

FÁBIO ROSSI TORRES

Este exemplar corresponde à versão final da
Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso
de Pós-Graduação Ciências Médicas da Facul-
dade de Ciências Médicas da UNICAMP, para
obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas,
área de Ciências Biomédicas do(a) aluno(a)
Fábio Rossi Torres.

Campinas, 22 de agosto de 2003.

Prof(a). Dr(a). Íscia Lopes Cendes
Orientador(a)



**ESTUDO DE MUTAÇÕES EM GENES RESPONSÁVEIS POR
DIFERENTES FORMAS DE DISTÚRBIOS DO
DESENVOLVIMENTO CORTICAL**

200402807

Apoio CAPES

CAMPINAS

2003

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

FÁBIO ROSSI TORRES

***ESTUDO DE MUTAÇÕES EM GENES RESPONSÁVEIS POR
DIFERENTES FORMAS DE DISTÚRBIOS DO
DESENVOLVIMENTO CORTICAL***

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

Orientadora: Prof. Dra Iscia Lopes-Cendes

Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Cendes

Apoio CAPES

CAMPINAS

2003

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP T636e
V	EX
TOMBO BDI	56998
PROC.	16-P-117104
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00193840-1

BIB ID 310640

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

T636e	<p>Torres, Fábio Rossi Estudo de mutações em genes responsáveis por diferentes formas de distúrbios do desenvolvimento cortical / Fábio Rossi Torres. Campinas, SP : [s.n.], 2003.</p> <p align="center">Orientador : Iscia lopes Cendes Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p align="center">1. Sistema Nervoso Central. 2. Genética. 3. Córtex cerebral. 4. *Displasias. I. Iscia Lopes Cendes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.</p>
-------	---

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Iscia Lopes-Cendes

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Iscia Lopes-Cendes

2. Prof(a). Dr(a). Christine Hackel

3. Prof. Dr. João Pereira Leite

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

Data: 22/08/2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pelo apoio científico a este projeto

À Profa. Dra. Íscia Lopes Cendes e ao Prof. Dr. Fernando Cendes, pela chance que me deram e pela confiança depositada no meu trabalho

A todos os colegas e amigos que fiz nestes anos de trabalho, pelos momentos divertidos que passamos juntos, pelos conselhos nos momentos de necessidade e pela ajuda profissional

A minha família, pelo suporte moral, força, carinho e amor que sempre me deram

	<i>PÁG.</i>
RESUMO	<i>xxi</i>
ABSTRACT	<i>xxv</i>
1- INTRODUÇÃO	29
2- OBJETIVOS	43
3- MATERIAIS E MÉTODOS	47
4- RESULTADOS	65
5- DISCUSSÃO	93
6- CONCLUSÃO	109
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
8- ANEXOS	125

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>APOe2</i>	apolipoproteína E2
CTCG	crises tônico-clônico generalizadas
DATP	adenosina deoxinucleotídeo trifosfato
DGTP	guanina deoxinucleotídeo trifosfato
DCTP	citossina deoxinucleotídeo trifosfato
DTTP	timina deoxinucleotídeo trifosfato
<i>DAB1</i>	gene <i>disable homolog 1</i>
DDC	desordens do desenvolvimento cortical
<i>DCX</i>	gene <i>doublecortin</i>
DMSO	dimetil sulfoxido
DFM	displasia frontometáfiseal
DNA	ácido desoxiribonucleico
<i>EMX1</i>	gene <i>empty spiracles 1</i>
<i>EMX2</i>	gene <i>empty spiracles 2</i>
ELAB	esquizencefalia de lábios abertos bilateral
ELAU	esquizencefalia de lábios abertos unilateral
ELFU	esquizencefalia de lábios fechados unilateral
<i>FGFR2</i>	gene receptor 2 do fator de crescimento de fibroblatos
<i>FLN1</i>	gene filamina 1
HNP	heterotopia nodular periventricular
HSB	heterotopia subcortical em banda
IG	Imunoglobulina

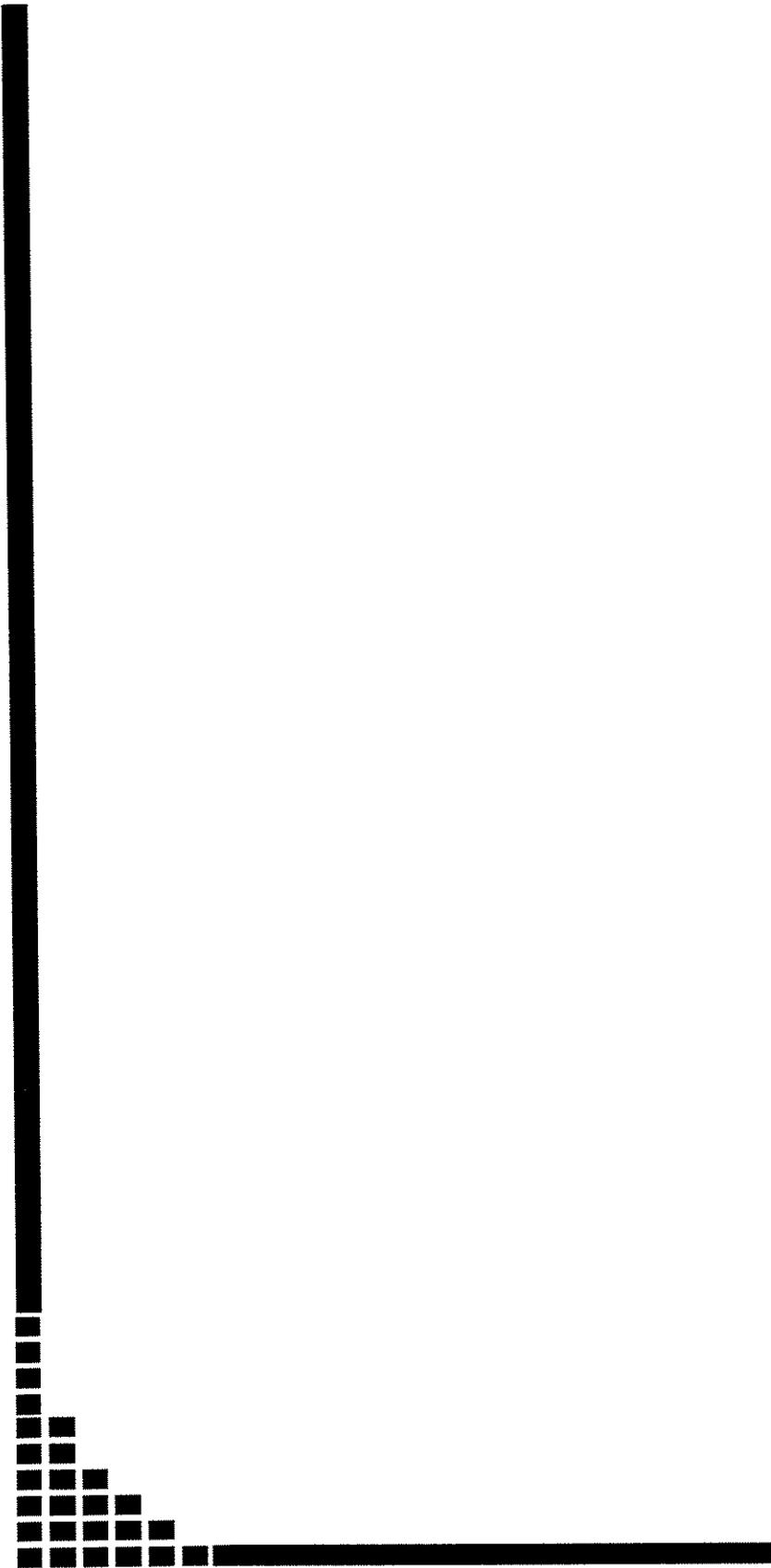
LACC	issencefalia com agenesia do corpo caloso
LHC	lissencefalia com hipoplasia cerebelar
LIS	lissencefalia
<i>LIS1</i>	gene lissencefalia I
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
OPD1	síndrome otopalatodigital tipo 1
OPD2	síndrome otopaltodigital tipo 2
<i>OTX1</i>	gene <i>orthodenticle 1</i>
<i>OTX2</i>	gene <i>orthodenticle 2</i>
<i>PAFAH1b1</i>	acetil hidrolase ativadora de plaquetas
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
RDNPM	retardo do desenvolvimento neuropsicomotor
<i>RELN</i>	gene <i>reelin</i>
RNA	ácido ribonucleíco
RM	ressonância magnética
SDS	dodecilsulfato de sódio
SLG	síndrome de Lennox-Gastaut
SMD	síndrome de Miller Dieker
SSCP	<i>single strand conformation polymorphism</i>
TC	tomografia computadorizada
TEMED – N,N,N,N	tetrametilenodiamina
UTR	<i>untranslated region</i>
<i>VLDRL</i>	gene receptor de baixa densidade da lipoproteína
WD	triptofano – aspartato

LISTA DE TABELAS

	<i>PÁG.</i>
TABELA 01- Classificação em graus do espectro LIS/HSB.....	35
TABELA 02- Polimorfismos do gene <i>LIS1</i>	37
TABELA 03- Classificação das lissencefalias.....	39
TABELA 04- Mutações descritas até o momento em pacientes com esquizencefalia.....	41
TABELA 05- Achados clínicos e de neuroimagem dos pacientes com HNP.	51
TABELA 06- Achados clínicos e de neuroimagem dos pacientes com o espectro LIS/HSB.....	53
TABELA 07- Achados clínicos e de neuroimagem dos pacientes com esquizencefalia.....	55
TABELA 08- <i>Primers</i> utilizados para amplificação do gene <i>FLNI</i>	58
TABELA 09- <i>Primers</i> utilizados para amplificação do gene <i>LIS1</i>	59
TABELA 10- <i>Primers</i> utilizados para amplificação do gene <i>DCX</i>	60
TABELA 11- <i>Primers</i> utilizados para amplificação do gene <i>EMX2</i>	61
TABELA 12- Neuroimagem e achados moleculares do grupo da HNP.....	75
TABELA 13- Neuroimagem e achados moleculares do grupo do espectro lissencefalia/HSB.....	79
TABELA 14- Neuroimagem e achados moleculares do grupo das esquizencefalias.....	88

	PÁG.
FIGURA 01- Esquema do gene <i>FLN1</i> , posição e seqüência dos <i>primers</i>	58
FIGURA 02- Esquema do gene <i>LIS1</i> , posição e seqüência dos <i>primers</i>	59
FIGURA 03- Esquema do gene <i>DCX</i> , posição e seqüência dos <i>primers</i>	60
FIGURA 04- Esquema do gene <i>EMX2</i> , posição e seqüência dos <i>primers</i>	61
FIGURA 05- Gel de poliacrilamida mostrando padrão de migração alterado para <i>FLN1</i>	67
FIGURA 06- Sequenciamento mostrando mutação 1159G→C no gene <i>FLN1</i> ..	68
FIGURA 07- Sequenciamento mostrando substituição IVSV+519C→G no gene <i>FLN1</i>	68
FIGURA 08- SSCP mostrando padrão de migração alterado do exon 8 de <i>LIS1</i>	69
FIGURA 09- Sequenciamento mostrando mutação 1385A→C no gene <i>LIS1</i>	70
FIGURA 10- SSCP mostrando padrão de migração alterado do exon 11 de <i>LIS1</i>	70
FIGURA 11- Alinhamento entre a seqüência da proteína LIS1 humana e ortólogas.....	71
FIGURA 12- Sequenciamento mostrando substituição 1805C→T no gene <i>LIS1</i>	72
FIGURA 13- Heredograma e SSCP alterado do exon 5 do gene <i>DCX</i>	73
FIGURA 14- Sequenciamento mostrando a substituição IVSV+19G→A.....	73
FIGURA 15- SSCP mostrando padrão de migração alterado para o gene <i>EMX2</i>	74

FIGURA 16-	Sequenciamento mostrando a substituição 796C→A no gene <i>EMX2</i>	75
FIGURA 17-	Heterotopia nodular periventricular bilateral, paciente hnp-07.....	76
FIGURA 18-	Heredograma de uma família portando HNP.....	77
FIGURA 19-	Heterotopia nodular periventricular bilateral, paciente hnp-05.....	77
FIGURA 20-	Heterotopias nodulares atípicas, pacientes hnp-08 e hnp-06.....	78
FIGURA 21-	LIS grau3a em um paciente com mutação em <i>LIS1</i>	80
FIGURA 22-	HSB de predomínio anterior, paciente lis-09.....	82
FIGURA 23-	Associação HSB-paquigiria, paciente lis-12.....	83
FIGURA 24-	HSB de predomínio anterior em homem, paciente lis 14.....	84
FIGURA 25-	HSB de predomínio posterior, paciente lis-02.....	86
FIGURA 26-	HSB espessa e difusa, paciente lis-07.....	87
FIGURA 27-	Heredograma da família do paciente esq-06.....	89
FIGURA 28-	EBLA em paciente com SSCP alterado.....	90
FIGURA 29-	EULA em paciente com substituição 796C→A no gene <i>EMX2</i>	91
FIGURA 30-	EBLA e F em paciente com substituição 796C→A no gene <i>EMX2</i>	92



RESUMO

Os distúrbios do desenvolvimento cortical (DDC) são uma das principais causas de deficiência mental e epilepsia e podem ter uma etiologia genética predominante. Extensos estudos determinaram genes envolvidos nos DDC como a heterotopia nodular periventricular (HNP), o espectro da lissencefalia/heterotopia subcortical em banda (LIS/HSB) e a esquizencefalia.

Os objetivos deste projeto foram: 1) pesquisar mutações nos quatro principais genes responsáveis por DDC (*FLNI*, *LISI*, *DCX* e *EMX2*) em um grupo de pacientes com diferentes formas de malformações corticais e 2) estabelecer correlações entre as mutações encontradas e características de neuroimagem.

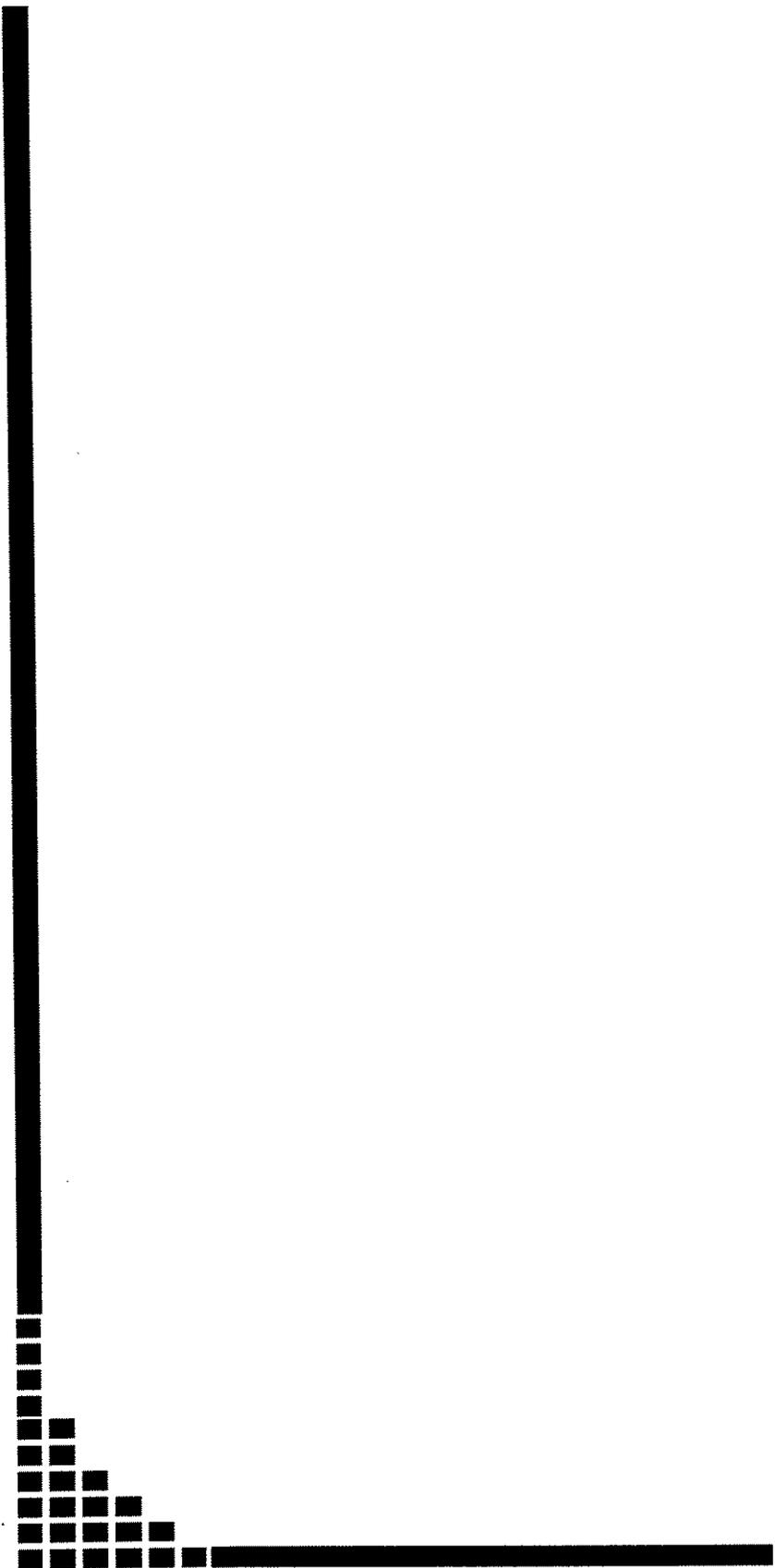
Todos indivíduos participantes deste estudo possuíam exames de tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM). Nossa amostra foi dividida em três grupos: a) pacientes com heterotopias nodulares, b) portadores do espectro LIS/HSB e c) pacientes com esquizencefalia.

Os pacientes foram genotipados pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se *primers* descritos na literatura. Os produtos de PCR foram analisados pela técnica de *single strand conformation polymorphism* (SSCP) e subsequentemente sequenciados manualmente ou por sequenciamento automático.

Foram analisados 58 indivíduos com DDC. Nove possuíam heterotopias nodulares, 15 tinham o espectro LIS/HSB e 34 eram portadores de esquizencefalias. Também genotipamos 50 indivíduos normais pertencentes a um grupo controle. A pesquisa de mutações do gene *FLNI* no grupo da heterotopias nodulares revelou uma mutação 1159G→C em 2 indivíduos relacionados apresentando o padrão clássico de HNP. Além disso, encontramos uma variante neutra IVSV + 519C→G em 3 pacientes (1 com padrão clássico e outros 2 com padrão atípico de HNP). No grupo das LIS/HSB 7 indivíduos mostraram-se portadores da substituição 1805C → T também presente em 9 indivíduos normais. Um outro indivíduo com agiria/paquigira possui uma mutação 1385A→C levando a substituição de uma histidina por uma prolina na posição 277 da proteína. Além disso, uma variante normal rara IVSV + 19G→A no gene *DCX* foi encontrada em uma paciente com agiria/paquigiria. No grupo das esquizencefalias foram identificados 4 indivíduos com

a alteração 796C→A que não leva a troca de uma arginina por outro aminoácido. Esta mesma alteração foi detectada em 4 controles normais.

Concluimos que: a) pacientes com padrões atípicos de HNP não possuem mutação nos primeiros 6 exons codificantes do gene *FLNI* e confirmamos a alta incidência de mutações no gene *FLNI* em casos familiares de HNP; b) mutações de sentido trocado no gene *LIS1* são raras em pacientes com LIS/HSB; c) a substituição 1805C→T é o mesmo polimorfismo descrito por KOCH et al. (1996); d) mutações de sentido trocado em *LIS1* e sua localização em domínios WD terminais não estão associados com graus leves de lissencefalia; e) a substituição IVSV+19G→A no gene *DCX* é uma variante rara; f) a ausência de mutações no gene *DCX* pode ser explicada pela pequena amostra de pacientes com HSB, mosaïcismo somático ou baixa estringência quanto as características de neuroimagem; g) as esquizencefalias parecem não ter base genética no gene *EMX2* já que detectamos apenas polimorfismos neutros neste gene.



ABSTRACT

Cortical development malformations (CDM) are one of the most important causes of epilepsy and developmental delay. Extensive molecular genetic studies have resulted in gene discovery for CDM such as periventricular nodular heterotopia (PNH), lissencephaly/subcortical band heterotopia spectrum (LIS/SBH) and schizencephaly.

The main goals of this project were 1) to screen for mutations in the four main genes responsible for abnormal cortical development (*FLN1*, *LIS1*, *DCX* and *EMX2*) in a large cohort of patients with different types of cortical malformations and 2) to perform phenotype-genotype correlations.

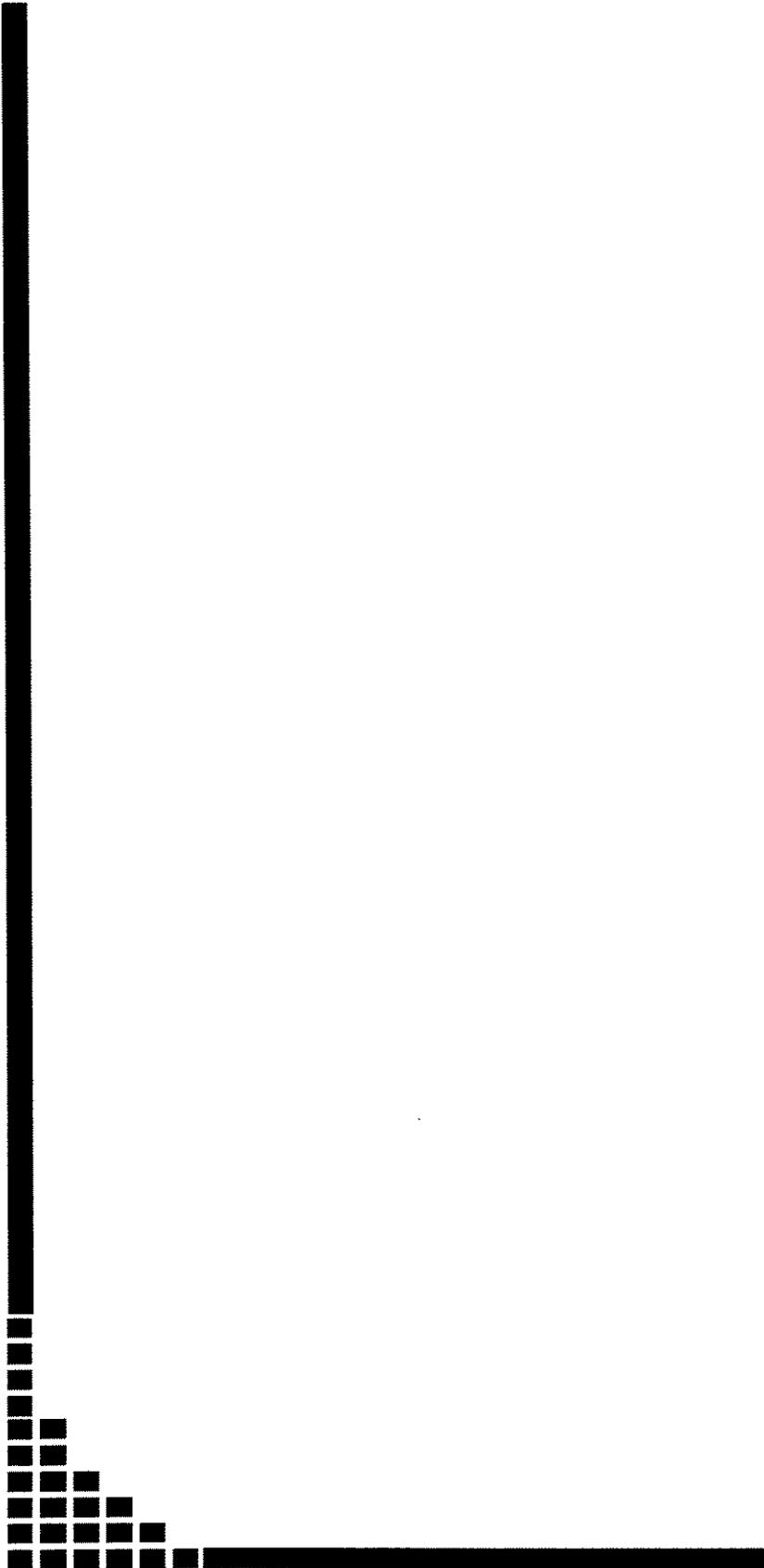
All patients included in this study had CT scans or high resolution MRI scans. We have divided our patients in three groups: a) individuals with nodular heterotopia, b) individuals with the LIS/HSB spectrum and c) individuals with schizencephaly.

Mutation screening was performed by the polymerase chain reactions (PCRs). PCR products were analyzed by single strand conformation polymorphism (SSCP) and were subsequently sequenced using standard manual sequencing or an automatic sequencer.

We have studied a total of 58 patients with CMDs. Nine had nodular heterotopia, 15 had the LIS/HSB spectrum and 34 individuals had schizencephaly. In the group of nodular heterotopias we have detected a 1159G→C mutation in the *FLN1* gene in two related patients with classical HNP and a neutral variant IVS5 + 519C→G in three patients (1 with typical and 2 with atypical imaging findings). In the LIS/SBH group 7 patients had a 1805C→T substitution in the beginning of the untranslated 3' region that is also present in 9 control individuals. One patient with agyria/pachygyria had a 1385A→C transversion which changes a histidine for a proline in amino acid 277 of the LIS1 protein. Furthermore, we detected a rare polymorphism in the *DCX* gene, a IVSV+19G→A, in a female with agyria/pachygyria. In the group of the schizencephalies we have detected 4 individuals with a 796A→C substitution that does not change the identity of the wild type arginine. The same alteration was found in 4 individuals of the control group.

We conclude that: a) patients with atypical PNH do not have mutations in the first six coding exons of the *FLN1* gene and there is a high incidence of *FLN1* mutations in classical familial PNH; b) missense mutations in the *LIS1* gene are a rare finding in patients with the

LIS/SBH spectrum and its localization in latter WD domains are not always related with less severe LIS; c) the substitution 1805C→T is the same polymorphism previously described by KOCH et al. (1996); d) the absence of mutations in the *DCX* gene in patients with SBH could be explained by our small sample of patients with this pattern of malformation, somatic mosaicism or low stringency for the neuroimage findings; e) the substitution IVSV+19G→A found in the *DCX* gene is a rare polymorphism (idiomorphism) f) schizencephalies appear not to have genetic background in the *EMX2*, since our study detected only a neutral polymorphism in these patients.



1- INTRODUÇÃO

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

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

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

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

1.2-O DESENVOLVIMENTO NORMAL DO CÓRTEX CEREBRAL

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

As primeiras células que migram formarão uma estrutura acima da zona ventricular denominada de pré-placa. As demais ondas migratórias de neurônios irão então formar a placa cortical que irá dividir a pré-placa em uma camada mais externa denominada de zona marginal (futura camada I do córtex maduro) e uma camada mais interna chamada de sub-placa. Ao chegarem a placa cortical, os neurônios organizam-se em camadas que

irão se desenvolver no córtex adulto. Este processo mostrou-se surpreendentemente complexo, havendo um padrão *'inside-out'* de deposição dos neurônios (ANGEVINE et al., 1961). Em outras palavras, os neurônios recém chegados à placa cortical ultrapassam os neurônios mais antigos, acumulando-se progressivamente em camadas mais superficiais (SIDMAN et al., 1973).

A migração dos neurônios ocorre em sua maioria ao longo das células radiais gliais, no entanto, interneurônios gabaminérgicos seguem um padrão de migração tangencial, paralelo à superfície pial ou lateralmente dentro dos ventrículos (VAN SLEGTENHORST et al., 1998; FISHELL et al., 1993, TANN et al., 1993; WALSH et al., 1992; O'ROURKE et al., 1995).

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

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

1.3-DISTÚRBIOS DE DESENVOLVIMENTO CORTICAL: FASE DE MIGRAÇÃO

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

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

1.3.1-Heterotopia Nodular Periventricular (HNP)

A HNP é um distúrbio na qual uma fração dos neurônios pós-mitóticos parece ser incapaz de deixar a zona ventricular resultando no adulto, em nódulos de neurônios diferenciados próximo a zona ventricular, enquanto outros neurônios migram normalmente formando o córtex maduro (EKSIIOGLU et al., 1996; GLEESON et al., 2000). Quando a HNP ocorre em famílias, o padrão de herança é similar ao de um gene dominante ligado ao cromossomo X, que afeta principalmente mulheres, já que os homens parecem não sobreviver a gestação (HUTTENLOCHER et al., 1994). A principal manifestação neurológica da HNP é a epilepsia (DUBEAU et al., 1993), que provavelmente é consequência da localização heterotópica dos nódulos neuronais (KOTHARE et al., 1998), geralmente não havendo nenhuma deficiência grave nas funções cognitivas (DUBEAU et al., 1998). Os homens afetados normalmente não sobrevivem ao termo, e quando o fazem morrem precocemente devido a problemas de coagulação sangüínea (FOX et al., 1998). O gene responsável pela HNP foi clonado na região Xq28, possui 48 exons (EKSIIOGLU et al., 1996) e seu produto foi identificado como a filamina 1 (FLN1), uma proteína de 280kD que realiza ligação cruzada com a actina, sugerindo que o papel da FLN1 na migração neuronal pode ser mediado através da modulação do citoesqueleto de actina (FOX et al., 1998). O fenótipo de HNP parece ser consequência de mutações nulas na região codificante 5' do gene, levando a uma perda de função da proteína (FOX et al., 1998), no entanto trabalhos recentes identificaram mutações em outras regiões do gene (SHEEN et al., 2001).

Recentemente mutações no gene *FLN1* foram detectadas em pacientes com múltiplas malformações congênitas, afetando estruturas craniofaciais, esqueleto, cérebro, vísceras e trato urogenital em quatro desordens ligadas ao cromossomo X como a síndrome otopalatodigital tipos 1 (OPD1) e 2 (OPD2), displasia frontometáfiseal (DFM) e a síndrome de Melnick-Needles. (ROBERTSON et al., 2003), demonstrando que nem sempre mutações neste gene são letais no período embrionário para homens.

A HNP parece ser uma desordem clínica e geneticamente heterogênea já que apesar de mutações serem encontradas em 80% dos casos familiares, apenas 20% dos casos esporádicos apresentam mutações no gene *FLN1* (SHEEN et al., 2001; MORO et al., 2002). Este fato foi reforçado pelo achado de uma forma possivelmente autossômica

recessiva de HNP indistinguível em termos de neuroimagem da HNP clássica ligada ao X (SHEEN et al., 2003) e de indivíduos portando HNP associadas a anormalidades citogenéticas no braço curto do cromossomo 5 (SHEEN et al., 2003). No entanto, nesta última forma foram relatadas diferenças na neuroimagem quanto comparada a forma clássica (SHEEN et al., 2003). Além disso, existem relatos de HNP associada às síndromes de pterígeo múltiplo (HOLTMANN et al.2001) e também à síndrome de Allgrove (ZEHARIA et al., 1999), doença celíaca e palatoesquize (INTISO et al., 1998), megaencefalia (JAN et al., 1999) e retardo mental (GUERRINI et al., 1998).

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

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

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

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

Tabela 01- Classificação em graus do espectro LIS/HSB

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

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

Tanto a LIS tipo I como a HSB têm sido observadas dentro das mesmas genealogias ou esporadicamente. Em várias famílias, mulheres com HSB tem filhos com LIS, deficiência mental profunda e epilepsia, enquanto as filhas desenvolvem HSB e

deficiência mental leve, sugerindo o envolvimento de um único gene ligado ao X (PINARD et al., 1994). Este locus foi mapeado na região Xq21-q24 (ROSS et al., 1997) e o gene clonado em Xq22.3-q23. O gene recebeu a denominação de doublecortina (*DCX*) e possui 9 exons (6 codificantes) (DES PORTES et al., 1998; GLEESON et al., 1998). O produto de expressão deste gene parece ser uma proteína que se associa a microtúbulos (FRANCIS et al., 1999; GLEESON et al., 1999).

A LIS tipo I também pode ser causada por mutações e deleções em um gene localizado no cromossomo 17p13.3: o *LIS1* (LEDBETTER et al., 1992; LO NIGRO et al., 1998; REINER et al., 1993). Aproximadamente 65% dos pacientes com LIS possuem mutações intragênicas ou deleções envolvendo o gene *LIS1* que possui 11 exons (CARDOSO et al., 2000), sendo que deleções envolvendo o gene *LIS1* são o evento mutacional predominante (PILTZ et al., 1998). Em um total de 220 crianças com LIS (incluindo a Síndrome da Lissencefalia Isolada e a Síndrome de Miller-Dieker) foram encontradas deleções em cerca de 98 pacientes enquanto 33 tinham mutações intragênicas (LO NIGRO et al., 1997; PILZ et al., 1998, PILZ et al. 1999; CARDOSO et al., 2000). Um estudo conduzido por SAKAMOTO et al. (1998) confirmou a alta taxa de deleções como o principal evento mutacional, mostrando 6 indivíduos portando deleções de um total de 12 com a Síndrome da Lissencefalia Isolada e somente 1 mutação intragênica detectada por SSCP. No entanto, apesar dos dados apontarem para uma predominância de deleções, FOGLI et al. (1999) estudando mutações em 24 pacientes encontrou grandes deleções do gene *LIS1* em apenas 3 e mutações intragênicas em 7 indivíduos.

