

IARA LEDA BRANDÃO DE ALMEIDA PEREIRA

**ESTUDO MOLECULAR E DE CORRELAÇÃO
GENÓTIPO-FENÓTIPO NA POLIMICROGIRIA
PERISYLVIANA BILATERAL CONGÊNITA**

CAMPINAS

2005

IARA LEDA BRANDÃO DE ALMEIDA PEREIRA

**ESTUDO MOLECULAR E DE CORRELAÇÃO
GENÓTIPO-FENÓTIPO NA POLIMICROGIRIA
PERISYLVIANA BILATERAL CONGÊNITA**

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

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ÍSCIA LOPES CENDES

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO CENDES

CAMPINAS

2005

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

P414e Pereira, Iara Leda Brandão de Almeida
Estudo molecular e de correlação genótipo-fenótipo na polimicrogiria
perisylviana bilateral congênita./Iara Leda Brandão de Almeida
Pereira. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientadores : Íscia Lopes Cendes, Fernando Cendes
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neurogenética. 2. Córtex Cerebral. 3. Polimicrogiria . 4.
Síndrome Polimicrogiria. 5. Disgenesia cortical. 6. Cérebro –
Anomalias e deformidades. 7. Cérebro – Anormalidades. I. Cendes,
Íscia Lopes. II. Cendes, Fernando. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(Slp/fcm)

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Orientadora: Profa. Dra. Iscia T. Lopes Cendes

Membros:

1. Prof. Dr. Lineu Correa Fonseca_____

2. Profa. Dra. Marília de Arruda Cardoso Smith_____

3. Profa. Dra. Maria Valeriana Leme de Moura-Ribeiro_____

4. Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes_____

Suplentes:

1. Profa. Dra. Vanda Maria Gimenes Gonçalves_____

2. Profa. Dra . Antônia Paula Marques de Faria_____

3. Profa. Dra. Elza Márcia Targas Yacubian_____

4. Prof. Dr. Luiz Celso Pereira Vilanova_____

Curso de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas

Data: 24 / 08 / 2005

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Nitalma e Tobias porque deram alicerce e orientaram meus passos;

Ao André, meu marido e amigo em todas as horas;

À vovó Maria Júlia, “In Memoriam” e vovó Maria Alcântara, porque suas histórias de vida não me deixam esquecer que no caminho do aço é a prova do fogo que o torna resistente!

Á minha querida vovó Maria Filomena Cavini Pereira por ser para mim, um exemplo de perseverança, não acomodação, gosto pelo conhecimento e energia para levar a vida adiante!

As famílias e pacientes que participaram desta pesquisa. Este trabalho somente foi possível, porque vocês compreenderam e colaboraram conosco.

A minha orientadora Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes pela parceria científica destes anos de trabalho e pelo aprendizado que me proporcionou. O meu muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Fernando Cendes, meu co-orientador, obrigada pela disponibilidade em discutir as imagens de ressonância magnética, pela atenção que sempre me dispensou e discussão do trabalho nos seus plantões médicos.

À Profa. Dra. Marilisa Mantovane Guerreiro pela coordenação do projeto temático no estudo da Síndrome Perisylviana e esta tese é parte deste projeto. Sua ativa participação nas discussões e atividades práticas de ambulatório foram importantes contribuições para minha atividade profissional.

Aos colegas de bancada: Fabio Torres, Rodrigo Secolin, Daniela Souza, Marilza Silva e Dra. Neide Ferreira. Uma tese é o resultado de muitas colaborações e esta, tornou-se possível porque pude contar com o apoio de todos vocês.

À Adriana Bortolai citogeneticista do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo e Alexandre Dias, funcionário da CITOGEM que me deram o suporte técnico para as análises de microscopia.

À Dra. Silvia Toledo, citogeneticista da UNIFESP que permitiu o uso do equipamento de microscopia em seu laboratório para que eu pudesse concluir as análises de FISH.

Às fonoaudiólogas Ecila Paula Oliveira e Dra. Simone Hage pelas avaliações fonoaudiológicas deste trabalho, pelas discussões científicas nesta trajetória e pela agradável convivência profissional.

Às neuropsicólogas Catarina Guimarães e Dagma Abramides pela avaliações neuropsicológicas presentes neste trabalho.

Ao Fabrício Ramos, funcionário do laboratório de neuroimagem da UNICAMP que me deu importante ajuda na localização de imagens dos pacientes e organização dos planos de imagens.

Às secretárias do Departamento de Genética Médica* e secretária de pós-graduação na Fisiopatologia Médica** da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP: Cláudia Hudorovic*, Sônia Silva*, Teresa Chiodetto* e Teresa Ferreira**, como também a estagiária Natasha Lopes* pela ajuda nos trâmites de papéis.

À CAPES e FAPESP pelo suporte financeiro.

	PÁG.
RESUMO	xxv
ABSTRACT	xxix
1- INTRODUÇÃO	33
1.1- Aspectos histológicos	36
1.2- Patogênese	36
1.3- Etiologia	37
1.4- Características clínicas	39
1.5- Neuroimagem	42
1.6- Aspectos genéticos	43
- PMG Perisylviana bilateral.....	43
- PMG fronto-parietal bilateral.....	44
- PMG na síndrome da deleção em 22q112.....	46
- PMG e Mutação no gene <i>MECP2</i>	47
- Relação entre esquizencefalia, PMG e mutação no gene <i>EMX2</i>	48
1.7- Justificativa para o estudo	48
2- OBJETIVOS	51
3- MATERIAL E MÉTODOS	55
4- RESULTADOS	69
5- DISCUSSÃO	97
6- CONCLUSÃO	109
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
8- ANEXOS	125

LISTA DE ABREVIATURAS

Bil	Bilateral
CT	Computerize Tomography
DAE	Droga Anti-Epiléptica
DEL	Distúrbio Específico de Linguagem
DGCR	DiGeorge Critical Region
DL	Distúrbio de Linguagem
EEG	EletroEncefaloGrama
EI	Espasmo Infantil
EMX2	Gene Empty Spiracles 2
ESES	Estatus Epiléptico durante o Sono
FISH	Fluorescence In situ Hybridization
Fr	Frontal
GPCR	G Protein Coupled Receptor
ILAE	International League Against Epilepsy
MDC	Malformação do Desenvolvimento Cortical
MECP2	Methyl-CpG-binding Protein 2
Par	Parietal
PC	Parcial Complexa
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIC	Polymorphism Information Content
PMG	Polimicrogiria

Post	Posterior
PPBC	Polimicrogria Perisylviana Bilateral Congênita
PPVT-R	Peabody Picture Vocabulary Test-Revised
PS	Perisylviana
QIE/QIV	Quociente de Inteligência Execução (QIE) e Verbal (QIV)
RM	Ressonância Magnética
SSCP	Single Stranded Conformation Polymorphism
TCG	Tônico Clônica Generalizada
Uni	Unilateral
WAIS-R	Wechsler Adult Intelligence Scale- Revised
WISC	Wechsler Intelligence Scale for Children
WPPSI	Wechsler Preschool and Primary Scale Intelligence

LISTA DE TABELAS

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1- Primers para amplificação do gene <i>EMX2</i>	62
Tabela 2- Primers para amplificação dos marcadores das regiões candidatas.	65
Tabela 3- Perfil amostral dos pacientes com PMG.....	71
Tabela 4- Achados clínicos e avaliação fonoaudiológica de pacientes com PMG.....	74
Tabela 5- Avaliação neuropsicológica de pacientes com PMG.....	75
Tabela 6- Achados de RM.....	76
Tabela 7- Dados clínicos de famílias com recorrência para PMG.....	77
Tabela 8- Dados clínicos de pacientes com PMG (casos isolados).....	78
Tabela 9- Análise de ligação de dois pontos.....	95

		PÁG.
Figura 1-	Esquema do gene <i>EMX2</i>	62
Figura 2-	Ideograma do gene <i>MECP2</i>	64
Figura 3-	Heredograma das famílias com PMG.....	73
Figura 4-	RM de paciente com PMG/PS bilateral.....	79
Figura 5-	RM de paciente com PMG/PS bilateral e esquizencefalia.....	80
Figura 6-	RM de paciente com PMG/PS parietal posterior bilateral.....	81
Figura 7-	RM de paciente com PMG/PS fronto-parietal bilateral.....	82
Figura 8-	RM de paciente com PMG/PS parietal posterior unilateral.....	83
Figura 9-	RM de paciente com PMG/PS frontal bilateral/PS normal.....	84
Figura 10-	RM paciente com PMG fronto-parietal posterior bilateral/ PS normal.....	85
Figura 11-	RM paciente com PMG/PS frontal bilateral.....	86
Figura 12-	Heredograma e achados de RM - família 1.....	87
Figura 13-	Heredograma e achados de RM - família 5.....	89
Figura 14-	Célula metafásica em FISH.....	90
Figura 15-	Localização das regiões candidatas no cromossomo X.....	92
Figura 16-	Haplótipos de 3 famílias.....	94
Figura 17-	Análise de ligação múltiplos-pontos.....	96
Figura 18-	Exemplos de géis de poliacrilamida a 6%.....	96

	PÁG.
ANEXO I- Artigos científicos resultantes deste trabalho de pesquisa.....	127
ANEXO II- Carta de aprovação pelo comitê de ética em pesquisa da FCM – UNICAMP e aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.....	164
ANEXO III- Formulários de Consentimento Livre e esclarecido.....	165
ANEXO IV- Formulário de avaliação Clínica.....	168
ANEXO V- Ficha de encaminhamento de amostras de sangue.....	170
ANEXO VI- Protocolo de Preparação citológica.....	171
ANEXO VII- Protocolo para técnica de <i>FISH</i>	175
ANEXO VIII- Protocolo de coloração com Prata.....	179

RESUMO



Polimicrogiria (PMG) é uma malformação comum do desenvolvimento cortical caracterizada por um número excessivo de pequenos giros e laminação anormal, dando à superfície cortical uma aparência irregular e grosseira. A gravidade das manifestações clínicas se correlaciona com a extensão do envolvimento cortical. As lesões bilaterais ou unilaterais extensas indicam um pior prognóstico. Uma das síndromes de polimicrogiria mais bem descritas clinicamente é a polimicrogiria perisylviana bilateral congênita (PPBC). Distúrbios de linguagem em crianças, epilepsia sintomática focal e disfunção cognitiva podem estar associados a PMG perisylviana. Embora o substrato patológico deste distúrbio não seja conhecido, existem indicativos de que a anormalidade cortical caracterizada como PMG contribui de forma variável nos diferentes níveis de desorganização da linguagem avaliados do ponto de vista fonológico, lexical, morfossintático e discursivo. Recentemente, o locus Xq28 foi mapeado para a forma de PMG perisylviana bilateral e o gene *GPR56* foi identificado para a PMG fronto-parietal bilateral no cromossomo 16q12.2-21. Além disso, uma série de genes candidatos têm sido implicados na etiologia das diferentes formas de PMG. Nesta tese apresentamos estudo clínico e molecular de 32 pacientes com PMG. Recorrência familiar foi observada em 18 destes indivíduos, pertencentes a 5 famílias não relacionadas. Os pacientes foram avaliados por detalhado exame neurológico, submetidos a testes neuropsicológicos e avaliação de linguagem. Todos eles realizaram exames de ressonância magnética com análise de reconstrução multiplanar e curvilínea. Análise de hibridização “*In situ*” por fluorescência (FISH) para pesquisa de deleção no 22q11.2 foi negativa em todos os pacientes avaliados. Em estudos subsequentes, a procura por mutações no gene *EMX2* revelou que este gene não está mutado nos pacientes com PMG. Três famílias, não relacionadas, apresentando recorrência para a polimicrogiria perisylviana bilateral foram selecionadas e genotipadas para 13 marcadores localizados na região Xq27.3-q28. A análise de ligação apresentou Lod score de 2 pontos para o marcador DXS1227 (LOD score 3.01). A análise de múltiplos pontos delimitou uma região candidata, distante 12cM entre os marcadores DXS1227 a DXS8043. Portanto, nossos resultados delimitam uma nova região candidata para a polimicrogiria perisylviana bilateral familiar.

ABSTRACT



Polymicrogyria (PMG) is a malformation of cortical development characterized by an excessive number of small gyri and abnormal cortical lamination, giving the cortical surface an irregular and gross appearance. The severity of clinical manifestations correlates with the extent of cortical involvement. Bilateral or large unilateral lesions indicate a poor prognosis. The congenital bilateral perisylvian polymicrogyria syndrome (CBPS) is one of the well-recognized clinical polymicrogyria syndromes. Developmental language disorder in children, focal symptomatic epilepsy and cognitive deficits, can be associated with perisylvian polymicrogyria. Clinical manifestations will depend on the location and extent of the PMG. Although the pathological substrate of this disorder remains unknown, there are indications that the cortical abnormality known as PMG may contribute to language impairment in different levels, such as phonologic, lexical, morphosyntactic and semantic. Recently, a genetic locus for one form of bilateral perisylvian PMG was mapped to Xq28 and the gene *GPR56* was identified for bilateral frontoparietal polymicrogyria on chromosome 16q12.2-21. In addition, a number of other candidate genes have been implicated in this disorder. In this thesis, we report a clinical and molecular study of 32 patients with PMG. Familial recurrence was observed in 18 of them, belonging from 5 unrelated families. Patients and their families were evaluated by detailed clinical and neurological examinations and also assessed by neuropsychological tests and language evaluation. All patients included in this study were submitted to high resolution MRI scans by performing multiplanar and curvilinear reformatting. FISH analyses for 22q11.2 were negative to all patients. In subsequent studies, we did not identify mutations in *EMX2* gene in patients with PMG. Three unrelated families with recurrence of bilateral perisylvian polymicrogyria were selected and genotyped for 13 markers, which were localized in the Xq273-q28 region. Two-point linkage analysis presented a Lod score of 3.10 for the DXS1227 marker. Multipoint analysis indicated a candidate interval within a 12 cM region between markers DSX1227 and DXS8043. Therefore, our results point out to a new candidate region for bilateral perisylvian polymicrogyria.

1- INTRODUÇÃO

O termo polimicrogiria (PMG) designa uma malformação do desenvolvimento cortical (MDC), decorrente de um defeito na fase de migração e organização do córtex cerebral, que se caracteriza por um excessivo número de pequenas e proeminentes circunvoluções cerebrais espaçadas por sulcos pouco profundos e mais alargados (FRIEDE, 1989; EVRARD et al., 1989). A espessura cortical se apresenta aumentada e a junção entre substância branca e cinzenta é irregular. Este aspecto deve ser diferenciado de microgiria esclerótica ou ulegiria, que representa uma lesão encefaloclástica resultante de atrofia, freqüentemente em formato de cogumelo com pequenos giros e sulcos relativamente amplos intercalados (JANSEN & ANDERMANN, 2005; TAKANASHI et al., 2003). A PMG pode ser generalizada ou focal, unilateral ou bilateral. A apresentação mais comum da PMG é simétrica, bilateral e ocorre principalmente na região perisylviana. Algumas síndromes foram descritas nas quais os pacientes têm manifestações clínicas associadas com imagem de PMG bilateral e simétrica dentre estas, a perisylviana bilateral congênita (PPBC) (KUZNIECKY, et al., 1993), fronto-parietal (SZTRIHA, et. al., 2000; CHANG, et al., 2003), frontal (GUERRINI, et al., 2000), parassagital parieto-occipital (GUERRINI, et al., 1997), generalizada (CHANG, et. al., 2004) e unilateral (CARABALLO, et al., 1999; GUERRINI, et al., 1992). As diferentes formas de PMG levam a uma ampla variedade de achados clínicos, etiológicos e histológicos. A incidência de PMG é desconhecida, porém a freqüência de malformações corticais é estimada em 1/2500 nascidos vivos (VILLARD, et al., 2002). A falha em se obter dados acurados sobre incidência e prevalência é provavelmente conseqüência da heterogeneidade clínica e etiológica desta malformação. O diagnóstico de PMG era freqüentemente perdido por causa de limitações nas técnicas de imagem e foi freqüentemente confundido com paquigiria (STRAUSSBERG, et al., 1996) e até mesmo com esquizencefalia de lábios fechados (HARDING, et al., 1991; ROBIN R, 1991). Avanços no diagnóstico por imagem têm melhorado a classificação e diagnóstico desta condição, que agora parece ser relativamente comum. Além disso, algumas síndromes de PMG regiões específicas têm sido identificadas e podem resultar de mecanismos fisiopatológicos específicos (ex. mutações em genes envolvidos nos processos de formação cortical) (BARKOVICH, et al., 2001; JANSEN & ANDERMANN, 2005).

1.1- Aspectos histológicos

Microscopicamente dois padrões de polimicrogiria são reconhecidos: uma forma simplificada com 4 camadas corticais e uma forma sem camadas. Na PMG com camadas, ao invés de seis camadas como é normalmente reconhecido o córtex cerebral, apenas quatro camadas são vistas: molecular, celular externa, celular interna e camada de células esparsas. Acredita-se que a PMG com quatro camadas corticais resulte de falhas na perfusão ocorrida entre a 20^a e 24^a semanas de gestação levando a necrose intracortical laminar com conseqüente atraso na migração e organização cortical (BARKOVICH, et al., 2001). Os neurônios chegam ao córtex, mas distribuem-se anormalmente, resultando em múltiplos e pequenos giros. Já na PMG sem camadas, a suposta “camada molecular” é contínua sem permitir o contorno das circunvoluções onde os neurônios subjacentes têm distribuição radial (vertical) mas não têm organização laminar. Este aspecto sugere uma interrupção precoce da migração neuronal com subseqüente desorganização na camada cortical. Os dois tipos de PMG podem coexistir em áreas corticais contínuas, sugerindo que sejam parte de um mesmo espectro (BARKOVICH AND KJOS, 1992). Considerando estes 2 aspectos, a superfície cerebral poderá se apresentar com múltiplos e pequenos giros ou paradoxalmente lisa em função da ausência da camada molecular externa (ROBAIN O, 1996).

1.2- Patogênese da PMG

A formação do córtex cerebral humano pode ser dividida em 3 estágios de desenvolvimento: proliferação, migração e organização. Durante o primeiro estágio, os precursores neuronais se proliferam em neuroblastos ou células da glia, na zona ventricular ou subventricular. Na segunda fase, após o final da divisão mitótica, neurônios pós-mitóticos migram do seu lugar de origem em direção radial para a superfície pial. As primeiras células que migram formarão uma estrutura acima da zona ventricular denominada pré-placa. As demais correntes migratórias de neurônios irão formar a placa cortical que irá dividir a pré-placa em uma camada denominada zona marginal (futura camada I do córtex maduro) e uma camada mais interna denominada sub-placa. Ao chegarem a placa cortical, os neurônios organizam-se em camadas para finalmente

formarem o córtex adulto. Ocorre durante este processo, um padrão de deposição dos neurônios onde cada sucessiva geração ultrapassa os neurônios mais antigos, acumulando-se progressivamente em camadas mais superficiais, num padrão conhecido como “inside-out” (padrão de dentro para fora) para formação da lâmina cortical. A terceira fase representa a organização cortical constituída por 6 camadas associadas a sinaptogênese e apoptose. Uma vez que os neurônios imaturos chegam à placa cortical, estes estabelecem uma série de conexões específicas por meio da extensão de seus axônios e dendritos o que caracteriza esta fase de organização cortical (ALLEN, et al., 1999; JANSEN & ANDERMANN, 2005). Este é um processo dinâmico e mais de um estágio deve ocorrer simultaneamente durante algumas semanas de gestação. Na espécie humana, o estágio de proliferação varia de 5-6 semanas até 16-20 semanas, migração varia de 6-7 semanas até 20-24, e organização varia da 16^a semana até a vida pós-natal (BARKOVICH, et al., 2001; DOBYNS, et al., 1996; JANSEN & ANDERMANN, 2005). Com base em modelos animais, PMG resulta de um distúrbio do desenvolvimento ou injúria que ocorre no final do período de migração neuronal e no início da fase de organização cortical (MARRET, et al., 1995; ROSEN, et al., 1996). Em humanos, existe evidência de que fatores citotóxicos ou hipoperfusão (BARKOVICH & LINDAN, 1994; BARKOVICH et al., 1995) no segundo trimestre (entre aproximadamente 16 e 24 semanas de gestação) podem levar a formação de PMG. A forma sem camadas reflete um distúrbio precoce da migração neuronal normal com subsequente desordem na organização. A forma com 4 camadas tem características sugestivas de um evento mais tardio do desenvolvimento da migração e/ou organização cortical como demonstrado na falha de perfusão placentária ocorrendo entre a 20^a e 24^a semanas de gestação (ROBAIN O, 1996). Apesar de todas as considerações até o momento, o fato é que PMG tem etiologia e histologia heterogêneas e sua patogenia permanece desconhecida.

1.3- Etiologia da PMG

Há na literatura evidência de que fatores extrínsecos, tais como infecção intrauterina por citomegalovirus, podem estar envolvidos na patogênese da PMG (BARKOVICH & LINDAN, 1994). Em pacientes com infecção pré-natal confirmada por

citomegalovirus, as regiões do cérebro próximas a PMG podem conter inclusões virais, focus de necrose, calcificações, heterotopia e áreas de infartos. Deste modo, o que se pode concluir é que: alguns mecanismos ocorrendo simultaneamente, incluindo direta perda celular, perda da integridade da superfície pial, hipóxia e isquemia, e outros insultos vasculares locais mediados pela destruição do endotélio capilar, devem influenciar o desenvolvimento da PMG (NORMAN, et al., 1995). Outras ocorrências também foram descritas em associação com PMG tais como; isquemia cerebral fetal por falha na perfusão placentária, (BARKOVICH, et al., 1995) transfusão entre gêmeos, (SUGAMA & KUSANO, 1994) perda intrauterina de um gemelar (BAKER, et al., 1996; VAN BOGAERT, et al., 1996), e ingestão materna de drogas ilícitas (BARKOVICH, et al., 1995). Ademais, a associação de PMG com algumas síndromes geneticamente determinadas tais como; Zellweger, (LIU, et al., 1976), Aicardi (BARKOVICH, et al., 2001), Walker-Warburg (BARKOVICH, et al., 1998) e a presença de PMG em pacientes com anormalidades cromossômicas ou a ocorrência de casos familiares de PMG indicam fortemente a presença de um componente genético para o desenvolvimento desta malformação.

Análises do padrão de expressão de *GPR56*, o primeiro gene identificado como contendo mutações em pacientes com PMG, sugere que o distúrbio pode efetivamente resultar de mutações em genes que estão envolvidos na formação do padrão regional do córtex cerebral em estágios precoce do desenvolvimento, durante a proliferação e migração neuronal (PIAO, et al., 2004). Estes achados sugerem que a PMG pode ser o ponto final de diferentes processos etiológicos, não necessariamente ocorrendo ao mesmo tempo no desenvolvimento cortical. Além disso, essas mesmas evidências sugerem que é provável que a maioria dos subtipos de PMG bilateral e formas generalizadas sejam o reflexo de uma anormalidade ocorrida num período mais precoce do desenvolvimento. Modelos de citotoxicidade e hipoperfusão em que a malformação é freqüentemente focal ou assimétrica devem ter origem em estágios mais tardios do desenvolvimento cortical (JANSEN & ANDERMANN, 2005).

1.4- Características clínicas da PMG

A extensão da PMG pode variar de uma PMG focal em um cérebro normal para PMG difusa em associação com outras malformações cerebrais tais como heterotopia ou alteração de substância branca; ou mesmo fazer parte de um quadro clínico mais complexo, associado a anomalias congênicas múltiplas e retardo mental. A malformação passa a ser denominada esquizecefalia quando ocorre comunicação com o ventrículo (pela formação de uma fenda). É interessante notar que nas bordas superficiais da fenda esquizecefálica é freqüentemente encontrado córtex polimicrogírico. Esta observação sugere a hipótese de que a esquizecefalia pode ser uma extensão mais grave da PMG. No entanto, um possível mecanismo etiológico comum por trás da PMG e da esquizecefalia não está ainda completamente estabelecido (JANSEN & ANDERMANN, 2005).

Caracteristicamente na PMG, a gravidade das manifestações clínicas é bem variável e se correlaciona com a extensão do envolvimento cortical. As lesões bilaterais ou unilaterais extensas indicam um pior prognóstico (BARCOVICH, et al., 2001). Os pacientes acometidos podem apresentar: déficit cognitivo em graus variados, epilepsia e sinais pseudobulbares caracterizados principalmente por dificuldades na aquisição e desenvolvimento da linguagem oral e/ou escrita e dificuldades de mobilidade da língua com conseqüente distúrbios de mastigação e salivação.

Em uma série de 13 pacientes não relacionados, Guerrini e colaboradores (GUERRINI, et al., 2000) apresentaram pacientes com **PMG frontal bilateral**. As Características típicas incluíam atraso motor e atraso na aquisição da linguagem, hemiparesia espástica ou quadriparesia, e retardo mental grave a moderado. Nenhum sinal pseudobulbar foi relatado e a circunferência craniana foi normal. Epilepsia esteve presente em 38% dos pacientes, variando em tipos de crise, idade de início e gravidade.

Chang e colaboradores (CHANG, et al., 2003) descreveram 19 pacientes com **PMG fronto-parietal bilateral**, nestes pacientes a principal característica clínica de PMG Fronto-parietal bilateral incluiu atraso global do desenvolvimento variando de moderado a grave, esotropia, sinais piramidais e cerebelares, e crises em 94% dos pacientes em sua maior parte generalizadas. Achados de ressonância magnética (RM) demonstraram PMG

simétrica afetando principalmente as regiões fronto parietais em associação com anormalidade da substância branca bilateralmente, atrofia do tronco cerebral e cerebelo e ventriculomegalia (CHANG, et al., 2003). Estas características adicionais não são relatadas, consistentemente, em nenhuma outra forma de PMG bilateral. O sinal de esotropia também não se observa em nenhuma outra forma de PMG o que pode ser utilizado como recurso adicional para diferenciar PMG fronto-parietal bilateral de outras formas de PMG bilateral, embora a esotropia seja comum em pacientes com grave encefalopatia estática (JANSEN & ANDERMANN, 2005).

