....	32
3.3.3. AMPLIFICAÇÃO POR PCR.....	36
3.3.4. DETECÇÃO DE MUTAÇÕES.....	37
3.3.5. SEQUENCIAMENTO.....	38
3.3.6. ANÁLISES COMPUTACIONAIS.....	39
3.3.7. INVESTIGAÇÃO EM GRUPO CONTROLE.....	39
<b>4. RESULTADOS</b> .....	41
4.1. CASUÍSTICA.....	42
4.1.1. EPILEPSIAS GENERALIZADAS COM CRISES FEBRIS.....	42
4.1.2. EPILEPSIA BENIGNA DA INFÂNCIA COM ESPÍCULAS CENTRO- TEMPORAIS.....	45

4.2. ESTUDOS GENÉTICOS.....	46
4.2.1. GENE <i>SCN1A</i> .....	46
4.2.2. GENE <i>CHRNA7</i> .....	55
4.2.3. GENE <i>CHRM5</i> .....	58
4.2.4. GENE <i>CX36</i> .....	58
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
5.1. EPILEPSIAS GENERALIZADAS COM CRISES FEBRIS.....	61
5.1.1. GENE <i>SCN1A</i> .....	61
5.2. EPILEPSIA BENIGNA DA INFÂNCIA COM ESPÍCULAS CENTRO- TEMPORAIS.....	67
5.2.1. GENE <i>CHRNA7</i> .....	67
5.2.2. GENE <i>CHRM5</i> .....	69
5.2.3. GENE <i>CX36</i> .....	70
5.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>72</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>84</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<i>CACNA1A</i>	gene do canal de cálcio voltagem-dependente tipo P/Q
<i>CACNA1H</i>	gene do canal de cálcio Ca <sub>v</sub> 3.2
<i>CACNB4</i>	gene subunidade beta 4 do canal de cálcio voltagem-dependente
<i>CHRM5</i>	gene subtipo 5 do receptor colinérgico muscarínico
<i>CHRNA2</i>	gene subunidade alfa 2 do receptor colinérgico nicotínico
<i>CHRNA4</i>	gene subunidade alfa 4 do receptor colinérgico nicotínico
<i>CHRNA7</i>	gene subunidade alfa 7 do receptor colinérgico nicotínico
<i>CHRNB2</i>	gene subunidade beta 2 do receptor colinérgico nicotínico
<i>CLCN2</i>	gene canal de cloro voltagem-dependente tipo 2
<i>CX36</i>	gene subtipo 36 da conexina
dATP	adenosina deoxinucleotídeo trifosfato
dGTP	guanina deoxinucleotídeo trifosfato
dCTP	citossina deoxinucleotídeo trifosfato
DHPLC	<i>denaturing high performance liquid chromatography</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
dTTP	timina deoxinucleotídeo trifosfato
EEG	eletroencefalograma
<i>EFHC1</i>	gene contendo um domínio EF-hand (C-terminal)
EGCF+	epilepsia generalizada com crises febris <i>plus</i>
EMA	epilepsia mioclônico-astática
EMGI	epilepsia mioclônica grave da infância
GABA <sub>A</sub>	ácido gama-aminobutírico subtipo A

<i>GABRA1</i>	gene subunidade alfa 1 do receptor de ácido gama-aminobutírico A
<i>GABRD</i>	gene subunidade delta do receptor de ácido gama-aminobutírico A
<i>GABRG2</i>	gene subunidade gama 2 do receptor de ácido gama-aminobutírico A
<i>HCN1</i>	gene canal ativado por hiperpolarização dependente de nucleotídeos cíclicos tipo 1
<i>HCN2</i>	gene canal ativado por hiperpolarização dependente de nucleotídeos cíclicos tipo 2
HLA	principal complexo de histocompatibilidade
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
<i>KCNQ2</i>	gene do canal de potássio voltagem-dependente Kv7.2
<i>KCNQ3</i>	gene do canal de potássio voltagem-dependente Kv7.3
<i>LGII</i>	gene <i>leucine rich, glioma inactivated 1</i>
<i>SCN1A</i>	gene subunidade alfa 1 do canal de sódio voltagem-dependente
<i>SCN2A</i>	gene subunidade alfa 2 do canal de sódio voltagem-dependente
<i>SCN1B</i>	gene subunidade beta 1 do canal de sódio voltagem-dependente
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
pb	pares de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Ta	temperatura de anelamento

	<b>PÁG.</b>
<b>Tabela 1 -</b> Ordem cronológica da descoberta dos principais genes para epilepsias idiopáticas.....	24
<b>Tabela 2 -</b> Sequências dos <i>primers</i> , temperaturas de anelamento (Ta) e temperaturas de análise dos éxons do gene <i>SCN1A</i> por DHPLC.....	33
<b>Tabela 3 -</b> Sequências dos <i>primers</i> , temperaturas de anelamento (Ta) e temperaturas de análise dos éxons do gene <i>CHRNA7</i> por DHPLC.....	35
<b>Tabela 4 -</b> Sequências dos <i>primers</i> , temperaturas de anelamento (Ta) e temperaturas de análise dos éxons do gene <i>CHRM5</i> por DHPLC.....	35
<b>Tabela 5 -</b> Sequências dos <i>primers</i> , temperaturas de anelamento (Ta) e temperaturas de análise dos éxons do gene <i>CX36</i> por DHPLC.....	36
<b>Tabela 6 -</b> Alterações encontradas nas sequências nucleotídicas do gene <i>SCN1A</i> ..	46
<b>Tabela 7 -</b> Resultados das análises de predição do efeito da alteração C277R na proteína.....	48
<b>Tabela 8 -</b> Resultados das análises de predição do efeito da alteração H324P.....	50
<b>Tabela 9 -</b> Resultados das análises de predição do efeito da alteração W1812R.....	54
<b>Tabela 10 -</b> Alterações encontradas nas sequências nucleotídicas do gene <i>CHRNA7</i> .....	55
<b>Tabela 11 -</b> Alterações encontradas nas sequências nucleotídicas do gene <i>CX36</i> .....	58

	<b>PÁG.</b>
<b>Figura 1</b> - Representação esquemática do gene <i>SCN1A</i> .....	25
<b>Figura 2</b> - Representação esquemática do gene <i>CHRNA7</i> .....	27
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática do gene <i>CHRM5</i> .....	27
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática do gene <i>CX36</i> .....	27
<b>Figura 5</b> - Representação gráfica do princípio da técnica de DHPLC.....	38
<b>Figura 6</b> - Perfis cromatográficos do éxon 2 do gene <i>SCN1A</i> e alterações detectadas por sequenciamento automático.....	47
<b>Figura 7</b> - Perfil cromatográfico alterado do éxon 4 do gene <i>SCN1A</i> e alterações detectadas por sequenciamento automático.....	47
<b>Figura 8</b> - Perfis cromatográficos do éxon 5 do gene <i>SCN1A</i> e alteração detectada por sequenciamento automático. (A) Perfil normal; (B) perfil alterado.....	48
<b>Figura 9</b> - Perfis cromatográficos do éxon 6 do gene <i>SCN1A</i> e alteração detectada por sequenciamento automático. (A) Perfil normal; (B) perfil alterado.....	48
<b>Figura 10</b> - Gel de acrilamida com produto da digestão do éxon 6 do gene <i>SCN1A</i> pela enzima <i>TaiI</i> . (M) Marcador de peso molecular 100pb; (1) Indivíduo heterozigoto T/C; (2) Indivíduo homozigoto T/T.....	49
<b>Figura 11</b> - Perfis cromatográficos do éxon 7 do gene <i>SCN1A</i> e alterações detectadas por sequenciamento automático.....	50
<b>Figura 12</b> - Perfis cromatográficos do éxon 8 do gene <i>SCN1A</i> e alterações detectadas por sequenciamento automático.....	51
<b>Figura 13</b> - Perfis cromatográficos do éxon 9 do gene <i>SCN1A</i> e alterações detectadas por sequenciamento automático. (A) Perfil normal; (B) perfil alterado.....	51
<b>Figura 14</b> - Alterações detectadas por sequenciamento automático no íntron 11 do gene <i>SCN1A</i> .....	52

<b>Figura 15</b> - Perfis cromatográficos do éxon 13 do gene <i>SCN1A</i> e alterações detectadas por sequenciamento automático. (A) Perfil normal; (B) perfil alterado.....	52
<b>Figura 16</b> - Alterações detectadas por sequenciamento automático no íntron 15 do gene <i>SCN1A</i> .....	53
<b>Figura 17</b> - Perfil cromatográfico alterado e alteração detectada por sequenciamento automático no éxon 19 do gene <i>SCN1A</i> .....	53
<b>Figura 18</b> - Perfis cromatográficos do éxon 26b do gene <i>SCN1A</i> e alterações detectadas por sequenciamento automático.....	53
<b>Figura 19</b> - Gel de acrilamida com produto da digestão do éxon 26 do gene <i>SCN1A</i> com a enzima Hpy188III. (M) Marcador de peso molecular 100pb; (1) Indivíduo heterozigoto T/C; (2) Indivíduo homozigoto T/T.	54
<b>Figura 20</b> - Perfil cromatográfico alterado do éxon 3 do gene <i>CHRNA7</i> e alteração detectada por sequenciamento automático.....	55
<b>Figura 21</b> - Perfis cromatográficos éxon 6 do gene <i>CHRNA7</i> e alterações detectadas por sequenciamento automático.....	56
<b>Figura 22</b> - Alterações detectadas por sequenciamento automático no éxon 7 do gene <i>CHRNA7</i> .....	56
<b>Figura 23</b> - Perfil cromatográfico normal (A) e alterado (B) do éxon 8 do gene <i>CHRNA7</i> e alterações detectadas por sequenciamento automático.....	57
<b>Figura 24</b> - Perfil cromatográfico normal (A) e alterado (B) do éxon 9 do gene <i>CHRNA7</i> e alterações detectadas por sequenciamento automático.....	57
<b>Figura 25</b> - Perfil cromatográfico normal (A) e alterado (B) do fragmento 2a do gene <i>CX36</i> e alterações detectadas por sequenciamento automático.....	59
<b>Figura 26</b> - Perfil cromatográfico normal (A) e alterado (B) do fragmento 2b do gene <i>CX36</i> e alteração detectada por sequenciamento automático.....	59

<b>Figura 27</b> - Estrutura dos resíduos de aminoácido cisteína e arginina.....	62
<b>Figura 28</b> - Estrutura dos resíduos de aminoácido histidina e prolina.....	62
<b>Figura 29</b> - Estrutura dos resíduos de aminoácido histidina e prolina.....	63
<b>Figura 30</b> - Provável localização das alterações encontradas na subunidade $\alpha$ -I do canal de sódio.....	64
<b>Figura 31</b> - Nucleotídeos conservados nos sítios doador e receptor de <i>splicing</i> .....	64

***RESUMO***

Dentre as epilepsias infantis, destacam-se a epilepsia mioclônica grave da infância (EMGI) e a epilepsia mioclônico-astática (EMA), as quais constituem os fenótipos mais graves do espectro da epilepsia generalizada com crises febris *plus* (EGCF+). Outra síndrome epiléptica importante é a epilepsia benigna da infância com espículas centro-temporais (EBIECT), que se destaca por ser a mais comum na infância. Avanços nos estudos de genética molecular levaram à descoberta de um gene responsável pelo espectro de fenótipos da EGCF+, o gene *SCN1A*, e um *locus* candidato para EBIECT na região 15q14.

Os objetivos deste projeto foram realizar triagem de mutações em genes candidatos em pacientes com as epilepsias mencionadas e estabelecer possíveis correlações genótipo-fenótipo. Os genes estudados foram o *SCN1A* para EMGI e EMA e os genes *CHRM5*, *CHRNA7* e *CX36*, localizados na região cromossômica 15q14, para EBIECT.

A triagem de mutações foi realizada por meio da técnica de *Denaturing High Performance Liquid Chromatography* (DHPLC) e posterior sequenciamento automático dos fragmentos alterados. Foram estudados nove pacientes com EMGI, 12 com EMA e 27 com EBIECT.

A análise de mutações no gene *SCN1A* revelou seis alterações potencialmente deletérias: as substituições c.829T>C, c.971A>C e c.5434T>C, que resultam em troca de resíduo de aminoácidos na proteína codificada, a inserção c.3719\_3720insGATA, que promove alteração na matriz de leitura, e as alterações IVS4+1G>A e IVS8+3G>T, que se localizam em possíveis sítios doadores de *splicing*. As alterações foram encontradas apenas em pacientes com o fenótipo mais grave, a EMGI, nos quais ocorreram crises em vigência de febre baixa. A análise de mutações nos pacientes com EBIECT não revelou alterações potencialmente deletérias nos genes estudados.

Com base nos resultados deste trabalho, podemos concluir que pelo fato de variantes potencialmente deletérias terem sido encontradas no gene *SCN1A* apenas em pacientes com EMGI, isso levanta a hipótese de que outro gene esteja envolvido na etiologia de EMA nos demais pacientes. O gene *CHRM5* não parece estar envolvido com a etiologia de EBIECT em nossa amostra de pacientes. Também não foram encontradas alterações potencialmente deletérias nos genes *CHRNA7* e *CX36*, mas os mesmos ainda não podem ser totalmente excluídos como envolvidos em EBIECT.

***ABSTRACT***

Among the childhood epilepsies one important sub-group is the spectrum of generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+), which includes severe syndromes such as severe myoclonic epilepsy of infancy (SMEI) and myoclonic astatic epilepsy (MAE). Another important epileptic syndrome is benign childhood epilepsy with centrotemporal spikes (BCECTS), which is of particular interest for being the most common childhood epilepsy. Advances in molecular genetic studies led to the discovery of the *SCN1A* gene, responsible for the spectrum of GEFS+, and a candidate locus for BCECTS in the 15q14 region.

The main objectives of this project were to screen candidate genes for mutations in a cohort of patients diagnosed with the epilepsies mentioned above, and to establish genotype-phenotype correlations. We studied the *SCN1A* gene in patients with SMEI and MAE; and *CHRM5*, *CHRNA7*, and *CX36* genes, located within the candidate region on chromosome 15q14, in patients with BCECTS.

Mutation screening was performed using the denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) technique, with subsequent automatic sequencing of the altered fragments. We investigated 9 patients with SMEI, 12 with MAE and 27 with BCECTS.

Analysis of the *SCN1A* gene revealed 6 potentially deleterious variants: substitutions c.829T>C, c.971A>C and c.5434T>C, leading to amino acid residue substitutions; insertion c.3719\_3720insGATA, which promotes a frameshift; and alterations IVS4+1G>A and IVS8+3G>T, which possibly modify splicing donor sites. We found alterations only in patients with the most severe phenotype, SMEI, who had seizures during low temperature fever occur. Mutation analysis in patients diagnosed with BCECTS did not reveal potentially deleterious variants for the genes studied.

As a result of our study, we can conclude that we only found potentially deleterious variants in the *SCN1A* gene among the patients studied. The fact that they were identified only in patients with SMEI provides evidence that another gene is likely to be involved in the etiology of MAE. The *CHRM5* gene does not seem to be involved in the etiology of BCECTS in our patients. Even though no evidences supporting the pathologic role of *CHRNA7* and *CX36* genes were found, we still can not exclude them as involved in BCECTS.

## ***1 - INTRODUÇÃO***

## **1.1. EPILEPSIAS: ASPECTOS GERAIS**

As epilepsias constituem um grupo de doenças que possuem como característica comum crises epilépticas recorrentes na ausência de condições tóxico-metabólicas ou febris<sup>1</sup>. Tais crises são eventos clínicos transitórios causados por descargas elétricas anormais e excessivas das células nervosas, como resultado da movimentação iônica anormal através da membrana celular<sup>1,2</sup>. Como grupo, a epilepsia é uma das condições neurológicas mais frequentes na população, acometendo cerca de 50 milhões de pessoas no mundo<sup>3</sup>, o que a caracteriza como um problema de saúde pública mundial.

Segundo a classificação internacional proposta pela ILAE (*International League Against Epilepsy*)<sup>4,5</sup>, as crises epilépticas podem ser consideradas generalizadas, quando a descarga epiléptica envolve todo o córtex cerebral, ou parciais, quando a ativação neuronal inicia-se em uma região cortical restrita. Tanto as epilepsias generalizadas quanto as parciais são divididas em categorias de acordo com sua provável etiologia, sendo que as epilepsias idiopáticas, aquelas sem presumível lesão estrutural do sistema nervoso, são as que apresentam maior predisposição genética<sup>1,6</sup>.

## **1.2. EPILEPSIAS IDIOPÁTICAS NA INFÂNCIA**

As epilepsias infantis requerem atenção especial e pleno entendimento em sua avaliação, pois seu diagnóstico pode ter grande influência na vida da criança afetada e de seus familiares<sup>7</sup>. As consequências psicológicas e cognitivas da epilepsia podem ter um impacto importante sobre o ajuste acadêmico e social da criança<sup>8</sup>, e seus efeitos psicossociais na infância podem estender-se à idade adulta.

Os distúrbios epilépticos da infância apresentam uma ampla diversidade de expressão clínica e de prognóstico, incluindo desde manifestações benignas, com prognóstico favorável para as crises, até as mais graves, nas quais ocorre deterioração das funções cognitivas e motoras<sup>9</sup>. O pior prognóstico para o desenvolvimento cognitivo em encefalopatias relacionadas à idade pode ser resultado de um possível impacto do início precoce das crises no desenvolvimento neurológico, devido à inibição da atividade mitótica, comprometimento da mielinização e redução do número de células<sup>10</sup>.

Dentre as epilepsias infantis, destacam-se as do espectro de **epilepsias generalizadas com crises febris**, que apresenta relevância clínica por abranger fenótipos graves, e a **epilepsia benigna da infância com espículas centro-temporais**, que é a síndrome epiléptica mais comum na infância.

### 1.2.1. EPILEPSIAS GENERALIZADAS COM CRISES FEBRIS

O termo epilepsia generalizada com crises febris *plus* (EGCF+) foi utilizado pela primeira vez por Scheffer e Berkovic<sup>11</sup> para designar uma síndrome epiléptica caracterizada por crises febris que persistem além dos seis anos de idade e por crises afebris variáveis, incluindo crises tônico-clônicas generalizadas, mioclônicas e de ausência. Os autores que descreveram essa síndrome constataram que a mesma abrange um vasto espectro de fenótipos, incluindo desde manifestações brandas, como as crises febris simples, até expressões clínicas mais graves, como a epilepsia mioclônico-astática<sup>11</sup>.

A **epilepsia mioclônico-astática** (EMA), também conhecida como síndrome de Doose, foi descrita em 1970<sup>12</sup> e representa aproximadamente 1 a 2% de todas as epilepsias infantis<sup>13</sup>. O início das crises se dá durante os cinco primeiros anos de vida, geralmente entre 18 e 60 meses de idade, em crianças normais<sup>14</sup>. As crises são variáveis, com predominância das mioclônicas e mioclônico-astáticas, podendo ser também tônicas, tônico-clônicas e de ausência<sup>14,15</sup>. Crises febris também foram relatadas precedendo crises afebris em 11 a 28% das crianças, e costumam ser simples<sup>14,15</sup>. O prognóstico é bastante variável, sendo que a maioria dos pacientes apresenta déficits cognitivos e atraso no desenvolvimento, mas em alguns casos pode ocorrer remissão das crises<sup>12,14</sup>.