Apesar do gene *LIS1* ser altamente conservado, alguns polimorfismos já foram encontrados, principalmente na região 3'-UTR (*untranslated region*) sendo que nenhum deles altera a seqüência de aminoácidos (Tabela 02).

Tabela 02-Polimorfismos do gene *LIS1*

Posição no gene	alteração/nucleotíd eo	alteração/seqüenci a	freqüência	referência
intron 6	c.568+27pbT→C	intrônico	~1.5%	CARDOSO et al. (2002)
exon 8	687 A→T	T229T	raro (1 caso)	CARDOSO et al. (2000)
exon 11	1188 C→T	V396V	raro (1 caso)	CARDOSO et al. (2000)
exon 11	1236 T→G	3'UTR	~10%	CARDOSO et al. (2000)
exon 11	1250 C→T	3'UTR	~ 40%	KOCH et al. (1996)

(modificado de CARDOSO et al., 2002)

O gene *LIS1* codifica a subunidade β da isoforma cerebral de uma acetil-hidrolase ativadora de plaquetas (PAFAH1b1) (CHONG et al., 1994; HATTORI et al., 1997; REINER et al., 1993). O papel do fator ativador de plaquetas na migração neuronal ainda não foi estabelecido, mas ele parece estar envolvido em fenômenos de diferenciação celular neuronal e cascatas de indução críticas para o desenvolvimento cortical (GARCIA-HIGUERA et al., 1996; HO et al., 1997).

Diferente do encontrado para *LIS1*, a maioria das mutações identificadas no gene *DCX* são mutações de sentido trocado. Mutações na região codificante do gene *DCX* foram encontradas em todos os casos familiares publicados até o momento (MATSUMOTO et al., 2001), no entanto a taxa de detecção de mutações em casos esporádicos varia entre 38 a 91% (GLEESON et al., 2000; DES PORTES et al., 1998). A HSB raramente afeta homens, no entanto existem casos associados a mutações no gene *DCX* ou *LIS1* (PILZ et al., 1999). D'AGOSTINO et al. (2002) publicaram uma amostra de 30 homens portando HSB, dos quais 24 possuíam análise completa dos genes *LIS1* e *DCX*, encontrando mutações nos genes *LIS1* e *DCX* em apenas 1 e 7 pacientes respectivamente.

Este estudo mostrou que a HSB em homens é uma síndrome heterogênea tanto clínica como geneticamente.

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

Recentemente foi descoberto um novo gene em 7q22 que quando mutado em humanos também leva a lissencefalia (HONG et al., 2000). Este gene é o homólogo humano ao gene Reelina (*Reln*), cuja identificação se deu em uma linhagem de ratos (*reeler*) que apresenta um quadro de LIS semelhante ao encontrado em humanos portadores de mutações neste gene (D'ARCANGELO et al., 1995; HIROTSUNE et al., 1995). O gene *RELN* codifica uma grande proteína de 388Kd que é secretada (D'ARCANGELO et al., 1995) e atua na migração dos neurônios corticais. As características deste tipo de LIS diferem da LIS clássica do tipo 1, pois existem anormalidades severas também no hipocampo, medula espinhal e hipoplasia cerebelar. Além disso, um padrão de herança autossômico recessivo foi demonstrado nessas famílias (HONG et al., 2001).

Finalmente, existem descritos na literatura vários tipos de LIS que não a clássica do tipo I (BARKOVICH et al., 2001). A tabela 3 resume as variantes relatadas até o momento. Fica evidente pela tabela, que devido a grande variabilidade fenotípica é de vital importância um estudo de neuroimagem detalhado para que uma classificação correta seja efetuada.

Tabela 03-Classificação das lissencefalias

Malformações devido a migração neuronal anormal

A. Espectro das lissencefalias e Heterotopia Subcortical em Banda

1-) Lissencefalia clássica (agiria-paquigiria) e heterotopia subcortical em banda (HSB)

- a-) Síndrome de Miller-Dieker (SMD) com deleção de *LIS1* e genes teloméricos
- b-) Lissencefalia ou HSB com mutações em *LIS1*
- c-) Lissencefalia ou HSB com mutações em *DCX* (XLIS)
- d-) Síndrome de Baraitser-Winter
- e-) outros *loci* para lissencefalia e HSB

2-) Lissencefalia com agenesia do corpo caloso (LACC)

- a-) LAAC com morte neonatal
- b-) LACC
- c-) LACC ligada ao X com genitália anormal (XLAG)

3-) Lissencefalia com hipoplasia cerebelar (LHC)

- a-) LHC idêntica a lissencefalia clássica exceto pela hipoplasia moderada do vermis
- b-) LHC com gradiente AP, hipocampo malformado e cerebelo globular
 - i-) LHC com mutações em *RELN*
 - ii-) outros *loci*
- c-) LHC com severa hipoplasia da medula, cerebelo e morte neonatal.
- d-) LCH com hipoplasia da medula e cerebelo
- e-) LCH com gradiente AP abrupto
- f-) LCH com agenesia do corpo caloso e hipoplasia da medula e cerebelar

4-) Lissencefalia, NOC

- a-) Lissencefalia com deficiência de linfócitos T
- b-) Síndrome de Winter-Tsukahara

(Modificado de BARKOVICH et al., 2001)

1.4-DISTÚRBIOS DE DESENVOLVIMENTO CORTICAL: FASE DE ORGANIZAÇÃO

A esquizencefalia, um tipo de DDC classificada como uma anormalidade da organização cortical, é considerada, na maior das vezes, como consequência de insultos ambientais. Recentemente, evidências de um comprometimento gênico foram apresentadas (BRUNELLI et al., 1996.). Esta patologia tem sido descrita como um distúrbio congênito extremamente raro caracterizado por fendas localizadas dentro dos hemisférios cerebrais (BARKOVITCH et al., 1996). Estas fendas são cercadas pela substância cinzenta e na maioria das vezes envolvem as regiões perisilvianas (WOLPERT et al., 1992). Áreas extensas dos hemisférios cerebrais podem estar ausentes, sendo substituídas pelo líquido cérebro-espinhal. Os pacientes com esquizencefalia são clinicamente caracterizados por déficit motores e mentais que são proporcionalmente mais graves conforme a extensão das malformações cerebrais, além de serem freqüentemente afetados por epilepsia (GRANATA et al., 1996; BARKOVICH et al., 1992). Foram caracterizados dois tipos de esquizencefalia, dependendo da magnitude da área envolvida e do tamanho das fendas (WOLPERT et al., 1992). A esquizencefalia do tipo I (fendas com lábios fechados) é a menos grave e os pacientes são freqüentemente normais, no entanto eles podem apresentar crises epilépticas e ter algum grau de espasticidade. A esquizencefalia do tipo II ou severa (fendas com lábios abertos) apresenta a maioria das anormalidades descritas no parágrafo anterior, sendo a forma que apresenta uma base genética mais preponderante.

Em uma pesquisa procurando detectar mutações em genes humanos homólogos a *Emx1*, *Emx2*, *Otx1* e *Otx2* que são expressos no prosencéfalo em desenvolvimento de ratos, BRUNELLI et al. (1996) encontraram que 3 de 8 pacientes com esquizencefalia severa eram heterozigotos para diferentes mutações no gene *EMX2*. Mais tarde FAIELLA et al. (1997) analisaram geneticamente 18 indivíduos afetados detectando pelo menos 13 portadores de mutação em *EMX2* em condição heterozigótica. Estes dois trabalhos solidificaram a hipótese de que a esquizencefalia pode ter causas predominantemente genéticas. A tabela abaixo sumariza as mutações descritas até o momento na literatura para pacientes portadores de esquizencefalia (tabela 4).

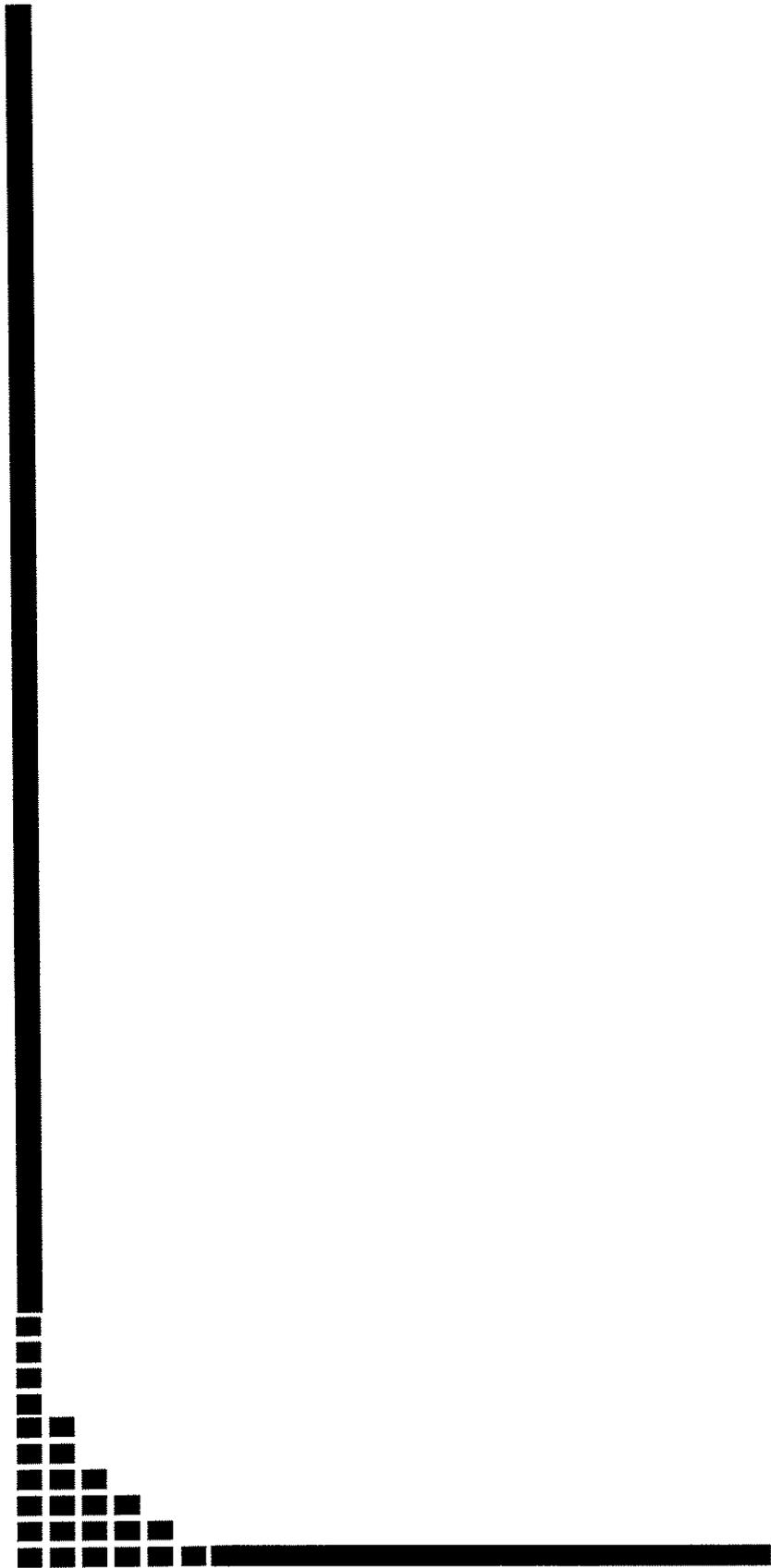
Tabela 04-Mutações descritas até o momento no gene *EMX2* em pacientes com esquizencefalia

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

hb= domínio *homeobox*

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

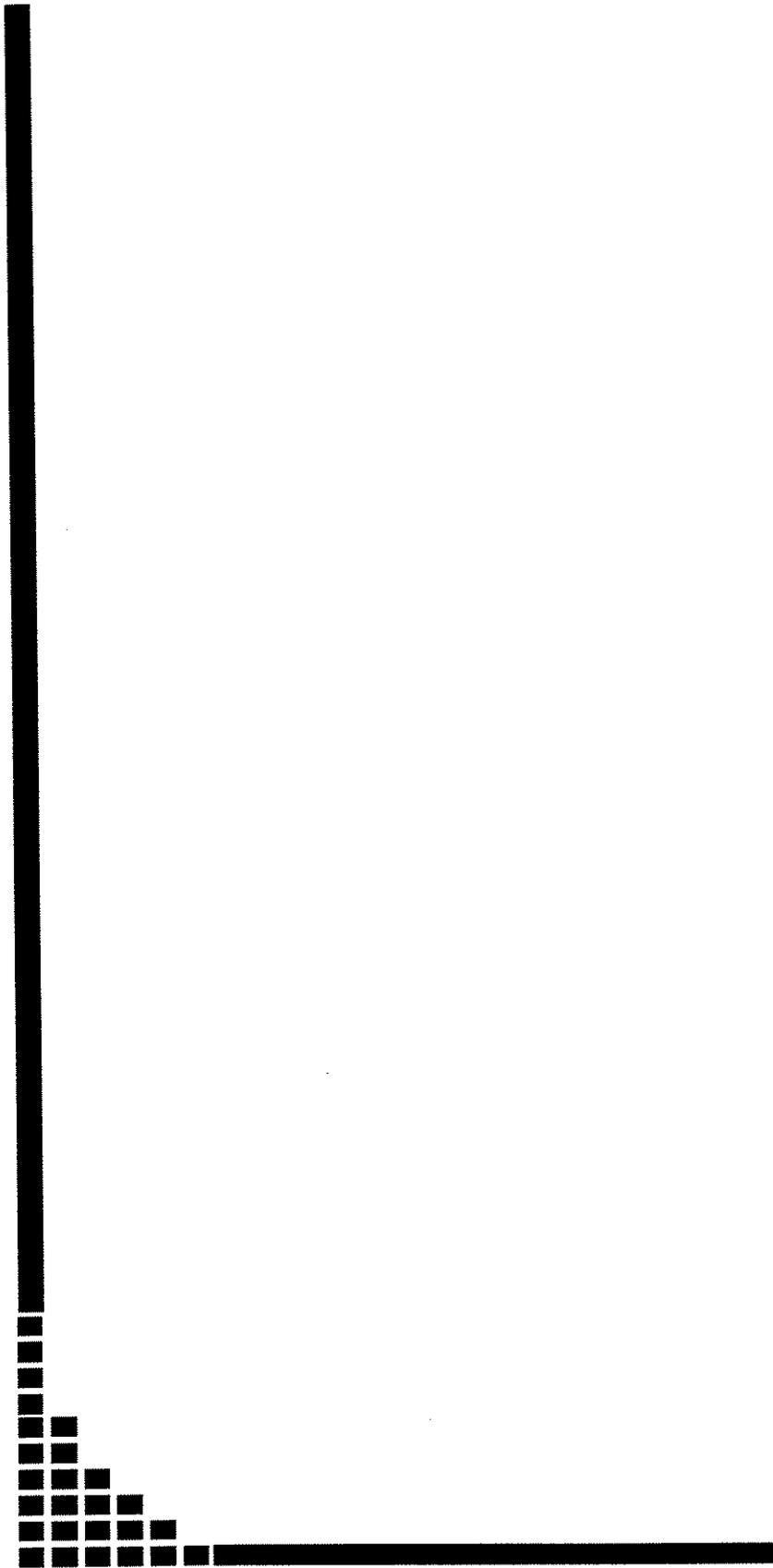
Acredita-se que, em mamíferos, o *EMX2* pode ter um papel como inibidor da proliferação celular ou como um regulador positivo da diferenciação neuronal (CECCHI et al., 2000). A medida dos níveis de expressão de *EMX2*, tanto do seu RNA como da proteína (MALLAMACI et al., 1998), sugerem que este gene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



2- OBJETIVOS

Nossos objetivos foram:

- a) Determinar se os distúrbios de desenvolvimento cortical na nossa amostra de pacientes estão relacionados com mutações em genes candidatos: *FLN1*, *LIS1*, *DCX* e *EMX2*.
- b) Estabelecer a correlação entre os diversos tipos de mutação encontradas e o padrão de neuroimagem de nossos pacientes.



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**3- MATERIAIS
MÉTODOS**

3.1-ASPECTOS ÉTICOS

Os indivíduos selecionados participaram do projeto somente após a assinatura de um formulário de consentimento livre e esclarecido. Para assegurar que toda a manipulação da 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. Informações geradas durante o nosso projeto e que possam ter implicações na confirmação diagnóstica de indivíduos sintomáticos, serão comunicados aos profissionais responsáveis pelo acompanhamento dos pacientes. Dados para serem usados em diagnóstico preditivo de indivíduos assintomáticos, com risco de desenvolver a doença, não foram gerados por este projeto. Cópias do formulário de consentimento pós-informação que foram assinadas por todos os pacientes (ou responsáveis) do projeto, se encontram em anexo. Este mesmo formulário foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM-UNICAMP (protocolo 383/2000) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP (protocolo 516/2001).

3.2-PACIENTES

Esta etapa do projeto foi realizada através da colaboração dos docentes responsáveis pelos ambulatórios de Epilepsia Infantil, Epilepsia, Paralisia Cerebral e Neurogenética do Hospital das Clínicas- FCM-UNICAMP e de profissionais do Departamento de Genética do Instituto Fernandes Figueira-FIOCRUZ, RJ. A identificação dos pacientes com quadro clínico sugestivo de DDC foi feita através de critérios diagnósticos já descritos na literatura (BARKOVITCH et al., 2001). Os critérios de inclusão no estudo foram: a) confirmação da presença e tipo de DDC por exames de neuroimagem, e b) disponibilidade e concordância do paciente (ou responsável) para se submeter a uma coleta de sangue para a extração de DNA genômico. A classificação dos diferentes graus do espectro lissencefalia/heterotopia subcortical em banda seguiu a classificação proposta por DOBYNS et al. (1999). A caracterização detalhada dos aspectos de neuroimagem foi realizada por profissionais do Laboratório de Neuroimagem do Departamento de Neurologia da FCM-UNICAMP e do Instituto Fernandes Figueira-FIOCRUZ, RJ.

Um questionário semi-estruturado foi utilizado para obter informações detalhadas sobre a história familiar de epilepsia ou a presença de déficit neurológico em parentes de primeiro, segundo e terceiro grau e a ocorrência de qualquer evento pré-natal durante os 24 primeiros meses de gestação. Eventos pré-natais significantes incluem qualquer anormalidade reportada pela mãe ou familiares durante os primeiros 24 meses de gestação, como tentativa de aborto, uso de drogas, abuso físico, queda com trauma abdominal, hipertensão, febre, *rash*, diabetes *mellitus*, exposição a raios X, infecção por citomegalovirus e gestação de gemelar.

Foram coletados amostras de sangue de pacientes afetados por diferentes formas de DDC e que tiveram confirmação do diagnóstico por exames de neuroimagem. Sempre que possível os pais, ou irmãos destes indivíduos também eram avaliados clinicamente e as amostras coletadas.

3.2.1- Caracterização da Amostra

3.2.1.1- Características clínicas e de neuroimagem

Foi analisado um total de 58 pacientes sendo que esses foram divididos em três grandes grupos: **grupo I)** heterotopias nodulares, **grupo II)** espectro da lissencefalia (LIS)/ heterotopia subcortical em banda (HSB), e **grupo III)** esquizencefalias.

A caracterização detalhada dos aspectos clínicos e de neuroimagem de grande parte dos pacientes analisados neste trabalho pode ser encontrada com detalhes na tese de doutorado MALFORMAÇÕES DO DESENVOLVIMENTO CORTICAL: contribuição dos fatores genéticos e ambientais para sua etiologia, aspectos clínicos e de neuroimagem. (MONTENEGRO, 2003).

O grupo das heterotopias nodulares foi dividido ainda em dois: **i)** indivíduos com o padrão clássico de HNP bilateral, e **ii)** outras heterotopias. Foram identificados 4 pacientes com o padrão clássico (4 mulheres) e 5 (2 homens e 3 mulheres) com outros tipos de heterotopia. Dentro deste grupo todos os pacientes possuem epilepsia sendo predominante as crises parciais (8/9) e controladas (5/9) com a idade de início das crises variando entre 2 e 36 anos (média de 15 anos). O exame neurológico destes pacientes foi

considerado normal em 9/10 casos sendo encontrado apenas 1 indivíduo acometido de síndrome piramidal com predomínio à esquerda. Um resumo dos principais dados clínicos e de neuroimagem dos pacientes com HNP pode ser encontrado na tabela 5.

Tabela 05-Achados clínicos e de neuroimagem dos pacientes com HNP

Paciente \ sexo\ idade	achados de neuroimagem	início das crises	tipo de crise	freqüência	exame neurológico
hnp-01 \ F \ 37a	HNPB, colpocefalia e heterotopias na substância branca	29 anos	parcial	3x por ano	normal
hnp-02 \ M \ 53a	HNP assimétrica à esquerda, lobos cerebrais assimétricos com leve redução à esquerda	17 anos	parcial	controlada	normal
hnp-03 \ F \ 61a	HNPB	nd	parcial	controlada	normal
hnp-04 \ M \ 38a	HNP em corno temporal direito	20 anos	parcial	8-10 x por mês	normal
hnp-05 \ F \ 27a	HNPB	2 anos	parcial	1 x por mês	normal
hnp-06 \ F \ 22a	HNP à D, heterotopias focais e polimicrogiria ou displasia	12 anos	parcial	5 x por semana	normal
hnp-07 \ F \ 31a	HNPB	4 anos	tônicas com <i>drop attacks</i>	diariamente	Sd de liberação piramidal à E
hnp-08 \ F \ 21a	Heterotopia transmento	10 anos	parcial	semanais	normal
hnp-09 \ F \ 54a	HNP à D, assimetria hipocampal c/ diminuição do hipocampo D, agenesia do c caloso e polimicrogiria	36 anos	parcial	1 x a cada 3 meses	normal

HNPB = Heterotopia Nodular Periventricular Bilateral, HNP = Heterotopia Nodular Periventricular, nd = não disponível

No grupo do espectro LIS/HSB foram identificados 9 indivíduos com graus variados de LIS (em 3 pacientes com LIS o gradiente da malformação não foi classificado com exatidão por limitações técnicas do exame de RM ou CT e que não pode ser repetido)

e 6 com HSB (em um dos pacientes com HSB não conseguimos repetir o exame de RM, cuja primeira avaliação não foi ideal). Sete são homens e 8 são mulheres cuja idade variou entre 1 e 45 anos (idade média: 16,6 anos). HSB foi encontrado em 5/8 mulheres e somente em 1/7 dos homens estudados. Houve uma predominância de mulheres (4 indivíduos) no grupo de pacientes com bandas heterotópicas difusas de predomínio anterior quando comparados com pacientes com bandas heterotópicas difusas de predomínio posterior (2 indivíduos, sendo um homem e uma mulher). No subgrupo de indivíduos com LIS foram encontrados 4 indivíduos com paquigiria difusa, três deles (2 homens e 1 mulher) com predominância posterior e 1 homem com predominância anterior, dois homens com agiria posterior e paquigiria anterior. O grau de LIS em nossa amostra de pacientes foi entre 4 e 5. Neste grupo de pacientes, encontramos indivíduos com comprometimento neurológico mais grave, principalmente epilepsia de difícil controle e retardo mental. De um total de 15 indivíduos, 14 apresentam crises sendo: 7 pacientes com crises parciais, 3 pacientes com crises típicas das síndromes de West ou Lennox-Gastaut, 1 paciente com apenas crises mioclônicas, 1 paciente com crises tônicas e mioclônias, e 3 pacientes cujo tipo de crise não foi definido com certeza. A idade de início de crises variou desde 30 dias de vida até os 18 anos de idade (idade média de 3 anos). O exame neurológico se mostrou alterado em 13/15 indivíduos; sendo as alterações clínicas encontradas mais graves quanto maior o grau da malformação vista nos exames de neuroimagem. Os dados clínicos estão resumidos na tabela 06.

Tabela 06-Achados clínicos e de neuroimagem dos pacientes com o espectro LIS/HSB

Paciente (sexo) idade	achados de neuroimagem	início das crises	tipo das crises	freqüência	Exame neurológico
lis-01 \ F \ 4a	lissencefalia incompleta tipo I, grau a definir	1 ano	mioclônicas	nd	RDNPM
lis-02 \ F \ 29a	HSB posterior, difuso e descontinuo mais à D (grau 6a1)	7 anos	parcial	2x por mês	Normal
lis-03 \ F \ 13a	paquigiria difusa com predomínio posterior (grau 4a)	2,5 anos	multiformes (SLG)	diariamente	RDNPM
lis-04 \ M \ 37a	paquigiria difusa com predomínio posterior bilateral (grau 4a)	6 meses	parcial	não controlada	RDNPM
lis-05 \ F \ 15a	lissencefalia incompleta tipo I, grau a definir*	5 meses	espasmos infantis (West) e multiformes (SLG)	diariamente	RDNPM e Sd de liberação piramidal global
lis-06 \ M \ 8a	lissencefalia incompleta tipo 1, grau a definir	2 meses	multiformes (SLG)	diariamente	RDNPM e Sd de liberação piramidal global
lis-07 \ F \ 25a	HSB mais anterior, difusa continua e grossa (grau 6b1)	4 anos	parcial	diariamente	hemiparesia leve à E e Sd de liberação piramidal à E
lis-08 \ M \ 4a	paquigiria difusa com predomínio posterior (grau 4a)*	-	-	-	tetraparesia, RDNPM
lis-09 \ F \ 29a	HSB grau 6b3	2,5 anos	parcial	diariamente	Normal
lis-10 \ M \ 6a	agiria posterior e paquigiria anterior (grau 3a)	3 meses	parcial	diariamente	sd de liberação piramidal, hipotonia, visão subnormal
lis-11 \ M \ 3a	agiria posterior e paquigiria anterior (grau 3a)	3 meses	indefinido	diariamente	tetraparesia, RDNPM
lis-12 \ F \ 22a	paquigiria posterior e HSB anterior (grau 5a)	7 anos	parcial	2x por mês	RDNPM
lis-13 \ F \ 2a	inconclusivo: suspeitas de HSB com bandas finas e anteriores	30 dias	tônicas e mioclônicas	4 a 5 por dia	nd
lis-14 \ M \ 45a	HSB com bandas finas difusas mais acentuadas frontalmente e mais finas posteriormente (grau 6b3)	18 anos	indefinido (possivelmente atônicas)	2x por dia	normal
lis-15 \ M \ 12a	paquigiria difusa com predomínio anterior (grau 4b1)	2 anos	parcial	diárias	retardo mental leve

RDNPM: retardo do desenvolvimento neuropsicomotor, SLG: Síndrome de Lennox-Gastaut, * Tomografia

Computadorizada

O grupo das esquizencefalias foi composto por um total de 34 pacientes, sendo 16 mulheres e 18 homens cuja idade variou de 2 a 40 anos (idade média 11.2 anos). Nossa amostra consistiu de 11 indivíduos portadores de esquizencefalia bilateral de lábios abertos, 4 com esquizencefalia bilateral com uma fenda aberta e a outra fechada, 9 com esquizencefalia unilateral de lábios abertos, 3 com esquizencefalia unilateral de lábios fechados e 7 cujo tipo de fenda necessita ainda de uma melhor classificação. A presença de epilepsia foi constatada em 24/34 pacientes sendo de fácil controle em 7/24 indivíduos. As crises parciais foram o tipo predominante, acometendo 12/24 indivíduos. A idade de início das crises foi de aproximadamente 5 anos de idade. Informações sobre o exame neurológico estavam presentes em 31/34 indivíduos encontrando-se alterado em 28/31 pacientes, geralmente o dano neurológico é mais profundo quanto maior for a área do córtex acometida pela presença das fendas (tabela 07).

Tabela 07-Achados clínicos e de neuroimagem dos pacientes com esquizencefalia

Paciente\ Sexo\idade	achados de neuroimagem	localização	Idade da crise	tipo da crise	freqüência da crise	exame neurológico
esq-01 \ F \ 8a	polimicrogiria difusa + ELAU à E**	fronto- temporo- parietal	1 ano	parcial	controlada	tetraparesia, microcefalia
esq-02 \ F \ 5a	ELA inconclusiva se U ou B**	-	-	-	-	paresia do membro superior D
esq-03 \ H\ 22a	ELAB**	parieto- occipital	4 anos	multiformes (SLG)	controlada	Sd. liberação piramidal, predomínio à D
esq-04 \ H\ 7a	ELAU à esquerda **	centro-parietal	1,5 anos	parcial	controlada	Sd. liberação piramidal, predomínio à D
esq-05 \ F \ 9a	Polimicrogiria difusa + ELAU à E**	posterior na transição parieto- occipital	-	-	-	tetraparesia predomínio à D
esq-06 \ F \ 4a	ELAB + possivelmene displasia septo óptica**	frontal	indefinida	indefinida	controlada	RDNPM
esq-07 \ M\ 13a	ELA inconclusiva se U ou B**	temporo- parietal	5 anos	parcial	1 ou 2x por ano	hemiparesia à D
esq-08 \ M\ 6a	ELAB	todos os lobos	4 anos	(espasmos infantis) West	diárias	Sd. Liberação piramidal predomínio à E, visão subnormal
esq-09 \ M\ 19a	ELFU à direita	lobo frontal	9 anos	parcial	5x por semana	Sd. Liberação piramidal predomínio à E
esq-10 \ M\ 40a	EU a D inconclusivo se labios são F	occipital	37 anos	parcial	2 a 3x por semana	normal
esq-11 \ F \ 11a	ELAU à direita	parieto- occipital	-	-	-	hemiparesia E e D (?)
esq-12 \ F \ 15a	ELAB + pequeno cisto aracnóide (temporal esquerdo)	centro-parietal	-	-	-	tetraespástico predomínio à E
esq-13 \ M\ 16a	ELF inconclusivo de B ou U**	-	1,5 anos	parcial	controlada	Sd. Liberação piramidal pior à E, sincinesia
esq-14 \ M\ 42a	E à D, inconclusivo de LA ou LF	occipital	15 anos	parcial	3 x por semana	hemiparesia direita
esq-15 \ M\ 13a	ELAU à esquerda + depressão no lado D** com polimicrogiria	frontal	12 anos	parcial	diárias	normal
esq-16 \ M\ 8a	ELAB (é assimétrica) pior a esquerda**	centro-parietal em continuação com fendas silvianas	3 meses	parcial	nd	tetraparesia espástica c/ predomínio à E
esq-17 \ M\ 40a	ELFU à direita + heterotopia subcortical direita	temporo- parietal	18 anos	parcial	4 a 5x por semana	Sd. Liberação piramidal à E

esq-18 \M\ 10a	Polimicrogiria frontal + ELAU à E	frontal	-	-	-	Sd. Liberação piramidal D, distonia à D, sincinesias
esq-19 \M\ 12a	EU à D, inconclusivo de F ou A ELAU a E + agenesia do septo pelúcido + calcificações	temporo- parietal	5 anos	ausência atípica	controlada	Sd. liberação piramidal à E
*esq-20 \F\ 2a	periventriculares grosseiras bilateralmente**	parieto- temporal	-	-	-	hemiparesia à D
*esq-21 \F\ 3a	ELAU a D + calcificação periventricular bilateral**	parietal	-	-	-	hipotonia axial e tronco, paresia à D
*esq-22 \F\ 2a	ELAB + lissencefalia frontal (?) **	temporo- parietal a E e parietal a D	-	-	-	tetraparesia
*esq-23 \F\ 6a	ELAB**	temporo- fronto-parietal a E e fronto- parietal a D	2 anos	generalizada	difícil controle	Sd. liberação piramidal
*esq-24 \M\ 5a	ELAU a D e ELFU a E**	fronto-parietal a D e parietal a E	8 meses	indefinida	difícil controle	tetraparesia
*esq-25 \F\ 2a	ELAB**	parietal a D e frontal a E	indefinida	espasmos infantis (West)	difícil controle	tetraparesia
*esq-26 \F\ 8a	ELAB + dilatação ventriculos laterais e terceiro ventriculo + agenesia septo-pelucido**	fronto-parietal a E e a D	9 meses	parcial	difícil controle	tetraparesia
*esq-27 \M\ 7a	ELAU a D e ELFU a E**	fronto-parietal a D e parietal a E	2 anos	multiformes (SLG)	difícil controle	tetraparesia e tetraplegia
*esq-28 \M\ 10a	inconclusivo**	-	1 a 2 meses	parcial	4 x dia	nd
*esq-29 \F\ 3a	ELAB**	fronto-parietal a E e parietal a D	-	-	-	hipotonia central
*esq-30 \F\ 3a	ELAB + agenesia do corpo caloso (?) + polimicro (?) + paquigiria (**)	temporal- parietal e frontal	4 meses	indefinida	difícil controle	nd
*esq-31 \F\ 3a	ELAU a E e ELFU à D + polimicrogiria extensa + paquigiria	frontal	-	-	-	nd
*esq-32 \M\ 8a	ELAU a E + agenesia do septo pelúcido**	temporal- parietal	1 ano	indefinida	difícil controle	tetraparesia, hiperreflexia
*esq-33 \M\ 8a	ELFU a E	parietal	3 anos	indefinida	10x dia	normal
*esq-34 \M\ 9a	ELAU à E e ELFU à D**	parietal	3 anos	indefinida	nd	hemiplegia E

ELAU = Esquizencefalia de lábios abertos unilateral, ELFU = Esquizencefalia de lábios fechados unilateral, ELAB = Esquizencefalia de lábios abertos bilateral SLG= síndrome de Lennox-Gastaut; nd=não disponível, crises multiformes=CTCG, tônicas, ausência atípica * paciente provenientes da FIOCRUZ, ** Tomografia Computadorizada

3.3-EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE SANGUE PERIFÉRICO

A extração do DNA genômico das amostras colhidas foi realizada utilizando-se protocolos manuais de extração de DNA com fenol-clorofórmio. Vinte a 30 ml de sangue venoso foram colhidos dos indivíduos recrutados para o estudo. As amostras foram centrifugadas à 1900 rpm por 10 minutos e a parte intermediária onde está localizada os leucócitos, foi transferida para um tubo de propileno em fundo cônico. Em seguida, foram adicionados as soluções de RSB 1X (até completar um volume de 11ml) e 60µl de Nonidet. A solução foi então centrifugada à 2900 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Três ml de solução SDS a 10% e 60µl de proteinase K (100mg/ml) foram adicionados e as amostras incubadas à 37° por 24h. Após a incubação foram acrescentados 3 ml de fenol, seguido de centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos e descarte da parte orgânica da solução. Esse processo foi repetido com 1,5 ml de fenol e 1,5ml de uma solução de álcool isoamílico e clorofórmio (1:24), seguido de 3 ml de uma solução de álcool isoamílico e clorofórmio (1:24). O DNA genômico foi então precipitado com 6,0 ml de etanol absoluto. Esse método propicia a extração de grande quantidade de DNA (acima de 700µg a partir de 20 ml de sangue venoso).

