



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia

2010

Eugénia Maria Pinto

**Estudo Molecular da Epilepsia Mioclonica
Progressiva Unverricht-Lundborg**



Eugénia Maria Pinto

**Estudo Molecular da Epilepsia Mioclonica
Progressiva Unverricht-Lundborg**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Olga Amaral, Assistente Principal na UID-P do Departamento de Genética do INSA e do Professor Doutor Manuel Santos, Professor Associado do Departamento de Biologia, da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho ao Joaquim e aos meus filhos, Gustavo e ao Rodrigo

o júri

presidente

Professora Maria Adelaide Almeida
Professora Auxiliar,
Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Maria Clara Pereira Sá Miranda
Investigadora Principal,
Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto

Doutora Olga Alcina Martins De Oliveira Amaral
Assistente Principal,
UID-P Departamento de Genética INSA IP

Professor Manuel Santos
Professor Associado,
Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

À Dra. Olga pela orientação prestada, pela disponibilidade e amizade demonstrada.

À Unidade de Investigação e Desenvolvimento do Centro de Genética Médica Jacinto Magalhães_INSA, que possibilitou a realização deste trabalho e a todos os elementos agradeço o carinho e o apoio manifestado.

À Unidade de Bioquímica Genética, à Dra Lúcia e a todos os meus colegas agradeço a ajuda e a forma como me apoiaram.

Ao Dr. João Chaves pela colaboração e informações prestadas da família estudada.

Aos colegas de mestrado que tornaram mais fácil esta fase, ao Nuno pelas boleias e pela ajuda, à Raquelita pela simpatia e disponibilidade e à Sónia pelas viagens animadas e pela amizade.

À Liliana e à Joana, pelas dicas e sugestões nas figuras...

À Lurdes, pela disponibilidade e ajuda com as culturas celulares.

À Isaura, pela amizade e disponibilidade de sempre e pela grande ajuda na imunofluorescência.

Aos meus pais pelo enorme apoio e carinho.

Ao Joaquim agradeço a paciência, a ajuda e o carinho nestes últimos meses.

Ao Gustavo e Rodrigo pelos beijinhos e sorrisos...

palavras-chave

Epilepsia, EPM1, CSTB, gene *CSTB*, Lisossoma, *splicing* alternativo

resumo

As Epilepsias Mioclónicas Progressivas (EMP) estão associadas a um grupo heterogéneo de doenças metabólicas raras. São caracterizadas clinicamente por mioclonias, crises tónico-clónicas e declínio neurológico progressivo com ataxia e demência. A doença de Unverricht-Lundborg (DUL), epilepsia mioclónica progressiva tipo 1 (EPM1, MIM 254800) e principal causa de EMP, é uma doença autossómica recessiva causada por mutações no gene da cistatina B (*CSTB*) que levam à perda de função desta proteína. Os primeiros sintomas surgem entre os 6 e os 10 anos de idade, e são caracterizados por convulsões. O diagnóstico da EPM1 é feito, inicialmente, a nível clínico e posteriormente confirmado a nível genético.

O objectivo principal deste trabalho foi a implementação do estudo genético e investigação aplicada da EPM1. Sendo a EPM1 uma doença rara, sem diagnóstico laboratorial em Portugal, e da qual se desconhece o impacto real em termos de saúde pública, este trabalho permite proceder à confirmação/exclusão de suspeita clínica e à caracterização dos casos.

Os resultados obtidos permitiram iniciar o estudo do gene *CSTB* em casos com suspeita de EPM1. Assim, foi possível a confirmação de um doente com suspeita de EPM1, e a avaliação preliminar de alguns polimorfismos existentes na nossa população. A mutação nova identificada e caracterizada neste trabalho é uma mutação pontual, aparentemente silenciosa (p.Q22Q), mas que altera o padrão normal de *splicing* resultando em inclusão de sequência intrónica, sendo de prever a perda de função da cistatina B.

Estes resultados demonstram a necessidade de optar por uma abordagem não direccionada, complementando o estudo de gDNA com o de cDNA. O estudo molecular desta doença, poderá contribuir para a avaliação e caracterização desta patologia em termos mutacionais e, simultaneamente, contribuir para uma melhor compreensão da patofisiologia da doença.

keywords

Epilepsy, EPM1, CSTB, gene *CSTB*, Lysosome, alternative splicing

abstract

The Progressive Myoclonus Epilepsies (PME) are associated to an heterogeneous group of rare metabolic diseases. They are clinically marked by myoclonic, tonic-clonic episodes and progressive neurological decline, with ataxia and dementia.

One of the major causes of PME is the Unverricht- Lundborg disease (EPM1, MIM 254800), an autosomal recessive disorder, caused by loss of function mutations in the cystatin B gene (*CSTB*). The onset of the symptoms is around the age of 10 yr. and is marked by convulsions. The EPM1 diagnostic is done through a differential diagnostic, first at a clinical level, and being confirmed at a genetic level.

The main objective of this work is the implementation of the genetic study and applied research in EPM1. Since EPM1 is a rare disease without laboratory diagnostic in Portugal its real impact at the level of public health is unknown, the methods developed in this thesis will give the possibility of confirming/excluding clinical suspicion of EPM1, and allow the characterization of the patients.

The results obtained have permitted the initiation of the study of *CSTB*, in instances where there was a suspicion of EPM1. It became possible to confirm a case of a patient suspect of having the EPM1, as well as making the evaluation of some polymorphisms present in our population. The new mutation, found and characterized in this work, is a point mutation, apparently silent (p.Q22Q), which alters the normal splicing pattern resulting in partial retention of the intronic sequence and subsequently leading to loss of function.

These results show the need for making a non directional approach, doing a comprehensive study of the *CSTB* gene and complementing the gDNA study with the cDNA one. The study of this disease at the molecular biology level, may contribute to the evaluation and characterization of this pathology as far as its mutations and, at same time, it may contribute for a better understanding of its pathophysiology.

Índice de Figuras

| | |
|--|-----------|
| Figura 1.1 - Representação esquemática da subdivisão das epilepsias (baseado de Ceru <i>et al.</i> , 2005)..... | 4 |
| Figura 1.2 - Origem e consequências da libertação de catepsinas do lisossoma. (modificada de Johansson <i>et al.</i> , 2010)..... | 10 |
| Figura 1.3 - Representação esquemática da estrutura tetramérica da cistatina B, a laranja estão representadas as hélices alfa e a rosa as folhas beta. Imagem retirada de Protein Data Base, (10.2210/pdb2oct/pdb) onde se pode ver o tetramero resultante do processo de interacção de transformação de estruturas diméricas de cistatina B. | 11 |
| Figura 1.4 - O stress oxidativo induz a CSTB protegendo os neurónios da morte cerebral, por inibição da actividade da catepsina B. Em contraste, nos neurónios com deficiência em CSTB, o stress oxidativo leva ao aumento da actividade da catepsina B, ao dano oxidativo e à morte neuronal (baseado em Lehtinen <i>et al.</i> , 2009). | 13 |
| Figura 1.5 - (A) Esquema da estrutura do gene <i>CSTB</i> (baseado em Joensuu <i>et al.</i> , 2008) e (B) da sequência da proteína <i>CSTB</i> | 14 |
| Figura 1.6 - Representação do gene da <i>CSTB</i> e da região do promotor com a localização e sequência da repetição polimórfica do dodecâmero (3) (modificado de Nokelainen <i>et al.</i> , 2000). | 16 |
| Figura 1.7 - Representação simplificada do modelo de repressão do gene da <i>CSTB</i> causado pela expansão. O dodecâmero está representado pelas caixas roxas. (A) Esquematiza a interacção do activador com todo o complexo de transcrição associado a 2-3 repetições do dodecâmero. (B) Ilustra a incapacidade do activador interagir com o complexo de transcrição devido à expansão do dodecâmero, que altera a distância do local de interacção (baseado em Lalioti <i>et al.</i> , 1999). | 17 |
| Figura 1.8 - Estrutura 3D da proteína <i>CSTB</i> (PDB 2 OCT). A marcação a amarelo indica a localização do aminoácido alterado de algumas mutações descritas (Tabela 1.2). | 19 |
| Figura 1.9 - Organização do lisossoma (adaptado de Alberts <i>et al.</i> , 2001). | 20 |
| Figura 2.1. Esquema do gene da <i>CSTB</i> e dos fragmentos utilizados para amplificação do gene..... | 33 |
| Figura 2.2. Esquema do cDNA da <i>CSTB</i> e dos fragmentos possíveis para a sua amplificação. | 34 |
| Figura 3.1 - Resultado da amplificação da expansão com as condições descritas na Tabela 2.3 - A , B (55°C), B' (57°C) e E ; 1, 3, 5 e 7 – controlo homozigótico para a expansão; 2, 4, 6 e 8 - controlo normal; M - marcador de peso molecular 100pb..... | 42 |

| | |
|--|-----------|
| Figura 3.2 - Resultado da amplificação da expansão com as condições descritas na Tabela 2.3 - C ; 1 – controlo homocigótico para a expansão; 2 - controlo heterocigótico para a expansão; 3 - controlo normal; M - marcador de peso molecular 100pb. | 42 |
| Figura 3.3 - Resultado da amplificação da expansão com as condições descritas na Tabela 2.3 - D ; M - marcador de peso molecular 100pb; 1 - controlo homocigótico para a expansão; 2 - controlo normal | 43 |
| Figura 3.4 - Fragmentos amplificados para a análise do gDNA do gene da CSTB (exões, intrões e junções exão-intrão); 1 - 6 corresponde aos fragmentos amplificados; M - marcador de peso molecular 100pb. | 44 |
| Figura 3.5 - Resultados da análise por sequenciação do fragmento 2F/2R do gDNA do doente com EPM1 e dos seus pais..... | 45 |
| Figura 3.6 - Análise do fragmento 3F/4R (Tabela 2.2) do cDNA do doente com a alteração c.66G>A no gene da CSTB. 1 - cDNA do doente EPM1; 2 - cDNA do controlo normal; M - Marcador de peso molecular 100pb. | 46 |
| Figura 3.7 - Representação parcial da sequência do cDNA e da grelha de leitura da proteína de um controlo normal (a) e do Doente A (b) com a mutação c.66G>A, no qual se verifica a inclusão de parte do intrão 1 (364pb). | 47 |
| Figura 3.8 - Representação esquemática do transcrito normal e dos transcritos obtidos na presença da mutação c.66G>A. Representação dos diferentes valores de <i>score</i> para o 5' <i>splice-site</i> (ss), 3' <i>splice-site</i> (ss) e 5' <i>splice-site</i> (ss) alternativo. | 48 |
| Figura 3.9 - Distribuição citoplasmática dos lisossomas por imunofluorescência indirecta em fibroblastos humanos cultivados. CN – células do controlo normal; DA – células do Doente A. | 51 |
| Figura 3.10 - Marcação lisossomal com o corante <i>LysoTracker</i> fibroblastos em humanos cultivados. CN – células do controlo normal; DA – células do Doente A. | 52 |

Índice de Tabelas

| | |
|---|-----------|
| Tabela 1.1 - Principais formas de EMP (baseado em Kälviäinen <i>et al.</i> , 2008 e Shahwan <i>et al.</i> , 2005)..... | 6 |
| Tabela 1.2 - Mutações descritas no gene <i>CSTB</i> (Joensuu <i>et al.</i> , 2008 e Erdinç <i>et al.</i> , 2010)..... | 15 |
| Tabela 1.3 - Resumo das catepsinas melhor caracterizadas (baseado em Guha <i>et al.</i> , 2008) | 21 |
| Tabela 2.1 - Características clínicas dos doentes estudados com EMP. | 27 |
| Tabela 2.2 - Descrição dos primers e condições para amplificação da expansão do dodecâmero do gene da <i>CSTB</i> (Joensuu <i>et al.</i> , 2007). | 30 |
| Tabela 2.3 - Condições testadas na otimização da amplificação da expansão do dodecâmero do gene da <i>CSTB</i> | 31 |
| Tabela 2.4 - Descrição dos primers usados para amplificação do gDNA do gene <i>CSTB</i> | 32 |
| Tabela 2.5 - Descrição dos primers para amplificação do cDNA do gene <i>CSTB</i> | 34 |
| Tabela 3.1 - Resultados obtidos na análise do gDNA do Doente B. | 49 |
| Tabela 3.2 - Resultados obtidos no rastreio populacional. | 50 |

Abreviaturas

| | |
|---------------|--|
| Abs | Absorvância |
| ADRPL | Atrofia dentato-rubro-palido-luisiana |
| BSA | Bovine Soro fetal |
| cDNA | DNA complementar ao mRNA |
| CSTB | Cistatina B |
| ddNTPs | Di-Desoxirribonucleótidos trifosfato |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| dNTPs | Desoxirribonucleótidos trifosfato |
| DUL | Doença de Unverricht-Lundborg |
| DL | Doença de Lafora |
| DTT | 1,4-Ditiotriol |
| EEG | Electroencefalograma |
| EMPs | Epilepsias Mioclónicas Progressivas |
| EPM1 | Epilepsia Mioclónica Progressiva Tipo I |
| EPM1B | Epilepsia Mioclónica Progressiva Tipo I novo locus |
| EPM2A | Gene da Laforina |
| EPM2B | Gene da Malina |
| gDNA | DNA genómico |
| ILAE | <i>International League Against Epilepsy</i> |
| kb | Quilobase, 1000 |
| KDa | KiloDalton |
| MERRF | Epilepsia Mioclónica com Fibras Vermelhas Rajadas |
| mRNA | RNA mensageiro |
| NCL | Ceroide Lipofuscinoses |
| NEU1 | Gene da Neuraminidase |
| NMD | <i>Nonsense Mediated Decay</i> |
| pb | Pares de bases |

| | |
|----------------|---|
| PBS | <i>Phosphate buffer saline</i> |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| qRT-PCR | <i>Quantitative reverse transcriptase - Polymerase chain reaction</i> |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| rpm | Rotações por minuto |
| SNPs | <i>Single Nucleotide Polymorfism</i> |
| Sp1 | <i>Specificity protein 1</i> |
| SUDEP | <i>Sudden Unexplained Death in Epilepsy</i> |
| SVF | Soro vitelo fetal |
| TAE | Tampão tris-acetato |
| TRNK | Gene tRNALys |
| TRNF | Gene tRNAPhe |
| UTR | <i>Untranslated region</i> – região não traduzida do DNA |
| UV-vis | Ultravioleta visível |

Índice

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 3 |
| 1.1. CONCEITOS GERAIS SOBRE EPILEPSIA | 3 |
| 1.2. EPILEPSIAS MIOCLÓNICAS PROGRESSIVAS..... | 5 |
| 1.3. DOENÇA DE UNVERRICHT-LUNDBORG OU EPM1 | 7 |
| 1.3.1 <i>Características clínicas</i> | 8 |
| 1.3.2 <i>Diagnóstico</i> | 9 |
| 1.3.3 <i>Fisiopatologia da EPM1</i> | 9 |
| 1.3.3.1 <i>Cistatinas</i> | 9 |
| 1.3.3.2 <i>Cistatina B</i> | 10 |
| 1.3.3.3 <i>Função biológica da CSTB</i> | 12 |
| 1.3.3.4 <i>Patogénese da EPM1</i> | 12 |
| 1.4. GENE CSTB | 14 |
| 1.4.1 <i>Mutações associadas à EPM1</i> | 15 |
| 1.4.1.2 <i>Expansão do dodecâmero (CCCCGCCCGCG)n</i> | 15 |
| 1.4.1.3 <i>Outras mutações associadas à EPM1</i> | 18 |
| 1.4.5 <i>EPM1B</i> | 19 |
| 1.5. CATEPSINAS | 20 |
| 1.6. TRATAMENTO DA EPM1 | 22 |
| 1.7. MODELO ANIMAL..... | 23 |
| 1.8. OBJECTIVO | 24 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 27 |
| 2.1. AMOSTRA ANALISADA | 27 |
| 2.2. MATERIAL BIOLÓGICO | 28 |
| 2.2.1 <i>Extracção de DNA genómico</i> | 28 |
| 2.2.2 <i>Estabelecimento de cultura e obtenção de pellet</i> | 28 |
| 2.2.3 <i>Extracção de RNA</i> | 29 |
| 2.2.4 <i>Síntese de cDNA</i> | 29 |
| 2.3. IMPLEMENTAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE EPM1 | 30 |
| 2.3.1 <i>Optimização das condições de amplificação da região 5' UTR que contem a expansão do dodecâmero</i> | 30 |
| 2.3.2 <i>Optimização das condições de amplificação dos exões, intrões e das junções exão-intrão do gene da CSTB</i> | 32 |
| 2.3.3 <i>Amplificação por PCR do cDNA da CSTB</i> | 33 |
| 2.4. ANÁLISE MUTACIONAL DO GENE CSTB | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4.1 Verificação dos produtos de PCR | 34 |
| 2.4.2. Purificação dos produtos de PCR | 35 |
| 2.4.2.1. Purificação do produto de PCR por método enzimático | 35 |
| 2.4.2.2. Purificação do produto de PCR por excisão da banda | 35 |
| 2.4.3. Reacção de sequenciação | 35 |
| 2.4.4. Purificação dos produtos de sequenciação | 35 |
| 2.4.5. Sequenciação dos fragmentos | 36 |
| 2.5. IMUNOFLUORESCÊNCIA | 36 |
| 2.5.1. Imunofluorescência indirecta | 36 |
| 2.5.2. Estudos com LysoTracker | 37 |
| 2.6. RASTREIO POPULACIONAL | 37 |
| 2.7. ANÁLISE BIOINFORMÁTICA | 37 |
| 2.8. INQUÉRITO | 38 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 41 |
| 3.1. IMPLEMENTAÇÃO DO ESTUDO MOLECULAR DA EPM1 | 41 |
| 3.1.1. Optimização das condições para detecção da expansão do dodecâmero (CCCCGCCCGC) | 41 |
| 3.1.2. Optimização das condições de amplificação para o gene da CSTB (gDNA e cDNA) | 44 |
| 3.2. ESTUDO DOS DOENTES COM SUSPEITA DE EPM1 | 44 |
| 3.2.1 Doente A - Identificação e caracterização da mutação c.66G>A (Q22Q) | 44 |
| 3.2.2 Análise do Doente B _ Estudo do gDNA | 48 |
| 3.3. RASTREIO POPULACIONAL | 49 |
| 3.4. MICROSCOPIA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA | 50 |
| 4. CONCLUSÃO | 55 |
| 5. PERSPECTIVAS FUTURAS | 59 |
| 6. BIBLIOGRAFIA | 63 |
| 7. ANEXOS | 64 |

1. Introdução

1. Introdução

1.1. Conceitos gerais sobre Epilepsia

A *International League Against Epilepsy (ILAE)* define, em 2005, a epilepsia como “distúrbio cerebral causado por predisposição persistente do cérebro a gerar crises epiléticas e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicossociais e sociais da condição, caracterizada pela ocorrência de pelo menos uma crise epilética” (Fisher *et al.*, 2005).