Em 2001, Singh e colaboradores<sup>16</sup> sugeriram que a **epilepsia mioclônica grave da infância** (EMGI) também poderia ser incluída nesse espectro, representando seu fenótipo mais grave. Essa síndrome foi descrita por Dravet em 1978<sup>17</sup> e sua incidência estimada é de pelo menos uma em cada 40.000 crianças com menos de sete anos<sup>18</sup>. Seu início se dá no primeiro ano de vida, quando ocorrem crises tônicas, clônicas e tônico-clônicas induzidas por febre. Nos anos seguintes, entre as idades de 1 a 4 anos, seguem-se também crises mioclônicas e de ausência. O desenvolvimento neurológico é normal antes do início das

crises, mas pacientes apresentam atraso e ataxia por volta do segundo ano de idade<sup>4,19</sup>, além de alta resistência ao tratamento com medicamentos anti-epilépticos.

### **1.2.2. EPILEPSIA BENIGNA DA INFÂNCIA COM ESPÍCULAS CENTRO-TEMPORAIS**

A **epilepsia benigna da infância com espículas centro-temporais** (EBIECT, ou epilepsia benigna rolândica) foi descrita em 1958<sup>20</sup> e é o principal distúrbio dentre as epilepsias parciais idiopáticas da infância<sup>21</sup>, perfazendo aproximadamente 15% de todas as síndromes epiléticas infantis. O diagnóstico é feito com base em manifestações características das crises epiléticas, que são predominantemente parciais, podendo ser secundariamente generalizadas, e com espículas localizadas na região centro-temporal nos eletroencefalogramas (EEG) típicos<sup>22</sup>.

Essa síndrome acomete crianças neurologicamente normais, com idade entre três e 13 anos<sup>23</sup>. As crises são parciais motoras simples, envolvendo a face, podem apresentar generalização secundária e ocorrem predominantemente durante o sono<sup>24</sup>. O EEG mostra espículas de alta voltagem, centro-temporais, unilaterais ou bilaterais, geralmente seguidos por uma onda lenta, muito ativa durante o sono, com atividade de fundo normal<sup>25</sup>.

O prefixo “benigna” refere-se ao excelente prognóstico dos pacientes em relação às crises epiléticas, as quais, juntamente com as alterações do EEG, costumam cessar na puberdade<sup>26</sup>. Entretanto, muitos estudos durante a última década mostraram déficits cognitivos em crianças afetadas, de forma que o prognóstico favorável tem sido questionado<sup>27-29</sup>. Também existia um consenso de que a EBIECT não está relacionada a alterações estruturais, mas essa visão vem sendo refutada por pesquisadores que relatam casos de lesões cerebrais identificadas à imagem de alta resolução<sup>30,31</sup>.

### **1.3. ASPECTOS GENÉTICOS DAS EPILEPSIAS**

A existência de fatores genéticos contribuindo para a etiologia das epilepsias tem sido especulada desde longa data, porém as primeiras evidências científicas para uma predisposição genética foram apresentadas nas décadas de 50 e 60<sup>32,33,34</sup>. Nesses estudos, foi demonstrado que o risco de se desenvolver epilepsia era 1,5 a cinco vezes maior nos

indivíduos com antecedentes familiares da doença do que na população geral.

Com o avanço das técnicas de biologia molecular e genética, tornou-se possível o mapeamento e a identificação de genes implicados nas epilepsias idiopáticas. Várias mutações têm sido descritas em diferentes formas de epilepsia (Tabela 1), sendo a maioria localizada em genes que codificam subunidades de canais iônicos<sup>35</sup>.

As estratégias mais utilizadas para a identificação de genes responsáveis por doenças são a clonagem posicional e o teste dos genes candidatos<sup>1</sup>. A primeira visa o mapeamento genético quando não se tem informação suficiente acerca dos mecanismos fisiopatológicos da síndrome estudada, enquanto a segunda requer um conhecimento prévio sobre a doença. Ambas as estratégias podem ser utilizadas em conjunto, de forma que, após identificar o *locus* de predisposição à doença por meio da clonagem posicional, são selecionados para análise os genes localizados na região candidata que possuem função correlacionada a sua patogenia.

### 1.3.1. EPILEPSIAS GENERALIZADAS COM CRISES FEBRIS

Os estudos das bases genéticas da EGCF+ revelaram um padrão de herança autossômico dominante em algumas famílias e complexo em outras<sup>11,36</sup>, além da existência de heterogeneidade genética. O primeiro gene identificado para esse tipo de epilepsia foi o *SCN1B*<sup>31</sup>, que codifica a subunidade  $\beta_1$  de um canal de sódio voltagem-dependente. Posteriormente, um segundo *locus* foi mapeado no cromossomo 2<sup>37,38</sup> e mutações no gene da subunidade  $\alpha_1$  do canal de sódio neuronal (*SCN1A*) foram descritas<sup>39-43</sup>. Outro gene que também codifica para uma subunidade de um canal de sódio foi descrito para essa síndrome, o *SCN2A*<sup>38</sup>, porém estudos subsequentes não confirmaram essa descoberta<sup>44</sup>. Também foram identificadas mutações em genes que codificam receptores GABA<sub>A</sub> (*GABRG2*<sup>45-47</sup> e *GABRD*<sup>48</sup>) em outras famílias estudadas.

Dentre os cinco genes identificados até o momento, o mais amplamente descrito é o *SCN1A*, cujas mutações foram observadas em aproximadamente 5 a 10% das famílias com EGCF+ previamente relatadas<sup>49</sup>. Esse gene destaca-se por ser o mais relevante clinicamente, já que suas mutações têm sido associadas também aos fenótipos mais graves do espectro das epilepsias generalizadas: a EMA e a EMGI.

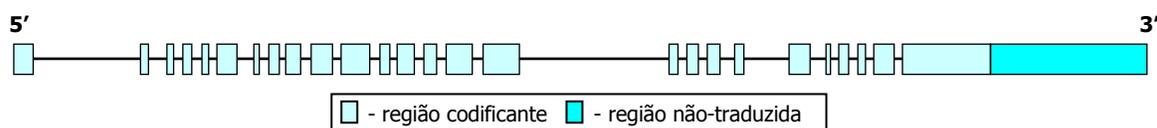
**Tabela 1-** Descoberta dos principais genes para epilepsias idiopáticas, em ordem cronológica.

Gene	Proteína codificada	Síndrome	Ano
<i>CHRNA4</i>	Receptor nicotínico	Epilepsia do lobo frontal autossômica dominante noturna	1995 <sup>50</sup>
<i>KCNQ2</i>	Canal de potássio	Convulsão neonatal benigna familiar	1998 <sup>51</sup>
<i>KCNQ3</i>	Canal de potássio	Convulsão neonatal benigna familiar	1998 <sup>52</sup>
<i>SCN1B</i>	Canal de sódio	Epilepsia generalizada com crises febris <i>plus</i>	1998 <sup>53</sup>
<i>SCN1A</i>	Canal de sódio	Epilepsia generalizada com crises febris <i>plus</i> / Epilepsia mioclônica grave da infância	2000 <sup>39</sup> / 2001 <sup>54</sup>
<i>CHRNA2</i>	Receptor nicotínico	Epilepsia do lobo frontal autossômica dominante noturna	2000 <sup>55</sup>
<i>CACNB4</i>	Canal de cálcio	Epilepsias generalizadas idiopáticas	2000 <sup>56</sup>
<i>GABRG2</i>	Receptor GABA <sub>A</sub>	Epilepsia ausência da infância/Crisis febris/ Epilepsia generalizada com crises febris <i>plus</i>	2001 <sup>45</sup> / 2001 <sup>46</sup>
<i>SCN2A</i>	Canal de sódio	Epilepsia generalizada com crises febris <i>plus</i> / Convulsão neonatal-infantil familiar benigna	2001 <sup>57</sup> / 2002 <sup>58</sup>
<i>CACNA1A</i>	Canal de cálcio	Epilepsias generalizadas idiopáticas/ Epilepsia ausência	2001 <sup>59</sup> / 2004 <sup>60</sup>
<i>GABRA1</i>	Receptor GABA <sub>A</sub>	Epilepsia mioclônica juvenil	2002 <sup>61</sup>
<i>LGII</i>	Proteína LGII	Epilepsia parcial autossômica dominante com sintomas auditivos	2002 <sup>62</sup>
<i>CACNA1H</i>	Canal de cálcio	Epilepsia ausência da infância/ Epilepsias generalizadas idiopáticas	2003 <sup>63</sup> / 2004 <sup>64</sup>
<i>CLCN2</i>	Canal de cloro	Epilepsias generalizadas idiopáticas	2003 <sup>65</sup>
<i>EFHC1</i>	Proteína EFHC1	Epilepsia mioclônica juvenil	2004 <sup>66</sup>
<i>GABRD</i>	Receptor GABA <sub>A</sub>	Epilepsias generalizadas idiopáticas/ Epilepsia generalizada com crises febris <i>plus</i>	2004 <sup>48</sup>
<i>CHRNA2</i>	Receptor nicotínico	Epilepsia do lobo frontal autossômica dominante noturna	2006 <sup>67</sup>
<i>HCN1 e 2</i>	Canais HCN	Epilepsias generalizadas idiopáticas	2008 <sup>68</sup>

Desde sua descrição inicial, a **EMA** é considerada uma epilepsia geneticamente determinada. Recentemente, a hipótese de uma etiologia genética para essa síndrome foi corroborada por estudos que relataram pacientes com essa condição em famílias afetadas por EGCF+ com mutações nos genes *SCN1A*, *SCN1B* e *GABRG2*. Entretanto, Nabbout e colaboradores<sup>69</sup> não encontraram mutações deletérias em pacientes esporádicos, o que os levou ao questionamento a respeito da base genética comum entre essa e as outras epilepsias do espectro.

Para a **EMGI**, também já se acreditava em uma predisposição genética, de acordo com a história familiar e observação de fenótipo concordante em gêmeos monozigóticos<sup>70,71</sup>. Em 2001, Claes e colaboradores<sup>54</sup> relataram pela primeira vez mutações no gene *SCN1A* em pacientes com essa epilepsia. A partir dessa descoberta, várias mutações nesse gene foram relatadas em estudos realizados em diversos países, tanto em pacientes esporádicos como em casos familiares, fortalecendo evidências de que *SCN1A* seja o principal gene relacionado a essa síndrome<sup>72-79</sup>. Foram observadas mutações em mais de 70% dos pacientes estudados, sendo a maioria delas *de novo*.

O gene *SCN1A* possui 26 éxons (Figura 1) e codifica a subunidade que forma o poro pelo qual os íons sódio atravessam a membrana celular dos neurônios<sup>80</sup>. Os canais de sódio estão entre os principais responsáveis pela geração de descarga durante as crises epiléticas.



**Figura 1-** Representação esquemática do gene *SCN1A*.

Apesar dos grandes avanços na elucidação das bases moleculares das epilepsias generalizadas com crises febris, permanecem ainda controversas várias questões a respeito do valor prognóstico das mutações encontradas no gene *SCN1A* e suas possíveis correlações com os diferentes subtipos clínicos. Enquanto alguns trabalhos relatam existir essa relação<sup>81,82</sup>, outros contradizem essa teoria<sup>83,84</sup>. Essa discussão não é meramente acadêmica e tem tido implicações importantes, inclusive na elaboração de recomendações internacionais para o diagnóstico molecular das síndromes epiléticas.

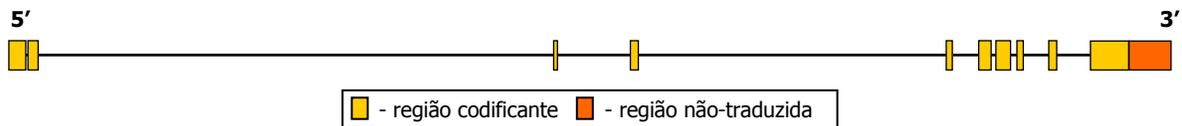
### 1.3.2. EPILEPSIA BENIGNA DA INFÂNCIA COM ESPÍCULAS CENTRO-TEMPORAIS

A existência de um padrão de herança autossômico dominante em famílias de pacientes com **EBIECT** foi relatada inicialmente em 1964 por Bray e Wiser<sup>85</sup>. Posteriormente, outro trabalho relatou resultados semelhantes e seus autores concluíram que um gene autossômico dominante com penetrância dependente de idade era responsável pelas alterações no EEG<sup>86</sup>. Em 1989, Doose e Baier<sup>87</sup> propuseram uma herança multifatorial para as características do EEG.

Estudos de ligação genética realizados na década de 90 excluíram alguns *loci* candidatos para EBIECT e para as espículas centro-temporais, como a região HLA do cromossomo 6p<sup>88</sup>, a região do X frágil<sup>89</sup> e o gene *CHRNA4*<sup>90</sup>. A primeira evidência positiva de ligação foi encontrada na região cromossômica 15q14<sup>91</sup>. Uma análise posterior de mutações em um dos genes presentes nessa região, o *SLC12A6 (KCC3)*, não revelou evidências que o mesmo esteja associado com a doença<sup>92</sup>.

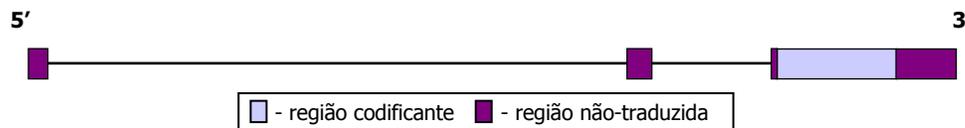
A descoberta de mutações em subunidades de receptores colinérgicos nicotínicos<sup>93</sup> e em canais iônicos para diferentes formas de epilepsia fornece pistas para as possíveis causas de outras epilepsias idiopáticas, como a EBIECT, e servem de embasamento para a procura de novos genes candidatos. Na região cromossômica 15q14, alguns genes se enquadram nos requisitos para gene candidato à doença, por serem componentes moleculares da sinalização neuronal. São eles: *CHRNA7*, *CHRM5* e *CX36*.

O gene *CHRNA7* codifica a subunidade  $\alpha$ -7 do receptor colinérgico nicotínico e é constituído por 10 éxons (Figura 2). Os receptores nicotínicos são canais iônicos ligante-dependentes cujas formas neuronais realizam a mediação de sinapses químicas através da passagem de correntes iônicas pelas células<sup>93</sup>. A proteína codificada pelo gene *CHRNA7* forma um canal altamente permeável a íons de cálcio que se abre quando a acetilcolina se liga ao receptor.



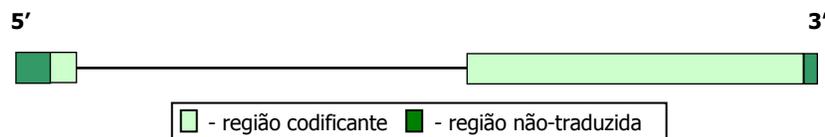
**Figura 2-** Representação esquemática do gene *CHRNA7*.

O gene *CHRM5* codifica um subtipo do receptor colinérgico muscarínico e possui um único éxon codificante (Figura 3). Os receptores muscarínicos são do tipo metabotrópicos, ou seja, seus efeitos sobre o neurônio pós-sináptico são produzidos indiretamente por meio da proteína G ou de ação enzimática intracelular efetuada pelo próprio receptor<sup>80</sup>. Receptores muscarínicos influenciam muitos efeitos da acetilcolina nos sistemas nervoso central e periférico.



**Figura 3-** Representação esquemática do gene *CHRM5*.

O gene *CX36* tem dois éxons (Figura 4) e é membro da família de genes que codificam as conexinas<sup>1</sup>. As conexinas são subunidades protéicas que se acoplam em grupos de seis para formarem os conexons, canais que permitem a passagem de íons de uma célula para o interior de outra através das junções comunicantes (*gap junctions*)<sup>80,94</sup>. Evidências mostram que tais junções permitem o compartilhamento de sinais elétricos e químicos entre células vizinhas durante o desenvolvimento neural, e isso pode auxiliar na coordenação do crescimento e da maturação<sup>94</sup>. O gene *CX36* é muito expresso em neurônios e já foi descrito como estando associado à epilepsia mioclônica juvenil<sup>95,96</sup>.



**Figura 4-** Representação esquemática do gene *CX36*.

Mesmo com os esforços por parte da comunidade científica para elucidar as bases genéticas da EBIECT, seu gene responsável ainda está por ser determinado<sup>91,92,97</sup>. Para conhecer melhor os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela atividade epiléptica, é essencial localizar e caracterizar os genes envolvidos nessa síndrome.

## ***2 - OBJETIVOS***

Os objetivos do projeto foram:

- Utilizando as técnicas de DHPLC e sequenciamento automático, investigar a presença de mutações nos genes candidatos:
  - *SCN1A*, em uma amostra de pacientes com epilepsia mioclônica grave da infância e epilepsia mioclônico-astática;
  - *CHRNA7*, *CHRM5* e *CX36*, em uma amostra de pacientes com epilepsia benigna da infância com espículas centro-temporais.
- Estabelecer possíveis correlações genótipo-fenótipo entre as mutações identificadas e o quadro clínico dos pacientes.

***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, protocolo 032/2006 (Anexo 1). Todos os pacientes e familiares que concordaram em participar da pesquisa assinaram um formulário de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2).

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 em que o indivíduo entrou no estudo. As informações geradas durante esse projeto que possam ter implicações na confirmação diagnóstica de indivíduos sintomáticos serão comunicadas aos profissionais responsáveis pelo acompanhamento dos pacientes.

### **3.2. CASUÍSTICA**

Foram incluídos no estudo 21 pacientes não aparentados com diagnóstico de epilepsia generalizada, sendo nove deles diagnosticados com **EMGI** e 12 com **EMA**. Esses pacientes foram recrutados nos ambulatórios do Departamento de Neurologia da UNICAMP, sob responsabilidade da Dra. Marilisa Guerreiro. O outro grupo estudado foi composto por 27 pacientes com **EBIECT** não aparentados, diagnosticados pelo Dr. Lineu Fonseca e pela Dra. Glória Tedrus, do grupo de Neurologia Infantil da PUC-Campinas.

Os diagnósticos foram realizados com base nos critérios de classificação internacional propostos pela ILAE<sup>4</sup> e por Dalla Bernardina<sup>21</sup>. Os pacientes estudados foram acompanhados clinicamente por vários anos e informações detalhadas sobre a apresentação clínica e eletroencefalográficas estão disponíveis e descritas na literatura<sup>98,99</sup>.