3.4-AMPLIFICAÇÃO POR PCR

O DNA genômico foi amplificado pela técnica de PCR (*polymerase chain reaction*). As condições da PCR para os exons dos genes *FLN1*, *DCX*, *LIS1* e *EMX2* foram: desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos a 95°C por 30 s, temperatura de anelamento específica para cada par de *primers* por 30s e 72°C por 1 minuto, seguido de extensão final a 72°C por 7 minutos.

Os *primers*, quando possível, foram desenhados para que os produtos de amplificação não ultrapassassem 300 pares de base para que a técnica de triagem de mutações, o SSCP, fosse mais eficiente.

O gene *FLN1* possui 48 exons ocupando uma área de 26kpb de DNA genômico e um transcrito de aproximadamente 7.9 kb (FOX et al., 1998). A maioria das mutações foi descrita nos primeiros seis exons codificantes (FOX et al., 1998; SHEEN et al., 2001),

devido a isto e ao grande tamanho do gene, resolvemos concentrar a nossa pesquisa de mutações nestes 6 primeiros exons. A figura e tabela abaixo resumem a posição, seqüência e temperatura de anelamento dos *primers* utilizados.

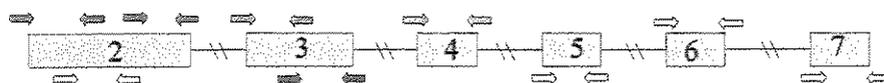


Figura 01-Esquema do gene *FLN1*, posição e seqüência dos *primers*

Tabela 08-*Primers* utilizados para amplificação do gene *FLN1*

<i>Primers</i>	seqüência	Ta (°C)
exon 2.1f	5'-CCGCATTTAAAGGGCTCGCT-3'	60
exon 2.1r	5'-GCGTGAAAGTGTCTGCTGGA-3'	60
exon 2.2f	5'-ACCGAGAAGGACCTGGCG-3'	65
exon 2.2r	5'-AGTGGGCCGCTGGTTGTG-3'	65
exon 2.3f	5'-GGCTTATCGCGCTGTTGGAG-3'	62
exon 2.3r	5'-GGAGATGGAAGGACGCACG-3'	62
exon 3.1f	5'-GTGCTGCCAGACCCTGACC-3'	60
exon 3.1r	5'-GCTTCTTGGCCTCCTCATCC-3'	60
exon 3.2f	5'-ACCCTGATCCTGCACTACTCC-3'	60
exon 3.2r	5'-GTGACCCCAGCCCAGTCTC-3'	60
exon 4f	5'-GGCGCAGAGGCAGGAGAG-3'	58
exon 4r	4'-GCCGATCCGGTCCCCTAC-3'	58
exon 5f	5'-GGATCGGCAGTTGGGAGAG-3'	65
exon 5r	5'-GGAAGACGTTGGCACACGG-3'	65
exon 6f	5'-AAGGGTGGAGGGGTGAGG-3'	60
exon 6r	5'- AAGAGCAGCCCCACTGAAAG-3'	60
exon 7f	5'-CTTTCAGTGGGGCTGCTCTT-3'	62
exon 7r	5'-CCAGCCACTGCCTGAGGTC-3'	62

(modificado de SHEEN et al., 2001) Ta=temperatura de anelamento.

O gene *LIS1* possui 11 exons, e ocupa uma região genômica de aproximadamente 90kbp (LO NIGRO et al., 1997). A região codificante abrange 1.233pb que vão do exon 2 ao 11 e há dois transcritos alternativos (5.5kb e 7.5Kb) que diferem no tamanho de suas regiões 3'UTR. A figura e tabela abaixo resumem a posição, seqüência e temperaturas de anelamento dos *primers* utilizados para amplificação do gene *LIS1*.

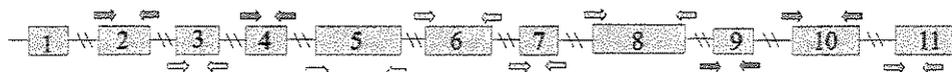


Figura 02-Esquema do gene *LIS1*, posição e seqüência dos *primers*

Tabela 09-*Primers* utilizados para amplificação do gene *LIS1*

<i>Primers</i>	seqüência	Ta (C°)
exon 2f	5'-TGTGGAAGACACTTAGTGGCATA-3'	60
exon 2r	5'-AAGAGACCTCCCAAAGCTGTA-3'	60
exon 3f	5'-TGAAAAGAGTATCTTCAGGGTTAATG-3'	57
exon 3r	5'-AAAATTGTGCGTAACTGTAACTACA-3'	57
exon 4f	5'-TTGTCTTGAGGATCATAGTTAAGCC-3'	57
exon 4r	5'-TGCAGAAGAATGTTATTTTCAGAA-3'	57
exon 5f	5'-GAAATCTATCTGTACGTA ACTAC-3'	57
exon 5r	5'-ATCACACGTTTCAGAGTACCTCC-3'	57
exon 6f	5'-AAGGAGTGATGGAGTTGGTGTT-3'	60
exon 6r	5'-GGGACACTGTACACTGTTAG-3'	60
exon 7f	5'-AACCCCATGGTAAAATCCCAT-3'	57
exon 7r	5'-GCCGCGTGATGCCTTTTCAACTA-3'	57
exon 8f	5'-ACTTCTGGGAAGTGCCTGATG-3'	57
exon 8r	5'-TTCAGATATCAGCAATAAAACCATG-3'	57
exon 9f	5'-GTCCATACCTAACTTTCTTGTTGG-3'	57
exon 9r	5'-CATAAAGCATTAATCCCAAAGG-3'	57
exon 10f	5'-AATAGATGCTATTTAAACATTTTGCC-3'	57
exon 10r	5'-GTTTGTCTGGCACTCCAAAATC-3'	57
exon 11f	5'-GGTCTCACTATGTTTGTGTCCA-3'	60
exon 11r	5'-GGTATCATCAGAGTGCATCCAG-3'	60

(modificado de LO NIGRO et al., 1997) Ta=temperatura de anelamento

O gene *DCX* possui 9 exons ocupando uma região genômica de aproximadamente 100kb. O RNAm possui 10kb com uma matriz de leitura de 1080pb abrangendo 6 exons (exons 4 a 9) e uma longa região 3'UTR. A figura e tabela abaixo resumem a seqüência dos *primers* e temperaturas de anelamento utilizadas para análise do gene *DCX*.

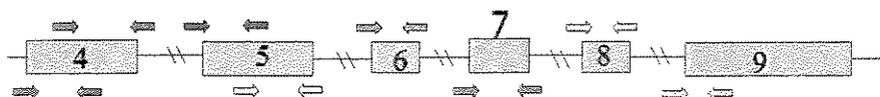


Figura 03-Esquema do gene *DCX*, posição e seqüência dos *primers*

Tabela 10-*Primers* utilizados para amplificação do gene *DCX*

<i>Primers</i>	seqüência	Ta (C°)
Exon 4af	5'-CTTCACCCCCATCCCTTTCT-3'	56
Exon 4ar	5'-CAGCGTACACAATCCCCTTG-3'	56
Exon 4bf	5'-AGAACCTTGCAGGCACTGAG-3	56
Exon 4br	5'-TAACCAATGATGCCACCTCC-3'	56
Exon 5af	5'-CACCTAATCACTTATTTCTTGCCTTAG-3'	60
Exon 5ar	5'-GCTCAAAAGAGTGGGCTGTC-3'	60
Exon 5bf	5'-AAGCTGGTTACCATCATCCG-3'	56
Exon 5br	5'-GAGTCCGTCAACAAGAAATGA-3'	56
Exon 6f	5'-GAGGTTTCATTGTACAGGACCA-3'	59
Exon 6r	5'-AAGGGGAGAGAACAATGGAGC-3'	59
Exon 7f	5'-TGTGTCCTTTTGCCCCAG-3'	56
Exon 7r	5'-TGTCCTCCATAAATGAAGTCAG-3'	56
Exon 8f	5'-TTCCTTTTCTCTCTTGCTTTGGG-3'	57
Exon 8r	5'-AACCTTCACCAAGCCATTCAG-3'	57
Exon 9f	5'-AGCAGACATTCAGAGCTCAA-3'	60
Exon 9r	5'-GACTCTGAGCACTCTCCCCTC-3'	60

(modificado de GLEESON et al., 1999) Ta=temperatura de anelamento

O gene *EMX2* possui 3 exons e abrange uma região genômica de 7.10kb. O RNAm possui 2.892 pb com uma região codificante de aproximadamente 756pb (NOONAN et al., 2001). A figura abaixo mostra a posição dos *primers* na região codificante do gene *EMX2*. A tabela abaixo sumariza a seqüência dos *primers* e temperaturas de anelamento utilizadas.

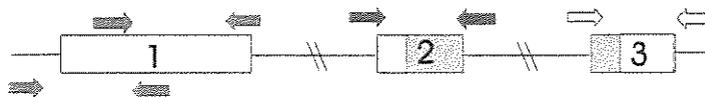


Figura 04-Esquema do gene *EMX2*, posição e seqüência dos *primers*. A área destacada representa o domínio *homeobox*

Tabela 11-*Primers* utilizados para amplificação do gene *EMX2*

<i>Primers</i>	seqüência	Ta (C°)
exon 1af	5'-ACAAACGAGTCCCCAATTCTCGTCC-3'	65
exon 1ar	5'ACACCAAGTCCGGGTTGGAGTAGA-3'	65
exon 1bf	5'-AATCCGTTCTCAACGGCTTCCAC-3'	65
exon 1br	5'-CTTGAAGCGATGACCCAGATATCG-3'	65
exon 2.f	5'-CCTAATGGGATTTCTGCTGTGCTCC-3'	65
exon 2.r	5'-TTGAGACATACATCCCGACCCCAG-3'	65
exon 3f	5'-AAGAACTAACGCACCCCATCTGCCT-3'	65
exon 3r	5'-TGCTCCATGTTGTCCGTTTCTGTGG-3'	65

(modificado de BRUNELLI et al., 1996) Ta=temperatura de anelamento

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 12.5 µl, contendo 40 ng de DNA genômico; 100 ng de cada *primer*; 200µM de dGTP, dCTP e dTTP; 25µM de dATP; 1,5 µCi[³³P]dATP; 0.5 unidades de *Taq* DNA polimerase e 1.5mM de MgCl₂. Quando necessário também foram acrescentados à reação DMSO e glicerol de forma que atingissem respectivamente 10% e 5% do volume total da reação.

3.5-DETECÇÃO DE MUTAÇÕES

A procura por mutações nos genes *FLN1*, *LISI*, *DCX*, e *EMX2* foi inicialmente realizada pela técnica do SSCP (*single-strand conformation polymorfism*), que permite a detecção de mutações por análise do polimorfismo de conformação da fita simples. Esta técnica baseia-se no fato de que DNAs simples fita em eletroforese de gel não-desnaturante tem seu padrão de migração influenciado pela sua seqüência de bases e por interações intermoleculares entre as mesmas. Desta forma, qualquer diferença na seqüência de nucleotídeos resultará em uma alteração de mobilidade da banda no gel.

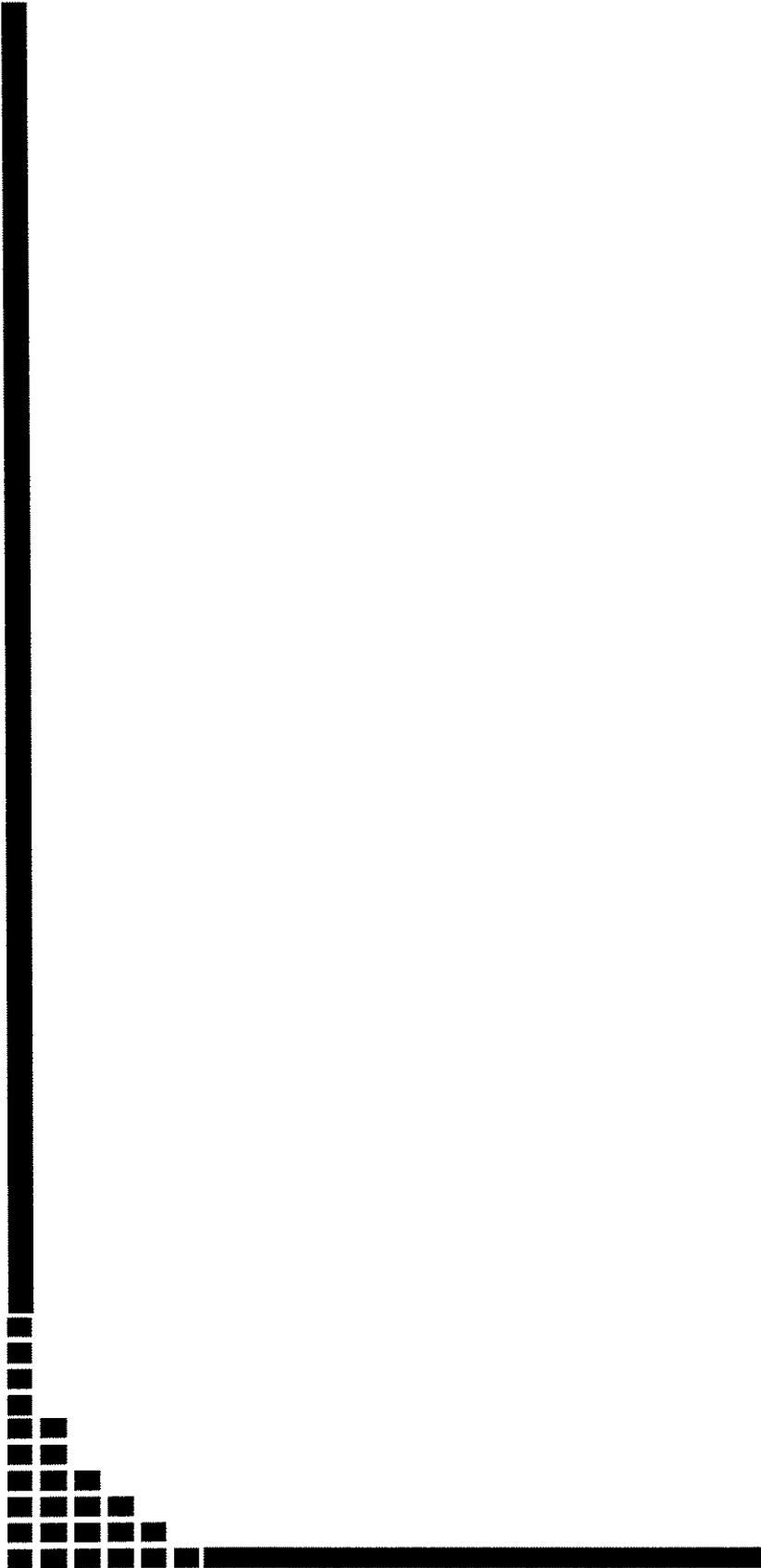
Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram desnaturados por aquecimento a 95°C durante um período que variou entre 5 a 10 minutos e em seguida foram submetidos a eletroforese em gel não desnaturante de poliacrilamida com concentração de 6%. e volume final contendo 5% de glicerol. A eletroforese foi realizada em temperatura ambiente. O padrão das bandas foi detectado por autoradiografia dos fragmentos marcados radiativamente pela incorporação de nucleotídeos trifosfato marcados com P₃₃ durante a reação de PCR. A reação de PCR e o SSCP foram feitos em duplicata para eliminar qualquer dúvida sobre o posicionamento da banda ou um possível falso positivo ocasionado pela adição de uma base errada na reação de PCR.

3.6-SEQUENCIAMENTO

Depois de detectada a alteração pelo SSCP, a mesma foi confirmada pelo sequenciamento do exon em questão utilizando-se a técnica de terminação de cadeia desenvolvida por SANGER et al. (1977). Na maioria das vezes sequenciamos diretamente o produto da PCR. Os *primers* para esta etapa do projeto foram os mesmos usados para a reação de PCR. Foram utilizados tanto o sequenciamento manual com marcação radioativa com ddATP-P₃₃ quanto o automático utilizando o *Big Dye Terminator Sequencing kit for megaBACE®1000*.

3.7-CLONAGEM E PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE PCR DO GENE *FLNI*

Devido à alta porcentagem de CGs do gene *FLNI*, optou-se por clonar os produtos de PCR que foram submetidos a sequenciamento. Para tal foi utilizado o protocolo para clonagem TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen). A purificação dos produtos da clonagem foi feita utilizando-se o UltraClean™ mini plasmidprep kit (Mobil).



4- RESULTADO.

4.1-ANÁLISE MOLECULAR

4.1.1-gene *FLN1*

A análise molecular por SSCP do gene *FLN1* foi realizada em 9 pacientes, todos eles com o diagnóstico de HNP ou outras heterotopias realizado por RM. Além disso 4 indivíduos assintomáticos (pais e irmãos de alguns pacientes) também foram genotipados.

Observou-se a alteração do padrão de migração pela técnica de SSCP em 5 pacientes analisados (figura 05), todas as alterações foram detectadas no exon 6 (tabela 12).

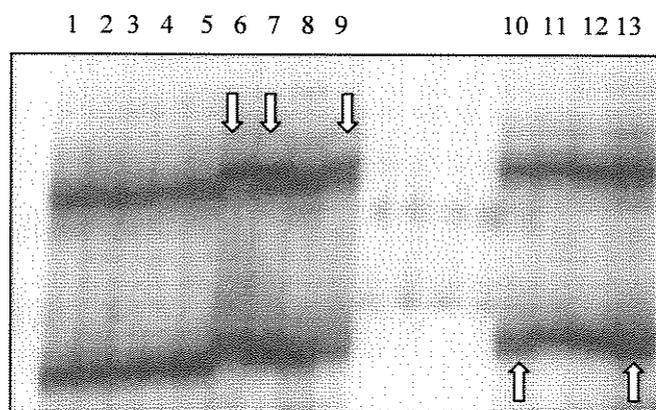


Figura 05-Gel de poliacrilamida 6% contendo 5% do volume em glicerol mostrando padrão de migração alterado (setas). Na figura estão presentes os 9 pacientes com HNP, parentes dos mesmos (11, 12) e controles normais (1, 2).

O sequenciamento dos indivíduos 10 e 13 (pacientes hnp-03 e hnp-07) revelou uma substituição na posição 1159G→C (NCBI, NM 001456) na terceira base do último códon do exon 6 (figura 06 e tabela 12). Esta alteração pode ter duas conseqüências: 1-) troca de um ácido glutâmico (D) para um ácido aspártico (E) na posição 329 da proteína *FLN1* ou 2-) destruição do sítio doador de *splicing* do intron 6.

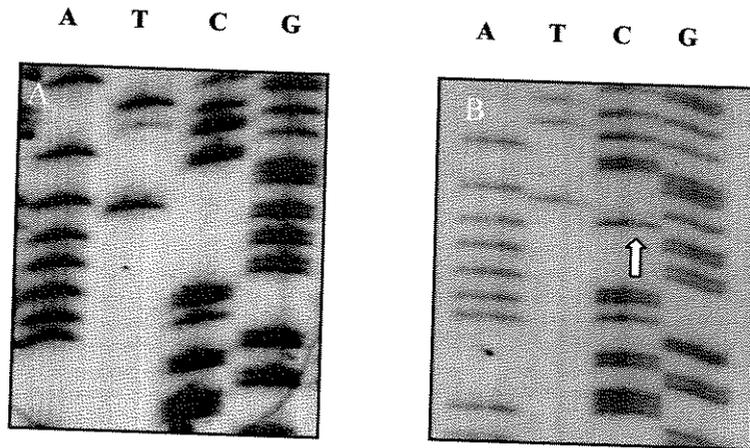


Figura 06-Sequenciamento mostrando mutação de sentido trocado 1159G → C no exon 6 do gene *FLN1* de uma paciente portadora de heteropia nodular periventricular (seta). A figura A mostra a seqüência de um indivíduo normal e a figura B evidência a seqüência mutante.

O sequenciamento dos indivíduos 5, 6 e 9 revelou uma substituição IVSV+ 519C→G (tabela 12) no quinto intron do gene *FLN1*, mais precisamente a 28pb do início do exon 6 (figura 07) .

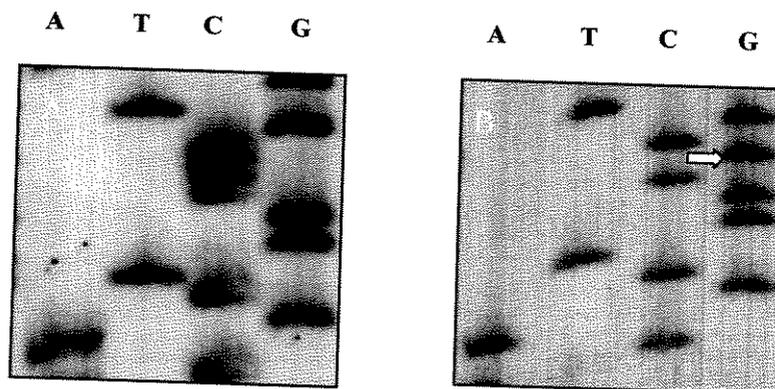


Figura 07-Sequenciamento mostrando substituição IVSV + 519C→G no 5° intron do gene *FLN1* (seta). A figura A mostra a seqüência normal e a figura B evidência a seqüência com a substituição.

4.1.2-gene *LIS1*

Nosso estudo por SSCP de todos os exons que codificam para a proteína LIS1 não mostrou nenhum padrão de alteração de mobilidade eletroforética, com apenas duas exceções: o exon 8 (tabela 13) que mostrou alteração do padrão de banda para um indivíduo (figura 08) e o exon 11 (tabela 13), no qual foi detectada alteração em 16 indivíduos, incluindo 7 pacientes, 6 parentes em primeiro grau dos mesmos e 3 indivíduos controle (figura 10). A mesma alteração foi detectada em mais 9 indivíduos de outra amostra composta de 32 controles normais (dados não mostrados).

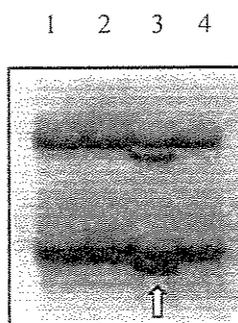


Figura 08-gel de poliacrilamida 6% contendo 5% do volume em glicerol mostrando padrão de migração alterado para o exon 8 do gene *LIS1* (seta) para um paciente portador do complexo agiria/paquigiria (3). Notar o padrão de migração normal dos controles (1 e 2) e da mãe do paciente (4).

O sequenciamento automático do indivíduo com padrão de migração alterado para o exon 8 revelou uma substituição na posição 1385A→C (NCBI, NM0004300) (figura 09) que resulta na troca de uma histidina (H) por uma prolina (P) na posição 277, correspondente ao quinto domínio WD da proteína LIS1. Esta alteração não foi encontrada em 50 controles normais não relacionados.

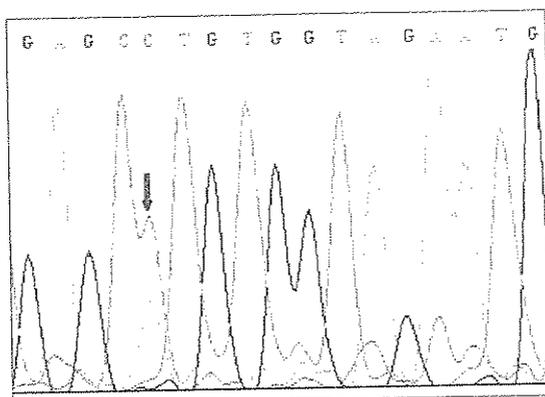


Figura 09-Sequenciamento automático mostrando uma mutação de sentido trocado A→ C no exon 8 do gene *LISI* em um paciente com LIS grau 3a (seta).

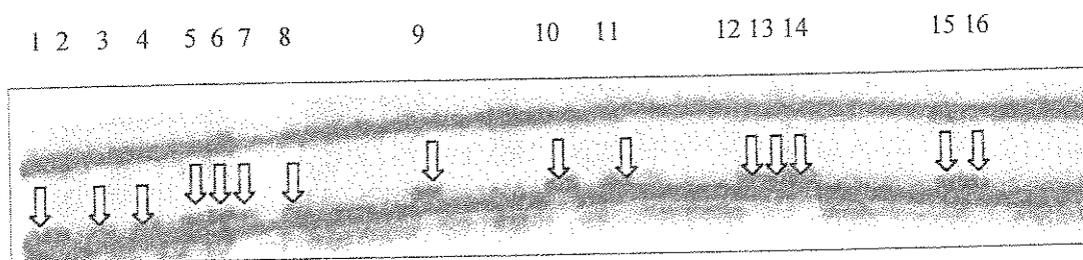


Figura 10-gel de poliacrilamida 6% contendo 5% do volume em glicerol mostrando padrão de migração alterado para o exon 11 do gene *LISI* (seta). Para facilitar a descrição dos resultados no texto, somente os indivíduos com padrão alterado foram identificados com números na figura.

O alinhamento entre a seqüência da proteína LIS1 humana e suas ortólogas em outras espécies mostra que a histidina na posição 277 é um aminoácido conservado entre diferentes organismos (figura 11).

<i>H. sapiens</i>	MVLSQRQRDELNRAIADYLRNSGYEBAVSVEKKEAELDMNEELDKKIVASLLEKKWTSV	58
Mutante	MVLSQRQRDELNRAIADYLRNSGYEBAVSVEKKEAELDMNEELDKKIVASLLEKKWTSV	58
<i>M. musculus</i>	MVLSQRQRDELNRAIADYLRNSGYEBAVSVEKKEAELDMNEELDKKIVASLLEKKWTSV	58
<i>R. novergicus</i>	MVLSQRQRDELNRAIADYLRNSGYEBAVSVEKKEAELDMNEELDKKIVASLLEKKWTSV	58
<i>D. melanogaster</i>	MKMVLSQRQRDELNRAIADYLRNSGYEBAVSVEKKEAELDMNEELDKKIVASLLEKKWTSV	58
<i>C. elegans</i>	--MQLSERQKEEINRAIAEYVMQNHGYSESFSVFLKESGLSE---NDIKPLGLLEKKWTSV	56
<i>A. thaliana</i>	-----	
<i>H. sapiens</i>	IRLQKKVMELESKLINEAKEEFTSGGPLEQKRDPKQWI PRPPEKYALSGHRSPVTRVI FHP	118
Mutante	IRLQKKVMELESKLINEAKEEFTSGGPLEQKRDPKQWI PRPPEKYALSGHRSPVTRVI FHP	118
<i>M. musculus</i>	IRLQKKVMELESKLINEAKEEFTSGGPLEQKRDPKQWI PRPPEKYALSGHRSPVTRVI FHP	118
<i>R. novergicus</i>	IRLQKKVMELESKLINEAKEEFTSGGPLEQKRDPKQWI PRPPEKYALSGHRSPVTRVI FHP	118
<i>D. melanogaster</i>	IRLQKKVMELEAKLVEAKEEVIETGAPTKKRT PGQWI PRPPEKFGLTGHRASITRVI FHP	118
<i>C. elegans</i>	LRLQKRVNDLESKLGESQREINHGAPTRDKRQAADWI PRPPEKQKLTGHRLETRVI FHP	116
<i>A. thaliana</i>	-----MADIIPATASFTPIVHSQTLTGHNRVSSVVKFSS	34
<i>H. sapiens</i>	VFEVMVSA SEDATIKVWDYETG-----DFERTLKGHTDSVQDISFDHSGKLLASCSADMT	173
Mutante	VFEVMVSA SEDATIKVWDYETG-----DFERTLKGHTDSVQDISFDHSGKLLASCSADMT	173
<i>M. musculus</i>	VFEVMVSA SEDATIKVWDYETG-----DFERTLKGHTDSVQDISFDHSGKLLASCSADMT	173
<i>R. novergicus</i>	VFEVMVSA SEDATIKVWDYETG-----DFERTLKGHTDSVQDISFDHSGKLLASCSADMT	173
<i>D. melanogaster</i>	IYFALMVSA SEDATIRIWDYETG-----EYERSLKGHTDSVQDVAFDAQKLLASCSADLS	173
<i>C. elegans</i>	LWYIMASGSEDATIKVWDYETG-----QLERTLKGHTDAVNDIAIDAGKQLVSGSDDL	171
<i>A. thaliana</i>	DGSLLASASADKTI RYTYTENTINDPIAEPVQEFTHENGISDVAFTSSDARFIVSASDDKT	94
<i>H. sapiens</i>	IKLWDFQG-FECIRTMHGH DHHVSSVAIMPNGDHI VSA SRDKTI KMWEVQFGYGVKTFEG	232
Mutante	IKLWDFQG-FECIRTMHGH DHHVSSVAIMPNGDHI VSA SRDKTI KMWEVQFGYGVKTFEG	232
<i>M. musculus</i>	IKLWDFQG-FECIRTMHGH DHHVSSVAIMPNGDHI VSA SRDKTI KMWEVQFGYGVKTFEG	232
<i>R. novergicus</i>	IKLWDFQG-FECIRTMHGH DHHVSSVAIMPNGDHI VSA SRDKTI KMWEVQFGYGVKTFEG	232
<i>D. melanogaster</i>	IKLWDFQGSYECIKTMHGH DHHVSSVAEVSAGDYVLSASRDRTI KMWEVATFGYGVKTYTFRG	233
<i>C. elegans</i>	IKLWDFQGYDCLKKLGHEHTIVS SVTFLPFGDFVLSAARDHTI KQWDISTFGYGVKTYTFRG	231
<i>A. thaliana</i>	LKLWDFVET--GSLIKTLIGHITNYAFVWVFNHQSNNMIVSGGDETVRIWDVTTIKGLKVLRA	153
<i>H. sapiens</i>	HRWVVRMVRPNQDQTLIASCSNDQTVRVVWVATKECKAELR	291
Mutante	HRWVVRMVRPNQDQTLIASCSNDQTVRVVWVATKECKAELR	291
<i>M. musculus</i>	HRWVVRMVRPNQDQTLIASCSNDQTVRVVWVATKECKAELR	291
<i>R. novergicus</i>	HRWVVRMVRPNQDQTLIASCSNDQTVRVVWVATKECKAELR	291
<i>D. melanogaster</i>	HRWVVRMVRVHIEGGIEAFCNSNDQTVRVVWVATKECKAELR	292
<i>C. elegans</i>	HRWVVRMIRISNDQTLFASASLDQTVTVWSFATKSAKLVLR	290
<i>A. thaliana</i>	HRDPVAVDENRDCGLIVGSSYDGLRIRIWDSEGTGHGVKTLI	209
<i>H. sapiens</i>	VSTGMCLMTLVGHDN---WVRGVLFHS	348
Mutante	VSTGMCLMTLVGHDN---WVRGVLFHS	348
<i>M. musculus</i>	VSTGMCLMTLVGHDN---WVRGVLFHS	348
<i>R. novergicus</i>	VSTGMCLMTLVGHDN---WVRGVLFHS	348
<i>D. melanogaster</i>	VSVLCLLTLGHDN---WVRGLAFHP	349
<i>C. elegans</i>	INTGDLVLFLLAHEN---WVRGLAFHP	342
<i>A. thaliana</i>	IRSAKFLKTYTGHVNAQYICIGAFSPV	253
<i>H. sapiens</i>	GGKFEILSCADDKTLRVWDYKMKRMKTLNAHEHEVTSLDPHKTA PYVVTGSSVDQTVKVWE	408
Mutante	GGKFEILSCADDKTLRVWDYKMKRMKTLNAHEHEVTSLDPHKTA PYVVTGSSVDQTVKVWE	408
<i>M. musculus</i>	GGKFEILSCADDKTLRVWDYKMKRMKTLNAHEHEVTSLDPHKTA PYVVTGSSVDQTVKVWE	408
<i>R. novergicus</i>	GGKFEILSCADDKTLRVWDYKMKRMKTLNAHEHEVTSLDPHKTA PYVVTGSSVDQTVKVWE	408
<i>D. melanogaster</i>	GGKILVSA SDKTLRVWDLRNMKRMKTLVAHQHFPFSLIDFNKAHPYVITGSSVDQTVKVWE	409
<i>C. elegans</i>	KGKYLISVADDKTLRVWELSAQRMKALBAHEHEVTSVAAPHQTSPPFVITGSSVDMSSQVWE	402
<i>A. thaliana</i>	HGKRIVSGSEDNCTVMWELNSKLLQKLEGHTETVMNVACHPTENLIAGSLDKTVRIWT	313
<i>H. sapiens</i>	CR-- 410	
Mutante	CR-- 410	
<i>M. musculus</i>	CR-- 410	
<i>R. novergicus</i>	CR-- 410	
<i>D. melanogaster</i>	CR-- 411	
<i>C. elegans</i>	CR-- 404	
<i>A. thaliana</i>	QKKE 317	

Figura 11- Alinhamento entre a seqüência da proteína LIS1 humana normal e mutante e suas ortólogas em *M. musculus*, *R. novergicus*, *D. melanogaster*, *C. elegans* e *A. thaliana*. Notar que a histidina na posição 277 da proteína é conservada em todas as espécies com exceção de *A. thaliana*. O 5º domínio WD está destacado em azul e a prolina mutante está destacada em amarelo.