Epilepsia é um tipo de disfunção cerebral que se caracteriza clinicamente por alterações súbitas, “crises epiléticas”, que persistem ao longo da vida do doente. É considerada uma doença complexa, multifactorial, dependente de interações entre os factores epileptogénicos e as características genéticas do indivíduo.

As crises reflectem actividade eléctrica anormal, de início súbito, acometendo uma ou várias áreas do córtex cerebral e podem ser causadas por inúmeras patologias estruturais ou neuroquímicas, de causas genéticas ou decorrentes de lesões por traumatismos, infecções e distúrbios hemodinâmicos. Os síndromes epiléticos são definidos através de um conjunto de características baseadas numa avaliação global do doente. Em cerca de 40-50% das formas de epilepsia a causa é desconhecida (Figura 1.1) e são designadas por epilepsias idiopáticas (Ceru *et al.*, 2005).

As epilepsias constituem um grupo de doenças neurológicas comuns com prevalência de 1-3%, na população geral. Devido à sua alta prevalência, gravidade, morbilidade e impacto socioeconómico, são consideradas como um problema importante de saúde pública (Sundqvist *et al.*, 2002).

Estudos realizados em Portugal, estimaram a existência de cerca de 50000 doentes com epilepsia e a identificação de aproximadamente 50 novos doentes por ano (Lopes Lima, 2005).

O tratamento da epilepsia é, neste momento, apenas sintomático tendo como objectivo principal o controlo das crises. O uso de medicamentos antiepiléticos, em cerca de 30% dos casos, não possibilita um controlo completo das crises devido à ausência de resposta aos fármacos (Lopes Lima, 2005), podendo então recorrer-se a tratamentos alternativos como a intervenção cirúrgica, a estimulação do nervo vago ou a dieta cetogénica.

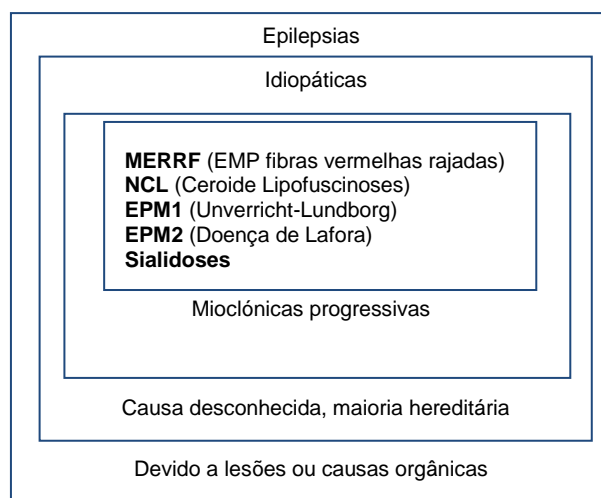


Figura 1.1 - Representação esquemática da subdivisão das epilepsias (adaptada de Ceru *et al.*, 2005).

Existe uma grande heterogeneidade genética nas epilepsias, uma vez que diferentes genes actuam no aparecimento das crises epilépticas. A identificação dos diferentes tipos de genes envolvidos permitirá o esclarecimento das vias moleculares associadas à hiperexcitabilidade neuronal e ao processo epileptogénico e conseqüentemente levará ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para esta doença crónica.

Nas epilepsias de causa genética a hiperexcitabilidade neuronal está associada a mutações em vários genes envolvidos na comunicação neuronal ou na produção de energia (Napolioni, 2009).

Vários síndromes foram considerados, pela ILAE (Engel, 2001), nos quais a epilepsia é um dos sintomas mais ou menos grave do quadro clínico, compreendendo outros sintomas neurológicos como ataxia, demência e atraso mental.

Um dos grupos de doenças considerado foi o de Epilepsia Mioclónica Progressiva (EMP) responsável por cerca de 1% de todos os casos de epilepsia.

Uma vez que entre as epilepsias mioclónicas progressivas, de origem genética definida, se encontram várias doenças de disfunção do lisossoma, a importância da ligação entre a alteração da função da proteína (e do gene), a disfunção organelar e o aparecimento de epilepsia suscita um interesse acrescido por parte de grupos dedicados ao estudo de doenças relacionadas com este organelo.

1.2. Epilepsias Mioclónicas Progressivas

As Epilepsias Mioclónicas Progressivas (EMPs) formam um grupo heterogêneo de doenças raras, geneticamente determinadas. Clinicamente são caracterizadas por mioclonias, crises generalizadas tónico-clónicas e declínio neurológico progressivo como ataxia e demência. A mioclonia consiste num estímulo sensitivo que pode ser parcial ou segmentar, arritmico ou assíncrono e muitas vezes é precipitado pela postura, acção, ou estímulos externos, como luz, som ou toque (Shahwan *et al.*, 2005).

As EMPs apresentam características diferentes tanto clínicas, etiológicas e patogénicas como também na sua progressão. As cinco formas de EMP mais representativas são (Tabela 1.1): Doença Unverricht-Lundborg (DUL) ou EPM1, Doença de Lafora (DL), Ceroide Lipofuscinoses (NCLs), Epilepsia Mioclónica com Fibras Vermelhas Rajadas (MERRF) e Sialidoses. Destas, apenas a MERRF não é autossómica recessiva e a DUL, as NCLs e as Sialidoses são doenças relacionadas com o lisossoma.

Uma das características que distingue a DUL (descrita em 1.3) é a ausência de corpos de inclusão, sendo esta a forma mais comum de EMP na população mundial.

A DL manifesta-se entre os 6 e os 18 anos e caracteriza-se por ter uma deterioração cognitiva muito rápida e severa, com uma sobrevida de 10 anos após os primeiros sintomas. Tem uma transmissão autossómica recessiva e é causada por mutações nos genes EPM2A (80% dos casos) ou EPM2B que codificam, respectivamente, a laforina e a malina. A laforina é importante para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência dos neurónios, dendrites e sinapses. Estes doentes apresentam inclusões de Lafora, que são compostos de poliglicanos, que se acumulam em diferentes tipos de células no cérebro, músculo estriado, fígado, coração, retina e pele (revisto em Ramachandran *et al.*, 2009).

As NCLs fazem parte de um grupo de doenças que se caracterizam pela acumulação anormal de lipopigmento nos lisossomas. Os doentes apresentam, entre outros sintomas, regressão do desenvolvimento neuropsicomotor com perda de visão e mioclonia progressivas. O estudo histológico permite identificar diferentes tipos de inclusões patológicas, conforme o tipo de tecido examinado e a forma clínica.

Epilepsia mioclónica com fibras vermelhas rajadas (MERRF), é uma encefalopatia mitocondrial causada por mutações no DNA mitocondrial no gene tRNALys (TRNK) e tRNAPhe (TRNF). Caracteriza-se clinicamente, para além da mioclonia, da epilepsia generalizada e de fibras rajadas no músculo, por ataxia, perda auditiva, demência, baixa estatura, atrofia óptica e miopatia. Os sintomas surgem habitualmente na infância,

podendo também aparecer na fase adulta e podendo variar dentro da mesma família (revisto em Shahwan *et al.*, 2005).

Tabela 1.1 - Principais formas de EMP (baseado em Kälviäinen *et al.*, 2008 e Shahwan *et al.*, 2005).

| Doença | Locus/ Cromossoma | Aparecimento dos Sintomas | Transmissão | Demência /Declínio Cognitivo | Características patológicas principais |
|--|---|------------------------------|--------------------------|------------------------------------|--|
| Unverricht- Lundborg | EPM1/21q22.3 | 6-16 anos | Autossómica recessiva | Progressão lenta ou ausente | Não se verifica |
| Doença de Lafora | EPM2/6q24 | 8-18 anos | Autossómica recessiva | Progressão rápida | Inclusões de “corpos de Lafora” |
| Ceroide Lipofuscinoses | TPP1/11p15 CLN2/11p/15.5 CLN3/16p12 CLN5/13q22 CLN6/15q21 | Variável | Autossómica recessiva | Progressão rápida | Depósitos de lipopigmentos no lisossoma |
| Epilepsia mioclónica com fibras vermelhas rajadas | MTTK/mRNA | Variável | Mitocondrial | Variável | Fibras vermelhas rajadas no músculo |
| Sialidoses | NEU1/6p21 | Variável | Autossómica recessiva | Ausente | Mancha vermelho- cereja no fundo do olho |

As Sialidoses são doenças lisossomais autossómicas recessivas que se caracterizam clinicamente pela presença de mancha vermelho-cereja no fundo do olho. Na Sialidose Tipo I, associada à deficiente actividade da alfa-N-acetilneuraminidase, os primeiros sintomas (mioclonias de acção, ataxia) podem aparecer no início da adolescência ou na fase adulta. Várias alterações do gene da neuraminidase (NEU1) foram descritas, verificando-se alguma heterogeneidade molecular, o que se reflecte na diversidade de fenótipos clínicos desta patologia (revisto em Shahwan *et al.*, 2005).

Para além das doenças referidas existem outras formas ainda mais raras que causam EMP, como por exemplo, a doença Gaucher tipo III (DG) e a Atrofia Dentato-Rubro-Palido-Luisiana (ADRPL) (Shahwan *et al.*, 2005).

A DG Tipo III, que se pode manifestar inicialmente como uma EMP, acompanhada de esplenomagalia e paralisia supranuclear, é provocada por alterações no gene da β -glucosidase. É uma doença lisossomal, neurodegenerativa e de transmissão autossómica recessiva.

Outro exemplo, é a ADRPL, igualmente uma doença neurodegenerativa. É mais frequente no Japão, sendo causada por uma expansão instável de tripletos (CAG) no gene da ADRPL. Manifesta-se por ataxia, epilepsia, mioclonia, demência, convulsões e deterioração intelectual progressiva e tem transmissão autossómica dominante (revisto em Shahwan *et al.*, 2005)

Embora o recurso ao diagnóstico diferencial seja frequente, os avanços tecnológicos na área da biologia molecular e celular, tornou possível a identificação das diferentes causas e, conseqüentemente, o diagnóstico definitivo das EMPs. Nos casos de Unverricht-Lundborg, MERRF, ADRPL e na maioria dos doentes com DL é actualmente possível o recurso ao diagnóstico molecular. O diagnóstico definitivo tem implicações significativas no tratamento e no aconselhamento genético destes doentes e famílias.

1.3. Doença de Unverricht-Lundborg ou EPM1

A forma mais comum de EMP é a doença de Unverricht-Lundborg (DUL), de transmissão autossómica recessiva. Foi descrita em 1891 por Unverricht e posteriormente por Lundborg, em 1903 (EPM1, OMIM#254800). A EPM1 foi inicialmente designada como epilepsia mioclónica Báltica. Na área do Mediterrâneo foi descrita uma patologia idêntica que, mais tarde, se comprovou ser a mesma doença (Virtaneva *et al.*, 1997).

A EPM1 é mais frequente na Finlândia onde a incidência é de 1:20.000 nados vivos (Norio & Koskiniemi, 1979). Estima-se que a prevalência da EPM1 seja também elevada no Mediterrâneo (Itália, França, Tunísia, Algéria e Marrocos) e na América do Norte embora se desconheça a prevalência exacta em cada uma destas regiões. Ao longo das últimas décadas, têm sido descritos casos esporádicos por todo o mundo, mas provavelmente os doentes com EPM1 continuam subestimados em muitos países (Haan, *et al.*, 2004; Kalviainen *et al.*, 2008).

Alterações no gene da *Cistatina B* (*CSTB*) parecem ser a causa primária da EPM1 (Pennachio *et al.*, 1996).

1.3.1 Características clínicas

O início dos sintomas ocorre inesperadamente entre os 6 e os 18 anos. Os sintomas iniciais podem ser abalos mioclónicos e/ou crises tónico-clónicas generalizadas.

Cerca de metade dos pacientes apresentam, como primeira manifestação, abalos mioclónicos provocados por estímulos externos como luz intermitente, barulho, exercício físico e stress (Norio & Koskiniemi, 1979). A mioclonia torna-se mais frequente e severa 5 a 10 anos após o início dos sintomas e cerca de um terço dos doentes ficam incapacitados (cadeira de rodas, incapazes de comer ou beber sem ajuda) (Kalviainen *et al.*, 2008).

As crises tónico-clónicas generalizadas são, também comuns, em cerca de metade dos doentes. As crises são raras no início da doença mas, normalmente, tornam-se comuns nos 3 a 7 anos após o início dos sintomas. Em geral, estas crises são proeminentes na adolescência e melhoram na idade adulta (Lehesjoki, 2002).

A nível neurológico, inicialmente os doentes com EPM1 não apresentam alterações evidentes mas, com a evolução da doença, manifestam ataxia, descoordenação, tremor de acção e disartria. Em geral, a inteligência destes doentes é normal durante muitos anos, notando-se um declínio lento e progressivo, sendo comum o aparecimento de depressão e de labilidade emocional (revisto em Kalviainen *et al.*, 2008).

Apesar das alterações serem consideradas inespecíficas, no caso dos doentes com EPM1, o electroencefalograma (EEG) é sempre caracterizado pela presença de padrões anormais, apresentando paroxismos de poliespículas e espícula onda lenta generalizados, simétricos e de alta voltagem e também uma resposta à fotossensibilidade (Koskiniemi, 1974). As características anormais parecem ser mais proeminentes durante a fase inicial da doença, estando associadas aos abalos mioclónicos e às crises tónico-clónicas generalizadas que tendem a diminuir ao longo da doença, reflectindo uma estabilização no EEG (Kalviainen *et al.*, 2008).

O fenótipo da EPM1 é mais heterogéneo do que inicialmente se supunha, existindo divergências quanto ao grau de gravidade do quadro clínico mesmo em indivíduos da mesma família. Parecem existir diversos factores, tanto de ordem exógena como de ordem endógena, com efeitos agravantes e portanto, influenciando a severidade da doença (Kalviainen *et al.*, 2008).

No passado, a esperança de vida destes doentes era curta, muitos indivíduos morriam após 8 a 15 anos do aparecimento dos primeiros sintomas, normalmente antes dos 30

anos. A heterogeneidade na evolução dos doentes com EPM1, considerada benigna para a maioria dos doentes, ainda está associada a um elevado risco de mortalidade, nomeadamente devido a morte súbita com epilepsia (SUDEP), que se verifica em cerca de 31% dos doentes estudados (Khiari *et al.*, 2009).

Hoje em dia, a sobrevivência de doentes com EPM1 consegue ser praticamente normal através do recurso a tratamentos farmacológicos, à reabilitação motora e ao apoio psicológico (Kalviainen *et al.*, 2008).

1.3.2. Diagnóstico

O diagnóstico da EPM1 é feito através da avaliação clínica do doente, que deve incluir a avaliação da marcha, da coordenação, da escrita, do desempenho escolar e do seu estado emocional. Adicionalmente deve ser realizado o EEG antes do início da terapia. A confirmação do diagnóstico é efectuada através da análise molecular do gene da cistatina B (Kalviainen *et al.*, 2008). O estudo do gene é um passo fundamental pois permite confirmar o diagnóstico, excluindo a hipótese de outro tipo de epilepsia, e permite também o aconselhamento genético e a indicação para a melhor abordagem terapêutica.

1.3.3. Fisiopatologia da EPM1

A EPM1 está associada à alteração do gene que codifica a cistatina B (CSTB). Este gene está localizado no cromossoma 21, banda q22.3 (Lehesjoki *et al.*, 1991,1993).

A perda de função do gene ou do seu produto, a Cistatina B, um inibidor intracelular reversível de proteases cisteínicas (Järvinen e Rinne, 1982; Ritonja *et al.*, 1985), está na origem do desenvolvimento desta patologia.

1.3.3.1 Cistatinas

Os inibidores das proteases cisteínicas foram agrupados numa superfamília denominada de cistatinas. Atendendo ao grau de homologia entre as proteínas e o número de domínios inibidores, foram consideradas três grandes famílias: cistatinas tipo 1 (estefinas), cistatinas tipo 2 e tipo 3 os quinínógenos (Barrett, 1986a). As famílias 1 e 2 são constituídas por proteínas de baixo peso molecular e só com um domínio inibidor, as primeiras não são glicosiladas e são fundamentalmente citoplasmáticas, enquanto que as segundas são maioritariamente não glicosiladas, mas contêm pontes dissulfureto e sequência de sinal. Os quinínógenos são proteínas mais complexas, apresentam três cadeias polipeptídicas, são glicosilados e apresentam pontes de enxofre.

O estudo da papaína e das catepsinas foi fundamental para a descoberta dos seus inibidores. Originalmente, foi atribuído o nome de cistatina a um inibidor de proteases cisteínicas do tipo papaína, isolado na clara de ovo. Tem sido usada, desde então, esta nomenclatura para as proteínas relacionadas com este inibidor (Barret, 1987).

As cistatinas fazem parte de um grupo grande de proteínas que têm como função a inibição das cisteína-proteases, incluindo as catepsinas. A actividade inibidora das cistatinas é vital para a regulação dos processos fisiológicos limitando a actividade extremamente destrutiva das proteases alvo. A quebra dos mecanismos biológicos do controlo da actividade das proteases resulta em diversos tipos de patologias, tais como, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, osteoporose, artrite e cancro (Turk *et al.*, 2008).

O fenómeno de permeabilização da membrana lisossomal, ou seja, o processo pelo qual as catepsinas são libertadas do lisossoma para o citosol, tem um papel importante na morte celular. Vários tipos de estímulos estão envolvidos na activação de morte celular (Figura 1.2), podendo existir, ou não, envolvimento mitocondrial (Johansson *et al.*, 2010).

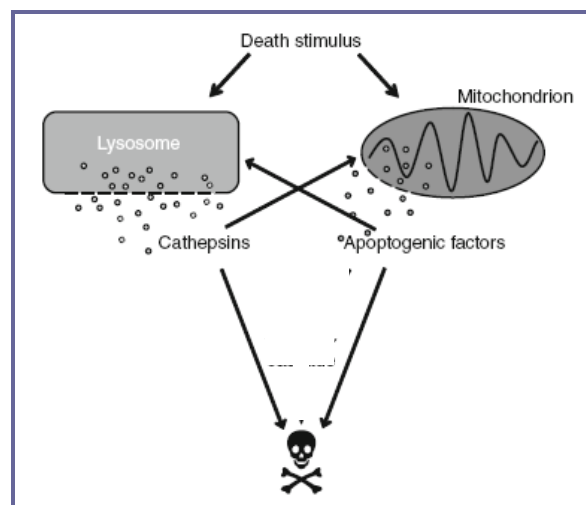


Figura 1.2 - Origem e consequências da libertação de catepsinas do lisossoma (modificada de Johansson *et al.*, 2010).