### **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, 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. DESENHO DE *PRIMERS*

Para a amplificação e sequenciamento dos éxons de interesse dos genes *SCN1A*, *CHRNA7*, *CHRM5* e *CX36*, foram construídos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que flanqueiam essas regiões. Esses *primers* foram desenhados com o auxílio dos programas *Gene Runner*® e *Primer 3*®, levando-se em conta determinadas regras como tamanho entre 18 e 25 nucleotídeos; ausência de complementaridade entre os *primers*, pois a dimerização diminui a habilidade do *primer* se anelar com o molde; porcentagem semelhante do conteúdo de G e C dos dois *primers* e, conseqüentemente, temperaturas de anelamento parecidas; além de tamanho do fragmento a ser amplificado de até 700 pares de bases. Para os casos em que os éxons são muito extensos, foram desenhados mais de um par de *primers*.

---

\* <http://frodo.wi.mit.edu/primer3>

A seleção das regiões estudadas foi baseada em critérios que levaram em conta características moleculares da região que facilitariam o uso das técnicas de DHPLC e sequenciamento. Sendo assim, os éxons 1 e 10 do gene *CHRNA7* foram excluídos do estudo por não cumprirem esses requisitos.

Foram utilizados ao total 44 pares de *primers*, sendo 28 para a amplificação do gene *SCN1A*, oito para o gene *CHRNA7*, cinco para o gene *CHRM5* e três para o gene *CX36*. As seqüências nucleotídicas dos *primers* estão apresentadas nas Tabelas 2, 3, 4 e 5.

**Tabela 2-** Sequências dos *primers*, temperaturas de anelamento (Ta) e temperaturas de análise dos éxons do gene *SCN1A* por DHPLC.

<i>Primers</i>	Seqüência (5'-3')	Ta	Temperaturas de análise (DHPLC)			
			1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>
SCN01F	ATCCTCTAGCTCATGTTTCATG	55°C	56,5°C	58,6°C	-	-
SCN01R	TAATTTGGCATGTGTTGGTG					
SCN02F	ATTGTGATTGTGCTGGTTTCTC	50°C	53,5°C	55,0°C	60,2°C	-
SCN02R	TGAGGCTAATATGACAAAGATGC					
SCN03F	AGAAGACTTGCCACAATGC	55°C	55,3°C	-	-	-
SCN03R	CATTGTCCTCTTGCTGCGTA					
SCN04F	CTGATGGAGTGATAAGAAATTGG	55°C	54,4°C	57,2°C	-	-
SCN04R	TCCACTTAGACCTTTGTTGTGC					
SCN05F	TCGGTAATCCAGGTAAGAAGTG	55°C	60,1°C	-	-	-
SCN05R	GAATGTCAAGCAGAGAAGGATG					
SCN06F	AGCGTTGCAAACATTCTTGG	55°C	53,8°C	57,0°C	58,8°C	-
SCN06R	GGATATCCAGCCCCTCAAGT					
SCN07F	CTGACCTTCCTGTTCTCATTG	55°C	56,3°C	-	-	-
SCN07R	AATTAGTTGGCTGTTATCTTCAGTT					
SCN08F	GGCAGCAGAACGACTTGTA	55°C	57,6°C	-	-	-
SCN08R	CAATCCTTGGCATCACTCTG					
SCN09F	TTGAAAGTTGAAGCCACCAC	62,2°C	56,4°C	60,0°C	-	-
SCN09R	CCTCATAACAACCACCTGCTC					
SCN10F	AGCCATGCAAATACTTCAGC	52°C	58,6°C	59,2°C	61,7°C	-
SCN10R	CAACCATGCATCAGTAAACTCAG					

SCN11F	CTGTTATGAATGCTGAAATCTCC	52°C	56,8°C	59,0°C	60,5°C	61,5°C
SCN11R	TGGTGCAGCAATAGTGAGC					
SCN12F	GTCACCATTTGGTTGTTTGC	55°C	55,8°C	57,8°C	-	-
SCN12R	TGCACTATTCCCAACTCACA					
SCN13F	GGCTCTATGTGTGTGTCTGATG	59°C	54,7°C	56,0°C	57,5°C	-
SCN13R	GAAGGATGGTTGAAAGACTGC					
SCN14F	TCTACTTCGCGTTTCCACAA	52°C	55,1°C	56,4°C	58,0°C	-
SCN14R	TGCTATGCAAGAACCCTGAT					
SCN15F	GACGGTTAGGGCAGATCAGA	57°C	57,1°C	59,9°C	60,5°C	-
SCN15R	GCCATGCTGGTGTATTTCC					
SCN16F	CTGCTCTTCCCTACATTGG	55°C	-	-	-	-
SCN16R	ATTCATACCTTCCCACACC					
SCN17F	AAGGGTTAGCACAGACAATG	52°C	56,5°C	59,0°C	61,5°C	-
SCN17R	CAAGCTGCACTCCAAATG					
SCN18F	AAGGATATTATGGAAGCAGAGACA	55°C	57,5°C	59,0°C	-	-
SCN18R	GGATACTAAGACAATGAAACAAAGG					
SCN19F	TTTCTCTGCCCTCCTATTCC	55°C	52,5°C	56,2°C	-	-
SCN19R	GCCCTTGTCTTCCAGAAATG					
SCN20F	TGTCTGAACATTTATCCTCTGAA	50°C	56,1°C	58,5°C	-	-
SCN20R	TGGCTATATAACAATACTTCAGGTTC					
SCN21F	GGAAAGACCAGAGATTACTAGGG	55°C	55,1°C	56,8°C	-	-
SCN21R	CCATCTGGGCTCATAAACTTG					
SCN22F	TGTCTTGGTCCAAAATCTGTG	50°C	55,5°C	-	-	-
SCN22R	TTGGTCGTTTATGCTTTATTCG					
SCN23F	GCACCAGTGACATTTCCAG	50°C	54,9°C	55,7°C	-	-
SCN23R	ATGACAGAGGAAGAGGAAGG					
SCN24F	GGACACAGTTTTAACCAGTTTG	55°C	55,2°C	57,2°C	-	-
SCN24R	AGATGATGCTCTACAAGTGAAAG					
SCN25F	GCTAATGCACATGAGAAAATCC	55°C	54,2°C	56,0°C	57,2°C	-
SCN25R	TGATTGCTGGGATGATCTTG					
SCN26aF	ACGCATGATTTCTTCACTGG	55°C	55,6°C	57,3°C	58,9°C	60,0°C
SCN26aR	CAGGATGACCGCGATGTA					
SCN26bF	TAAGGGAGACTGTGGGAACC	55°C	57,9°C	58,6°C	60,4°C	-
SCN26bR	AAGGTGGCGTCTGTAAGCA					
SCN26cF	GGTCTCCTATCAGCCAATCAC	55°C	54,9°C	56,0°C	-	-
SCN26cR	CAGTTTGGCATTGACCTCCT					

**Tabela 3-** Sequências dos *primers*, temperaturas de anelamento (Ta) e temperaturas de análise dos éxons do gene *CHRNA7* por DHPLC.

<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	Ta	Temperaturas de análise (DHPLC)		
			1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>
CHRNA02F	GGGCTGCTTGTCTGGGCT	53°C	63°C	-	-
CHRNA02R	CCGCCCAGCTGTCTAA				
CHRNA03F	ACACACAACAACGCTCTC	50,8°C	57,1°C	-	-
CHRNA03R	GACCTCTCAGAAGCAAGC				
CHRNA04F	AGTAGCCAAGGAAGTGAAGTGC	57,9°C	56,8°C	58,2°C	-
CHRNA04R	AAAGCCGTGTAGGGAGCAG				
CHRNA05F	TGCTGCTCCATCAAAGAC	50,8°C	61,7°C	-	-
CHRNA05R	GACACCCAAACTCGCTTC				
CHRNA06F	CATCTCAGTCAGCTTCCGTTTC	50°C	60,3°C	61,3°C	-
CHRNA06R	GCTTTCTTCCAGGCGGTTAG				
CHRNA07F	AACAATGGCTCCTTCTCTCC	59,5°C	60,8°C	62°C	63,4°C
CHRNA07R	GAACCCTGATGGAGTCCTG				
CHRNA08F	AGCCCTCGTTAGACAGAATTG	54,5°C	59°C	60,3°C	-
CHRNA08R	CAGCAAATCATCACCTTCCA				
CHRNA09F	CTCACCTGCATCTGTTC	62,5°C	62,2°C	64,1°C	-
CHRNA09R	TGAGCCAAGATTACACCAC				

**Tabela 4-** Sequências dos *primers*, temperaturas de anelamento (Ta) e temperaturas de análise dos éxons do gene *CHRM5* por DHPLC.

<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	Ta	Temperaturas de análise (DHPLC)			
			1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>
CHRM01aF	TCATGCTGGTGTGCGAAG	56.7°C	57.8°C	59.9°C	-	-
CHRM01aR	TAGTCCAGTGCAAGCCAAAG					
CHRM01bF	TCTCGGGAGTCTGGCTTGT	52.2°C	60.2°C	61°C	-	-
CHRM01bR	AGTGGCTTGGGATGGCTTC					
CHRM01cF	GCTCATAGGGCTCTGTTC	56.7°C	58.9°C	59.6°C	61.7°C	63.0°C
CHRM01cR	GCTGCTTTCCTCTCTTTG					
CHRM01dF	TGACCAAACGAAAGAGAG	50.8°C	57.1°C	58.6°C	59.4°C	-
CHRM01dR	GAGCCTATCCCTTTACTTC					
CHRM01eF	ATGACTCTTGCCTATGACC	52.5°C	55.0°C	56.1°C	57.6°C	58.4°C
CHRM01eR	TAACCTGACTGTGGAGACTTG					

**Tabela 5-** Sequências dos *primers*, temperaturas de anelamento (Ta) e temperaturas de análise dos éxons do gene *CX36* por DHPLC.

<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	Ta	Temperaturas de análise (DHPLC)		
			1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>
CX01F	TTGCTTCTTTAATTGGGAG	51.7°C	65°C	-	-
CX01R	AGTCCAGGTGTGAGAAGG				
CX02aF	AAACACCAGCAAAGGGAAG	54.8°C	59.2°C	60.7°C	61.5°C
CX02aR	ACCTCTAAACAATCTGGCTCTG				
CX02bF	GCAGAACACAGAGAACACCAG	57°C	57.6°C	59.4°C	60.5°C
CX02bR	GATACAGCCACGTCTGAGCA				

### 3.3.3. AMPLIFICAÇÃO POR PCR

Os fragmentos de DNA genômico foram amplificados pela técnica de PCR (*polymerase chain reaction*), utilizando-se *primers* específicos para os exons dos genes candidatos. As reações foram realizadas utilizando-se o protocolo padronizado em nosso laboratório para triagem de mutações por DHPLC. O protocolo mínimo utilizado para uma reação de volume final 8,3µl contém 100ng de DNA, 5pmol de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 11,25nmol de dNTP mix (contendo dGTP, dCTP e dTTP e dATP em quantidades equimolares), 0,75 unidade de *Taq* DNA polimerase recombinante (Fermentas), 18,5nmol de MgCl<sub>2</sub>, tampão com KCl 1,5x (Fermentas) e água até completar o volume. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

As condições para a realização do PCR 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.

Para otimizar o processo de amplificação dos genes de interesse e minimizar o surgimento de bandas inespecíficas, foi utilizada a técnica de *Touchdown* PCR<sup>100</sup>. A temperatura de anelamento no primeiro ciclo é programada para 10°C acima da temperatura

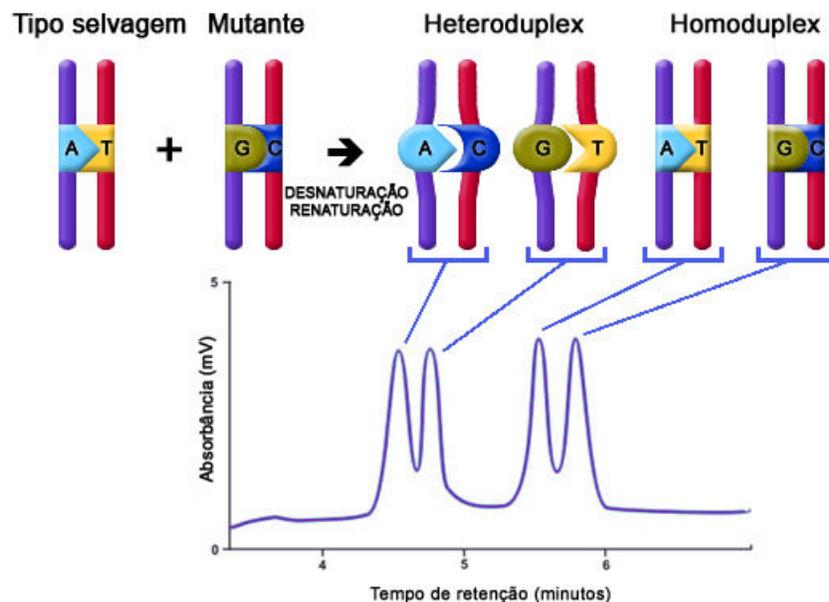
de anelamento específica do par de *primers*. Em cada ciclo, a temperatura diminui 0,5°C e, após 20 ciclos, atinge a temperatura de anelamento ideal. Os ciclos seguintes seguem-se à temperatura específica dos *primers*, que estão apresentadas nas Tabelas 2, 3, 4 e 5.

#### 3.3.4. DETECÇÃO DE MUTAÇÕES

A triagem de mutações foi feita por meio da técnica de DHPLC (*Denaturing High-performance Liquid Chromatography*), que permite a detecção de substituições de bases únicas e de pequenas inserções e deleções com sensibilidade superior a 96%<sup>101</sup>. O DHPLC é uma cromatografia líquida baseada no método de pareamento de íons em fase reversa sob condições desnaturantes.

Nesse método, os produtos amplificados por PCR são submetidos a aquecimento a 95°C durante 5 minutos, para que ocorra a desnaturação do DNA, e posterior resfriamento à temperatura ambiente por 45 minutos, o que promove o re-anelamento gradual das fitas. Quando a sequência nucleotídica do fragmento analisado é diferente entre os cromossomos, como no caso da presença de uma mutação, ocorre a formação do que se chama de “heteroduplex”, ou seja, hibridização das fitas não perfeitamente complementares. As amostras são injetadas no aparelho WAVE® 4500 (Transgenomic) em aliquotas de 5µl, submetidas à cromatografia na coluna DNASep® e, posteriormente, passam por um detector de luz UV. O processo é realizado em temperaturas específicas para cada fragmento, definidas com o auxílio do Navigator Software™, programa que acompanha o WAVE® System. Como os heteroduplex são menos estáveis do que os homoduplex (fitas perfeitamente pareadas), eles são eluídos em tempos diferentes<sup>101</sup>. Sendo assim, o programa registra perfis cromatográficos diferentes para amostras com e sem alterações na sequência nucleotídica (Figura 5).

Para a análise por DHPLC de cada fragmento amplificado, foram determinadas temperaturas específicas da coluna cromatográfica, de forma que fosse possível detectar mutações em qualquer base da sequência codificante. Nas Tabelas 3, 4, 5 e 6 estão indicadas as temperaturas utilizadas para análise cromatográfica dos genes estudados.



**Figura 5-** Representação gráfica do princípio da técnica de DHPLC.

Além da cromatografia dos pacientes incluídos na casuística, foi realizada a cromatografia de indivíduos não afetados, com a finalidade de se obter um padrão de referência para os fragmentos analisados. Isso foi necessário porque cada fragmento interage de uma maneira com a coluna cromatográfica, conforme suas propriedades físico-químicas<sup>101</sup>, e nem sempre a configuração dos perfis corresponde à teoria. Foram utilizados cerca de cinco indivíduos não-afetados, cujos perfis foram comparados com os dos pacientes. É importante enfatizar que essa estratégia não substitui a análise em um grupo controle maior e bem estabelecido.

### 3.3.5. SEQUENCIAMENTO

As amostras que apresentaram perfis cromatográficos alterados foram sequenciadas no aparelho MegaBace1000, utilizando-se os mesmos *primers* usados para a PCR. 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 foi feita para um volume final de 10µl, contendo 4µl de solução pré-mix, 0,5µl de *primer* (10pmol/µl) 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. A purificação da reação de sequenciamento foi feita com etanol e acetato de amônio 7,5mM, como sugerido pelo fabricante.

### 3.3.6. ANÁLISES COMPUTACIONAIS

As substituições de base única identificadas foram comparadas com bancos de dados de SNP do NCBI<sup>†</sup>. Aquelas 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<sup>‡</sup> (*Sorting Intolerant from Tolerant*), Polyphen<sup>\*</sup> (*Polymorphism Phenotyping*) e Pmut<sup>§</sup>, além da escala Grantham<sup>102</sup>. Essas análises levam em consideração as diferenças físico-químicas entre o aminoácido original e o alterado, além de, no caso das análises de bioinformática, a posição da alteração e o nível de conservação entre sequências homólogas.

### 3.3.7. INVESTIGAÇÃO EM GRUPO CONTROLE

Duas das alterações potencialmente patogênicas identificadas nos pacientes estudados foram investigadas em 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.

Foram utilizadas duas enzimas de restrição com sítios de clivagem específicos para as substituições analisadas, as enzimas *Tai*I e *Hpy*188III. As reações de digestão foram feitas para um volume final de 15,5µl, contendo 5µl de PCR, 9µl de água, 1µl de tampão específico (fornecido pelo fabricante) e 0,5µl de enzima. A incubação foi feita a 65°C para a enzima *Tai*I e a 37°C para *Hpy*188III por 16 horas. Os produtos da digestão foram visualizados em gel de acrilamida 12% corado com brometo de etídeo.

---

<sup>†</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<sup>\*</sup> <http://blocks.fhrc.org/sift/SIFT.html>

<sup>‡</sup> <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>

<sup>§</sup> <http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut>

Na análise de uma substituição encontrada no éxon 6 do gene *SCN1A*, foi utilizada enzima *TaiI*, que reconhece e cliva sítios específicos com a sequência ACTG. Na sequência do fragmento do tipo selvagem, existe um sítio de restrição. Se a mutação estiver presente, a sequência normal ATTG passará a ser ACTG e um segundo sítio será criado. Sendo assim, um indivíduo homocigoto TT apresentará um fragmento de 81pb e outro de 395pb, um homocigoto CC terá o fragmento de 81pb e mais dois, um de 173pb e outro de 222pb, e o indivíduo heterocigoto exibirá todos os fragmentos. Essa alteração foi investigada em um grupo de 70 indivíduos não afetados.

Para estudar uma substituição no éxon 26 do gene *SCN1A*, foi utilizada a enzima *Hpy188III*, cujo sítio de restrição é a sequência TCNNGA, sendo N qualquer nucleotídeo. Como os produtos da clivagem teriam tamanhos de difícil diferenciação no gel de acrilamida, um novo *primer reverse* foi desenhado para amplificar a região (5'-CACTCACCATGGGCAAATC-3'). O fragmento do tipo selvagem apresenta um sítio de restrição e, se houver a mutação, um segundo sítio será criado. Dessa maneira, um indivíduo homocigoto TT apresentará um fragmento de 128pb e outro de 195pb, um homocigoto CC terá o fragmento de 128pb, um de 15pb e outro de 180pb, e o indivíduo heterocigoto terá a combinação dos fragmentos. Para a análise dessa alteração, um grupo de 90 indivíduos não afetados foi estudado.