O sequenciamento automático dos fragmentos de PCR mostrando alteração no *SSCP* correspondente ao exon 11 do gene *LIS1* revelou uma substituição na posição 1805C→T na região 3'-*UTR* também presente em 9 controles normais não relacionados. (figura 12).

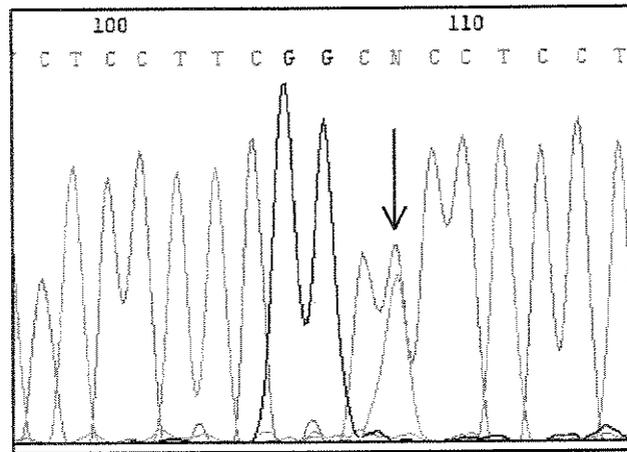


Figura 12-Sequenciamento automático mostrando uma substituição na posição 1805C→T na região 3' *UTR* do gene *LIS1* (seta).

4.1.3-gene *DCX*

Todos os 15 pacientes portadores do espectro LIS/SBH e seus parentes que tiveram o gene *LIS1* testado para a presença de mutações também foram pesquisados para alterações intragênicas na região codificante do gene *DCX*.

Não foram encontradas alterações no gene *DCX* para nenhum dos pacientes testados com exceção de dois indivíduos pertencentes a mesma família (uma menina portadora de lissencefalia e seu pai assintomático) que mostraram alteração no padrão de migração para os pares de *primer* 5b (figura 13).

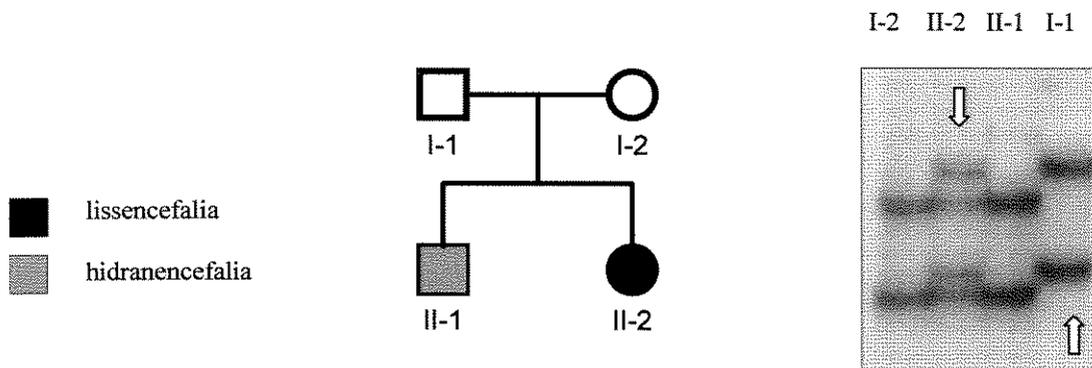


Figura 13-Família na qual foi detectado o padrão de alteração de migração no gene *DCX*. Observar a presença da banda anômala tanto na filha portadora de lissencefalia incompleta (II-2) como no pai assintomático (I-1).

O sequenciamento revelou uma substituição na posição IVSV + 19G (tabela 13), mais precisamente no 19º par de bases do quinto intron (figura 14) indicando a presença de uma variante neutra. Esta substituição não foi encontrada em 50 controles normais testados, tratando-se provavelmente de uma variante rara ou idiomorfismo.

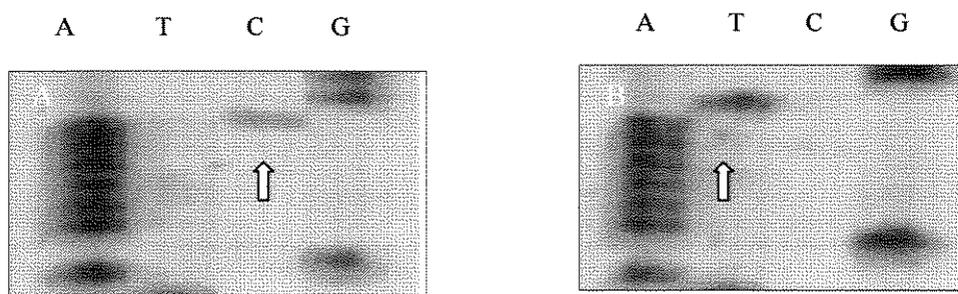


Figura 14-Sequenciamento manual mostrando a seqüência normal (A) e a seqüência alterada (B). A figura mostra o sequenciamento da fita *antisense*, por isso temos na figura a troca de um C por um T em lugar do G→A citado no texto. É importante citar que estamos mostrando o sequenciamento da fita *antisense* por termos obtido um resultado melhor quando comparado a fita *sense*.

4.1.4-gene *EMX2*

A pesquisa de mutações para o gene *EMX2* foi realizada em um total de 34 pacientes portadores de esquizencefalia. A presença de alterações no padrão de mobilidade das bandas foi detectada em 5 pacientes (figura 15). Estas alterações estão localizadas no exon 2, uma região funcionalmente importante pois parte dela codifica para o domínio *homeobox* da proteína.

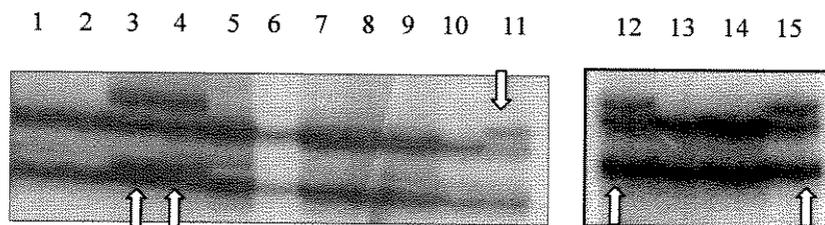


Figura 15-Gel de poliacrilamida 6% contendo 5% do volume em glicerol mostrando padrão de migração alterado para o exon 2 do gene *EMX2* (setas). Notar que não foram mostrados todos os indivíduos testados para mutação no gene *EMX2*.

O sequenciamento de 4 indivíduos (3,4,12 e 15) apresentando alteração no padrão de migração detectada pela técnica do SSCP mostrou uma substituição na posição 796C→A (NM 004098) (tabela 14) localizada mais precisamente na primeira base do terceiro codon do domínio *homeobox* (figura 16).

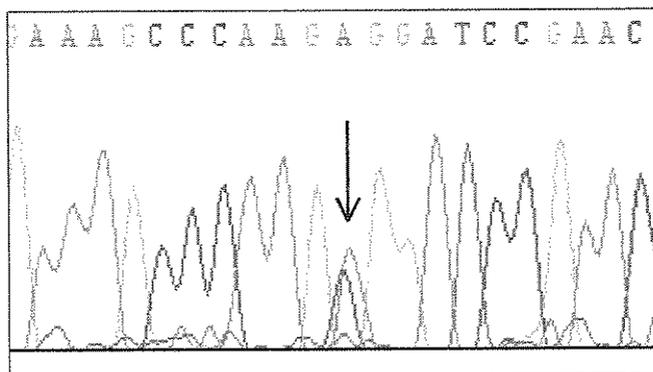


Figura 16-Sequenciamento automático mostrando a substituição 796C→A no gene *EMX2* (seta).

Esta alteração mantém o aminoácido codificado pela trinca de bases selvagem (mutação sinonímia) deste modo tanto a seqüência normal como a alterada continuam codificando uma arginina. A mesma alteração foi encontrada em 4 indivíduos do grupo controle composto de 50 indivíduos normais (8% do total).

4.2-CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO DOS PACIENTES COM ALTERAÇÃO GÊNICA

4.2.1-Gene *FLNI* e Heterotopias nodulares

A tabela abaixo resume os achados moleculares para o grupo das HNP e os padrões de neuroimagem encontrados:

Tabela 12-Neuroimagem e achados moleculares do grupo da HNP

Paciente	achados de neuroimagem	alteração no SSCP	sequenciamento
hnp-01	HNPB, colpocefalia e heterotopias na substância branca	na	-
hnp-02	HNP assimétrica à esquerda, lobos cerebrais assimétricos com leve redução à esquerda	na	-
hnp-03	HNPB	exon 6	1159G→C*, D319E
hnp-04	HNP em corno temporal direito	na	-
hnp-05	HNPB	exon 6	IVSV + 519C→G
hnp-06	HNP à D, heterotopias focais e polimicrogiria ou displasia	exon 6	IVSV + 519C→G
hnp-07	HNPB	exon 6	1159G→C*, D319E
hnp-08	Heterotopia transmento	exon 6	IVSV + 519C→G
hnp-09	HNP à D, assimetria hipocampal e/ diminuição do hipocampo D, agenesia do c caloso e polimicrogiria	na	-

HNPB = Heterotopia Nodular Periventricular Bilateral, HNP = Heterotopia Nodular Periventricular,

na=não alterado, D= aspartato, E= glutamato

* posição da alteração relativa ao cDNA do gene *FLNI* (NCBI, NM 001456)

Os indivíduos hnp-03 e hnp-07 são duas mulheres com 61 e 31 anos respectivamente e que pertencem a mesma família (figura18), mãe (hnp-03) e filha (hnp-07). A paciente hnp-07 apresenta deficiência mental moderada e crises intratáveis desde os 4 anos de idade. Os achados de neuroimagem estão ilustrados na figura 17 e demonstram a presença de HNP, com nódulos ectópicos bilaterais de substância cinzenta adjacentes aos ventrículos laterais sem outras alterações de substância branca e cinzenta cortical.(tabela 12). Sua mãe, a paciente hnp-03 não apresenta retardo mental e tem crises parciais facilmente controladas com medicação. Os achados de neuroimagem mostram a presença de HNP clássica (tabela 12), semelhante ao encontrado em sua filha (paciente hnp-07). Um dado interessante, é que a história familiar revelou que esta paciente (hnp-03) teve 5 abortos espontâneos. O SSCP mostrou o mesmo padrão de alteração da migração para as duas pacientes. O sequenciamento revelou a alteração 1159G→C em ambas pacientes.

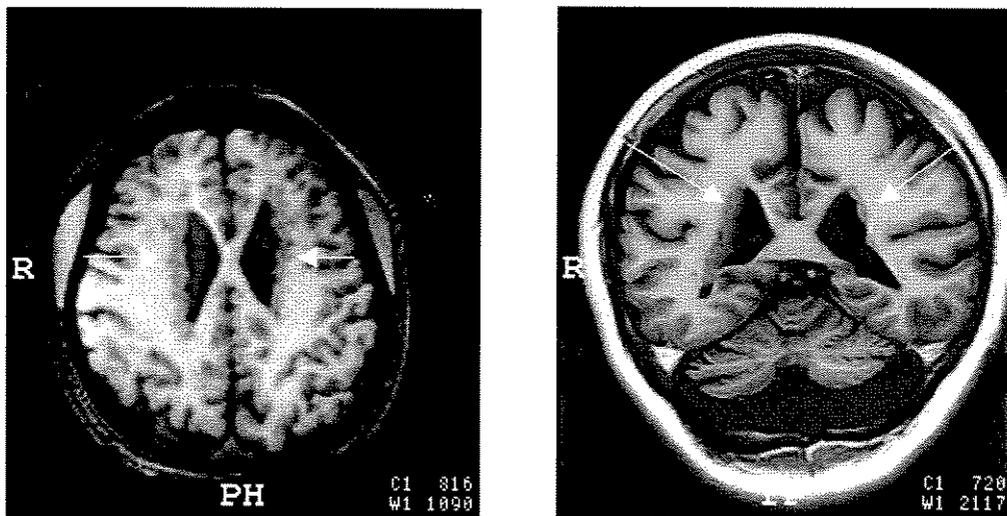


Figura 17-Cortes axial e coronal da paciente hnp-07 mostrando heterotopia nodular periventricular bilateral (setas).



Figura 18-Heredograma mostrando padrão de herança dominante ligado ao X. Notar o alto número de abortos espontâneos que provavelmente são do sexo masculino.

O indivíduo hnp-05 é uma mulher de 27 anos sem antecedentes familiares relevantes e sem retardo mental . Apresenta crises parciais na frequência de uma vez por mês, mesmo em uso de medicação. A RM evidencia HNP bilateral (tabela 12), seguindo o padrão clássico (figura 19). O SSCP mostrou alteração no padrão de migração para exon 6 desta paciente , este padrão é diferente das pacientes hnp-03 e hnp-07.O sequenciamento revelou a alteração IVSV + 519C→G.

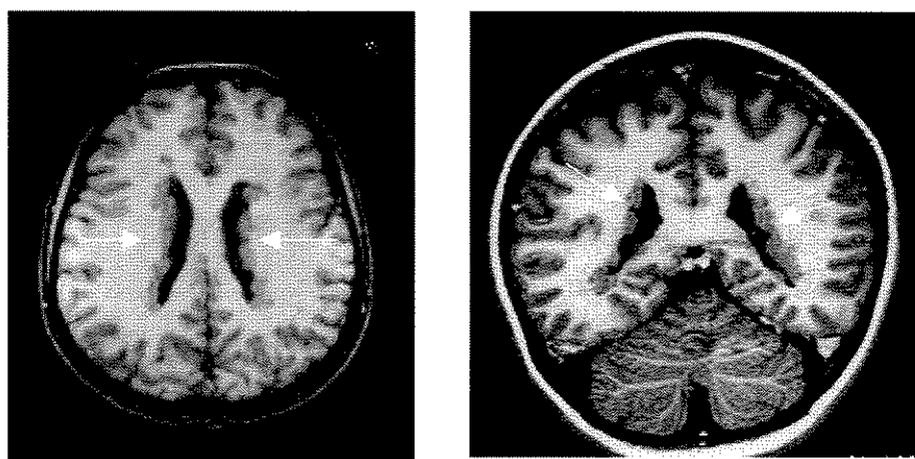


Figura 19-Cortes axial e coronal do paciente hnp-05 mostrando nódulos bilaterais alinhando os ventrículos, característica típica da HNPB clássica (setas).

O indivíduo hnp-06 é uma mulher de 21 anos sem antecedentes familiares relevantes, possivelmente um caso isolado. Não possui retardo mental. Apresenta crises parciais semanais em uso de medicação. Sua RM (figura 20a) revela a presença de nódulos de substância cinzenta junto ao ventrículo lateral direito e uma extensa área de heterotopia subcortical direita que se estende desde a região parieto-occipital até a região temporal (tabela 12). Esses achados de neuroimagem são atípicos para um indivíduo com mutação no gene *FLN1*. A alteração no SSCP é semelhante à encontrada nos pacientes hnp-05, 06 e 08. O sequenciamento também revelou a alteração IVSV + 519C→G.

A paciente hnp-08 é uma mulher de 22 anos sem antecedentes familiares relevantes, caso isolado. Não possui retardo mental. Apresenta crises parciais que ocorrem semanalmente, mesmo em uso de medicação. A RM mostra área de heterotopia periventricular e subcortical estendendo-se até a superfície cortical ('heterotopia *transmantle*') em região temporo-occipital direita (tabela 12). A alteração na superfície do córtex pode estar associada de polimicrogiria ou displasia (figura 20b), sendo portanto um padrão de neuroimagem atípico para pacientes com mutações no gene *FLN1* (SHEEN et al., 2001). A alteração no SSCP é semelhante a encontrada para o paciente hnp-05. O sequenciamento revelou a mesma alteração IVSV + 519C→G.

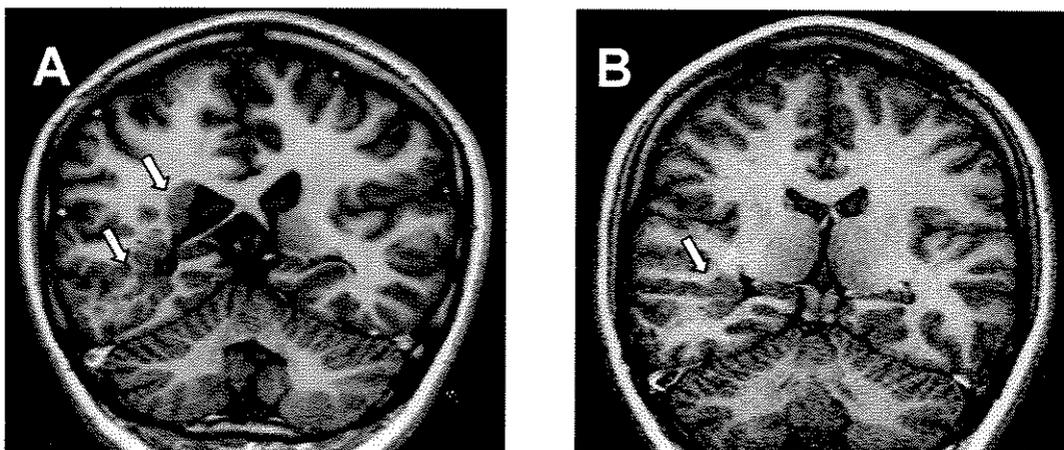


Figura 20-(A) corte coronal do paciente hnp-06 mostrando a presença de heterotopias periventriculares à direita e extensa área de heterotopia subcortical estendendo-se até a superfície do córtex lateral (seta). (B) Corte coronal do paciente hnp-08 evidenciando nódulos de substância cinzenta junto ao corno temporal do ventrículo lateral direito, estendendo-se até a superfície cortical (seta).

4.2.2-Genes *LIS1* e *DCX* e espectro das LIS/HSB

A tabela abaixo resume os achados moleculares e de neuroimagem dos pacientes com o espectro das LIS/HSB.

Tabela 13-Neuroimagem e achados moleculares do grupo do espectro Lissencefalia/HSB

paciente	achados de neuroimagem	alteração no SSCP do <i>LIS1</i>	sequenciamento	alteração no SSCP do <i>DCX</i>	sequenciamento
lis-01	lissencefalia incompleta tipo I, grau a definir	na	-	exon 5B	IVSV + 19G→A
lis-02	HSB posterior, difuso e descontinuo mais à D (grau 6a1)	na	-	na	-
lis-03	paquigiria difusa com predomínio posterior (grau 4a)	na	-	na	-
lis-04	paquigiria difusa com predomínio posterior bilateral (grau 4a)	na	-	na	-
lis-05	lissencefalia incompleta tipo I, grau a definir	exon 11	1805C→T*	na	-
lis-06	lissencefalia incompleta tipo I, grau a definir	exon 11	1805C→T*	na	-
lis-07	HSB mais anterior, difusa continua e grossa (grau 6b1)	na	-	na	-
lis-08	paquigiria difusa com predomínio posterior (grau 4a)	na	-	na	-
lis-09	HSB grau 6b3	exon 11	1805C→T*	na	-
lis-10	agiria posterior e paquigiria anterior (grau 3a)	exon 11	1805C→T*	na	-
lis-11	agiria posterior e paquigiria anterior (grau 3a)	exon 8	1385A→C* H277P	na	-
lis-12	paquigiria posterior e HSB anterior (grau 5a)	exon 11	1805C→T*	na	-
lis-13	inconclusivo: suspeitas de HSB com bandas finas e anteriores	exon 11	1805C→T*	na	-
lis-14	HSB com bandas finas difusas mais acentuadas frontalmente e mais finas posteriormente (grau 6b3)	exon 11	1805C→T*	na	-
lis-15	paquigiria difusa com predomínio anterior (grau 4b1)	na	-	na	-

HSB = Heterotopia subcortical em banda, na= não alterado; H= Histidina; P=Prolina

* posição da alteração relativa ao cDNA do gene *LIS1* (NCBI, NM 000430)

Como este grupo é o mais extenso em resultados moleculares e há dois genes envolvidos na etiologia do espectro LIS/HSB dividimos esta seção em sub-itens para uma melhor apresentação da correlação genótipo-fenótipo.

4.2.3-Mutação A →C no gene *LIS1*

O paciente lis11, portador da mutação 1385A→C no exon 8 do gene *LIS1*, é um menino de 3 anos sem antecedentes pré-natais e com histórico familiar de epilepsia positivo, possuindo uma avó e bisavó paternas com crises de etiologia desconhecida. O paciente possui retardo mental. Crises diárias estão presentes mesmo em uso de medicação, além de apresentar tetraparesia e retardo do desenvolvimento neuropsicomotor. O exame de RM apontou para lissencefalia incompleta assim como para a presença de heterotopias laminares bilaterais de substância cinzenta tanto nas regiões frontais como parietais (figura 21). Os sulcos cerebrais são rasos nos lobos frontal e temporal (paquigiria) havendo uma ausência de giros (agiria) nos lobos parietais e occipitais, portanto este paciente por ser classificado como portador de LIS grau 3a (tabela 13). O paciente também tem algumas características faciais típicas da síndrome de Miller-Dieker como narinas antevertidas e lábios superiores proeminentes mas que não são suficientes para enquadrá-lo como portador desta síndrome.

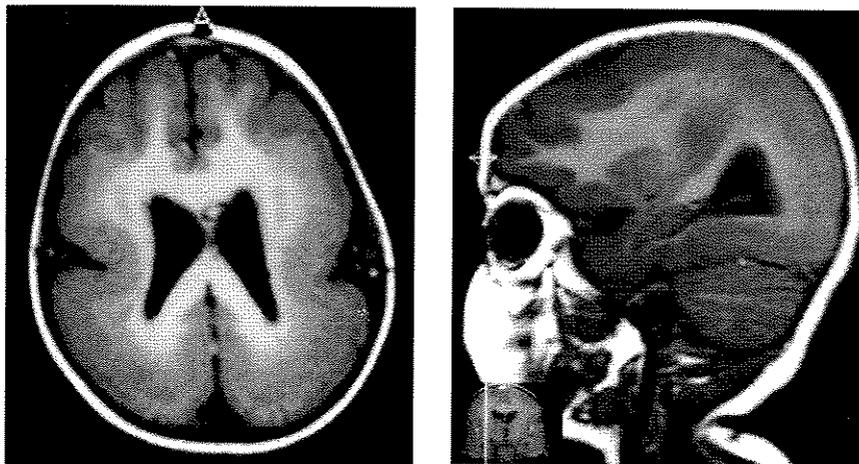


Figura 21-Cortes axial e sagital de um paciente com mutação em *LIS1* evidenciando a total ausência de giros nas regiões posteriores(agiria) e giros rasos e malformados anteriormente (paquigiria) caracterizando LIS grau 3a.

4.2.4-Pacientes portadores do polimorfismo 1805C→T na região 3'UTR do gene *LIS1*

A paciente lis-05 é uma menina de 15 anos com histórico familiar para epilepsia (um primo pelo lado materno) e histórico negativo para retardo do desenvolvimento e deficiência mental. No entanto possui como antecedentes gestacionais infecção por toxoplasmose (o mês exato não foi referido). A paciente possui retardo mental. Suas crises são típicas da Síndrome de West e Lennox-Gastaut e ocorrem diariamente mesmo sob medicação, o exame neurológico evidenciou retardo do desenvolvimento neuropsicomotor e síndrome piramidal global. A tomografia computadorizada (TC), evidenciou fissuras silvianas pouco desenvolvidas com pobreza dos sulcos corticais e calcificações puntiformes em substância branca periventricular, um quadro típico de lissencefalia incompleta (agiria/paquigiria) tipo I (tabela 13). Tanto a paciente como a sua mãe mostraram o mesmo padrão de alteração detectado por SSCP no exon 11 do gene *LIS1*, a variante neutra 1805C→T na região 3'UTR. A pesquisa por mutações no gene *DCX* foi negativa.

O paciente lis-06 é um menino de 8 anos sem antecedentes familiares de retardo mental e epilepsia mas com antecedentes gestacionais de febre e *rash* no início de sua gestação. O paciente possui retardo mental. Apresenta crises típicas da síndrome Lennox-Gastaut com frequência diária mesmo sob medicação. O exame neurológico evidenciou a presença de síndrome piramidal global e retardo do desenvolvimento neuropsicomotor. O exame de RM aponta para a presença de agiria/paquigira difusa (tabela 13). Esse indivíduo também apresentou alteração no exon 11 do gene *LIS1*, a mesma variante encontrada na paciente anterior e sua mãe. Nenhuma alteração de migração foi encontrada no gene *DCX*.

A paciente lis-09 é uma mulher de 29 anos com fraco histórico familiar para epilepsia (uma prima e uma tia-avó da mãe) e histórico negativo para deficiência mental na família. As crises são parciais e diárias. A RM se caracteriza por bandas finas completas de heteropia neuronal com predomínio anterior (figura 22), padrão típico da HSB 6b3 (tabela 13). Tanto a paciente como sua mãe assintomática apresentaram alteração no padrão de migração para o exon 11 do gene *LIS1* cujo sequenciamento evidenciou a troca na

posição 1805C→T na região 3'UTR. A pesquisa para mutações utilizando *SSCP* no gene *DCX* não mostrou nenhum padrão de alteração de banda em relação aos controles normais.

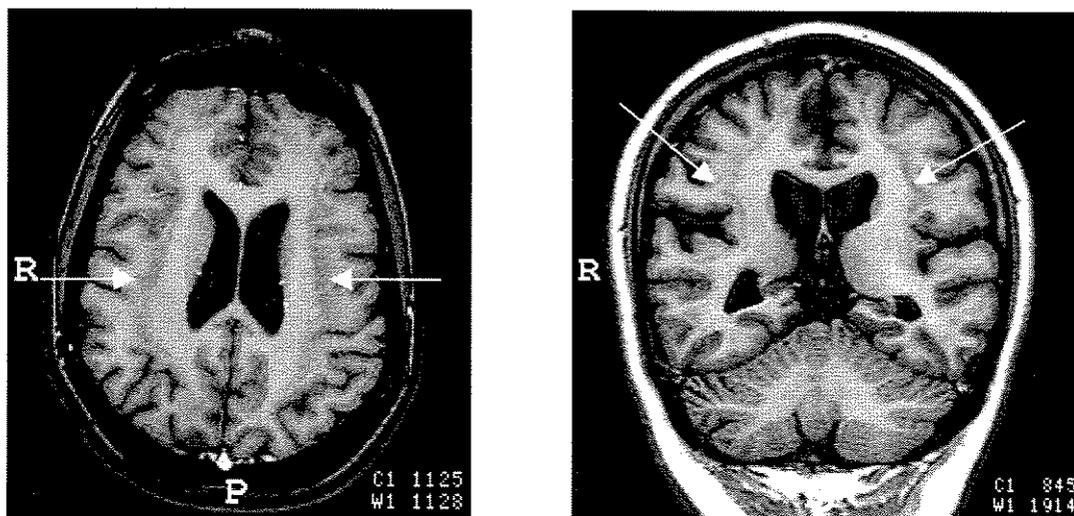


Figura 22-Cortes axial e coronal de RM mostrando bandas finas e difusas com predomínio anterior em uma mulher com HSB (setas).

O paciente lis-10 é um menino de 6 anos com antecedentes familiares de epilepsia, um tio e uma prima pelo lado materno, e tentativa de aborto. O paciente possui retardo mental. As crises são parciais e diárias mesmo sob medicação. O exame neurológico evidenciou principalmente hipotonia e síndrome piramidal. A RM mostra giros cerebrais espessados difusamente com sulcos rasos típicos do padrão de agiria/paquigiria grau 3a (tabela 13). A pesquisa por *SSCP* para o gene *LIS1* evidenciou alteração no exon 11 cujo sequenciamento mostrou ser a variante 1805C→T na região 3'UTR. A mãe do paciente, assintomática, também apresentou essa mesma variante. A pesquisa para o gene *DCX* foi negativa.

O paciente lis-12 é uma mulher com 22 anos e antecedentes familiares importantes: a mãe da paciente teve um aborto e um filho que faleceu aos dois meses de idade, além de possuir vários primos maternos e paternos com deficiência mental e retardo do desenvolvimento neuropsicomotor. A paciente possui retardo mental. As crises são

parciais e ocorrem geralmente duas vezes por mês. O exame neurológico detectou a presença de retardo do desenvolvimento neuropsicomotor. O exame de neuroimagem (RM) evidência LIS grau 5a (tabela 13) caracterizado pela presença de paquigiria posterior e HSB anterior (figura 23). O gradiente da malformação é claramente postero-anterior fato que poderia indicar a presença de mutações no gene *LIS1*. A análise molecular do mesmo evidenciou apenas a presença da alteração 1805C→T na região 3'UTR. A análise do gene *DCX* por SSCP não resultou em nenhuma suspeita de mutação. É importante ressaltar que a mãe da paciente que também realizou RM e não apresentou nenhuma alteração anatômica, também mostrou o mesmo padrão eletroforético alterado e a mesma substituição no sequenciamento.

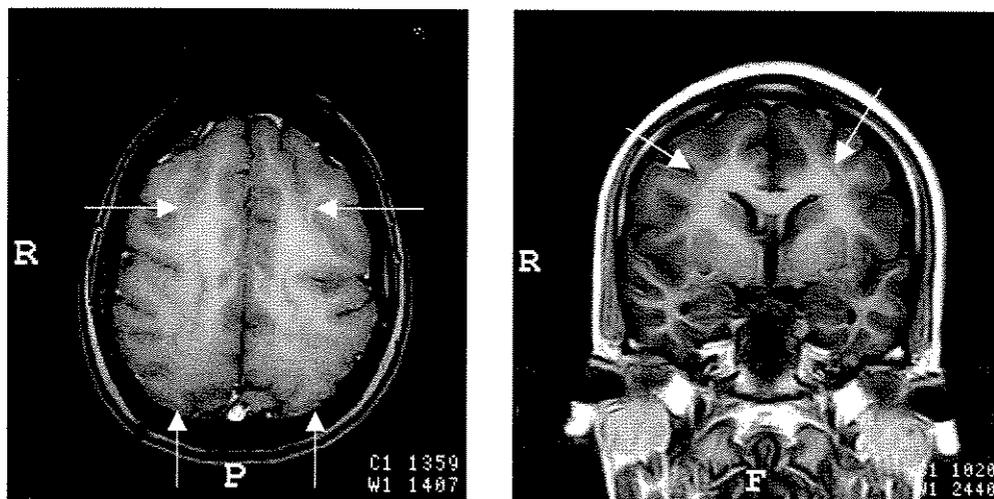


Figura 23-Cortes axial e coronal de RM evidenciando HSB nas regiões frontais transicionando para paquigiria nas regiões posteriores (setas).

O paciente lis-13 é uma menina de 2 anos de idade com histórico familiar negativo para epilepsia e apenas um primo pelo lado paterno com retardo mental. A presença de retardo mental não pode ser determinada. As crises dos tipos tônica e mioclônica têm frequência de 4 a 5 episódios por dia. O exame de RM aponta evidência de HSB. Tanto a criança como a sua mãe mostraram a presença da variante 1805C→T na região 3'UTR.. A pesquisa por SSCP para o gene *DCX* não evidenciou nenhuma alteração.