PMG/PS bilateral foi a primeira síndrome de PMG a ser descrita, inicialmente definida como síndrome perisylviana congênita bilateral (KUZNIECKY, et al., 1993). A anormalidade é geralmente simétrica mas varia em extensão entre os pacientes. O córtex cerebral sobre as bordas e na profundidade da fissura sylviana é espesso e anormalmente dobrado. A fissura sylviana é frequentemente mais verticalizada e orientada para a região posterior do lobo parietal quando comparada com o controle normal (KUZNIECKY, et al., 1993). Em uma série de 31 pacientes, Kuzniecky e colaboradores definiram o fenótipo clínico como caracterizado por sinais pseudobulbares com diplegia de face, faringeal e de músculos mastigatórios (paresia facio-glossofaringeana), sinais piramidais e déficits cognitivos variando de moderado a grave em 85% dos pacientes. Epilepsia foi identificada em 87% dos pacientes com diferentes tipos de crise, sendo de difícil controle em mais da metade dos casos. O envolvimento pseudobulbar resulta em restrição de movimentos da língua, distúrbio de deglutição e mastigatórios, e disartria. A dissociação de movimentos faciais voluntários pode estar presente (KUZNIECKY, et al., 1993). Distúrbios na aquisição e desenvolvimento da linguagem podem estar associados com PMG/PS bilateral, e sua gravidade depende da extensão da lesão cortical (GUERREIRO, et al., 2002). Existe aqui também grande variabilidade na apresentação clínica, sendo que em membros da família de pacientes com PMG, foram observadas anormalidades neurológicas características de PMG/PS bilateral, porém com exame de RM normal. Este aspecto pode ser explicado pela heterogeneidade de achados histológicos presentes na PMG, em que a desorganização cortical sutil pode resultar em mudanças estruturais possivelmente não detectáveis ao exame de RM pelas técnicas atuais (GUERREIRO, et al., 2000; BORGATTI, et al., 1999).

Em uma série de 9 pacientes com **PMG bilateral em região parassagital e mesial do córtex parieto-occipital**, Guerrini e colaboradores (GUERRINI, et al., 1997) relataram epilepsia em todos os casos, de início na primeira década de vida e com difícil controle em 7 pacientes. As crises eram parciais com ou sem automatismos presentes. O exame neurológico foi normal em todos os pacientes. Os scores de QI variaram de inteligência mediana até moderado retardo mental. Os autores concluíram que o diagnóstico precoce deste tipo de PMG pode apresentar dificuldades pela falta de sinais neurológicos e início relativamente tardio dos episódios de crise.

Na **PMG generalizada bilateral**, PMG ocorre com distribuição generalizada. porém a região mais gravemente afetada é a região perisylviana. Ventriculomegalia e redução volumétrica da substância branca estão comumente associados. Pacientes com PMG generalizada bilateral têm graus variados de atraso motor e cognitivo, hemiparesia espástica ou quadriparesia e epilepsia. Chang e colaboradores relataram 12 pacientes com PMG generalizada bilateral, nos quais epilepsia ocorria em 10, e variava em idade de início, tipo e gravidade (CHANG, et al., 2004). A maioria dos pacientes têm anormalidades congênitas associadas tais como macrocefalia, defeito em membros, baixa implantação das orelhas, macrostomia, hipotireoidismo, e surdez neuro sensorial (CHANG, et al., 2004).

Na **PMG unilateral** características clínicas incluem hemiparesia espástica com envolvimento primário de extremidade superior, grau variável de retardo mental, e epilepsia. A maior parte dos pacientes têm crises generalizadas e desenvolvem crises focais com o curso da doença. O controle das crises é variável (PASCUAL-CASTROVIEJO, et al., 2001; HAYAKAWA, et al., 2002). Guerrini e colaboradores relataram uma série de 9 pacientes (2 bilateral, 7 unilateral) com PMG e status epiléptico durante o sono (ESES) com crises de prognóstico favorável (GUERRINI, et al., 1998). Em uma série de 15 pacientes, Ohtsuka e colaboradores confirmaram que pacientes com PMG de localização unilateral tendem a desenvolverem ESES ou epilepsia relacionada à localização da lesão (OHTSUKA, et al., 2002). É bem conhecida a associação entre malformação cortical e epilepsia, como também é sabido que a maior parte dos pacientes com MDC sofrem de crises refratárias. Alguns pacientes com PMG localizada em um único hemisfério podem apresentar epilepsia com espícula-onda contínua durante o sono não REM (status elétrico durante o sono) (OHTSUKA, et al., 2002).

Na PMG perisylviana o início das crises é variável, podendo ocorrer no período neonatal, infantil precoce ou tardio ou crises na fase adulta. Os espasmos infantis são mais freqüentes na PMG difusa (OHTSUKA, et al., 2002). Gropman e colaboradores em estudo com 12 pacientes que apresentavam PPBC concluíram que a epilepsia não é uma característica freqüente na população pediátrica e, quando ocorre, tem início num período mais tardio (GROPMAN, et al., 1997; CARABALLO, et al., 1999).

A PMG focal unilateral ou bilateral pode estar associada com epilepsia occipital. Nesse caso, as crises têm início na primeira ou segunda década de vida, manifestando-se como crises parciais complexas com automatismo, e caracteristicamente há ausência de sintomatologia com ictus visual (TAYLOR, et al., 2003). Em alguns pacientes, a PMG focal pode resultar em manifestação clínica e eletrencefalográfica semelhante a da epilepsia com espículas centrotemporais. De forma geral, a PMG perisylviana cursa com quadro epiléptico mais brando (podendo até estar ausente) quando comparado a outras formas de MDC, como por exemplo, as displasias corticais focais e os erros de migração neuronal (MONTENEGRO, et al., 2002).

1.5- Neuroimagem

Nos últimos dez anos grande progresso tem ocorrido no diagnóstico das MDC, especialmente pelo melhor reconhecimento destas, através de métodos de imagem como a ressonância magnética. A RM particulariza aspectos da variação, distribuição e espessura de sulcos corticais, destacando diferenças de intensidade de sinal entre substância branca e cinzenta, fato que permite o reconhecimento de diferentes padrões de MDC.

A PMG muitas vezes não é detectada nos exames de RM de rotina com imagens spin-echo porque os giros são muito pequenos ou porque se encontram fundidos e de difícil visualização. Além disso, o aspecto de córtex irregular pode ser confundido com a paquigiria, giros amplos e de aparência fina, conforme já citado anteriormente. As aquisições volumétricas em 3D, gradiente echo com cortes finos (1 a 1,5 mm) e avaliação em 3 planos (reformatação multiplanar) são freqüentemente necessárias para detectar

pequenas irregularidades na junção substância cinzenta e branca. A análise multiplanar consiste na avaliação visual interativa do parênquima cerebral, adquirido através da RM volumétrica. Esta técnica permite que se inspecione detalhes da estrutura cerebral através da análise simultânea dos giros cerebrais em diferentes planos de secção (MONTENEGRO, et al., 2002). Anomalia da drenagem venosa é comum em áreas com polimicrogiria, especialmente em regiões onde o córtex de aparência fina se dobra. Estes vasos, quando vistos neste contexto, não devem ser considerados como malformação vascular e a angiografia não está indicada (BARKOVICH, et al., 1996).

Na PMG difusa, o cérebro se apresenta de aspecto liso. Pacientes com esta forma grave de comprometimento tipicamente são microcefálicos e frequentemente têm retardo mental ou crises convulsivas com início em torno do 6° -8° meses de vida pós-natal. A maioria dos pacientes com PMG difusa, apresenta infecção congênita por citomegalovírus. Nestes pacientes, a RM mostra um córtex fino (tipicamente com 5 a 7mm) com superfície interna e externa de aspecto irregular. Os ventrículos são alargados e a substância branca hipomielinizada (BARKOVICH, et al., 1996).

Ocasionalmente, ocorre alteração de sinal na substância branca sugestivo de gliose ou desmielinização (LEVENTER, et al., 2000). Alguns autores sugerem que a mielinização das fibras subcorticais e intracorticais causa mudanças na aparência espessa ou fina do córtex polimicrogírico (TAKANASHI, et al., 2003). A PMG/PS bilateral tem apresentação clínico-radiológica variável e requer seqüências específicas e cortes finos de imagens ponderadas em T1, como gradiente echo ou *inversion recovery*, para sua visualização apropriada e diagnóstico.

1.6- Aspectos genéticos

Achados na PMG/PS bilateral

Muito se tem avançado no conhecimento das doenças do desenvolvimento cortical pelos estudos de famílias informativas e pacientes isolados com rearranjos cromossômicos ou deleções. Tais estudos têm demonstrado inequivocamente a base genética para algumas dessas doenças.

A primeira delimitação de PMG/PS bilateral familiar foi dada por Andermann e Andermann em 1996, mais recentemente, Guerreiro e colaboradores relataram a ocorrência familiar da PMG/PS bilateral num estudo multicêntrico que reuniu 12 famílias (GUERREIRO, et al., 2000). Diferentes padrões de herança foram sugeridos para PMG /PS bilateral, no entanto em 75% das famílias a herança é compatível com ligada ao X (JANSEN & ANDERMANN, 2005). A investigação sistemática de membros da família de pacientes com quadro clínico de PMG/PS bilateral levou a identificação de indivíduos assintomáticos que apresentaram na investigação de neuroimagem, PMG parietal posterior bilateral. Estes indivíduos tinham em sua maioria, história prévia de atraso de linguagem ou moderada disartria. A PMG/PS bilateral apresenta espectro clínico e de neuroimagem muito amplo sendo possível que fatores ambientais, tais como os encontrados na forma difusa de PMG, atuem em conjunto com fatores genéticos para determinar os diferentes fenótipos nas formas familiares de PMG.

Estudos recentes, utilizando análise de ligação gênica, mapearam um locus no cromossomo Xq28 em 5 famílias com uma forma ligada ao cromossomo-X da PMG/PS bilateral. Os pacientes destas famílias apresentaram tipicamente um quadro cognitivo variado, epilepsia, sinais pseudobulbares e distúrbio de linguagem. Duas das 5 famílias apresentaram microcefalia nos indivíduos com PMG. Os indivíduos do sexo masculino apresentaram quadro clínico mais grave quando comparado aos indivíduos do sexo feminino (VILLARD, et al., 2002).

PMG fronto-parietal bilateral

Nesta forma clínica, um locus foi mapeado no cromossomo 16q12.2-21 em 2 famílias palestinas não relacionadas e que apresentavam pais consanguíneos e não afetados e membros da prole afetados com PMG frontoparietal bilateral sugerindo herança autossômica recessiva. O quadro clínico apresentado pelos indivíduos afetados é semelhante ao quadro apresentado pelos pacientes com PMG/PS bilateral acrescido de sinais cerebelares, sinais piramidais e esotropia. Os achados de RM são uma redução de volume da substância branca e cinzenta e ventriculomegalia além da PMG simétrica e frontoparietal (PIAO, et al., 2002).

Posteriormente o gene *GPR56*, um gene que codifica um receptor de proteína G, foi identificado no cromossomo 16q12.2-21, como o responsável pela malformação. Os autores deste achado, identificaram 8 mutações independentes no gene *GPR56* em 22 pacientes examinados e confirmados clínica e radiologicamente, pertencentes a 12 famílias de origem franco canadense (PIAO, et al., 2004). Análises do padrão de expressão do gene *GPR56* sugerem que GPCR (G protein coupled receptor) desempenha um papel importante no padrão de regionalização do córtex cerebral humano. *GPR56* é expresso em células precursoras neuronais em todas as idades, porém não existe expressão clara em neurônios pós-mitóticos. A expressão de *GPR56* em células precursoras neuronais e a observação de que na PMG fronto-parietal bilateral a maior parte das regiões corticais gravemente afetadas são extremamente finas implica que *GPR56* deve regular o desenvolvimento cortical por atuar no início do desenvolvimento e afetar o destino final da célula. Contudo, um papel para o *GPR56* na migração neuronal não pode ser completamente descartado (PIAO, et al., 2004). A identificação de *GPR56* como um gene envolvido no desenvolvimento normal do córtex fronto-parietal sugere que alguns genes em cérebros humanos devem desempenhar um programa espécie-específico para a geração de neurônios corticais que são destinados a regiões específicas do córtex cerebral (RAKIC P, 2004). Além disso, mutações em genes específicos podem atingir a proliferação celular apenas em regiões da zona ventricular embriogênica subjacentes a estas áreas corticais afetadas. Portanto, esta zona proliferativa consiste de uma população heterogênea de células progenitoras que formam um “protomap” mais propriamente uma superfície uniforme de células equipotentes (RAKIC P, 1988). O domínio N-terminal que define *GPR56* é único para animais que têm um córtex cerebral. Isto sugere que *GPR56* não é apenas essencial durante o desenvolvimento e regionalização do córtex cerebral humano, mas também tem sido chave para estudos da evolução do córtex humano (PIAO, et al., 2004).

Portanto, estudos funcionais de *GPR56* trará esclarecimentos não apenas para as causas de PMG mas também para os mecanismos do desenvolvimento cortical normal e a padronização regional do córtex cerebral.

Na PMG generalizada bilateral há relatos na literatura sugestivos de herança autossômica recessiva baseados em achados de consangüinidade entre familiares de pacientes afetados. Estudos de ligação excluíram, nestas famílias, o locus da PMG fronto

parietal. Portanto, se conclui que PMG generalizada bilateral e PMG fronto parietal bilateral são entidades distintas do ponto de vista de genótipo e fenótipo, embora não seja possível descartar heterogeneidade genética para PMG generalizada bilateral (JANSEN & ANDERMANN, 2005).

PMG na síndrome de deleção 22q11.2

A deleção submicroscópica do cromossomo 22q11.2 é a mais conhecida deleção intersticial encontrada nos seres humanos e tem incidência de 1/4000 nascidos vivos. Dentre as deleções, 5 a 10% são herdadas (SCAMBLER, et al., 2000). Há relatos na literatura que associa a deleção 22q11.2 com mais de 80 tipos diferentes de malformações, combinando níveis variáveis de gravidade e produzindo um fenótipo que inclui a síndrome velocardio facial, DiGeorge e síndrome malformativa cardíaca conotruncal. Do ponto de vista embriológico, estas síndromes malformativas têm origem em distúrbio na histogênese das células da crista neural derivadas do 3^o e 4^o arcos branquiais. Modelos animais onde se observa disrupção das células da crista neural, sugerem que a haploinsuficiência resultante da deleção, de alguma maneira afeta este grupo de células ou suas interações (SCAMBLER, et al., 2000). A região cromossômica de localização em 22q11.2, também conhecida como região DiGeorge, está sendo inteiramente sequenciada e vários genes já foram localizados no intervalo da deleção (SCAMBLER, et al., 2000). Apesar deste esforço, nenhum gene, até o momento, foi inequivocamente relacionado a patogênese desta síndrome. Há na literatura descrição de 11 pacientes com PMG e que apresentam síndrome da deleção 22q11.2 (SCAMBLER, et al., 2000; SZTRIHA, et al., 2004; BINGHAM, et al., 1998; EHARA, et al., 2003; KAWAME, et al., 2000; CRAMER, et al., 1996; BIRD, et al., 2000; GHARIANI, et al., 2002). Outras malformações cerebrais tais como: atrofia, hipoplasia ou agenesia de corpo caloso, cisto em septo pelúcido, holoprosencephalia dentre outras, já foram associadas a deleção do 22q11.2 embora tanto a PMG como estas outras malformações sejam consideradas de baixa ocorrência na síndrome de deleção do 22q11.2 (TAKANASHI, et al., 2003; BARKOVICH, et al., 2001).

Em recente trabalho, Zollino e colaboradores (ZOLLINO, et al., 2003) descreveram uma translocação t(1;12)(q44;p13.3) segregando em 9 membros de uma família com uma síndrome que apresentava PMG. Neste caso, todos os pacientes que

apresentaram a translocação (7 pacientes) em graus variáveis apresentaram dismorfismos faciais e/ou déficit cognitivo. Porém, 5 pacientes com a translocação não apresentaram PMG associada ao quadro. Os autores justificaram que nesta família, os diferentes fenótipos com e sem PMG foram causados por segregação recíproca não balanceada da translocação materna balanceada. Ou seja, os 2 pacientes com PMG e grave retardo mental, eram monossômicos para 1q44qter e trissômicos para 12p13.3pter.

Um importante estudo colaborativo europeu que reuniu 558 pacientes com deleção em 22q11.2, observou que 8% dos pacientes morreram devido a complicações decorrentes de cardiopatia congênita e 62% dos pacientes sobreviventes, apresentavam um desenvolvimento normal ou dificuldade moderada no aprendizado. Anormalidades neurológicas foram observadas em 8% dos pacientes. Em 3% dos sobreviventes se observou anormalidade cerebral estrutural e em nenhum deles PMG foi encontrada (RYAN, et al., 1997). Portanto, neste estudo, a PMG foi considerada uma manifestação pouco comum da síndrome de deleção do cromossomo 22q11. Fica claro, que o real papel da deleção em 22q11 na etiologia da PMG ainda é bastante controverso e o mecanismo pelo qual tal anormalidade cromossômica opera é obscuro. Uma hipótese sugere que um mecanismo isquêmico operaria na síndrome de deleção 22q11.2 (BARKOVICH, et al., 2001). Portanto, um distúrbio circulatório como efeito indireto da microdeleção. Outros autores enfatizam que ainda não temos resposta para o questionamento se anomalias cerebrais na deleção 22q11.2 são devido a um defeito genético primário ou são o resultado de mecanismos vascular e circulatório (TAKANASHI, et al., 2003). No entanto, é bem provável que esta e outras regiões cromossômicas contenham genes cuja haploinsuficiência causaria desordens do desenvolvimento cortical.

PMG e Mutação no gene *MECP2*

PMG/PS bilateral foi descrita em um paciente do sexo masculino que apresentava encefalopatia neonatal grave cuja irmã tinha características clássicas da síndrome de Rett. Ambos os pacientes apresentavam mutação no gene *MECP2* localizado na região Xq28, sugerindo que mutações nesse gene poderiam estar implicadas na PMG/PS (GEERDINK, et al., 2002). Além disso, a região candidata previamente descrita por Villard

e colaboradores na região Xq28 (VILLARD, et al., 2002), engloba a localização do gene *MECP2*, reforçando o seu possível papel na etiologia da PMG/PS. O gene *MECP2* possui 2 domínios funcionais: o domínio metil CpG e um outro, identificado como domínio de repressão transcricional. Este último, interage com o grupo de histonas H3 e H4. Interações entre este complexo repressor e a cromatina ligada ao *MECP2* leva a deacetilação do grupo de histonas e consequentemente a repressão transcricional (BIENVENU, et al., 2002). Esta via bioquímica sugere que o *MECP2* desempenha um papel importante na regulação da expressão gênica (TUDOR, et al., 2002).

Relação entre esquizencefalia, PMG e mutação no gene *EMX2*

EMX2 é um fator de transcrição que age como gene regulatório. O gene *EMX2* de camundongo é homólogo ao gene na *Drosófila* que, quando mutado, é responsável pelo desenvolvimento de defeitos na segmentação do cérebro (GULISANO, et al., 1996; CECCHI, et al., 2000). Mutações em heterozigose no gene homeobox *EMX2* localizado no cromossomo 10q26.1 foram relatadas em alguns pacientes esporádicos e em casos familiares com esquizencefalia (BRUNELLI, et al., 1996; FAIELLA, et al., 1997). Como a relação entre PMG e esquizencefalias ainda é obscura e ambas as malformações podem fazer parte de um mesmo espectro clínico (BARKOVICH, et al., 1992; GUERREIRO, 2002), mutações em *EMX2* poderiam estar presentes em pacientes com PMG.

1.7- Justificativa para o estudo

Foi somente há pouco mais de uma década, começaram à ser definidos os aspectos clínicos e de neuroimagem das PMG (KUZNIECKY, et al., 1993) e bem mais recentemente os aspectos etiológicos, incluindo genéticos começaram a ser estudados (BORDARIER, et al., 1992; GUERREIRO, et al., 2000; BORGATTI, et al., 1999; CARABALLO, et al., 2000). Desse modo, existem ainda várias questões em relação ao real espectro clínico e de neuroimagem das diferentes formas de PMG, sua frequência relativa dentro das MDCs, e o valor das contribuições genéticas na etiologia das PMGs (incluindo aqui a frequência de recorrência familiar, de alterações citogenéticas e moleculares.

O diagnóstico precoce da PMG perisylviana é difícil em função do amplo espectro de manifestações clínicas tais como epilepsia que poderá não estar presente, sinais pseudobulbares e graus variados de déficit cognitivo. Ocasionalmente apenas a alteração de fala pode aparecer, enquadrando-se dentro dos distúrbios específicos do desenvolvimento da linguagem (DEDL). Uma outra dificuldade adicional diz respeito ao fato de que a PMG muitas vezes não é detectada nos exames de RM de rotina com imagens spin-echo necessitando de seqüências específicas e cortes finos de imagens. A identificação precoce do DEDL e sua adequada classificação e tratamento, pode minimizar o impacto que este distúrbio causa no desenvolvimento global da criança, e também prevenir ou minimizar o impacto de outras alterações, como o distúrbio de leitura e/ou de escrita, que posteriormente poderão estar presentes.

O conhecimento das manifestações lingüísticas de crianças com DEDL e a identificação precoce do referido distúrbio em outros membros de uma mesma família contribuem para a eficácia terapêutica e direcionamento do processo de intervenção nestas famílias.

Finalmente, consideramos que o esclarecimento das bases genéticas envolvidas nas PMGs, deverá contribuir para novas perspectivas de diagnóstico e aconselhamento genético bem como permitir o melhor entendimento dos mecanismos básicos do desenvolvimento cortical normal.

Portanto, sendo a PMG PS uma entidade clínica de reconhecimento recente cujo diagnóstico depende de tecnologia de imagem, nosso trabalho contribui com observação clínica sistemática desses pacientes e utilização de técnicas de neuroimagem para caracterização detalhada da malformação. Ao identificar e caracterizar fenotipicamente um grande número de pacientes com PMG estamos diante de uma oportunidade singular para investigar possíveis mecanismos moleculares determinantes desta patologia utilizando ferramentas de citogenética clássica e molecular e genética molecular.

2- OBJETIVOS

Objetivo principal

Caracterização genético-clínica e molecular de pacientes com PMG

Objetivos específicos

- 1) Identificação de pacientes isolados e recorrência familiar na PMG;
- 2) Caracterização de aspectos clínicos e de neuroimagem, por RM dos pacientes com PMG;
- 3) Investigar rearranjos cromossômicos utilizando citogenética clássica;
- 4) Investigar associação entre microdeleção na região cromossômica 22q11.2 e PMG utilizando técnica de FISH;
- 5) Estudo do locus candidato para PMG PS bilateral congênita na região telométrica do cr. Xq;
- 6) Estudo do gene candidato *MECP2* por análise de ligação genética na região Xq28 em pacientes com PMG
- 7) Pesquisa de mutações no gene candidato *EMX2* em pacientes com PMG;
- 8) Estabelecer correlações entre os achados fenóticos: clínicos e de neuroimagem com achados do genótipo: caracterização citogenética e molecular.

3- MATERIAL E MÉTODOS

1- Aspectos éticos

Os indivíduos selecionados para este estudo foram convidados a participar mediante a assinatura de um formulário de consentimento pós-informação. Para assegurar que toda a manipulação da informação clínica e molecular fosse confidencial, amostras de sangue e de DNA, bem como formulários de avaliação clínica foram identificados por um código comum, designado no momento em que o indivíduo aceitou entrar no estudo. Eventuais informações geradas durante a realização deste estudo e que tenham implicações na confirmação diagnóstica de indivíduos sintomáticos, foram comunicadas e discutidas com os profissionais responsáveis pelo acompanhamento dos pacientes. Dados para serem utilizados em diagnóstico preditivo de indivíduos assintomáticos, com risco de desenvolverem a doença, não foram gerados por este estudo. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM – UNICAMP (protocolo nº 383/2000) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa- CONEP, anexo II (protocolo 516/2001).

2- Pacientes

A identificação de pacientes com quadro clínico compatível com PMG foi realizada em ambulatório do Departamento de Neurologia da FCM-UNICAMP. Uma equipe multidisciplinar composta por: neuropediatra, fonoaudiólogo, neuropsicólogo e especialista em neuroimagem foi reunida para compor este ambulatório com o objetivo de dar uma ampla caracterização clínica para estes pacientes e assegurar uma criteriosa investigação laboratorial.

Os Critérios de inclusão no estudo foram: 1) confirmação da presença de PMG por exames de neuroimagem em pacientes com distúrbio de linguagem, e 2) disponibilidade e concordância do paciente (ou responsável) para participar da pesquisa. Os indivíduos com polimicrogiria detectada por ressonância magnética bem como seus familiares afetados ou não foram submetidos a análise laboratorial mediante consentimento informado (anexo III).

A Caracterização clínica e de neuroimagem destes pacientes foi obtida mediante critérios diagnósticos já descritos na literatura (BARKOVICH, et al., 1999; KUZNIECHY, et al., 1993). Um protocolo de avaliação clínica sistemática foi elaborado e aplicado em todos os pacientes (Anexo IV). Cada um dos pacientes foi questionado e avaliado quanto a possibilidade de recorrência familiar e heredogramas foram elaborados dando ênfase a identificação de todos os possíveis afetados.

3- Caracterização clínica dos afetados com PMG

Os pacientes foram avaliados mediante uma anamnese criteriosa guiada por um questionário previamente estruturado visando obter informações sobre evento pré-natal, evolução da gestação e parto, história pessoal e familiar de epilepsia e dados clínicos do desenvolvimento neuromotor e de linguagem. Todos os pacientes foram submetidos ao exame neurológico tradicional e seus familiares foram interrogados e avaliados. Testes neuropsicológicos foram realizados por profissionais da área utilizando a escala de inteligência Wechsler para crianças e pré-escolares: Intelligence Scale for Children-III (WISC-III) (FIGUEIREDO, 2002) Wechsler preschool and Primary Scale of Intelligence (WPPSI) (WECHSLER, 1989) ou a escala de inteligência Wechsler para adultos-revisada: “Wechsler Adult Intelligence Scale – Revised” (WAIS-R) (WECHSLER, 1981). Os testes de linguagem foram realizados por duas fonoaudiólogas que avaliaram linguagem espontânea e conversação de acordo com um protocolo semi estruturado que caracterizou os seguintes aspectos da linguagem: fonológico, sintático, semântico, pragmático e léxico. Além disso, alguns aspectos de leitura e escrita foram também avaliados. Os testes e protocolos utilizados foram: Yavas Protocol, Peabody Picture Vocabulary Test – revised (PPVT) (YAVAS, et al., 1992), padronização brasileira realizada por Capovilla and Capovilla, teste de consciência fonológica e rendimento escolar (STEIN, et al., 1994; CAPOVILLA, et al., 2003; GREGOIRE, et al., 1997; CONDEMARIN, et al., 1989).