***4 - RESULTADOS***

## 4.1. CASUÍSTICA

### 4.1.1. EPILEPSIAS GENERALIZADAS COM CRISES FEBRIS

Os pacientes incluídos na casuística possuem idade entre cinco e 22 anos, sem predominância de sexo e com mioclonias. Todos os pacientes com EMGI apresentaram crises febris com início no primeiro ano de vida e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor a partir dessa idade. Entre os pacientes com EMA, o início das crises se deu entre oito meses e cinco anos, sendo que apenas 33% apresentaram crises febris. Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor foi observado em 67% dos pacientes com EMA. História familiar de epilepsia existe para um terço dos pacientes com EMGI e metade dos pacientes com EMA.

As informações clínicas foram obtidas e gentilmente cedidas pela Dra. Paula Maria Preto sob supervisão da Profa. Dra. Marilisa Guerreiro, e encontram-se resumidos no Anexo 3. Um resumo da história clínica dos pacientes nos quais foram encontradas alterações potencialmente deletérias segue abaixo:

Paciente 1, 15 anos, sexo feminino. Hipótese diagnóstica: Epilepsia mioclônica grave da infância. É filha de pais não consanguíneos e sem intercorrências na gestação. Apresentou a primeira crise tônico-clônica generalizada com duração de 40 minutos aos quatro meses de vida em vigência de febre baixa (37,5°C). A partir de um ano e um mês de idade apresentou episódios freqüentes de crises parciais complexas febris e afebris. O desenvolvimento neuropsicomotor foi adequado até os dois anos de idade, mas a partir daí começou a apresentar atraso no seu desenvolvimento neurológico. Atualmente apresenta déficit cognitivo evidente com linguagem limitada a monossílabos e dificuldade de compreensão de ordens verbais simples. Não fixa o olhar, ainda deambula sem apoio, porém a marcha é atáxica, os reflexos ósteo-tendíneos são exaltados nos quatro membros. O comportamento é anormal com características autísticas. As crises do tipo parcial complexa com ou sem generalização secundária são diárias apesar do uso de medicação em doses terapêuticas. O exame de eletrencefalograma (EEG) é anormal, com lentificação da atividade de base cerebral e descargas epileptiformes generalizadas e focais. A fotoestimulação leva a uma piora do traçado do EEG com aumento das descargas epileptiformes. Alteração molecular encontrada: c.829T>C.

Paciente 2, 8 anos de idade, sexo masculino. Hipótese diagnóstica: Epilepsia mioclônica grave da infância. É filho de pais não consanguíneos e sem intercorrências relatadas na gestação. Apresentou a primeira crise parcial complexa aos três meses de vida, com duração de dois minutos em vigência de febre (38,5°C) após a primeira dose da vacina DPT. Aos seis meses de idade, após a segunda dose de DPT e novamente em vigência de febre (38,5°C) teve a segunda crise, dessa vez tônico-clônica generalizada com duração de quatro minutos. A partir daí, sempre que apresentava um episódio febril esse era acompanhado por crises. Com um ano e oito meses tiveram início os episódios de crises afebris, mas sempre apresentava piora das crises na vigência de febre e processos infecciosos. Há quatro anos perdemos o seguimento clínico do paciente (na época com quatro anos de idade) que apresentava na ocasião atraso no desenvolvimento neuropsicomotor principalmente na área da fala. Alteração molecular encontrada: c.971A>C.

Paciente 3, 18 anos de idade, sexo feminino. Hipótese diagnóstica: Epilepsia mioclônica grave da infância. É filha de pais não consanguíneos e sem intercorrências relatadas na gestação. Apresentou a primeira crise generalizada tônico clônica aos cinco meses de vida em vigência de febre baixa (37,5 °C) que teve duração de dois minutos. A partir dessa idade as crises se repetiram, principalmente na vigência de febre e processos infecciosos, mas podiam ocorrer também menos freqüentemente sem febre. As crises eram multiformes (ausências, parciais simples e parciais complexas com ou sem generalização secundária) com predomínio das mioclônicas. As mioclonias se agravavam na presença de estímulo luminosos, febre e processos infecciosos. O desenvolvimento neuropsicomotor foi adequado até os dois anos de idade quando começou a apresentar atraso significativo. Atualmente apresenta déficit cognitivo evidente com atraso de fala e traços autísticos de comportamento. A marcha é atáxica, reflexos ósteo-tendíneos são exaltados nos quatro membros. Mantém uma freqüência de crises de uma vez por semana e tem tido uma boa resposta à dieta cetogênica. O EEG é alterado, com lentificação da atividade de base cerebral e descargas epilepticas generalizadas e multifocais. Alteração molecular encontrada: c.5434T>C.

Paciente 4, 4 anos (falecida), sexo feminino. Hipótese diagnóstica: Encefalopatia grave da infância. É filha de pais não consangüíneos e sem intercorrências relatadas na gestação. Apresentou a primeira crise caracterizada por mioclonias seguidas por crise generalizada tônico-clônica aos quatro meses de vida em vigência de febre baixa (37,5°C) que teve duração de 20 minutos. Com um ano de idade iniciou crises freqüentes do tipo parciais complexas com evidente componente motor. As crises eram mais freqüentemente durante processos febris e infecciosos, mas também ocorriam sem febre. O desenvolvimento neuropsicomotor foi normal até os oito meses de idade e a partir daí apresentou atraso nas aquisições neurológicas: deambulou apenas com dois anos de idade e aos quatro anos ainda mantinha marcha com base alargada; iniciou a fala aos dois anos de idade. Faleceu aos quatro anos de idade e teve como causa provável do óbito morte súbita. Alteração molecular encontrada: IVS4+1G>A.

Paciente 5, 5 anos, sexo feminino. Hipótese diagnóstica: Epilepsia mioclônica grave da infância. É filha de pais não consangüíneos e sem intercorrências relatadas na gestação. Apresentou a primeira crise aos sete meses de vida em vigência de episódio de febre baixa (37,5°C). A partir dessa mesma idade começou a apresentar crise frequentes, febris e afebris com mioclonias diárias, crises mioclônico-astáticas, crises parciais complexas e crises tônico-clônicas generalizadas, essas últimas na freqüência de uma a duas vezes ao mês. As crises eram refratárias aos tratamentos medicamentosos. O desenvolvimento neuropsicomotor foi normal até a primeira crise aos 7 meses e a partir daí as aquisições neurológicas foram atrasadas. O seguimento clínico da paciente foi perdido há dois anos quando tinha três anos de idade e na ocasião apresentava ao exame neurológico déficit cognitivo evidente com atraso de linguagem, ataxia de tronco e apendicular, sinais evidentes de liberação piramidal. O EEG era anormal com lentificação da atividade de base cerebral e descargas epilepticas generalizadas e multifocais. Alteração molecular encontrada: IVS8+3G>T.

Paciente 6, 10 anos, sexo masculino. Hipótese diagnóstica: Epilepsia mioclônica grave da infância. É filho de pais não consangüíneos, nascido de parto normal sem intercorrências relatadas na gestação. Apresentou a primeira crise tônico-clônica generalizada aos quatro meses de idade, com duração de três a quatro minutos e a partir de

então iniciou crises epilépticas multiformes (mioclonias, mioclônico-astática, parciais simples e complexas com ou sem generalização secundária e tônico-clônica generalizada) com predomínio de crises mioclônico-astática. O desenvolvimento neuropsicomotor foi normal até os cinco meses de idade e a partir daí apresentou deterioração clínica com empobrecimento da linguagem, déficit cognitivo, hipotonia generalizada, clônus em membros inferiores e sinal de babinski bilateralmente. Atualmente apresenta características autísticas, atraso global de linguagem, desatenção, agitação psicomotora, não fixa olhar, hipotonia e sinais frustos de liberação piramidal. O exame de EEG sob apresenta lentificação global do traçado, com ondas lentas menor que 2Hz (sob sono) ondas lentas entre 2-3Hz (vigília), presença de atividade epileptiforme multifocal e generalizada e distúrbio difuso moderado a severo da atividade de base. Atualmente apresenta melhora significativa das crises, apresentando crises mioclônico-astáticas somente em processos febris e concomitante melhora do traçado do EEG, o qual somente realizado sob sono devido agitação psicomotora e apresentando distúrbio epileptiforme pouco freqüente em regiões frontais bilateralmente e síncronas. Alteração molecular encontrada: c.3719\_3720insGATA.

#### **4.1.2. EPILEPSIA BENIGNA DA INFÂNCIA COM ESPÍCULAS CENTRO-TEMPORAIS**

Alguns dados clínicos dos pacientes com EBIECT incluídos na casuística encontram-se resumidos no Anexo 4. Os dados foram obtidos e gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Lineu Fonseca e pela Profa. Dra. Glória Tedrus. Dados adicionais sobre a caracterização clínica, neuropsicológica e eletrencefalográfica desses pacientes foram publicadas previamente<sup>98,99</sup>. Os pacientes estudados possuem idade entre nove e 18 anos, sem predominância de sexo e início das crises entre um e 10 anos. A localização das espículas é predominante na região centro-temporal e a lateralidade do foco ao EEG ocorre em igual proporção no hemisfério direito e esquerdo, raramente ocorrendo bilateralidade. O número de descargas ao EEG mostrou-se bastante variável, sendo que a maioria dos pacientes apresenta mais de 10 espículas por minuto.

## 4.2. ESTUDOS GENÉTICOS

### 4.2.1. GENE *SCN1A*

Os pacientes com **EMGI** e **EMA** de nossa casuística tiveram os éxons do gene *SCN1A* submetidos à triagem de mutações. A Tabela 6 mostra as alterações identificadas nas sequências nucleotídicas.

**Tabela 6-** Alterações encontradas nas sequências nucleotídicas do gene *SCN1A*.

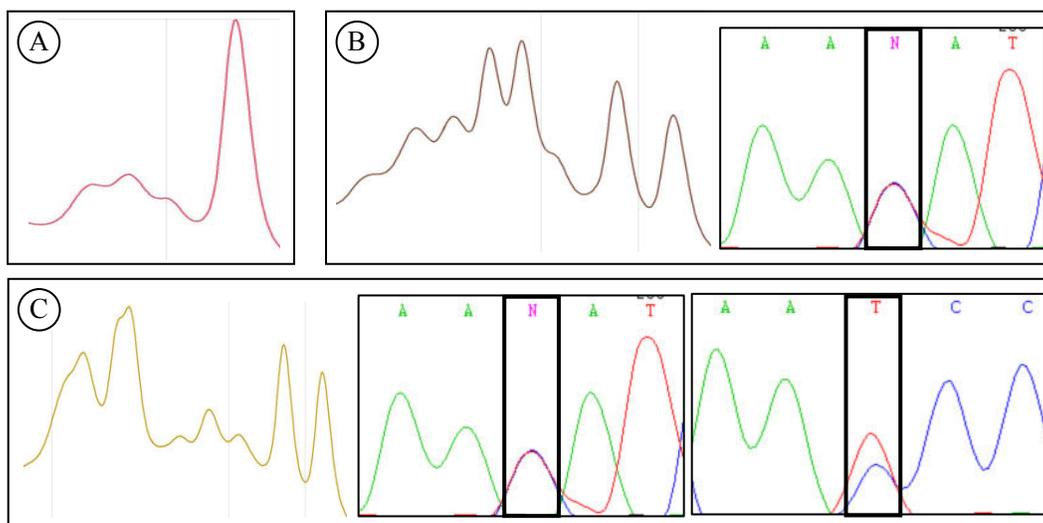
Éxon	Alterações identificadas
1	c.-83A>T (rs566839)
2	c.345 T>C ; IVS2+66 T>C (rs8191987)
4	IVS4+1G>A; IVS4+120A>G
5	c.670 T>C
6	c.829T>C (C277R)
7	c.971A>C (H324P) ; IVS7-20C>T (rs994399) ; IVS7+21T>C (rs1542484)
8	IVS8+3G>T ; IVS8+75C>A (rs11690962) ; IVS8+112C>T (rs11690959)
9	c.1212A>G (rs7580482)
11	IVS10-47T>G (rs6753355)
13	c.2292 T>C
14	IVS14-37G>A (rs2126152); IVS14-72A>C (rs490317)
19	c.3719_3720insGATA
26	c.5434T>C (W1812R)

Foram encontrados perfis cromatográficos alterados ao DHPLC nos éxons 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 19, 21, 23 e 26.

Para o primeiro éxon, alguns fragmentos apresentaram perfil cromatográfico ligeiramente distinto do normal e foram submetidos ao sequenciamento automático. Embora não tenham sido identificadas alterações que justificassem o padrão alterado, foi identificada uma alteração em homozigose no íntron (IVS1+20C>T). Trata-se de um polimorfismo já registrado em bancos de dados (rs566839), que foi identificado também em indivíduos com perfil normal.

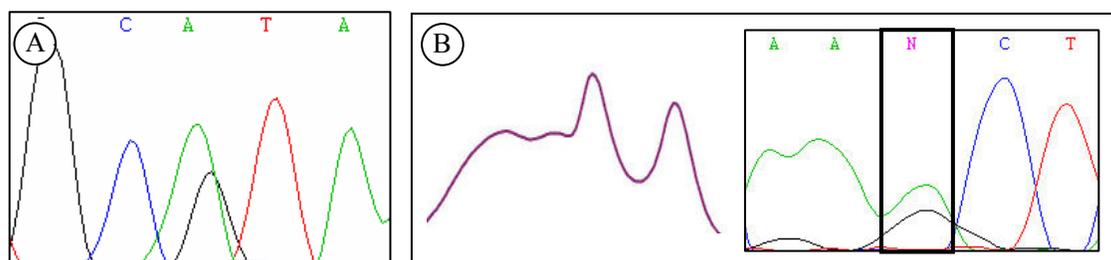
Foram observados três padrões cromatográficos para o éxon 2 nas duas primeiras temperaturas de análise (Figura 6). O padrão A representa um perfil normal. O padrão B foi

encontrado em quatro pacientes e o sequenciamento automático desse fragmento revelou um polimorfismo no íntron (IVS2+66T>C), já descrito em bancos de dados de SNP (rs8191987). O único paciente com o padrão C apresentou, além da alteração IVS2+66T>C, uma transição (c.345T>C) que não resulta em troca de resíduo de aminoácido (silenciosa).



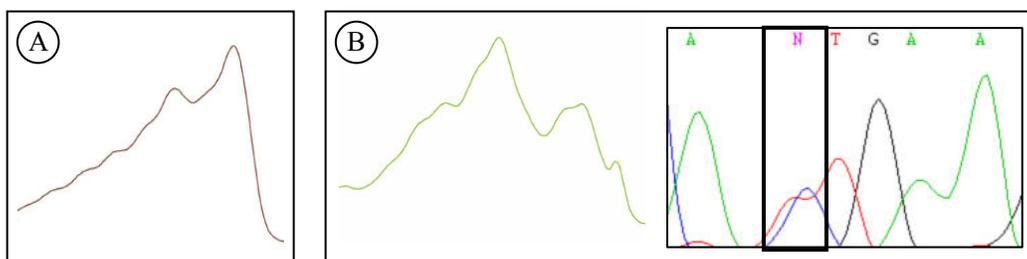
**Figura 6-** Perfis cromatográficos do éxon 2 do gene *SCN1A* e alterações detectadas por sequenciamento automático.

Dois indivíduos apresentaram alteração no perfil cromatográfico para a segunda temperatura de análise por DHPLC do éxon 4. O sequenciamento automático dos fragmentos alterados permitiu a identificação de duas transições no íntron: IVS4+1G>A em um dos pacientes (Figura 7A; perfil cromatográfico indisponível) e IVS4+120A>G no outro (Figura 7B). A alteração IVS4+1G>A localiza-se em um sítio de *splicing* e não foi encontrada nos pais do indivíduo afetado.



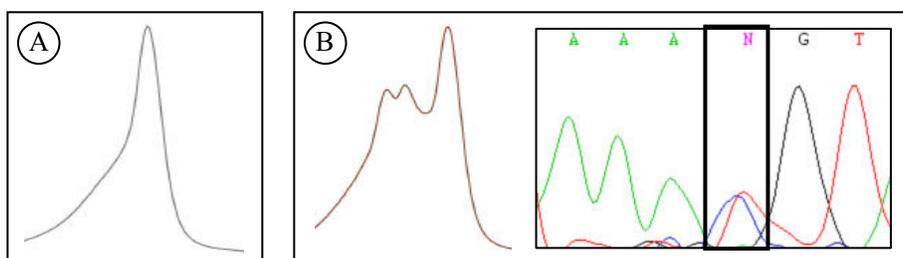
**Figura 7-** Perfil cromatográfico alterado do éxon 4 do gene *SCN1A* e alterações detectadas por sequenciamento automático.

Um paciente apresentou perfil cromatográfico diferente do padrão normal para o éxon 5 (Figura 8). O sequenciamento automático desse fragmento revelou uma substituição silenciosa (c.670 T > C).



**Figura 8-** Perfis cromatográficos do éxon 5 do gene *SCN1A* e alteração detectada por sequenciamento automático. (A) Perfil normal; (B) perfil alterado.

Na análise do éxon 6, um paciente apresentou perfil cromatográfico diferente dos demais na segunda e terceira temperaturas de análise do DHPLC (Figura 9). Por meio do sequenciamento automático, foi identificada uma transição (c.829T>C) que resulta na troca de uma cisteína por uma arginina (C277R) na proteína codificada. A Tabela 7 mostra os resultados das análises de predição do efeito dessa alteração na proteína e os valores calculados por cada ferramenta utilizada. Essa alteração é considerada *de novo*, pois não foi identificada nos pais do portador.



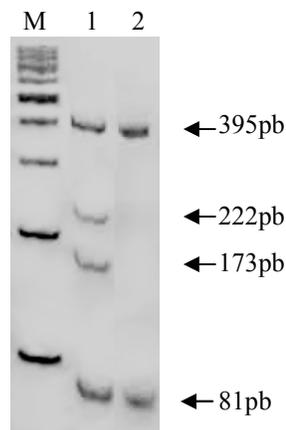
**Figura 9-** Perfis cromatográficos do éxon 6 do gene *SCN1A* e alteração detectada por sequenciamento automático. (A) Perfil normal; (B) perfil alterado.