O indivíduo lis-14 é um homem sem nenhum antecedente familiar de epilepsia ou retardo do desenvolvimento, portador de HSB com bandas finas difusas mais acentuadas frontalmente e mais finas posteriormente (grau 6b3).(figura 24 e tabela 13). O paciente não possui retardo mental. As crises são provavelmente atônicas com frequência aproximada de 2 episódios por dia mesmo sob uso de medicação. O exame neurológico foi normal.

A análise por SSCP de todo o gene *LIS1* não mostrou nenhum padrão de alteração para este gene, com exceção do exon 11 do gene *LIS1* que após o sequenciamento demonstrou ser a variante 1805C→T na região 3'UTR. A pesquisa para mutações no gene *DCX* foi negativa.

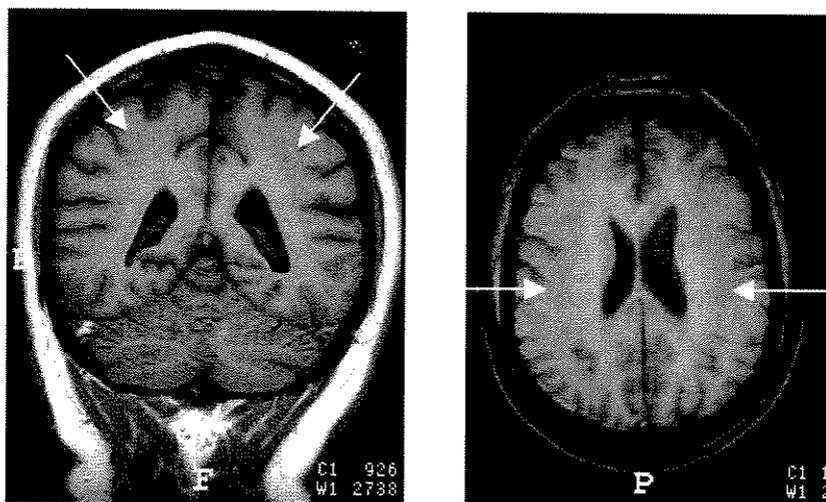


Figura 24-Cortes coronal e axial de RM mostrando a presença de bandas finas e difusas de neurônios heterotópicos acentuadas mais frontalmente em um homem portador de HSB (setas).

Outros 4 indivíduos também apresentaram a mesma alteração 1805C→T na região 3'UTR, são eles: um indivíduo portador de porencefalia e a sua mãe, a mãe de uma paciente portadora de uma provável displasia cortical focal e uma irmã normal de uma paciente com LIS grau 4a (lis-04) (figura 10). Além disso outros 9 indivíduos pertencentes a um grupo de controles normais também apresentaram tal alteração.

4.3-IDIOMORFISMO NO GENE *DCX*

O paciente lis-01 é uma menina de 4 anos sem nenhuma intercorrência durante a gestação, no entanto é interessante notar que esta paciente possui um irmão com hidranencefalia em cuja gestão houve sangramento no 1º mês de gestação. A paciente possui retardo mental. Apresenta crises mioclônicas e o exame neurológico revelou a presença de retardo do desenvolvimento neuropsicomotor. A RM evidenciou presença de LIS incompleta tipo 1 (tabela 13). A análise por SSCP no gene *DCX* mostrou uma alteração no padrão de migração relativa ao exon 5 deste gene. O sequenciamento revelou uma alteração IVSV + 19G→A. A presença da mesma alteração em seu pai assintomático sugere que esta alteração é provavelmente uma variação neutra. O SSCP para o gene *LIS1* não mostrou nenhum padrão de alteração tanto para a menina portadora de lissencefalia como para o seu pai. O menino portador de hidranencefalia não mostrou alteração no SSCP para os genes *LIS1* e *DCX*. Nenhum dos nossos 50 controles apresentou a variante encontrada na paciente.

4.3.1-HSB e ausência de mutações em *DCX*

Do grupo de pacientes com o espectro da LIS/HSB, 6 tem padrões de neuroimagem que levam a uma maior suspeita de possuírem mutação no gene *DCX*, isto é: presença de banda heterotópica e contínua de neurônios localizada entre as substâncias branca e cinzenta. Os pacientes lis-09, lis-12, lis-13 e lis-14 já foram descritos acima (seção 4.2.4, página 62).

A paciente (lis-02) é uma mulher de 29 anos sem nenhum evento pré-natal significativo e cuja mãe já teve um aborto. A paciente não apresenta retardo mental. As crises são do tipo parcial, com frequência de dois episódios por mês, mesmo em uso de medicação. A RM (figura 25) evidenciou HSB posterior, difusa e descontínua com predomínio à direita (grau 6a1) (tabela 13). A pesquisa de mutações nos genes *DCX* e *LIS1* foi negativa.

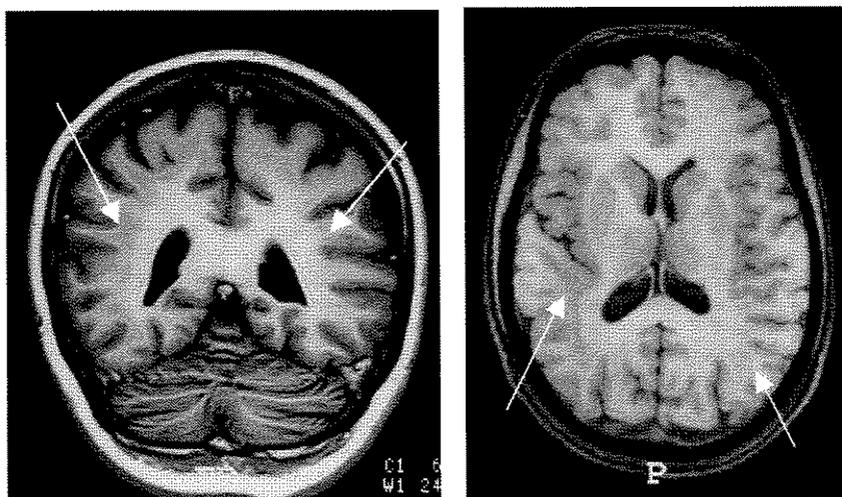


Figura 25-Cortes coronal e axial de RM mostrando a presença de bandas heterotópicas finas, difusas e descontínuas, com predomínio posterior (setas).

A outra paciente (lis-07) é uma mulher de 25 anos que refere como história familiar um único tio com epilepsia e nenhum evento pré-natal relevante. A paciente não possui retardo mental. As crises são parciais de frequência diária e difícil controle. O exame neurológico mostrou hemiparesia leve e síndrome piramidal à esquerda. A RM (figura 26) evidenciou HSB com predomínio anterior, difusa contínua e espessa (grau 6b1) (tabela 13). A pesquisa de mutações nos genes *DCX* e *LIS1* foi negativa.

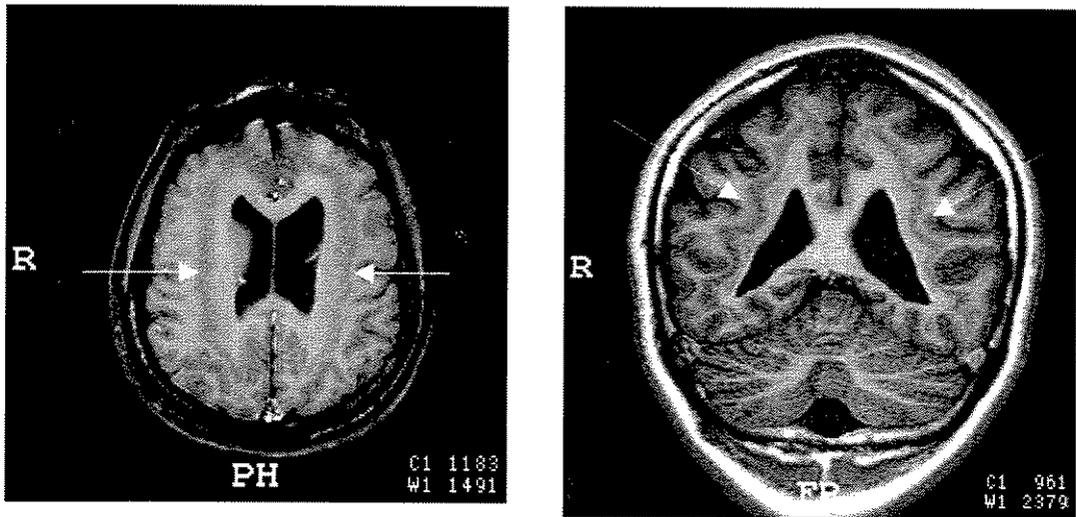


Figura 26-Cortes axial e coronal evidenciando a presença de bandas heterotópicas, espessas e difusas típicas do grau LIS 6b1 (setas).

4.4-GENE *EMX2* E ESQUIZENCEFALIAS

A tabela abaixo resume os achados de neuroimagem e moleculares para o grupo das esquizencefalias:

Tabela 14-Neuroimagem e achados moleculares do grupo das esquizencefalias

paciente	achados de neuroimagem	localização	alteração no SSCP	sequenciamento
esq-01	polimicrogiria difusa + ELAU à E	fronto-temporo-parietal	na	-
esq-02	ELA inconclusiva se U ou B	-	na	-
esq-03	ELAB	parieto-occipital	na	-
esq-04	ELAU à esquerda	centro-parietal	na	-
esq-05	polimicrogiria difusa + ELAU à E	posterior na transição parieto-occipital	na	-
esq-06	ELAB + possivelmente displasia septo óptica	frontal	primer 5+6	796C→A*, R156R
esq-07	ELA inconclusiva de U ou B	temporo-parietal	na	-
esq-08	ELAB	todos os lobos	primer 5+6	não realizado
esq-09	ELFU à direita	lobo frontal	na	-
esq-10	EU a D inconclusivo se lábios são F	occipital	na	-
esq-11	ELAU à direita	parieto-occipital	na	-
esq-12	ELAB + pequeno cisto aracnóide (temporal esquerdo)	centro-parietal	na	-
esq-13	ELF inconclusivo de B ou U	-	na	-
esq-14	E à D, inconclusivo de LA ou LF	occipital	na	-
esq-15	ELAU à esquerda + depressão no lado D com polimicrogiria	frontal	na	-
esq-16	ELAB (assimétrica) pior a esquerda	centro-parietal em continuação com fendas silvianas	na	-
esq-17	ELFU à direita + heterotopia subcortical direita	temporo-parietal	na	-
esq-18	polimicrogiria frontal + ELAU à E	frontal	na	-
esq-19	EU à D, inconclusivo de F ou A	temporo-parietal	primer 5+6	796C→A*, R156R
esq-20	ELAU a E + agenesia do septo pelúcido + calcificações periventriculares grosseiras bilateralmente	parieto-temporal	na	-
esq-21	ELAU a D + calcificação periventricular bilateral	parietal	primer 5+6	796C→A*,R156R
esq-22	ELAB + lissencefalia frontal?	temporo-parietal a E e parietal a D	na	-
esq-23	ELAB	temporo-fronto-parietal a E e fronto parietal a D	na	-
esq-24	ELAU a D e ELFU a E	fronto-parietal a D e frontoparietal a E	na	-
esq-25	ELAB	parietal a D e frontal a E	na	-
esq-26	ELAB + dilatação ventriculos laterais e terceiro ventriculo + agenesia septo-pelucido	fronto-parietal a E e a D	na	-
esq-27	ELAU a D e ELFU a E	fronto-parietal a D e parietal a E	na	-
esq-28	inconclusivo	-	na	-
esq-29	ELAB	fronto-parietal a E e parietal a D	na	-
esq-30	ELAB + agenesia do corpo caloso ? + polimicrogiria ? + paquigiria ?	temporal-parietal e frontal	na	-
esq-31	ELAU a E eELFU à D+ polimicrogiria extensa + paquigiria	frontal	primer 5+6	796C→A*, R156R
esq-32	ELAU a E + agenesia do septo pelúcido	temporal-parietal	na	-
esq-33	ELFU a E	parietal	na	-
esq-34	ELAU à E e ELFU à D	parietal	na	-

ELAU = Esquizencefalia de lábios abertos unilateral, ELFU = Esquizencefalia de lábios fechados

unilateral, ELAB = Esquizencefalia de lábios abertos bilateral, na = não alterado, R: Arginina

*** posição da alteração relativa ao cDNA do gene EMX2 (NCBI, NM 004098)**

O indivíduo esq-06 é uma menina de 4 anos com um fortíssimo histórico familiar de epilepsia de etiologia desconhecida, com indivíduos afetados praticamente em todas as gerações (figura 27). A paciente possui retardo mental, e crises epilépticas controladas na presença de medicação. O exame neurológico apontou para a presença de retardo do desenvolvimento neuropsicomotor. A RM evidenciou a presença de esquizecefalia de lábios abertos bilateral, ausência de septo pelúcido e corpo caloso, além de atrofia do nervo óptico (tabela 14). Infelizmente nós não pudemos coletar o sangue de todos os indivíduos desta família. O SSCP mostrou alteração no fragmento 5+6 e o sequenciamento automático evidenciou a alteração 796C→A (R156R) localizada na primeira posição do terceiro codon do domínio *homeobox*.

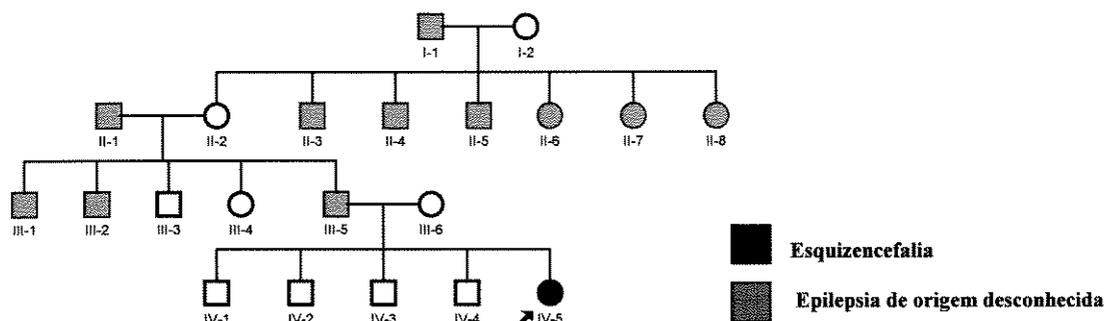


Figura 27-Heredograma mostrando a família do paciente esq-06. Notar o forte histórico familiar de epilepsia de etiologia desconhecida.

O paciente esq-08 é um menino de 6 anos de idade cujo histórico familiar de epilepsia e retardo mental não pode ser levantado pois foi adotado. O menino apresenta retardo mental e tem o diagnóstico de Síndrome de West. O exame neurológico mostra síndrome piramidal mais grave à esquerda e retardo do desenvolvimento neuropsicomotor. O exame de RM (figura 28) mostrou a presença de esquizecefalia bilateral de lábios abertos em conjunto com polimicrogiria, sendo que a fenda direita é muito mais pronunciada (tabela 14). O SSCP demonstrou a presença de migração alterada no fragmento 5+6. O sequenciamento ainda não foi realizado pois a amostra de DNA deste indivíduo não foi suficiente para completar este experimento.

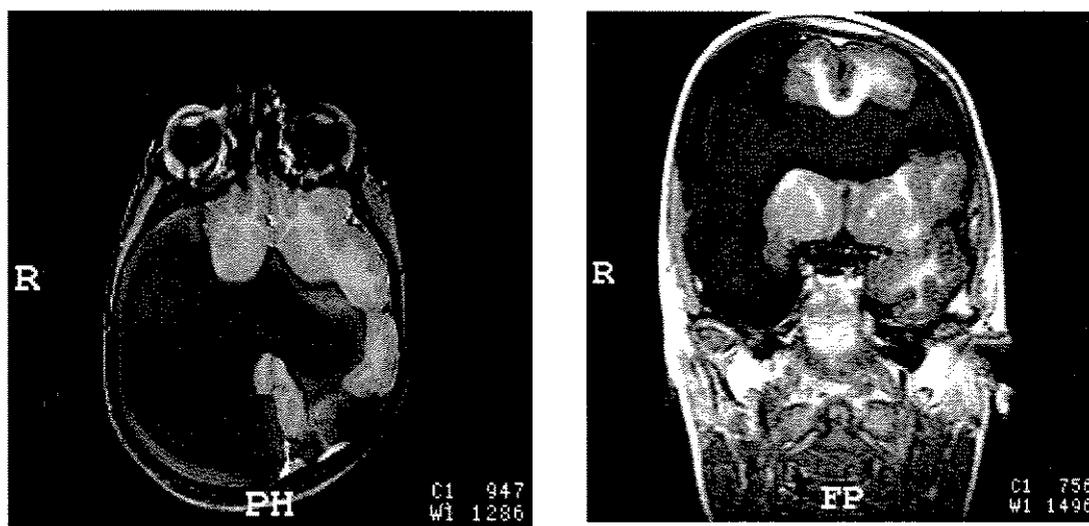


Figura 28- Cortes axial e coronal de RM evidenciando esquizecefalia de lábios abertos em um paciente com o padrão de migração alterado detectado por SSCP no gene EMX2. Notar que o lado direito é mais acometido.

O paciente esq-19 é um menino de 12 anos de idade com histórico familiar negativo para retardo mental e epilepsia. O paciente possui retardo mental. As crises apresentadas por este paciente são de ausência e estão controladas sob medicação. O exame neurológico revela síndrome piramidal à esquerda. O exame de RM evidenciou a presença de esquizencefalia unilateral com polimicrogiria no lobo temporal direito sendo necessário uma revisão da neuroimagem para classificar a fenda em aberta ou fechada (tabela 14). O sequenciamento destes indivíduos evidenciou a alteração 796C→A (R156R) localizada na primeira posição do terceiro codon do domínio *homeobox*.

O paciente esq-21 é um menino de 3 anos sem história familiar de epilepsia e retardo mental e ausência de intercorrências pré-natais. O paciente apresenta retardo mental. Este indivíduo não apresenta crises, no entanto seu exame neurológico revela hipotonia e paresia direita. A tomografia computadorizada (figura 29) evidenciou esquizencefalia unilateral de lábios abertos à direita (tabela 14). Este paciente possui migração alterada do fragmento 5+6 cujo sequenciamento também mostrou a alteração 796C→A (R156R) localizada na primeira posição do terceiro codon do domínio *homeobox*.

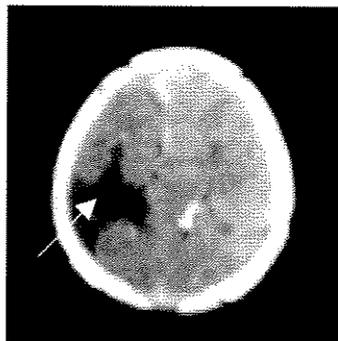


Figura 29-TC mostrando esquizencefalia unilateral de lábios abertos à direita.

O indivíduo possui alteração no SSCP e a substituição 796C→A no domínio *homeobox* (seta).

O indivíduo esq-31 é uma menina de 3 anos, também com histórico negativo de epilepsia e retardo mental na família, no entanto não houve realização do exame pré-natal ficando prejudicada a detecção de qualquer intercorrência neste período. O paciente apresenta retardo mental. Não há a presença de crises e informações sobre seu exame neurológico. A TC (figura 30) evidenciou esquizecefalia de lábios abertos à esquerda e lábios fechados à direita (tabela 14). A análise molecular deste indivíduo também mostrou uma alteração no padrão de migração do fragmento 5+6 ocasionada pela substituição 796C→A (R156R).

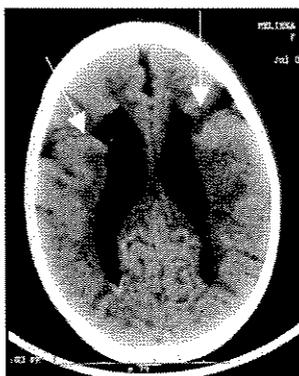


Figura 30- TC evidenciando esquizecefalia de lábios abertos à esquerda e lábios fechados à direita (setas). Este indivíduo demonstrou no SSCP o mesmo padrão de alteração que o paciente anterior e no sequenciamento a mesma substituição 796C→A no domínio *homeobox*.



5- DISCUSSÃO

5.1 GENE *FLNI*

Nossa análise se estendeu somente aos 6 primeiros exons codificantes do gene *FLNI*, pois é esta região que codifica um importante domínio funcional envolvido na ligação com a actina (FOX et al. 1998, POUSSAINT et al. 2000) e onde se encontra a grande maioria (aproximadamente 55%) das mutações em pacientes com HNP (FOX et al., 1998, SHEEN et al., 2001, MORO et al., 2002). Além disso, o gene *FLNI* é rico em seqüências CGs fato que dificulta a síntese de *primers* e a amplificação dos produtos de PCR, tornando a padronização da técnica de PCR uma etapa muito laboriosa e dispendiosa em tempo.

Se as alterações identificadas pelo SSCP nos pacientes hnp-06 e hnp-08, indivíduos com padrão atípico de HNP, fossem confirmadas como mutações nossos dados iriam diferir dos encontrados previamente na literatura. SHEEN et al. (2001) realizando pesquisa de mutações para todos os 48 exons do gene *FLNI* em 7 pacientes com padrão atípicos mostrou que nenhum deles possuía mutação no gene *FLNI*. Os achados atípicos incluíam: hidrocéfalo, heterotopia unilateral, nódulos altamente assimétricos ou localizados focalmente, nódulos que se estendem da superfície do córtex até os ventrículos ou desordens do córtex adjacente.

Desta forma, se nossos resultados fossem positivos, concluiríamos que deveria haver uma menor estringência no que se refere ao padrão clássico de neuroimagem para que o indivíduo seja testado para mutações no gene *FLNI*.

O sequenciamento automático revelou uma variante neutra IVSV + 519C→G localizada a 28pb do início do exon 6. Devido a sua localização é pouco provável que esta variante leve a uma alteração deletéria na proteína. Desta forma nossos dados, até o momento, corroboram os estudos anteriores (SHEEN et al. 2001); no entanto não podemos descartar a presença de mutações em outros exons do gene *FLNI* ou mesmo a presença de mosaïcismo somático afetando principalmente o tecido nervoso.

A paciente hnp-05 caso isolado com o padrão clássico de HNP (tabela 12) também possui a mesma alteração IVSV + 519C→G. Neste caso, podemos supor que a mutação deletéria provavelmente reside fora da região codificante do domínio de actina do gene *FLNI* ou em outro gene. Isto porque ao testar 31 pacientes esporádicos do sexo

feminino com padrões típicos de HNPB, SHEEN et al. (2001) encontrou apenas 7 indivíduos com mutação (19% do total). Sendo assim não seria surpreendente se, mesmo após uma varredura total do gene *FLNI*, esta paciente continuasse a mostrar resultados negativos para o mesmo.

Um fato muito importante nos casos de HNP familiar analisados (hnp-03 e 07) é o padrão sugestivo de herança ligada ao X dominante nesta família, com a mãe transmitindo o caráter para sua filha. A paciente hnp-03 também sofreu 5 abortos espontâneos, apesar de não podermos provar, certamente a maioria destes abortos deve ser do sexo masculino, característica muito comum em casos de HNP familiar já que os homens são hemizigotos para o cromossomo X (FOX et al., 1998; POUSSAINT et al., 2000).

Além do mais, estudos anteriores demonstram que a taxa de detecção de mutações em casos familiares de HNP é de aproximadamente 83% (SHEEN et al., 2001) e que famílias possuindo um grande número de abortos do sexo masculino possuem mutações sem sentido localizando-se próximas ao domínio N-terminal da proteína (região de ligação com actina) ou de sítio de *splicing* que podem produzir um RNAm instável, truncando qualquer produto protéico que seja eventualmente traduzido (SHEEN et al., 2001).

Desta forma, como o exon 6 codifica parte de um domínio localizado na região N-terminal da proteína e a família analisada neste trabalho possui vários abortos, acreditamos que a alteração no padrão de migração detectada por SSCP se devia realmente a uma mutação sem sentido ou de sítio de *splicing*. O sequenciamento dos fragmentos revelou uma substituição na posição 1159G→C, isto é na terceira base do último códon do exon 6. Surpreendentemente esta alteração pode levar a troca de um glutamato por um aspartato. Ambos são aminoácidos relacionados em suas propriedades pois além de serem polares também possuem cargas negativas. É interessante notar que esta é a quarta mutação de sentido trocado identificada até o momento para pacientes com HNP e a segunda quando levamos em conta apenas os casos familiares. Mutações de sentido trocado no gene *FLNI* têm sido descritas em homens e mulheres acometidos por síndromes clinicamente distintas da HNP e que afetam múltiplos órgãos como: as síndromes otopalatodigital tipo 1 e 2,

displasia frontometafiseal e síndrome de Melnick-Needles (ROBERTSON et al., 2003). Ainda não se sabe ao certo qual a razão de diferenças tão grandes entre doenças causadas por mutações no mesmo gene mas, diferente do que ocorre com as mutações em pacientes com HNP, acredita-se que as mutações responsáveis por estas síndromes não resultam em instabilidade do RNAm ou truncagem da proteína e sim em manutenção do sentido de leitura, resultando em um mecanismo de ‘ganho de função’ da proteína. Uma proteína com função modificada poderia ser mais danosa do que a ausência total da mesma, prejudicando drasticamente o fenômeno da organogênese.

Poderíamos propor que devido à similaridade em função dos aminoácidos trocados os indivíduos desta família teriam desenvolvido HNP e não as síndromes mais graves citadas acima. No entanto, ROBERTSON et al. (2003) demonstraram que as mutações de sentido trocado levando as síndromes otopalatodigital 1 e 2 estão concentradas nos exons 3 e 5 e que na síndrome de Melnick-Needles estão localizadas principalmente no exon 22. Estes exons codificam regiões como o domínio homólogo a calponina 2 (CHD2) e o domínio em bastão (*rod domain*). Mutações de sentido trocado nesses exons nunca foram descritas em pacientes com HNP. Desta forma podemos sugerir que estes exons codificariam regiões de extrema importância para o funcionamento correto da proteína e que o mecanismo de ganho de função nestas regiões levariam a fenótipos mais severos do que os produzidos por mutações de sentido trocado já descritas em outros exons para pacientes com HNP (SHEEN et al., 2001; MORO et al., 2002). No entanto, se analisarmos com cuidado a mutação descrita neste trabalho, podemos inferir um segundo mecanismo patogênico, muito mais provável que o descrito acima. A substituição 1159G→C altera um nucleotídeo adjacente ao sítio doador de *splicing* GT. Apesar de serem cruciais, os dinucleotídeos GT e AG não são suficientes para realizar o fenômeno de *splicing* sozinhos, necessitando das seqüências adjacentes que também possuem um alto grau de conservação entre genes e espécies. Desta forma a perda do sítio doador de *splicing* do exon 6 poderia fazer com que sítios de *splicing* cripticos fossem ativados levando a um processamento errôneo do RNAm e a produção de uma proteína *FLNI* truncada ou sem nenhuma função residual (perda de função).

Essa hipótese estaria muito mais de acordo com o descrito na literatura para mutações em casos familiares de HNP (FOX et al., 1998; SHEEN et al., 2001). Estudos funcionais deverão ser realizados no futuro para resolver esta questão.

Quanto aos outros indivíduos que não apresentaram mutação podemos destacar a presença de um paciente masculino com HNP (hnp-04). O paciente hnp-04 é um caso isolado, sem histórico familiar de epilepsia, aborto ou retardo mental. O exame de neuroimagem evidencia heterotopia nodular periventricular em corno temporal direito (tabela 12). Já foram descritos dois casos de homens com HNP e mutações no gene *FLN1* (SHEEN et al., 2001), o primeiro deles possui neuroimagem praticamente idêntica às mulheres até o momento identificadas, já o segundo mostrou um padrão muito menos severo com a presença de pouquíssimos nódulos heterotópicos localizados somente no hemisfério direito. Nenhum dos dois homens relatados na literatura apresentou mutações no domínio de ligação com actina. O primeiro é portador de uma substituição C→G na posição 6915 do cDNA que leva a uma mutação sem sentido e trunca a proteína na região de ligação a receptores. O segundo paciente possui uma substituição C→T que leva a troca de uma leucina (Leu) por uma fenilalanina (Phe) no quinto domínio homólogo a Ig da proteína FLN1 (SHEEN et al., 2001). Deste modo, apesar de nosso paciente possuir um padrão de imagem diferente dos descritos até o momento, se ele for portador de mutação esta deve residir fora dos 6 primeiros exons codificantes. Mutações nesta região provavelmente iriam alterar aminoácidos extremamente vitais para o funcionamento da proteína ou levar a produção de um produto protéico truncado precocemente, com resíduo funcional praticamente nulo. Estas alterações não seriam compatíveis com a vida em homens ou levariam a síndromes mais graves que a HNP. No entanto é pouco provável que este indivíduo possua mutações em *FLN1*, já que além de um padrão de imagem atípico, estudos prévios demonstraram que a presença de mutações nesse gene é rara em homens com HNP. SHEEN et al. (2001) estudando uma amostra de 24 homens com HNP encontrou mutações em apenas 9% dos indivíduos. A presença de mosaïcismo também pode ser questionada, mas esta parece não ser o caso para HNP (SHEEN et al., 2001) apesar de serem necessários estudos mais aprofundados para refutar definitivamente a hipótese.

5.2 GENE *LIS1*

Várias evidências indicavam que as alterações identificadas por SSCP no exon 11 poderiam ser atribuídas a um polimorfismo neutro. A primeira é a já citada alta frequência de polimorfismos na região 3'-UTR (*untranslated region*) do gene *LIS1* (tabela 1) e levando em conta que nossos *primers* para o exon 11 abrangem parte desta região não seria surpresa se as bandas anômalas detectadas pelo SSCP fossem resultantes de alterações que não levam a alterações do produto protéico. A segunda evidência está na própria aparência das bandas, todas elas tem um padrão muito semelhante de corrida eletroforética. Em geral alterações diferentes na seqüência da fita de DNA levam a padrões distintos de migração das bandas durante a eletroforese. Vale lembrar que o contrário não é verdadeiro ou seja, a identificação de um mesmo padrão eletroforético no SSCP pode ser formado por seqüências de DNA diferentes, principalmente se trocas de bases ocorrerem na mesma posição (SHEFFIELD et al., 1992).

No entanto, seria pouco provável que 7 pacientes e 9 controles normais com padrão de migração idêntico, em duplicata, possuíssem mutações distintas na mesma posição do fragmento de PCR. A confirmação de nossa hipótese, foi o resultado do sequenciamento automático demonstrando a mesma alteração 1805C→T na região 3'UTR de todos os pacientes e controles normais. Este polimorfismo já havia sido identificado por KOCK et al. (1996) na posição 1250 do cDNA de *LIS1* (No. de acesso no Genebank L13385) em 40% dos indivíduos testados. Nossa frequência de controles com a mesma alteração foi de aproximadamente 28%. A diferença na frequência é certamente devido ao número relativamente baixo de controles testados pelo nosso grupo para a presença de alterações no exon 11 deste gene. Outro fator que nos fez acreditar que esta alteração não era patogênica foi o baixo número de pacientes portadores da mesma com o padrão postero-anterior de malformação típico de pacientes com mutações em *LIS1*. Entre os 7 indivíduos detectados apenas o indivíduo lis-10, portador de LIS grau 3a, possui achados de RM que seriam realmente compatíveis com mutações nesse gene.

As mutações intragênicas estão espalhadas através dos 10 exons codificantes do gene *LIS1*, no entanto das 41 mutações descritas até o momento, 17 estão concentradas nos exons 8, 9 e 10 (CARDOSO et al., 2002). Um de nossos pacientes (lis-08) com padrão da

malformação claramente antero-posterior seguindo portanto as características encontradas em indivíduos com mutações no gene *LIS1*; mostrou uma alteração no padrão de mobilidade por SSCP no exon 8, justamente um ‘ponto quente’ para mutações intragênicas no gene *LIS1*. O sequenciamento automático revelou uma mutação de sentido trocado 1385A→C que altera uma histidina para uma prolina no aminoácido 277 (H277P) do 5º domínio WD-40 da proteína, sendo esta a sexta mutação de sentido trocado descrita até o momento.

Os domínios WD são encontrados em muitas proteínas de várias espécies e são compostos por pelo menos 4 repetições começando com glicina/histidina na região N-terminal e terminando com triptofano/aspartato (WD) na região C-terminal. Cada repetição é composta de 4 fitas (a, b, c, d) que variam entre 31 e 60 aminoácidos, ficando a fita a e d próximas ao poro central e superfície externa da proteína (SMITH et al., 1999). O gene *LIS1* possui sete repetições WD que conferem à proteína uma correta capacidade de dobra e estrutura tridimensional estável (REINER et al., 1993; SAPIR et al., 1999). O mecanismo preciso pelo qual a proteína LIS1 influencia a migração dos neuroblastos ainda não foi elucidado, no entanto dados recentes apontam para uma interação desta com os centrossomos e microtúbulos através de complexos formados por várias proteínas entre elas dineína, dinactina e proteínas de distribuição nuclear NUDE e NUDEL que podem influenciar a proliferação, migração e organização de neuroblastos (FENG et al., 2000; SASAKI et al., 2000; FAULKNER et al., 2000; LIU et al., 2000; SMITH et al., 2000, NIETHAMMER et al., 2000).