4- Avaliação por neuroimagem

A RM foi realizada em um aparelho Elscint Prestige de 2Tesla, segundo protocolo pré-estabelecido: (a) imagens *sagital* T1 spin-echo, 6mm de espessura (TR=430, TE=12) para orientação das imagens subsequentes; (b) imagens *coronal* T1 inversion recovery, 3mm de espessura (flip angle=200°; TR=2700, TE=14, inversion time TI=840, matrix=130X256, FOV=16X18 cm); (c) imagens *coronal* T2-weighted “fast spin echo” (FSE), 3-4mm de espessura, (flip angle=120°; TR=4800, TE=129, matrix=252X320, FOV=18X18cm), (d) imagens *axial*, 3mm de espessura (flip angle=70°, TR=200, TE=5, matrix=180X232, FOV=22X22 cm); (e) imagens *axial* T2 FSE, 4mm de espessura, (tip angle- 120°, TR=6800, TE=129, matrix 252X328, FOV=21X23cm); (f) aquisição volumétrica (3D) de imagens T1 GRE, adquiridas no plano sagital com 1 mm de espessura para reformatação multiplanar e reconstrução curvilinear, (TA=35°, TR=22, TE=9, matrix=256X220, FOV=23X25cm). As técnicas de pós-processamento mais utilizadas são a reconstrução multiplanar e reformatação curvilinear.

4.1- Reconstrução multiplanar é a análise interativa de uma aquisição volumétrica que permite a observação detalhada de regiões cerebrais específicas em diferentes planos de orientação (sagital, axial e coronal). O tempo necessário para realizar a reformatação multiplanar é variável, e depende da análise cuidadosa das imagens em três planos, simultaneamente. Como esta técnica permite a reorientação interativa dos planos de corte, o processo é demorado e pode durar até 2 horas.

4.2- Reformatação curvilinear foi desenvolvida para evitar a impressão de espessamento cortical produzida pelo efeito de volume parcial das imagens, pela inclinação oblíqua do plano de corte em relação aos giros corticais (BASTOS, 1999; BARKOVICH, 1996). O tempo necessário para delinear a superfície cerebral é de aproximadamente 5 minutos, e o processamento da imagem até que seja disponível na tela demora em média 8 a 10 minutos. A análise dos resultados depende de cada caso, e em nosso grupo a variação de tempo tem sido em torno de 20 e 30 minutos.

5- Avaliação por citogenética clássica e molecular

A análise citogenética clássica (cariótipo) dos pacientes com PMG foi realizada no laboratório de Citogenética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. A técnica de cultura utilizada foi a de Moorehead (MOOREHEAD, et al., 1960) (anexo VI) onde cultura de linfócitos de sangue periférico é estimulada com fitohemaglutinina e células em metáfase são inibidas com colchicina, hipotonizadas, fixadas e coradas com Giemsa para obtenção de banda G (SANCHES, et al., 1973). Finalmente analisamos o cariograma para uma verificação de aberrações numéricas e ou estruturais. O nível de resolução desta técnica é de 450 a 500 bandas cromossômicas. Objetivando a posterior execução do protocolo da técnica de FISH- Hibridização in situ por fluorescência – (Anexo VII), separamos uma suspensão celular obtida da cultura de linfócitos previamente realizada de cada paciente. Por questões técnicas, a análise de citogenética molecular (FISH) foi realizada no Hospital do Servidor Público Estadual e no Instituto de Oncologia Pediátrica (IOP) da Escola Paulista de Medicina-UNIFESP em função da disponibilidade do equipamento necessário a realização do FISH, tal como o microscópio de epifluorescência e do sistema automático de análise por imagem “Cytovision”. A Hibridização in situ (FISH) é um método coadjuvante da citogenética clássica onde uma sonda de seqüência única se hibridiza com a seqüência homóloga no DNA genômico do cromossomo metafásico ou núcleo interfásico. O DNA alvo, após fixação, é desidratado com solução salina e etanol e aquecido para desnaturar a dupla fita, transformando-se em fita única. Este DNA alvo fica disponível para o pareamento com a seqüência complementar da sonda, que é fita única, igualmente desnaturada e marcada com fluorocromo o que permite a visualização posterior sob microscopia eletrônica. O que não hibridiza é removido por lavagens sucessivas com solução salina. Finalmente, a microscopia de fluorescência, permite a visualização da sonda hibridizada ao material alvo. Neste trabalho utilizamos a sonda TUPLE1 (22q11.2) visualizada ao microscópio por cor vermelha e uma sonda controle, telomérica seqüência específica de cor verde. A região encontrada comumente deletada referida como DiGeorge Critical Region (DGCR) tem 2Mb. Dentro da DGCR há uma região crítica mínima de 480-575 Kb e que contém alguns genes possivelmente responsáveis pelo fenótipo da síndrome do 22q11.2 e dentre eles o gene TUPLE1 (HIRA).

A região da sonda tem aproximadamente 120Kb o que inclui, inteiramente o gene TUPLE 1 o que permite a identificação da deleção (HALFORD, 1993; CARLSON, 1997).

6- Avaliação por técnicas de genética molecular

A extração do DNA genômico das amostras colhidas foi realizada seguindo o protocolo descrito a seguir. Amostras de 10 a 20 ml de sangue venoso foram colhidas dos indivíduos selecionados para estudo. As amostras são centrifugadas à 1900 rpm por 10 minutos e os leucócitos da parte intermediária são transferidos para um tubo de polipropileno em fundo cônico. Em seguida, soluções de RSB 1X (até completar um volume de 11ml) e 60µl de Nonidet são adicionadas. A solução é então centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Adiciona-se 3 ml de solução SDS a 10% e 60µl de proteinase K (100mg/ml) e as amostras incubadas a 37° por 24h. Após a incubação são acrescentados 3 ml de fenol, seguido de centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos e descarte da parte orgânica da solução. Esse processo é repetido com 1,5 ml de fenol e 1,5 ml de uma solução de álcool isoamílico e clorofórmio (1:24), seguido de 3 ml de uma solução de álcool isoamílico e clorofórmio (1:24). O DNA genômico é então precipitado com 6 ml de etanol absoluto. Esse método propicia a extração de grande quantidade de DNA (acima de 700µg a partir de 20 ml de sangue venoso).

O DNA genômico foi amplificado pela técnica de PCR (polymerase chain reaction). As condições de PCR para os exons do gene *EMX2* foram estabelecidas: desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, temperatura de anelamento específica para cada par de primers por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguido de extensão final a 72°C por 10 minutos. Informações sobre os primers do *EMX2* foram obtidas da literatura (NOONAN, et al., 2001). Os produtos amplificados não ultrapassam 300 pares de base. Desta forma, a técnica de escolha para triagem das mutações foi o SSCP (Single Stranded Conformation Polymorfism, que se baseia na conformação secundária do DNA de fita simples sendo considerada técnica eficiente para triagem de mutações cujos fragmentos estão entre 150 a 300 pb. O gene *EMX2* possui 3 exons e abrange uma região genômica de 7.10Kb. O RNAm possui 2.892 pb com uma

região codificante de aproximadamente 756pb (LACCONE, et al., 2001). A figura abaixo mostra a posição dos primers na região codificante do gene *EMX2*. A tabela 1 sumariza a seqüência dos primers e temperaturas de anelamento utilizadas para amplificação do gene *EMX2*.

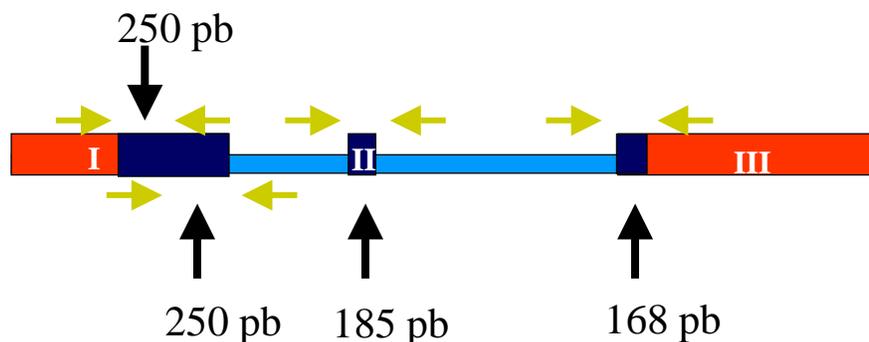


Figura 1- Esquema do gene *EMX2*, posição e seqüência dos primers. A área em cor azul, representa o domínio homeobox.

Tabela 1- Primers utilizados para amplificação do gene *EMX2*.

Primers	Seqüência	Ta(C°)
E2.1	5'- ACAAACGAGTCCCCAATTCTCGTCC - 3'	63 C°
E2.2	5'- AACACCAAGTCCGGGTTGGAGTAGA - 3'	63 C°
E2.3	5'- AATCCGTTCTCAACGGCTTCCAC - 3'	63 C°
E2.4	5'- CTTGGAAGCGATGACCCAGATATCG - 3'	63 C°
E2.5	5'- CCTAATGGGATTTCTGCTGTGCTCC - 3'	63 C°
E2.6	5'- TTGAGACATACATCCCGACCCAG - 3'	63 C°
E2.7	5'- AAGAACTAACGCACCCCATCTGCCT - 3'	63 C°
E2.8	5'- TGCTCCATGTTGTCCGTTTCTGTGG - 3'	63 C°

A triagem de mutações do gene *EMX2* foi realizada pela técnica de SSCP como citado anteriormente. Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram desnaturados por aquecimento a 95°C durante 5 a 10 minutos e em seguida foram submetidos a eletroforese, com temperatura ambiente, em gel não desnaturante de poliacrilamida com concentração de 6% e volume final contendo 5% de glicerol. A migração da fita de DNA no gel não desnaturante é dependente da sua conformação secundária que, por sua vez, é dependente da seqüência de nucleotídeos. Alteração na seqüência de nucleotídeos, altera o padrão de migração no gel. O padrão das bandas foi detectado por autoradiografia dos fragmentos marcados radioativamente pela incorporação de nucleotídeos trifosfato marcados com P33 durante a reação de PCR. A reação de PCR e o SSCP foram realizados em duplicata para afastar qualquer dúvida sobre o posicionamento da banda ou um possível falso positivo ocasionado por adição de uma base errada na reação de PCR. Utilizamos também a técnica de coloração com prata para a procura por mutações no gene *EMX2*. A descrição do protocolo de coloração encontra-se no anexo VIII desta tese.

7- Estudo de ligação genética

7.1- Seleção dos marcadores de DNA

Após extração de DNA pelo método fenol-clorofórmio, realizamos PCR e genotipagem utilizando marcadores moleculares microssatélites marcados com radioisótopo P³³ ou com fluoróforos. Esses marcadores foram selecionados utilizando mapas genéticos detalhados de microssatélites localizados no cromossomo X (GENETHON®, 1998 e www.ncbi.nlm.nih.gov). A seleção dos marcadores teve como base: o PIC (“polymorphism information content”), levando-se em consideração, apenas aqueles com valor superior a 75% e com intervalo não superior a 10 centiMorgans entre dois marcadores. Neste projeto cobrimos a região candidata descrita por Villard e colaboradores (VILLARD, et al., 2002) que é a mesma região que contém o gene *MECP2*. (Figura 2)

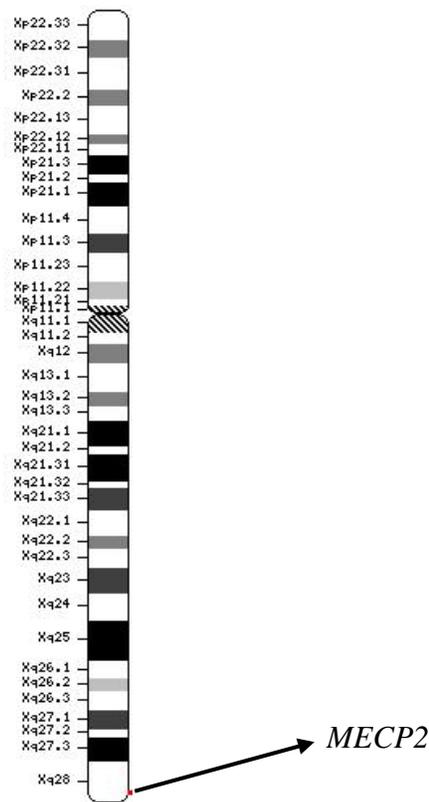


Figura 2- Ideograma mostrando a região Xq28 onde está localizado o gene *MECP2*.

7.2- Amplificação por PCR

Os fragmentos de DNA genômico foram amplificados pela técnica de PCR (polymerase chain reaction) utilizando-se os “primers” apresentados na tabela 5. Os “primers específicos para a amplificação da região repetitiva de cada microssatélite foram sintetizados e as condições ideais de PCR foram estabelecidas para cada par. A eletroforese foi realizada em um gel desnaturante de poliacrilamida a 6%. Em cada canaleta aplica-se o produto da reação em cadeia da polimerase previamente misturado a 8µl de “stock solution”(tampão de formamida, azul de bromofenol) e desnaturado a 95°C por dois minutos. A eletroforese é feita a 1500 volts, 45 miliamperes e 60 watts. O tempo de corrida depende do tamanho do fragmento. Posteriormente o gel é transferido para um papel de grande porosidade, passa por secagem a uma temperatura de 80°C por hora e é exposto em um filme radiográfico na câmara escura. O tempo de exposição depende da relação entre a

meia vida do radioisótopo e o tempo em que ele já está em uso (em média 72 horas). O produto de PCR migra do polo negativo para o positivo. Sob ação da fonte de energia, fragmentos menores migram mais rápido. Pelo fato do gel ser desnaturante as fitas de DNA mantêm-se separadas. Indivíduos do sexo masculino (hemizigotos) e sexo feminino (homozigotos) apresentam apenas uma banda em função de estarmos analisando marcadores do cromossomo X. Alelos diferentes são designados por indicadores diferentes para diferenciá-los. Depois do tempo de exposição apropriado o filme é revelado, fornecendo o padrão característico de bandas escuras que são genotipadas.

Tabela 2- Primers utilizados para amplificação dos marcadores das regiões candidatas

PRIMER	Genethon (cM)	Cr
DXS1192	155.80	<u>Xq27.1</u>
DXS1227	164.70	<u>Xq27.2</u>
DXS8106	173.60	<u>Xq27.3</u>
DXS8084	174.70	Xq27.3
DXS8073	174.70	Xq27.3
DXS8043	176.70	<u>Xq27.3</u>
DXS8028	177.50	Xq27.3
DXS1200	179.80	<u>Xq27.3</u>
DXS998	183.80	<u>Xq27.3</u>
DXS8091	186.30	<u>Xq28</u>
DXS8086	187.70	Xq28
DXS8069	190.40	Xq28
DXS8103	192.50	Xq28
DXS1073	196.50	Xq28
DXS8087	198.10	Xq28

7.3- Genotipagem manual (leitura dos alelos)

A leitura dos alelos é realizada por meio da identificação dos indivíduos das famílias no filme revelado, correspondendo aos heredogramas. Após esta etapa determinamos o padrão de comportamento das bandas dos alelos no filme, pois cada marcador tem um padrão diferente de corrida eletroforética. Os alelos que possuem um tamanho menor em relação aos outros migram mais facilmente no gel que os alelos maiores, os quais migram com mais dificuldade. Os alelos são então numerados de acordo com esta corrida eletroforética, completando portanto a genotipagem.

7.4- Genotipagem automática dos marcadores microssatélites: para alguns marcadores, os produtos de PCR marcados com P³³ foram analisados manualmente, porém os marcados com fluoróforos foram analisados automaticamente utilizando o seqüenciador automático "MegaBACE 1000[®]" e os picos encontrados, identificados através do programa FRAGMENT PROFILE. O programa LINKGEN processa os resultados da genotipagem. Estes resultados processados são utilizados para realização de análise de ligação genética de dois pontos e múltiplos pontos com o auxílio dos programas MLINK e LINKMAP disponíveis no pacote de programas LINKAGE. O programa LINKGEN, que processa os resultados da genotipagem, foi desenvolvido em nosso laboratório e atualmente encontra-se em fase de registro na Universidade Estadual de Campinas.

7.5- Análise dos dados

Para a análise dos dados utilizamos métodos paramétricos de análise de ligação genética, através do cálculo de *Lod scores* de dois pontos pelo programa de computador *LINKAGE*, já citado anteriormente. Em resumo: arquivos contendo a informação genealógica, clínica e genotipagem dos marcadores são criados utilizando a ferramenta *Makeped*. Em seguida são construídos arquivos contendo informações a respeito do modo de herança, frequência gênica e frequência dos alelos dos marcadores genotipados. Tal

arquivo, também chamado de arquivo de parâmetros, é construído utilizando a ferramenta *Prelink* do programa *LINKAGE*. Em seguida o cálculo do *Lod score* é automaticamente realizado para diferentes valores de fração de recombinação baseado no método de “*maximum likelihood*”. **Para doenças com herança ligada ao sexo**, *Lod scores* iguais ou acima de 2,00 indicam confirmação de ligação (probabilidade 1:1000 em favor de ligação) e *Lod scores* menores ou iguais a -2,00 excluem ligação (probabilidade de 1:100 contra ligação). Uma vez que o *Lod score* tenha valores de $Z_{\max} \geq 2,00$, o passo seguinte é o refinamento desta região com a genotipagem de marcadores adicionais e a construção de haplótipos, o que permitirá identificar pontos de recombinação cromossômica que serão fundamentais para a identificação final do gene envolvido.

4- RESULTADOS

1- Caracterização da amostra

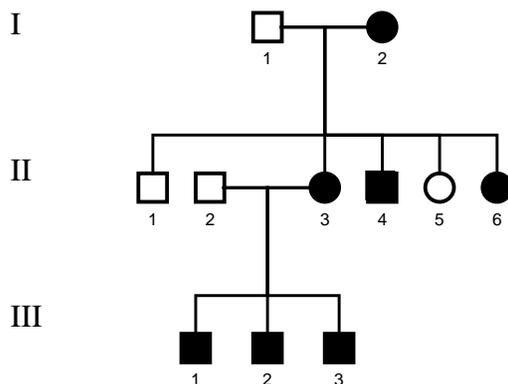
Os dados apresentados neste trabalho foram coletados no período compreendido entre março de 2003 a fevereiro de 2005, no ambulatório do Departamento de Neurologia da FCM-UNICAMP. Este ambulatório supracitado, vem desenvolvendo trabalhos nesta linha de pesquisa desde 2000, cujos resultados estão apresentados na literatura (GUERREIRO, et al., 2000; GUERREIRO, et al., 2002; MONTENEGRO, et al., 2002; BRANDÃO-ALMEIDA, et al., 2003; BRANDÃO-ALMEIDA, et al., 2004). Os pacientes inicialmente atendidos eram informados sobre o objetivo do trabalho e convidados a participarem do projeto mediante consentimento esclarecido e informado. O passo seguinte era a anamnese detalhada e exame neurológico para a caracterização clínica e decisão sobre a necessidade de exames complementares tais como ressonância magnética e agendamentos para avaliação fonoaudiológica e neuropsicológica. Neste período, examinamos um total de 75 pacientes. Destes, 32 foram identificados e confirmados por meio de RM como apresentando PMG. Em 5 famílias não relacionadas, observamos recorrência da PMG em 18 indivíduos (figura 3). Os 14 pacientes restantes eram casos isolados de PMG. A idade dos indivíduos variou de 4 a 65 anos. Um total de 22 pacientes eram do sexo masculino e 10 eram do sexo feminino. Um perfil amostral dos pacientes com PMG pode ser encontrado na tabela 3.

Tabela 3- Perfil amostral dos pacientes com PMG

Perfil amostral		
Indivíduos examinados		75
Afetados confirmados PMG		32
Casos familiares PMG		18
Idade		4-65
Sexo	Masc.	22
	Fem.	10

Masc= masculino, Fem= feminino

Família 1



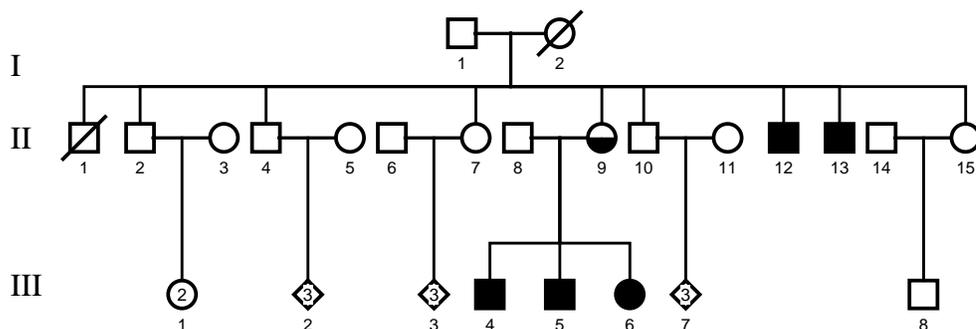
Afetados com PMG



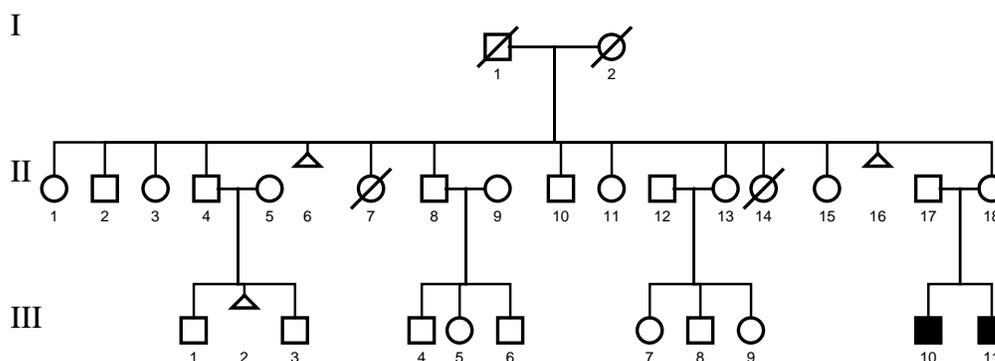
Atraso de linguagem



Família 2 . Indivíduo II-9 apresenta CT normal



Família 3



Família 4: Indivíduo I-2 apresenta RM normal



Família 5: Indivíduos II-4, II-5 e III-7 apresentam RM normal

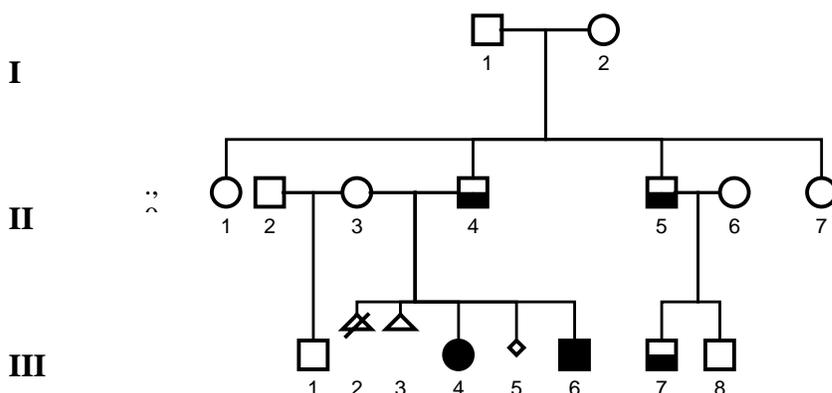


Figura 3- Heredograma das famílias de indivíduos afetados com PMG

Em 13 pacientes com PMG, houve relato de evento prenatal caracterizado por: hipertensão gravídica (3), uso de droga anti-epiléptica (2), uso de droga ilícita (2), ameaça de abortamento, tal como sangramento transvaginal no primeiro trimestre da gestação (3), febre (1) e gemelaridade em dois casos. Em nossa amostra, verificamos história de consanguinidade em um único casal com filho afetado por PMG. Epilepsia foi observada em 6 pacientes. Em 5 deles a polimicrogiria tem localização perisylviana bilateral, em apenas 1 caso a localização é unilateral. Em 2 dos casos com extensão para regiões fronto-parietal, região frontal em outro, 1 caso confinado a fissura sylviana e outros 2 com

extensão para região parietal posterior. O tipo de crise destes pacientes foi definido pela história clínica unicamente e o padrão das crises caracterizado de acordo com critérios da Liga Internacional contra epilepsia (ILAE, 1989) . Os tipos de crise foram identificados como: Tônico-Clônica Generalizada (TCG), Parcial Complexa (PC) e Espasmo Infantil (EI). A idade média para o início das crises variou de 8 meses a 13 anos. Dos 6 pacientes com história de epilepsia, 4 estão sem crises há pelo menos 5 anos e sem uso de droga antiepiléptica (DAE) e apenas 2 permanecem em uso de DAE e mantêm um bom controle das crises. O exame físico destes pacientes não revelou características dismórficas em nenhum deles. O exame neurológico tradicional se mostrou normal em 9 pacientes com PMG. Hemiparesia foi observada em 3 pacientes, dupla hemiparesia e microcefalia em 1 paciente e microcefalia sem déficit neurológico em 1 paciente. Sinais pseudobulbares foram identificados em 23 pacientes. Particularmente estes sinais se caracterizam por dificuldade de mobilização da língua, protrusão e/ou lateralização ou incoordenação oromotora. Os achados dos testes fonoaudiológicos e neuropsicológicos repercutiram estas dificuldades, uma vez que os pacientes apresentaram, em sua maioria, distúrbios de linguagem e baixo QI verbal a despeito de uma melhor performance no QI de execução. As tabelas 4 e 5 abaixo resumem os achados clínicos e avaliações fonoaudiológica e neuropsicológica respectivamente.