1.3.3.2. Cistatina B

A Cistatina B (CSTB) faz parte da família dos inibidores de proteases da cisteína do tipo 1, com aproximadamente 12KDa. A sua estrutura secundária consiste numa estrutura composta por uma hélice-alfa envolta por cinco folhas-beta.

Face à estrutura 3D determinada, em 1990, por Stubbs e seus colaboradores, foi demonstrada a existência de três elementos estruturais e importantes de interacção com

catepsinas: uma glicina na posição N-terminal, o primeiro *hairpin loop* QVVAG, sequência altamente conservada no meio do polipeptídeo e o segundo *hairpin loop* com menor contribuição na interação (Leu-Pro). A sequência C-terminal da cistatina B confere uma região adicional de ligação hidrofóbica. A prolina 74 é um aminoácido altamente conservado e particularmente importante para os fenômenos de dimerização e tetramerização, e pensa-se que esta envolvido nos processos de amiloidogênese (Jenko Kokalj *et al.*, 2007).

A descrição de estruturas 3D (Figura 1.3) permite a modulação de alterações a nível de aminoácidos e facilita a previsão do seu impacto em termos funcionais.

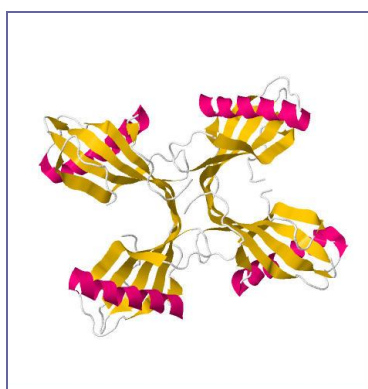


Figura 1.3 - Representação esquemática da estrutura tetramérica da cistatina B, a laranja estão representadas as hélices alfa e a rosa as folhas beta. Imagem retirada de Protein Data Base, (10.2210/pdb2oct/pdb) onde se pode ver o tetramero resultante do processo de interação de transformação de estruturas diméricas de cistatina B.

A CSTB é uma proteína intracelular e encontra-se largamente distribuída pelos diferentes tipos de células e tecidos. Descrita, inicialmente, como uma proteína citoplasmática com aparente concentração membranar (Calkins *et al.*, 1998), posteriormente foi referida como tendo localização nuclear nas células em proliferação e nuclear e citoplasmática no caso das células em diferenciação (Riccio *et al.*, 2001). Estudos mais recentes (Alakurtti *et al.*, 2005) referem uma localização da CSTB no núcleo, no lisossoma e/ou citosol, estando esta localização dependente da fase de diferenciação da célula.

A presença da CSTB no núcleo sugere que a sua função está para além da sua actividade no processo proteolítico. Cada vez mais são evidenciadas múltiplas funções adicionais da CSTB, nomeadamente, no envolvimento em processos inflamatórios, no cancro e na imunidade e também estão presentes nas placas amilóides de Alzheimer, Parkinson e encefalopatias (Cipollini *et al.*, 2008).

O envolvimento da catepsina B no cancro tem sido amplamente estudado. O desequilíbrio entre catepsinas e cistatinas parece estar envolvido no processo de

metastização e a CSTB pode ser utilizada com um novo biomarcador (Feldman *et al.*, 2009).

1.3.3.3. Função biológica da CSTB

Apesar de, *in vitro*, a função da CSTB se encontrar bem caracterizada, a sua função fisiológica ainda não se encontra completamente esclarecida. Vários estudos demonstraram que, *in vitro*, a CSTB se liga fortemente às catepsinas B, H, L e S (Joensuu *et al.*, 2008). Estas têm a principal função de degradação não selectiva de proteínas intracelulares e também estão envolvidas em processos antigénicos e na apoptose (Rinne *et al.*, 2002). Foi também demonstrado que CSTB inibe a catepsina K nos osteoclastos (Laitala-Leinonen *et al.*, 2005). Nos doentes com EPM1 a CSTB está diminuída, e a actividade das catepsinas B, L e S aumentada (Rinne *et al.*, 2002), sugerindo a regulação *in vivo* das catepsinas pela CSTB (Joensuu *et al.*, 2008).

A interacção com estas proteases, que escapam do lisossoma, é fundamental e a perturbação deste mecanismo inibidor estará na base da EPM1. Alakurtti e seus colaboradores demonstraram que a CSTB tem uma importante função fisiológica de associação com o lisossoma, podendo a perda desta associação resultar da alteração do local de ligação com as catepsinas (Alakurtti *et al.*, 2005).

A CSTB participa na formação de um complexo multiproteico com função cerebelar específica, participando provavelmente no crescimento e diferenciação celular. Estas proteínas estão envolvidas em funções do citoesqueleto e algumas delas são expressas exclusivamente nos neurónios. Este estudo sugere uma correlação entre a disfunção deste complexo proteico e a patogénese da EPM1 (Di Giaimo *et al.*, 2002).

1.3.3.4. Patogénese da EPM1

Vários estudos têm sido realizados com o objectivo de esclarecer quais os mecanismos envolvidos na patogénese da EPM1, isto é, tentar saber como o défice da CSTB resulta em EPM1 (ver também ponto 1.6).

Em 2007, Franceschetti e seus colaboradores, recorrendo a estudos imunohistoquímicos em cérebros de ratinhos *knockout*, sugeriram que a CSTB actua como um protector fisiológico. A perda da sua actividade provoca neurodegeneração, tornando os neurónios mais susceptíveis, originando convulsões prolongadas, que levam à morte celular contribuindo para a progressão da doença. A deficiência da CSTB aumenta a

susceptibilidade para as convulsões tónico - clónico generalizadas e, conseqüentemente, leva à morte celular (Franceschetti *et al.*, 2007).

A regulação da expressão e da dimerização da CSTB foram consideradas como factores críticos para as células e a sua desregulação poderá induzir a degeneração neuronal (Zerovnik, 2008). Foi demonstrado, através de estudos proteicos, que algumas das mutações da CSTB levam à formação de agregados e conseqüentemente à formação de fibrilas amilóides, podendo a formação destes agregados contribuir também, para a patogénese da EPM1 (Rabzelj *et al.*, 2005, Ceru *et al.*, 2005, Cipollini *et al.*, 2008). A agregação proteica parece ocorrer na EPM1, como acontece com outras doenças neurodegenerativas como, por exemplo, Alzheimer ou Parkinson, o que leva a propor que estratégias terapêuticas semelhantes possam ser consideradas nestas patologias (Zerovnik, 2008).

Estudos recentes, utilizando cérebro de rato, demonstraram que o desequilíbrio da homeostase redox é o mecanismo pelo qual a deficiência da CSTB promove a degeneração neuronal (Figura 1.4). O stress oxidativo pode contribuir para EPM1 induzindo hiperexcitabilidade dos neurónios, por deficiência de CSTB. Este trabalho reforça a possibilidade interessante de que as proteases lisossomais e as oxiredutases derivadas da mitocôndria convergem para um mecanismo comum de controlo da homeostase redox e da sobrevivência neuronal (Lehtinen *et al.*, 2009).

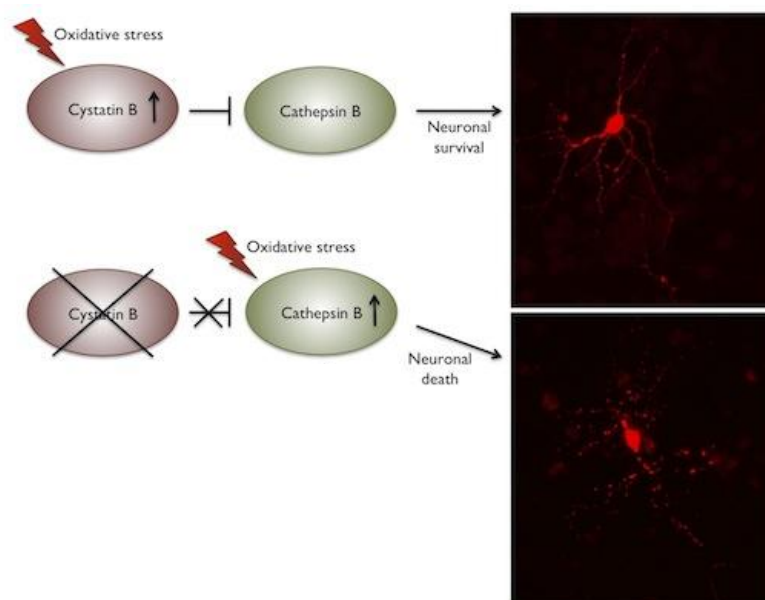


Figura 1.4 - O stress oxidativo induz a CSTB protegendo os neurónios da morte cerebral, por inibição da actividade da catepsina B. Em contraste, nos neurónios com deficiência em CSTB, o stress oxidativo leva ao aumento da actividade da catepsina B, ao dano oxidativo e à morte neuronal (baseado em Lehtinen *et al.*, 2009).

Diferentes linhas de investigação têm sido desenvolvidas e apesar de comprovada a alteração de CSTB na EPM1, a ligação funcional ao aparecimento da epilepsia permanece por esclarecer. A investigação nesta área continua a ser essencial para a melhor compreensão dos mecanismos patológicos desta doença.

1.4. Gene *CSTB*

O gene *CSTB* (*CSTB*; 601145) codifica uma proteína de 98 (Figura 1.5 B) aminoácidos que se estende ao longo de 11KDa e se localiza no cromossoma 21 no locus 21q22.3. O *CSTB* é expresso ubiquitariamente com um transcrito de aproximadamente 0.8kb. É composto por três exões (1- 66pb; 2 -102pb; 3 -129pb) e dois potenciais locais de início de transcrição localizados a 67 e 78 nucleótidos abaixo da sequência de repetição polimórfica (5'-CCCCGCCCGCG-3') (Figura 1.5 - A). A sequência 3' não codificante (UTR) é aproximadamente de 250pb e os intrões 1422pb e 326pb (revisto em Joensuu *et al.*, 2008). O promotor caracteriza-se por uma sequência típica de "housekeeping", rico em conteúdo GC (75%), um elevado nível de dinucleótidos CpG e vários locais de ligação Sp1 CCGCCC (Alakurtti *et al.*, 2000).

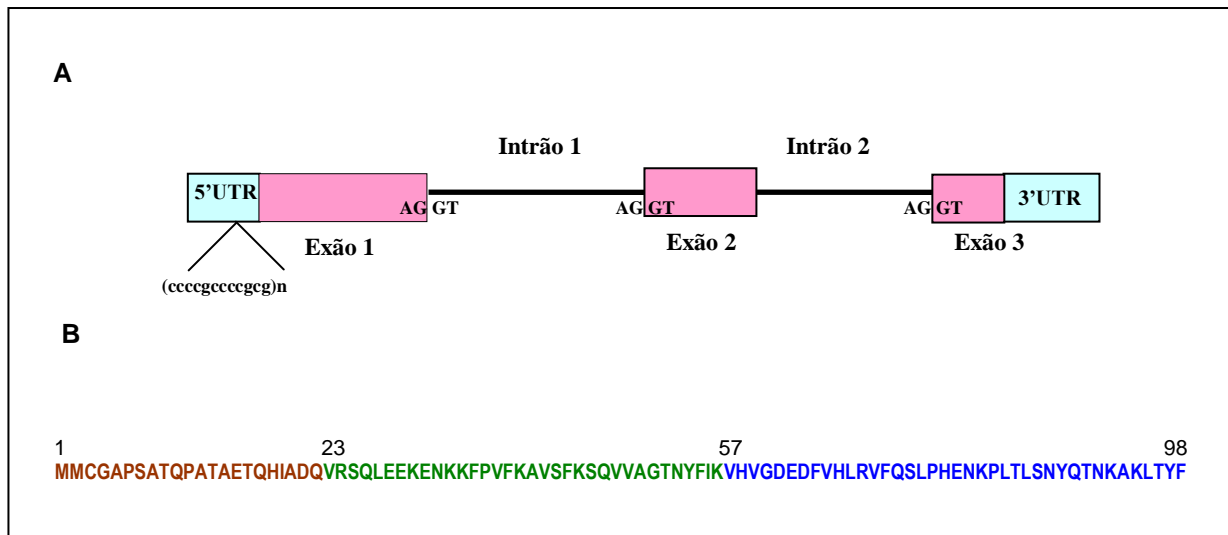


Figura 1.5 - (A) Esquema da estrutura do gene *CSTB* (baseado em Joensuu *et al.*, 2008) e **(B)** da sequência da proteína *CSTB*.

1.4.1. Mutações associadas à EPM1

Cerca de 12 mutações foram descritas como causais de EPM1 (Tabela 1.2).

A perda geral da função da proteína da CSTB, devido à sua expressão reduzida, parece ser a consequência patológica primária na maioria das mutações da EPM1 (Joensuu *et al.*, 2008).

Tabela 1.2 - Mutações descritas no gene *CSTB* (revisado em Joensuu *et al.*, 2008 e Erdinç *et al.*, 2010).

| Mutação | Localização | Tipo de Mutação | Alteração da proteína | População |
|---|-------------|-----------------|---------------------------|------------------------------|
| Expansão do dodecâmero (CCCCGCCCGCG) | 5'UTR | Expansão | Redução da expressão CSTB | Geral |
| c.10G>C | Exão 1 | <i>Missense</i> | p.G4R | Marrocos |
| c.67-1G>C | Intrão 1 | <i>Splicing</i> | p.delV23_K56 | Geral |
| c.149G>A | Exão 2 | <i>Missense</i> | p.G50E | Finlândia |
| c.168G>A | Exão 2 | <i>Splicing</i> | <i>Splicing</i> aberrante | Japão |
| c.125C>A | Exão 2 | <i>Nonsense</i> | p.S42X | Turquia |
| c.121G>A | | <i>Missense</i> | p.V41M | |
| c.168+1_18 del | Intrão 2 | Delecção | p.delV23_k56 p.V57EfsX28 | Itália |
| c.169-2A>G | Intrão 2 | <i>Splicing</i> | <i>Splicing</i> aberrante | França |
| c.202C>T | Exão 3 | <i>Nonsense</i> | p.R68X | Finlândia, Suécia e Alemanha |
| c.212A>C | Exão 3 | <i>Missense</i> | p.Q71P | Alemanha |
| c.218_219delTC | Exão 3 | Delecção | p.L73fsX3 | França e América |

1.4.1.2. Expansão do dodecâmero (CCCCGCCCGCG)_n

Na maioria dos doentes a patologia está associada à expansão do dodecâmero (CCCCGCCCGCG), estando presente em cerca de 90% dos alelos conhecidos. Esta alteração está localizada na porção 5' não transcrita do gene (Figura 1.6), a 175pb do codão de iniciação (Joensuu *et al.*, 2008).

Esta expansão instável de pelo menos 30 cópias do dodecâmero polimórfico normal (2-3 cópias) é detectada na maioria dos doentes em homozigotia, apresentando penetrância completa quando em número superior a 30. Até ao momento, apenas um doente EPM1 apresentou homozigotia para uma mutação pontual, p.G4R (Lalioi *et al.*, 1997).

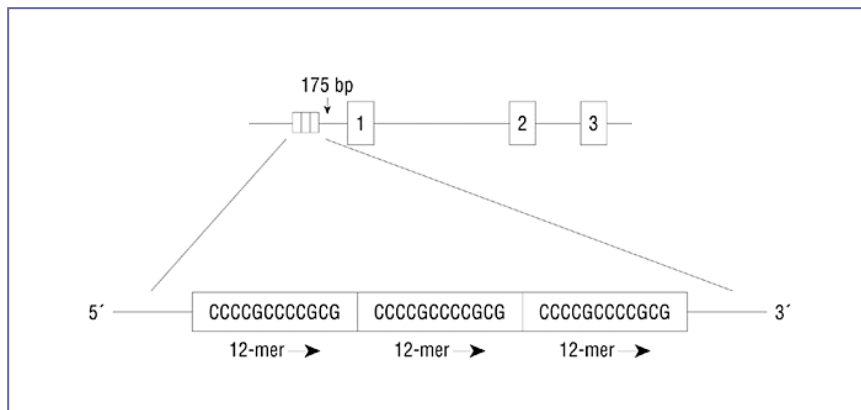


Figura 1.6 - Representação do gene da *CSTB* e da região do promotor com a localização e sequência da repetição polimórfica do dodecâmero (3) (modificado de Nokelainen *et al.*, 2000).

A expansão do dodecâmero altera o gene *CSTB* reduzindo a expressão do mRNA, quando em homozigotia verifica-se a redução da expressão para valores inferiores a 10% (Joensuu *et al.*, 2007) e, conseqüentemente, a actividade inibidora da proteína *CSTB* diminui (Rinne *et al.*, 2002). Lalioi e seus colaboradores demonstraram que esta redução se devia essencialmente à alteração do espaçamento introduzido pela expansão (Figura 1.7) entre os elementos do promotor, impossibilitando a ligação entre o factor de transcrição e a região do promotor (Lalioi *et al.*, 1999).

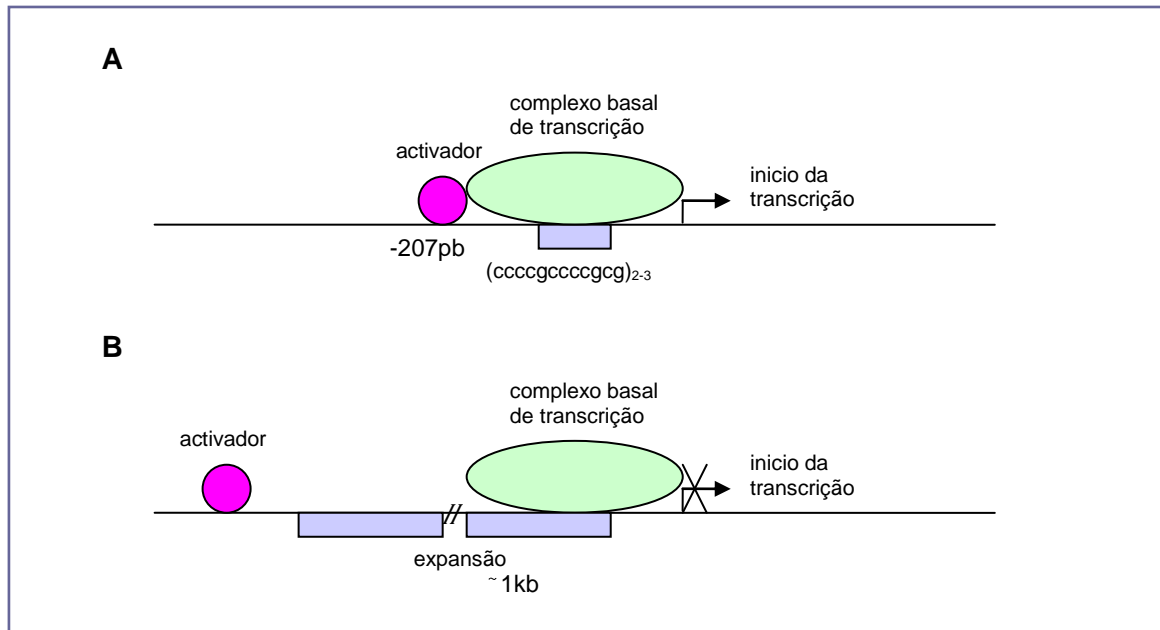


Figura 1.7 - Representação simplificada do modelo de repressão do gene da CSTB causado pela expansão. O dodecâmero está representado pelas caixas roxas. (A) Interação do ativador com todo o complexo de transcrição associado a 2-3 repetições do dodecâmero. (B) Incapacidade do ativador interagir com o complexo de transcrição devido à expansão do dodecâmero, que altera a distância do local de interação (adaptado de Laloti *et al.*, 1999).