As mutações de sentido trocado no gene *LIS1* estão localizadas nos exons 3, 6 e 9, responsáveis pela codificação do domínio *coiled-coil*, e pelos segundo e quinto domínios WD-40 respectivamente. Entre as cinco mutações de sentido trocado descritas, quatro modificam aminoácidos altamente conservados entre diferente espécies e em proteínas pertencentes ao mesmo grupo dentro da mesma espécie (CARDOSO et al., 2002), sugerindo que estas substituições podem prejudicar o funcionamento e integridade da proteína LIS1.

As características de neuroimagem de pacientes com mutações de sentido trocado no gene *LIS1* são geralmente mais variáveis e leves do que as de pacientes com outros tipos de mutação (LEVENTER et al., 2001). O paciente mais severamente afetado

com este tipo de mutação possui LIS grau 3a , caracterizada por agiria posterior e paquigiria nas regiões anteriores, um padrão encontrado na maioria dos pacientes com mutações sem sentido e de matriz de leitura no gene *LIS1*. Este indivíduo possui uma mutação H149A (histidina substituída por arginina) que altera um aminoácido altamente conservado no segundo domínio WD. Como consequência é provável que ocorram mudanças na conformação da proteína LIS1 mutante que prejudicariam a sua interação com proteínas como NUDE e NUDEL (FENG et al., 2000; SASAKI et al., 2000) e as outras duas subunidades da PFAH (SWEENEY et al., 2000). Os demais pacientes com mutações de sentido trocado em *LIS1* possuem padrões de malformação entre LIS 4 e 6 (LEVENTER et al., 2001).

LEVENTER et al. (2001) propôs que pacientes com mutações de sentido trocado em resíduos pouco conservados teriam características fenotípicas mais leves, já que um dos pacientes analisados por este grupo é portador de uma mutação que troca uma glicina hidrofóbica por uma serina que é um aminoácido hidrofílico. Esta alteração é uma variante normal dentro da seqüência de aminoácidos de outros membros da família das proteínas WD-40 (SMITH et al., 1999).

Esse paciente possui o mais leve fenótipo até hoje descrito para pacientes com LIS devido a mutações no gene *LIS1*, já que sua malformação foi classificada como de grau 4a2, caracterizada por paquigiria restrita nos lobos occipitais e parietais transicionando para um córtex normal anteriormente.

A mutação de sentido trocado identificada pelo nosso grupo (H277P) modifica também um resíduo pouco conservado. Encontramos que na família das proteínas WD a histidina na posição alterada está presente em apenas 26 de 776 repetições WD presentes na base de dados on-line "*The WD repeat family of proteins*". O aminoácido prolina é encontrado em apenas 13 seqüências WD presentes na mesma base de dados.

Considerando as informações anteriores sobre as mutações de sentido trocado poderíamos esperar um grau leve de LIS em nosso paciente, já que a mutação encontrada altera um aminoácido não conservado dentro das seqüências WD. No entanto, nosso paciente possui o padrão de malformação LIS grau 3a. Uma possível explicação para essa aparente contradição seria que, apesar desta histidina não ser um resíduo conservado dentro

da família de seqüências WD ele é muito conservado entre diferentes espécies. Portanto, a alteração para outro aminoácido na mesma posição poderia levar a mudanças dramáticas de conformação da proteína LIS1 resultando em alterações nas propriedades de ligação desta com a β -espectrina, uma proteína do citoesqueleto (WANG et al., 1996).

Outra característica que difere a nova mutação que descrevemos neste trabalho das descritas anteriormente por LEVENTER et al. (2001) está na natureza e localização dos resíduos trocados. Este grupo sugeriu que mutações de sentido trocado em regiões do gene *LIS1* codificando domínios WD localizados próximos a região 3' terminal da proteína levariam a fenótipos menos severos, conseqüência de uma proteína LIS1 mutante com função residual.

LEVENTER et al. (2001) baseou sua hipótese em um de seus pacientes estudados. O indivíduo em questão que apresenta paquigiria generalizada (grau 4a) e possui uma mutação que substituiu um aspartato localizado no 5° domínio WD por uma histidina (A317H). A mutação descrita por nosso grupo também se localiza neste domínio.

Aspartato e histidina são aminoácidos relativamente relacionados, ambos são polares, enquanto histidina e prolina têm maiores diferenças em suas propriedades. A histidina é um aminoácido básico enquanto a prolina é apolar, somado-se a isto a prolina é o único aminoácido que não segue a regra geral da estrutura dos aminoácidos, já que sua cadeia se liga tanto ao átomo de nitrogênio do grupo NH_2 assim como ao carbono central. Estas diferenças nas propriedades químicas e estruturais em uma região conservada poderiam levar a uma proteína com pouca função residual, fato que resultaria em um padrão de malformação mais severo. Desta forma sugerimos que a severidade da malformação está mais relacionada a natureza dos resíduos trocados do que a posição da mutação em relação aos domínios WD.

Para elucidar e confirmar as conseqüências funcionais da mutação encontrada em nosso paciente serão necessários estudos *in vivo* e *in vitro* designados para testar a integridade funcional da proteína mutante. Estes estudos serão muito importantes para se investigar o potencial que esta proteína possui em tomar sua conformação final corretamente, interagir com outras proteínas envolvidas no desenvolvimento cortical e nas vias bioquímicas de hidrólise de PAF.

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

No entanto, podemos justificar nossa escolha pela pesquisa inicial de mutações intragênicas em *LIS1* pois a maioria de nossos pacientes possui um grau de LIS não tão severo e com um gradiente postero-anterior (P>A). Estas características são fortemente indicativas de mutações intragênicas no gene *LIS1* já que pacientes com deleções no cromossomo 17 geralmente possuem graus de lissencefalia entre 1 e 2.(CARDOSO et al., 2000).

Outro fator que pode também ter influenciado é a sensibilidade do próprio SSCP que apesar de ter alta eficiência não assegura que todas as alterações de seqüência de nucleotídeos sejam detectadas. Estima-se que a técnica, quando bem utilizada seja capaz de identificar entre 80 e 95 % das mutações (SHEFFIELD et al., 1992).

Existe ainda a possibilidade da presença de heterogeneidade não alélica, ou seja de que outros genes estejam envolvidos na gênese de LIS em nossos pacientes. Bons candidatos seriam alguns genes identificados em camundongos, e ainda não testados em humanos, que estão relacionados com malformações corticais similares ao fenótipo *reeler*, um modelo animal de lissencefalia. Apesar do gene *RELN* humano ter sido clonado e não estar relacionado com lissencefalia clássica, genes que participam das mesmas vias bioquímicas como *DABI*, *VLDRL* e *APOE2* (OLSON et al., 2002) e que já tem comprovada suas ligação com fenótipos semelhantes ao *reeler* em camundongos *knock-out* são bons candidatos e devem ser testados para que se confirme ou se exclua sua participação na etiologia da LIS clássica em pacientes sem mutação nos genes *DCX* e *LIS1*.

5.3 GENE *DCX*

A família na qual o SSCP resultou em um padrão alterado para o exon 5 do gene *DCX* é composta por dois indivíduos com desordens no sistema nervoso central. A análise por SSCP identificou uma alteração no padrão de migração quando utilizado o par de *primer* 5b que amplifica parte do quinto exon (sendo o segundo exon codificante), no entanto a alteração foi identificada tanto na filha como no pai assintomático, fato que nos levou a crer na presença de um polimorfismo neutro.

O sequenciamento dos indivíduos revelou uma substituição IVSV + 19G→A, confirmando a hipótese de uma alteração que não resulta na produção de uma proteína defeituosa. Esta alteração trata-se provavelmente de uma alteração neutra rara ou idiomorfismo já que não foi detectada em 50 controles não relacionados.

Mutações na região codificante do gene *DCX* são responsáveis por 100% dos casos familiares de LIS/HSB ligadas ao X (MATSUMOTO et al., 2001) e de 38 a 91% dos casos esporádicos de HSB em mulheres (GLEESON et al., 2000). Geralmente todas as mulheres com mutações no gene *DCX* tem HSB e paquigiria predominantemente em regiões anteriores, no entanto cerca de 25% das mulheres com um padrão de banda anterior e todas aquelas com bandas localizadas em regiões posteriores ou bandas unilaterais não apresentam mutações em *DCX*, sugerindo que outros *loci* ou mosaicismos somáticos podem ser responsáveis por estes diferentes fenótipos (GLEENSON et al., 2000a; GLEESON et al., 2000b). Mutações de linhagem germinativa materna ou mosaicismos podem ocorrer em 10% dos casos HSB e lissencefalia ligada ao X (GLEESON et al., 2000b). Apesar de raro, também já foram identificados homens com HSB e mutações em *DCX* e *LISI* (PILZ et al., 1999).

Nós podemos atribuir a ausência de mutações no gene *DCX* em nossos pacientes com o espectro LIS/SBH aos seguintes fatores: 1-) A maioria de nossos pacientes portadores do espectro são esporádicos e nenhum deles mostra um padrão familiar claro de ligação ao cromossomo X, 2-) foram testados apenas 6 pacientes com HSB, uma amostra muito pequena quando comparada aos números descritos na literatura, 3-) nossa stringência quanto às características de neuroimagem foi baixa, incluindo indivíduos com

características atípicas e finalmente, 4-) pode haver a presença de mosaicismo somático nos indivíduos de nossa amostra que não foi detectado pelo SSCP.

Alguns de nossos casos de HSB merecem uma discussão mais aprofundada. Em nosso grupo de pacientes há um homem (lis-14) com grau de LIS 6b3 (figura 24) que apresenta um padrão de malformação tipicamente encontrado em mulheres com mutações em *DCX* (PILZ et al., 1999; GLEESON et al., 2000). D'AGOSTINO et al. (2002), estudando um grupo de 30 homens com HSB, incluindo este paciente, descobriram que de 12 indivíduos com um padrão de malformação tipicamente encontrado em mulheres com mutação no gene *DCX* (A=P ou A>P) 7 eram portadores de mutações na região codificante desse gene. Quando todos os pacientes estudados eram computados (inclusive os com padrões atípicos), somente 29% dos indivíduos possuíam mutações no gene *DCX*, mostrando que a ocorrência deste tipo de evento é rara em homens. O gene *LIS1* poderia ser um candidato natural, já que existem descritos homens com HSB e mutações neste gene (PILZ et al., 1999), no entanto o predomínio anterior da malformação deste paciente assim como nossos dados moleculares negativos refutam esta hipótese.

Dentre os pacientes atípicos identificamos uma mulher (lis-2) com LIS grau 6a1 (tabela 13) caracterizada por bandas completas ou quase completas com predomínio posterior (figura 25).

Apesar de mulheres com mutações em *DCX* poderem apresentar HSB difusa (MATSUMOTO et al., 2001) elas normalmente apresentam bandas sem um gradiente aparente ou com predominância anterior. O gene *LIS1* poderia ser candidato devido ao predomínio posterior. No entanto os resultados moleculares negativos confirmam que a HSB de predomínio posterior raramente tem base genética nestes genes.

Outra paciente (lis-12) com HSB atípico possui achados de RM muito interessantes (figura 23). O padrão paquigira-HSB tem sido identificado apenas em homens (D'AGOSTINI et al., 2002). No entanto esta paciente possui LIS grau 5a (tabela 13) caracterizado frontalmente por HSB e posteriormente por paquigiria, sendo a primeira mulher a ser descrita com este grau de malformação. Este padrão é muito pouco usual e foi considerado por DOBYNS et al. (1999) como uma síndrome distinta da LIS clássica ligada

aos genes *LIS1* e *DCX* com possivelmente outros genes envolvidos. Resultados moleculares negativos para ambos esses genes, obtidos por nosso grupo suportam esta hipótese.

As demais pacientes são mulheres (lis-07 e lis-09) que possuem LIS grau 6b1 e 6b3 (tabela 13) respectivamente (figuras 22, 26), portanto ambas tem um predomínio anterior característico de mulheres com mutações em *DCX*. No entanto o resultado para mutações em *DCX* foi negativo assim como para *LIS1*. GLEESON et al. (2000) encontraram no seu grupo de pacientes 25% de casos negativos para mutações no gene *DCX* cujo padrão de neuroimagem é idêntico ao dos casos positivos, mostrando que pode existir heterogeneidade genética em indivíduos com o padrão 'clássico' de HSB.

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

5.4 GENE *EMX2*

O achado de mutações no gene *EMX2* em dois irmãos e a ausência do mesmo defeito nos seu pais neurologicamente normais fornece evidências de que, pelo menos em alguns casos, as esquizencefalias são determinadas por mutações deletérias em genes *homeobox* (GRANATA et al., 1997). No entanto, a hipótese genética não substitui a possibilidade de mecanismos patogênicos alternativos como lesões encefaloclásticas adquiridas resultantes de infartos locais no território das principais artérias cerebrais (SARNAT et al., 1992). Entre os pacientes com alteração de padrão de migração detectado pelo *SSCP* identificamos um indivíduo com forte histórico familiar para epilepsia de origem desconhecida que nos fez acreditar em uma possível origem genética, pelo menos para este indivíduo.

Dados preliminares apontam para uma relação entre a natureza do defeito molecular, a severidade do fenótipo e a presença de certas características clínicas (GRANATA et al., 1997; FAIELLA et al., 1997). Defeitos moleculares severos como mutações de mudança de matriz ou de sítio de *splicing* estão associados com esquizencefalia severa, geralmente bilateral e de lábios abertos, enquanto mutações

sinonímias e de sentido trocado estão relacionadas com esquizecefalia unilaterais, por vezes de lábios fechados.

Entre nossos pacientes com alteração no padrão de migração, dois possuem esquizecefalia bilateral de lábios abertos, um com esquizecefalia bilateral sendo uma aberta e outra fechada e dois esquizecefalia unilateral, sendo que um está descrito como portador de uma fenda de lábio aberto e um cujo tipo de fenda não pode ser especificado. Desta maneira, esperávamos encontrar em nossa amostra uma predominância de alterações deletérias como mutações de mudança de matriz de leitura e de sítios de *splicing*.

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

No entanto 4/5 de nossos pacientes com migração alterada no SSCP possuem a mesma substituição 796C→A no domínio *homeobox* do gene *EMX2*. Esta alteração não leva a troca de resíduos ou cria um codon de parada, mantendo o aminoácido arginina intacto. Surpreendentemente esta mesma alteração foi detectada por BRUNELLI et al. (1996) e foi considerada como uma mutação sinonímia já que não foi encontrada no grupo controle testado.

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

No entanto um achado do grupo de BRUNELLI et al. (1996) ficou sem uma explicação clara: as mães dos pacientes que portavam a substituição 796C→A também possuíam a mesma alteração mas sem qualquer malformação cortical associada. Nosso

achado da mesma substituição em 4 indivíduos de um grupo controle composto de 50 indivíduos (8% do total) esclarece esta contradição, demonstrando que a substituição 796C→A é provavelmente um polimorfismo neutro.

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

Resta ainda determinar se a alteração por SSCP do paciente esq-08 se deve a um polimorfismo neutro ou a uma mutação deletéria do tipo sem sentido ou de mudança de matriz de leitura já que ele possui um quadro severo de esquizencefalia bilateral de lábios abertos. Baseado na nossa experiência acreditamos na possibilidade de outro polimorfismo, já que este paciente possui eventos pré-natais significantes que podem ser responsáveis pela malformação cortical (dados não mostrados). Também fica em aberto a causa de epilepsia na família da paciente esq-06, já que esta não se deve a alteração polimórfica do gene *EMX2*.

Portanto, permanece ainda controversa a participação deste gene na etiologia da esquizencefalia já que a literatura especializada é muito escassa em relação a estudos genéticos feitos em indivíduos portando este tipo de malformação. DOBYNS (dados não publicados) relatou que de um grupo composto por 15 pacientes portadores de esquizencefalia e analisados geneticamente para o gene *EMX2*, nenhum mostrou-se portador de mutação no mesmo, fato que concorda com o nosso estudo. Além do mais como já citado anteriormente, várias das alterações descritas são sinonímias que não são freqüentemente citadas como deletérias.

Nós acreditamos que serão necessários estudos multicêntricos, incluindo um grande número de pacientes, para que se obtenha um consenso quanto ao verdadeiro valor da etiologia genética nas esquizencefalias. É de nossa opinião que a origem da maioria dos casos ocorre devido a um insulto ambiental, como sangramentos durante o período de gestação, ou a mutações em outros genes responsáveis pelo desenvolvimento do prosencéfalo.



6- CONCLUSÃO

Concluimos que:

a-) HNP e gene *FLNI*

• Confirmamos que pacientes com padrões atípicos de HNP não possuem mutação nos primeiros 6 exons codificantes do gene *FLNI*. Além disso confirmamos a alta incidência de mutações no gene *FLNI* em casos familiares de HNP.

b-) Espectro das LIS/HSB e genes *LIS1* e *DCX*

• Confirmamos dados prévios da literatura de que mutações de ponto no gene *LIS1* são raras em pacientes com LIS/HSB, pois encontramos apenas uma mutação de sentido trocado no gene *LIS1* num total de 15 pacientes genotipados.

• Demonstramos pela primeira vez que mutações de sentido trocado em *LIS1* e sua localização em domínios WD terminais nem sempre estão associados com graus de LIS menos severos.

• Confirmamos a presença do polimorfismo descrito por KOCH et al. (1996), a substituição C→T encontrada no exon 11 do gene *LIS1* em uma frequência diferente da relatada.

• Identificamos uma provável variante nova rara, ou idiomorfismo, no gene *DCX*. Já que a substituição IVSV + 19G→A do gene *DCX* foi encontrada em uma paciente com agiria/paquigiria e em seu pai assintomático. Tal variante não foi encontrada em nenhum dos 50 controles normais genotipados.

• Diferente dos relatos prévios na literatura, não encontramos nenhuma mutações no gene *DCX* em pacientes com HSB típico. Tal achado pode ser explicado pelo pequeno número de pacientes com este padrão de malformação ou pela presença de mosaicismo somático.

• De acordo com dados apresentados previamente na literatura, nós confirmamos que pacientes com padrões atípicos de HSB, como bandas

posteriores e a associação paquigiria-HSB, não possuem mutação no gene *DCX*.

c-) Esquizencefalias e *EMX2*

- Diferente do relatado na literatura, demonstramos que a substituição 796C→A localizada no terceiro codon do domínio *homeobox* do gene *EMX2*, e anteriormente descrita como uma mutação sinonímia é na realidade uma alteração neutra, já que foi encontrada também em 8% de nossos controles normais.
- Em oposição ao relatado anteriormente por BRUNELLI et al. (1996) e confirmado pelo mesmo grupo de pesquisadores em FAIELLA et al. (1997), nenhum dos nossos pacientes com esquizencefalia apresentou mutações, potencialmente deletérias, no gene *EMX2*. Questionamos, portanto o papel deste gene na determinação desse tipo de DDC.



- AICARDI, J. The agyria-pachygyria complex: a spectrum of cortical malformations. **Brain Dev**, 13: 1-8, 1991.
- ALLEN, K.M.; WALSH, A.C. Genes that regulate neuronal migration in the cerebral cortex. **Epilepsy Res**, 36: 143-56, 1999.
- ANGEVINE, J.B.; SIDMAN, R.L. Autoradiographic study of the cell migration during histogenesis of the cerebral cortex in the mouse. **Nature**, 192: 766-68, 1961.
- BARKOVICH, A.J.; KJOS B.O. Squizencephaly: correlation of clinical findings with MR characteristics. **Am J Neuroradiol**, 13: 85-94, 1992.
- BARKOVICH, A.J.; GUERRINI, R.; BATTAGLIA, G.; KALIFA, G.; N'GUYEN, T.; PARMEGGIANI, A. et al. Band heterotopia: correlation of outcome with magnetic resonance imaging parameters. **Ann Neurol**, 36: 609-17, 1994.
- BARKOVICH, A.J. Malformations of neocortical development: magnetic resonance imaging correlates. **Curr Opin Neurol**, 9: 118-21, 1996.
- BARKOVICH, A.J.; KUZNIECKY, R.I.; JACKSON, G.D.; GUERRINI, R.; DOBYNS, W.B. Classification system for malformations of cortical development-update 2001. **Neurology**, 57: 2168-78, 2001.
- BRUNELLI, S.; FAIELLA, A.; CAPRA, V.; NIGRO, V.; SIMEONE, A.; CAMA, A. et al. Germline mutation in the homeobox gene EMX2 in patients with severe schizencephaly. **Nature Genet**, 12: 94-6, 1996.
- CARDOSO, C.; LEVENTER, R.J.; MATSUMOTO, N.; KUC, J.A.; RAMOCKI, M.B.; MEWBORN, S.K. et al. The location and type of mutation predict malformation severity in isolated lissencephaly caused by abnormalities within the LIS1 gene. **Hum Mol Genet**, 9: 3019-28, 2000.
- CARDOSO, C.; LEVENTER, R.J.; DOWLING, J.J.; WARD, H.L.; CHUNG, J.; PETRAS K.S. et al. Clinical and molecular basis of classical lissencephaly: mutations in the LIS1 gene (PFAFH1B1). **Hum Mutation**, 19: 4-15, 2002.
- CECCHI, C.; BONCINELLI, E. Emx homeogenes and mouse brain development. **Trends Neurosci**, 23: 347-52, 2000.

- CHONG, S.S.; PACK, S.D.; ROSCHKE, A.V.; TANIGAMI A.; CARROZZO, R.; SMITH, A.C. et al. A revision of the lissencephaly and Miller-Dieker syndrome critical regions in chromosome 17p13.3. **Hum Mol Genet**, 6: 147-55, 1997.
- D'AGOSTINO, M.D.; BERNASCONI, A.; DAS, D.; BASTOS, A.; VALERIO, R.M.; PALMINI, A. et al. Subcortical band heterotopia (SBH) in males: clinical, imaging and genetic findings in comparison with females. **Brain**, 125: 2507-22, 2002.
- D'ARCANGELO, G.; MIAO, G.G.; CHEN, S.C.; SOARES, H.D.; MORGAN, J.I.; CURRANT, T. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. **Nature**, 374: 719-23, 1995.
- DES PORTES, V.; FRANCIS, F. ; PINARD, J.M.; DESGUERRE, I.; MOUTARD, M.L.; SNOEK, I. et al. Doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia. **Hum Mol Genet**, 7: 1063-70, 1998.
- DOBYNS, W.B.; CURRY, C.J.; HOYME, H.E.; TURLINGTON L.; LEDBETTER, D.H. Clinical and molecular diagnosis of Miller-Dieker syndrome. **Am J Hum Genet**, 48: 584-594, 1991.
- DOBYNS, W.B.; ELIAS, E.R.; NEWLIN, A.C.; PAGON, R.A.; LEDBETTER, D.H. Causal heterogeneity in isolated lissencephaly. **Neurology**, 42: 1375-1388, 1992.
- DOBYNS, W.B.; TRUWIT, C.L.; ROSS, M.E.; MATSUMOTO, N.; PILZ, D.T.; LEDBETTER, D.H. et al. Differences in the gyral pattern distinguish chromosome 17-linked and X-linked lissencephaly. **Neurology**, 53: 270-277, 1999.
- DUBEAU, F.; TAMPIERI, D.; LEE, N.; ANDERMANN, E.; CARPENTER, S.; LEBLANCK, R. et al. Periventricular and subcortical nodular heterotopia. A study of 33 patients. **Brain**, 118: 1273-87, 1995.
- DUBEAU F. et al. Periventricular nodular heterotopia: clinical manifestations and strategies for surgical treatment of intractable seizures. **Epilepsia**, 34: 127, 1993.
- EKSIOGLU, Y.Z.; SCHEFFER, I.E.; CARDENAS, P.; KNOLL, J.; DIMARIO, F.; RAMSBY, G. et al. Periventricular heterotopia: an X-linked dominant epilepsy locus causing aberrant cerebral cortical development. **Neuron**, 16: 77-87, 1996.

- FAIELLA, A.; BRUNELLI, S.; GRANATA, T.; D'INCERTI, L.; CARDINI, R.; LENTI, C. et al. A number of schizencephalic patients including 2 brothers are heterozygous for germline mutations in the homeobox gene EMX2. *Eur J Hum Genet*, 5: 186-90, 1997.
- FAULKNER, N.E.; DUJARDIN, D.L.; TAI, C.Y.; VAUGHAN, K.T.; O'CONNELL, C.B.; WANG, Y. et al. A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nat Cell Biol*, 2: 784-91, 2000.
- FENG, Y.; OLSON, E.C.; STUKENBERG, P.T.; FLANAGAN, L.A.; KIRSCHNER, M.W.; WALSH, C.A. LIS1 regulates CNS lamination by interaction with mNudE, a central component of the centrosome. *Neuron*, 28: 665-79, 2000.
- FISHELL, G.; MASON, C.A.; HATTEN, M.E. Dispersion of neural progenitors within the germinal zones of the forebrain. *Nature*, 362: 636-38, 1993.
- FOGLI, A.; GUERRINI, R.; MORO, F.; FERNANDEZ-ALVAREZ, E.; LIVET, M.O.; RENIERI, A. et al. Intracellular levels of the LIS1 protein correlate with clinical and neuroradiological findings in patients with classical lissencephaly. *Annals of Neurology*, 45: 154-61, 1999.
- FOX, J.W.; LAMPERTI, E.D.; EKISIOGLU, Y.Z.; HONG, S.E.; FENG, Y.; GRAHAM, D.A. et al. Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron*, 21: 1315-25, 1998.
- FRANCIS, F.; KOULAKOFF, A.; BOUCHER, D.; CHAFEY, P.; SCHAAR, B.; VINET, M.C. et al. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*, 23: 247-56, 1999.
- GARCIA-HIGUERA, I.; FENOGLIO, J.; LI, Y.; LEWIS, C.; PANCHENKO, M.P.; REINER, O et al. Folding of proteins with WD-repeats: comparison of six members of the WD-repeat, superfamily to the G protein beta subunit. *Biochemistry*, 35: 13985-94, 1996.
- GLEESON, J.G.; LIN, P.T.; FLANAGAN, L.A.; WALSH, CA. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*, 23: 257-71, 1999.

GLEESON, J.G.; LUO, R.; GRANT, P.; GUERRINI, R.; RUTTENLOCHER, P.R.; BERG, M.J. et al Genetic and neuroradiologic heterogeneity of double cortex syndrome. **Ann Neurol**, 47: 265-69, 2000a.

GLEESON, J.G.; MINNERATH, S.; KUZNIECKY, R.I.; DOBYNS, W.B.; YOUNG, I.D.; ROSS, M.E. et al. Somatic and germline mosaic mutations in the doublecortin gene are associated with variable phenotypes. **Am J Hum Genet**, 67: 574-81, 2000b.

GLEESON, J.G.; WALSH, C.A. Neuronal migration disorders: from genetic diseases to developmental mechanisms. **Trends Neurosci**, 23: 352-59, 2000c.

GRANATA, T.; BATTAGLIA, G.; D'INCERTI, L.; FRANCESCHETTI, S.; SPREAFICO, R.; BATTINO, D. et al. Schizencephaly: neuradiologic and epileptologic findings. **Epilepsia**, 37: 1185-93, 1996.

GRANATA, T.; FARIANA, L.; FAIELLA, A.; CARDINI, R.; D'INCERTI, L.; BONCINELLI, E. et al. Familial schizencephaly associated with EMX2 mutation. **Neurology**, 48: 1403-06, 1997.

GUERRINI, R.; DOBYNS, W.B. Bilateral periventricular nodular heterotopia with mental retardation and frontonasal malformation. **Neurology**, 51: 499-503, 1998.

HATTORI, M.; ADACHI, H.; TSUJIMOTO, M.; ARAI, H.; INOUE, K. Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase [published erratum appears in *Nature* 1994 Aug 4; 370(6488):391]. **Nature**, 370: 216-218, 1994.

HIROTSUNE, S.; TAKAHARA, T.; SASAKI, N.; HIROSE, K.; YOSHIKI, A.; OHASHI, T. et al. The reeler gene encodes a protein with an EGF-like motif expressed by pioneer neurons. **Nat Genet**, 10: 77-83, 1995.

HIRTH, F.; THERIANOS, S.; LOOP, T.; GEHIRING, W.J.; REICHERT, H.; FURUKUBO-TOKUNAGA, K. Developmental defects in brain segmentation caused by mutations of the homeobox genes orthodenticle and empty spiracles in *Drosophila*. **Neuron**, 15: 769-78, 1995.

HO, Y.S.; SWENSON, L.; DEREWENDA, U.; SERRE, L.; WEI, Y.; DAUTER, Z. et al. Brain acetylhydrolase that inactivate platelet-activating factor is a G α -protein-like trimer. *Nature*, 385: 89-93, 1997.

HOLTMANN, M.; WOERMANN, F.G.; BOENIGK, H.E. Multiple pterygium syndrome, bilateral periventricular nodular heterotopia and epileptic seizures-a syndrome ? *Neuropediatrics*, 32: 264-66, 2001.

HONG, S.E.; SHUGART, Y.Y.; HUANG, D.T.; SHAHWAN, S.A.; GRANT, P.E.; HOURIHANE, J.O.B. et al. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nature Genet*, 26: 93-6, 2000.

HUTTENLOCHER, P.R.; TAVARATH, S.; MOJTAHEDI, S. Periventricular heterotopia and epilepsy. *Neurology*, 44: 51-5, 1994.

INTISO, D.; CIOFFI, R.; DI VIESTI, P.; SIMONE, P.; TONALI, P. Bilateral periventricular nodular heterotopia associated with coeliac disease and palatoschisis. *Ital J Neurol Sci*, 19: 180-3, 1998.

JAN, M.M. Outcome of bilateral periventricular nodular heterotopia in monozygotic twins with megalencephaly. *Dev Med Child Neurol*, 41: 486-88, 1999.

KOCH, A.; TONN, J.; ALBRECHT, S.; SORENSEN, N.; WIESTLER, O.D.; PIETSCH, T. Frequent intragenic polymorphism in the 3' untranslated region of the lissencephaly gene 1 (LIS1). *Cli Genet*, 50: 527-28, 1996.

KOTHARE, S.V.; VANLANDINGHAM, K.; ARMON, C.; LUTHER, J.S.; FRIEDMAN, A.; RADTKE, R.A. Seizure onset from periventricular nodular heterotopias: depth-electrode study. *Neurology*, 51: 1723-27, 1998.

KUZNIECKY R, MURRO A, KING D, MORAWETZ R, SMITH J, POWERS R et al. Magnetic resonance imaging in childhood intractable partial epilepsies: pathologic correlations. *Neurology*, 43: 681-87, 1993.

LEDBETTER, S.A.; KUWANO, A.; DOBYNS, W.B.; LEDBETTER, D.H. Microdeletions of chromosome 17p13 as a cause of isolated lissencephaly. *Am J Hum Genet*, 50: 182-9, 1992.

- LEVENTER, R.J.; CARDOSO, C.; LEDBETTER, D.H.; DOBYNS, W.B. LIS1 missense mutations cause milder lissencephaly phenotypes including a child with normal IQ. *Neurology*, 57: 416-22, 2001.
- LI, X.; PARK, W.J.; PYERITZ, R.E.; JABS, E.W. Effect on splicing of a silent FGFR2 in Crouson syndrome. *Nature Genet*, 9: 232-33, 1995.
- LIU, Z.; STEWARD, R.; LUO, L. Drosophila Lis1 is required for neuroblast proliferation, dendritic elaboration and axonal transport. *Nat Cell Biol*, 2: 776-83, 2000.
- LO NIGRO, C.; CHONG, C.S.; SMITH, A.C.; DOBYNS, W.B.; CARROZO, R.; LEDBETTER, D.H. Point mutations and a intragenic deletion in LIS1, the lissencephaly causative gene in isolated lissencephaly sequence and Miller-Dieker syndrome. *Hum Mol Genet*, 6: 157-64, 1997.
- MALLAMACI A.; IANONNE, R.; BRIATA, P.; PINTONELLO, L.; MERCURIO, S.; BONCINELLI E. et al. EMX2 protein in the developing mouse brain and olfactory area. *Mech Dev*, 77: 165-72, 1998.
- MATSUMOTO, N.; LEVENTER, R.J.; KUC, J.A.; MEWBORN, S.K.; DUDLICEK, L.L.; RAMOCKI M.B. et al. Mutation analysis of the DCX gene and genotype/phenotype correlation in subcortical band heterotopia. *Eur J Hum Genet*, 9: 5-12, 2001.
- MONTENEGRO, M.A. Malformações do desenvolvimento cortical: Contribuição dos fatores genéticos e ambientais para sua etiologia, aspectos clínicos e de neuroimagem. – Campinas. 2003. (Dissertação – Doutorado – Universidade Estadual de Campinas).
- MORO, F.; CARROZZO, R.; VEGGIOTI, P.; TORTORELLA, G.; TONIOLO, D.; VOLZONE, A. et al. Familial periventricular heterotopia: missense and distal truncating mutations of the FLN1 gene. *Neurology*, 58: 916-21, 2002.
- NIETHAMMER, M.; SMITH, D.S.; AYALA, R.; PENG, J.; KO, J.; LEE, M.S. et al. NUDEL is a novel cdk5 substrate that associates with LIS1 and cytoplasmic dynein. *Neuron*, 28: 697-711, 2000.
- NOONAN, F.C.; MUTCH, D.G.; MALLON, M.A.; GOODFELLOW, P.J. Characterization of the homeodomain gene EMX2: sequence conservation, expression analysis, and a search for mutations in endometrial cancers. *Genomics*, 76: 37-44, 2001.