Tabela 4- Achados clínicos e avaliação fonoaudiológica de indivíduos com PMG

Indivíduos com PMG			
Presença de Epilepsia			6
Evento pré-natal			13
Avaliação fonoaudiológica (30 pacientes)	Distúrbio de linguagem	Oral	19
		Escrita (dislexia)	8
		Normal	3
Exame neurológico	Normal		9
	Sinais Pseudobulbares		23
	Hemiparesia		3
	Microcefalia		2
	Dupla hemiparesia		1

Tabela 5- Achados de avaliação neuropsicológica de indivíduos com PMG

Indivíduos com PMG		
Avaliação neuropsicológica (28 pacientes)		
QI de execução	QI deficiente	2
	QI limítrofe	8
	QI médio	10
	QI médio inferior	3
	QI médio superior	5
QI verbal	QI deficiente	3
	QI limítrofe	2
	QI médio	7
	QI médio inferior	6
	Não obtido	10

2- Achados de neuroimagem por RM

Em nossa série identificamos, por meio de RM, a presença de PMG PS bilateral em **28 pacientes**, sendo que em 1 deles a polimicrogiria se estendeu comunicando a superfície cortical com a luz ventricular, apresentando bordas justapostas, o que caracteriza uma esquizecefalia de lábios fechados. Somente **1 paciente** apresentou PMG unilateral, com localização perisylviana parietal posterior à direita. PMG com região perisylviana normal foi observada em **3 pacientes**, envolvendo regiões frontais em 2 deles e parietais posteriores em 1 deles. A PMG PS se estendeu para a região parietal posterior em 9 pacientes; para a região fronto-parietal em 5 pacientes e para a região frontal em 1 paciente. (tabela 6).

Tabela 6- Achados de RM

Ressonância Magnética de Crânio	
PMG/PS- Bil.	12
PMG/PS- Bil./ Esquizencefalia	1
PMG/PS- Par. Post. Bil.	9
PMG/PS- Fr. Bil.	1
PMG/PS- Fr. Par. Bil.	5
PMG/PS- Par. Post. Unil. Direita	1
PMG – Fr. Bil. (PS nl)	2
PMG – Fr. Par. Post. Bil. (PS nl)	1
TOTAL	32

Bil=bilateral; Par=parietal; Post=posterior;
Fr=frontal; nl=normal

As tabelas 7 e 8 abaixo resumem os dados pertinentes aos 32 pacientes com diagnóstico de PMG confirmados por RM. A tabela 7 apresenta os dados das 5 famílias. Os demais pacientes, que constituem os casos não familiares, estão representados na tabela 8. Tomografia computadorizada foi realizada em apenas um indivíduo (II-9, tabela 7) que infelizmente não pôde realizar RM por utilizar prótese metálica de fêmur. Em resumo, os resultados de RM de nosso estudo revelaram: 28 pacientes com PMG/PS de envolvimento bilateral com variável extensão aos lobos adjacentes, sendo que em um deles observamos esquizencefalia de lábios fechados. Em 1 paciente identificamos PMG/PS unilateral. Os outros 3 pacientes têm o córtex da fissura Sylviana normal com PMG frontal bilateral em 2 e acometimento fronto-parietal posterior bilateral em 1 paciente.

Tabela 7- Resumo dos dados clínicos de famílias com recorrência de polimicrogiria

Família	Pt	Idade (anos)	Sexo	Aquisição Linguagem	Evento Prenatal	QIE / QIP	Avaliação Linguagem	Crise: id/tipo	Frequência crise	Exame neurológico	RM/TC*
1	I-2	65	F	Normal		102/83	Normal			Normal	PMG PS Bil
	II-3	42	F	Normal		93/80	Dislexia			Normal	PMG PS (Bil Par Post)
	II-4	39	M	Atraso		79/NO	DL	13a/TCG	livre	SPB	PMG PS Bil Fr.
	II-6	35	F	Normal		NR	NR			Normal	PMG PS (Bil Par Post)
	III-1	20	M	Atraso	Hipertensão	74/57	DL			SPB	PMG PS Bil
	III-2	16	M	Atraso		95/97	Dislexia			Normal	PMG PS (Bil Par Post)
	III3	9	M	Atraso		97/93	Dislexia			Normal	PMG PS (Bil Par Post)
2	II-9	44	F	Normal		87/73	Dislexia			SPB	Normal (TC*)
	II-12	36	M	Atraso		109/82	Normal			SPB	PMG PS Bil
	II-13	35	M	Atraso		NR	NR			SPB	PMG PS Bil
	III-4	19	M	Atraso		123/101	Dislexia			SPB	PMG PS Bil
	III-5	14	M	Atraso		82/84	Dislexia			SPB	PMG PS Bil
	III-6	9	F	Atraso		112/87	DEL			SPB	PMG PS Bil
3	III-10	12	M	Atraso		84/66	DEL			SPB	PMG PS (Bil Par Post)
	III-11	6	M	Atraso		90/59	DEL			SPB	PMG PS (Bil Par Post)
4	II-1	15	M	Atraso	Gemelaridade	73/47	DL	6a/TCG	livre	SPB	PMG PS (Bil Fr-Par)
	II-2	15	M	Atraso	Gemelaridade	104/109	Normal			SPB	PMG PS (Bil Fr-Par)
5	II-4	44	M	Normal		116/95	Dislexia			Normal	Normal
	II-5	35	M	Normal		113/90	Dislexia			Normal	Normal
	III-4	9	F	Atraso	DAE	113/105	Dislexia			Normal	PMG Bil Par-Post (PS-nl)
	III-6	7	M	Atraso	DAE	89/NO	DEL	4a/TCG	controle	Hemiparesia direita+ SPB	PMG PS (Bil Par Post)
	III-7	5	M	Atraso		122/124	DEL			Normal	Normal

Tabela 8- Resumo dos dados clínicos de pacientes com polimicrogiria (casos isolados)

Pt/ Idade Anos/ sexo	Aquisição Linguagem	Evento prenatal	QIP / QIV	Avaliação Linguagem	Crise/Idade/tipo	Frequência Crise	Sinais pseudobulbares	Exame neurológico	RM
1/11/F	Atraso	Uso de droga	90/NO	DEL	Não		-	Normal	PMG PS Bilateral
2/14/M	Atraso	-	79/67	DEL	Não		+	Alterado	PMG PS Bilateral
3/10/M	Atraso	-	110/54	DEL	8me/PC/TCG	Livre	+	Alterado	PMG PS Bilateral
4/8/F	Atraso	Ameaça abortamento	57/NO	DL	Não		-	Normal	PMG PS Bilateral
5/13/M	Atraso	-	78/59	DEL	Não		+	Alterado	PMG PS Bilateral
6/10/M	Atraso	Febre 20a. semana	91/88	DEL	Não		+	Hemiparesia direita	PMG PS Bilateral + esquizencefalia
7/10/M	Atraso	Sangramento vaginal	79/64	DEL	Não		+	Alterado	PMG PS Bilateral Par-Post
8/8/M	Atraso	Hipertensão	80/NO	DL	Não		-	Normal	PMG PS Bil Par- Post
9/15/M	Atraso	Sangramento vaginal	NR	NR	Não		+	Microcefalia	PMG PS Bil Fr- Par
10/12/M	Atraso	Hipertensão	110/99	DEL	Não		+	Alterado	PMG PS Bil Fr- Par
11/5/F	Atraso	-	NR	NR	9me/EI,TCG	Controle DAE	+	Dupla hemiparesia, microcefalia	PMG PS Bil Fr- Par
12/8/M	Atraso	Uso de droga	86/71	DEL	18me/TCG	Livre	+	Hemiparesia esquerda	PMG PS Uni Par- Post
13/17/M	Atraso	-	63/77	DL	Não		+	Alterado	PMG Bil Fr (PS normal)
14/13/F	Atraso	-	79/60	DEL	Não		+	Alterado	PMG Bil Fr (PS normal)

Abaixo seguem imagens de RM caracterizando um exemplo correspondente a cada grupo de pacientes identificados.

2.1- Polimicrogiria perisylviana bilateral



Figura 4- Imagens sagital T1 e coronal- *inversion recovery* de um paciente (tabela. 7, paciente III-1) com polimicrogiria perisylviana bilateral

2.2- Polimicrogiria Perisylviana bilateral com esquizencefalia de lábios fechados

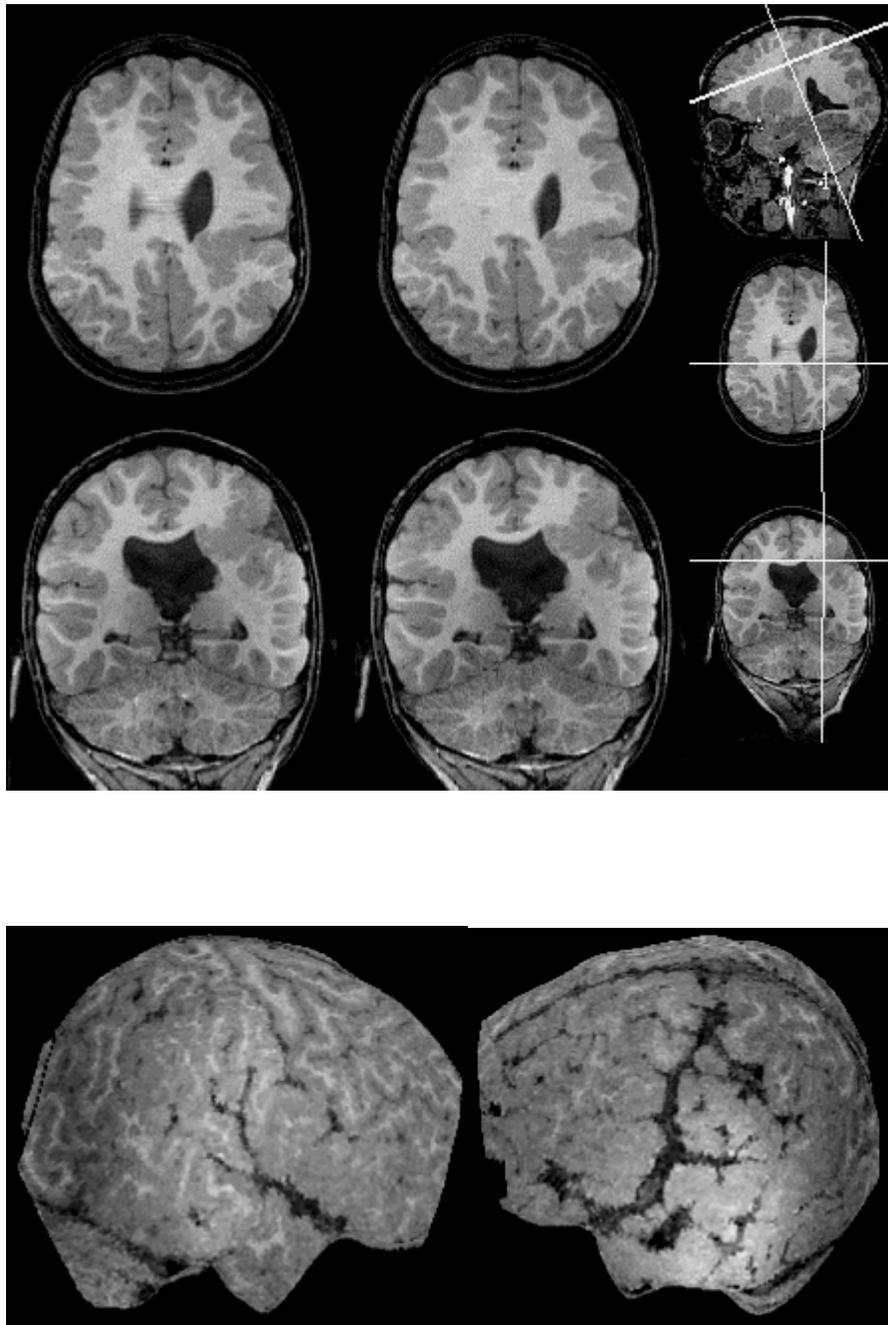


Figura 5- Reconstrução multiplanar (acima) e reconstrução curvilínea de um paciente (tabela. 8, paciente 6) com polimicrogiria perisylviana bilateral e esquizencefalia de lábios fechados à esquerda.

2.3- Polimicrogiria perisylviana parietal posterior bilateral

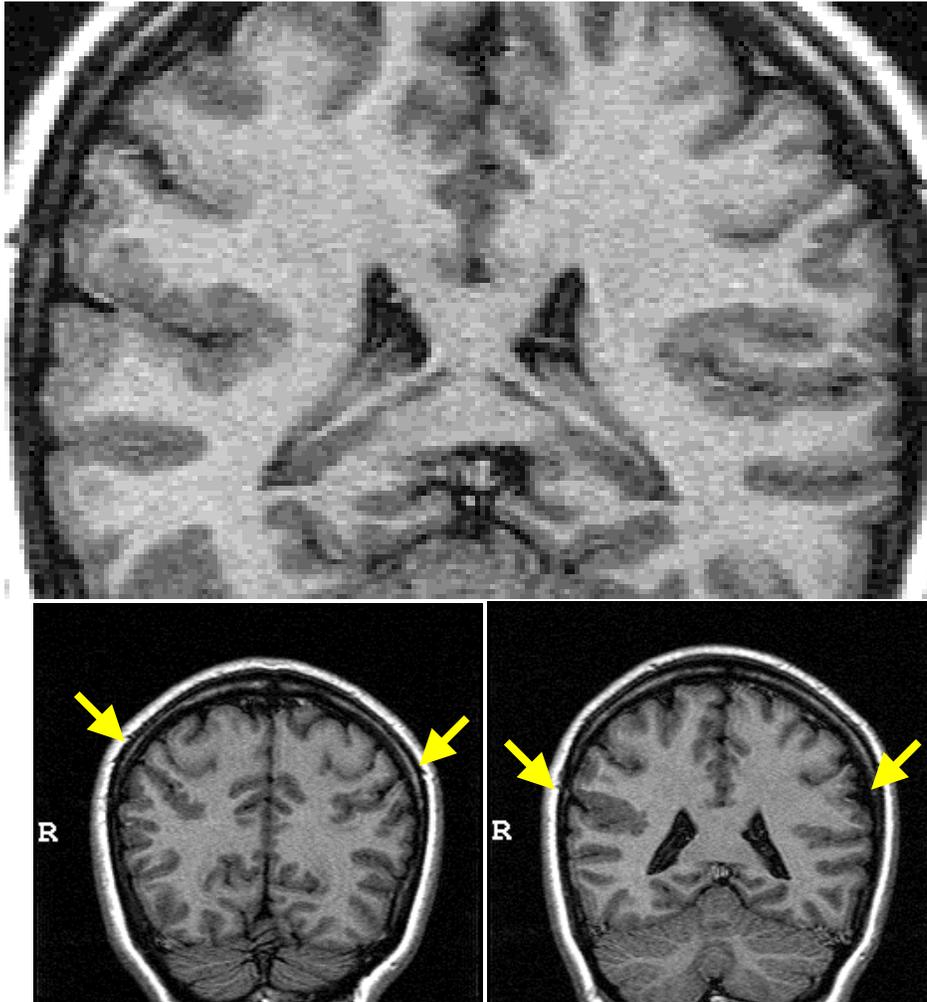


Figura 6- Imagens coronais T1-*inversion recovery* em um paciente (II-3, família 1- tabela7) com polimicrogiria perisylviana par- post bil

2.4- Polimicrogiria perisylviana fronto-parietal bilateral

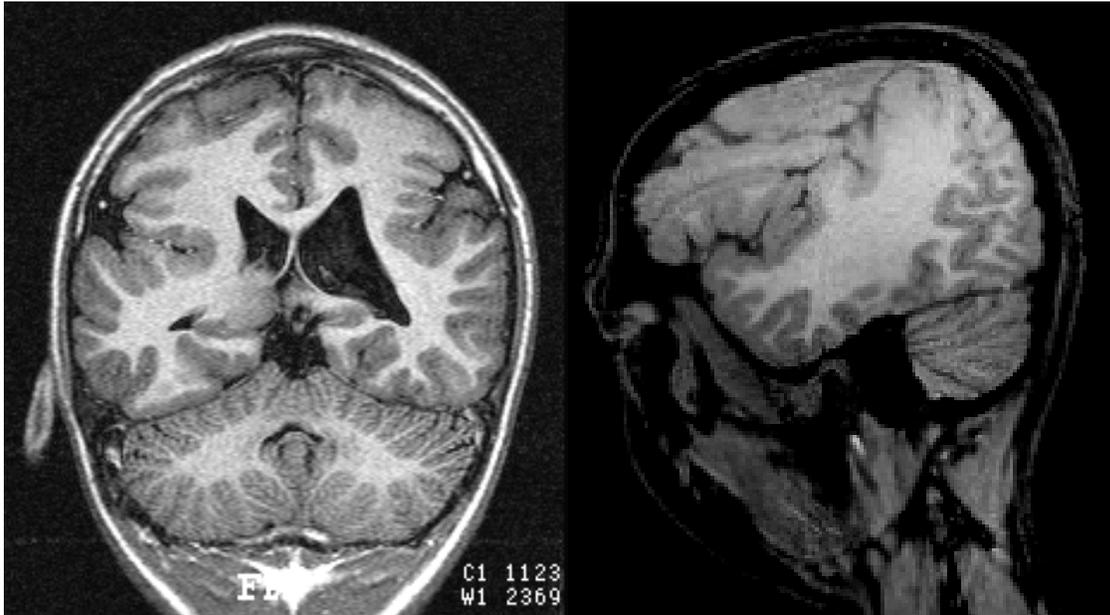


Figura 7- Imagens coronal e sagital T1 de um paciente (II-1, família 4-tabela 7) com polimicrogiria perisylviana fronto-parietal bilateral.

2.5- Polimicrogiria perisylviana parietal posterior unilateral à direita



Figura 8- Reconstrução curvilínea (acima) e multiplanar de um paciente (tabela 8- nº 12) com polimicrogiria perisylviana parietal posterior unilateral à direita.

2.6- Polimicrogiria frontal bilateral com região perisylviana normal

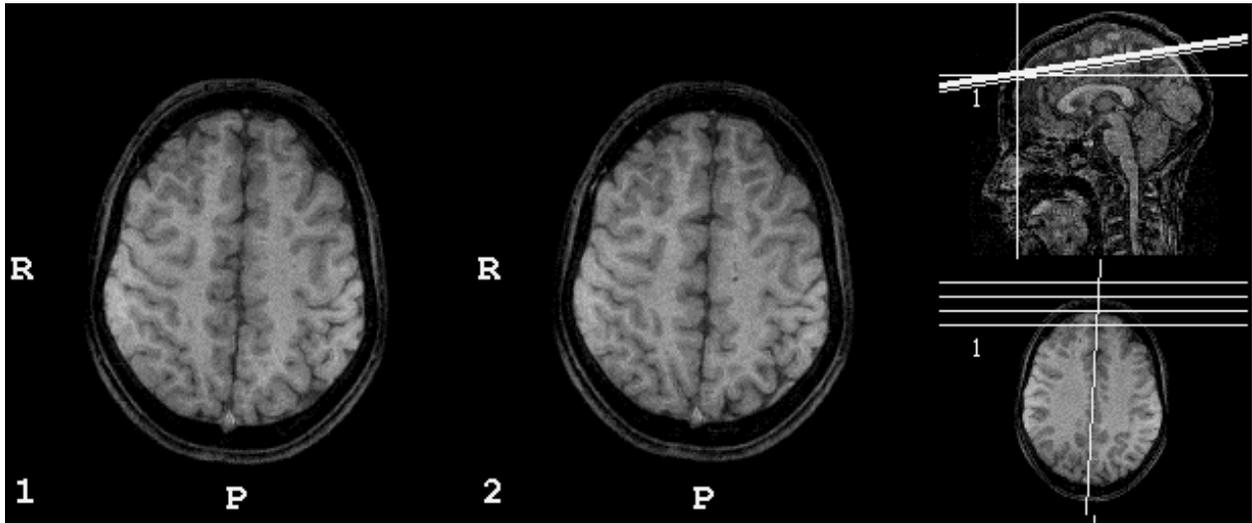


Figura 9- Reconstrução multiplanar de um paciente (tabela.8, n° 13) com polimicrogiria frontal bilateral com região perisylviana normal.

2.7- Polimicrogiria fronto-parietal posterior bilateral com região perisylviana normal

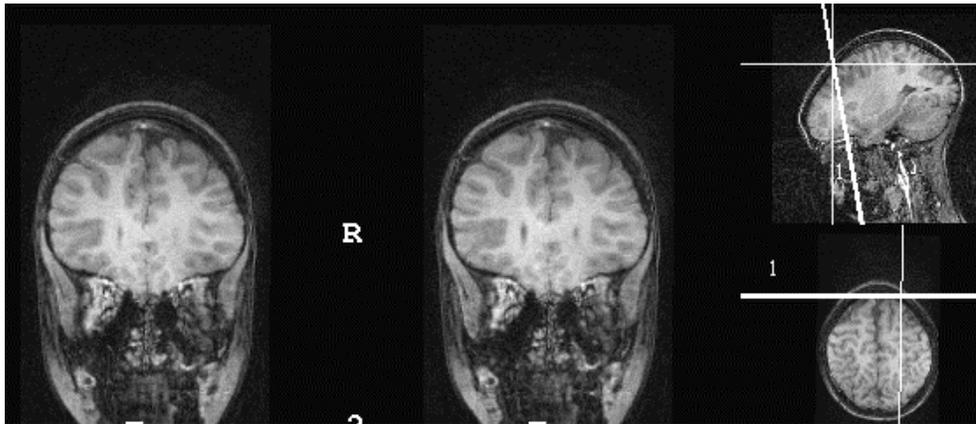
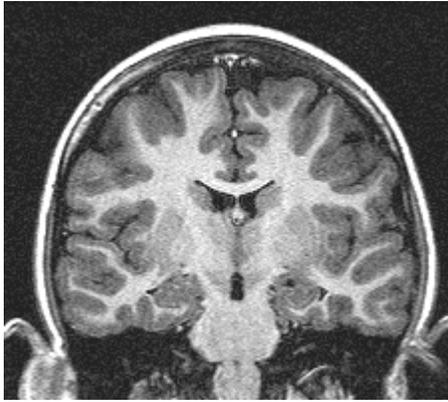


Figura 10- Imagens coronais T1 de um paciente (III-4, família 5- tabela 7) com polimicrogiria fronto-parietal posterior bilateral com região perisylviana normal.

2.8- Polimicrogria perisylviana com extensão para a região frontal bilateral

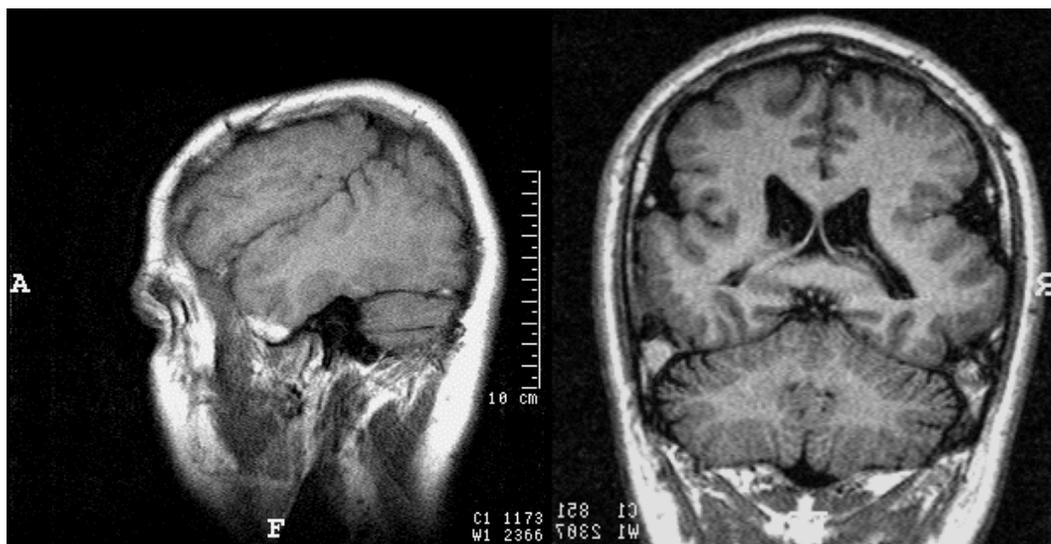


Figura 11- Imagens sagital e coronal T1 de um paciente (II-4, família 1) com polimicrogria perisylviana com extensão para região frontal bilateral.

3- Análise da variação fenotípica intra-familiar

Família 1. Os indivíduos I-2 e III-1 da figura 12, apresentam o mesmo tipo de polimicrogria: PMG/PS bilateral extensa, no entanto, o indivíduo III-1 apresenta quadro clínico expressivo, tal como sinais pseudobulbares e distúrbio de linguagem. Apesar da ampla extensão do acometimento cortical de I-2, este apresenta exame neurológico, avaliação neuropsicológica e de linguagem normais. Os indivíduos II-3, III-2 e III-3 apresentam PMG/PS parietal posterior bilateral, sendo que a única expressão clínica nestes pacientes é um distúrbio de linguagem caracterizado por dislexia. O indivíduo II-6 também apresenta PMG/PS parietal posterior bilateral, porém não foi avaliado do ponto de vista da linguagem. Quanto ao indivíduo II-4, a PMG acomete amplamente a fissura Sylviana com extensão frontal bilateral e este indivíduo apresenta como maior característica, um distúrbio de linguagem importante levando-o a uma incapacidade de expressão verbal tal como ocorre com o indivíduo III-1 com a diferença que neste último, a região frontal é normal.

Observa-se que as mulheres afetadas têm uma expressão mais branda (embora variável) do fenótipo. O padrão de herança nesta família é compatível com herança dominante ligada ao X (abaixo, fig.12 com heredograma e RM dos indivíduos).