Uma outra explicação para a redução da expressão resultante da expansão é a formação de estruturas tetraplexas (Saha e Usdin, 2001), possivelmente, afectando a transcrição e/ou a tradução.

O número de repetições da expansão nos doentes EPM1 pode variar entre 30-125 cópias, o que resulta numa inserção de 360 a 1500pb, não havendo correlação do número de repetições com a severidade ou com a idade de aparecimento dos sintomas (Virtaneva *et al.*, 1997; Laloti *et al.*, 1998). As diferentes manifestações clínicas verificadas na mesma família devem-se, provavelmente, a factores ambientais e/ou outros genes envolvidos (Laloti *et al.*, 1998).

No entanto, a expansão do dodecâmero apresenta instabilidade durante a transmissão e uma elevada variação mutacional (Larson *et al.*, 1999). Ainda não se encontra esclarecido o impacto das pré-mutações, tendo sido descrita uma pré-mutação com 12 a 17 dodecâmeros numa família venezuelana com doença de Huntington (Laloti *et al.*, 1997).

Devido à natureza da expansão do dodecâmero e à formação de estruturas secundárias complexas, a sua análise é extremamente difícil, o que pode dificultar a detecção de pequenas instabilidades no dodecâmero.

O método de detecção mais utilizado tem por base a análise de DNA por Southern blot, no entanto, este método não permite distinguir pequenas variações no tamanho da expansão (Laloti *et al.*, 1997). Todos os outros métodos desenvolvidos são baseados na amplificação por PCR: PCR seguido de hibridização com sondas que contêm a repetição, contudo, para distinguir os heterozigóticos, é necessário a realização de um PCR radioactivo (Laloti, *et al.*, 1998); PCR fluorescente analisado utilizando um sequenciador automático (Larson *et al.*, 1999); PCR com amostras de DNA deaminado (Horiuchi *et al.*, 2005); mais recentemente foi descrito um outro método de PCR com condições específicas para detecção da expansão (Joensuu *et al.*, 2007). Este último método pela aparente simplicidade, não recorrendo à utilização de fluorescência, radioactividade ou tratamentos adicionais, foi escolhido para adaptação/optimização neste trabalho.

1.4.1.3. Outras mutações associadas à EPM1

As restantes mutações associadas à EPM1 representam menos de 10% dos alelos e incluem: três mutações *missense*, p.G4R (c.10G>C), p.G50E (c.149G>A) e p.Q71P (c.212A>C); três de *splicing*, c.67-1G>C, c.168G>A e c.169-2A>G; uma *nonsense* p.R68X (c.202C>T) e duas deleções c.218_219delTC e c.168+1_18 del, (Tabela 1.2). Com excepção da p.G4R, que foi descrita em homozigotia, todas outras mutações foram encontradas em heterozigotia composta com a expansão.

A alteração p.G4R (c.10G<C) resulta na substituição do aminoácido de glicina altamente conservado na posição 4 na parte N-terminal da proteína, alterando um local de interacção importante com as catepsinas (Laloti *et al.*, 1997).

A alteração de *splicing* c.67-1G>C (p.delV23_K56) resulta no *skipping* do exão 2 com consequente deleção de 34 aminoácidos (Bespalova *et al.*, 1997). Esta é a mais frequente das mutações encontradas, para além da expansão e está presente em diferentes populações (Lehesjoki e Koskiniemi, 1999).

A mutação *missense* p.G50E (149G>A), encontrada num doente Finlandês, afecta o local QVVAG, sequência altamente conservada, importante ponto de interacção com as catepsinas, impedindo a correcta associação lisossoma-CSTB (Joensuu *et al.*, 2007).

Detectada num doente Japonês, a alteração c.168G>A, não altera o aminoácido mas afecta a sequência do local de *splicing*, prevendo-se alteração do *splicing* embora não tenha sido confirmada esta hipótese (Kagitani-Shimono *et al.*, 2002).

A alteração, c.169-2A>G, provavelmente resulta num *splicing* anormal e foi encontrada num doente Francês (Laloti *et al.*, 1997).

A deleção de 18pb no intrão 2 (c.168+1_18 del) afecta o *splicing* e foi detectada num doente Italiano (Joensuu *et al.*, 2007).

A alteração *nonsense*, c.202C>T, dá origem a um codão stop prematuro e, consequentemente, a uma proteína truncada, p.R68X, e foi detectada em diferentes populações (Haan *et al.*, 2004).

Foi identificada a mutação *missense* p.Q71P (c.212A>C) num doente Alemão (Hann *et al.*, 2004), e como se pode ver na Figura 1.6 a sua proximidade do segundo *hairpin loop*, envolvido na ligação com as proteases (Stubbs *et al.*, 1990) altera a afinidade entre a CSTB e as catepsinas (Alakurtti *et al.*, 2005).

A mutação c.218_219delTC causa uma deleção de TC numa repetição dinucleotídica AATCTCTCCC. Esta alteração, p.L73fsX3, origina uma proteína truncada de apenas 74 aminoácidos, com menos 24 aminoácidos do que a normal, e foi detectada em dois doentes um Francês e outro Americano (Lalioi *et al.*, 1997).

Recentemente, na Turquia, foram identificadas duas alterações novas, a *nonsense* p.Ser42X (c.125C>A) e a alteração *missense* p.Val41Met (c.121G>A), em heterozigotia composta com a expansão. Esta mutação composta origina o *skipping* do exão 2, com deleção de 34 aminoácidos na proteína CSTB (Erdinç *et al.*, 2010).

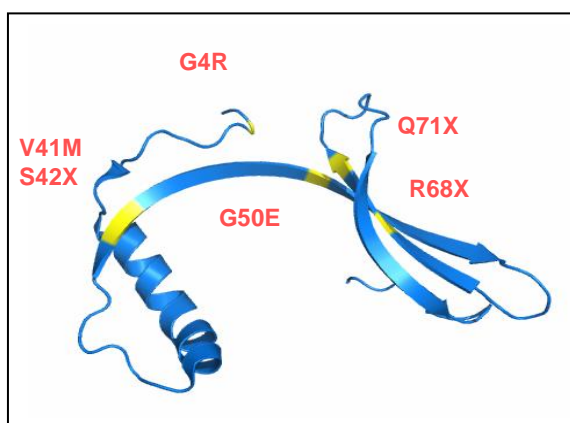


Figura 1.8 - Estrutura 3D da proteína CSTB (PDB 2 OCT). A marcação a amarelo indica a localização do aminoácido alterado de algumas mutações descritas (Tabela 1.2).

1.4.5. EPM1B

Existem vários casos descritos de doentes que apresentam um fenótipo idêntico a EPM1 mas não manifestam alterações do gene da cistatina B.

Num estudo realizado em 2005, verificou-se ausência de mutações no gene *CSTB* em doentes com um fenótipo idêntico a EPM1. A caracterização desta família Árabe permitiu a identificação de um novo *locus* associado a DUL, localizado numa região de 15-Mb no cromossoma 12p11-q13 (Berkovic *et al.*, 2005). Posteriormente foi identificada a mutação R104Q no gene *PRICKLE1* (MIM 608500) nesta e em mais duas famílias (Bassuk *et al.*, 2008). O fenótipo desta forma é muito idêntico à EPM1, variando na idade média de aparecimento dos sintomas, 7.3 anos para EPM1B e 11 anos para EPM1 (Berkovic *et al.*, 2005).

1.5. Catepsinas

Os lisossomas são organelos celulares que estão presentes nas células nucleadas e que têm como função a digestão intracelular de macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e lípidos) sendo esta função assegurada por mais de 70 enzimas hidrolíticas que incluem proteases, nucleases, glicosidasas, lipases, fosfatases e sulfatases. Estas hidrolases são solúveis ou membranares e são activas a pH ácido. Estes organelos (Figura 1.9) caracterizam-se também por estarem delimitados por uma membrana lipoproteica (Vellodi, 2004).

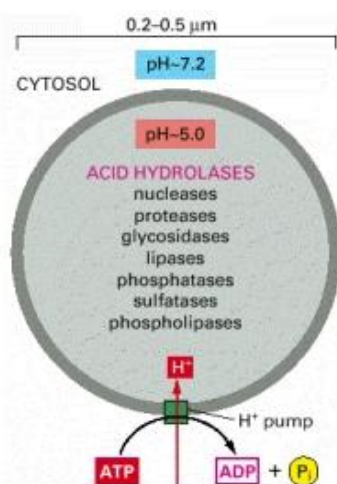


Figura 1.9 - Organização do lisossoma (adaptado de Alberts *et al.*, 2001).

Das hidrolases lisossomais, as proteases são as que se encontram melhor caracterizadas. Distinguem-se em relação à sua estrutura e ao substrato e incluem as proteases cisteínas (catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, V, W e X) e as proteases

aspárticas (catepsinas D e E). A actividade anormal das catepsinas é controlada pelas cistatinas, seus inibidores proteicos endógenos (revisto Guha *et al.*, 2008).

Como se verifica na Tabela 1.3, a distribuição das catepsinas B, C, D, F, H, L, O e X é ubiquitária, enquanto a catepsina K está presente maioritariamente nos osteoclastos, a catepsina S nos macrófagos, monócitos, células dendríticas e células da microglia, a V presente no timo, testículos e córnea e a W nos linfócitos T (revisto Guha *et al.*, 2008).

As catepsinas lisossomais têm funções específicas e individuais que são importantes para o normal funcionamento do organismo. Várias patologias foram já associadas à actividade anormal destas enzimas, tais como artrite reumatóide, osteoporose, cancro, doenças lisossomais de sobrecarga e doenças neurológicas (Turk *et al.*, 2001). As catepsinas B, L e D têm também um papel importante na regulação do processo de apoptose (Chwieralski *et al.*, 2006).

Tabela 1.3 - Resumo das catepsinas melhor caracterizadas (baseado em Guha *et al.*, 2008)

| Catepsina | Distribuição | Função | Patologias associadas |
|-------------|---|--|--|
| Catepsina B | Ubiquitária | Turnover proteico Manutenção do metabolismo celular Maturação e integridade do SNC Apoptose | Doença cardíaca Osteoartrite Cancro |
| Catepsina H | Ubiquitária | Actua como neuropeptidase no cérebro | Artrite juvenil idiopática Tumor da próstata Cancro pulmão |
| Catepsina L | Ubiquitária | Turnover proteico Maturação e integridade do SNC Fagocitose Processos antigénicos Regulação do ciclo do cabelo Homeostase da epiderme Apoptose | Doenças inflamatórias da pele Diabetes autoimune |
| Catepsina D | Ubiquitária | Processos antigénicos e hormonais Remodelação tecidual Apoptose | Necrose Tromboembolias Linfopenia |
| Catepsina S | Macrófagos, Monócitos Células dendríticas Células da microglia | Processos antigénicos | Aterosclerose Doenças auto imunes |
| Catepsina K | Osteoclastos Condroblastos | Reabsorção do tecido ósseo | Aterosclerose Osteoartrite Osteoporose Artrite reumatóide Picnodisostose |

1.6. Tratamento da EPM1

O tratamento da EPM1 passa pela necessidade de evitar factores que possam desencadear as crises, pela utilização da medicação adequada à sintomatologia e compreende também um suporte psicossocial para uma melhor integração destes doentes na sociedade.

Os factores desencadeantes como a privação do sono, o uso exagerado de álcool e/ou café, os estímulos luminosos intensos nos indivíduos fotossensíveis e o stress físico, devem ser evitados, sendo esta a parte fundamental da terapêutica. No entanto, na maioria dos doentes, estas medidas não são suficientes para um controlo completo ou satisfatório das crises.

Não há ainda nenhum tratamento específico para EPM1. A terapia farmacológica é apenas sintomática, havendo, no entanto, melhorias significativas na maioria dos doentes.

O Valproato de Sódio é tido como o medicamento de primeira escolha no tratamento de pacientes com EPM1 pela sua acção na diminuição das crises mioclónicas e da frequência das crises tónico-clónicas generalizadas (Shahwan *et al.*, 2005). Existem vários fármacos de utilização corrente no controlo das mioclonias e/ou das crises tónico-clónicas que são usados nestes doentes, como Clonazepam, usado em associação com o Valproato de Sódio, o Piracetam, o Levetiracetam, o Topiramato e o Zonizamide (Kalviainen *et al.*, 2008). O Levetiracetam, quando administrado no início da doença, demonstrou ser mais eficaz no controlo das mioclonias (Shahwan *et al.*, 2005).

A Fenitoina deve ser evitada por agravar os sintomas neurológicos e a degeneração cerebelar, assim como, os bloqueadores dos canais de sódio, em geral, e as drogas GABAérgicas porque podem agravar as crises mioclónicas (Kalviainen *et al.*, 2008).

Outros tipos de terapia têm sido descritos como complementares aos já referidos. A estimulação do nervo vago que reduz as crises e melhora a função cerebelar (Smith *et al.*, 2000). O tratamento com o antioxidante, N-acetilcisteína, foi experimentado, e embora com resultados variáveis, melhorou significativamente as crises, os tremores e a fala (Edwards *et al.*, 2002).

Para os doentes com EPM1 é importante o acompanhamento clínico e o apoio psicossocial, incluindo a avaliação do tratamento com os fármacos e uma adequada reabilitação social (Kalviainen *et al.*, 2008).

1.7. Modelo animal

Diversos estudos foram realizados no sentido de estudar a fisiopatologia da doença EPM1, usando para isso modelos animais.

O primeiro ratinho *knockout* para a EPM1 foi produzido, em 1998, por Pennachio e seus colaboradores, através da introdução de alterações no gene *CSTB* (Pennachio, *et al.*, 1998). O modelo foi produzido tendo em conta dois backgrounds genéticos, um isogénico 129SV e uma mistura C57BL16/129SV. O ratinho *knockout* desenvolveu sintomatologia idêntica aos humanos e, de uma maneira geral, trata-se de um bom modelo de EPM1. Foi demonstrado nesse trabalho que as características genéticas têm um impacto importante no aparecimento dos sintomas e na severidade do fenótipo (Pennachio *et al.*, 1998).

Várias experiências têm sido efectuadas em ratinhos, permitindo concluir que: a *CSTB* tem uma função endógena neuroprotectora (D' Amato *et al.*, 2000); a *CSTB* tem um papel importante na manutenção da arquitectura neuronal normal (Shannon *et al.*, 2002); provavelmente, a catepsina B é um dos intervenientes no fenótipo apoptótico como consequência da deficiência da *CSTB* (Houseweart *et al.*, 2003) e uma perda parcial da função da *CSTB*, nos ratinhos heterozigóticos origina um fenótipo suave da EPM1 (Kaasik *et al.*, 2007), demonstrando que a atrofia neuronal é uma importante consequência da perda de função da *CSTB* (Shannon *et al.*, 2002).

Estes e outros trabalhos contribuem, com a ajuda dos modelos animais, para o esclarecimento dos mecanismos moleculares e fisiopatogénicos da EPM1.

1.8. Objectivo

Este trabalho teve como objectivo principal a implementação do estudo molecular da doença de Unverricht-Lundborg (EPM1) em Portugal.

Os objectivos específicos foram:

1. Implementação de técnicas para o diagnóstico molecular desta patologia.
2. Análise do genótipo e caracterização molecular de doentes com suspeita de EPM1.
3. Caracterização da/s mutação/es encontrada/s e contribuição para a compreensão do perfil mutacional de doentes com EPM1.

2. Material e Métodos

2. Material e Métodos

Este trabalho compreendeu numa fase inicial a implementação do diagnóstico molecular da EPM1, com a optimização das condições de PCR para gDNA e cDNA e numa segunda fase a análise de dois casos com suspeita de EPM1.

2.1. Amostra analisada

Para a optimização das condições de amplificação do gene da *CSTB* foi usado um controlo normal. No caso da expansão do dodecâmero para além do controlo normal (3/3 repetições) foram utilizados controlos positivos, um homozigótico (60/63 repetições) e um heterozigótico (2/61 repetições) para esta alteração, cedidos por Tarja Joensuu e Anna-Elina Lehesjoki do Neuroscience Center da Universidade de Helsínquia, Finlândia.

O presente trabalho incidiu sobre o estudo de uma família com um doente que apresentava forte suspeita clínica de Unverricht-Lundborg e um segundo doente com Epilepsia Mioclónica Progressiva (EMP) com suspeita clínica de Doença de Gaucher Tipo III (Tabela 2.1).

O Doente A tem 26 anos, é do sexo masculino e manifestou o início dos sintomas aos 13 anos, não apresenta deterioração cognitiva e completou a sua formação no ensino superior. Neste momento, encontra-se já com alguma incapacidade motora necessitando de cadeira de rodas. O estudo familiar foi realizado com a confirmação dos resultados nos pais. Não há indicação de consanguinidade nesta família e desconhece-se história familiar relevante. A família é oriunda da zona Norte.

O Doente B tem 17 anos de idade e é também do sexo masculino, apresenta EMP e foi referido para estudo por suspeita de Doença de Gaucher. Após estudo bioquímico negativo para esta patologia procedeu-se ao estudo molecular da EPM1.

Tabela 2.1 - Características clínicas dos doentes estudados com EMP.

| Doente | Idade anos | Suspeita clínica | Idade de aparecimento dos sintomas | Sintomatologia |
|----------|------------|-------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| A | 26 | Doença de Unverricht-Lundborg | 13 | EMP, sem deterioração cognitiva |
| B | 17 | Doença de Gaucher | Sem informação | EMP |

Para o rastreio populacional foram utilizadas amostras de DNA anónimas, provenientes de 150 indivíduos controlo da população normal.