**Tabela 7-** Resultados das análises de predição do efeito da alteração C277R na proteína.

Ferramenta	Valor	Predição
SIFT	0.00	Afeta a função da proteína (<0.05)
Polyphen	3.168	Provavelmente deletéria (>2.00)
PMut	0.859	Patológica (>0.05)
Escala de Grantham	180	Radical (>150)

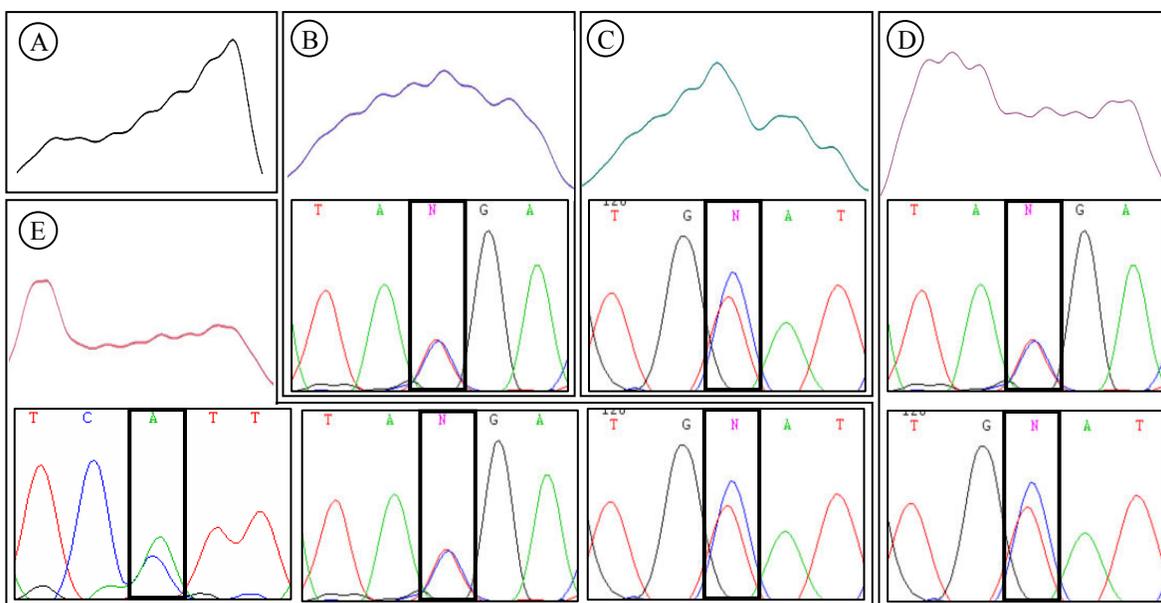
Resultados

Para averiguar se a alteração c.829T>C está presente em indivíduos sem epilepsia, um grupo de indivíduos controles foi investigado. Não foi encontrado o alelo mutante em nenhum dos 140 alelos analisados. A Figura 10 ilustra o padrão de bandas observado para indivíduos com e sem a alteração.



**Figura 10-** Gel de acrilamida com produto da digestão do éxon 6 do gene *SCN1A* pela enzima TaiI. (M) Marcador de peso molecular 100pb; (1) Indivíduo heterozigoto T/C; (2) Indivíduo homozigoto T/T.

Para o éxon 7, foram observados cinco padrões cromatográficos distintos (Figura 11). O padrão A, considerado normal, foi observado em sete pacientes. O padrão B foi observado em dois pacientes e o sequenciamento automático desses fragmentos revelou a presença de uma alteração no íntron (IVS6-20 C>T), relatada em bancos de dados (rs994399). Para o padrão C, observado em três pacientes, foi identificada outra transição no íntron (IVS7+21T>C), também já descrita em bancos de dados (rs1542484). O padrão D foi observado em oito pacientes e corresponde à combinação das duas alterações mencionadas. O padrão E foi observado em um paciente, no qual também foram identificadas as duas alterações no íntron e uma substituição na região codificante (c.971A>C), resultando na troca de uma histidina por uma prolina (H324P) na proteína codificada por esse gene. Os resultados das análises realizadas para essa alteração encontram-se na Tabela 8. Em alguns pacientes com os padrões A e C também foi observada a substituição IVS6-20C>T em homozigose.

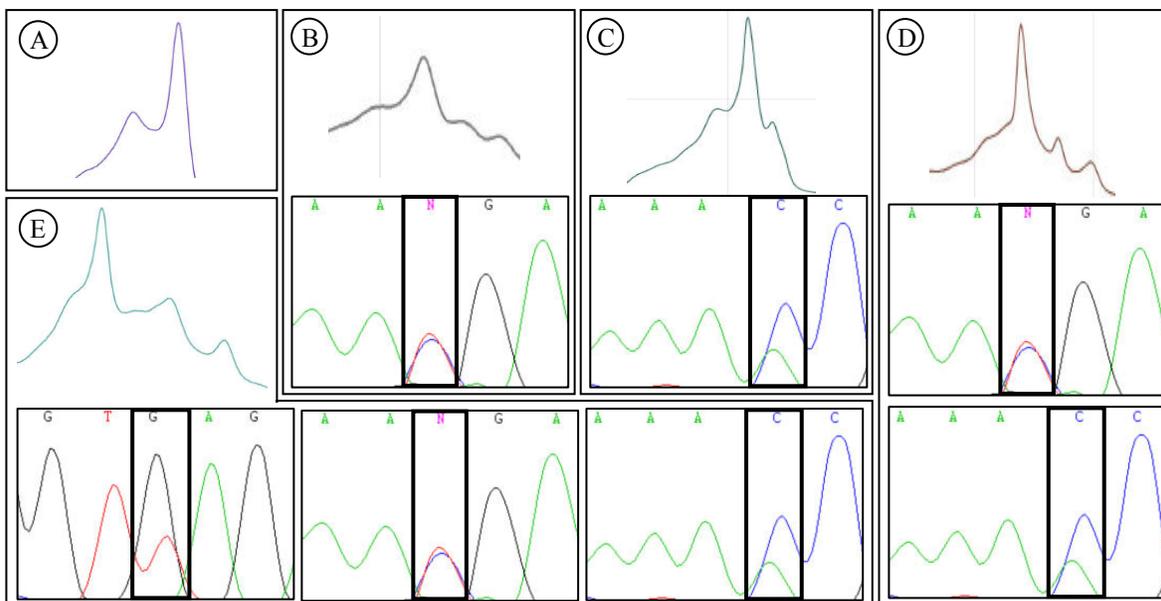


**Figura 11-** Perfis cromatográficos do éxon 7 do gene *SCN1A* e alterações detectadas por sequenciamento automático.

**Tabela 8.** Resultados das análises de predição do efeito da alteração H324P.

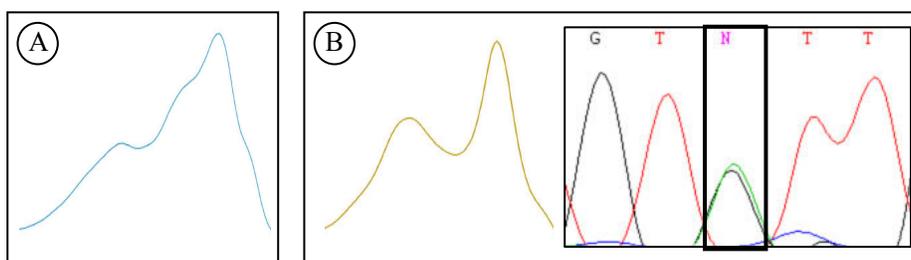
Ferramenta	Valor	Predição
SIFT	0.01	Afeta a função da proteína (<0.05)
Polyphen	0.675	Benigna (0.00-0.99)
PMut	0.572	Patológica (>0.05)
Escala de Grantham	77	Moderadamente conservativa (51-100)

Foram identificados cinco padrões cromatográficos para o éxon 8 (Figura 12). O padrão considerado normal foi observado em cinco pacientes. No paciente com o padrão B foi identificada uma alteração no íntron (IVS8+112C>T), presente em bancos de dados (rs11690959). O padrão C, encontrado em dois pacientes, está relacionado com outra substituição no íntron (IVS8+75C>A), previamente descrita (rs11690962). Em alguns indivíduos com esse padrão também foi identificada a transição IVS8+112C>T em homozigose. O padrão D foi observado em 12 pacientes e corresponde à combinação das duas alterações mencionadas. Um paciente apresentou o padrão E e o sequenciamento automático revelou, além das duas substituições, uma transversão no começo do íntron (IVS8+3G>T), localizada em um sítio de *splicing*.



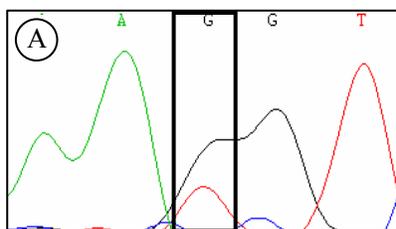
**Figura 12-** Perfis cromatográficos do éxon 8 do gene *SCN1A* e alterações detectadas por sequenciamento automático.

Na análise do éxon 9, seis pacientes apresentaram perfil cromatográfico alterado na segunda temperatura de análise (Figura 13). Foi identificada uma substituição silenciosa (c.2292T>C), já descrita em bancos de dados (rs7580482). Essa alteração também foi observada em homozigose em outros pacientes submetidos ao sequenciamento automático.



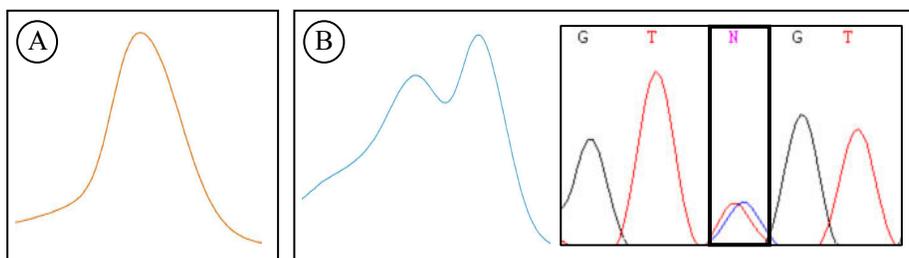
**Figura 13-** Perfis cromatográficos do éxon 9 do gene *SCN1A* e alterações detectadas por sequenciamento automático. (A) Perfil normal; (B) perfil alterado.

No íntron 11, foi identificada a alteração IVS10-47T>G em heterozigose em um paciente (Figura 14; perfil cromatográfico indisponível) e em homozigose em outros pacientes submetidos ao sequenciamento automático. Essa substituição está presente em bancos de dados de SNP (rs6753355).



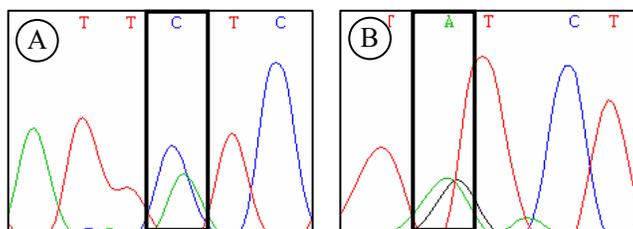
**Figura 14-** Alterações detectadas por sequenciamento automático no íntron 11 do gene *SCN1A*.

Para o éxon 13, foi observado perfil alterado em 10 pacientes para a terceira temperatura de análise por DHPLC (Figura 15). O sequenciamento automático de amostras com esse padrão revelou uma substituição silenciosa (c.2292T>C) descrita em bancos de dados (rs6432860). A mesma alteração foi encontrada em homozigose em indivíduos com perfil cromatográfico normal.



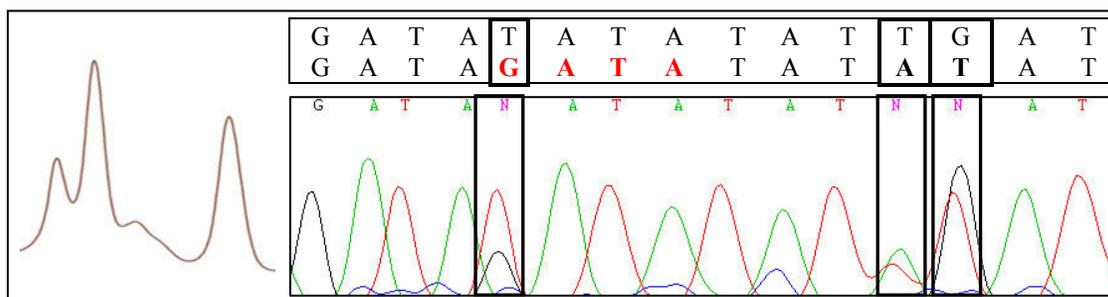
**Figura 15-** Perfis cromatográficos do éxon 13 do gene *SCN1A* e alterações detectadas por sequenciamento automático. (A) Perfil normal; (B) perfil alterado.

Todos os fragmentos correspondentes ao éxon 14 apresentaram perfis cromatográficos complexos e difíceis de serem agrupados em padrões distintos. O sequenciamento automático de algumas amostras revelou variações no número de repetições da base adenina existente no íntron. A sequência obtida em bancos de dados indica que essa base encontra-se repetida 17 vezes, porém foram encontradas variações nesse número em todos os indivíduos submetidos ao sequenciamento. Mesmo assim, foi possível a identificação de duas alterações no íntron: IVS13-37A>C (rs2126152), tanto em hetero como em homozigose, e IVS13-72G>A (rs490317) (Figura 16).



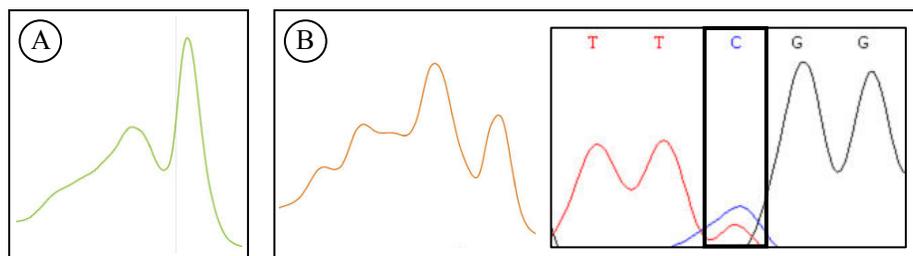
**Figura 16-** Alterações detectadas por sequenciamento automático no intron 15 do gene *SCN1A*.

Para o éxon 19, um paciente apresentou perfil cromatográfico alterado na primeira temperatura de análise (Figura 17) e foi identificada uma duplicação na sequência do éxon (c.3719\_3720insGATA). Essa inserção resulta na criação de um códon de terminação precoce, levando à tradução de uma proteína truncada.



**Figura 17-** Perfil cromatográfico alterado e alteração detectada por sequenciamento automático no éxon 19 do gene *SCN1A*.

No fragmento b do éxon 26, um paciente apresentou perfil cromatográfico diferente do normal (Figura 18) e o sequenciamento revelou uma substituição (c.5434T>C) que resulta na troca de um triptofano por uma arginina (W1812R) na proteína codificada. Na Tabela 9 estão os resultados das análises predições realizadas para essa alteração.

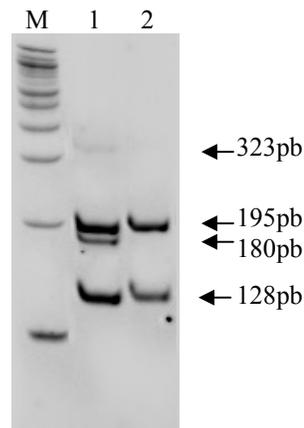


**Figura 18-** Perfis cromatográficos do fragmento 26b do gene *SCN1A* e alteração detectada por sequenciamento automático.

**Tabela 9-** Resultados das análises de predição do efeito da alteração W1812R.

	<b>Valor</b>	<b>Predição</b>
SIFT	0.00	Afeta a função da proteína (<0.05)
Polyphen	4.285	Provavelmente deletéria (>2.00)
PMut	0.976	Patológica (>0.05)
Escala de Grantham	101	Moderadamente Radical (101-150)

A alteração c.5434T>C foi investigada em um grupo controle composto por indivíduos sem epilepsia. Não foi encontrado o alelo mutante em nenhum dos 180 alelos analisados. A Figura 19 ilustra o padrão de bandas observado para indivíduos com e sem a alteração.



**Figura 19-** Gel de acrilamida com produto da digestão do éxon 26 do gene *SCN1A* com a enzima Hpy188III. (M) Marcador de peso molecular 100pb; (1) Indivíduo heterozigoto T/C; (2) Indivíduo homozigoto T/T.

Foram observados perfis cromatográficos alterados em alguns pacientes para os éxons 15, 21, 23, 26a e 26c, porém não foram detectadas alterações nas sequências nucleotídicas do éxon e das regiões intrônicas imediatamente adjacentes a ele.

#### 4.2.2. GENE *CHRNA7*

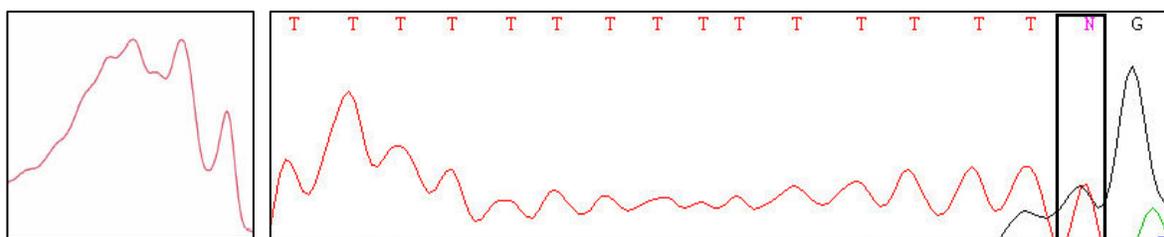
Os pacientes com **EBIECT** tiveram os éxons 2 a 9 do gene *CHRNA7* submetidos à triagem de mutações por DHPLC. Na Tabela 10 estão indicadas as alterações identificadas nas sequências nucleotídicas.

**Tabela 10-** Alterações encontradas nas sequências nucleotídicas do gene *CHRNA7*.

Éxon	Alterações identificadas
6	c.497_498delTG; IVS6+11G>A (rs408234)
7	c.654C>T (rs1042722); c.690G>A (rs386715)
8	IVS8-21A>G (rs2651439); IVS8+92G>C (rs425138)
9	IVS9+87T>C (rs2564605); IVS9+37C>G (rs2564606) e c.933A>G (rs384470)

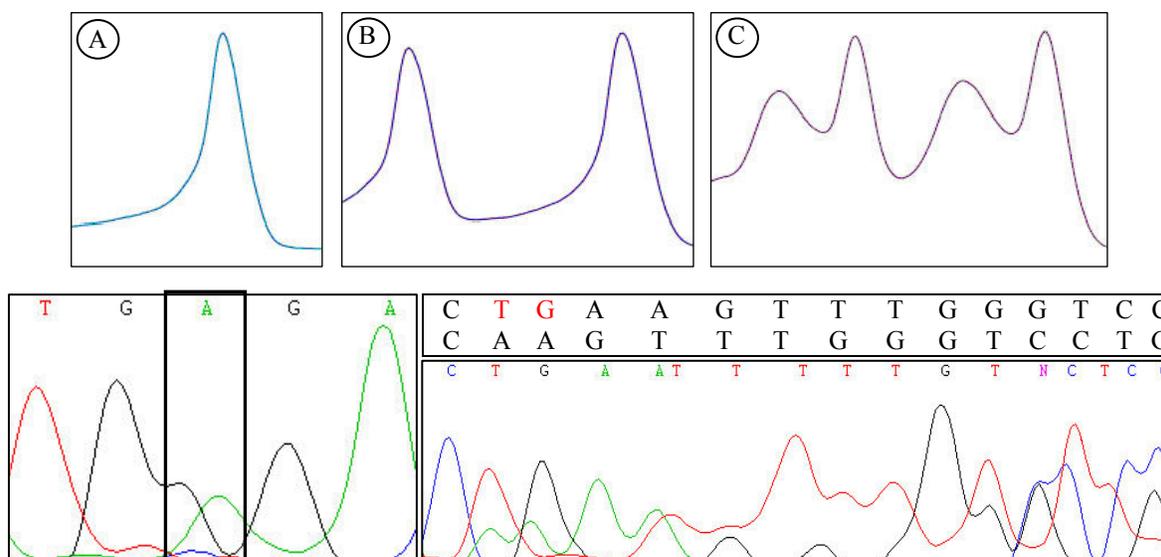
Na análise por DHPLC dos éxons 2, 4 e 5, foram observados perfis cromatográficos alterados em alguns pacientes. No entanto, o sequenciamento automático dos fragmentos não revelou alterações nas regiões codificantes.