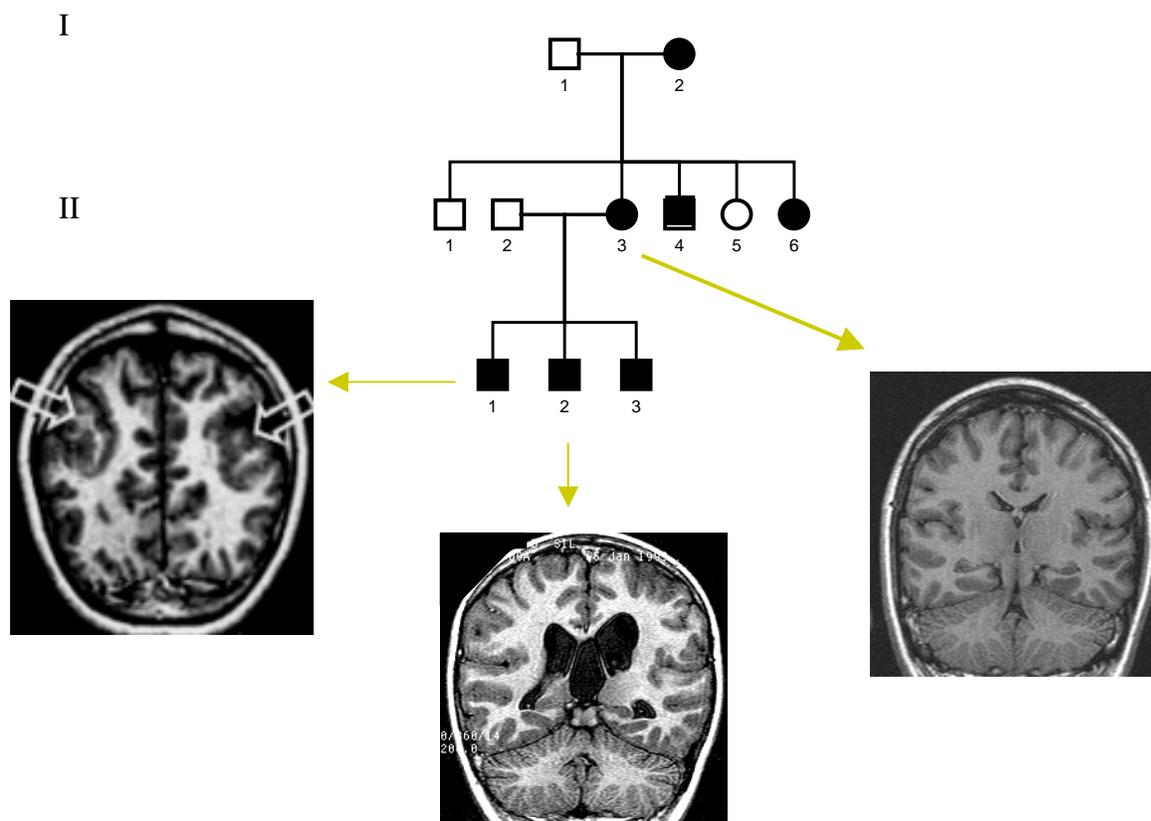


Figura 12- Família 1. Heredograma e achados de RM

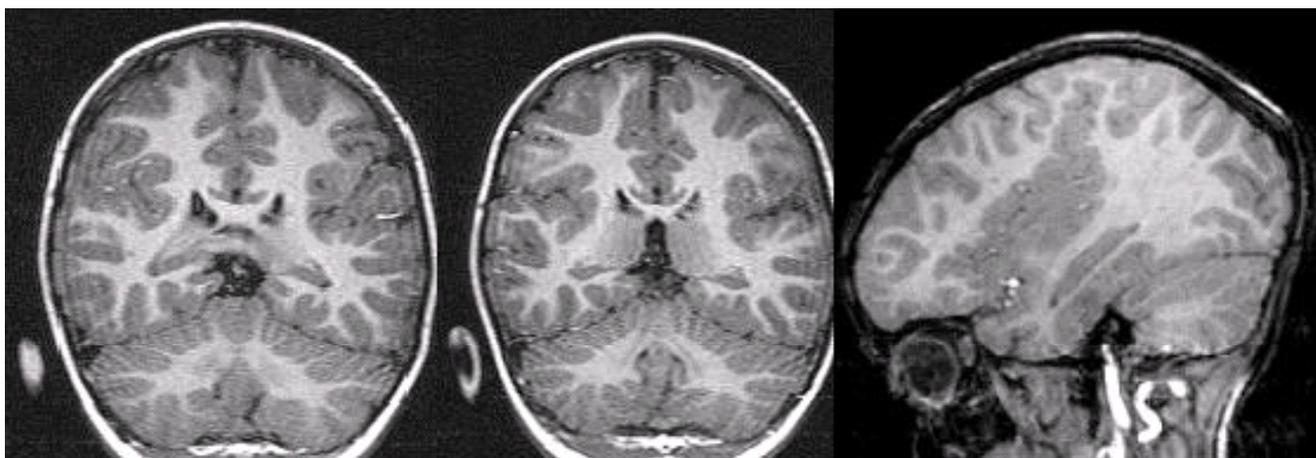
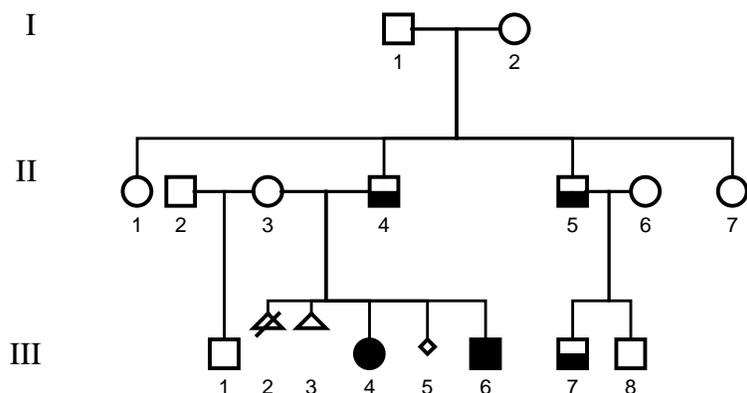
Família 2. O indivíduo II-9 não pôde fazer RM por utilizar prótese metálica. O exame de tomografia de crânio (CT) foi normal. Os indivíduos II-12, II-13, III-4, III-5 e III-6 apresentam PMG confinada a fissura Sylviana bilateralmente e exames neuropsicológicos normais. No entanto, todos os indivíduos citados, inclusive o indivíduo II-9, apresentam sinais pseudobulbares caracterizados por dificuldades, em graus variáveis, de mobilização da língua. Avaliação fonoaudiológica dos indivíduos revelou indivíduos com dislexia (II-9, III-4 e III-5), avaliação normal (II-12) e DEL (III-6). O padrão de herança é sugestivo de herança dominante ligada ao X (fig. 3).

Família 3. O indivíduo II-18 apresenta exame clínico e RM normais. Os Indivíduos III-10 e III-11 (fig.3) têm o mesmo tipo de PMG PS parietal posterior bilateral. O exame neurológico de ambos mostrou-se normal exceto pela presença de graus variáveis de sinais pseudobulbares, principalmente dificuldade de mobilização da língua. A avaliação neuropsicológica dos indivíduos afetados revelou discrepância entre o QI verbal e de execução, variando este último nas categorias de médio a médio inferior, e o QI verbal sendo deficiente para ambos. Atraso na aquisição da linguagem e DEL esteve presente nos 2 indivíduos.

Família 4. O indivíduo I-2 (fig.3) apresenta história de atraso na aquisição e desenvolvimento da linguagem. As avaliações fonoaudiológica, neuropsicológica e os exames neurológico e de RM foram normais. Os indivíduos II-1 e II-2 apresentam o mesmo tipo de PMG com semelhante acometimento em extensão cortical. O exame neurológico de ambos é normal exceto pela presença de graus variáveis de sinais pseudobulbares tais como; dificuldades de protusão, verticalização e lateralização da língua. O indivíduo II-1 apresentou epilepsia e atualmente está livre dos episódios. A avaliação fonoaudiológica evidenciou distúrbio de linguagem. Os testes neuropsicológicos deste paciente revelaram QI de execução limítrofe e QI Verbal intelectualmente deficiente. Enquanto seu irmão, igualmente afetado (II-2), apresentou desempenho normal nos exames neuropsicológico e fonoaudiológico. O padrão de herança nesta família é compatível com herança dominante ligada ao X.

Família 5. Os indivíduos II-4, II-5 e III-7 (fig. 13) apresentam avaliação neurológica e neuropsicológica normais com exames de RM normais. Porém todos eles apresentam distúrbio específico de linguagem (DEL), com alterações na linguagem escrita. Os indivíduos III-4 e III-6 apresentam acometimentos distintos de PMG bem como fenótipos variáveis. Observa-se PMG parietal posterior bilateral e região perisylviana normal no indivíduo III-4. O exame neurológico e neuropsicológico foram normais, porém a avaliação fonoaudiológica identificou dislexia. Por outro lado, os indivíduos (II-4,II-5 e III-7) que têm RM normais, também apresentaram dislexia. O indivíduo III-6 (RM fig. 13) apresenta PMG PS parietal posterior bilateral e exame neurológico caracterizado por hemiparesia à direita e sinais pseudobulbares. A avaliação fonoaudiológica revelou

significativo DEL. Os eventos observados em III-2 (1 natimorto), III-3 e III-5 (2 abortamentos) dizem respeito a episódios provocados. Nesta família, o padrão de herança é compatível com herança autossômica dominante, já que dois meninos afetados são filhos de homens também acometidos (Fig.13).



Indivíduo III-6. Imagens coronal e sagital T1 de um paciente com PMG/PS parietal posterior bilateral.

Figura 13- Família 5. Heredograma e achados de RM

4- Citogenética Clássica e Molecular

A análise citogenética clássica (cariótipo) foi realizada em 20 pacientes com PMG. Em 7 pacientes das 5 famílias e em 13 casos não familiares de PMG. Em apenas 1 paciente, caso não familiar, não foi possível realizar o cariótipo pela não aceitação da realização do exame por parte do paciente. Todos os cariótipos analisados foram normais.

A análise citogenética molecular utilizando hibridização *in situ* por fluorescência (*FISH*) foi obtida dos 20 pacientes que realizaram cariótipo. Todos apresentaram ausência da deleção pesquisada no cromossomo 22q11.2. Este aspecto pode ser visualizado na figura 14, onde se observa a presença do sinal verde identificando os 2 cromossomos 22 em uma célula metafásica e a ausência de deleção, comprovada pela presença da região crítica, corada em vermelho nos dois cromossomos.

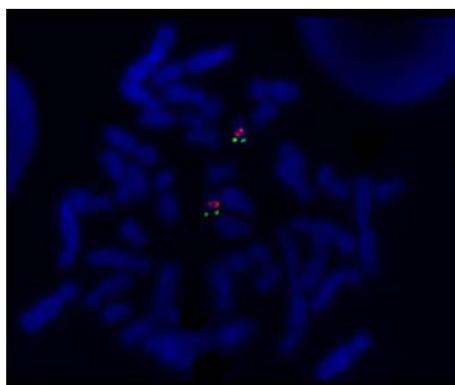


Figura 14- Célula metafásica em análise *FISH*

5- Resultados de análise de ligação

Identificamos 5 famílias com recorrência de PMG. Em 3 destas famílias (F.1, F.2, F.4) observamos que o padrão de herança era compatível com herança ligada ao cromossomo X e desta forma, partimos para os estudos de ligação na região candidata Xq28. Vale ressaltar que nosso protocolo incluiu a realização de exames de ressonância magnética (RM) em grande parte dos indivíduos envolvidos no estudo molecular (inclusive

indivíduos clinicamente assintomáticos dentro das famílias). Portanto, um trabalho preliminar intenso de avaliação clínica dos indivíduos probandos bem como de seus familiares, antecede a avaliação molecular. Ao final desta triagem clínica foram incluídas as 3 famílias para o teste da região candidata no cromossomo X (Figura 16) num total de 26 indivíduos avaliados, sendo 14 pacientes com PMG PS confirmados por RM. Os indivíduos II-6 da família 2 e I-2 da família 4 apresentam história clínica de atraso na aquisição e desenvolvimento da linguagem. Quanto ao exame neurológico o indivíduo I-2 apresenta exame normal. O indivíduo II-6 apresenta comprometimento clínico caracterizado pela presença de sinais pseudobulbares, porém sem condições de se submeter a RM conforme já notificado (uso de prótese metálica no fêmur, inviabilizando a execução da RM no momento). O indivíduo III-8 da família 1 não foi submetido ao exame de RM.

Os indivíduos II-1, II-7 e III-9 da família 1, II-11 da família 2 e I-2 da família 4 apresentam exame de RM normal. Os 26 indivíduos foram genotipados para 13 marcadores localizados nas regiões Xq27.3-q28. (DXS1192, DXS1227, DXS8106, DXS8073, DXS8043, DXS8028, DXS1200, DXS998, DXS8091, DXS8086, DXS8069, DXS8103 e DXS1073). A análise de ligação apresentou *lod score* de 2 pontos que resultaram num $Z_{max} = 3.01$ a um $\theta = 0.00$ para o marcador DXS1227 (tabela 9). A análise de ligação por múltiplos pontos, como também a análise de haplótipos, identificaram recombinações informativas centroméricas e teloméricas delimitando uma região candidata de 12 cM entre os marcadores DXS1227 a DXS8043 (Figura 15, 16 e 17). Estes resultados comprovam a ligação das 3 famílias com PMG/PS bilateral sendo o padrão de herança ligado ao cromossomo-X e localizado na região Xq27.3-q28, além de delimitar esta região a um intervalo candidato de 12cM, mais centromérico que a região descrita anteriormente por Villard e colaboradores (VILLARD, et al., 2002).

Como é possível visualizar na figura abaixo, esta nova região candidata não inclui a região delimitada anteriormente. Além disso, a tabela 9 mostra valores de lod-score negativos para a região delimitada por Villard e colaboradores (nos marcadores DXS8103 e DXS1073) mostrando que o *locus* descrito anteriormente não está determinando a doença em nossas famílias.

Dentro da região candidata examinada, podemos excluir ligação com o gene *MECP2* localizado em Xq28, conforme figura abaixo (figura 15).

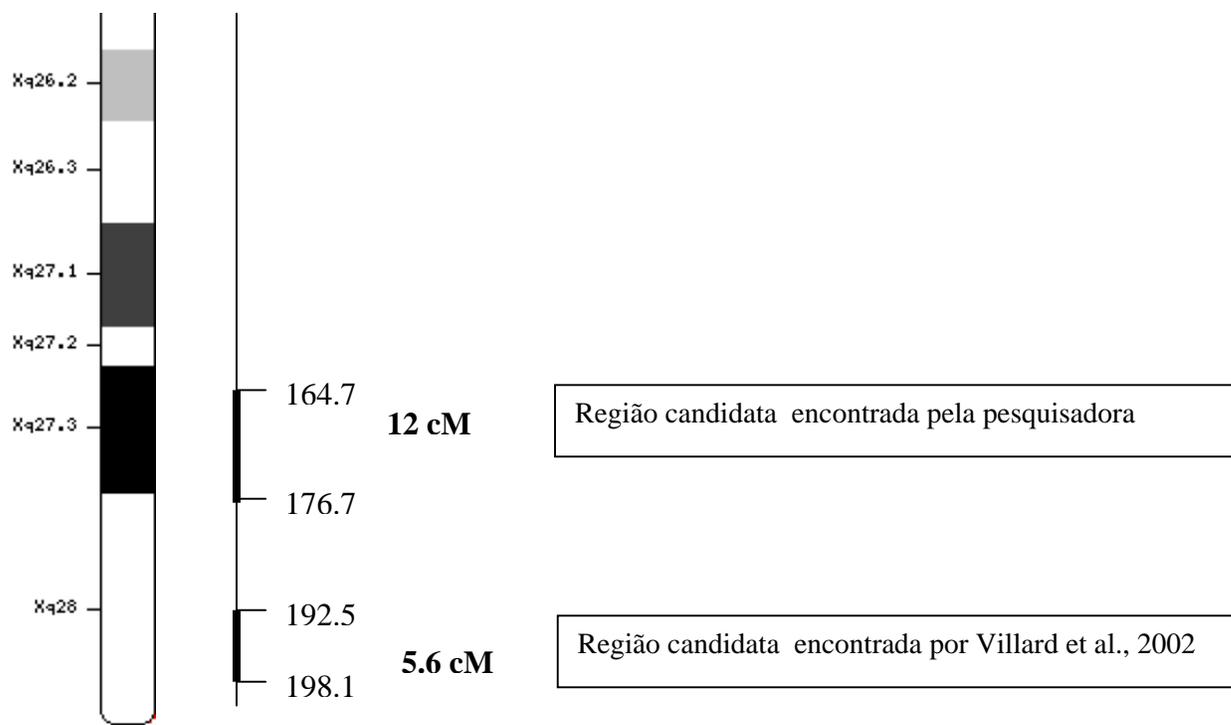
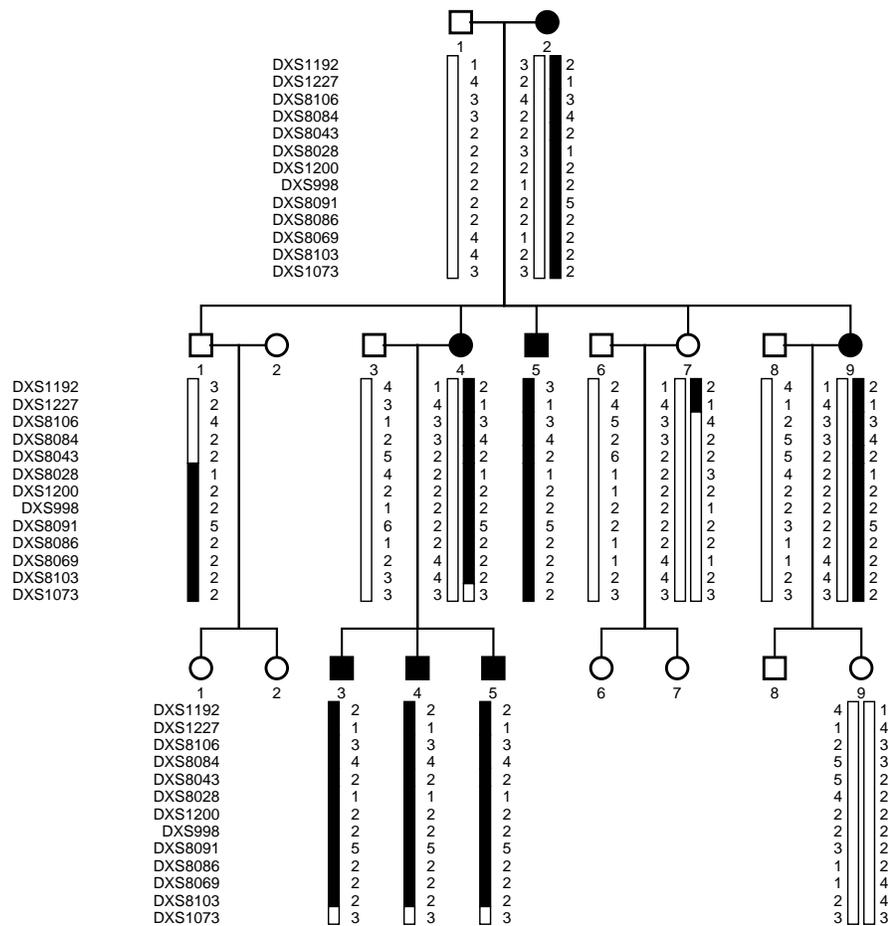
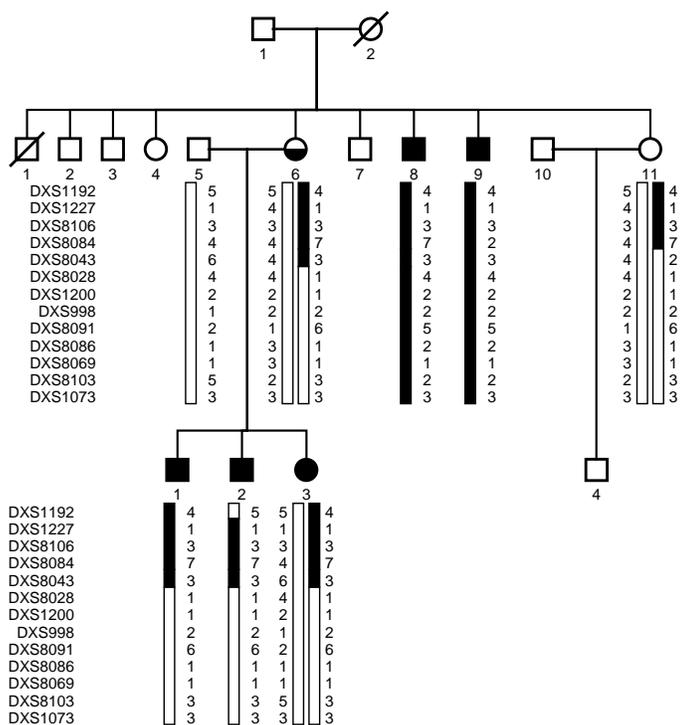


Figura 15- Localização das regiões candidatas

F.1



F.2



F4

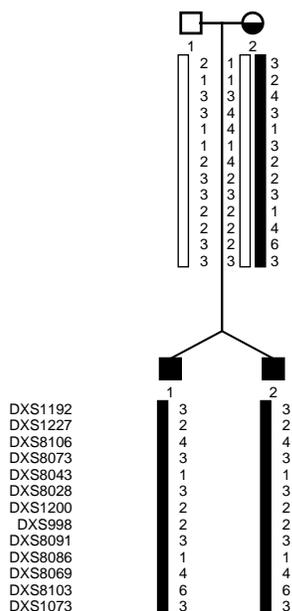


Figura 16- Haplótipos das famílias. As regiões marcadas em negrito indicam regiões comuns aos indivíduos afetados.

Tabela 9- Análise de ligação de dois pontos

PMG - X	Frequência de Recombinação									
	Marcadores	0.0	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40
DXS1192		-8.69	-2.02	-1.00	-0.48	-0.16	0.03	0.14	0.18	0.17
4		-6.50	-2.41	-1.58	-1.10	-0.78	-0.55	-0.37	-0.24	-0.13
2		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1		-2.20	0.39	0.58	0.63	0.62	0.58	0.51	0.41	0.30
DXS1227		3.10	2.81	2.52	2.21	1.89	1.57	1.24	0.91	0.59
4		1.00	0.91	0.82	0.72	0.62	0.52	0.42	0.32	0.21
2		0.30	0.26	0.21	0.17	0.13	0.1	0.06	0.04	0.02
1		1.81	1.65	1.49	1.31	1.13	0.95	0.75	0.56	0.37
DXS8106		1.04	0.91	0.77	0.64	0.51	0.38	0.26	0.16	0.07
4		0.14	0.11	0.09	0.07	0.05	0.04	0.02	0.01	0.01
2		0.30	0.26	0.21	0.17	0.13	0.1	0.06	0.04	0.02
1		0.60	0.54	0.47	0.39	0.32	0.24	0.17	0.10	0.05
DXS8084		-0.69	1.76	1.81	1.71	1.55	1.35	1.12	0.86	0.58
4		-2.50	0.12	0.32	0.40	0.42	0.40	0.36	0.30	0.22
2		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1		1.81	1.65	1.49	1.31	1.13	0.95	0.75	0.56	0.37
DXS8043		1.81	1.63	1.45	1.26	1.06	0.87	0.67	0.48	0.30
4		1.50	1.37	1.23	1.08	0.93	0.77	0.61	0.45	0.29
2		0.30	0.26	0.21	0.17	0.13	0.1	0.06	0.04	0.02
1		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DXS8073		-0.99	-1.20	-1.08	-0.72	-0.42	-0.22	-0.09	-0.01	0.03
4		-2.50	-2.57	-2.31	-1.81	-1.37	-1.02	-0.74	-0.50	-0.31
2		0.30	0.26	0.21	0.17	0.13	0.1	0.06	0.04	0.02
1		1.20	1.11	1.02	0.92	0.82	0.70	0.58	0.46	0.32
DXS8028		-0.63	1.78	1.78	1.64	1.45	1.22	0.96	0.70	0.45
4		-2.74	-0.13	0.08	0.16	0.18	0.17	0.14	0.11	0.06
2		0.30	0.26	0.21	0.17	0.13	0.1	0.06	0.04	0.02
1		1.81	1.65	1.49	1.31	1.13	0.95	0.75	0.56	0.37
DXS1200		-2.44	-0.59	-0.42	-0.36	-0.33	-0.32	-0.29	-0.24	-0.18
4		-2.74	-0.85	-0.63	-0.53	-0.47	-0.41	-0.35	-0.28	-0.20
2		0.30	0.26	0.21	0.17	0.13	0.1	0.06	0.04	0.02
1		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DXS998		0.68	0.60	0.52	0.43	0.35	0.26	0.18	0.11	0.05
4		0.08	0.07	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01	0.01	0.00
2		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1		0.60	0.53	0.46	0.39	0.32	0.24	0.17	0.10	0.05
DXS8091		-0.69	1.46	1.51	1.41	1.26	1.06	0.85	0.62	0.40
4		-2.50	-0.18	0.02	0.10	0.12	0.12	0.09	0.06	0.03
2		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1		1.81	1.65	1.49	1.31	1.13	0.95	0.75	0.56	0.37
DXS8086		-2.19	0.07	0.24	0.27	0.26	0.21	0.16	0.10	0.05
4		-2.50	-0.18	0.02	0.10	0.12	0.12	0.09	0.06	0.03
2		0.30	0.26	0.21	0.17	0.13	0.1	0.06	0.04	0.02
1		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DXS8069		3.05	2.77	2.48	2.18	1.87	1.55	1.23	0.91	0.59
4		0.95	0.86	0.78	0.69	0.60	0.51	0.41	0.31	0.21
2		0.30	0.26	0.21	0.17	0.13	0.1	0.06	0.04	0.02
1		1.81	1.65	1.49	1.31	1.13	0.95	0.75	0.56	0.37
DXS8103		-1.20	0.47	0.56	0.52	0.45	0.37	0.28	0.20	0.13
4		-2.70	-0.90	-0.68	-0.57	-0.50	-0.43	-0.37	-0.29	-0.20
2		0.30	0.26	0.21	0.17	0.13	0.1	0.06	0.04	0.02
1		1.20	1.11	1.02	0.92	0.82	0.70	0.58	0.46	0.32
DXS1073		-2.91	-1.53	-1.00	-0.71	-0.51	-0.37	-0.26	-0.17	-0.10
4		0.19	0.16	0.13	0.11	0.08	0.06	0.04	0.02	0.01
2		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1		-3.10	-1.69	-1.13	-0.81	-0.59	-0.42	-0.30	-0.20	-0.11

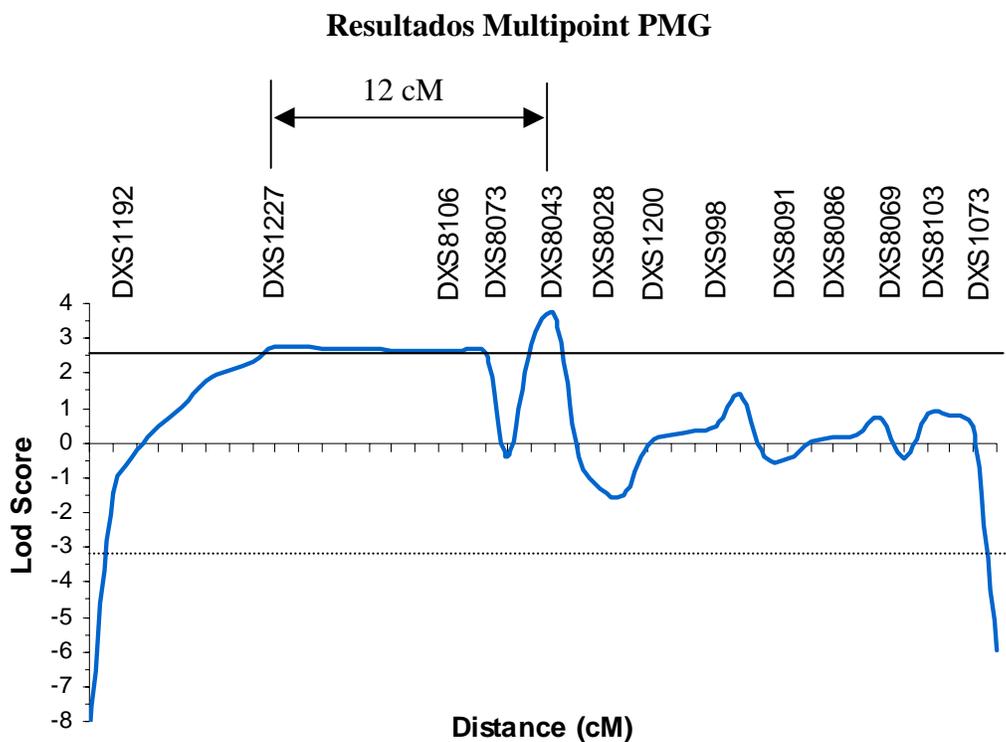


Figura 17- Análise de ligação de múltiplos-pontos. A linha contínua equivale a um intervalo de confiança de 90%.