2.2. Material biológico

A declaração de consentimento informado foi obtida pelos médicos que referenciaram os doentes.

Para a realização da análise molecular foi utilizado inicialmente sangue total colhido com o anticoagulante heparina de lítio e, posteriormente, apenas para o doente A, foi obtida biopsia de pele, para cultura de fibroblastos.

2.2.1. Extracção de DNA genómico

A extracção de DNA genómico (gDNA) foi realizada a partir do sangue total, por extracção automática no aparelho *Bio Robot EZ1* (Quiagen), utilizando um Kit comercial específico de extracção *EZ1 DNA Blood* (Quiagen) e seguindo o protocolo indicado pelo fabricante.

A determinação da concentração (ng/µl) e da pureza do DNA total foi determinada por quantificação no espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop ND-1000.

2.2.2. Estabelecimento de cultura e obtenção de pellet celular de fibroblastos

A biopsia de pele foi colocada numa placa de Petri pequena com 1 ml de meio completo enriquecido com SVF (*MEM, Dullbecco's, Gibco*), suplementado com 20% de soro vitelo fetal (*SVF, Lonza*) e antibióticos (10000 U/ml de estreptomicina e penicilina, *Gibco*; 125 mg/ml de kanamicina, *Biological Industries* e 1250 µg/ml de fungizona, *Gibco*), e de seguida foi cortada em vários fragmentos com bisturi estéril e pinça. Foram divididos e colocados em duas caixas de 50 ml, com a derme colada à parede da caixa. Adicionou-se 1 ml de meio completo enriquecido com SVF (20%) de forma a não descolar a pele. De seguida foram colocadas na estufa de incubação a 37°C em atmosfera humidificada com 5% de CO₂ e após 48 horas foram observadas ao microscópio. Adicionou-se 1 ml de meio completo enriquecido com SVF (20%) e o meio de cultura foi renovado, 2 vezes por semana, com a quantidade de 5ml, até obter uma cultura confluenta. Após crescimento dos fibroblastos as células foram tripsinizadas, com cerca de 1ml de tripsina durante 3-5 minutos a 37°C, para outra caixa de 50 ml, a reacção foi parada com 2 ml de meio completo enriquecido com SVF (5%).

As células foram mantidas em cultura em meio completo com SVF (10%), numa estufa a e em atmosfera humidificada com 5% de CO₂. O meio de cultura foi renovado de quatro em quatro dias e sempre que necessário procedeu-se à expansão da cultura por tripsinização.

As células foram lavadas com PBS 1x (137 mM cloreto de sódio, 1,1 mM dihidrogenofosfato de sódio, 6,4 mM monohidrogenofosfato de potássio, 2,7mM cloreto de potássio, pH 7,4), tripsinizadas com 2 ml de tripsina (Gibco) durante 3 minutos a 37 °C e de seguida centrifugadas 1083xg durante 10 minutos (Centrífuga *Megafuge 1.0R*, *Heraeus Instruments*). Após uma segunda lavagem, o pellet de células foi ressuspendido em 1 ml de PBS 1x, centrifugado a 8400xg durante 10 minutos (Centrífuga refrigerada 5417R, *Eppendorf*) e congelado a -20 °C ou processado de imediato.

2.2.3. Extração de RNA

O RNA foi obtido a partir de um *pellet* de fibroblastos e foi utilizado o *kit High Pure RNA Isolation (Roche)*, aplicando o protocolo fornecido pelo fabricante.

A determinação da concentração (ng/μl) e da pureza do RNA obtido foi realizado por quantificação no espectrofotómetro UV-Vis *NanoDrop ND-1000*.

2.2.4. Síntese de cDNA

A partir do RNA total foi sintetizada a cadeia complementar do mRNA utilizando *Kit First-Strand cDNA Synthesis (Amersham Biosciences)*. Procedeu-se à destruição das estruturas secundárias do RNA, colocando 20 μl de RNA a 65°C durante 10 minutos num termobloco. De seguida, adicionou-se a mistura de reacção, que contem *bulk first-strand reaction mix*, *primer Not I-(dT)₁₈* diluído (1/25) e uma solução de DTT e foi a incubar, durante 1 hora, num banho a 37°C, por fim efectuou-se nova incubação a 95°C durante 10 minutos para inactivação da enzima. Após a análise do cDNA a amostra guardou-se a -20°C.

2.3. Implementação do diagnóstico molecular de EPM1

2.3.1. Otimização das condições de amplificação da região 5' UTR que contem a expansão do dodecâmero

A amplificação da região do promotor para pesquisa da expansão do dodecâmero (CCCCGCCCCGCG) foi inicialmente testada segundo as condições descritas em Joensuu *et al.*, 2007 e na Tabela 2.2 e posteriormente, testada com as condições da Tabela 2.3

Tabela 2.2 - Descrição dos primers e condições para amplificação da expansão do dodecâmero (Joensuu *et al.*, 2007).

| Região | Sequência do primer (5'>3') | Fragmento (pb) | Ta (°C) |
|--------|---|--------------------|---------|
| 5' UTR | 2F CCCGGAAAAGACGATACCAG * 1R GAGGAGGCACTTTGGCTTC * | 193 193+ (≥360) | 57 |

pb - pares de bases; F - *Forward*; R - *Reverse*; Ta - temperatura de *annealing*;

Para além da *Expand Long Template PCR System (Roche Applied Science)*, usada no referido artigo, foram testadas outras Misturas de PCR, disponíveis no laboratório nomeadamente, *ImmoMIX (Bioline)*, *Diamond (Bioline)*, *FailSafe PCR PreMix Selection Kit (Epicentre)* e *GC_Rich PCR System (Roche Applied Science)* (Tabela 2.3). Com excepção da *ImmoMix*, que foi usada por ser uma enzima de alto rendimento e de elevada especificidade, todas estas misturas de PCR são indicadas para amplificação de sequências ricas em GC e sequências repetitivas. Adicionalmente, foram usados com algumas das misturas de PCR testadas, aditivos que permitem diminuir estruturas secundárias e aumentar o rendimento do PCR, como a Betaína (Sigma) (Tabela 2.3 - **B**) e DMSO (Sigma) (Tabela 2.3 - **B e F**).

Nas experiências efectuadas para a amplificação da expansão, constituída exclusivamente por GC, foram testadas as condições indicadas na Tabela 2.3, seguindo as indicações dos fabricantes com pequenas adaptações.

Tabela 2.3 - Condições testadas na otimização da amplificação da expansão do dodecâmero do gene *CSTB*.

| Misturas de PCR testados | Ta (°C) | Programa de amplificação | Componentes da reacção [Final] | Experiência |
|---|--|--|---|-------------|
| Expand Long Template PCR System (Roche Applied Science) | 52 e 57 | 94°C 2 min 94°C 10 seg 57°C 45 seg } 40x 68°C 8 min 68°C 7 min | H2O p/ volume final 20 µl, 10XTampão (1/2/3), 1x BSA, 5mM dNTPs, 1M Betaina, 5%DMSO, 20ng DNA, 0.5µM Primers (F+R), 0.12U Enzima Expand Long | A |
| Immomix (Bioline) | 55 e 57 | 94°C 2 min 94°C 10 seg ta°C 45 seg } 40x 68°C 8 min 68°C 7 mi | H2O p/ volume final 25 µl, 0.5M Betaina, 5%DMSO, 0.2µM Primers (F+R), 20ng DNA, 2x Immomix | B |
| | 57 | 97°C 5 min 94°C 45 seg ta°C 45 seg } 40x 72°C 90 seg 72°C 7 min | Mesmas condições de B mas sem aditivos | C |
| Diamond (Bioline) | 57 | 96°C 5 min 95°C 45 seg ta°C 45 seg } 38x 72°C 3 min 72°C 7 min | H2O p/ volume final 25 µl, 0.2µM Primers (F+R), 20ng DNA, 2x Diamond | D |
| FailSafe PCR PreMix Selection Kit (Epicentre) | 52 | 98°C 90 seg 95°C 45 seg ta°C 45 seg } 40x 72°C 1 min 72°C 7 min | H2O p/ volume final 50 µl, FailSafe PCR 2X PreMix (K/L), 0.2µM Primers (F+R), 20ng DNA, 1.25U FailSafe Enzyme Mix | E |
| | | | H2O p/ volume final 50 µl, FailSafe PCR 2X PreMix (L), 0.2µM Primers (F+R), 10%DMSO, 20ng DNA, 1.25U FailSafe Enzyme Mix | F |
| GC_Rich PCR System (Roche Applied Science) | **62→57 (-1°C por c/ ciclo) " 57 | 95°C 3 min 95°C 1 min ta°C** 1 min } 6x 72°C 1 min 95°C 1 min ta°C" 1 min } 34x 72°C 1 min # # + 5 seg por c/ ciclo 72°C 7 min | H2O p/ volume final 25 µl, 5XTampão GC-Rich, 200µM dNTPs, 20ng DNA, 0.2µM Primers (F+R), 2M GC-Rich Solution 1U Enzima GC-Rich | G |

Os programas utilizados para a amplificação tiveram como base o que foi descrito (Joensuu et al., 2007) e também as recomendações dos fabricantes, com exceção, do programa utilizado na experiência G (Tabela 2.3), no qual foi aplicado um programa de *PCR Touchdown*, que consiste na diminuição da temperatura de *annealing* em cada ciclo. Os termocicladores utilizados para a execução destas experiências foram o *T Gradient* (Biometra), *T Pernoal* (Biometra) e *Uno II* (Biometra).

Os fragmentos amplificados foram visualizados conforme descrito em 2.4.1.

2.3.2. Otimização das condições de amplificação dos exões, intrões e das junções exão-intrão do gene da *CSTB*

A análise dos fragmentos do gDNA inclui também, como já foi referido, as regiões exónicas, intrónicas e as junções exão-intrão (Figura 2.1). Os primers usados para amplificação das diferentes regiões do gene *CSTB* estão descritos na Tabela 2.4.

Foi utilizada para todas as reacções de amplificação a mistura comercial *ImmoMix Red 2x* (Bioline). Esta mistura contém DNA polimerase *Immolase™*, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, *Tween 20*, MgCl_2 , dNTPs e tampão Tris-HCL. A 12.5 μl desta mistura adicionou-se 1 μl de cada primer (*Forward* e *Reverse*) a uma concentração de 10pmol/ μl , 1 μl de gDNA (50ng/ μl) e 9 μl de água para um volume final de 25 μl .

Tabela 2.4 - Descrição dos primers usados para amplificação do gDNA do gene *CSTB*.

| Região | Sequência dos primers (5'>3') | Fragmento (pb) | Ta (°C) |
|--------------------------|--|----------------|---------|
| 5' UTR | 1F AAACGCAAATTCACCAGAG * 1R GAGGAGGCACTTTGGCTTC * | 568 | 62 |
| Exão 1 | 2F CCCGAAAGACGATACCAG * 2R CGGCTTCTTCGCTCCAG * | 457 | 62 |
| Parte do exão1+Int 1 | 3F GCCGAGACCCAGCACATC * 3R CCTGTGGACCTTTTATGCAG * | 675 | 62 |
| Intrão 1+ parte do exão2 | 4F GCAAGAGGTCCCCAGTGATA * 4R TGACACGGCCTTAAACACAG * | 925 | 62 |
| Exão 2 | 2s AGGGAATCCAAGAAGCCACT 6R AAGCCTCTGATCCCAAGTCA* | 457 | 62 |
| Exão 3 | 7F ATTGTCTTCAGCTGGCTGCTAAT * 7R AAGATCACCTATTGGGAAGGAAAGA * | 421 | 62 |

pb - pares de bases; s - *sense*; F - *Forward*; R - *Reverse*; Ta - temperatura de *annealing*, * - primers descritos em Joensuu et al., 2007

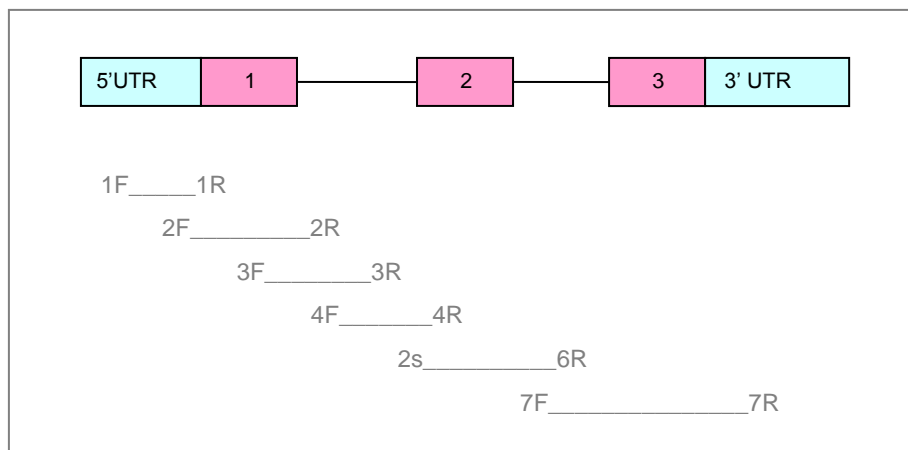


Figura 2.1. Esquema do gene da CSTB e dos fragmentos utilizados para amplificação do gene.

O programa usado consistiu numa desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos à temperatura de *annealing* específica de cada fragmento (ver Tabela 2.4) e 45 segundos a 72°C e uma extensão final de 5 minutos a 72°C, no termociclador *TPersonal* (*Biometra*).

2.3.3. Amplificação por PCR do cDNA da *CSTB*

Para o estudo do cDNA da *CSTB* foram usadas as condições de amplificação dos fragmentos descritos na Tabela 2.5. (Figura 2.2)

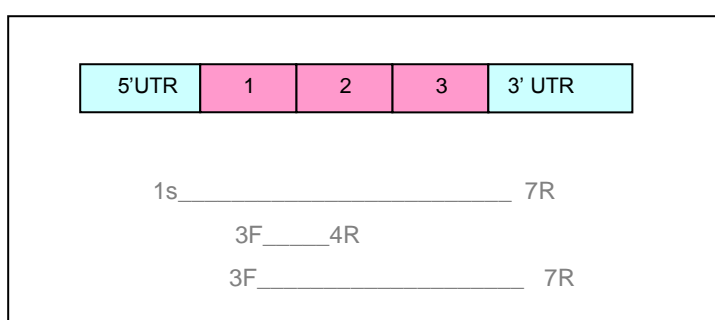
Foi utilizada para a reacção de amplificação a mistura comercial *ImmoMix Red 2x* (*Bioline*), esta mistura contém DNA polimerase *Immolase*[™], (NH₄)₂SO₄, *Tween 20*, MgCl₂, dNTPs e tampão Tris-HCL. A 12.5 µl desta mistura adicionou-se 1 µl de cada primer (*Forward* e *Reverse*) a uma concentração de 10pmol/µl, 2µl de cDNA e 8 µl de água para um volume final de 25 µl. O programa de amplificação usado consistiu numa desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 60°C e 45 segundos a 72°C, e uma extensão final de 5 minutos a 72°C, no termociclador *TPersonal* (*Biometra*).

Para além do controlo negativo (branco do ensaio), foi também usado um cDNA de um indivíduo saudável, como controlo normal.

Tabela 2.5 - Descrição dos primers para amplificação do cDNA do gene *CSTB*.

| Região | Sequência dos primers (5'>3') | Fragmento (pb) | Ta (°C) |
|------------------------------------|---|----------------|---------|
| Exões 1, 2 e 3 Total | 1s AGCGCCTACTTGGGCTGA 7R AAGATCACCTATTGGGAAGGAAAGA * | 577 | 62 |
| Parte do exão 1 e 2 | 3F GCCGAGACCCAGCACATC * 4R TGACACGGCCTTAAACACAG * | 87 | 62 |
| Parte do exão 1, exão 2 e exão3 | 3F GCCGAGACCCAGCACATC * 7R AAGATCACCTATTGGGAAGGAAAGA * | 462 | 62 |

pb - pares de bases; s - *sense*; F - *Forward*; R - *Reverse*; Ta - temperatura de *annealing*
* - primers descritos em Joensuu *et al.*, 2007.

**Figura 2.2** - Esquema do cDNA da *CSTB* e dos fragmentos possíveis para a sua amplificação.

2.4. Análise mutacional do gene *CSTB*

O estudo do gene da *CSTB* iniciou-se com a análise do gDNA através da amplificação de regiões exónicas, regiões intrónicas flangeadoras e regiões 5' e 3' UTR, para os doentes A e B. Posteriormente foi feita a análise do cDNA para o Doente A. Foram utilizados primers previamente descritos (Joensuu *et al.*, 2007) e alguns primers específicos (Tabelas 2.4 e 2.5).

2.4.1 Verificação dos produtos de PCR

A validação dos fragmentos de PCR amplificados foi efectuada por electroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TAE 1X (*Invitrogen*), onde se aplicou 4µl de produto amplificado e se comparou com um marcador de peso molecular de 100pb (*Fermentas*). A visualização destes fragmentos foi feita através de um transiluminador de luz ultra-violeta.

2.4.2. Purificação dos produtos de PCR

2.4.2.1. Purificação do produto de PCR por método enzimático

Os produtos de PCR obtidos foram purificados através de um método enzimático usando o *Kit ExoSap-IT®*, de forma a eliminar os primers e nucleótidos não incorporados. O procedimento consiste em adicionar 2 µl de *ExoSap-IT®* a cada 5 µl de produto de PCR, e incubar a 37°C durante 15 minutos, seguida de uma incubação de 15 minutos a 80°C para inactivação das enzimas.

2.4.2.2. Purificação do produto de PCR por excisão da banda

Após verificação da amplificação do cDNA, como descrito em 2.4.1., onde se aplicou a totalidade do produto amplificado, cada banda obtida foi excisada com um bisturi e transferida para um tubo eppendorf. De seguida procedeu-se à sua purificação com o *Kit Perfectprep Gel Cleanup (Eppendorff)* seguindo as instruções do fabricante.

2.4.3. Reacção de sequenciação

Para a preparação da reacção de sequenciação automática utilizou-se uma mistura comercial *BigDye® Terminator Cycle Sequencing kit2.0 (ABI PRISM, PE Applied Biosystems)*, que contem MgCL₂, dNTPs, ddNTPs marcados com 4 fluorocromos distintos, tampão e uma *AmpliTaQ DNA Polimerase*. A 2µl desta mistura adicionou-se 0.65 µl de primer (F ou R) a 1.6 pmol/µl, 2 µl de produto de PCR purificado e água para um volume final de 10 µl.