A análise do exon 3 demonstrou perfis cromatográficos diferentes do esperado para um padrão normal em todos os indivíduos (Figura 20). O sequenciamento automático de algumas amostras permitiu a identificação de alterações no número de repetições da base timina presente no íntron. Não foram encontradas alterações na sequência codificante dos indivíduos submetidos ao sequenciamento automático.



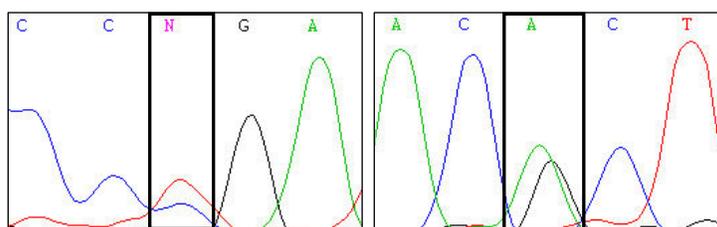
**Figura 20-** Perfil cromatográfico alterado do éxon 3 do gene *CHRNA7* e alteração detectada por sequenciamento automático.

Na análise cromatográfica do éxon 6, foram observados diferentes perfis cromatográficos em ambas as temperaturas analisadas (Figura 21). O perfil A representa o padrão normal, encontrado em quatro pacientes. O sequenciamento de amostras com os padrões B e C revelou uma substituição IVS6+11G>A e uma deleção (c.497\_498delTG).



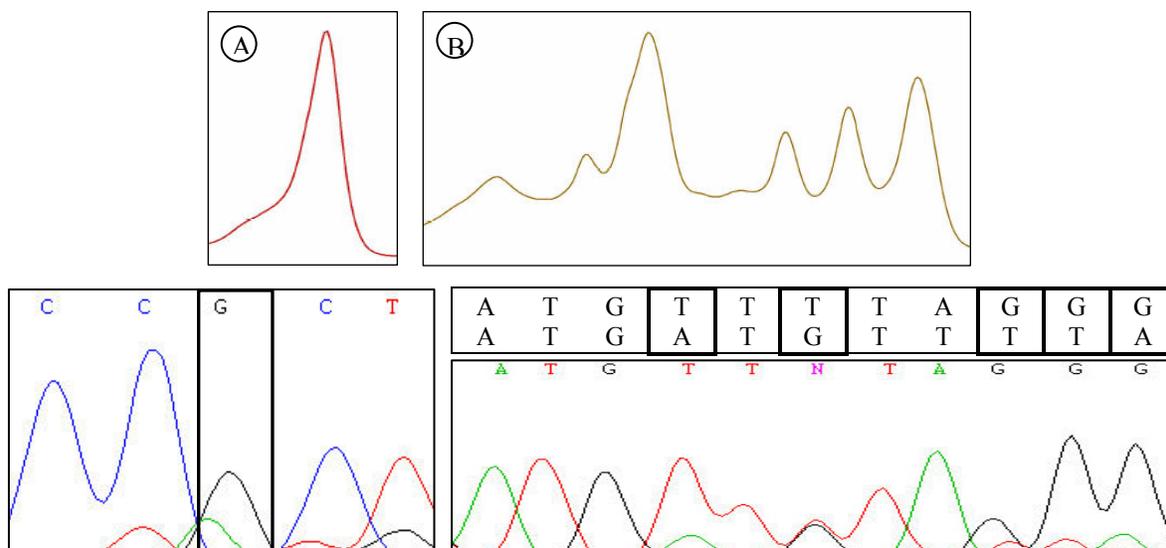
**Figura 21-** Perfis cromatográficos éxon 6 do gene *CHRNA7* e alterações detectadas por sequenciamento automático.

Para o éxon 7, foram observados padrões cromatográficos diferentes do normal em todas as temperaturas de análise (Figura 22). Por meio de sequenciamento automático, foram identificadas duas alterações no éxon: c.654C>T e c.690G>A, ambas silenciosas e presentes em bancos de dados de SNP (rs1042722 e rs386715).



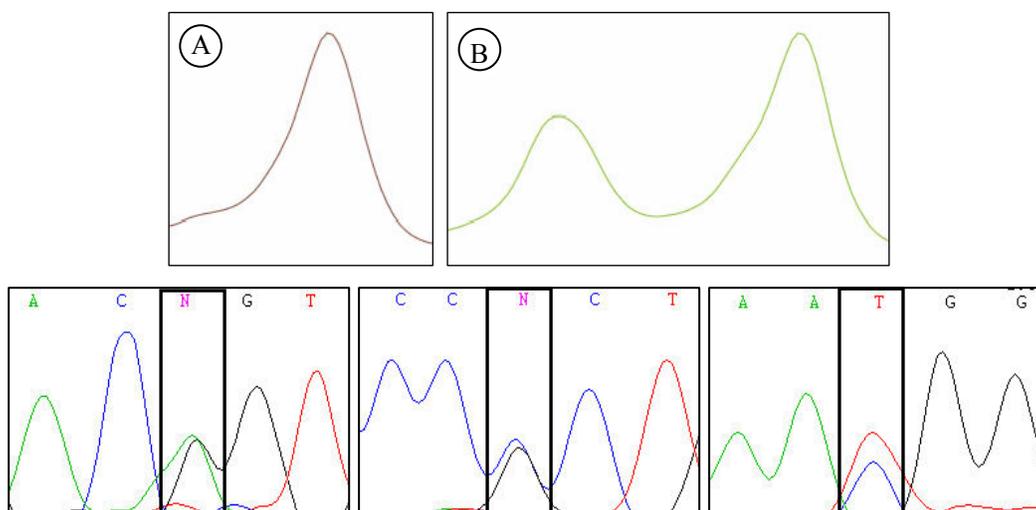
**Figura 22-** Alterações detectadas por sequenciamento automático no éxon 7 do gene *CHRNA7*.

Foram observados perfis cromatográficos alterados e complexos nas duas temperaturas de análise do éxon 8 (Figura 23). O sequenciamento automático de fragmentos alterados permitiu a detecção da substituição IVS8-21A>G (rs2651439) e de uma inserção de três bases no íntron de difícil identificação que pode ser condizentes com uma das inserções descritas nos bancos de dados do NCBI: IVS8-15\_16insGTG (rs57851846) ou IVS8-11\_12GTT (rs10649395). Também foi identificada uma transversão já descrita IVS8+92G>C (rs425138) em homozigose.



**Figura 23-** Perfil cromatográfico normal (A) e alterado (B) do éxon 8 do gene *CHRNA7* e alterações detectadas por sequenciamento automático.

Foram observados três padrões cromatográficos para o éxon 9 (Figura 24). O padrão B foi observado em oito pacientes e o sequenciamento automático de amostras com esse padrão permitiu a identificação de uma alteração no íntron (IVS9+87T>C) presente em bancos de dados (rs2564605). No paciente com o padrão C (cromatograma indisponível) foi identificada, além dessa substituição, outras duas alterações já descritas: IVS9+37C>G (rs2564606) e c.933A>G (rs384470), que é silenciosa.



**Figura 24-** Perfil cromatográfico normal (A) e alterado (B) do éxon 9 do gene *CHRNA7* e alterações detectadas por sequenciamento automático.

#### 4.2.3. GENE *CHRM5*

Os pacientes com **EBIECT** tiveram o éxon codificante do gene *CHRM5* submetido à triagem de mutações por DHPLC.

Para os fragmentos 1a, 1d e 1e, não foram observados perfis cromatográficos alterados nos pacientes em nenhuma das temperaturas de análise.

Embora alguns pacientes tenham apresentado perfil cromatográfico ligeiramente distinto dos demais para os fragmentos 1b e 1c, o sequenciamento automático não revelou alterações na sequência nucleotídica desses indivíduos.

#### 4.2.4. GENE *CX36*

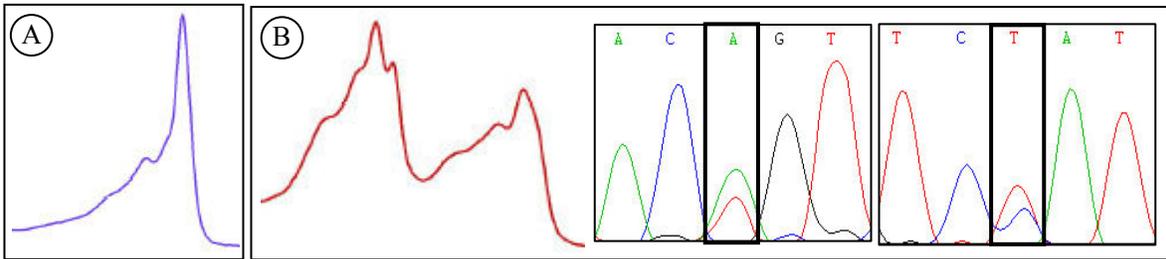
Os pacientes com **EBIECT** tiveram os éxons do gene *CX36* submetidos à triagem de mutações por DHPLC. As alterações identificadas nas sequências nucleotídicas encontram-se na Tabela 11.

**Tabela 11-** Alterações encontradas nas sequências nucleotídicas do gene *CX36*.

Éxon	Alterações identificadas
2a	c.333A>T (rs651724); c.369C>T (rs35174018)
2b	c.558C>T (rs3743123)

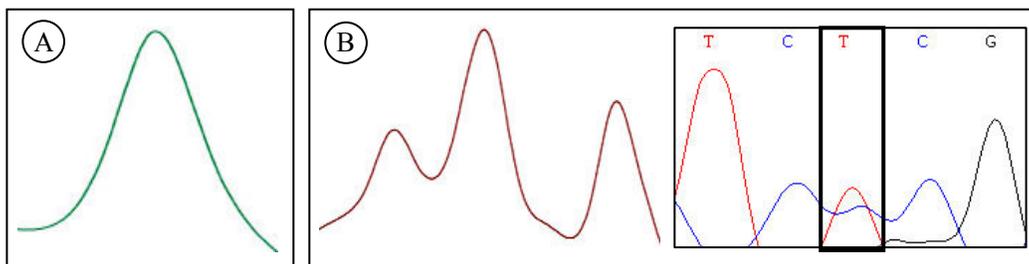
Na triagem de mutações realizada para o éxon 1, não foram encontradas alterações nos perfis cromatográficos dos pacientes.

Na análise cromatográfica do fragmento 2a, um paciente apresentou o perfil cromatográfico mostrado na Figura 25, e o sequenciamento automático desse fragmento permitiu a identificação de duas alterações já descritas em bancos de dados: c.333A>T (rs651724) e c.369C>T (rs35174018), ambas silenciosas. Outros dois pacientes com padrão diferente do normal apresentaram apenas a transição c.369C>T. A transversão c.333A>T foi encontrada em homozigose em um paciente com padrão A submetido ao sequenciamento automático. Para esse fragmento, a triagem de mutações foi parcial.



**Figura 25-** Perfil cromatográfico normal (A) e alterado (B) do fragmento 2a do gene *CX36* e alterações detectadas por sequenciamento automático.

Para o fragmento 2b, nove pacientes apresentaram perfil cromatográfico alterado na segunda e na terceira temperaturas de análise (Figura 26). O sequenciamento automático permitiu a identificação da transição c.558C>T (rs3743123), que não resulta em troca do aminoácido na proteína codificada.



**Figura 26-** Perfil cromatográfico normal (A) e alterado (B) do fragmento 2b do gene *CX36* e alteração detectada por sequenciamento automático.

## ***5 - DISCUSSÃO***

## 5.1. EPILEPSIAS GENERALIZADAS COM CRISES FEBRIS

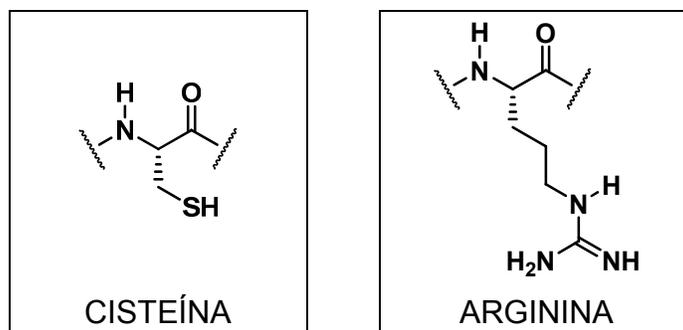
Os 21 pacientes com epilepsias generalizadas incluídos na casuística desse estudo foram diagnosticados com **EMGI** ou **EMA**, síndromes pertencentes ao espectro da EGCF+. Apesar de ambas representarem fenótipos graves, o comprometimento neurológico dos pacientes acometidos pela primeira síndrome é nitidamente maior e o prognóstico é sempre desfavorável.

Embora se acredite em uma base genética comum às epilepsias contidas no espectro, evidências contestam a hipótese de que a EMA esteja geneticamente relacionada à EGCF+<sup>69</sup>. A EMGI, por outro lado, possui etiologia genética bem estabelecida e condizente com os achados moleculares para EGCF+, sendo o gene *SCN1A* o principal relacionado a essa síndrome<sup>72-79</sup>.

### 5.1.1. GENE *SCN1A*

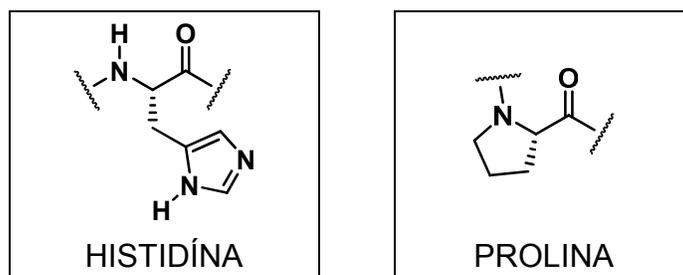
A triagem de mutações no gene *SCN1A* revelou um total de 20 alterações na sequência nucleotídica dos fragmentos amplificados, sendo 12 localizadas em íntrons e oito em éxons. Dentre as alterações identificadas na região codificante do gene, três destacam-se por promoverem troca de resíduo de aminoácido na subunidade  $\alpha$ -I do canal de sódio voltagem-dependente neuronal e outra se destaca por promover mudança na matriz de leitura. Nenhuma dessas quatro alterações está descrita nos bancos de dados do NCBI e são, portanto, inéditas.

A transição c.829T>C, localizada no éxon 6, provoca a substituição do resíduo de aminoácido no códon 277 de cisteína por arginina. A cisteína é um aminoácido apolar neutro que tende a formar pontes de dissulfeto, as quais estabilizam a estrutura da proteína, enquanto a arginina é o mais básico dos aminoácidos e possui cadeia lateral mais extensa (Figura 27). Segundo as análises computacionais e a escala de Grantham, essa troca é considerada patológica e afeta a função da proteína. Essa mutação não foi encontrada em nenhum dos 140 alelos de indivíduos controles analisados. Embora ainda seja necessário analisar mais indivíduos controles, as evidências obtidas até o momento apontam para uma provável implicação deletéria para essa mutação.



**Figura 27-** Estrutura dos resíduos de aminoácido cisteína e arginina.

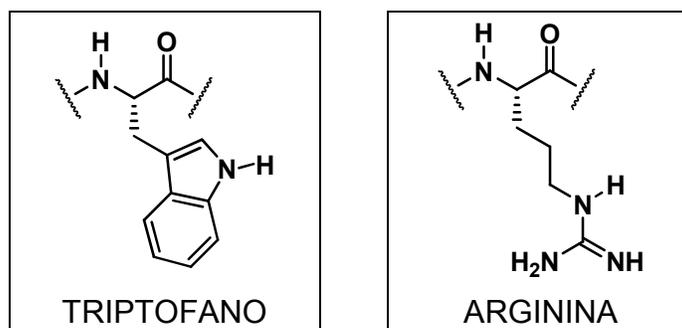
No éxon 7, foi encontrada a alteração c.971A>C, que leva à troca do resíduo de histidina por prolina no códon 324. A histidina é polar, enquanto a prolina é apolar, além de ser o único aminoácido que tem cadeia lateral formando um anel com o nitrogênio da cadeia principal (Figura 28) e, por isso, tem menos liberdade de rotação e de ângulos das ligações, deixando a estrutura da proteína mais rígida. As análises de predição do efeito dessa mutação foram divergentes, sendo que o resultado mais discrepante foi o atribuído pelo algoritmo Polyphen, o qual considerou a alteração benigna. No entanto, a confiabilidade desse resultado pode ser questionada, visto que o número de sequências alinhadas comparadas com a fornecida foi pequeno (três), o que, segundo o próprio programa, é um fator determinante para a precisão da análise. Sendo assim, são necessários mais estudos para compreender o real efeito funcional dessa alteração na proteína.



**Figura 28-** Estrutura dos resíduos de aminoácido histidina e prolina.

A alteração c.5434T>C no éxon 26 ocasiona a substituição do resíduo de triptofano por arginina no códon 1812. O triptofano é o aminoácido mais apolar e volumoso de todos e possui cadeia lateral aromática, enquanto a arginina, como mencionado anteriormente, é o

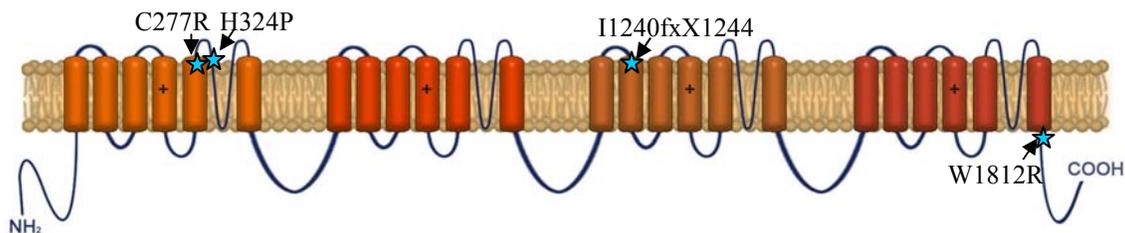
mais básico dos aminoácidos (Figura 29). Segundo as análises de predição do efeito dessa mutação, ela é patológica e afeta a função da proteína. Essa mutação não foi encontrada em nenhum dos 180 alelos de indivíduos controles analisados. O grupo controle ainda precisa ser expandido, mas é provável que a alteração em questão tenha uma implicação deletéria.