- OLSON, E.C.; WALSH, C. Smooth, rough and upside-down neocortical development. **Curr Op Genet Develop**, 12: 320-27, 2002.
- O'ROURKE, N.A.; SULLIVAN, D.P.; KAZNOWSKI, C.E.; JACOBS, A.A.; MCCONNELL, S.K. Tangential migration of neurons in the developing cerebral cortex. **Development**, 121: 2165-76, 1995.
- PALMINI, A.; ANDERMANN, E.; ANDERMANN, F. Prenatal events and genetic factors in epilepsy patients with neuronal migration disorders. **Epilepsia**, 35: 965-73, 1994.
- PILZ, D.; MATSUMOTO, N.; MINNERATH, S.; MILLS, P.; GLEESON, J.; ALLEN, K. et al. LIS1 and XLS1 (doublecortin) mutations cause most human classical lissencephaly, but different patterns of malformation. **Hum Mol Genet**, 7: 2029-37, 1998.
- PILZ, D.T.; KUC, J.; MATSUMOTO, N.; BODURTHA, J.; BERNADI, B.; TASSINARI, C.A. et al. Subcortical band heterotopia in rare affected males can be caused by missense mutations in DCX (XLIS) or LIS1. **Hum Mol Genet**, 8: 1757-60, 1999.
- PINARD, J.M.; MOTTE, J.; CHIRON, C.; BRIAN, R.; ANDERMANN, E.; DULAC, O. Subcortical laminar heterotopia and lissencephaly in two families: a single X linked dominant gene. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 57: 914-20, 1994.
- POUSSAINT, T.Y.; FOX, J.W.; DOBYNS, W.B.; RADTKE, R.; SCHEFFER, I.E.; BERKOVIC, S.F. et al. Periventricular nodular heterotopia in patients with filamin-1 gene mutations: neuroimaging findings. **Pediatr Radiol**, 30: 748-55, 2000.
- RICHARD, I.; BECKMANN, J.S. How neutral are synonymous codon mutations? **Nature Genet**, 10: 259, 1995.
- RAYMOND, A.A.; FISH, D.R.; SISODIYA, S.M.; ALSANJARI, N.; STEVENS, J.M.; SHORVON, S.D. Abnormalities of gyration, heterotopias, tuberous sclerosis, focal cortical dysplasia, microdysgenesis, dyembryoplastic neuroepithelial tumour and dysgenesis of the archicortex in epilepsy. Clinical, EEG and neuroimaging features in 100 adult patients. **Brain**, 118: 629-60, 1995.
- REINER, O.; CARROZZO, R.; SHEN, Y.; WEHNERT, M.; FAUSTINELA, F.; DOBYNS, W.B. et al. Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. **Nature**, 364: 717-21, 1993.

- RICHARD, I.; BECKMANN, J.S. How neutral are synonymous codon mutations ?. **Nature Genet**, 10: 259, 1995.
- ROBERTSON, P.S.; TWIGG, S.F.R.; SUTHERLAND-SMITH, A.J.; BIANCALANA, V.; GORLIN, R.J.; HORN, D. et al. Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans. **Nature Genet**, 33: 487-91, 2003.
- ROSS, M.E.; ALLEN, K.M.; SRIVASTAVA, A.K.; FEATHERSTONE, T.; GLEESON, J.G.; HIRSCH, B. et al. Linkage and physical mapping of X-linked lissencephaly/SBH (XLIS): a gene causing neuronal migration defects in human brain. **Hum Mol Genet**, 6: 555-62, 1997.
- ROSS, M.E.; WALSH, C.A. Human brain malformation and their lessons for neuronal migration. **Annu Rev Neurosci**, 24: 1041-70, 2001.
- SAKAMOTO, M.; ONO, J.; OKADA, S.; MASUNO, M.; NAKAMURA, Y.; KURAHASHI, H. Alteration of the LIS1 gene in Japanese patients with isolated lissencephaly sequence or Miller-Dieker syndrome. **Hum Genet**, 103: 586-89, 1998.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA**, 74: 5463-67, 1977.
- SAPIR, T.; EISENSTEIN, M.; BURGESS, H.A.; HORESH, D.; CAHANA, A.; AOKI, J. et al., Analysis of lissencephaly causing LIS1 mutations. **Eur J Biochem**, 266: 1011-20, 1999.
- SASAKI, S.; SHIONOYA, A.; ISHIDA, M.; GAMBELLO, M.J.; YINGLING, J.; WYNshaw-BORIS, A. et al. A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system. **Neuron**, 28:681-96, 2000.
- SEMAH, F.; PICOT, M.C.; ADAM, M.D.; BROGLIN, D.; ARZIMANOGLU, A.; BAZIN, B. et al. Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence ? **Neurology**, 51: 1256-62, 1998.
- SHEEN, V.L.; DIXON, P.H.; FOX, J.W.; HONG, S.E.; LINTON, L.; SISODIYA, S.M. et al. Mutations in the X-linked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females. **Hum Mol Genet**, 10: 1775-83, 2001.

SHEEN, V.L.; WHELESS, J.W.; BODELL, A.; BRAVERMAN, E.; COTTER, P.D.; RAUEN KA et al. periventricular heterotopia associated with chromosome 5p anomalies. *Neurology*, 60: 1033-36, 2003.

SHEEN, V.L.; TOPÇU, M.; BERKOVIC, S.; YALNIZOGLU, D.; BLATT, I.; BODELL, A. et al. Autosomal recessive form of periventricular heterotopia. *Neurology*, 60: 1108-12, 2003.

SHEEFIELD, V.C.; BECK, J.S.; KWITEK, A.E.; SANDSTROM, D.W.; STONE, E.M. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*, :325-32, 1992.

SIDMAN, R.L.; RAKIC, P. Neuronal migration with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res*, 62: 1-35, 1973.

SMITH, T.F.; GAITATZES, C.; SAXENA, K.; NEER, E.J. The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci*, 24: 181-85, 1999.

SMITH, D.S.; NIETHAMMER, M.; AYALA, R.; ZHOU, Y.; GAMBELLO, M.J.; WYNshaw-BORIS, A. et al. Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian Lis1. *Nat Cell Biol*, 2:767-75, 2000.

SOSSEY-ALAOUI, K.; HARTUNG, A.J.; GUERRINI, R.; MANCHESTER, D.K.; POSAR, A.; PUCHE-MIRA, A. et al. Human doublecortin (DCX) and the homologous gene in mouse encode a putative Ca²⁺-dependent signaling protein which is mutated in human X-linked neuronal migration defects. *Hum Mol Genet* 7: 1327-32, 1998.

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

The WD repeat family of proteins: banco de dados. Disponível em: <http://BMERC-www.bu.edu/wdrepeat>. Acesso em: 17 jun, 2003.

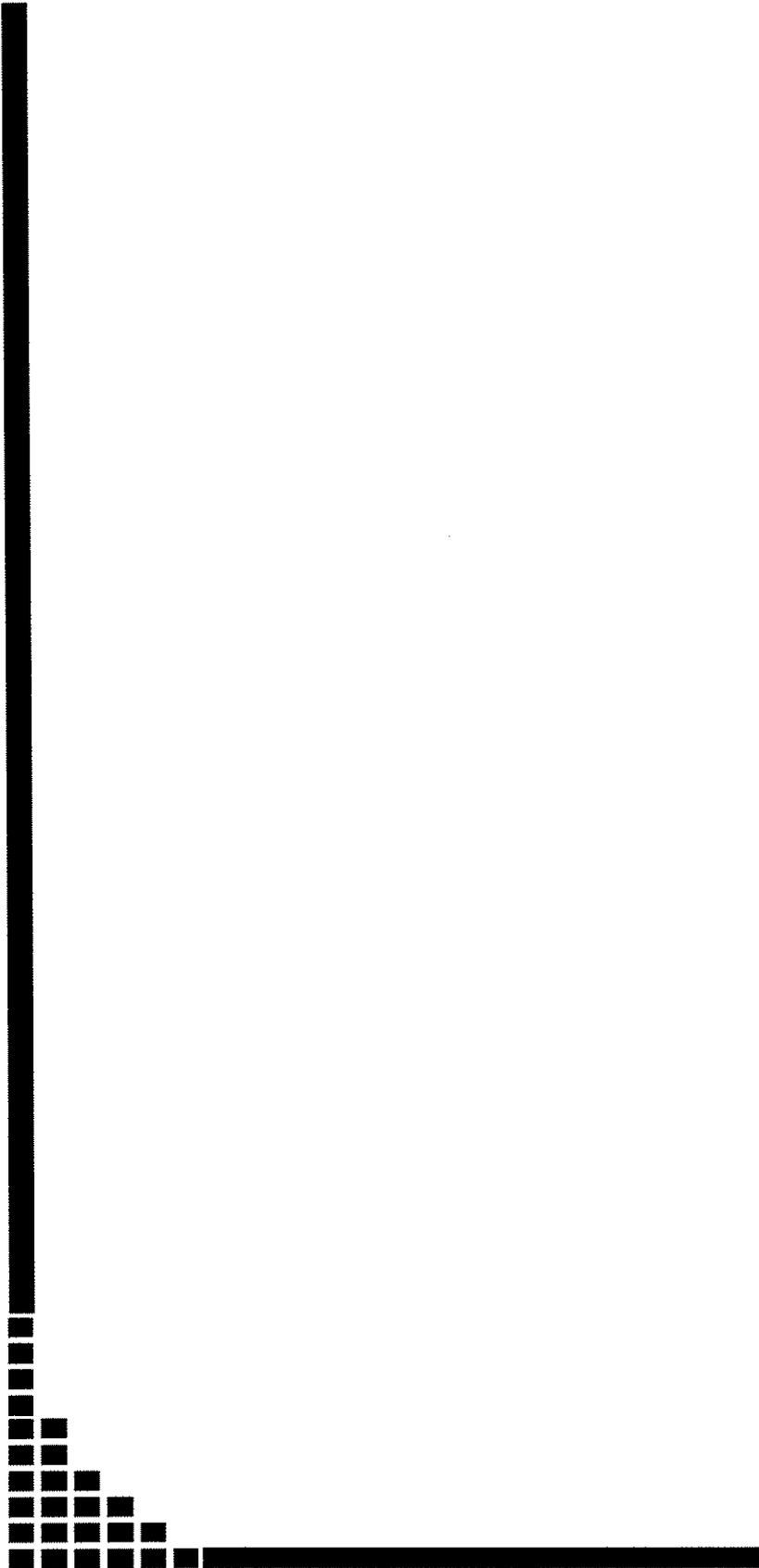
VAN SLEGTHENHORST, M.; NELLIST, M.; NAGELKERKEN, B.; CHEADLE, J.; SNELL, R.; VAN DEN OUWELAND, A. et al. Interaction between hamartin and tuberin, the TSC1 and TSC2 gene products. *Hum Molec Genet*, 7: 1053-57, 1998.

WALSH, C.; CEPKO, C.L. Clonal dispersion of neuronal clones across functional regions of the cerebral cortex. *Science*, 255: 434-40, 1992.

WOLPERT, S.M.; BARNES, P.D. MRI in Pediatric **Neuroradiology**. Mosby Year Book, St. Louis, 1992.

WYLLIE, E.; COMAIR, Y.; RUGGIERI, P.; RAJA, S.; PRAYSON, R. Epilepsy surgery in the setting of periventricular leukomacia and focal cortical dysplasia. *Neurology*, 46: 839-41, 1996.

ZEHARIA, A.; SHUPER, A.; MIMOUNI, M.; KORNREICH, L.; RACHMEL, A.; LERMAN-SAGIE, T. Periventricular brain heterotopias in a child with adrenocortical insufficiency, achalasia, alacrima and neurologic abnormalities (Allgrove syndrome). *J Child Neurol*, 14: 331-34, 1999.



8- ANEXOS

ANEXO 1

***Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM UNICAMP e da
CONEP***



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

☒ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas-S.P.

☎ 0 19 7888936

☎ fax 0 19 7888925

☐ cep@head.fcm.unicamp.br

CEP, 13/02/01
(Grupo I)

PARECER PROJETO: N° 383/2000

I-IDENTIFICAÇÃO:

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

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Fábio Rossi Torres

INSTITUIÇÃO: Departamento de Genética Médica/FCM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP : 16/01/2001

II - OBJETIVOS

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

III - SUMÁRIO

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

Para assegurar que toda a manipulação da informação clínica e molecular seja confidencial, questionários clínicos e amostras de sangue e de DNA serão identificados por um código comum designado no momento em que o indivíduo entrar no estudo. Informações geradas durante o nosso projeto e que possam ter implicações na confirmação diagnóstica de indivíduos sintomáticos, serão comunicados aos profissionais responsáveis

pelo acompanhamento dos pacientes. Dados para serem usados em diagnóstico preditivo de indivíduos assintomáticos, com risco de desenvolver a doença, não serão gerados por este projeto.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELADORES

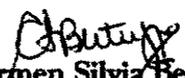
O projeto está bem estruturado. O risco a que o paciente é submetido é mínimo. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é claro e adequado. Acreditamos que o projeto não tenha problemas éticos, estando de acordo com a Resolução 196/96 CNS-MS.

V - PARECER DO CEP

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

VI - DATA DA REUNIÃO

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


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



PARECER Nº 516/2001

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

Protocolo CEP = 363/2000

Processo nº 25000.023733/2001-32

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

Pesquisador Responsável: Dr Fábio Rossi Torres

Instituição: Universidade Estadual de Campinas / UNICAMP

Área Temática Especial: Genética Humana.

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

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

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

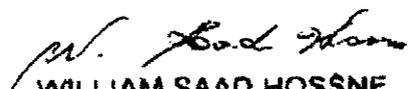
Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta - se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, com as seguintes recomendações a serem acompanhadas pelo CEP :

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

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

Situação : Projeto aprovado com recomendações

Brasília, 24 de maio de 2001


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP-MS

ANEXOS 2 E 3

Termo de consentimento para coleta do sangue e realização da pesquisa de mutações e formulários de entrada e clínico para avaliação dos pacientes

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

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

OBJETIVO DA PESQUISA:

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

PROCEDIMENTO:

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

RISCO E DESCONFORTO

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

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 2 de 3

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

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

VANTAGENS:

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

SIGILO

Entendo que toda a informação médica, assim como o resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, farão parte do prontuário médico do propósito e serão submetidos aos regulamentos do HC-UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica.

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

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL

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

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO

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

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 3 de 3

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

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

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

Nome do participante ou responsável

Assinatura do participante ou responsável

data

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

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

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado

data



**ENCAMINHAMENTO DE AMOSTRAS DE SANGUE PARA O LABORATÓRIO DE
GENÉTICA MOLECULAR**

Seguir as instruções para coleta de amostras de sangue para extração direta de DNA e contactar o laboratório de genética molecular para obter autorização para a coleta (ramal: 6-88902).

Data da coleta: _____ Nome do paciente: _____ Idade: _____

Filho de consanguíneos: () sim () não

Origem étnica dos avós: Maternos: _____ - _____ Paternos: _____ - _____

HC: _____

Registro no Dep. de Genética Médica (DGM): _____

Ambulatório: _____

Docente Responsável: _____

Diagnóstico Clínico: _____

Resumo da história clínica e exame físico (incluir idade de início dos sintomas): _____

Heredograma: Sexo feminino Sexo masculino
Clinicamente afetado Possivelmente afetado
Indivíduo cuja amostra foi colhida →



Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Genética Médica

FORMULÁRIO PARA AVALIAÇÃO CLÍNICA DE PACIENTES COM DDC

Centroclínico: _____ HC: _____

Nome: _____ Data da consulta: _____

Data de nascimento: _____ Número no heredograma: _____

Origem étnica dos quatro avós: Maternos: _____ / _____ Paternos: _____ / _____

Status clínico: _____ (afetado, possivelmente afetado, não afetado)

Classificação da síndrome epiléptica*: _____

Interrogatório complementar (se "positivo", informe a idade na qual ocorreu)

1. Crises febris: _____

2. Trauma de crânio: _____

3. Outras condições neurológicas: _____

4. Outras condições médicas: _____

Medicação :

1. Drogas anticonvulsivantes: (informe dose diária e por quanto tempo o paciente vem tomando) _____

2. Outras: _____

Características clínicas da epilepsia:

1. Idade do início das crises (afebris): _____

2. Tipos de crise: Não Sim

2.1. Parcial simples: _____

2.2. Parcial complexa: _____

2.3. Secundariamente generalizada: _____

2.4. Outras: _____

Exame neurológico: Normal: _____ Anormal: _____ Especificar a

anormalidade: _____

EEG inter-ictal:

1. Normal: _____

2. Anormalidade epileptiforme localizada:

2.1 Frontal: Bilateral () Direita () Esquerda ()

2.2 Temporal: Bilateral () Direita () Esquerda ()

2.3 Parietal: Bilateral () Direita () Esquerda ()

2.4 Occipital: Bilateral () Direita () Esquerda ()

3. Anormalidade epileptiforme generalizada: _____

4. Alterações do ritmo de base: Difusas: _____ Focais: _____

EEG Ictal (se disponível):

1. Generalizado: _____

2. Focal: _____ Localização: _____

CT () ou RM (): Normal: _____ Anormal: _____ Especificar a anormalidade: _____

De acordo com: Commission on Classification and Terminology of the International League against Epilepsy (1989) Proposal for revised classification of epilepsy and epileptic syndromes. *Epilepsia* 30, 389-399.

Faculdade de Ciências Médicas - Cidade Universitária "Zeferino Vaz" - Distrito de Barão Geraldo - Campinas - SP - Brasil - CEP 13081-970 - C. P. 6111 - Fone (019) 788-8907 - FAX: (019) 788-8909

ANEXO 4

Protocolo de Ressonância Magnética

Investigação por ressonância magnética

As imagens foram obtidas em um sistema de 2 T (Elcint Prestige®), com aquisições no plano coronal, sagital e axial. Os parâmetros de imagem para as diferentes aquisições foram:

1. Imagens sagitais T1 ponderadas “spin echo”, ângulo de excitação – “flip angle”- de 180°; TR=430, TE=12, matriz de 200x350, FOV=25X25cm). Estas imagens são utilizadas para orientar o plano de aquisição das demais imagens.
2. Imagens no plano coronal oblíquo obtidas em um plano perpendicular ao longo eixo da formação hipocampal, definido nas imagens sagitais.
 - a-) T2 ponderadas “fast spin echo” (espessura de 3 a 4mm, ângulo de excitação de 120°; TR=4800, TE=129, matriz de 252X320, FOV=18X18cm).
 - b-) T1 ponderadas “inversion recovery”(espessura de 3mm, ângulo de excitação de 200°; TR=2800, TE=14, TI=840, matriz de 130X256, FOV=16X18cm).
3. Imagens no plano axial: “duplo spin echo” (T2 ponderadas e densidade de prótons): T2 ponderadas (espessura de 6mm, ângulo de excitação de 120°, TR=6800, TE=129, matriz de 252X328, FOV=21X23cm).
4. Aquisição volumétrica (3D) T1 gradiente echo (GRE), para reconstrução multiplanar, com espessura de 1 mm (flip angle=35°, TR=22, TE=9, matriz=256 x 256, FOV=23 x 25 cm).

ANEXO 5

Artigo publicados ou submetidos no período

Aspectos Genéticos das Malformações do Desenvolvimento Cortical

Fábio Rossi Torres*, Iscia Lopes Cendes**

Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

RESUMO

Os mecanismos que levam a formação do córtex cerebral têm se mostrado muito complexos, requerendo uma maquinaria molecular e bioquímica extremamente eficientes para a sua realização, desta forma não é surpresa que qualquer defeito em alguma das fases de sua embriogênese resulte em diferentes tipos de patologias. Estes distúrbios estão todos reunidos sob a designação de malformações do desenvolvimento cortical (MDC). As MDC estão entre as principais causas conhecidas de deficiência mental e epilepsia e podem ter uma etiologia genética predominante. Extensos estudos em genética molecular conseguiram isolar os genes envolvidos em algumas desordens como a esclerose tuberosa, a lissencefalia, a síndrome do duplo córtex, a heterotopia nodular periventricular e a esquizencefalia. Nesta revisão pretendemos discutir sucintamente as fases de desenvolvimento do córtex, suas respectivas desordens e levantar alguns fatos controversos na literatura.

Unitermos: formação do córtex cerebral, MDC, genética molecular.

ABSTRACT

Aspects genetics of the cortical development malformations

The mechanisms involved in cortical development are very complex and require a highly efficient molecular machinery to work properly. Therefore, a simple disturbance in the cortical embryogenesis may result in different pathologies. These disorders are known as cortical development malformations (CDM) and are one of the most important causes of epilepsy and developmental delay. Some of these disorders have a very strong genetic background. Extensive studies in molecular genetics resulted in gene discovery for a number of CDM, such as tuberous sclerosis, lissencephaly, double cortex, periventricular nodular heterotopy and schizencephaly. In this review we aimed to discuss the different phases of cortical development and the associated disorders.

Key words: cortical development, CDM, molecular genetics.

INTRODUÇÃO

As malformações do desenvolvimento cortical (MDC) cada vez mais têm sido reconhecidas como uma importante causa de atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, epilepsia e outras desordens neurológicas.

Semah e colaboradores⁽⁴⁶⁾ comprovaram recentemente através de detalhados estudos eletrográficos, clínicos e de ressonância magnética (RM) que as MDC, em suas diversas formas, totalizam cerca de 8% dos pacientes com

epilepsia que procuram tratamento em centros especializados. O mesmo estudo também chegou a surpreendente conclusão de que as MDC correspondem à segunda etiologia mais freqüente de epilepsia refratária, atrás apenas da epilepsia de lobo temporal associadas a esclerose hipocampal.

Até o advento das técnicas de imagem por ressonância magnética (RM) estas desordens pertenciam exclusivamente a área da patologia, no entanto, após a incorpo-

* Pós-graduando em Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP. E-mail: frossit@yahoo.com.

** Professora Doutora, Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP. E-mail: iccendes@unicamp.br.

ração da RM à rotina do atendimento neurológico, estas malformações passaram a ser detectadas em vida, tornando essencial a compreensão das mesmas no âmbito clínico e científico.

Houve também um maior interesse na área de neurogenética molecular graças a união de dois campos do conhecimento aparentemente não relacionadas: estudos de neuroimagem demonstrando a ocorrência de várias formas de malformações de desenvolvimento cortical em famílias⁽⁶⁾ e a descoberta dos mecanismos que regulam a formação do córtex cerebral.

Desta forma vários genes importantes para a gênese destas doenças foram descobertos e os mecanismos que atuam no desenvolvimento do córtex cerebral humano tornaram-se mais claros.

Nesta revisão pretendemos primeiro discutir brevemente a embriologia do córtex e suas fases de desenvolvimento, para em seguida analisarmos as malformações com base genética relacionadas a cada etapa da embriogênese.

O DESENVOLVIMENTO DO CÓRTEX CEREBRAL

A formação do córtex cerebral pode ser dividida em três grandes estágios de desenvolvimento: *proliferação*, *migração* e *organização*. Os precursores neuronais *proliferam* na zona ventricular e em seguida os neurônios pós-mitóticos *migram* para formar as estruturas que virão a se tornar o futuro córtex cerebral maduro. Esses estágios do desenvolvimento ocorrem da 5ª a 24ª semana gestacional. É importante salientar que tal seqüência de eventos é obedecida para grupos celulares distintos em momentos diferentes e do ponto de vista prático todas essas fases podem ser vistas ao mesmo tempo em regiões diferentes do sistema nervoso embrionário.

As primeiras células que *migram* formarão uma estrutura acima da zona ventricular denominada de pré-placa. As demais ondas migratória de neurônios irão então formar a placa cortical que irá dividir a pré-placa em uma camada mais externa denominada de zona marginal (futura camada I do córtex maduro) e uma camada interna chamada de subplaca. Ao chegarem a placa cortical, os neurônios organizam-se em camadas que irão se desenvolver no córtex adulto. Este processo mostrou-se surpreendentemente complexo, havendo um padrão *inside-out* de deposição dos neurônios⁽³⁾. Em outras palavras, os neurônios recém chegados à placa cortical ultrapassam os neurônios mais antigos, acumulando-se progressivamente em camadas mais superficiais⁽⁴⁷⁾.

A *migração* dos neurônios ocorre em sua maioria ao longo das células radiais gliais, no entanto, interneurônios gabaminérgicos seguem um padrão de migração tangencial,

isto é paralelo a superfície pial ou lateralmente dentro dos ventrículos^(52,22,50,53,49).

Uma vez que os neurônios imaturos chegam a sua localização definitiva estes estabelecem uma série específica de conexões pela extensão de seus axônios e dentritos, estes fenômenos são característicos da fase de *organização cortical*.

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

MALFORMAÇÕES DO DESENVOLVIMENTO CORTICAL COM BASE GENÉTICA

Fase de Proliferação

Os mecanismos pelo qual estas malformações ocorrem são complexos e pouco entendidos, portanto a base genética da maioria das desordens pertencentes a esta fase ainda não estão bem elucidadas.

Uma exceção a regra é a *esclerose tuberosa*, uma doença multisistêmica envolvendo principalmente o sistema nervoso central, a pele e os rins⁽²⁷⁾. As principais características desta doença no cérebro são a presença de nódulos subependimais, células tumorais gigantes e tubérculos corticais, sendo estes os mais ligados à epileptogênese. Quando familiar, a esclerose tuberosa é herdada como uma doença autossômica dominante e de expressão variada. A recorrência na prole de pais não afetados tem sido apenas raramente descrita e parece ser devido a baixa expressividade ou a mosaicismo gonadal⁽²⁹⁾. No entanto, a maioria dos casos (50 a 70% do total) é esporádica decorrendo de mutações "*de novo*". Tais pacientes podem, no entanto, transmitir a mutação para a prole num padrão de herança autossômica dominante (veja comentário abaixo). Um dos genes responsáveis por esta malformação foi clonado por van Sleightenhorst e colaboradores⁽⁵¹⁾ em 1997. O gene *TSC1* localiza-se no cromossomo 9q34 e codifica uma proteína de 1.164 aminoácidos denominada hamartina, cuja seqüência não possui homologia com nenhuma proteína conhecida. O outro gene, denominado *TSC2*, localiza-se no cromossomo 16 e codifica uma proteína de 1.784 aminoácidos denominada tuberina. Esta proteína parece estar associada a membrana celular e intracelular possuindo um provável papel na proliferação e diferenciação celular⁽⁵³⁾.

As proteínas hamartina e tuberina podem se associar⁽⁵²⁾ fato que indica uma participação de ambas nas mesmas etapas de desenvolvimento, o que pode explicar a similaridade do fenótipo visto em pacientes com mutações nestes dois genes.

Os genes *TSC1* e *TSC2* juntos correspondem a aproximadamente 70% dos casos de tuberosa esclerose devido

a mutações genéticas, o restante tem sido atribuído a outros genes ainda não descobertos⁽²⁹⁾.

A diferenciação entre casos esporádicos e familiares de esclerose tuberosa é muito importante pois por esta se tratar de uma doença autossômica dominante a chance de recorrência na prole é de 50%. Como existem alguns casos de baixa expressividade, a pesquisa molecular nos pais do indivíduo afetado tentando identificar mutações dos genes *TSC1* e *TSC2*, tornou-se fundamental para o aconselhamento genético.

Fase de Migração

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

Dentre as malformações corticais com base genética na fase de migração destacam-se as *heterotopias nodulares periventriculares* (HNP) e o espectro das *lissencefalias/heterotopias subcorticais em banda* (HSB). A HNP é uma desordem na qual uma fração dos neurônios pós-mitóticos parece ser incapaz de deixar a zona ventricular⁽²⁶⁾ resultando no adulto, em nódulos de neurônios diferenciados próximo a zona ventricular, enquanto outros neurônios migram normalmente formando o córtex maduro^(2,19). Quando a HNP ocorre em famílias, o padrão de herança é similar ao de um gene dominante ligado ao cromossomo X, que afeta principalmente mulheres, já que os homens parecem não sobreviver a gestação⁽³⁴⁾. A principal manifestação neurológica da HNP é a epilepsia⁽¹⁷⁾, que provavelmente é consequência da localização heterotópica dos nódulos neuronais⁽³⁶⁾, geralmente não havendo nenhuma deficiência grave nas funções cognitivas⁽¹⁸⁾. Os homens afetados normalmente não sobrevivem ao termo, e quando o fazem morrem precocemente devido a problemas de coagulação sanguínea⁽²³⁾. O gene responsável pela HNP foi clonado na região Xq28⁽¹⁹⁾ e seu produto foi identificado como a filamina 1 (*fln1*)⁽²³⁾, uma proteína que realiza ligação cruzada com a actina, sugerindo que o papel da *fln1* na migração neuronal pode ser mediado através da modulação do citoesqueleto de actina. O fenótipo de HNP parece ser, mais freqüentemente relacionado a mutações nulas na região codificante 5' do gene, levando a uma perda de função da proteína⁽²³⁾.

A HSB ou *córtex duplo* é o extremo menos grave do espectro das lissencefalias e caracteriza-se por uma banda anormal de neurônios na substância branca em um córtex aparentemente normal⁽⁴³⁾. A gravidade das manifestações

clínicas, epilepsia e retardo mental, variam com a magnitude da banda heterotópica de neurônios⁽⁷⁾.

Os pacientes com *lissencefalia tipo I* demonstram um fenótipo mais grave, sendo caracterizados pela ausência (agiria) ou diminuição (paquígia) das circunvoluções de superfície do córtex⁽¹⁾. A lissencefalia tipo I está associada com profundo retardo mental e crises epiléticas intratáveis, estando também presente na *síndrome de Miller-Dieker* que além desta malformação cortical vem acompanhada de uma série de dismorfismos faciais^(15,16).

Tanto a lissencefalia tipo I como a HSB têm sido observadas dentro das mesmas genealogias ou esporadicamente. Em várias famílias, mulheres com córtex duplo tem filhos com lissencefalia, deficiência mental profunda e epilepsia, enquanto as filhas desenvolvem córtex duplo e deficiência mental leve, sugerindo o envolvimento de um único gene ligado ao X⁽⁴²⁾. Este locus foi mapeado na região Xq21-q24⁽⁴⁵⁾ e o gene clonado denominado *doublecortina* (*DCX*), cujo produto de expressão parece ser uma proteína que se associa a microtúbulos^(21,25).

A lissencefalia tipo I também pode ser causada por mutações e deleções em um gene localizado no cromossomo 17p13.3^(37,38,44): o *LIS1*. Grandes deleções em *LIS1*, detectadas citogeneticamente, são as mutações mais freqüentemente encontradas em pacientes com lissencefalia. O *LIS1* codifica a subunidade α da isoforma cerebral de uma acetil-hidrolase ativadora de plaquetas (*PAFAH*)^(11,30,44). O papel do fator ativador de plaquetas na migração neuronal ainda não foi estabelecido, mas ele parece estar envolvido em fenômenos de diferenciação celular neuronal e cascatas de indução críticas para o desenvolvimento cortical^(24,32).

Um ponto interessante envolvendo os dois genes citados foi a observação de que as regiões do cérebro mais afetadas diferem entre os pacientes com mutações em *DCX* e *LIS1*⁽⁴¹⁾. As mutações em *DCX* resultam em lissencefalia com anormalidades mais localizadas na região frontal, consistente com o padrão de expressão de *DCX* no córtex frontal⁽⁴³⁾. Por outro lado, mutações em *LIS1* afetam mais as regiões occipital e parietal. Por outro lado, as similaridades no fenótipo de lissencefalia, perda de foliação e espessamento do córtex compartilhadas por estes dois diferentes tipos de mutação, sugerem que *DCX* e *LIS1* estão potencialmente envolvidos nos mesmos mecanismos que controlam a migração neuronal, participando em vias de transdução de sinal relacionadas, porém distintas⁽²⁾.

Recentemente, foi descoberto um novo gene na região 7q22 que quando mutado em humanos também leva a lissencefalia⁽³³⁾. Este gene é o homólogo humano do gene *reelin* (*RELN*), cuja identificação se deu em uma linhagem de ratos (*reeler*) que apresentam um quadro de lissencefalia semelhante ao encontrado em humanos por-

tadores da mutações^(14,31). O gene *RELN* codifica uma grande proteína de 388Kd que é secretada⁽¹⁴⁾ e atua na migração dos neurônios corticais. As características deste tipo de lissencefalia diferem da lissencefalia do tipo I, mostrando um padrão de herança autossômico recessivo e anormalidades severas no hipocampo, medula espinhal e hipoplasia cerebelar.

Também é importante comentarmos, mesmo que sucintamente, os avanços genéticos referentes as *lissencefalias* tipo II. Ao contrário do primeiro tipo, na qual ocorre um atraso da migração neuronal, as lissencefalias tipo II se caracterizam pela migração dos neurônios além das leptomeninges. Esta anormalidade de desenvolvimento cortical está associada a distrofia muscular congênita de Fukuyama (DMCF), a Síndrome de Walker-Warburg (SWW) e a *muscle-eye-brain disease* (MEB). A DMCF é uma doença autossômica recessiva caracterizada por mutações no gene *FCMD* que codifica uma proteína de matriz extracelular denominada fukutina⁽³⁵⁾. A SWW é uma doença com o padrão autossômico recessivo e a MEB teve seu locus mapeado na região 1p32-p32⁽¹²⁾. Porém, em ambos os casos os genes ainda não foram identificados.