A amplificação foi efectuada com o programa que inclui uma desnaturação inicial de 3 minutos a 96°C, seguido de 25 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C e 4 minuto a 60°C, no termociclador *TPersonal (Biometra)*.

2.4.4. Purificação dos produtos de sequenciação

Os produtos obtidos após PCR de sequenciação foram purificados em colunas com resina *Sephadex 7% (GE Healthcare)* de forma a eliminar os dNTPs e ddNTPs não incorporados e também sais que pudessem interferir com a electroforese capilar. O procedimento inicia-se com uma centrifugação de 3520xg durante 4 minutos (Centrifuga

Biofuge Pico, Heraeus) para retirar o excesso de água da resina, de seguida adiciona-se a amostra à resina e centrifuga-se novamente a 3520xg durante 4 minutos (Centrifuga *Biofuge Pico, Heraeus*). Deixa-se secar durante 15 minutos a 80°C e ressuspende-se com 20 µl de *Hi-Di Formamida Desionizada (Applied Biosystems)* por agitação no vortex e dissolução completa à temperatura ambiente durante 10 minutos.

2.4.5. Sequenciação dos fragmentos

A análise dos fragmentos foi realizada por electroforese capilar no sequenciador automático *ABI PRIS3130xl (Applied Biosystems)* e os resultados foram analisados no programa *Chromas*.

2.5. Imunofluorescência

2.5.1. Imunofluorescência indirecta

As células foram cultivadas em lamelas de vidro (Roth) colocadas em caixas de petri de 8,8 cm² (Nunc) e após atingirem 80% de confluência foram lavadas três vezes durante 2 minutos com PBS 1x. A fixação das células foi efectuada com metanol durante 5 minutos a -20 °C seguida de três lavagens com PBS 1x (três vezes durante 2 minutos). As células foram bloqueadas com PBS 1x/ 1% BSA/ 0,01% Triton X-100 durante 30 minutos à temperatura ambiente. De seguida, procedeu-se à incubação com o anticorpo primário (Monoclonal Anti-Lamp1, IgG1 de ratinho, Santa Cruz *Biotechnology, Inc*) diluído na solução de bloqueamento (1:200), durante a noite a 4 °C e posteriormente procedeu-se à incubação com o anticorpo secundário (*Anti-mouse-FITC*, IgG de galinha, Santa Cruz *Biotechnology, Inc*) diluído na solução de bloqueamento (1:200) durante 2 horas à temperatura ambiente. As células foram lavadas com PBS 1x (três vezes durante 2 minutos). As lâminas foram montadas com meio de montagem *Antifade Slow Fade (Invitrogen)*.

As lâminas foram observadas no microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse E400), usando os filtros adequados para os fluoróforos do anticorpo secundário usado. As imagens das células foram captadas com a objectiva de 100x utilizando a câmara *Nikon Colpix 950*. As imagens foram processadas recorrendo ao programa bioinformático *ImageJ* (versão 1.38).

2.5.2. Estudos com *LysoTracker*

As células foram cultivadas em lamelas de vidro (Roth) colocadas em caixas de petri de 8,8 cm² (Nunc) com meio completo e após atingirem 80% de confluência foram lavadas com meio completo. Posteriormente foram incubadas com 60nM de *LysoTracker BlueDND-22* em meio completo durante 2 horas a temperatura ambiente. Após lavagem com meio completo as células foram montadas sobre uma lâmina de vidro côncava (Roth). As lâminas foram observadas no microscópio de fluorescência (*Nikon Eclipse E400*). As imagens das células foram captadas com a objectiva de 100x utilizando a câmara *Nikon Colpix 950*. As imagens foram processadas recorrendo ao programa bioinformático *ImageJ* (versão 1.38).

2.6. Rastreio populacional

A alteração detectada no doente em estudo, foi uma mutação silenciosa e ainda não descrita e, como tal, foi efectuado um rastreio populacional em 150 indivíduos controlo para esclarecer se era, ou não, uma variação polimórfica. O fragmento usado para o rastreio populacional foi o 2F/2R (Tabela 2.4) que engloba parte da sequência 5'UTR que contem o dodecâmero, o exão 1 e parte do intrão 1. Com a amplificação deste fragmento, também, foi possível analisar o número de repetições do dodecâmero (CCCCGCCCGCG) nestes controlos.

As condições de PCR (Tabela 2.4), a verificação da amplificação e a purificação dos produtos PCR foram efectuados conforme já descrito nos pontos 2.4.1 e 2.4.2.1, respectivamente.

O PCR de sequenciação e a purificação dos produtos de sequenciação foram elaborados como descritos em 2.4.3. e 2.4.4., a análise foi elaborada apenas no sentido reverse (2R) de forma a evitar possíveis artefactos resultantes de eventuais heterozigotias do dodecâmero existente nessa região.

2.7. Análise Bioinformática

Os primers foram desenhados com a ajuda do programa *NCBI Primer-Blast*, recurso informático que permite desenhar e confirmar a qualidade dos primers em relação à sua

especificidade e compatibilidade. A análise das sequências foi feita através do programa *Chromas*.

A consulta da sequência de referência do gene *CSTB* (ENSG00000160213) e a pesquisa de SNPs foi efectuada na base de dados *Ensembl Genome Browser*.

Para fazer a previsão de *splicing* foi usado o programa informático *Splice Site Prediction by Neural Network at BDGP* (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

2.8. Inquérito

No sentido de divulgar a possibilidade da realização do estudo molecular da EPM1 e de se tentar fazer a caracterização da população portuguesa foi elaborado um inquérito (Anexo1). Pretende-se saber quais os doentes já diagnosticados, clinicamente e molecularmente, compilar as mutações já identificadas e analisar casos com suspeita clínica de EPM1.

O envio deste inquérito será feito para os principais centros de estudo de Epilepsia em Portugal, para que nos sejam enviadas as amostras e/ou os dados de doentes ou casos com suspeita de EPM1.

3. Resultados e Discussão

3. Resultados e Discussão

Foram otimizadas as condições para análise do gene da *CSTB*, gDNA e cDNA, com exceção da análise da expansão do dodecâmero.

A análise do Doente A com suspeita de EPM1 permitiu identificar uma nova mutação de *splicing* (c.66G>A), no exão 1, e confirmar a homozigotia com a realização do estudo dos pais.

No Doente B com epilepsia mioclónica progressiva não foi detectada nenhuma alteração causal, podendo-se concluir que esta epilepsia não é relacionada com a cistatina B.

3.1. Implementação do estudo molecular da EPM1

3.1.1. Optimização das condições para detecção da expansão do dodecâmero (CCCCGCCCGC)

A sequência da expansão do dodecâmero é constituída exclusivamente por guanina (G) e citosina (C), o que dificulta a sua análise através da técnica de PCR devido à formação de estruturas secundárias complexas que tornam as condições de PCR muito específicas e exigentes. Dos protocolos já existentes para amplificar sequências ricas em GC, como os descritos para X-Frágil, por exemplo, nenhum foi possível adaptar para a expansão do dodecâmero da EPM1 (Laloti *et al.*, 1998).

Para todas as experiências realizadas foram usados um controlo normal (3/3 -193pb) e um controlo homozigótico para a expansão e nalgumas experiências foi usado também um controlo heterozigótico. O controlo homozigótico apresenta 60/63 repetições e o controlo heterozigótico apresenta 2/61 repetições o que corresponde, respectivamente, a fragmentos com tamanhos de 877/912 pb e 181/889 pb.

Na análise da expansão começamos por usar as condições experimentais descritas por Joensuu *et al.*, 2007 (Tabela 2.2) com algumas modificações (Tabela 2.3 - A). Um dos constituintes da mistura de reacção GC-melt Mix (Clontech) foi substituído por Betaína e foram experimentados os três tampões do kit, pois no artigo não vinha especificado qual o utilizado. Várias experiências foram elaboradas mas não foi possível a reprodução dos resultados com as condições descritas, isto é, nenhum fragmento foi amplificado incluindo o do alelo normal (Figura 3.1- A).

Das várias experiências realizadas com estas condições, os resultados obtidos foram sempre semelhantes, ou seja, na técnica descrita nenhum dos fragmentos amplificou, o

que pode significar que o aditivo usado *GC-melt Mix* (*Clontech*) poderá ser essencial para amplificação deste PCR com estas condições, ou também ser um factor crítico o termociclador usado.

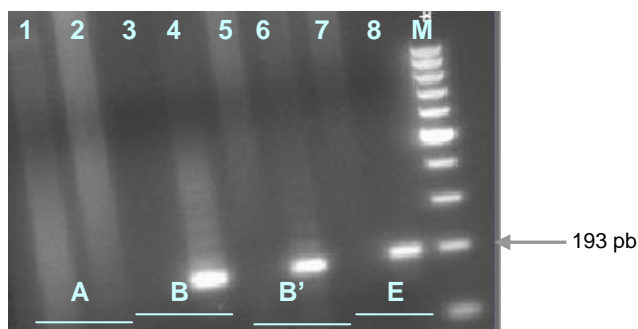


Figura 3.1 - Resultado da amplificação da expansão com as condições descritas na Tabela 2.3 - **A, B** (55°C), **B'** (57°C) e **E**; 1, 3, 5 e 7 – controlo homocigótico para a expansão; 2, 4, 6 e 8 - controlo normal; M - marcador de peso molecular 100pb.

Com as condições descritas em **B** e **E** da Tabela 2.3, apenas a banda correspondente ao alelo normal amplificou (Figura 3.1- B). Nos resultados obtidos não se notam diferenças significativas, nem em relação às diferentes experiências (B e E) nem à variação de temperatura de *annealing*, de 55 e 57°C, na experiência B. Verificando-se, no entanto, menor especificidade para o fragmento correspondente ao alelo normal com as condições da experiência B.

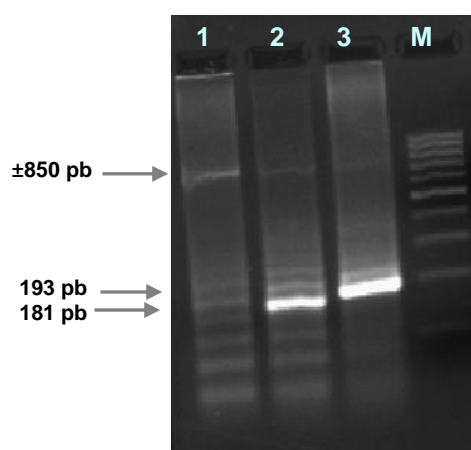


Figura 3.2 - Resultado da amplificação da expansão com as condições descritas na Tabela 2.3 - **C**; 1 – controlo homocigótico para a expansão; 2 - controlo heterocigótico para a expansão; 3 - controlo normal; M - marcador de peso molecular 100pb.

Com a experiência **C** (Figura 3.2), obteve-se a amplificação de uma banda de alto peso molecular, no entanto este não é o resultado esperado, pois no caso 1 previa-se a amplificação de duas bandas 877/912 pb e no caso 2, uma banda de 889 pb e outra de 181pb. Com estas condições apenas amplifica o alelo normal e não é possível a distinção dos casos homozigóticos para a expansão.

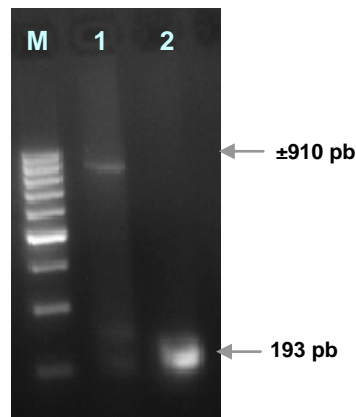


Figura 3.3 - Resultado da amplificação da expansão com as condições descritas na Tabela 2.3 - **D**; M - marcador de peso molecular 100pb; 1 - controlo homozigótico para a expansão; 2 - controlo normal

Com as condições descritas na Tabela 2.3 - **D**, obteve-se o resultado visualizado na Figura 3.3. Amplificou um fragmento de cerca de 910 pb provavelmente um dos fragmentos de interesse, mas apenas um foi amplificado, como tal não é possível a distinção entre o diferente número de repetições nos homozigóticos.

De todas as experiências realizadas em nenhuma se obteve o resultado esperado. Parte das experiências teriam que ter sido realizadas variando em paralelo várias condições do PCR, como por exemplo, para a mesma temperatura de *annealing* fazer diferentes concentrações tanto dos aditivos, como também variando a concentração de MgCl₂. Seria, igualmente, desejável experimentar programas de PCR descritos recentemente como sendo mais indicados para sequências ricas em GC, como por exemplo o *Slowdown PCR* que se baseia no uso de diferentes temperaturas de *annealing* (Frey *et al.*, 2009). Uma outra possibilidade é o desenho de novos primers para amplificar este fragmento ou a utilização técnicas alternativas ao PCR.

O principal factor limitante das experiências foi a quantidade de amostra. As amostras de gDNA cedidas pelo laboratório finlandês foram insuficientes, para a realização de todas

as experiências que seriam necessárias de forma a testar variações adicionais nas condições experimentadas.

A otimização das condições de amplificação da expansão do dodecâmero não foi possível devido à dificuldade inerente ao tipo de sequência a amplificar, muito repetitiva e com um alto teor de GC, cerca de 75%, mas também pela quantidade insuficiente da amostra que tínhamos disponível. Outras experiências terão que ser realizadas no sentido de implementar a metodologia necessária para a análise desta alteração.

3.1.2. Otimização das condições de amplificação para o gene da CSTB (gDNA e cDNA)

Com as condições de amplificação dos exões, intrões e das junções exão-intrão, descritas na Tabela 2.4 no Capítulo 2, foi possível a otimização da amplificação do gDNA da CSTB.

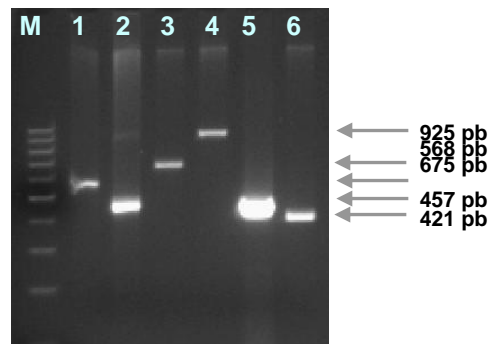


Figura 3.4 - Fragmentos amplificados para a análise do gDNA do gene da CSTB (exões, intrões e junções exão-intrão); 1 - 6 corresponde aos fragmentos amplificados; M - marcador de peso molecular 100pb.

Com as condições descritas no ponto 2.7.3 foi possível a otimização da amplificação do cDNA.

3.2. Estudo dos doentes com suspeita de EPM1

3.2.1 Doente A - Identificação e caracterização da mutação c.66G>A (Q22Q)

No Doente A foi identificada a alteração c.66G>A (Q22Q) em homozigotia sendo posteriormente confirmada a segregação familiar através do estudo dos pais.

A utilização dos métodos de análise do gene da CSTB descritos previamente (Capítulo 2) permitiu a identificação da mutação c.66G>A (Figura - 3.5). Esta alteração localiza-se no último nucleótido do exão 1, na junção exão-intrão. Esta mutação pontual não causa alteração do aminoácido glutamina na posição 22 mas perturba um local de *splicing* (AG/gt). A análise deste fragmento (2F/2R) permitiu também identificar o número de repetições do dodecâmero para esta família. O doente e a mãe são ambos homocigóticos para a forma com 3 repetições do dodecâmero (3/3) e o pai é composto heterocigótico com 3 repetições num alelo e 2 no outro (3/2).

Nesta família foram ainda detectados, no intrão 1, três SNPs já descritos: c.67-479 t>g (rs 13046612), c.67-471 t>g (rs 13046607) e c.67-456 t>g (rs 35006428). O doente apresenta homocigotia (t/t) e a mãe e o pai heterocigotia para estas alterações.

A mutação identificada c.66G>A está, portanto, associada à sequência polimórfica de 3 repetições do dodecâmero e à variante t dos SNPs descritos anteriormente.

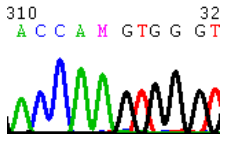
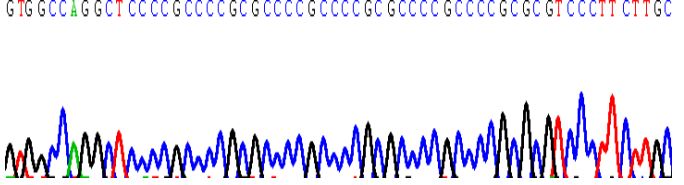
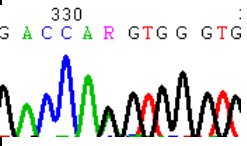
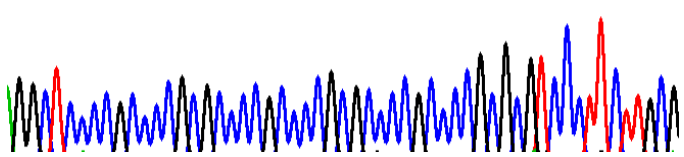
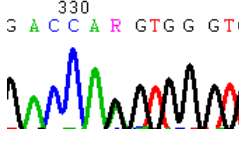
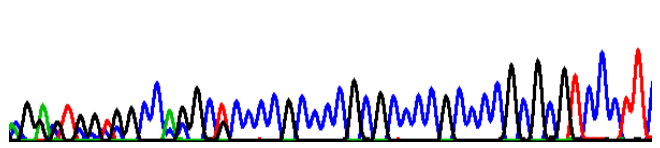
| Cromatograma da sequência com a mutação Q22Q | Resultados Mutação/nº repetições | Cromatograma da sequência com o número de repetições do dodecâmero |
|---|---|--|
|  | <p>Doente</p> <p>c.66G>A: A/A</p> <p>3/3</p> |  |
|  | <p>Mãe</p> <p>c.66G>A: G/A</p> <p>3/3</p> |  |
|  | <p>Pai</p> <p>c.66G>A: G/A</p> <p>3/2</p> |  |

Figura 3.5 - Resultados da análise por sequenciação do fragmento 2F/2R do gDNA do doente com EPM1 e dos seus pais.

A maioria das mutações de localização exónica é apenas considerada como causal quando a capacidade codificante está comprometida. No entanto, existem mutações exónicas silenciosas que alteram o *splicing* e são responsáveis por alterações

patológicas graves sem apresentarem qualquer efeito directamente previsível na função ou estrutura da proteína em causa (revisto em Faustino e Cooper, 2003).

Recorreu-se ao programa informático *Splice Site Prediction by Neural Network at BDGP* para se efectuar a previsão de *splicing* causado pela alteração c.66G>A. Verificou-se que com a presença desta mutação era alterada uma região crítica da sequência, dando origem a perda do local dador de *splicing* (5'ss), com o valor normal de *score* de 0.78, originando um novo local dador de *splicing* com um *score* de 0.98. Aparentemente, o local aceitador (3'ss) manteve-se inalterado.