**Figura 29-** Estrutura dos resíduos de aminoácido histidina e prolina.

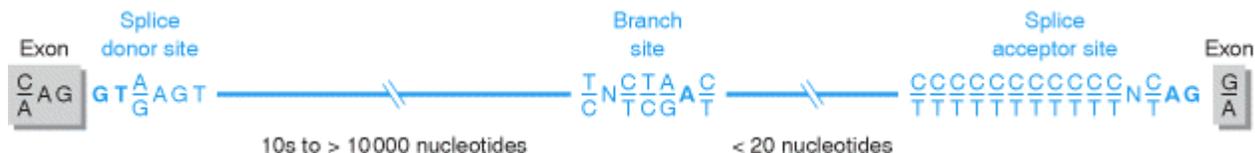
A inserção c.3719\_3720insGATA no éxon 19 promove uma alteração na matriz de leitura, resultando em resíduos de aminoácidos diferentes a partir desse ponto na sequência da proteína e término prematuro da cadeia, devido ao surgimento de um códon de terminação precoce. Como esse tipo de alteração é de difícil visualização ao sequenciamento automático, o ideal para sua confirmação é que o fragmento seja clonado e re-sequenciado, a fim de se obter a sequência nucleotídica de cada alelo isolado. Estudos futuros poderão elucidar melhor a função dessa alteração na patogenia da doença.

A Figura 30 ilustra a provável localização no canal de sódio das alterações identificadas. Observa-se que as alterações C277R e H324P estão próximas do poro pelo qual os íons atravessam a membrana, que é formado pelos segmentos 5 e 6 de cada domínio. A alteração I1240fsX1244 promove o término da cadeia no começo do terceiro domínio, resultando em perda de mais de um terço da proteína. A alteração W1812R está provavelmente localizada na porção final da proteína e pode estar relacionada com a formação do poro, ancoragem da proteína à membrana ou regulação. Sendo assim, todas podem afetar o funcionamento normal da proteína. No entanto, essas hipóteses só podem ser confirmadas com estudos estruturais e funcionais.



**Figura 30-** Provável localização das alterações encontradas na subunidade  $\alpha$ -I do canal de sódio.

Outras duas alterações possivelmente patogênicas foram identificadas no íntron, em sítios de *splicing* (ou recomposição): no primeiro nucleotídeo do íntron 4 (IVS4+1G>A) e no terceiro do íntron 8 (IVS8+3G>T). O *splicing* consiste em um processo de remoção dos íntrons no transcrito que dará origem ao RNAm maduro. Para que esse mecanismo ocorra de forma correta, é importante que as sequências determinantes da fronteira éxon-íntron dos sítios doadores e aceptores sejam conservadas, conforme ilustrado na Figura 31. A substituição de algum desses nucleotídeos pode prejudicar o processo de *splicing* e, conseqüentemente, afetar a estrutura e a função da proteína. No caso das duas alterações identificadas no presente estudo, a troca de base ocorre no sítio doador e pode estar relacionada com a doença. Entretanto, são necessários mais estudos acerca dos efeitos dessas alterações na proteína codificada para corroborar essa hipótese.



**Figura 31-** Nucleotídeos conservados nos sítios doador e receptor de *splicing*<sup>103</sup>.

Das alterações restantes que foram observadas no gene *SCN1A*, quatro são substituições silenciosas (c.345T>C, c.670T>C, c.1212A>G e c.2292T>C), localizadas nos éxons 2, 5, 9, e 13, respectivamente. Ainda não é possível tirar conclusões sobre o real papel dessas alterações sem a realização de mais estudos. Apesar de alterações que não resultam em troca de resíduo de aminoácido serem comumente classificadas como

polimorfismos neutros não relacionados a patologias, um recente trabalho demonstrou que esse tipo de polimorfismo pode afetar o processo de enovelamento da proteína e, conseqüentemente, sua função. Isso pode ocorrer quando um códon frequente é substituído por um raro, mesmo que corresponda ao mesmo aminoácido<sup>104</sup>.

A relevância das outras 10 alterações encontradas em íntrons também é difícil de ser prevista sem estudos adicionais. Como nove delas já estão descritas no banco de dados de SNPs do NCBI, é provável que não estejam relacionadas com a doença estudada e sejam polimorfismos neutros.

Algumas amostras correspondentes aos produtos de amplificação dos éxons 15, 21, 23 e 26 apresentaram perfis cromatográficos alterados na análise por DHPLC, porém não foram detectadas alterações nas sequências nucleotídicas das regiões codificantes ou intrônicas imediatamente adjacentes ao éxon. É possível que existam alterações no íntron que não puderam ser visualizadas por meio do sequenciamento automático, já que nem sempre é possível analisar o fragmento inteiro com confiabilidade.

Dentre todas as alterações identificadas, algumas foram encontradas também em homozigose. O princípio da técnica de DHPLC implica na detecção apenas de mutações em heterozigose, quando ocorre a formação de heteroduplex. No entanto, não se pode excluir a hipótese de que a base alterada, mesmo em homozigose, altere as propriedades físico-químicas do fragmento e influencie em sua interação com a coluna cromatográfica. Nos casos em que as alterações em homozigose foram identificadas também em indivíduos com padrão cromatográfico normal, é mais provável que as mesmas não estejam relacionadas a perfis cromatográficos específicos e tenham sido detectadas ao acaso.

As seis alterações potencialmente deletérias aqui descritas foram encontradas em pacientes com o fenótipo mais grave do espectro das epilepsias generalizadas com crises febris, a EMGI. Essas mutações foram observadas em 67% dos indivíduos acometidos por essa síndrome em nossa casuística, dado compatível com o relatado em estudos realizados em casuísticas no exterior<sup>72-79</sup>. Em compensação, não foram encontradas alterações provavelmente deletérias em pacientes com a outra forma de epilepsia do espectro estudada, a EMA. Esse resultado reforça a hipótese proposta por Nabbout e colaboradores de que os genes envolvidos na patogênese dessa síndrome não sejam os mesmos causadores da EMGI

e da EGCF+. Os autores sugerem que, embora EMA e EMGI apresentem os mesmos tipos de crises, apenas os pacientes com a EMGI são significativamente sensíveis à febre e talvez essa seja a principal característica clínica que a relacione com a EGCF+. Em nosso grupo de pacientes com EMA, 33% apresentaram crises febris, enquanto 100% dos pacientes com EMGI apresentaram esse tipo de crise, o que vai de acordo com a teoria proposta. De fato, a característica clínica que mais se correlacionou com a presença de mutações potencialmente deletérias em *SCN1A* nos pacientes com EMGI estudados foi ocorrência de crises em vigência de episódio febril de baixa intensidade. É possível que alguma característica clínica, como as crises febris, seja determinante para a inclusão de EMGI no espectro de EGCF+, e não de EMA. Sendo assim, é mais provável que outro gene esteja envolvido na etiologia da EMA.

Segundo dados da literatura, o tipo de mutação no gene *SCN1A* predominantemente encontrado na EMGI é o “sem sentido” (*nonsense*), que resulta na síntese de proteína truncada. Apenas uma das alterações identificadas neste estudo promove a mudança do códon de um aminoácido para um códon finalizador, embora não seja pela ocorrência de uma mutação sem sentido, mas sim devido à inserção de bases que alteram a matriz de leitura. Três das mutações identificadas são do tipo “troca de sentido”, que, apesar de estar mais frequentemente associada aos fenótipos mais brandos da EGCF+, neste caso pode estar provocando a substituição de aminoácidos evolutivamente conservados. Além disso, as propriedades físico-químicas dos aminoácidos pelos quais os originais são trocados podem ser suficientemente diferentes a ponto de provocar alterações drásticas na estrutura e função da proteína, resultando em um fenótipo clínico mais grave.

Como neste trabalho foram analisados apenas éxons e as junções intron-éxon do gene *SCN1A*, não se pode descartar a possibilidade de que mutações em regiões promotoras e reguladoras do íntron estejam implicadas na patogenia das epilepsias generalizadas no grupo de pacientes estudado.

### 5.3. EPILEPSIA BENIGNA DA INFÂNCIA COM ESPÍCULAS CENTRO-TEMPORAIS

A **EBIECT**, apesar de ser a mais comum dentre as epilepsias idiopáticas da infância, ainda não possui base genética bem estabelecida. A partir de dados na literatura sobre uma possível ligação genética à região cromossômica 15q14, adotou-se neste estudo a estratégia de triagem de mutações em genes candidatos contidos na região. Essa estratégia é particularmente eficaz quando se tem conhecimento prévio sobre fisiopatologia da doença e não requer um grande número de probandos ou famílias com muitos indivíduos afetados, como é o caso das técnicas de clonagem posicional. Foram escolhidos os genes *CHRNA7*, *CHRM5* e *CX36*, todos expressos no cérebro e envolvidos no processo das sinapses.

#### 5.2.1. GENE *CHRNA7*

Embora alguns indivíduos tenham apresentado perfis cromatográficos alterados para os éxons 2, 3, 4 e 5, não foram encontradas alterações nas sequências nucleotídicas das regiões codificantes e fronteiras éxon-íntron. Uma possível justificativa é que existam alterações em regiões intrônicas da sequência que não ficaram nítidas no sequenciamento automático. Outra possibilidade é que as alterações nos perfis cromatográficos encontradas sejam produtos inespecíficos ou excesso de reagentes que não puderam ser visualizados no gel de agarose, mas foram detectados por DHPLC.

A análise do gene *CHRNA7* a partir do éxon 5 foi complicada devido à existência de uma duplicação dos éxons 5 a 10 no genoma humano. Essa duplicação parcial, denominada *CHRFAM7A*, está localizada a cerca de 1Mb do gene *CHRNA7* no cromossomo 15 e possui semelhança superior a 99% com o gene original<sup>105</sup>. A divergência entre eles ocorre no íntron 4, aproximadamente 700pb antes do início do éxon 5. A duplicação não está presente em todos os indivíduos, mas a presença é mais comum do que a ausência<sup>106</sup>.

Como a triagem de mutações depende da amplificação inicial por PCR do fragmento de interesse a partir do DNA genômico, a reação realizada para os éxons 5 a 10 resulta na amplificação tanto de *CHRNA7* quanto de *CHRFAM7A*. Consequentemente, as alterações identificadas nesses fragmentos não podem ser atribuídas com exatidão a algum deles.

No éxon 6, foi detectada uma deleção (c.497\_498delTG) relatada como sendo um polimorfismo referente apenas à região duplicada. Esse resultado sugere que em nossa casuística existem indivíduos que possuem a duplicação *CHRFAM7A*, porém, torna-se difícil estimar o número total, já que a deleção de 2pb não está sempre presente no fragmento duplicado. Mesmo com as evidências apresentadas na literatura, não é possível afirmar que a essa alteração está localizada em *CHRFAM7A* em nossa casuística com os dados obtidos até o momento.

Outras três alterações foram identificadas na região codificante de *CHRNA7/CHRFAM7A*, duas no éxon 7 (c.654C>T e c.690G>A) e uma no éxon 9 (c.933A>G). Todas são silenciosas e já descritas em bancos de dados de SNP. Relatos na literatura mostram que as duas alterações no éxon 7 parecem ser polimórficas no gene *CHRNA7*, enquanto c.933A>G parece ser polimórfica também em *CHRFAM7A*<sup>105,106</sup>.

Foram identificadas também cinco alterações em íntrons (IVS6+11G>A, IVS8-21A>G, IVS8+92G>C, IVS9+87T>C, IVS9+37C>G), todas presentes em bancos de dados. Uma inserção de 3pb foi observada no intron 7, mas para sua identificação é necessário que o fragmento seja clonado e sequenciado.

As alterações identificadas neste estudo, mesmo se estiverem localizadas no gene *CHRNA7*, não parecem ser deletérias, com exceção da deleção no éxon 6, que causaria mudança na matriz de leitura e originaria um códon de terminação precoce. Entretanto, não é possível prever se elas afetam de alguma maneira o funcionamento ou a regulação da função da subunidade  $\alpha$ -7 do receptor colinérgico nicotínico sem a realização de estudos adicionais.

É interessante citar que o gene *CHRFAM7A* também é transcrito no cérebro humano<sup>105</sup>, embora ainda não se saiba se seu RNA é traduzido. Esse dado nos fornece base para supor que gene *CHRFAM7A* pode desempenhar um papel na modulação da expressão ou da função de *CHRNA7*. Além disso, o fato da presença dessa duplicação parcial ser mais comum do que a ausência pode significar que a mesma, ou alguma variante presente nela, como a deleção de 2pb, forneça uma vantagem adaptativa aos indivíduos que a possuem<sup>106</sup>. Sendo assim, a ausência de *CHRFAM7A* poderia estar relacionada com a patologia. Uma

evidência que reforça tal hipótese foi a identificação de uma família com epilepsia mioclônica juvenil segregando a ausência da duplicação<sup>107</sup>.

Como a triagem de mutações foi parcial, não incluindo dois éxons e a região promotora do gene *CHRNA7*, não se pode descartar totalmente a possibilidade de que mutações nessas regiões estejam implicadas na patogenia da EBIECT no grupo de pacientes estudado.

Embora não tenha sido possível diferenciar a origem das alterações encontradas com base nas técnicas empregadas, o presente estudo representa uma abordagem inicial da triagem de mutações em *CHRNA7* e *CHRFAM7A* para EBIECT, sendo que estudos futuros poderão elucidar uma possível relação entre esses genes e a doença estudada. Além disso, os dados obtidos contribuem com a geração de conhecimento acerca do gene *CHRNA7*, que é pouco investigado em epilepsias, apesar de ser um forte candidato, e de *CHRFAM7A*, cuja função permanece desconhecida.

### **5.2.2. GENE *CHRM5***

A região codificante do gene *CHRM5* foi dividida em cinco fragmentos para possibilitar a análise por DHPLC, que só analisa com confiabilidade fragmentos de até 700pb. Foram observados padrões cromatográficos diferentes do normal em apenas dois fragmentos. Entretanto, o sequenciamento automático de amostras com o perfil alterado não revelou alterações na sequência nucleotídica. Como a diferença entre os perfis cromatográficos era muito sutil, é possível que as alterações observadas no DHPLC correspondam a fragmentos cuja amplificação gerou produtos inespecíficos de difícil visualização no gel de agarose, mas capazes de gerar cromatogramas com mais de um pico. Além disso, existe a possibilidade de existirem alterações que não puderam ser visualizadas nitidamente nas regiões intrônicas por sequenciamento automático.

Os dados apresentados nesse estudo indicam que a EBIECT não parece ter base genética relacionada ao gene *CHRM5*.

### 5.2.3. GENE *CX36*

A análise do gene *CX36* permitiu a identificação de três alterações na região codificante (c.333A>T, c.369C>T e c.558C>T). Nenhuma delas resulta em troca de aminoácido na proteína codificada e todas estão descritas em bancos de dados de SNPs. São necessários mais estudos para saber se essas alterações são polimorfismos que não afetam a função da conexina.

Ainda não é possível excluir o gene *CX36* como potencialmente envolvido na EBIECT em pelo menos alguns pacientes da nossa amostra, já que a triagem de mutações nesse gene foi parcial.

### 5.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em termos de correlação entre genótipo e fenótipo, as seis alterações potencialmente deletérias identificadas no gene *SCN1A* foram encontradas apenas em pacientes com EMGI, e parecem estar correlacionadas com crises em vigência de febre baixa. A análise de mutações no mesmo gene em pacientes com EMA não revelou variantes deletérias, suportando a hipótese de que essa síndrome não esteja geneticamente incluída no espectro de EGCF+. Em nossa amostra de pacientes estudada, outro gene parece estar envolvido na etiologia de EMA.

No estudo da EBIECT, os resultados obtidos não fornecem evidências de implicação dos genes *CHRNA7*, *CHRM5* e *CX36* na patogenia da doença nos pacientes analisados. O gene *CHRM5* parece não desempenhar um papel importante na etiologia da doença, porém o mesmo ainda não pode ser afirmado para *CHRNA7* e *CX36*.

A dificuldade em se esclarecer as bases genéticas para essa epilepsia pode ser justificada por seu caráter complexo e pela ocorrência de heterogeneidade genética. Em um recente estudo, Neubauer e colaboradores<sup>108</sup> mostraram que alterações nos genes *KCNQ2* e *KCNQ3* podem contribuir para etiologia de síndromes epilépticas idiopáticas comuns como a EBIECT, em contradição a trabalhos anteriores do próprio grupo de pesquisa que mostraram resultados negativos para esses *loci* na análise de ligação. Os autores justificaram essa incoerência pelo fato da relação entre genótipo e fenótipo, que é uma

condição crucial para os estudos de ligação, estar evidente em apenas uma minoria das famílias estudadas.

Além disso, acredita-se que a herança genética esteja relacionada ao traço das espículas centro-temporais no EEG e não à síndrome epiléptica em si. Esse fator complica as análises de correlação genótipo-fenótipo para EBIECT, uma vez que esse traço do EEG pode ser observado na presença ou ausência das crises epilépticas e sua base genética pode ser mal interpretada.

Por fim, alguns autores afirmam que, embora a EBIECT seja geneticamente determinada, influências genéticas convencionais podem ser menos importantes que outros mecanismos, como fatores ambientais, mutações somáticas e alterações epigenéticas<sup>109</sup>.

## ***6 - CONCLUSÕES***

- Foram encontradas seis alterações potencialmente deletérias no gene *SCN1A* em pacientes com epilepsia mioclônica grave da infância, perfazendo um total de 67% de nossa casuística com esse diagnóstico.
  - As substituições c.829T>C, c.971A>C e c.5434T>C são potencialmente deletérias, pois resultam na troca de resíduos de aminoácidos conservados na proteína por outros de características químicas distintas.
  - A inserção c.3719\_3720insGATA promove uma alteração na matriz de leitura, gerando um códon de terminação precoce e, conseqüentemente, originando uma proteína truncada.
  - As variantes IVS4+1G>A e IVS8+3G>T estão localizadas em sítios doadores de *splicing* e, sendo assim, podem influenciar na tradução da proteína e afetar sua função.
- A característica clínica que mais se correlacionou com a presença de mutações potencialmente deletérias no gene *SCN1A* nos pacientes com epilepsia mioclônica grave da infância foi ocorrência de crises em vigência de episódio febril de baixa intensidade.
- Não foram encontradas alterações potencialmente deletérias no gene *SCN1A* em pacientes com epilepsia mioclônico-astática.
- O gene *CHRM5* não parece estar envolvido com a etiologia de EBIECT em nossa amostra de pacientes.
- Não foram encontradas alterações potencialmente deletérias nos genes *CHRNA7* e *CX36*, localizados na região candidata 15q14, em pacientes com epilepsia benigna da infância com espículas centro-temporais.