6- Análise molecular para pesquisa de mutações no gene *EMX2*

A procura por mutações no gene *EMX2* foi realizada em 30 pacientes utilizando a técnica de SSCP. Na figura 18, observa-se em 3 exemplos de gel, após coloração com nitrato de prata, a ausência de alteração do padrão de migração visualizada nos exons 1, 2 e 3 do gene *EMX2* respectivamente .

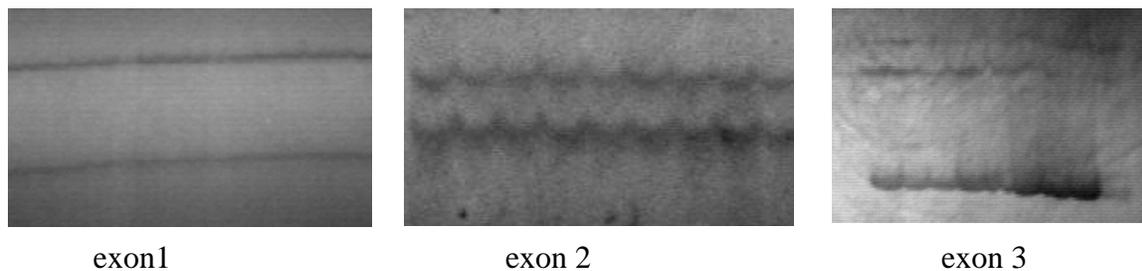


Figura 18- Exemplos de géis de poliacrilamida a 6%

5- DISCUSSÃO

Nosso trabalho reuniu um total de 32 pacientes com PMG identificados a partir de uma amostra de 75 indivíduos possivelmente afetados e que foram inicialmente estudados com base na presença de distúrbios de linguagem. Tal critério de inclusão foi estabelecido baseando-se nos achados prévios de Guerreiro e colaboradores (GUERREIRO, et al., 2002; GUERREIRO, 2002) de que tais pacientes, representavam uma classe de indivíduos com alto risco de apresentarem PMG como substrato anatômico para o distúrbio de linguagem. Estes autores apresentaram os primeiros trabalhos na literatura que avaliam pacientes com PMG a partir do distúrbio de linguagem (GUERREIRO, et al., 2002; GUERREIRO, 2002).

Aspectos clínicos

A alta incidência de lesões bilaterais na região PS tem sido utilizada como evidência de insulto vascular cortical de etiologia hipóxico-isquêmica na PMG, porém fatores tóxicos e infecciosos certamente não podem ser totalmente excluídos, particularmente nos casos de lesões unilaterais. Apesar da teoria do insulto vascular na patogênese da PMG, a ocorrência de casos familiares indicam fortemente o envolvimento de predisposição genética para o desenvolvimento da PMG (GUERREIRO, et al., 2000; MILLER, et al., 1998; BARTOLOMEI, et al., 1999; BORGATTI, et al., 1999; CARABALLO, et al., 2000). A caracterização clínica detalhada de nossos pacientes iniciou-se com uma busca por fatores pré-natais de risco que poderiam indicar uma etiologia ambiental para a PMG. Dentre outros, os principais fatores de risco pesquisados foram: evidência de infecção intra-útero, síndrome de transfusão gemelar, ou uso de drogas ilícitas durante a gravidez. É importante ressaltar que nenhuma das intercorrências gestacionais identificadas em nossa amostra, foi suficientemente grave para levar a uma interrupção espontânea da gestação, causando abortamento ou prematuridade. Dentre os 18 pacientes com recorrência familiar (tabela 7), apenas 5 relataram eventos pré-natais (22%). Em 4 desses pacientes a PMG se localizou na região PS bilateral, e em apenas 1 caso a região PS não foi acometida. Em contraste, dentre os 14 pacientes isolados com PMG, 8 relataram eventos pré-natais significativos (57%). Um desses pacientes apresentou PMG PS unilateral, um segundo PMG associada à esquizencefalia e os demais apresentaram a forma de PMG PS bilateral (tabela 8). Observa-se portanto, uma maior

prevalência de eventos pré-natais no grupo de pacientes isolados em comparação com os casos familiares. Esses dados parecem apontar para uma contribuição diferencial de fatores ambientais nas diferentes formas de PMG, indicando que o componente de predisposição genética talvez seja mais importante nos pacientes com recorrência familiar da PMG. Em nossa série 8 dos 9 pacientes com a forma de PMG PS parietal posterior bilateral, como também 7 dos 12 pacientes com PMG PS bilateral são casos de recorrência familiar indicando uma importante associação entre estes 2 tipos de PMG e predisposição genética. É possível que estes 2 tipos componham um mesmo tipo de PMG variando em espectro de gravidade no acometimento cortical. Ademais, evento pré-natal fez parte dos 2 tipos de PMG (PS bilateral e parietal posterior) indistintamente, corroborando a idéia de que façam parte de um mesmo espectro de PMG e que a predisposição genética exerça igual influência nos 2 grupos. Contrariamente ao observado por Montenegro e colaboradores que encontraram maior associação de evento pré-natal em pacientes com PMG PS bilateral quando comparado a PMG PS parietal posterior bilateral (MONTENEGRO, et al., 2001).

Avançando na caracterização do perfil fenotípico e planejando a obtenção de informações sobre possível modelo de herança envolvido na PMG, colhemos minuciosa história familiar com especial atenção para fatores como, dificuldade de aprendizado, retardo mental, problemas de linguagem, epilepsia e características dismórficas possivelmente associadas com a PMG. Nas famílias apresentadas aqui, o modelo de herança foi compatível com o ligado ao cromossomo X, exceto para a família 5 (figura 13) onde uma herança autossômica é sugerida, uma vez que 2 meninos afetados (III-6 e III-7) são filhos de homens também acometidos (II-4 e II-5), excluindo portanto a herança ligada ao X. Vale ressaltar que com os dados obtidos em nosso trabalho, uma análise de segregação formal não é possível, devido à pequena amostra disponível.

Variabilidade de manifestação clínica intra-familiar foi observada em todos os 5 casos de recorrência documentados (famílias 1-5, figura 3). Em geral, quanto maior a extensão da lesão, maior a exuberância dos sinais clínicos. Porém, não foi o que observamos no indivíduo I-2 da família 1, o qual apresenta exame neurológico normal e PMG PS bilateral e extensa (figura 12). Na família 5 (figura 13), tivemos a oportunidade de registrar uma observação clínica interessante, como relatado a seguir. O indivíduo III-4

apresenta exame neurológico normal e RM com PMG parietal posterior bilateral e região PS normal. O indivíduo III-6 apresenta RM com PMG PS parietal posterior bilateral e exame neurológico caracterizado por hemiparesia à direita e sinais pseudobulbares. O exame neurológico e RM dos indivíduos II-4, II-5 e III-7 foram normais, porém os 3 apresentam distúrbio específico de linguagem (DEL) com evolução para dislexia. Aqui fica evidente o aparecimento de heterogeneidade da manifestação clínica e do comprometimento de neuroimagem, chegando ao extremo de um indivíduo (III-4) apresentar-se como clinicamente assintomático, mas ter alteração claramente demonstrada na RM ao passo que 3 indivíduos com DEL não apresentaram alterações à RM. Estes achados podem ser explicados pelo largo espectro de comprometimento histológicos presentes na PMG, em que uma desorganização cortical sutil pode resultar em mudanças estruturais não detectáveis ao exame de RM pelas técnicas atuais de exame. No entanto, não podemos excluir totalmente, neste momento, a possibilidade de que o DEL encontrado nos 3 indivíduos sem alterações à RM seja uma associação fortuita. Com o progresso da investigação genética e a identificação de mutações gênicas específicas, poderemos ter uma idéia mais clara desse fenômeno de heterogeneidade clínica intra-familiar.

Dentre as manifestações clínicas observadas em pacientes com PMG, particularmente afetando a região PS, o DEL vem se mostrando cada vez mais frequente. DEL se caracteriza por atraso na aquisição e desenvolvimento da linguagem em crianças sem qualquer outra alteração do desenvolvimento neurológico e cognitivo. Estas crianças apresentam discrepância entre habilidades intelectuais verbais e não verbais na ausência de alteração estrutural na morfologia bucal (GUERREIRO, et al., 2002). Algumas destas crianças evoluem na fase pré-escolar para dislexia. Nesta série, os pacientes têm exames de audição e cognição normais avaliados por profissionais das respectivas áreas. Por conseguinte, estes se enquadram nos critérios de DEL. A prevalência de DEL na população é estimada em 6 a 7%, sendo que a taxa de concordância de DEL entre gêmeos monozigóticos é de 100% e entre gêmeos dizigóticos é de 50% a 70% (O'BRIEN, et al., 2003). Estes estudos indicam um importante papel de fatores genéticos implicados nos distúrbios de linguagem envolvendo as modalidades oral e escrita. A presença de PMG/PS em indivíduos com DEL tem levantado a possibilidade de que a PMG pode ser um dos substratos neurobiológicos do DEL (GUERREIRO, et al., 2002). Em artigo recente, Jansen

e Andermann (JANSEN & ANDERMANN, 2005), sustentam a posição de que o fenótipo de PMG/PS pode também ser confundido com uma síndrome de distúrbio específico de linguagem chamada de síndrome do distúrbio da linguagem com dispraxia orofacial ou dispraxia do desenvolvimento verbal. Nestes pacientes, mutações no gene *FOXP2* no cromossomo 7q31 afeta o desenvolvimento intelectual, linguagem, e funções práxicas orofaciais (JANSEN, et al., 2005). No entanto, os pacientes com mutações em *FOXP2* aparentemente não têm PMG PS ao exame de RM (JANSEN & ANDERMANN, 2005). Considerando-se as limitações que as vezes ocorrem na identificação de PMG em alguns casos, julgamos que o papel do gene *FOXP2* na etiologia da PMG associada a DEL ainda não foi suficientemente investigado para ser descartado neste momento.

Em nossa série, epilepsia foi observada em apenas 6 pacientes (19%), variando em relação a idade de início de 8 meses a 13 anos. A maior parte das crises relatadas eram tônico-clônicas generalizadas - TCG (4 pacientes), parcial complexa (PC) e TCG (1 caso) e espasmo infantil (EI) e TCG (1 paciente). Em 4 pacientes não se observam episódios a pelo menos 5 anos. Os outros 2 pacientes apresentam bom controle das crises com uso de DAE em monoterapia com oxcarbamazepina (paciente III-6, família 5- tabela 7) e fenitoína (paciente 11, tabela 8). Em nossos dados, o tipo de crise foi definido com base unicamente na história clínica e não temos dados do perfil eletrográfico (EEG) destes pacientes. Diferente de nossos achados, Kuzniecky e colaboradores (KUZNIECKY, et al., 1993) que identificaram crises em 27 (87%) de 31 pacientes. Os episódios foram identificados como crises TCG, ausência atípica e menos frequentemente crises do tipo parcial complexa (PC). As crises foram de difícil controle medicamentoso em 55% dos casos. Um outro estudo, com 12 crianças com a forma de PMG PS, 7(50%) apresentaram epilepsia, variando na frequência, tipo de crises e gravidade de apresentação incluindo EI (1), crises TCG (1), PC (2), parcial motora (2) e crises febris (1). Essa alta frequência de epilepsia refratária como observou Kuzniecky e colaboradores (KUZNIECKY, et al., 1993) contrasta com nossos achados e talvez possa ser explicada pelas diferenças nos critérios de inclusão dos pacientes nos estudos, pois nos relatos da literatura os pacientes foram selecionados dentro de um grupo de candidatos a cirurgia de epilepsia, caracterizando um grande viés de observação. Um viés de observação pode ter também ocorrido em nosso grupo de pacientes, uma vez que a alta frequência de atraso de linguagem (n=29, 91% dos pacientes) e sinais

pseudobulbares (n=23, 72% dos pacientes) por nós encontrados podem decorrer do fato de que demos grande ênfase na investigação de pacientes com distúrbios de linguagem. Em um estudo de Jansen e colaboradores (JANSEN, et al., 2005), 14 pacientes com PMG PS bilateral todos apresentaram atraso de linguagem e sinais pseudobulbares e apenas 4 dos 14 pacientes alcançaram valores abaixo de 70 nos testes cognitivos e foram considerados como intelectualmente deficientes. A maior parte dos pacientes apresentou inteligência baixa ou mediana pelos referidos testes. No entanto, a média de resultados dos testes de habilidades verbais (QI verbal) foi inferior a média obtida nos testes de habilidades não verbais (QI de execução). Os autores atribuíram tal discrepância a presença de disartria em 9 de 13 pacientes. Estes autores sugerem que o acometimento da região perisylviana bilateral poderá comprometer o QI verbal.

Em nossa amostra, déficit cognitivo nem sempre esteve associado às formas mais extensas de PMG, haja visto a paciente I-2 família-1 que apresenta PMG PS bilateral extensa e avaliações neuropsicológica e fonaudiológica normais. Porém, nossos dados estão associados ao comprometimento de lobo frontal em 1 dos 2 casos intelectualmente deficientes e em 3 dos 7 pacientes identificados com habilidades não verbais limítrofes. A presença de hemiparesia esteve relacionada a forma unilateral isolada (n=1) ou por assimetria do acometimento cortical bilateral (n=1) ou ainda associada a presença de esquizecefalia (n=1).

Em nenhum dos nossos pacientes observamos associação de PMG com anomalias congênitas maiores. Estes dados são discordantes com os achados de Jansen e colaboradores que observaram malformações ou características dismórficas em 64% numa série de 14 pacientes com PMG PS bilateral (JANSEN, et al., 2005). Não identificamos déficit cognitivo global importante, embora tenhamos observado discrepância entre habilidades verbais e não verbais em boa parte dos indivíduos afetados. Novamente, não podemos descartar a presença de um viés de observação em nossos achados, uma vez que pacientes com distúrbio de linguagem foram preferencialmente selecionados em nosso estudo.

Em geral, um quadro clínico mais grave foi observado em indivíduos do sexo masculino, principalmente nos casos com recorrência familiar (Tabela 7: indivíduos II-4 e III-1 família 1; III-6 família 5 e II-1, II-2 família 4) . Esta mesma observação clínica já foi

descrita anteriormente na literatura nos relatos de Villard e Borgatti (VILLARD, et al., 2002; BORGATTI, et al., 1999) e reforçam a hipótese de que gene(s) ligado(s) ao cromossomo X, segregando num padrão dominante ligado ao X possa(m) estar envolvido(s) na etiologia das PMGs.

Achados de RM

Em nossa série de 32 pacientes com PMG, vale ressaltar aqui que nenhum dos nossos pacientes apresentou outras malformações cerebrais associadas a PMG, tais como heterotopia nodular periventricular ou ausência de septo pelúcido. Associações estas, já descritas na literatura por outros autores (BECKER, et al., 1989; SIEJKA, et al., 1989). Chang e colaboradores identificaram anormalidade da substância branca bilateralmente, ventriculomegalia bem como atrofia do tronco cerebral e cerebelar em RM de pacientes com PMG simétrica afetando as regiões fronto-parietais (CHANG, et al., 2003). Estas características descritas por estes autores não foram identificadas em nenhuma outra forma de PMG bilateral. Por outro lado, PMG com alterações de substância branca, é um achado presente em distrofia muscular congênita tal como na síndrome de Walker-Warburg e distrofia congênita de Fukuyama (JANSEN & ANDERMANN, 2005).

Em 5 de 32 pacientes identificamos a forma PMG PS fronto-parietal bilateral porém, nenhum deles apresentou associação com os achados descritos por Chang e colaboradores (CHANG, et al., 2003). É possível que as diferenças nos achados de RM identificados pelo nosso grupo, possam guiar a triagem para mutações no gene *GPR56* identificado como mutado em pacientes com a forma de PMG fronto parietal descrita por Chang e colaboradores.

Achados de citogenética e moleculares

Não identificamos nenhuma alteração citogenética nos pacientes com PMG analisados em nosso trabalho, isso inclui a ausência da deleção 22q11.2, pesquisada pela técnica de FISH em n=20 pacientes. Vale ressaltar que dentre os pacientes analisados pela técnica de citogenética molecular (FISH), nenhum deles apresentou anormalidades cardiológicas e/ou dismorfismos faciais, sinais fenotípicos da síndrome de deleção 22q11.2. Nossos resultados apontam para uma falta de associação entre a deleção de 22q11.2 e PMG

sem malformações associadas. Na literatura, PMG foi relatada em 11 pacientes (9 homens) com deleção em 22q11.2; porém, todos eles tinham características dismórficas em graus variáveis. Sete tinham malformação cardíaca (CRAMER, et al., 1996; SZTRIHA, et al., 2004). A distribuição de PMG em pacientes com síndrome da deleção 22q11.2 é variável, e tanto a PMG unilateral quanto bilateral foram relatadas. Possivelmente a incidência e localização de PMG nestes pacientes é influenciada pelo tamanho da deleção ou pela deleção de genes contíguos. Dois pacientes com PMG e síndrome da deleção 22q11.2 tinham um parente também com a deleção, porém nenhum dos parentes apresentava PMG. Isto ilustra o efeito pleiotrópico da síndrome de deleção 22q11.2 e sugere o envolvimento de fatores modificadores (BINGHAM, et al., 1998; WORTHINGTON, et al., 2000). Neste momento, podemos concluir que a análise cariotípica de rotina ou por técnicas moleculares não parece se justificar em pacientes com PMG sem associação com distúrbios ou malformação cardíaca.

Análise de ligação genética nas famílias com PMG PS

A análise genética de condições herdadas tal com PMG, em que regiões específicas do córtex são preferencialmente acometidas, nos oferece a oportunidade para estudar os mecanismos do desenvolvimento cortical normal e especificação cortical. Estudos para delinear a base genética das diferentes formas de síndromes de PMG tiveram início num passado recente, até o momento apenas mutações no gene *GPR56* na PMG fronto parietal bilateral foram identificadas. Diante da grande heterogeneidade clínica vista na PMG, ainda não está claro se os diferentes fenótipos resultam de mutações em diferentes genes (heterogeneidade gênica), ou seriam mutações diferentes num mesmo gene (heterogeneidade alélica), afetando de forma diferenciada a função protéica. No entanto, as evidências acumuladas até o momento parecem apontar para a presença de heterogeneidade gênica. Portanto, é de grande importância a pesquisa para a identificação de novos genes envolvidos no desenvolvimento de PMG. Estes resultados contribuirão para uma melhor correlação genótipo-fenótipo.

Diferente do mapeamento previamente obtido por Villard e colaboradores (VILLARD, et al., 2002) em que a região Xq28 foi identificada como possivelmente implicada na PMG PS bilateral, nossos achados, apontam para uma nova região candidata,

mais centromérica e excluem, inequivocamente, a região Xq28. Esta nova região candidata não inclui a região delimitada anteriormente.

Até este momento, a pergunta que não podemos responder com certeza é se estamos diante de genes distintos ou não. Isso só poderá ser respondido com certeza quando o (os) gene(s) for(em) efetivamente identificado(s) e a(s) respectiva(s) mutação(ões) caracterizada(s). Tal aparente discrepância de resultados indica que devemos continuar nosso estudo, genotipando marcadores adicionais na região, para nos certificarmos o máximo possível de nossos achados. No entanto, vale ressaltar que a descoberta de um novo *locus* é até mais interessante do que confirmar um *locus* anteriormente identificado, já que isto pode confirmar heterogeneidade gênica, isto é, diferentes genes levando a uma mesma doença. A presença de heterogeneidade de *locus* (ou gênica) não seria surpresa, uma vez que está presente na maioria das doenças do sistema nervoso central, incluindo outras disgenesias corticais como por exemplo, o espectro lissencefalia/heterotopia subcortical em banda, causado por mutações em dois genes envolvidos em uma mesma via bioquímica: *LIS1* e *DCX* (TORRES, et al., 2003). Esta observação levanta um ponto importante, já que tanto nosso trabalho como o de Villard se completariam, pois existe a chance de os dois grupos clonarem genes diferentes que participariam em uma mesma via de desenvolvimento do córtex cerebral, abrindo novos campos de pesquisa em genética molecular e estudos funcionais do desenvolvimento do SNC.

O papel dos genes *EMX2* e *MECP2* na etiologia da PMG

EMX2

O achado de mutações no gene *EMX2* em pacientes com esquizencefalia fornece evidências de que, pelo menos em alguns casos, as esquizencefalias são determinadas por mutações deletérias em genes *homeobox* (GRANATA, et al., 1997). No entanto, não é possível descartar mecanismos patogênicos alternativos tais como lesões adquiridas resultantes de injúria vascular e/ou infartos locais em território de principais artérias cerebrais (SARNAT, et al., 1992). Em oposição aos relatos descritos na literatura, sobre a presença de mutações sinonímias na esquizencefalia (GRANATA, et al., 1997; FAIELLA, et al., 1997), Torres identificou, em uma série de 34 pacientes com

esquizencefalia , que as mutações sinonímias na realidade são alterações neutras presentes em indivíduos controles. Estes achados questionam o papel de mutações do gene *EMX2* na determinação da esquizencefalia (TORRES, 2003). Em nosso trabalho, a ausência de mutação no *EMX2*, identificada em 30 pacientes pesquisados, corroboram os resultados obtidos por Torres.

Em recente trabalho, Tietjen e colaboradores por meio de estudos de ligação, identificaram uma família com 3 afetados que indicam 2 regiões candidatas para esquizencefalia. Uma no cromossomo 8q24.22-24.3 assumindo um modelo de herança recessivo e uma outra no cromossomo 5q21.3-23.2, assumindo modelo de herança dominante (TIETIEN, et al., 2005).

Nenhum outro grupo de pesquisa, além dos trabalhos de Brunelli e Granata, conseguiu identificar o papel causativo do gene *EMX2* no desenvolvimento da esquizencefalia, sugerindo heterogeneidade genética ou o envolvimento de fatores modificadores. Contudo, se for confirmado o papel do *EMX2* no desenvolvimento de esquizencefalia, triagens de mutações no gene *EMX2* em pacientes com PMG e esquizencefalia podem ser indicadas já que ambas fazem parte de um mesmo espectro (JANSEN & ANDERMANN, 2005).

MECP2

Geerdink e colaboradores, em 2002, apresentaram descrição clínica e neuropatológica de um paciente do sexo masculino com encefalopatia neonatal grave e PMG, associados a presença de mutação no *MECP2*. A irmã deste paciente, tinha clássicas características da síndrome de Rett e igual mutação no gene *MECP2 localizado na região Xq28* (GEERDINK, et al., 2002). A partir deste relato, a pesquisa por mutações no gene *MECP2* em pacientes com PMG foi iniciada.

A nossa opção por estudo de ligação genética, um método indireto, se deu em primeiro lugar por termos famílias informativas que permitiram a geração de *lod scores* significativos. Além disso, trata-se de uma técnica menos laboriosa e dispendiosa quando comparada ao sequenciamento de todo um gene. Somando-se a isto, temos que citar a

complexidade de sequências codificantes do gene MECP2 (rico em regiões CpG), fator que complica a obtenção de sequências de qualidade. Por outro lado a técnica de sequenciamento não permitiria a detecção de deleções ou outros rearranjos maiores. Sendo assim, a análise de ligação com sua propriedade de excluir ou confirmar regiões (*locus*) envolvidos em doenças foi de total utilidade para a análise de *MECP2*. Portanto, nossos resultados não deixam dúvidas de que , pelo menos em nossas famílias, o MECP2 não é o gene principal.