Para além do estudo do gDNA, foi realizado o estudo do mRNA, para se esclarecer o efeito desta alteração a nível de *splicing* da proteína, através da análise do cDNA.

Os resultados obtidos através da análise de cDNA (Figura 3.6) permitiram verificar a existência de um transcrito normal (87pb), semelhante ao controlo normal, e de um transcrito alternativo (451pb). O transcrito alterado é resultante da perda do local normal de *splicing* com a inclusão parcial de região intrónica e com activação de um novo local localizado a 364 pb do início do intrão 1, posteriormente confirmado por sequenciação (Figura 3.7).

Na Figura 3.8 encontram-se esquematizados os resultados confirmados da previsão efectuada anteriormente.

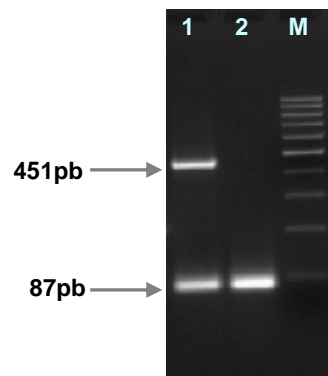


Figura 3.6 - Análise do fragmento 3F/4R (Tabela 2.2) do cDNA do doente com a alteração c.66G>A no gene da CSTB. 1 - cDNA do doente EPM1; 2 - cDNA do controlo normal; M - Marcador de peso molecular 100bp.

Consequentemente esta alteração, que poderia ser silenciosa, origina uma alteração a nível da transcrição e, caso o transcrito anormal seja estável, origina também um péptido alterado devido à inclusão de 14 aminoácidos e aparecimento de um codão de stop a 14 aminoácidos do resíduo Q22. No doente em causa, homocigótico para c.66G>A (p.Q22Q)

obtiveram-se dois transcritos principais e a mutação poderia denominar-se por r.[66g>a, 65_66ins66+364pb] uma vez que há um deslocamento do local dador de *splicing* para o intrão 1, com inserção de 364 nucleótidos pertencentes à sequência intrínica.

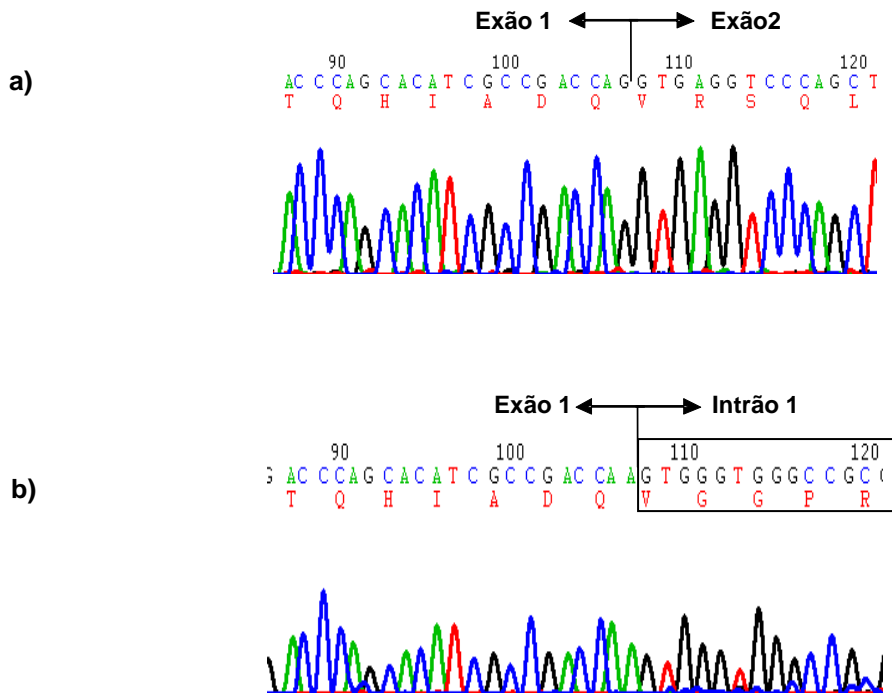


Figura 3.7 - Representação parcial da sequência do cDNA e da grelha de leitura da proteína de um controlo normal (a) e do Doente A (b) com a mutação c.66G>A, no qual se verifica a inclusão de parte do intrão 1 (364pb).

A obtenção de duas bandas, uma de tamanho normal e outra de tamanho alterado, indica a existência de duas isoformas do mesmo transcrito. A utilização de um local de *splicing* alternativo, tal como noutros casos, resulta na retenção parcial do intrão e na introdução de um codão de stop prematuro. O aparecimento de um codão de stop prematuro pode levar à degradação do transcrito através de *NMD* (*nonsense mediated decay*) e à subsequente perda de função.

Assim, a identificação e estudo desta mutação contribui para um aumento da heterogeneidade molecular das alterações no gene *CSTB*.

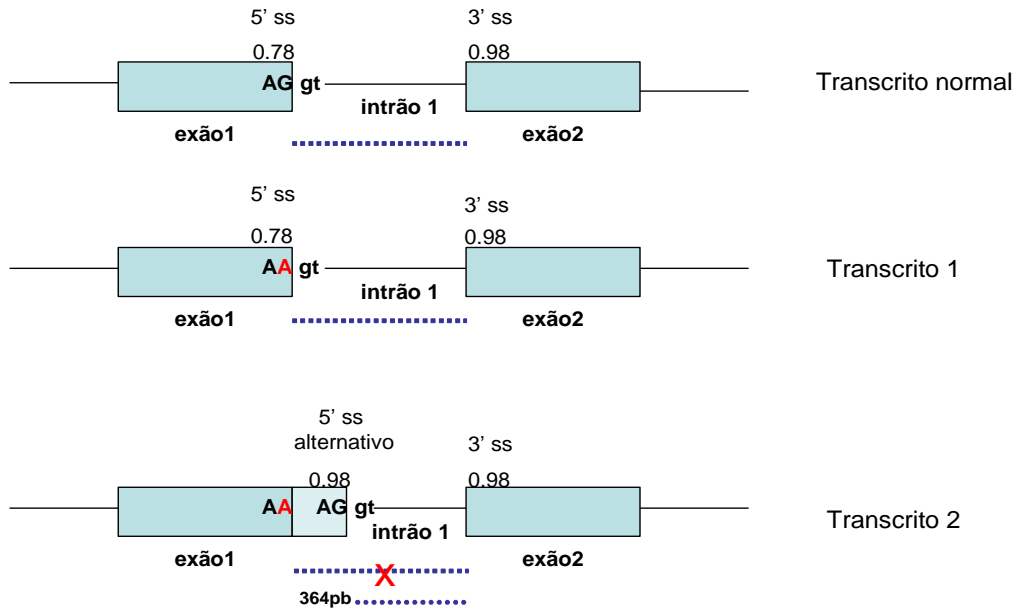


Figura 3.8 - Representação esquemática do transcrito normal e dos transcritos obtidos na presença da mutação c.66G>A. Representação dos diferentes valores de *score* para o 5' *splice-site* (ss), 3' *splice-site* (ss) e 5' *splice-site* (ss) alternativo.

Relativamente ao perfil mutacional conhecido nos doentes com EPM1, é de referir que a alteração c.66G>A é, apenas, a segunda mutação detectada em homozigotia, sendo a mutação c.10G>C (G4R) a primeira a ser descrita como tal.

O *splicing* alternativo normal é um processo utilizado de forma a permitir gerar transcritos distintos em tipos de células, tecidos ou fases de desenvolvimento diferentes. Este mecanismo permite aumentar a diversidade de funções a partir de uma mesma informação genética. No entanto, tal como neste caso, a alteração do processo normal de *splicing* pode resultar numa deficiência patológica.

3.2.2 Análise do Doente B _ Estudo do gDNA

No Doente B foi analisado o gDNA e não foi detectada alguma mutação causal. Foram apenas identificados alguns SNP já descritos (Tabela 3.1) e homozigotia para 3 repetições do dodecâmero.

Tabela 3.1 - Resultados obtidos na análise do gDNA do Doente B.

| Alterações detectadas | Resultado |
|---|-----------|
| Repetição do dodecâmero (CCCCGCCCCGCG) | 3/3 |
| c.67-479 t>g (rs 13046612) | t/g |
| c.67-471 t>g (rs 13046607) | t/g |
| c.67-456 t>g (rs 35006428) | t/g |

Para se prosseguir com a análise do cDNA seriam necessárias mais informações clínicas no sentido de se averiguar se o diagnóstico clínico continua a ser sugestivo de EPM1.

3.3. Rastreio populacional

Na análise dos 150 indivíduos controlo (300 alelos) não foi detectada a mutação c.66G>A (Q22Q) em algum dos casos estudados, o que corrobora a hipótese de que se trata de uma mutação causal.

Paralelamente, foi analisada a variação polimórfica do dodecâmero (CCCCGCCCCGCG) nestes indivíduos, tendo sido detectados 50% de indivíduos com a variação de 3 dodecâmeros em cada alelo (3/3), 40.7% com 3 num alelo e 2 no outro (3/2) e 9.3% de casos homocigóticos para 2 dodecâmeros (2/2) (Tabela 3.2). Relativamente à variante com 3 repetições está descrita a sua frequência como sendo de 66% para a população Caucasiana normal (Lalioi *et al.*, 1998). No nosso estudo foi obtido um resultado de 70%, um valor semelhante ao descrito.

Tabela 3.2 - Resultados obtidos no rastreio populacional.

| Alterações detectadas | Indivíduos |
|------------------------------|------------|
| c.66G>A | 0 % |
| nº de repetições 3/3 | 50% |
| nº de repetições 3/2 | 40,7% |
| nº de repetições 2/2 | 9,3% |
| c.15G>T_G/T (rs4533) | 0,66 % |
| c.-54C>T_C/T (rs59649299) | 1,33 % |

Foram detectados dois SNPs já descritos, embora sem dados de frequência, o c.15G>T_G/T num indivíduo e c.-54C>T_C/T em dois dos casos estudados.

Com este rastreio em indivíduos controlo foi possível iniciar a caracterização do gene *CSTB* na população portuguesa.

3.4. Microscopia de imunofluorescência

Com o objectivo de estabelecer a localização celular da cistatina B previu-se proceder a estudos de co-localização, utilizando células controlo e células do doente, com anticorpos específicos contra proteínas marcadoras do lisossoma, designadamente a anti-LAMP1 (Lysosomal-associated membrane protein 1), proteína lisossomal membranar fundamental para garantir as funções normais do lisossoma, e o marcador lisossomal LysoTracker® Blue DND-22 (composto fluorescente organelo-sensível com excitação/emissão máxima de 373/422 nm) que permite visualizar de forma específica os lisossomas em células vivas. Uma vez que o anticorpo anti-Cistatina B ainda não está disponível no nosso laboratório, procedeu-se a estudos preliminares apenas com o anticorpo anti-LAMP1 e o LysoTracker®.

Este estudo foi iniciado apenas com o doente A.

Imunofluorescência indirecta

Para a experiência de imunofluorescência com o anti-Lamp1, foram utilizadas culturas em monocamada de fibroblastos humanos do doente A e de um controlo normal segundo as condições descritas em 2.5.1. O resultados obtidos (Figura 3.9), quer para as células controlo, quer para as células do doente, evidenciam uma marcação punctata, vesicular e perinuclear, característica da marcação lisossomal normal.

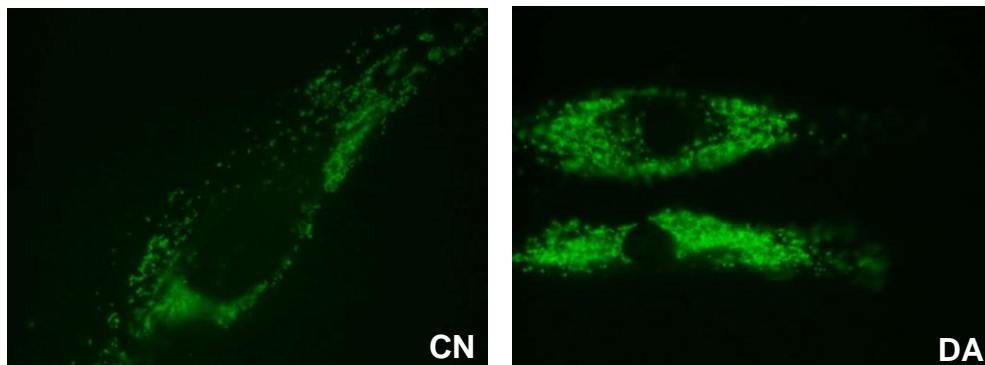


Figura 3.9 – Distribuição citoplasmática dos lisossomas por imunofluorescência indirecta em fibroblastos humanos cultivados. CN – células do controlo normal; DA – células do Doente A.

Estudos com LysoTracker

A experiência foi realizada com o intuito de estabelecer as condições experimentais deste marcador lisossomal e para a confirmação da integridade lisossomal, através da marcação fluorescente de fibroblastos em cultura, com as condições descritas em 2.5.2. Esta experiência também foi realizada utilizando os fibroblastos do Doente A e de um controlo normal (Figura 3.10). Com este estudo é possível avaliar a qualidade e quantidade de lisossomas.

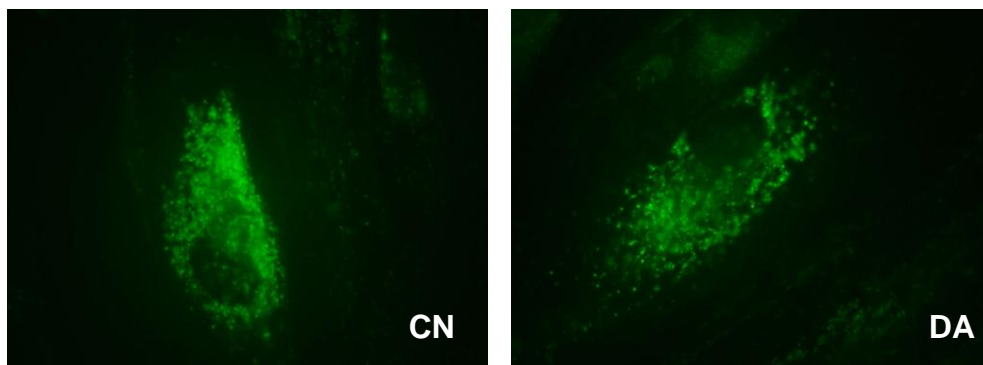


Figura 3.10 – Marcação lisossomal com o corante LysoTracker em fibroblastos humanos cultivados. CN – células do controlo normal; DA – células do Doente A.

Com esta experiência preliminar, os resultados obtidos para as duas linhas celulares são semelhantes, apresentando uma marcação vesicular e perinuclear característica da marcação lisossomal. A utilização futura deste marcador com o anticorpo anti-cistatina-B poderá permitir avaliar uma possível alteração da cistatina B.

4. Conclusão

4. Conclusão

Sendo a doença de Unverricht-Lundborg (EPM1) uma doença autossómica recessiva sem diagnóstico laboratorial em Portugal, e da qual se desconhece o impacto real em termos de saúde pública, é importante a implementação do estudo genético e investigação aplicada desta doença.

Com este trabalho foi possível atingir os objectivos propostos:

procedeu-se à optimização das condições técnicas para a amplificação do gene *CSTB*, com excepção da pesquisa da expansão do dodecâmero; efectuou-se a caracterização mutacional e a confirmação do diagnóstico clínico de um doente; demonstrou-se, mais uma vez, a importância do processo correcto de *splicing*; contribuiu-se para o conhecimento da existência de heterogeneidade mutacional em EPM1; iniciou-se a caracterização do gene *CSTB* em Portugal.

Com a implementação da restante metodologia foi possível a caracterização molecular de um doente com EPM1, que apresenta uma mutação de *splicing* não descrita c.66G>A (Q22Q). A identificação desta mutação não-clássica pode sugerir a existência de um perfil mutacional diferente em doentes portugueses.

O outro doente estudado, com suspeita de Gaucher Tipo III, não apresenta alterações no gene da *CSTB*. Neste momento, os dados clínicos que possuímos são insuficientes para considerar este caso como tendo uma forte suspeita clínica de EPM1 e justificar a continuidade do estudo deste gene, sendo de esperar que o despiste de outras doenças metabólicas venha a ser conclusivo.

No estudo de doentes com suspeita de EPM1 é, assim, fundamental para o diagnóstico diferencial uma caracterização clínica detalhada e o exame histopatológico para determinação da existência (ou ausência) de corpos de inclusão.

A detecção de uma alteração de *splicing* nova contribui para a demonstração da importância da avaliação do RNA, em termos de diagnóstico e investigação, mesmo em casos com alterações aparentemente silenciosas. No gene da cistatina B a causa mais frequente de deficiência, relacionada com EPM1, resulta de alterações a nível do processamento de RNA.

5. Perspectivas futuras

5. Perspectivas futuras

Os métodos implementados, neste trabalho, têm aplicação imediata a nível da caracterização mutacional de doentes com EPM1 permitindo uma identificação mais precisa destes doentes.

Através da divulgação do inquérito concebido ao longo deste trabalho é previsível que a recolha de dados e de amostras permita um levantamento dos casos com quadro clínico compatível, a divulgação da doença, um aumento do conhecimento sobre a EPM1 e permitirá também efectuar a sua caracterização e avaliação do impacto na nossa população.

Uma vez que não se conseguiu a optimização da detecção da expansão do dodecâmero, de forma reprodutível, será desejável prosseguir com outro tipo de abordagem.

A avaliação de alterações a nível de RNA por qRT-PCR poderá facultar uma forma alternativa/complementar na caracterização desta patologia. Dado não ter sido possível concluir atempadamente as experiências de imunofluorescência, será interessante prosseguir com estes estudos de forma a avaliar e verificar a localização celular da cistatina B. A análise da proteína, por *Western blotting*, poderá também complementar a avaliação do defeito causal de EPM1.

6. Bibliografia

6. Bibliografia

Alakurtti K, Virtaneva K, Joensuu T, Palvimo JJ, Lehesjoki AE. Characterization of the cystatin B gene promoter harboring the dodecamer repeat expanded in progressive myoclonus epilepsy, EPM1. 2000; :Gene. 242: 65-73.

Alakurtti K, Weber E, Rinne R, Theil G, de Haan GJ, Lindhout D, Salmikangas P, Sauk P, Latina U, Lehesjoki AE. Loss of lysosomal association of cystatin B proteins representing progressive myoclonus epilepsy, EPM1, mutations. Eur J Hum Genet. 2005; 13: 208–15.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P Molecular biology of the cell. 2001; 4th edition, Garland Science.