## ***7 – REFERÊNCIAS***

1. Guerreiro CAM, Guerreiro MM, Cendes F, Lopes-Cendes I. *Epilepsia*. São Paulo: Lemos Editorial; 2000. p 1-3; 71-74.
2. 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.
3. Scott RA, Lhatoo SD, Sander JW. The treatment of epilepsy in developing countries: where do we go from here? *Bull World Health Organ*. 2001; 79:344-51.
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. Engel JJr. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: Report for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*. 2001; 42:796-803.
6. Yacubian EM. Treatment of epilepsy in childhood. *J Pediatr*. 2002;78 Suppl 1:S19-27.
7. Sillanpää M, Cross JH. The psychosocial impact of epilepsy in childhood. *Epilepsy & Behavior*. 2009; 15:S5–S10.
8. 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.
9. Dulac O. Benign Syndromes in Childhood Epilepsy. In: Porter RJ, Chadwick D. *The epilepsies 2*. 1997. p.167.
10. Aldenkamp AP, Alpherts WCJ, Dekker MJA, Overweg J. Neuropsychological aspects of learning disabilities in epilepsy. *Epilepsia*. 1990; 31(Suppl. 4):S9-20.
11. Scheffer IE, Berkovic SF. Generalized epilepsy with febrile seizures plus: a genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes. *Brain*. 1997; 120:479–90.
12. Doose H, Gerken H, Leonhardt R, Voelzke E, Voelz C. Centrencephalic myoclonic-astatic petit mal. Clinical and genetic investigations. *Neuropediatric*. 1970; 2: 59-78.
13. Doose H, Sitepu B. Childhood epilepsy in a German city. *Neuropediatrics*. 1983; 14: 220-4.
14. 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.
15. Doose H. Myoclonic-astatic epilepsy. *Epilepsy Res*. 1992; Suppl 6:163-8.

16. 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.
17. Dravet C. Les épilepsies graves de l'enfant. *Vie Med*. 1978 ; 8: 543–8.
18. Hurst DL. Epidemiology of Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy. *Epilepsia*. 1990; 31(4):397-400.
19. 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.
20. Nayrac P, Beaussart M. Les pointe-ondes prérolandiques: Expression EEG très particulière: Etude électroclinique de 21 cas. *Rev Neurol*. 1958; 99: 201-6.
21. Dalla Bernadina P, Chiamenti C, Capovilla G, Colamaria V. Benign Partial Epilepsies in Childhood. In: *Epileptic Syndromes in Infancy, Childhood and Adolescence*. London: 1985. p.137-149.
22. Lundberg S, Eeg-Olofsson, O. Rolandic epilepsy: a challenge in terminology and classification. *European Journal of Paediatric Neurology*. 2003; 7:239–41.
23. Cavazzutti GB. Epidemiology of different types of epilepsy in school age children of Modena, Italy. *Epilepsia*. 1980; 2:57-62.
24. O'donohoe NV. *Epilepsias da Infância*. São Paulo: 1982. p.105-110.
25. Dravet C. Benign epilepsy with centrotemporal spikes: do we know all about it? In Wolf P. *Epileptic seizures and syndromes*. London: 1994. p.231-40.
26. Eeg-Olofsson O. Rolandic epilepsy. In Bazil, CW; Malow, BA; Sammaritano, MR *Sleep and Epilepsy: the Clinical spectrum*. Amsterdam: 2002. p 257-63.
27. Lindgren A, Kihlgren M, Melin L, Croona C, Lundberg S, Eeg-Olofsson O. Development of cognitive functions in children with rolandic epilepsy. *Epilepsy & Behavior*. 2004; 5: 903–10.
28. Monjauze C, Tuller L, Hommet C, Barthez Ma, Khomsi A. Language in benign childhood epilepsy with centrotemporal spikes abbreviated form: rolandic epilepsy and language. *Brain Lang*. 2005; 92:300-8.
29. Northcott E, Connolly AM, Berroya A, Sabaz M, McIntyre J, Christie J *et al.* The neuropsychological and language of children with benign rolandic epilepsy. *Epilepsia*. 2005; 46:924-30.

30. Santanelli P, Bureau M, Magaouda A, Gobbi G, Roger J. Benign partial epilepsy with centro-temporal (or rolandic) spikes and brain lesion. *Epilepsia*. 1989; 30:182-8.
31. Morikawa, T; Tenaguchi, N; Shigematsu, H. Functional partial epilepsies in childhood. *Jpn J Psychiatry Neurol*. 1986; 40:301-6.
32. Lennox WG. Heredity of epilepsy as told by relatives and twins. *JAMA*. 1951; 146:529-36.
33. Lennox WG. *Epilepsy and Related Disorders*. Boston, Little Brown Company, 1960.
34. Metrakos JD, Metrakos K. Genetics of convulsive disorder: II-Genetic and electroencephalographic studies in centrencephalic epilepsy. *Neurology*. 1961; 11:474-83.
35. Reid CA, Berkovic SF, Petrou S. Mechanisms of human inherited epilepsies. *Prog Neurobiol*. 2009; 87(1):41-57.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. Escayg A, Baulac S, Moulard B et al. Mutations of *SCN1A* encoding a neuronal sodium channel in two families with GEFS+2. *Nat Genet*. 2000; 24:343–5.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. Ito M, Nagafuji H, Okazawa H, Yamakawa K et al. Autosomal dominant epilepsy with febrile seizures plus with missense mutations of the (Na<sup>+</sup>)-channel  $\alpha$ -1 subunit gene, *SCN1A*. *Epilepsy Res*. 2002. 48: 15–23.

44. Nakayama J, Yamamoto N, Hamano K, Iwasaki N, Ohtad M, Nakahara S et al. Failure to find evidence for association between voltage-gated sodium channel gene *SCN2A* variants and febrile seizures in humans. *Neurosci Lett*. 2002;329(2):249-51.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. Steinlein OK, Mulley JC, Propping P et al. A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 4$  subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet*. 1995; 11:201-3.
51. Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C et al. A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science*. 1998; 279:403-6.
52. Charlier C, Singh NA, Ryan SG et al. A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet*. 1998; 18:53-5.
53. Wallace RH, Wang DW, Singh R et al. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na<sup>+</sup>-channel beta1 subunit gene *SCN1B*. *Nat Genet*. 1998; 19:366-70.
54. 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.
55. De Fusco M, Becchetti A, Patrignani A et al. The nicotinic receptor  $\beta 2$  subunit is mutant in nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet*. 2000; 26:275-6.
56. Escayg A, de Waard M, Lee DD et al. Coding and noncoding variations of the human calcium-channel 4-subunit gene *CACNB4* in patients with idiopathic generalised epilepsy. *Am J Hum Genet*. 2000; 66:1531-9.

57. Sugawara T, Tsurubuchi Y, Agarwala KL, Ito M et al. A missense mutation of the Na<sup>1</sup> 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.
58. Heron SE, Crossland KM, Andermann E et al. Sodium-channel defects in benign familial neonatal–infantile seizures. Lancet. 2002; 360:851–2.
59. Jouvenceau A, Eunson LH, Spauschus A, et al. Human epilepsy associated with dysfunction of the brain P/Q-type calcium channel. Lancet 2001; 358:801–807.
60. Imbrici P, Jaffe SL, Eunson LH, Davies NP, Herd C, Robertson R et al. Dysfunction of the brain calcium channel CaV2.1 in absence epilepsy and episodic ataxia. Brain. 2004 127(Pt 12):2682-92.
61. Cossette P, Liu L, Brisebois K et al. Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. Nat Genet. 2002; 31:184–9.
62. Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B et al. Mutations in LGI1 cause autosomal dominant partial epilepsy with auditory features. Nat Genet. 2002; 30:335–41.
63. Chen C, Westenbroek RE, Xu X, Edwards CA, Sorenson DR et al. Mice lacking sodium channel beta1 subunits display defects in neuronal excitability, sodium channel expression, and nodal architecture. J. Neurosci. 2004; 24:4030–42.
64. Heron SE, Khosravan H, Varela D, Bladen C et al. Extended spectrum of idiopathic generalized epilepsies associated with CACNA1H functional variants. Ann. Neurol. 2004; 62, 560–8.
65. Haug K, Warnstedt M, Alekov AK, Sander T, Ramirez A, Poser B, Maljevic S et al. Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. Nat. Genet. 2003; 33:527–32.
66. Suzuki T, Delgado-Escueta AV, Aguan K, Alonso ME et al. Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. Nat. Genet. 2004; 36: 842–49.
67. Aridon P, Marini C, Di Resta C, Brillì E, De Fusco M et al. Increased sensitivity of the neuronal nicotinic receptor alpha 2 subunit causes familial epilepsy with nocturnal wandering and ictal fear. Am. J. Hum. Genet. 2006; 79: 342–350.
68. Tang B, Sander T, Craven KB, Hempelmann A, Escayg A. Mutation analysis of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels HCN1 and HCN2 in idiopathic generalized epilepsy. Neurobiol. Dis. 2008; 29:59–70.
69. 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.

70. Fujiwara T, Nakamura H, Watanabe M, Yagi K, Seino M, Nakamura H. Clinicoelectrographic concordance between monozygotic twins with myoclonic epilepsy in infancy. *Epilepsia*. 1990;31:281–6.
71. Benlounis A, Nabbout R, Feingold J et al. Genetic predisposition to severe myoclonic epilepsy in infancy. *Epilepsia* 2001; 42:204–9.
72. 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.
73. Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, Fukushima K. et al. Frequent Mutations of *SCN1A* in severe myoclonic epilepsy in infancy. *Neurology*. 2002; 58: 1122–4.
74. Fujiwara T, Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, Takahashi Y et al. Mutations of sodium channel alpha type 1 (*SCN1A*) in intractable childhood epilepsies with frequent generalized tonic–clonic seizures. *Brain*. 2003; 126:531– 46.
75. Gennaro E, Veggiotti P, Malacarne M et al. Familial severe myoclonic epilepsy of infancy: truncation of Nav1.1 and genetic heterogeneity. *Epileptic Disord*. 2003; 5:21–25.
76. Nabbout R, Gennaro E, Dalla Bernardina B, Dulac O et al. Spectrum of *SCN1A* mutations in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Neurology*. 2003; 60: 1961–7.
77. Wallace RH, Hodgson BL, Crinton BE, Gardiner RM et al. Sodium channel alpha1-subunit mutations in severe myoclonic epilepsy of infancy and infantile spasms. *Neurology*. 2003; 61: 765–9.
78. Fukuma G, Oguni H, Shirasaka Y, Watanabe et al. Mutations of neuronal voltagegated Na<sup>+</sup> channel alpha 1 subunit gene *SCN1A* in core severe myoclonic epilepsy in infancy (SMEI) and in borderline SMEI (SMEB). *Epilepsia*. 2004; 45:140–8.
79. Kimura K, Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E et al. A missense mutation in *SCN1A* in brothers with severe myoclonic epilepsy in infancy (SMEI) inherited from a father with febrile seizures. *Brain Dev*. 2005; 27:424–30.
80. Lent R. Cem bilhões de neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência. Atheneu, 2004. p 77, 78, 101, 114.
81. Mulley JC, Scheffer IE, Petrou S et al. *SCN1A* mutations and epilepsy. *Hum Mutat*. 2005; 25(6):535-42.

82. Ceulemans L, Claes L, Laga LG. Clinical correlations of mutations in the SCN1A gene: from febrile seizures to severe myoclonic epilepsy in infancy. *Pediatr. Neurol.* 2004; 30: 236–243.
83. Graves, T.D. Ion channels and epilepsy. *QJM.* 2006; 99(4):201-17.
84. Rhodes TH, Vanoye CG, Ohmori I et al. Sodium channel dysfunction in intractable childhood epilepsy with generalized tonic-clonic seizures. *J Physiol.* 2005; 569:433-45.
85. Bray PF, Wisner WC. Evidence for a Genetic Etiology of Temporal Central abnormalities in Focal epilepsy. *N Engl J Med.* 1964; 271: 926-33.
86. Heijbel, J; Blom, S; Rasmuson, M. Benign epilepsy of childhood with centrotemporal EEG foci: a genetic study. *Epilepsia.* 1975; 16:285-93.
87. Doose, H; Baier, WK. Benign partial epilepsy and related conditions: multifactorial pathogenesis with hereditary impairment of brain maturation. *Eur J Pediatr.* 1989; 149: 152-8
88. Whitehouse W, Diebold U, Rees M, Parker K, Doose H, Gardiner RM. Exclusion of linkage of genetic focal sharp waves to the HLA region on chromosome 6p in families with benign partial epilepsy with centrotemporal sharp waves. *Neuropediatrics.* 1993;24(4):208-10.
89. Rees M, Diebold U, Parker K, Doose H, Gardiner Rm, Whitehouse WP. Benign childhood epilepsy with centrotemporal spikes and the focal sharp wave trait is not linked to the fragile X region. *Neuropediatrics.* 1993;24(4):211-3.
90. Neubauer BA, Moises HW, Lässker U, Waltz S, Diebold U, Stephani U. Benign childhood epilepsy with centrotemporal spikes and electroencephalography trait are not linked to EBN1 and EBN2 of benign neonatal familial convulsions. *Epilepsia.* 1997; 38(7):782-7.
91. Neubauer BA, Fiedler B, Himmelein B et al. Centerotemporal spikes in families with rolandic epilepsy: linkage to chromosome 15q14. *Neurology,* 1998; 51:1608–12.

92. Steinlein OK, Neubauer BA, Sander T, Song L, Stoodt J, Mount DB. Mutation analysis of the potassium chloride cotransporter KCC3 (SLC12A6) in rolandic and idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsy Research*. 2001; 44:191–5.
93. Barrantes F J, Aztiria E, Rauschemberger M B, Vasconsuelo A. The Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor in Some Hereditary Epilepsies. *Neurochemical Research*. 2000; 25(5): 583–90.
94. Connors W, Bear MF, Paradiso M.A. *Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso*. Artmed, 2002. p100, 101.
95. Mas C, Taske N, Deutsch S, Guipponi et al. Association of the connexin36 gene with juvenile myoclonic epilepsy. *J. Med. Genet*. 2004; 41.
96. Hempelmann A, Armin H, Sander T. Confirmatory evidence for an association of the connexin-36 gene with juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy Research*.
97. Berkovic SF, Scheffer IE. Genetics of the Epilepsies. *Epilepsia*. 2001; 42 (5): 16-23.
98. Fonseca LC, Tedrus GMAS, Pacheco EMC. Epileptiform EEG discharges in benign childhood epilepsy with centrotemporal spikes: Reactivity and transitory cognitive impairment. *Epilepsy Behav*. 2007; 11:65–70.
99. Fonseca LC, Tedrus GMAS, Pacheco EMC, Berretta MF, Campregher AA, Costa DM. Benign childhood epilepsy with centro-temporal spikes: correlation between clinical, cognitive and EEG aspects. *Arq Neuropsiquiatr*. 2007; 65(3A):569-75.
100. 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.
101. Xiao W, Oefner PJ. Denaturing High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *Human Mutation*. 2001; 17: 439-474.
102. Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science*. 1974; 187: 822-4.
103. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics* 2, 1999.

104. 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.
105. Gault J, Robinson M, Berger R, Drebing C, Logel J, Hopkins J et al. Genomic organization and partial duplication of the human alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene (CHRNA7). *Genomics*. 1998; 52: 173–185.
106. Riley B, Williamson M, Collier D, Wilkie H, Makoff A. A 3Mb map of a large segmental duplication overlapping the a7 nicotinic acetylcholine receptor gene (CHRNA7) at human 15q13–q14. *Genomics*. 2002; 79: 197–209.
107. Taske NL, Williamson MP, Makoff A, Bate L, Curtis D, Kerr M. Evaluation of the positional candidate gene CHRNA7 at the juvenile myoclonic epilepsy locus (EJM2 ) on chromosome 15q13–14. *Epilepsy Research*. 2002; 49: 157–72.
108. Neubauer BA, Waldegger S, Heinzinger J, Hahn A, Kurlemann G, Fiedler F et al. KCNQ2 and KCNQ3 mutations contribute to different idiopathic epilepsy syndromes. *Neurology*. 2008; 71:177-83
109. Vadlamudi L, Harley AS, Connellan MM, Milne RL, Hopper JL et al. Is Benign Rolandic Epilepsy Genetically Determined? *Ann Neurol*. 2004; 56:129–32.

**8 – ANEXOS**

## ANEXO 1

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://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**  
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.



**Universidade Estadual de Campinas**  
Departamento de Genética Médica

**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

### ANEXO 3

#### Dados clínicos dos pacientes com epilepsias generalizadas

ID	Síndrome	Sexo	Idade (anos)	Início das crises (meses)	Crises febris	Desenvolvimento neuropsicomotor	História familiar
1	<b>EMGI</b>	<b>F</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	+	<b>atraso</b>	-
2	<b>EMGI</b>	<b>M</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	+	<b>atraso</b>	-
3	<b>EMGI</b>	<b>F</b>	<b>18</b>	<b>5</b>	+	<b>atraso</b>	-
4	<b>EMGI</b>	<b>F</b>	<b>*</b>	<b>4</b>	+	<b>atraso</b>	-
5	<b>EMGI</b>	<b>F</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	+	<b>atraso</b>	+
6	<b>EMGI</b>	<b>M</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	+	<b>atraso</b>	-
7	EMGI	M	12	8	+	atraso	-
8	EMGI	M	11	3	+	atraso	+
9	EMGI	F	11	8	+	atraso	+
10	EMA	M	14	30	-	atraso	-
11	EMA	F	15	36	+	atraso	+
12	EMA	F	11	36	-	atraso	+
13	EMA	M	10	36	-	bom	-
14	EMA	F	14	60	-	atraso	-
15	EMA	M	10	43	-	atraso	-
16	EMA	M	11	36	+	bom	+
17	EMA	F	20	48	+	bom	-
18	EMA	M	7	30	-	bom	+
19	EMA	F	22	34	-	atraso	-
20	EMA	M	10	36	-	atraso	+
21	EMA	M	6	8	+	atraso	+

\*faleceu em 2006.

Em negrito: pacientes com alterações potencialmente deletérias no gene *SCN1A*.

## ANEXO 4

### Dados clínicos dos pacientes com EBIECT

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Início das crises (anos)	História familiar
1	F	13	8	+
2	F	14	1	-
3	M	15	7	+
4	M	13	7	+
5	M	14	4	+
6	F	16	5	+
7	M	16	7	+
8	F	14	3	-
9	F	14	5	+
10	M	15	3	-
11	F	15	9	-
12	M	15	2	-
13	F	12	3	-
14	F	15	6	-
15	F	16	3	+
16	M	14	5	+
17	F	13	4	-
18	M	18	3	+
19	F	16	5	+
20	F	9	6	+
21	F	18	3	+
22	M	17	5	+
23	M	18	7	-
24	M	13	4	-
25	F	15	7	-
26	F	15	7	+
27	M	12	6	+