6- CONCLUSÃO

1. PMG não se associa necessariamente a déficit intelectual a despeito do limitado QI verbal nos pacientes com sinais pseudobulbares;
2. Distúrbio de linguagem escrita (dislexia) foi encontrado em familiares adultos de pacientes afetados por PMG;
3. Epilepsia, quando presente, apresentou evolução para bom controle de crises;
4. Em 50% dos pacientes a PMG atingiu extensão para além da fissura Sylviana. Os lobos corticais foram afetados na seguinte ordem: o lobo parietal posterior (62,5%), fronto-parietal (31,3%) e lobo frontal (6,2%);
5. Não identificamos rearranjos cromossômicos nos pacientes com PMG avaliados;
6. Não identificamos a deleção 22q112 com a utilização de análise de FISH nos pacientes com PMG avaliados;
7. Excluímos o locus candidato previamente mapeado na região Xq28, por análise de ligação em famílias com PMG PS;
8. Identificamos uma nova região candidata para PMG PS na região Xq27, mapeado num intervalo de 12 cM;
9. Excluímos o gene *MECP2* como implicado em casos famílias de PMG, por análise de ligação;
10. Não encontramos mutações no gene *EMX2* nos pacientes com PMG.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, K.M; WALSH, A.C. Genes that regulate neuronal migration in the cerebral cortex. **Epilepsy Res**;36:143-156, 1999.

ANDERMANN, E; ANDERMANN, F. X- linked inheritance in subcortical band and periventricular nodular heterotopia: familial occurrence of bilateral perisylvian polymicrogyria. In : GUERRINI, R; ANDERMANN, F; CANAPICCHI R, et al. **Dysplasias of cerebral cortex and epilepsy**. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996:11-15.

BAKER, E.M; KHORASGANI, M.G; GARDNER-MEDWIN, D; GHOLKAR, A; GRIFFITHS, P.D. Arthrogyrosis multiplex congenital and bilateral parietal polymicrogyria in association with the intrauterine death of a twin. **Neuropediatrics**; 27:54-56, 1996.

BARKOVICH, A.J; HEVNER, R AND GUERRINI, R. Syndromes of bilateral symmetrical polymicrogyria. **Am J Neuroradiol**;20:1814-1821, 1999

BARKOVICH, AJ; KJOS, B.O. Schizencephaly: correlation of clinical findings with MR characteristics. **Am J Neuroradiol**; 13:85-94, 1992.

BARKOVICH, A.J; KUZNIECKY, R.I; JACKSON, G.D; GUERRINI, R; DOBYNS, W.B. Classification system for malformations of cortical development : update 2001. **Neurology**; 57:68-78, 2001.

BARKOVICH, A.J; LINDAN, C.E. Congenital cytomegalovirus infection of the brain: imaging analysis and embryologic considerations. **Am J Neuroradiol**; 15:703-715,1994.

BARKOVICH, AJ. Magnetic resonance imaging of lissencephaly, polymicrogyria, schizencephaly, hemimegalencephaly, and band heterotopia. In: **Dysplasias of cerebral cortex and epilepsy**. Edited by R. Guerrini et al. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1996

BARKOVICH, A.J; ROWLEY, H; BOLLEN, A. Correlation of prenatal events with the development of polymicrogyria. **Am J Neuroradiol**; 16: 822-827, 1995.

BARKOVICH, A.J; SIMON, E.M; WALSH, C.A. Callosal agenesis with cyst: a better understanding and new classification. **Neurology**; 56:220-227, 2001.

BARKOVICH, AJ. Neuroimaging manifestations and classification of congenital muscular dystrophies. **Am J Neuroradiol**; 19:1389-1396, 1998. BARTOLOMEI, F, GAVARET, M; DRAVET, C, et al. Familial epilepsy with unilateral and bilateral malformations of cortical development **Epilepsia**;40:47-51,1999.

BASTOS, AC; COMEAU, RM; ANDERMANN, F; MELANSON D; CENDES, F; DUBEAU, F; et al., Diagnosis of subtle focal dysplastic lesions : curvilinear reformatting from three dimensional magnetic resonance imaging. **Ann Neurol**; 41(1): 88-94, 1999.

BECKER, P.S; DIXON, A.M; TRONCOSO, J.C. Bilateral opercular polymicrogyria. **Ann Neurol**; 25:90-92, 1989.

BIENVENU, T; CARRIÉ, A; ROUX, N.D. MECP2 mutations account for most cases of typical forms of Rett syndrome. Hum Mol Genet.:9(9);1377-1384, 2002

BINGHAM, P.M; ZIMMERMAN, R.A; McDONALD-McGINN, D, et al. Enlarged sylvian fissures in infants with interstitial deletion of chromosome 22q11. **Am J Med Genet**; 74:538-543, 1997.

BINGHAM, P.M; LYNCH, D; McDONALD-McGINN, D et al. Polymicrogyria in chromosome 22 deletion syndrome. **Neurology**; 51:1500-1502, 1998.

BIRD, L.M; SCAMBLER, P. Cortical dysgenesis in 2 patients with chromosome 22q11 deletion. **Clin Genet**; 58:64-68, 2000.

BORDARIER, C; ROBAIN, O. Migrogyric and neurotic cortical lesions in twin fetuses: Consecutive to twinning? **Brain Dev**:14;174-178, 1992.

BORGATTI, R; TRIULZI, F; ZUCCA, C; PICCINELLI, P; BALOTTIN, U; CARRAZZO,R. Bilateral perisylvian polymicrogyria in three generations. **Neurology**; 52:1910-1913, 1999.

BRANDÃO-ALMEIDA, I.L; GUERREIRO, M.M; SANTOS, N.F; GUIMARÃES, C.A OLIVEIRA, EPM; MONTENEGRO, M.A. Congenital Bilateral perisylvian syndrome: clinical spectrum and neuroimaging findings. **Am J Hum Genet** 2003;73(5): 273.

- BRANDÃO-ALMEIDA, I.L; HAGE, S.R.V; GUIMARÃES, C.A; SANTOS, N.F; OLIVEIRA, EPM; MONTENEGRO, M.A. Polimicrogria perisylviana bilateral Congênita: aspectos clínicos, eletrencefalográficos, neuroradiológicos, psicolinguísticos e genéticos. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**; 10(1):7-12, 2004
- BRUNELLI, S; FAIELLA, A; CAPRA, V; NIGRO, V; SIMEONE, A; CAMA, A; BONCINELLI, E. Germline Mutations in the homeobox gene *EMX2* in patients with severe schizencephaly. **Nature Genetics**;12:94-96, 1996.
- CAPOVILLA, A.G.S & CAPOVILLA, F.C. Prova de Consciência Fonológica. In: Capovilla, AGS & Capovilla, FC. *Problemas de Leitura e Escrita*. São Paulo: Ed. Memnon, 2003.
- CARABALLO, R; CERSOSIMO, R.O; FEJERMAN, N. A particular type of epilepsy in children with congenital hemiparesis associated with unilateral polymicrogyria. **Epilepsia**, 40(7): 865-871, 1999.
- CARABALLO, R.H; CERSOSIMO, R.O; MAZZA, E, et al. Focal polymicrogyria in mother and son. **Brain Dev**;22:336-339, 2000.
- CARLSON, C. **Am J Hum Genet** 61:620-629, 1997.
- CECCHI, C; BONCINELLI, E. *EMX2* homeogenes and mouse brain development. **Trends Neurosci**; 23:347-352, 2000.
- CHANG, B S; PIAO, X; BODELL, A, et al. Bilateral frontoparietal polymicrogyria: Clinical and radiological features in 10 families with linkage to chromosome 16. **Ann Neurol**; 53:596-606, 2003.
- CHANG, B.S; PIAO, X; GIANNINI, C; CASCINO G.D; SCHEFFER, I; WOODS C.G. et al. Bilateral generalized polymicrogyria (BGP): distinct syndrome of cortical malformation. **Neurology**; 62:1722-1728, 2004.
- COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE. Proposal for revised classification of epilepsy and epileptic syndromes. **Epilepsia**;30:389-399, 1989.

- CONDEMARIN, M; BLOMQUIST, M. **Dislexia: manual de leitura corretiva. psicolingüísticos e genéticos.** Porto Alegre, RS, Artes Médicas, 1989.. *J Epilepsy Clin Neurophysiol* 10 (1):7-12
- CRAMER, SC; SHAEFER, P.W; KRISHNAMOORTHY, K.S. Microgyria in the distribution of the middle cerebral artery in a patient with DiGeorge syndrome. **J Child Neurol**; 11:494-496, 1996.
- DOBYNS, W.S; ANDERMANN, E; ANDERMANN, F; CZAPANSKY-BEILMAN, D; DUBEAU, F; DULAC, O; et. al. X-linked malformations of neuronal migration. **Neurology**; 47:331-339, 1996.
- EHARA, H; MAEGAKI, Y; TAKESHITA, K. Pachygyria and polymicrogyria in 22q11 deletion syndrome. **Am J Med Genet**; 117A:80-82, 2003.
- EVARD, P ; DE SAINT-GEORGES, P ; KADHIM, H ; GADISSEUX, J.F. Pathology of prenatal encephalopathies. In: French J, editor. **Child neurology and developmental disabilities.** Baltimore: Brookes, 1989: 153-176
- FAIELLA, A; BRUNELLI, S; GRANATA, T; DÍNCERTI, L; CARDINI, R; LENTI, C; et al. A number of Schizencephaly patients including 2 brothers are heterozygous for germline mutations in the homeobox gene *EMX2*. **Eur J Hum Genet**;5:186-190, 1997.
- FIGUEIREDO, V.L.M. WISC-III: Escala de Inteligência Wechsler para crianças, Terceira Edição. Adaptação e padronização de uma amostra brasileira: São Paulo, SP: Casa do Psicólogo, 2002.
- FRIEDE RL. **Developmental neuropathology**, 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1989.
- GEERDINK, N; ROTTEVEEL, J.J; LAMMENS, M; SISTERMANS, E.A; HEIKENS, G.T; GABREELS, F.J.M; et al. MECP2 mutation in a boy with severe neonatal encephalopathy: clinical, neuropathological and molecular findings. **Neuropediatrics**; 33:33-36, 2002.
- GHARIANI, S; DAHAN, K; SAINT-MARTIN, C; KADHIM, H. Polymicrogyria in chromosome 22q11 deletion syndrome. **Europ J Paediatr Neurol**; 6:73-77, 2002.

GRANATA, T; FARINA, L; FAIELLA, A; CARDINI, R, D'INCERTI, L, BONCINELLI, G. Familial schizencephaly associated with EMX2 mutation. **Neurology**; 48(5):1403 – 1406, 1997.

GREGOIRE, J; PIERART, B. Avaliação dos problemas de leitura: os novos modelos teóricos e suas implicações diagnósticas. Porto Alegre, RS: Artes Médicas, 1997.

GROPMAN, A.L; BARKOVICH, A.J; VEZINA, L.G, et al. Pediatric congenital bilateral perisylvian syndrome: Clinical and MRI features in 12 patients. **Neuropediatrics**; 28: 198-203, 1997.

GUERREIRO, M.M; ANDERMANN, E; GUERRINI, R; DOBYNS, W.B; KUZNIECKY, R; SILVER, K; et, al. Familial perisylvian polymicrogyria: a new familial syndrome of cortical maldevelopment. **Ann Neurol**; 48:39-48, 2000.

GUERREIRO, M.M; HAGE, S.R.V; GUIMARÃES, CA; ABRAMIDES, D.V; FERNANDES, W; PACHECO; et. Al. Developmental language disorder associated with polymicrogyria. **Neurology**; 59(2): 245-250, 2002.

GUERREIRO, MM. Síndrome Perisylviana. Campinas. 2002. (Livre docência- Universidade Estadual de Campinas)

GUERRINI, R; BARKOVICH A.J; SZTRIHA, L; DOBYNS, W.B. Bilateral frontal polymicrogyria. A newly recognized brain malformation syndrome. **Neurology**; 54:909-913, 2000.

GUERRINI, R; DRAVET, C; RAYBAUD, C; ROGER, J; BUREAU, M; BATTAGLIA, A; et al. Epilepsy and focal gyral anomalies detected by MRI: eletroclínicomorphological correlations and follow-up. **Dev Med Child Neurol**; 34:706-718, 1992.

GUERRINI, R; DUBEAU, F; DULAC, O; BARKOVICH A.J; KUZNIECKY, R; FETT, C, et al. Bilateral parasagittal parietooccipital polymicrogyria and epilepsy. **Ann Neurol**; 41:65-73, 1997.

GUERRINI, R; GENTON, P; BUREAU, M; PARMEGGIANI, A; SALAS-PUIG, X; SANTUCCI, M; et al. Multilobar polymicrogyria, intractable drop attack seizures, and sleep-related electrical status epilepticus. **Neurology**; 51:504-512, 1998.

GULISANO, M; BROCCOLI, V; PARDINI, C; BONCINELLI, E. *EMX1* e *EMX2* show different patterns of expression during proliferation and differentiation of the developing cerebral cortex in the mouse. **Eur J Neurosci**; 8:1037-1050, 1996.

HALFORD, S. **Hum Mol Genet** 2 (12):2099-2107, 1993.

HARDING, B; COOP, A. **Malformations of the nervous system**. In: Graham J.G; Lantos PL, editors. Greenfield's neuropathology. London: Edward Arnold, 1997: 521-638

HAYAKAWA, K; KANDA, T; YAMARI, Y. Unilateral cerebral polymicrogyria with ipsilateral cerebral hemiatrophy. **Eur Radiol**; 12:2542-2547, 2002.

JANSEN, A; ANDERMANN E. Genetics of polymicrogyria syndromes. **J Med. Genet**, 42: 369-378, 2005.

JANSEN, A.C; LEONARD, G; BASTOS, A.C. Cognitive functioning in bilateral perisylvian polymicrogyria (BPP): clinical and radiological correlations. **Epilepsy & Behavior**:6:393-404, 2005.

KAWAME, H; KUROSAWA, K; AKATSUKA, A; et al. Polymicrogyria is an uncommon manifestation in 22q11.2 deletion syndrome. **Am J Med Genet**; 94: 7778, 2000.

KUZNIECKY, R; ANDERMANN, F; GUERRINI, R. Congenital bilateral perisylvian syndrome: study of 31 patients. **Lancet**;34:608-612,1993

LACCONE, F; HUPPKE, P; HANEFELD, F; MEINS, M. Mutation spectrum in patients with Rett syndrome in the german populations: Evidence of hot spot regions. **Human mutation**;17:183-190, 2001.

LEVENTER, R.J; MILLS, P.L; DOBYNS, W.B. X-Linked Malformations of Cortical Development. **American Journal of Medical Genetics**; 97:213-220, 2000.

LIU, H; BANGARU, B; KIDD, J; BOGGS, J. Neuropathological considerations in cerebro-hepato-renal syndrome (Zellweger's syndrome). **Acta Neuropathol**; 34:115-123, 1976.

MARRET, S; MUKHENDI, R; GADISSEUX, J; GRESSENS, P; EVRARD, P. Effect of ibotenate on brain development: an excitotoxic mouse model of microgyria and posthypoxic like lesions. **J Neuropathol Exp Neurol**; 54:358-370, 1995.

MILLER, S.P; SHEVELL, M; ROSENBLATT, B; SILVER, K, et al. Congenital bilateral perisylvian presenting as congenital hemiplegis. **Neurology**;50:1866-1869, 1998.

MONTENEGRO, M.A; GUERREIRO, M.M; LOPES-CENDES, I; GUERREIRO, C.A; CENDES, F. Interrelationship of genetics and prenatal injury in the genesis of malformations of cortical development. **Arch Neurol**; 59(7):1147-53, 2002.

MONTENEGRO, M.A; GUERREIRO, M.M; LOPES-CENDES, I; CENDES, F. Bilateral posterior parietal polymicrogyria: a mild form of congenital bilateral perisylvian syndrome. **Epilepsia**;42(7):845-849, 2001.

MONTENEGRO, M.A; LI, L.M; GUERREIRO, M.M; GUERREIRO, C.A; CENDES, F. Focal cortical dysplasia: improving diagnosis and localization with magnetic resonance imaging multiplanar and curvilinear reconstruction. **J Neuroimaging**; 12(3):224-230, 2002.

MOOREHEAD, P.S; NOWELL, P.C; MELLMANN, W.J. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Exp. Cell Res**;20:613-616, 1960.

NOONAN, FC; MUTCH, D.G; MALLON, M.A; GOODFELLOW, P.J. Characterization of Homeodomain gene *EMX2*: sequence conservation, expression analysis, and a search for mutations in endometrial cancers. **Genomics**;76:37-44, 2001.

NORMAN, M.G; MCGILLIVRAY, B.C; KALOUSEK, D.K. **Neuronal migration diseases and cortical dysplasia**. In: NORMAN, M.G; MCGILLIVRAY, B.C; KALOUSEK, eds. Congenital malformations of the brain. New York: Oxford University Press, 1995:223-279.

O'BRIEN, E.K; ZHANG, X; NISHIMURA, C; TOMBLIN, J.B. Association of specific language impairment (SLI) to the region of 7q31. **Am. J. Hum. Genet**; 72:1536-1543, 2003.

OHTSUKA, Y; TANAKA, A; KOBAYASHI, K; OHTA, H; ABIRU, K; NAKANO, K, et. al. Childhood-onset epilepsy associated with polymicrogyria. **Brain Dev**; 24:758-765, 2002.

PASCUAL-CASTROVIEJO, I; PASCUAL-PASCUAL, S; VIANA, J; MARTINEZ, V; PALENCIA, R. Unilateral polymicrogyria : a common cause of hemiplegia of prenatal origin. **Brain Dev**; 23:216-222, 2001.

PIAO, X; BASEL-VANAGAITE, L; STRAUSSBERG, R; GRANT, E.P; PUGH, E.WDOHENY, K; et, al. An Autosomal recessive form of bilateral frontoparietal polymicrogyria maps to chromosome 16q12.2-21. **Am. J. Hum. Genet**; 70:1028-1033, 2002.

PIAO, X; HILL, R.S; BODELL, A, et al. G protein - coupled receptor-dependent development of human frontal cortex. **Science**; 303:2033-2036, 2004.

RAKIC, P. Neuroscience. Genetic control of cortical convolutions. **Science**; 03:1983-1984, 2004.

RAKIC, P. Specification of cerebral cortical areas. **Science**; 241:170-176, 1988.

ROBAIN, O. **Introduction to the pathology of cerebral cortical dysplasia**. In:

GUERRINI, R; ANDERMANN, F; CANAPICCHI, R. Dysplasias of cerebral cortex and epilepsy. Philadelphia: Lippincott-raven, 1996:1-9.

ROBIN, R. Familial Schizencephaly. **Dev Med Child Neurol**; 33:1010-1012, 1991.

ROSEN, G.D; SHERMAN, G.F; GALABURDA, A.M. Birthdates of neurons in induced microgyria. **Brain Res**; 727:71-78, 1996.

RYAN, A.K; GOODSHIP, J.A; WILSON, D.I, et al. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions; A European collaborative study. **J Med Genet**; 34: 798-804, 1997.

SANCHES, O; ESCOBAR, JI; YUNIS, J.J. A simple G banding technique. **Lancet**; 2:269, 1973.

SARNAT, H.B. **Cerebral dysgenesis: embriology and clinical expression**. New York: Oxford Univ Press, 1992.

SCAMBLER, P. J. The 22q11 deletion syndromes. **Human Molecular Genetic**;9(16):2421-2426, 2000.

SIEJKA, S; STREFLING, A.M; URICH, H. Absence of septum pellucidum and polymicrogyria: a forme fruste of the porencephalic syndrome. **Clin Neuropathol**;8:174-178, 1989.

STEIN, LM. TDE – *Teste de Desempenho Escolar*. São Paulo: Casa do psicólogo, 1994.

STRAUSSBERG, R; GRASS, S; AMIR, J; GADATH, N. a new autosomal recessive syndrome of pachygyria. **Clin Genet**; 50:498-501, 1996.

SUGAMA, S; KUSANO, K. Monozygous twin with polymicrogyria and normal cotwin. **Pediatric Neurol**; 11:62-63, 1994.

SZTRIHA, L; GUERRINI, R; HARDING, B; STEWART, F; CHELLOUG, N; JOHANSEN, J.G; et al. Clinical, MRI, and pathological features of polymicrogyria in chromosome 22q11 deletion syndrome. *Am J Med Genet*; 127A:313-317,2004.

SZTRIHA, L; NORK, M. Bilateral frontoparietal polymicrogyria and epilepsy. **Pediatr Neurol**; 22:240-243, 2000.

TAKANASHI, J and BARKOVICH, A.J. The changing MR imaging appearance of polymicrogyria: a consequence of myelination. **AJNR Am J Neuroradiol**; 24:788-793, 2003.

TAYLOR, I; SCHEFFER, I.E; BERKOVIC, S.F. Occipital epilepsies: identification of specific and newly recognized syndromes. **Brain**; 126: 753-769, 2003.

Tietjen I, Erdogan F, Currier S, Apse K et al. *EMX2* – Independent familial squizecephaly: Clinical and genetic analyses. *Am J Medical Genet* 2005; 135A:166-170.

TORRES, F.R. Estudo de mutações em genes responsáveis por diferentes formas de diagnóstico do desenvolvimento cortical. Campinas. 2003. (tesedoutorado-Universidade Estadual de Campinas

TORRES, F.R; MONTENEGRO; MA, MARQUES-DE-FARIA, A.P; GUERREIRO; M.M; CENDES, F; LOPES-CENDES, I. Mutation screening in a cohort of patients with lissencephaly and subcortical band heterotopia. **Neurology**. 9;62(5):799-802, 2004.

TUDOR, M; AKBARIAN, S; CHEN, R.Z. Transcriptional profiling of a mouse model for Rett syndrome reveals subtle transcriptional changes in the brain. **PNAS**.;99(24)15536-15541, 2002.

VAN BOGAERT, P; DONNER, C; DAVID, P; RODESCH, F; AVNI, E.F; SZLIWAWSKI, H.B. Congenital bilateral perisylvian syndrome in a monozygotic twin with intra-uterine death of the co-twin. **Dev Med Child Neurol**; 38:166-170, 1996.

VILLARD, L; NGUYEN, K; CARDOSO, C; MARTIN C.L; WEISS, A.M; SIFRY-PLATT, M; et al. A locus for bilateral perisylvian polymicrogyria maps to Xq2.8. **Am.J.Genet**; 70:1003-1008, 2002.

WECHSLER, D. Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence- Revised. San Antonio, Tx: The Psychological Corporation, 1989.

WECHSLER, D. Wechsler Adult Intelligence Scale – Revised. San Antonio, Tx: The Psychological Corporation, 1981.

WORTHINGTON, S; TURNER, A; ELBER, J; ANDREWS, P.I. 22q11 deletion and polymicrogyria cause or coincidence? **Clin Dysmorphol**; 9:193-197, 2000.

YAVAS, M.; HERNANDORENA, C.L.M.; LAMPRECHT, R.R. *Avaliação Fonológica da criança: reeducação e terapia*. Porto Alegre: Artes Médicas, 1992.

ZOLLINO, M; COLOSIMO, C; ZUFFARDI, O. Cryptic t(1;12)(q44;p13.3) translocation in a previously described syndrome with polymicrogyria, segregating as an apparently X-linked trait. **Am J Med Genet**;117 A (1): 65-71, 2003.

8- ANEXOS



Original Articles

Journal of
Epilepsy and
Clinical
Neurophysiology

J Epilepsy Clin Neurophysiol 2004; 10(1): 7-12

Polimicrogiria Perisylviana Bilateral Congênita: Aspectos Clínicos, Eletrencefalográficos, Neuroradiológicos, Psicolinguísticos e Genéticos

Iara L. Brandão-Almeida*, Simone R.V. Hage***, Catarina A. Guimarães**, Neide F. Santos*,
Ecila P. M. Oliveira**, Maria Augusta Montenegro**, Fábio R. Torres*, Rodrigo Secolin*, Li Min Li**,
Fernando Cendes**, Iscia Lopes-Cendes*, Marilisa M. Guerreiro**

Departamento de Genética Médica – Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, Campinas, SP

RESUMO

Polimicrogiria (PMG) é uma malformação comum do desenvolvimento cortical caracterizada por um número excessivo de pequenos giros e laminação anormal, dando à superfície cortical uma aparência irregular e grosseira. A gravidade das manifestações clínicas se correlaciona com a extensão do envolvimento cortical. As lesões bilaterais ou unilaterais extensas indicam um pior prognóstico. Uma das síndromes de polimicrogiria mais bem descritas clinicamente é a polimicrogiria perisylviana bilateral congênita (PPBC). Distúrbios de linguagem em crianças, epilepsia sintomática focal e disfunção cognitiva podem estar associados a PMG perisylviana. Embora o substrato patológico deste distúrbio não seja conhecido, existem indicativos de que a anormalidade cortical caracterizada como PMG contribui de forma variável nos diferentes níveis de desorganização da linguagem avaliados do ponto de vista fonológico, lexical, morfossintático e discursivo. Recentemente, os loci Xq28 e 16q12.2-21 foram mapeados para uma forma de PMG perisylviana bilateral e para a PMG frontoparietal, respectivamente. Além disso, uma série de genes candidatos tem sido implicados na etiologia das diferentes formas de PMG. Neste artigo, iremos rever os aspectos mais recentes dessa malformação que ainda é pouco diagnosticada em nosso meio.

Unitermos: polimicrogiria perisylviana, epilepsia, distúrbio de linguagem.

ABSTRACT

Congenital bilateral perisylvian polymicrogyria syndrome: clinical, EEG, MRI, psycholinguistic and genetic aspects

Polymicrogyria (PMG) is a malformation of cortical development characterized by an excessive number of small gyri and abnormal cortical lamination, giving the cortical surface an irregular and gross appearance. The severity of clinical manifestations correlates with the extent of cortical involvement. Bilateral or large unilateral lesions indicate a poor prognosis. The congenital bilateral perisylvian polymicrogyria syndrome (CBPS) is one of the well-recognized clinical polymicrogyria syndromes. Developmental language disorder in children, focal symptomatic epilepsy and cognitive deficits, can be associated with perisylvian polymicrogyria. Clinical manifestations will depend on the location and extent of the PMG. Although the pathological substrate of this disorder remains unknown, there are indications that the cortical abnormality known as PMG may contribute to language impairment in different levels, such as phonologic, lexical, morphosyntactic and semantic. Recently, genetic loci for one form of bilateral perisylvian PMG and bilateral frontoparietal PMG were mapped to Xq28 and 16q12.2-21, respectively. In addition, a number of other candidate genes have been implicated in this disorder. We will review the most current aspects of the CBPS a still under-recognized syndrome in the clinical setting.