Barrett AJ. The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors. Biomed Biochim Acta 1986; 45:1363–1374.

Barrett AJ. The cystatins: a new class of peptidase inhibitor trends in Biochemical science 1987;12, 193-196.

Bassuk AG, Wallace RH, Buhr A, Buller AR, Afawi Z, Shimojo M, Miyata S, Chen S, Gonzalez-Alegre P, Griesbach HL, Wu S, Nashelsky M, Vladar EK, Antic D, Ferguson PJ, Cirak S, Voit T, Scott MP, Axelrod JD, Gurnett C, Daoud AS, Kivity S, Neufeld MY, Mazarib A, Straussberg R, Walid S, Korczyn AD, Slusarski DC, Berkovic SF, El-Shanti HI. A homozygous mutation in human PRICKLE1 causes an autosomal-recessive progressive myoclonus epilepsy-ataxia syndrome. Am J Hum Genet. 2008;83(5):572–581

Berkovic SF, Mazarib A, Walid S, Neufeld MY, Manelis J, Nevo Y, Korczyn AD, Yin J, Xiong L, Pandolfo M, Mulley JC, Wallace RH. A new clinical and molecular form of Unverricht-Lundborg disease localized by homozygosity mapping. Brain. 2005;128(Pt 3):652-8.

Bespalova IN, Pranzatelli M, Burmeister M. G to C transversion at a splice acceptor site causes exon skipping in the cystatin B gene. Mutat Res. 1997; 382(1-2):67-74.

Calkins CC, Sameni M, Koblinski J, Sloane BF, Moin K. Differential localization of cysteine protease inhibitors and a target cysteine protease, cathepsin B, by immuno-confocal microscopy. J Histochem Cytochem 1998; 46:745–751

Ceru, S., Rabzelj, S., Kopitar-Jerala, N., Turk, V., and Zerovnik, E..Protein aggregation as a possible cause for pathology in a subset of familial Unverricht-Lundborg disease. Med. Hypotheses 2005; 64: 955–959.

Chwieralski CE, Welte T, Bühling F. Cathepsin-regulated apoptosis. Apoptosis. 2006;11(2):143-9.

Cipollini E, Riccio M, Di Giaimo R, Dal Piaz F, Pulice G, Catania S, Caldarelli I, Dembic M, Santi S, Melli M. Cystatin B and its EPM1 mutants are polymeric and aggregate prone in vivo. Biochim Biophys Acta. 2008;1783(2):312-22.

D'Amato E, Kokaia Z, Nanobashvili A, Reeben M, Lehesjoki AE, Saarma M, Lindvall O. Seizures induce widespread upregulation of cystatin B, the gene mutated in progressive myoclonus epilepsy, in rat forebrain neurons. *Eur J Neurosci* 2000; 12:1687–1695.

Di Giaimo R, Riccio M, Santi S, Galeotti C, Ambrosetti DC, Melli M. New insights into the molecular basis of progressive myoclonus epilepsy: a multiprotein complex with cystatin B. *Hum Mol Genet.* 2002 1;11(23):2941-50.

Edwards MJ, Hargreaves IP, Heales SJ, Jones SJ, Ramachandran V, Bhatia KP, Sisodiya S. N-acetylcysteine and Unverricht-Lundborg disease: variable response and possible side effects. *Neurology.* 2002; 59:1447–9.

Engel Jr J. ILAE Task force on classification and terminology. Classification of epileptic disorders. *Epilepsia.* 2001;42(3):316.

Erdinç O.O., Joensuu T., Uslu F.I., Bebek N., Ozkara Ç., Tutkavul K., Gunduz A., Lehesjoki A., Baykan B. Unverricht-Lundborg in Turkey: Delineating the phenotype between cystatin B mutation positive and negative cases. *J Neurol Sci(Turk)* 2010;27:001-011.

Faustino NA, Cooper TA. Pre-mRNA splicing and human disease *Genes Dev.* 2003 Feb15;17(4):419-37.

Feldman AS, Banyard J, Wu CL, McDougal WS, Zetter BR. Cystatin B as a tissue and urinary biomarker of bladder cancer recurrence and disease progression. *Clin Cancer Res.* 2009 Feb 1;15(3):1024-31.

Fisher R, van Emde Boas W. Response: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia.* 2005;46(10):1698-702.

Franceschetti S, Sancini G, Buzzi A, Zucchini S, Paradiso B, Magnaghi G, Frassoni C, Chikhladze M, Avanzini G, Simonato M. A pathogenetic hypothesis of Unverricht-Lundborg disease onset and progression. *Neurobiol Dis.* 2007 ;25(3):675-85. Epub 2006 22.

Frey UH, Bachmann HS, Peters J, Siffert W. PCR-amplification of GC-rich regions: 'slowdown PCR'. *Nat Protoc.* 2008;3(8):1312-7.

Guha S., Padh H., Cathepsins: Fundamental Effectors of Endolysosomal proteolysis. *Indian J. Biochem. Biophys.,* 2008: 45.75-90

Haan GJ, Halley DJ, Doelman JC, Geesink HH, Augustijn PB, Jager-Jongkind AD, Majoie M, Bader AJ, Leliefeld-Ten Doeschate LA, Deelen WH, Bertram E, Lehesjoki AE, Lindhout D. Unverricht-Lundborg disease: underdiagnosed in the Netherlands. *Epilepsia.* 2004;45(9):1061-3.PMID: 15329070

Houseweart MK, Pennacchio LA, Vilaythong A, Peters C, Noebels JL, Myers RM. Cathepsin B but not cathepsins L or S contributes to the pathogenesis of Unverricht-Lundborg progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *J Neurobiol.* 2003; 56: 315–27.

Horiuchi H, Osawa M, Furutani R, Morita M, Tian W, Awatsu Y, Shimazaki H, Umetsu K. Polymerase chain reaction-based analysis using deaminated DNA of dodecamer expansions in *CSTB*, associated with Unverricht-Lundborg myoclonus epilepsy. *Genet Test*. 2005 Winter;9(4):328-33.

Järvinen M, Rinne A. Human spleen cysteine proteinase inhibitor. Purification, fractionation into isoelectric variants and some properties of the variants. *Biochim Biophys Acta* 1982; 708:210–217.

Jenko Kokalj SJ, Gunčar GŠI, Morgan G, Rabzelj S, Kenig M, Staniforth RA, Waltho JP, Žerovnik E, Turk D. Essential role of proline isomerization in stefin B tetramer formation. *J Mol Biol* 2007; 366: 1569–1579.

Joensuu T, Kuronen M, Alakurtti K, Tegelberg S, Hakala P, Aalto A, Huopaniemi L, Aula N, Michellucci R, Eriksson K, Lehesjoki AE. Cystatin B: mutation detection, alternative splicing and expression in progressive myoclonus epilepsy of Unverricht-Lundborg type (EPM1) patients. *Eur J Hum Genet*. 2007 ;15(2):185-93.

Joensuu Tarja, Anna-Elina Lehesjoki, and Outi Kopra Molecular background of EPM1-Unverricht–Lundborg disease. *Epilepsia*, 2008; 49 (4): 557 – 563

Johansson AC, Appelqvist H, Nilsson C, Kågedal K, Roberg K, Ollinger K. Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis*. 2010 May;15(5):527-40.

Kaasik A, Kuum M, Aonurm A, Kalda A, Vaarmann A, Zharkovsky A.. Seizures, ataxia, and neuronal loss in cystatin B heterozygous mice. *Epilepsia* 2007; 48(4):752-7.

Kagitani-Shimono K, Imai K, Okamoto N, Ono J, Okada S. Unverricht-Lundborg disease with cystatin B gene abnormalities. *Pediatr Neurol*. 2002 ;26(1):55-60.

Kälviäinen R, Khyuppenen J, Koskenkorva P, Eriksson K, Vanninen R, Mervaala E. Clinical picture of EPM1-Unverricht-Lundborg disease. *Epilepsia*. 2008; 49: 549–56.

Khari HM, Franceschetti S, Jovic N, Mrabet A, Genton P. Death in Unverricht-Lundborg disease. *Neurol Sci*. 2009 5.

Koskiniemi M, Toivakka E, Donner M. Progressive myoclonus epilepsy. Electroencephalographical findings. *Acta Neurol Scand* 1974; 50:333–359.

Laitala-Leinonen T, Rinne R, Saukko P, Väänänen HK, Rinne A. Cystatin B as an intracellular modulator of bone resorption. *Matrix Biol*. 2006;25(3):149-57.

Lalioti MD, Mirotsoy M., Buresi C., Peitsch M. C., Rossier C., Ouazzani R., Baldy-Moulinier M., Bottani A., Malafosse A., and Antonarakis S. E.. Identification of mutations in cystatin B, the gene responsible for the Unverricht-Lundborg type of progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *Am J Hum Genet*. 1997 ; 60(2): 342–351.

Lalioti MD, Scott HS, Genton P, Grid D, Ouazzani R, M'Rabet A, Ibrahim S, Gouider R, Dravet C, Chkili T, Bottani A, Buresi C, Malafosse A, Antonarakis SE. A PCR amplification method reveals instability of the dodecamer repeat in progressive myoclonus epilepsy (EPM1) and no correlation between the size of the repeat and age at onset. *Am J Hum Genet.* 1998; 62: 842–7.

Lalioti MD, Scott HS, Antonarakis SE.. Altered spacing of promoter elements due to the dodecamer repeat expansion contributes to reduced expression of the cystatin B gene in EPM1. *Hum Mol Genet* 1999; 8(9):1791-8.

Larson GP, Ding S, Lafrenière RG, Rouleau GA and Krontiris TG Instability of the EPM1 minisatellite. *Hum Mol Genet*, 1999; 1985–1988.

Lehesjoki AE, Koskiniemi M, Sistonen P, Miao J, Hästbacka J, Norio R, de la Chapelle A. Localization of a gene for progressive myoclonus epilepsy to chromosome 21q22. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:3696–3699.

Lehesjoki AE, Eldridge R, Eldridge J, Wilder BJ, de la Chapelle A. Progressive myoclonus epilepsy of Unverricht-Lundborg type: a clinical and molecular genetic study of a family from the United States with four affected sibs. *Neurology* 1993; 43:2384–2386

Lehesjoki AE, Koskiniemi M.x. Progressive myoclonus epilepsy of Unverricht-Lundborg type. *Epilepsia* 1999; 40 Suppl 3:23-8.

Lehesjoki AE. Clinical features and genetics of Unverricht-Lundborg disease. *Neurol.* 2002;89:193-7.

Lehesjoki AE. Molecular background of progressive myoclonus epilepsy *Embo Journ* 2003; 22 (14).3473-3478

Lehtinen MK, Tegelberg S, Schipper H, Su H, Zukor H, Manninen O, Kopra O, Joensuu T, Hakala P, Bonni A, Lehesjoki A-E. Cystatin B deficiency sensitizes neurons to oxidative stress in progressive myoclonus epilepsy, EPM1. *J Neurosci.* 2009;29: 5910–5915.

Lopes Lima JM. *Epilepsia - A abordagem clínica.* *Ver Port Clin Geral* 2005;21:291-8

Napolioni V., Recent Patents on Epilepsy Genetics. Recent patents on DNA & gene sequences 2009;3(3):183-92

Nokelainen P, Heiskala H, Lehesjoki AE, Kaski M. A patient with 2 different repeat expansion mutations. *Arch Neurol.* 2000;57(8):1199-203.

Norio R, Koskiniemi M. Progressive myoclonus epilepsy: genetic and nosological aspects with special reference to 107 Finnish patients. *Clin Genet* 1979; 15:382–398.

Pennacchio LA, Lehesjoki A-E, Stone NE, Willour VL, Virtaneva K, Miao J, D'Amato E, et al. Mutations in the gene encoding cystatin B in progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *Science* 1996; 271:1731–1734.

Pennacchio LA, Bouley DM, Higgins KM, Scott MP, Noebels JL, Myers RM. Progressive ataxia, myoclonic epilepsy and cerebellar apoptosis in cystatin B-deficient mice. *Nat Genet.* 1998; 20:251–8.

Rabzelj S, Turk V, Zerovnik E. In vitro study of stability and amyloid-fibril formation of two mutants of human stefin B (cystatin B) occurring in patients with EPM1. *Protein Sci.* 2005; 14(10):2713-22.

Ramachandran N, Girard JM, Turnbull J, Minassian BA. The autosomal recessively inherited progressive myoclonus epilepsies and their genes. *Epilepsia.* 2009; 50 Suppl 5:29-36.

Riccio M, Di Giaimo R, Pianetti S, Palmieri PP, Melli M, Santi S. Nuclear localization of cystatin B, the cathepsin inhibitor implicated in myoclonus epilepsy (EPM1). *Exp Cell Res* 2001 ;262:84–94.

Rinne R, Sauk P, Jarvinen M, Lehesjoki AE. Reduced cystatin B activity correlates with enhanced cathepsin activity in progressive myoclonus epilepsy. *Ann Med.* 2002;34:380–5.

Ritonja A, Machleidt W, Barrett AJ. Amino acid sequence of the intracellular cysteine proteinase inhibitor cystatin B from human liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 131:1187–1192.

Saha T, Usdin K. Tetraplex formation by the progressive myoclonus epilepsy type-1 repeat: implications for instability in the repeat expansion diseases. *FEBS Lett.* 2001;491(3):184-7.

Sundqvist A. Epilepsy: a clinical diagnostic overview. *Eur j Pain.* 2002;6 (Suppl A):21-5

Shannon P, Pennacchio LA, Houseweart MK, Minassian BA, Myers RM. Neuropathological changes in a mouse model of progressive myoclonus epilepsy: cystatin B deficiency and Unverricht-Lundborg disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002; 61: 1085–91.

Smith B, Shatz R, Elisevich K, Bespalova IN, Burmeister M. Effects of vagus nerve stimulation on progressive myoclonus epilepsy of Unverricht-Lundborg type. *Epilepsia.* 2000; 41: 1046–8.

Shahwan A, Farrell M, Delanty N.. Progressive myoclonic epilepsies: a review of genetic and therapeutic aspects. *Lancet Neurol* 2005; 4(4):239-48.

Stubbs MT, Laber B, Bode W, Huber R, Jerala R, Lenarcic B, Turk V. The refined 2.4 Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with the cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor interaction. *Embo J,* 1990: 9(6):1939-47.

Sundqvist, Anders. Epilepsy: a clinical diagnostic overview: *Eur Jour Pain.* 2002; 6: 21-25.

Turk V, Stoka V, Turk D. Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance. *Front Biosci.* 2008 1;13:5406-20.

Turk V, Turk B, Turk D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J.* 2001 3;20(17):4629-33.

Vellodi A. Lysosomal storage disorders. *British Journal of Haematology* 2004; 128:413-431.

Virtaneva K, D'Amato E, Miao J, Koskiniemi M, Norio R, Avanzini G, Franceschetti S, Michelucci R, Tassinari CA, Omer S, Pennacchio LA, Myers RM, Dieguez-Lucena JL, Krahe R, de la Chapelle A, Lehesjoki AE. Unstable minisatellite expansion causing recessively inherited myoclonus epilepsy, EPM1. *Nat Genet* 1997; 15:393–396.

Zerovnik E. Using stefin B as a model amyloidogenic protein- overview. *Zdrav Vestn* 2008;77:II-21-6.

7. ANEXOS

7. Anexos

RECOLHA DE DADOS RETROSPECTIVA_ EPILEPSIA MIOCLÓNICA PROGRESSIVA UNVERRICHT-LUNDBORG (EPM1)

Caro(a) Dr(a),

Com o objectivo de implementar o diagnóstico da EPM1 em Portugal, através do estudo do gene *CSTB*, está a ser desenvolvido, na Unidade de Investigação e Desenvolvimento do Centro de Genética Jacinto Magalhães _INSA, o trabalho, Estudo da Epilepsia Mioclónica Progressiva Unverricht-Lundborg, no âmbito de um Mestrado na Universidade de Aveiro.

Para a realização deste trabalho são fundamentais os seguintes dados: quantos são os casos existentes com esta patologia, quantos doentes têm já o estudo molecular realizado e quais as mutações detectadas. Assim, para a concretização dos objectivos propostos solicitamos a vossa participação na elaboração deste inquérito.

De salientar que é já possível oferecermos a realização do estudo molecular, permitindo a confirmação/exclusão destes doentes o mais breve possível.

DEPOIS DE PREENCHIDO ENVIAR NO ENVELOPE EM ANEXO

| | | | |
|--|--------------|---|---|
| NOME DO MÉDICO: _____ | EMAIL: _____ | SERVIÇO: _____ | HOSPITAL: _____ |
| DOENÇA DE UNVERRICHT-LUNDBORG: NENHUM REGISTO DE DOENTES <input type="checkbox"/> | | | |
| PACIENTE COM DOENÇA <input type="checkbox"/> | | | |
| PACIENTE COM SUSPEITA <input type="checkbox"/> | | | |
| DADOS DO DOENTE | | | |
| IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE: _____ | | DATA NASCIMENTO: _____ | SEXO: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> |
| CONSANGUINIDADE: SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> NÃO SABE <input type="checkbox"/> | | 1º GRAU/ 2º GRAU | |
| DADOS CLINICOS | | | |
| IDADE DE DIAGNÓSTICO DE EPILEPSIA MIOCLÓNICA PROGRESSIVA: _____ | | | |
| TRATAMENTO COM ANTIPILETICO: SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> NÃO SABE <input type="checkbox"/> QUAL: _____ | | | |
| ESTUDO MOLECULAR: NORMAL <input type="checkbox"/> ANORMAL <input type="checkbox"/> RESULTADO: _____ | | | |
| EEG: NORMAL <input type="checkbox"/> ANORMAL <input type="checkbox"/> | | FOTOSSENSIBILIDADE: SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> | |
| DETERIORAÇÃO COGNITIVA: SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> | | DISARTRIA: SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> | |
| ATAXIA: SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> | | TREMOR: SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> | |
| OBSERVAÇÕES/INFORMAÇÕES ADICIONAIS: | | | |
| _____ | | | |
| _____ | | | |
| _____ | | | |
| É POSSÍVEL ENVIO DE AMOSTRA DO DOENTE? _____ (COLHEITA A COMBINAR) | | | |
| CONTACTOS: OLGA AMARAL - olga.amaral@insa.min-saude.pt – TEL:226070300/337 | | | |
| EUGÉNIA PINTO - eugenia.pinto@igm.min-saude.pt – TEL:226070300/344 | | | |
| DATA: ____/____/____ | | | |
| OBRIGADA PELA SUA COLABORAÇÃO | | | |