Fase de Organização

As *esquizencefalias*, ocorrem por distúrbios nos processos de organização cortical e na maioria das vezes estão associadas a insultos ambientais. Porém, mais recentemente, também têm sido, ocasionalmente, associada a alterações gênicas. Esta patologia tem sido descrita como uma desordem congênita extremamente rara caracterizada por espessas fendas localizadas dentro dos hemisférios cerebrais⁽⁶⁾. Estas fendas são cercadas por substância cinzenta e na maioria das vezes envolvem as regiões perisilvianas⁽⁶⁾. Áreas extensas dos hemisférios cerebrais podem estar ausentes e substituídas pelo líquido cerebrospinal. Os pacientes com esquizencefalia são clinicamente caracterizados por *deficits* motores e mentais que são proporcionalmente mais graves conforme a extensão das malformações cerebrais, além de serem freqüentemente afetados por epilepsia^(4,23).

Foram caracterizados dois tipos de esquizencefalia, dependendo da magnitude da área envolvida e do tamanho das fendas⁽⁶⁾. A esquizencefalia do tipo I (lábios fechados) é a menos grave e os pacientes são freqüentemente normais, no entanto eles podem apresentar crises epiléticas e ter algum grau de espasticidade. Os pacientes com esquizencefalia do tipo II (lábios abertos) apresentam a maioria das anormalidades descritas no parágrafo anterior, sendo esta a forma que apresenta uma base genética mais preponderante.

Em uma pesquisa procurando detectar mutações em genes humanos homólogos a *Emx1*, *Emx2*, *Otx1* e *Otx2*

que são expressos no prosencéfalo em desenvolvimento de ratos, Brunelli et al. encontraram que 3 de 8 pacientes com esquizencefalia severa eram heterozigotos para diferentes mutações no gene *EMX2*⁽⁹⁾. Mais tarde Faiella et al. analisaram geneticamente 18 indivíduos afetados detectando pelo menos 13 portadores de mutações em *EMX2* em condição heterozigótica⁽²⁰⁾. Estes dois trabalhos solidificaram a hipótese de que a esquizencefalia pode ter causas predominantemente genéticas.

Acredita-se que, em mamíferos, o gene *EMX2* pode ter um papel como inibidor da proliferação celular ou como um regulador positivo da diferenciação neuronal⁽¹⁰⁾. No entanto permanece ainda controversa a participação deste gene na etiologia da esquizencefalia, pois a literatura especializada é muito escassa em relação a estudos genéticos feitos em indivíduos portando este tipo de malformação. Dobyns (dados não publicados) relatou que de um grupo composto por 15 pacientes portadores de esquizencefalia e analisados geneticamente para o gene *EMX2*, nenhum mostrou-se portador de mutação no mesmo. Nós acreditamos que serão necessários estudo multicêntricos, incluindo um grande número de pacientes, para que se obtenha um consenso quanto ao verdadeiro valor da etiologia genética nas esquizencefalias. É de nossa opinião que a origem da maioria dos casos ocorre devido a um insulto ambiental, como sangramentos durante o período de gestação, ou a mutações em outros genes responsáveis pelo desenvolvimento do prosencéfalo.

CONCLUSÃO

Apesar de ser um campo recente e em franca expansão, o estudo das malformações corticais ainda possui muitos pontos a serem explorados. Por exemplo, existem vários genes (*VLDL*, *ApoER2*, *CDK5*, *p35*) que levam a fenótipos semelhantes a da lissencefalia tipo I em camundongos e que precisam ter os seus homólogos humanos testados nos pacientes negativos para mutações nos genes *LIS1*, *DCX* e *RLN1*. Recentemente, também tem se descoberto homens com HNP e mutações no gene *FLN1*, seria muito intrigante saber o motivo pelo qual grande parte dos neurônios destes homens afetados completaram a migração normalmente já que todos expressam o alelo mutante; talvez possamos encontrar mais respostas quando o camundongo *knock-out* para este gene estiver desenvolvido. E por fim, temos ainda que tentar responder a seguinte pergunta: a esquizencefalia realmente tem base genética preponderante no gene *EMX2*? Estas perguntas certamente serão alvo de muito trabalho e pesquisa tanto na área clínica como na de estudos moleculares do desenvolvimento cortical.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aicardi J. The agyria-pachygyria complex: a spectrum of cortical malformations. *Brain Dev* 1991; 13: 1-8.
2. Allen KM, Walsh AC. Genes that regulate neuronal migration in the cerebral cortex. *Epilepsy Res* 1999; 36: 143-156.
3. Angevine JB, Sidman RL. Autoradiographic study of the cell migration during histogenesis of the cerebral cortex in the mouse. *Nature* 1961; 192: 766-768.
4. Barkovich AJ, Kjos BO. Schizencephaly: correlation of clinical findings with MR characteristics. *AJNR Am J Neuroradiol* 1992; 13: 85-94.
5. Barkovich AJ, Kjos BO. Gray matter heterotopias: MR characteristics and correlation with developmental and neurological manifestations. *Radiology* 1992; 182: 493-499.
6. Barkovich AJ. Malformations of neocortical development: magnetic resonance imaging correlates. *Curr Opin Neurol* 1996; 9: 118-121.
7. Barkovich AJ, Guerrini R, Battaglia G, Kalifa G, N'Guyen T, Parmeggiani A, Santucci M, Giovanardi-Rossi P, Granata T, D'Incerti L. Band heterotopia: correlation of outcome with magnetic resonance imaging parameters. *Ann Neurol* 1994; 36: 609-617.
8. Barkovitch J, Kuzniecky R, Dobins W, Jackson G, Becker L, Evrad P. A classification scheme for malformations of cortical development. *Neuropediatrics* 1996; 27: 59-63.
9. Brunelli S, Faiella A, Capra V, Nigro V, Simeone A, Cama A, Boncinelli E. Germline mutation in the homeobox gene *EMX2* in patients with severe schizencephaly. *Nature Genet* 1996; 12: 94-96.
10. Cecchi C, Boncinelli E. *Emx* homeogenes and mouse brain development. *Trends Neurosci* 2000; 23: 347-352.
11. Chong SS, Pack SD, Roschke AV, Tanigami A, Carrozzo R, Smith AC, Dobyns WB, Ledbetter DH. A revision of the lissencephaly and Miller-Dieker syndrome critical regions in chromosome 17p13.3. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 147-155.
12. Cormand B, Avela K, Pihko H, Santavuori P, Talim B, et al. Assignment of the muscle-eye-brain disease gene to 1p32-p34 by linkage analysis and homozygosity mapping. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 126-35.
13. Cunningham CC, Gorlin CC JB, Kwiatkowski DJ, Hartwig JH, Janney PA, Byers HR, Stossel TP. Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion. *Science* 1992; 255: 325-327.
14. D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Currant T. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant *reeler*. *Nature* 1995; 374: 719-723.
15. Dobyns WB, Curry CJ, Hoyme HE, Turlington L, Ledbetter DH. Clinical and molecular diagnosis of Miller-Dieker syndrome. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 584-594.
16. Dobyns WB, Elias ER, Newlin AC, Pagon RA, Ledbetter DH. Causal heterogeneity in isolated lissencephaly. *Neurology* 1992; 42: 1375-1388.
17. Dubeau F, et al. Periventricular nodular heterotopia: clinical manifestations and strategies for surgical treatment of intractable seizures. *Epilepsia* 1993; 34: 127.
18. Dubeau F, et al. Periventricular and subcortical nodular heterotopia. A study of 33 patients. *Brain* 1995; 118: 1273-1287.
19. Eksioglu YZ, et al. Periventricular heterotopia: an X-linked dominant epilepsy locus causing aberrant cerebral cortical development. *Neuron* 1996; 16: 77-87.
20. Faiella A, et al. A number of schizencephalic patients including 2 brothers are heterozygous for germline mutations in the homeobox gene *EMX2*. *Eur J Hum Genet* 1997; 5: 186-190.
21. Francis F, et al. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* 1999; 23: 247-256.
22. Fishell G, Mason CA, Harten ME. Dispersion of neural progenitors within the germinal zones of the forebrain. *Nature* 1993; 362: 636-638.
23. Fox JW, et al. Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* 1998; 21: 1315-1325.
24. Garcia-Higuera I, Fenoglio J, Li Y, Lewis C, Panchenko MP, Reiner O, Smith TF, Neer EJ. Folding of proteins with WD-repeats: comparison of six members of the WD-repeat, superfamily to the G protein beta subunit. *Biochemistry* 1996; 35: 13985-13994.
25. Gleeson JG, et al. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 1999; 23: 257-271.
26. Gleeson JG, Walsh CA. Neuronal migration disorders: from genetic diseases to developmental mechanisms. *Trends Neurosci* 2000; 23: 352-359.
27. Gomez MR. *Tuberous Sclerosis*. New York: Raven Press; 1979.
28. Granata T, Battaglia G, D'Incerti L, et al. Schizencephaly: neuroradiologic and epileptologic findings. *Epilepsia* 1996; 37: 1185-1193.
29. Guerrini, et al. Genetically determined forms of partial symptomatic epilepsies: clinical phenotype, neuropathology and neurogenetic basis of seizures. *Genetics of Focal Epilepsies*, London: John Libbey; 1999.
30. Hattori M, Adachi H, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K. Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase [published erratum appears in *Nature* 1994 Aug 4; 370(6488): 391]. *Nature* 1994; 370: 216-218.
31. Hirotsune S, Takahara T, Sasaki N, Hirose K, Yoshiki A, Ohashi T, Kusakabe M, Murakami Y, Muramatsu M, Watanabe S, Nakao M, Katsuki M, Hayashisaki Y. The reeler gene encodes a protein with an EGF-like motif expressed by pioneer neurons. *Nat Genet* 1995; 10: 77-83.
32. Ho YS, Swenson L, Derewenda U, Serre L, Wei Y, Dauter Z, Hattori M, Adachi T, Aoki J, Arai H, Inoue K, Derewenda ZS. Brain acetylhydrolase that inactivate platelet-activating factor is a G-protein-like trimer. *Nature* 1997; 385: 89-93.
33. Hong SE, Shugart YY, Huang DT, Shahwan SA, Grant PE, Hourihane JOB, Martin NDT, Walsh CA. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human *RELN* mutations. *Nature Genet* 2000; 26: 93-96.
34. Huttenlocher PR et al. Periventricular heterotopia and epilepsy. *Neurology* 1994; 44: 51-55.
35. Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, Matsumura K, Kondo-lida E, et al. An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 1998; 394:388-392.
36. Kothare SV et al. Seizure onset from periventricular nodular heterotopias: deph-t-electrode study. *Neurology* 1998; 51: 1723-1727.
37. Ledbetter SA, Kuwano A, Dobyns WB, Ledbetter DH. Micro-deletions of chromosome 17p13 as a cause of isolated lissencephaly. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 182-189.
38. Lo Nigro C, Chong CS, Smith AC, Dobyns WB, Carrozzo R, Ledbetter DH. Point mutations and a intragenic deletion in *LIS1*, the lissencephaly causative gene in isolated lissencephaly sequence and Miller-Dieker syndrome. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 157-164.
39. O'Rourke NA, Dailey ME, Smith SJ, McConnell SK. Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. *Science* 1995; 258: 299-302.
40. O'Rourke NA, Sullivan DP, Kaznowski CE, Jacobs AA, McConnell SK. Tangential migration of neurons in the developing cerebral cortex. *Development* 1995; 121: 2165-2176.
41. Pilz D, Matsumoto N, Minnerath S, Mills P, Gleeson J, Allen K, Walsh C, Barkovich A, Dobyns W, Ledbetter D, Ross M. *LIS1* and *XLS1* (doublecortin) mutations cause most human classical lissencephaly, but diferent patterns of malformation. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 2029-2037.
42. Pinard JM, Motte J, Chiron C, Brian R, Andermann E, Dulac O. Subcortical laminar heterotopia and lissencephaly in two families: a single X linked dominant gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57: 914-920.

43. Raymond AA, Fish DR, Sisodiya SM, Alsanjari N, Stevens JM, Shorvon SD. Abnormalities of gyration, heterotopias, tuberous sclerosis, focal cortical dysplasia, microdysgenesis, dysembryoplastic neuroepithelial tumour and dysgenesis of the archicortex in epilepsy. Clinical, EEG and neuroimaging features in 100 adult patients. *Brain* 1995; 118: 629-660.
44. Reiner O, Carruzzo R, Shen Y, Wehnert M, Faustinela F, Dobyns WB, Caskey CT, Ledbetter DH. Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature* 1993; 364: 717-721.
45. Ross ME, Allen KM, Srivastava AK, Featherstone T, Gleeson JG, Hirsch B, Harding BN, Andermann E, Abdullah R, Berg M, Czapanek-Bielman D, Flanders DJ, Guerrini R, Motte J, Mira AP, Scheffer I, Berkovic S, Scaravilli F, King RA, Ledbetter DH, Schlessinger D, Dobyns WB, Walsh CA. Linkage and physical mapping of X-linked lissencephaly/SBH (XLIS): a gene causing neuronal migration defects in human brain. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 555-562.
46. Semah F, Picot MC, Adam MD, et al. Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology* 1998; 51: 1256-1262.
47. Sidman RL, Rakic P. Neuronal migration with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res* 1973; 62: 1-35.
48. Sossey-Alaoui K, Hartung AJ, Guerrini R, Manchester DK, Posar A, Puche-Mira A, Andermann E, Dobyns WB, Srivastava AK. Human doublecortin (DCX) and the homologous gene in mouse encode a putative Ca^{2+} -dependent signaling protein which is mutated in human X-linked neuronal migration defects. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1327-1332.
49. Stendahl OI, Hartwig JH, Brotschi EA, Stossel TP. Distribution of actin-binding protein and myosin in macrophages during spreading and phagocytosis. *J Cell Biol* 1980; 84: 215-224.
50. Tan SS, Breen S. Radial mosaicism and tangential cell dispersion both contribute to mouse neocortical development. *Nature* 1993; 362: 638-640.
51. van Slechtenhorst M, de Hoogt R, Hermans C, Nellist M, Janssen B, Verhoef S, Lindhout D, van den Ouweland A, Halley D, Young J, Burley M, Jeremiah S, et al. Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science* 1997; 277: 805-808.
52. van Slechtenhorst M, Nellist M, Nagelkerken B, Cheadle J, Snell R, van den Ouweland A, Reuser A, Sampson J, Halley D, van der Sluijs P. Interaction between hamartin and tuberin, the TSC1 and TSC2 gene products. *Hum Molec Genet* 1998; 7: 1053-1057.
53. Walsh C, Cepko CL. Clonal dispersion of neuronal clones across functional regions of the cerebral cortex. *Science* 1992; 255: 434-440.
54. Walsh C, Cepko CL. Clonal dispersion in proliferative layers of developing cerebral cortex. *Nature* 1993; 362: 632-635.
55. Wienecke R, König A, DeCluc JE. Identification of tuberin, the tuberous sclerosis-2 product: tuberin possesses specific Rap1GAP activity. *J Bio Chem* 1995; 270: 16409-16414.
56. Wolpert SM, Barnes PD. MRI in Pediatric Neuroradiology. St. Louis: Mosby Year Book, 1992.

Teste seu Conhecimento

- Qual a chance de uma mulher com HNP e portadora de mutação no gene FLN1 dar luz a uma criança também afetada?
 - 1
 - 1/2
 - 1/4
 - 1/3
- As esquizencefalias foram por muito tempo consideradas malformações de etiologia ambiental, no entanto para uma minoria dos casos uma origem genética pode ser atribuída. A qual ou quais destes genes a esquizencefalia foi atribuída?
 - EMX1 e OTX1
 - EMX2 e TSC2
 - OTX2
 - EMX2
 - LIS1 e OTX2
- Quanto ao aconselhamento genético e pesquisa de mutações, existe no caso do espectro das agriplas/paquigrias uma prioridade de qual gene, LIS1 ou DCX, deve ser testado primeiro quando se leva em conta o gradiente anterior-posterior da malformação detectada por ressonância magnética.
 - certo
 - errado
- Que padrão e tipos celulares se esperariam de uma malformação cortical causada por um insulto na fase de proliferação neuronal?
 - neurônios displásicos e células em balão
 - neurônios normais porém em posição ectópica
 - laminação do córtex em 6 camadas
 - rachaduras no córtex, preenchidas por LCR e envoltas por áreas de polimicrogiria

RESPOSTAS COMENTADAS

1. Resp.: d.

A chance será de 1/3, pois se pensarmos que o genótipo da mãe será $X^H X^h$, onde H é o alelo mutante e h o alelo normal, e o genótipo de pai $X^h Y$, pela lei da segregação independente teremos para os filhos os prováveis genótipos: $X^H X^h$, $X^H Y$, $X^h X^h$, $X^h Y$. O genótipo $X^H Y$ geralmente leva ao aborto do conceito, os genótipos $X^h X^h$, $X^h Y$ resultarão em crianças fenotipicamente normais e o $X^H X^h$ em uma mulher portadora de HNP, logo a chance será de 1/3.

2. Resp.: d

Uma possível etiologia genética das esquizencefalias foi atribuída ao gene EMX2. Outros genes responsáveis pelo desenvolvimento do telencéfalo como EMX1, OTX1 e OTX2 foram testados mas apresentaram resultado negativo.

3. Resp.: a

A própria literatura aconselha que se detectado um gradiente mais severo anteriormente o gene DCX deve ter prioridade, já se as

malformações forem mais severas posteriormente o gene LIS1 deve ser pesquisado primeiro.

4. Resp.: a.

A presença de tipos celulares anormais como célula em balão, que apresentam em sua superfície marcadores presentes em células pouco diferenciadas, assim como a presença de neurônios displásicos são características de malformações pertencentes à fase de proliferação. Acredita-se que algum insulto genético ou ambiental no período em que essas células estão se dividindo na zona ventricular origine estas populações celulares atípicas.

Endereço para correspondência:
Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Ciências Médicas
Departamento de Genética Médica
13084-971 Campinas, SP, Brasil
Tel: (19)3788-8907 - Fax: (19)3788-8909

**MUTATION SCREENING IN A COHORT OF PATIENTS WITH LISSENCEPHALY
AND SUBCORTICAL BAND HETEROTOPIA**

Fábio Rossi Torres, MSc¹; Maria Augusta Montenegro, MD, PhD²;
Antonia Paula Marques-de-Faria, MD, PhD¹; Marilisa Mantovani Guerreiro, MD, PhD²,
Fernando Cendes, MD², PhD; Iscia Lopes-Cendes, MD, PhD¹

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

Key words: Malformations of cortical development, epilepsy, genetics.

Running title: Mutation screening in lissencephaly and subcortical band heterotopia.

Correspondence to: Iscia Lopes-Cendes, MD, PhD
Department of Medical Genetics
University of Campinas - UNICAMP
Campinas, SP, Brazil, 13084-971
Tel: + 55 19 3788 8907
FAX: + 55 19 3289 1818
E-mail: icendes@unicamp.br

ABSTRACT

We describe clinical neuroimaging and molecular findings in a group of 15 patients with classical lissencephaly (LIS) and subcortical band heterotopia (SBH). A 1385A → C mutation was found in the *LIS1* gene in one single patient with LIS more severe than expected for individuals with missense mutations in *LIS1*. We believe that the site of the mutation, present in a functionally critical region of the protein, could explain the unusual severe phenotype found in this patient.

Understanding of cortical development has progressed based on studies of human malformations and mouse mutants with deficient neuronal migration, particularly the malformation known as lissencephaly (LIS) which merges with the phenotype of subcortical band heterotopia (SBH).^{1,2} Approximately 64% of patients with LIS have deletions of the *LIS1* gene on chromosome 17p13.³ However, only five missense mutations in *LIS1* were found in patients with classical LIS.³ Mutations in *DCX* were reported in over 40 patients with different phenotypes, but with MRI abnormalities predominantly in the anterior areas.⁴ In this paper we report the 6th missense mutation in a patient with classical LIS. We believe that this finding will be an important contribution to the understanding of cortical malformations and the role of the LIS1 protein in the cortex embryology.

METHODS

The diagnosis of LIS or SBH was established according to imaging findings and the severity of these disorders was graded using an established system described previously.⁵ Twelve patients had high-resolution MRI scans performed according to a previously published protocol.⁶ Three patients had only CT scans performed.

We amplified the coding region, as well as intron-exon boundaries, of the *LIS1* and *DCX* genes using the polymerase chain reaction (PCR). PCR was carried out using standard protocols.⁷ PCR products were analyzed by single strand conformation polymorphism (SSCP). The nucleotide sequence of all fragments showing a band shift was determined using the Big Dye Terminator Sequencing kit for megaBACE®1000. Alignment between proteins was performed using the Match Box web server 1.3 from expasy molecular biology tools (<http://www.expasy.com>).

RESULTS

Clinical and MRI findings

We have studied a total of 15 patients with the lissencephaly/subcortical band heterotopia spectrum, eight were women and seven were men whose ages ranged from one to 45 years of age (mean age = 16.6 years). LIS was detected in two (2/8) women and in six (6/7) men; while, SBH was observed in five (5/8) women and only in one (1/7) men studied. **Table 1** summarizes the main demographic, clinical and imaging characteristics, as well as the molecular findings of the patients studied.

Clinical and MRI findings of the patient with the new missense mutation in LIS1

Patient 11 is a three year-old boy born at term after an uncomplicated pregnancy, offspring of young, health, non-consanguineous parents. Neurologic examination revealed a severe neurodevelopment delay with global hypotonia and epilepsy. He had no major facial dysmorphic features but a low hair implantation and a single transverse palmar crease were observed. MRI of this patient showed agyria in the parietal and occipital lobes and pachygyria in temporal and frontal lobes, which are characteristics of LIS grade 3a, **figure 1**. Cerebellum and brain stem were normal.

Molecular analysis

Seven patients and nine of 50 normal control subjects showed an altered band-shift in the PCR fragment amplified from exon 11 of the *LIS1* gene. In addition, a single patient showed a band-shift amplified from exon 8 of the *LIS1* gene. SSCP analysis of the *DCX* gene did not reveal any band-shifts in patients or normal controls. The automatic sequencing of the abnormal PCR fragments corresponding to exons 11 and 8 of the *LIS1* gene identified a substitution 1805C→T in the 3'untranslated region of the *LIS1* cDNA (NCBI, NM 000430) and a mutation, 1385A → C, (NCBI, NM 000430), not present in 50 unrelated normal controls, **figure 2**. The 1385A → C mutation is predicted to cause a histidine to proline substitution at amino acid 277, a residue localized in the 5th WD-40 domain of the LIS1 protein.

A sequence alignment between human LIS1 protein and its orthologues revealed that the mutated histidine is a very conserved amino acid in different organisms but not when this alignment is performed among different proteins with WD domains.

DISCUSSION

To date, 41 intragenic *LIS1* mutations have been found in 41 unrelated individuals.³ Of these mutational events only five were missense and, in general, affect amino acids highly conserved among and within species.³

The neuroimaging characteristics of patients with missense mutations in *LIS1* gene are variable and generally milder, most often LIS grades 4 and 6.⁸ The most severely affected patient with a *LIS1* missense mutation (mutation H149R, **figure 3**) has a LIS grade 3a, characterized by agyria in posterior and pachygyria in anterior regions. This neuroimaging pattern is most frequently found in patients with frameshift and nonsense mutations in *LIS1*. The H149R missense mutation interrupts a highly conserved invariant amino acid in the second tryptophan/aspartic acid (WD) repeat motif.

The new missense mutation described in this study, 1385A → C, is localized in a non-conserved region within species and corresponds to the 5th WD domain. The wild type histidine is present only in 26 of 776 WD repeats available in the BMERC database.⁹ The mutant amino acid proline is found in only 13 WD repeats available in the same database. These findings together with previous reports⁸ would point to a milder phenotype than that found in our patient, since this mutation changes a variable amino acid residue inside the sequence of the WD protein family. However, the amino acid histidine in position 277, in spite of not being conserved within species, is a very conserved residue among different species. In addition the differences in chemical and structural properties of the wild type histidine as compared to the mutant proline could lead to conformational changes in the *LIS1* protein resulting in a possible impairment of its interaction with β -spectrin, a

cytoskeletal protein or in a protein with less residual function, resulting in a more severe phenotype.

Although the majority of our patients with LIS have a relatively milder phenotype (table 1) with a postero-anterior gradient (P>A), suggesting intragenic mutations in *LIS1*, we cannot completely exclude the presence of major rearrangements, especially deletions, in the *LIS1* gene. Additional studies using fluorescent in situ hybridization (FISH) will be necessary to rule out these types of deletions.

The absence of *DCX* mutations in our cohort of patients is not completely unexpected, since none of the pedigrees showed evidence of X-linked inheritance and mutations in *DCX* can be found in small frequencies in sporadic patients with SBH.^{7,10} In addition, our results confirm that patients with atypical SBH findings, such as SBH-pachygyria and predominantly posterior SBH do not usually have mutations in *DCX*. Furthermore, it is also possible that other genes are involved in LIS genesis in our patients. There are some genes identified in mice, and not yet tested in humans that are good candidates for LIS not linked to *LIS1* and *DCX* genes.

Our study demonstrates that missense mutations in *LIS1* and their localization in latter WD repeats are not always associated with a milder phenotype as reported previously.⁸ We believe that these results are important in advancing our understanding of cortical malformations and the role of the *LIS1* protein in the cortex embryology. In addition, it may help to define new boundaries among phenotypes related to *LIS1* mutations.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the patients and their families. FRT received a scholarship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Brazil. Dr. MAM received a scholarship from FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), SP Brazil. Drs. FC, ILC and MMG are supported, in part, by CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), Brazil. This work was supported by grants from FAPESP, SP Brazil to Drs. FC and ILC.

References

1. Crome L. Pachygyria. *J Pathol Bacteriol* 1956; 71: 335-352.
2. Barkovich AJ, Guerrini R, Battaglia G, et al. Band heterotopia: correlation of outcome with magnetic resonance imaging parameters. *Ann. Neurol* 1994; 36: 609-617.
3. Cardoso C, Leventer RJ, Dowling JJ, et al. Clinical and molecular basis of classical lissencephaly: mutations in the *LIS1* gene (*PAFAH1B1*). *Hum Mutation* 2002; 19: 4-15.
4. Matsumoto N, Leventer RJ, Kuc JA. Mutation analysis of the *DCX* gene and genotype/phenotype correlation in subcortical band heterotopia. *Eur J Hum Genet* 2001; 9: 5-12.
5. Dobyns WB, Truwit CL, Ross ME, et al. Differences in the gyral pattern distinguish chromosome 17-linked and X-linked lissencephaly. *Neurology* 1999; 53: 270-277.
6. Montenegro MA, Guerreiro MM, Lopes-Cendes I, Guerreiro CAM, Cendes F. Interrelationship of genetics and prenatal injury in the genesis of malformations of cortical development. *Arch Neurol* 2002; 59: 1147-1153.
7. Gleeson JG, Minnerath SR, Fox JW, et al. Characterizations of mutations in the gene doublecortin in patients with double cortex syndrome. *Ann Neurol* 1999; 45: 146-153
8. Leventer RJ, Cardoso C, Ledbetter DH, Dobyns WB. *LIS1* missense mutations cause milder lissencephaly phenotypes including a child with normal IQ. *Neurology* 2001; 57: 416-422.
9. Gaitatzes C. The WD repeat family of proteins (online). Available at <http://BMERC-www.bu.edu/wdrepeat>. Accessed June 17, 2003.
10. Des Portes V, Francis F, Pinard JM, et al. Doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1063-1070

Table 1: Clinical, neuroimaging and molecular findings of 15 patients with LIS and SBH.

Patient I.D./ age (year)/ sex (M/F)	Imaging findings (MRI)	grade	Prenatal event	Family history (number of relatives)	Molecular findings in <i>LIS1</i> and <i>DCX</i> gene
1/04/F	agyria/pachygyria	not determined	positive IgG for rubecola
2/29/F	diffuse with posterior predominance and discontinuous SBH	6a1	...	spontaneous abortion (1), epilepsy (1)	...
3/12/F	diffuse with posterior predominance pachygyria	4a	fever and rash	MR (6 maternal cousins)	...
4/37/M	diffuse with posterior predominance pachygyria	4a
5/15/F	incomplete lissencephaly*	not determined	cytomegalovirus infection	...	C→T 1805pb of <i>LIS1</i> cDNA**
6/08/M	incomplete lissencephaly	not determined	fever	...	C→T 1805pb of <i>LIS1</i> cDNA**
7/25/F	diffuse with anterior predominance, continuous and thick SBH	6b1	...	epilepsy (1)	...
8/04/M	diffuse with posterior predominance pachygyria*	4a	abortion attempt, bleeding
9/29/F	SBH	6b3	...	epilepsy (1)	C→T 1805pb of <i>LIS1</i> cDNA**
10/06/M	posterior agyria and anterior pachygyria	3a	abortion attempt	epilepsy (2)	C→T 1805pb of <i>LIS1</i> cDNA**
11/03/M	posterior agyria and anterior pachygyria	3a	...	epilepsy (2)	A→C 1385pb of <i>LIS1</i> cDNA
12/21/F	anterior SBH and posterior pachygyria	5a	...	MR (1), neonatal death (1)	C→T 1805pb of <i>LIS1</i> cDNA**
13/01/F	inconclusive but possibly anterior and thin SBH	not determined	...	MR (1)	C→T 1805pb of <i>LIS1</i> cDNA**
14/45/M	diffuse with anterior predominance and thin SBH	6b3	C→T 1805pb of <i>LIS1</i> cDNA**
15/11/M	diffuse with anterior predominance pachygyria	4b1	...	premature death (4) and epilepsy (5)	...

Notes: M=male; F=female; SBH=subcortical band heterotopia

* This patients had only CT scan

** This variant was also found in nine normal controls

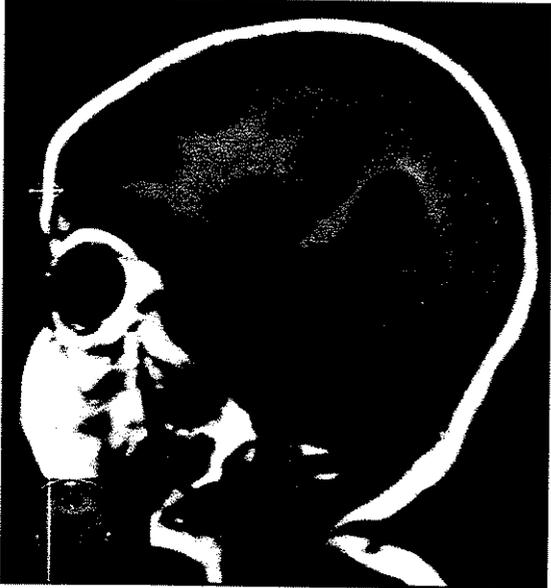
LEGEND FOR FIGURES

Figure 1: Magnetic resonance imaging findings of patient 11. **A)** Axial T1 and **B)** Sagittal T1 images, showing pachygyria in the frontal lobes transitioning to agyria in the parietooccipital regions, with the characteristics of lissencephaly grade 3^a

Figure 2: *LIS1* sequence electropherograms of **A)** patient 11 and **B)** a normal control subject. The sequencing change in patient 11, an A → C substitution in exon 8, is indicated by a black arrow.

Figure 1

A



B

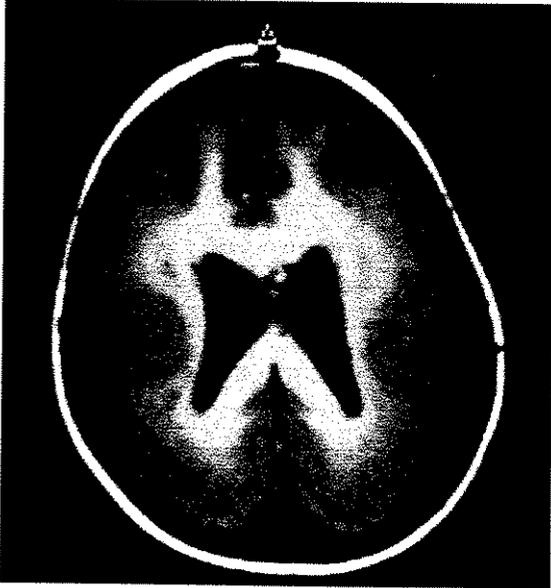
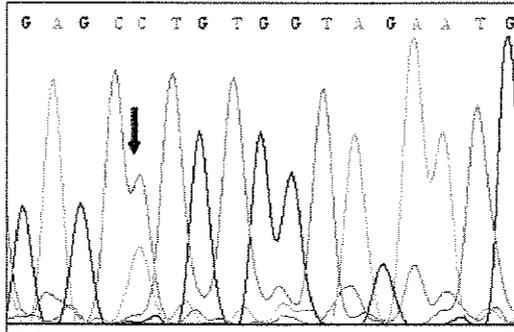


Figure 2

A



B