Key words: perisylvian polymicrogyria, epilepsy, language disorder.

* Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP
** Departamento de Neurologia, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP
*** Departamento de Fonoaudiologia, FOB, USP, Baurer-SP
Received Nov. 17, 2003; accepted Jan. 10, 2004.

INTRODUÇÃO E ASPECTOS CLÍNICOS

O termo polimicrogiria designa uma malformação do desenvolvimento cortical (MDC), decorrente de um defeito na fase de organização cortical, que se caracteriza por um excessivo número de pequenas e proeminentes circunvoluções cerebrais espaçadas por sulcos pouco profundos e mais alargados⁽¹⁾. A apresentação mais comum da polimicrogiria é simétrica, bilateral e ocorre principalmente na região perisylviana. Algumas síndromes foram descritas nas quais os pacientes têm manifestações clínicas associadas com imagem de PMG bilateral e simétrica dentre estas, a PMG perisylviana bilateral congênita (PPBC), PMG parasagital parietooccipital e PMG frontoparietal⁽²⁾. Microscopicamente dois padrões de polimicrogiria são reconhecidos: com presença de 4 camadas corticais e aquele sem camadas. Na polimicrogiria com camadas, ao invés de seis camadas como é normalmente reconhecido o córtex cerebral, apenas quatro camadas são vistas: molecular, celular externa, celular interna e camada de células esparsas. Acredita-se que a PMG com quatro camadas corticais resulte de falhas na perfusão ocorrida entre a 20ª e 24ª semanas de gestação liderando a necrose intracortical laminar com conseqüente atraso na migração e organização cortical⁽³⁾. Os neurônios chegam ao córtex mas distribuem-se anormalmente, resultando em múltiplos e pequenos giros. Já na PMG sem camadas, a suposta "camada molecular" é contínua sem permitir o contorno das circunvoluções onde os neurônios subjacentes têm distribuição radial (vertical) mas não têm organização laminar. Este aspecto sugere uma interrupção precoce da migração neuronal com subseqüente desorganização na camada cortical. Os dois tipos de PMG podem coexistir em áreas corticais contínuas, sugerindo que sejam parte de um mesmo espectro⁽⁴⁾. Considerando estes 2 aspectos, a superfície cerebral poderá se apresentar com múltiplos e pequenos giros ou paradoxalmente lisa em função da ausência da camada molecular externa.

As manifestações clínicas dependem da localização e extensão da lesão, com quadro cognitivo variável, epilepsia e paralisia pseudobulbar (facial e faríngeal) associado a atraso e/ou dificuldade de fala. PMG perisylviana deve ser considerada como possibilidade diagnóstica frente a todas as crianças que apresentarem atraso na aquisição e desenvolvimento da linguagem em associação com sinais pseudobulbares.

EPILEPSIA ASSOCIADA A POLIMICROGIRIA E ACHADOS ELETRENEFALOGRAFICOS

É bem conhecida a associação entre malformação cortical e epilepsia, como também é sabido que a maioria dos pacientes com MDC sofrem de crises refratárias. A gravidade da apresentação clínica é dependente da ex-

tensão do envolvimento cortical. O acometimento bilateral ou o envolvimento de mais da metade de um único hemisfério associado com outras lesões têm um pior prognóstico⁽⁵⁾. Alguns pacientes com PMG localizada em um único hemisfério podem apresentar epilepsia com espícula-onda contínua durante o sono não REM (status elétrico durante o sono)⁽⁶⁾.

Na PMG perisylviana o início das crises é variável, podendo ocorrer no período neonatal, infantil precoce ou tardio ou crises na fase adulta. Os espasmos infantis são mais freqüentes na PMG difusa⁽⁷⁾. Crompton e colaboradores em estudo com 12 pacientes que apresentavam PPBC concluíram que a epilepsia não é uma característica freqüente na população pediátrica e, quando ocorre, tem início num período mais tardio⁽⁸⁾.

A PMG focal unilateral ou bilateral pode estar associada com epilepsia occipital. Nesse caso, as crises têm início na primeira ou segunda década de vida, manifestando-se como crises parciais complexas com automatismo, e caracteristicamente há ausência de sintomatologia com ictus visual⁽⁹⁾. Em alguns pacientes, a PMG focal pode resultar em manifestação clínica e eletrencefalográfica semelhante a da epilepsia com espículas centrotemporais. De forma geral, a PMG perisylviana cursa com quadro epiléptico mais brando (podendo até estar ausente) quando comparado a outras formas de MDC, como por exemplo, as displasias corticais focais e os erros de migração neuronal⁽⁹⁾.

Neuroimagem

Nos últimos dez anos grande progresso tem ocorrido no diagnóstico das MDC, especialmente pelo melhor reconhecimento destas, através de métodos de imagem como a ressonância magnética (RM). A RM particulariza aspectos da variação, distribuição e espessura de sulcos corticais, destacando diferenças de intensidade de sinal entre substância branca e cinzenta, fato que permite o reconhecimento de diferentes padrões de MDC.

A PMG muitas vezes não é detectada nos exames de RM de rotina com imagens spin-echo porque os giros são muito pequenos ou porque se encontram fundidos e de difícil visualização. Além disso, o aspecto de córtex irregular pode ser confundido com a paquigiria, giros amplos e de aparência fina. As aquisições volumétricas em 3D, gradiente echo com cortes finos (1 a 1,5 mm) e avaliação em 3 planos (reformatação multiplanar) são freqüentemente necessárias para detectar pequenas irregularidades na junção substância cinzenta e branca. A análise multiplanar consiste na avaliação visual interativa do parênquima cerebral, adquirido através da RM volumétrica. Esta técnica permite que se inspecione detalhes da estrutura cerebral através da análise simultânea dos giros

cerebrais em diferentes planos de seção⁽¹⁰⁾. Anomalia da drenagem venosa é comum em áreas com polimicrogiria, especialmente em regiões onde o córtex de aparência fina se dobra. Estes vasos, quando vistos neste contexto, não devem ser considerados como malformação vascular e a angiografia não está indicada⁽¹¹⁾.

Na PMG o aspecto dobrado do córtex é pequeno e largo, quando ocorre comunicação com o ventrículo (pela formação de uma fenda), a malformação passa a ser denominada esquizecefalia. É interessante notar que nas bordas superficiais da fenda esquizecefálica é frequentemente encontrado córtex polimicrogírico. Esta observação sugere a hipótese de que a esquizecefalia pode ser uma extensão mais grave da PMG.

Na PMG difusa, o cérebro se apresenta de aspecto liso. Pacientes com esta forma grave de comprometimento tipicamente são microcefálicos e frequentemente têm retardo mental ou crises convulsivas com início em torno do 6°-8° meses de vida pós-natal. A maioria dos pacientes com PMG difusa, apresenta infecção congênita por citomegalovírus. Nestes pacientes, a RM mostra um córtex fino (tipicamente com 5 a 7 mm) com superfície interna e externa de aspecto irregular. Os ventrículos são alargados e a substância branca hipomielinizada⁽¹²⁾.

Ocasionalmente, ocorre alteração de sinal na substância branca sugestivo de gliose ou desmielinização⁽¹³⁾. Alguns autores sugerem que a mielinização das fibras subcorticais e intracorticais causa mudanças na aparência espessa ou fina do córtex polimicrogírico⁽²⁾. A PPBC tem apresentação clínico-radiológica variável e requer seqüências específicas e cortes finos de imagens ponderadas em T1, como gradiente echo ou inversion recovery, para sua visualização apropriada e diagnóstico.

DISTÚRPIO DO DESENVOLVIMENTO DA LINGUAGEM E ASPECTOS COGNITIVOS ASSOCIADOS A POLIMICROGIRIA PERISYLVIANA BILATERAL CONGÊNITA (PPBC)

Da mesma forma que linguagem é uma habilidade ou comportamento que resulta de uma complexa interação de fatores fisiológicos, cognitivos, psicológicos, linguísticos, ambientais e sociais, os distúrbios de linguagem em crianças caracterizam-se por grande complexidade. Portanto, crianças com distúrbios de linguagem são sem dúvida um grupo heterogêneo⁽¹⁴⁾.

A intersecção dos três maiores componentes da linguagem (conteúdo, forma e uso) está envolvida nos distúrbios de linguagem na criança. A *forma* refere-se aos componentes fonológicos, sintáticos e morfológicos da linguagem. O *conteúdo* refere-se ao significado das mensagens, ao aspecto semântico da linguagem. O *uso* refere-se ao componente pragmático da linguagem. Uma ruptura

na integração destes componentes ou em quaisquer dos aspectos que cada um deles contempla, poderá repercutir em distúrbio do desenvolvimento da linguagem (DDL) ou distúrbio específico do desenvolvimento da linguagem (DEDL).

Os termos DDL ou DEDL dizem respeito a uma linguagem inadequada para uma idade esperada, considerando que a criança apresenta desenvolvimento normal. O termo específico não significa que a criança não apresenta outras dificuldades cognitivas. O termo, na realidade, quer ressaltar uma criança que apresenta alteração de linguagem como principal manifestação de suas dificuldades. Os DEDL afetam cerca de 6% a 7% das crianças com QI de execução normal e têm evidência de uma base genética por estudos em gêmeos e em famílias⁽¹⁵⁾. Problemas estruturais, incluindo limitações na morfologia gramatical e no desenvolvimento lexical, são a principal causa das dificuldades das crianças com DEDL. Dificuldades pragmáticas são também frequentemente relatadas nessas crianças, tais como problemas com o direcionamento de tópicos, mudança de temas e participação na conversação. Estudos fonológicos em crianças com DEDL observaram erros na produção de consoantes e vogais isoladas, alteração que também dificulta a realização de tarefas mais complexas⁽¹⁶⁾.

Na avaliação das crianças com DEDL destacamos os vários níveis de desorganização da linguagem:

- *Distúrbio da programação fonológica*: crianças apresentam compreensão normal com o aparecimento da fala também normal ou levemente atrasado; a fala pode estar ininteligível pela presença de alterações fonológicas, porém com fluência.
- *Dispraxia verbal*: crianças apresentam compreensão normal com o aparecimento da linguagem oral atrasado estando a fluência prejudicada ou não e os enunciados produzidos limitam-se a uma ou duas palavras.
- *Distúrbio fonológico-sintático*: crianças com o aparecimento da linguagem oral atrasado e com a compreensão prejudicada quando estão diante de um enunciado longo e complexo; a fluência e a morfosintaxe estão prejudicadas, com a presença de diversas alterações fonológicas.
- *Agnosia auditivo-verbal*: crianças com ausência ou restrição de linguagem oral, com articulação muito alterada e compreensão também afetada ou ausente.
- *Distúrbio léxico-sintático*: crianças com aparecimento da linguagem oral normal ou atrasado podendo ocorrer alterações fonológicas, sem que haja prejuízo da inteligibilidade da fala; a compreensão de palavras isoladas pode ser normal, mas a dificuldade relaciona-se a períodos frasais.

Distúrbio semântico-pragmático: crianças com apraxia da fala normal e fluente, mas com dificuldades pragmáticas, tornando difícil a compreensão de enunciados longos.

Em estudo que abordou os DEDL, Guerreiro e colaboradores em 2002 descreveram 15 crianças das quais 12 apresentaram PPBC ao exame de ressonância magnética de crânio⁽⁶⁴⁾. Os autores observaram nestas crianças distúrbio fonológico-sintático (7 crianças), distúrbio da programação fonológica (3 crianças) e distúrbio léxico-sintático (1 criança), sendo as demais crianças, classificadas como apresentando um distúrbio global da linguagem. Os autores também observaram, a discrepância entre as habilidades lingüísticas e não lingüísticas, demonstrada através da aplicação de testes de inteligência. O quociente intelectual (QI) de execução dos pacientes situou-se numa faixa de classificação bem melhor do que o QI verbal. Alguns pacientes apresentaram um QI de habilidades não verbais na faixa limítrofe. Uma das hipóteses para explicar tais achados seria que os testes que se propõem a avaliar capacidades não verbais, em algum momento, acabam envolvendo processos lingüísticos o que falseiam os resultados obtidos⁽⁷⁷⁾. Outra explicação para estes pacientes apresentarem o QI de execução na faixa limítrofe, advém do fato de que há uma interdependência entre pensamento e linguagem que intervém no complexo universo cognitivo da criança⁽⁶⁵⁾. Assim, crianças com DEDL podem apresentar uma série de transtornos não verbais, como dificuldade no desenvolvimento do jogo simbólico, hiperatividade, atenção reduzida e algum comprometimento cognitivo⁽⁶⁵⁾. Esse estudo concluiu que DEDL pode estar associado a PPBC com espectro clínico variável.

Neste mesmo trabalho, os autores observaram ainda que a PMG parietal posterior, que se apresenta com discreto DEDL, representa uma forma mais leve da síndrome perisylviana e ocupa o extremo mais brando da variação clínica. Os pacientes com PMG exclusivamente nas regiões parietais posteriores apresentam mais frequentemente história familiar de síndrome perisylviana ou atraso de fala, e pacientes com exames de neuroimagem evidenciando envolvimento cortical extenso, comprometendo de modo importante as regiões perisylvianas frontais, apresentam manifestações clínicas mais graves. Muitas crianças com DEDL apresentarão dislexia na evolução. Dislexia refere-se a prejuízo na aprendizagem da leitura, podendo acompanhar-se também na escrita, apesar do nível intelectual normal, estabilidade emocional e oportunidades educacionais e familiares adequadas. Dislexia pode ser vista como fazendo parte de um contínuo com os DEDL⁽⁶⁸⁾. Os estudos de Galaburda e colaboradores em 1985 descreveram os achados neuroanatômicos de 4 pacientes com dislexia do desenvolvimento e pelo menos três deles tinham DEDL.

Destes pacientes, dois apresentaram PMG envolvendo a fissura perisylviana. Esta distribuição anatômica sustenta o fato de que anormalidades corticais envolvendo essa região desempenham papel proeminente na patogênese da dislexia e dos DEDL⁽⁶⁶⁾.

ASPECTOS GENÉTICOS

Muito se tem avançado no conhecimento das doenças do desenvolvimento cortical pelos estudos de famílias informativas e pacientes isolados com rearranjos cromossômicos ou deleções. Tais estudos têm demonstrado inequivocamente a base genética para algumas dessas doenças. A ocorrência familiar da PPBC foi descrita pela primeira vez há três anos por Guerreiro e colaboradores num estudo multicêntrico que reuniu 12 famílias⁽⁶¹⁾. A investigação sistemática de membros da família de pacientes com quadro clínico de PPBC levou a identificação de indivíduos assintomáticos que apresentaram na investigação de neuroimagem, PMG parietal posterior bilateral. Estes indivíduos tinham em sua maioria, história prévia de atraso de linguagem ou moderada disartria. A PPBC apresenta espectro clínico e de neuroimagem muito amplo sendo possível que fatores ambientais, tais como os encontrados na forma difusa de PMG, atuem em conjunto com fatores genéticos para determinar os diferentes fenótipos nas formas familiares de PMG.

Genes responsáveis pela PMG não são conhecidos até o momento embora estudos recentes, utilizando análise de ligação genética, tenham mapeado um locus no cromossomo Xq28 em 5 famílias com uma forma ligada ao cromossomo-X da PPBC. Os pacientes destas famílias apresentaram tipicamente um quadro cognitivo variado, epilepsia, sinais pseudobulbares e distúrbio de linguagem. Duas das 5 famílias apresentaram microcefalia nos indivíduos com PMG. Os indivíduos do sexo masculino apresentaram quadro clínico mais grave quando comparado aos indivíduos do sexo feminino⁽⁶⁷⁾. Um outro locus foi mapeado no cromossomo 16q12.2-21 em 2 famílias palestinas não relacionadas e que apresentavam pais consanguíneos e não afetados e membros da prole afetados com PMG frontoparietal bilateral sugerindo herança autossômica recessiva. O quadro clínico apresentado pelos indivíduos afetados foi semelhante ao quadro apresentado pelos pacientes com PPBC acrescido de sinais cerebelares, sinais piramidais e esotropia. Os achados de RM identificaram uma redução de volume da substância branca e cinzenta e ventriculomegalia além da PMG simétrica e frontoparietal⁽⁶³⁾. Recentemente Chang e colaboradores acrescentaram 19 pacientes provenientes de 10 famílias com PMG frontoparietal bilateral todos ligados ao locus 16q confirmando os dados clínicos e de neuroimagem já apresentados anteriormente⁽⁶⁹⁾.

Em nossa experiência, avaliamos do ponto de vista clínico e de neuroimagem e identificamos 6 famílias não relacionadas que apresentaram 14 indivíduos afetados com PMG. Destes, 7 apresentaram PMG bilateral parietal posterior, 6 tinham PMG perisylviana bilateral e 1 apresentou PMG fronto parietal bilateral. Em pelo menos 4 destas famílias não foi possível afastarmos um padrão de herança ligado ao cromossomo X. As outras 2 famílias sugerem padrão autossômico. Do ponto de vista clínico as características mais frequentemente encontradas foram: sinais pseudobulbares, atraso na aquisição e desenvolvimento da linguagem e avaliação cognitiva variando de QI médio a limítrofe. Epilepsia não foi observado em nenhum dos nossos pacientes. Neste momento estamos priorizando a abordagem molecular através de estudos de ligação para identificação de genes candidatos e futuras correlações genótipo-fenótipo.

Outros achados moleculares interessantes, que permanecem aguardando confirmação ou melhor definição são: I) presença de PMG em alguns pacientes com deleções 22q11.2, seriam meramente coincidentes ou são um sinal raro do espectro de deleção 22q11 que envolve um número considerável de outras síndromes tais como: velocardiocéfalo, conotruncal e seqüência de DiGeorge⁽²⁹⁾. II) Presença de mutações em alguns genes relacionados ao neurodesenvolvimento, tais como *EMX2*, associado a alguns casos de esquizencefalia, e *MECP2* mutado na síndrome de Rett^(26,27).

A compreensão da base genética da PPBC, ainda não esclarecida, deverá contribuir para novas perspectivas de diagnóstico e aconselhamento genético bem como permitir o melhor entendimento do desenvolvimento cortical normal. Nosso grupo de pesquisa, dedica-se intensamente neste momento a investigar os aspectos moleculares dessa síndrome.

COMENTÁRIOS FINAIS

O diagnóstico precoce da PMG perisylviana é difícil em função do amplo espectro de manifestações clínicas tais como epilepsia que poderá não estar presente, sinais pseudobulbares e graus variados de déficit cognitivo. Ocasionalmente apenas a alteração de fala pode ocorrer, enquadrando-se dentro dos DEDL. Uma outra dificuldade adicional diz respeito ao fato de que a PMG muitas vezes não é detectada nos exames de RM de rotina com imagens spin-echo necessitando de seqüências específicas e cortes finos de imagens. É importante ressaltar que o exame de RM realizado com critério e dirigido para a hipótese diagnóstica, frente a uma criança com atraso na aquisição e desenvolvimento da linguagem associado a sinais clínicos de disfunção oromotora e/ou sinais pseudobulbares terá sido bem indicado.

A identificação precoce do DEDL e sua adequada classificação e tratamento, pode minimizar o impacto que este distúrbio causa no desenvolvimento global da criança, e também prevenir ou minimizar o impacto de outras alterações, como o distúrbio de leitura e/ou de escrita, que posteriormente poderão estar presentes.

O conhecimento das manifestações lingüísticas de crianças com DEDL e a identificação precoce do referido distúrbio em outros membros de uma mesma família contribuem para a eficácia terapêutica e direcionamento do processo de intervenção nestas famílias.

REFERÊNCIAS

- Friede RL. *Developmental neuropathology*. 2nd ed. New York: Springer-Verlag; 1989.
- Takanashi J, Barkovich AJ. The changing MR imaging appearance of polymicrogyria: a consequence of myelination. *AJNR Am J Neuroradiol* 2003; 24: 788-793.
- Errard P, De Saint-Georges F, Kadhim H, Gadissoux JE. Pathology of prenatal encephalopathies. In: French J, editor. *Child neurology and developmental disabilities*. Baltimore: Brookes; 1989. p. 153-176.
- Harding B, Coop A. Malformations of the nervous system. In: Graham JG, Larus PL, editors. *Greenfield's neuropathology*. London: Edward Arnold; 1997. p. 521-635.
- Caraballo R, Cerasósimio R, Fejerman N. A particular type of epilepsy in children with congenital hemiparesis associated with unilateral polymicrogyria. *Epilepsia* 1999; 40(7): 865-871.
- Ohtsuka Y, Tanaka A, Kobayashi K, et al. Childhood-onset epilepsy associated with polymicrogyria. *Brain & Development* 2002; 24: 755-765.
- Geopman AL, Barkovich AJ, Vezina LG, et al. Pediatric congenital bilateral perisylvian syndrome: Clinical and MRI features in 12 patients. *Neuropediatrics* 1997; 28: 198-203.
- Taylor I, Scheffer JE, Berkovic SF. Occipital epilepsies: identification of specific and newly recognized syndromes. *Brain* 2003; 126: 753-769.
- Montenegro MA, Guerreiro MM, Lopes-Cendes I, Guerreiro CA, Cendes F. Interrelationship of genetics and prenatal injury in the genesis of malformations of cortical development. *Arch Neurol* 2002; 59(7): 1147-1153.
- Montenegro MA, Li LM, Guerreiro MM, Guerreiro CA, Cendes F. Focal cortical dysplasia: improving diagnosis and localization with magnetic resonance imaging multiplanar and curvilinear reconstruction. *J Neuroimaging* 2002; 12(3): 224-230.
- Barkovich AJ. Magnetic resonance imaging of lissencephaly, polymicrogyria, schizencephaly, hemimegalencephaly, and band heterotopia. In: *Dysplasias of cerebral cortex and epilepsy*. Edited by R. Guerrini et al. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers; 1996.
- Leventer RJ, Mills PL, Dobyns WB. X-Linked Malformations of Cortical Development. *Am J Med Gen* 2000; 97: 213-220.
- Reed AV. An introduction to children with language disorders. 2nd ed. [S.L.]: Mc Millan, 1994. In: BEFI-LOPES, D.M.; Acaju, K. de Gaudi, E. Diagnóstico diferencial nas alterações de desenvolvimento de linguagem: contribuição de uma análise comparativa. *J Bras Fonaudiol*. Curitiba 2002; 3(12): 204-211.
- O'Brien EK, Zhang X, Nishimura C, Tomblin JB. Association of specific language impairment (SLI) to the region of 7q31. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 1536-1543.
- Yont KM, Hewitt LE, Miccio AW. "What did you say?": understanding conversational breakdowns in children with speech and language impairments. *Clinical Linguistics & Phonetics* 2002; 16(4): 265-285.
- Guerreiro MM, Hage SRV, Guimarães CA, Abramides DV, Fernandes W, Pacheco PS, Pivovana AMSG, Montenegro MA, Cendes F. Developmental language disorder associated with polymicrogyria. *Neurology* 2002; 59(2): 245-250.

- Rapin I, Allen DA, Dunn MA. Developmental language disorders. In: Sagalowicz SJ, Rapin I (orgs.) Handbook of neuropsychology. New York, Elsevier Science: Pub, 1992.
- Vygotskii LS. Aprendizagem e desenvolvimento intelectual na idade escolar. In: Vygotskii LS, Luria AR, Leontiev NA. Linguagem, desenvolvimento e aprendizagem. São Paulo: Icone-Editora da Universidade de São Paulo, 1988. 103-117.
- Monfort M, Sánchez AJ. Los niños disléxicos: descripción e tratamiento. Madrid: CEPE, 1997.
- Galaburda AM, Sherman GE, Rosen GD, Aboitiz F, Geschwind N. Developmental dyslexia: four consecutive patients with cortical anomalies. *Ann Neurol* 1985; 18: 222-233.
- Guerciro MM, Andermann E, Guercini R, Dobyns WB, Kuzniecky R, Silver K, Van Bogaert P, Gillain C, David P, Ambrosetto G, Rosati A, Barnolomei F, Parmeggiani A, Paoletti R, Salonen O, Ignatius J, Borgatti R, Zucca C, Bastos AC, Paladini A, Fernandes W, Montenegro MA, Genika F, Andermann E. Familial perylvian polymicrogyria: a new familial syndrome of cortical maldevelopment. *Ann Neurol* 2000; 48: 39-48.
- Villand L, Nguyen K, Cardoso C, Martin CL, Weiss AM, Sifry-Platt M, Grix AW, Graham Jr JM, Winter RM, Leventer RJ, Dobyns WB. *Am J Genet* 2002; 70: 1003-1005.
- Piao X, Basel-Vanagaite L, Strausberg R, Grant ER, Pugh EW, Dobeny K, Doan B, Hong SE, Shugart YY, Walsh CA. An Autosomal recessive form of bilateral frontoparietal polymicrogyria maps to chromosome 16q12.2-2.1. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 1028-1033.
- Chang BS, Piao X, Bodell A, et al. Bilateral frontoparietal polymicrogyria: Clinical and radiological features in 10 families with linkage to chromosome 16. *Ann Neurol* 2003; 53: 596-605.
- Washington S, Turner A, Elber J, Andrews PL. 22q11 deletion and polymicrogyria: cause or coincidence? *Clin Dysmorphol* 2000; 9: 193-197.
- Coerdink N, Rotteveel JJ, Lammens M, Sistermans EA, Heikens GT, Gabriëls FJM, Mullaart RA, Hamel BCJ. MECP2 mutation in a boy with severe neonatal encephalopathy: clinical, neuropathological and molecular findings. *Neuropediatrics* 2002; 33: 33-36.
- Granata T, Farina L, Faiella A, Cardini R, D'Inceri L, Boncinelli G. Familial schizencephaly associated with EMX2 mutation. *Neurology* 1997; 48(5): 1403-1406.

Endereço para correspondência:
Marilisa M. Guerciro
Departamento de Neurologia - FCM - UNICAMP
Caixa Postal 6111
CEP 13063-970, Campinas, SP, Brasil

Síndrome peri-sylviana: estudo de uma família brasileira com ênfase na modalidade de transmissão genética e espectro clínico

Perisylvian syndrome: report of one Brazilian family with focus on the genetic mode of inheritance and clinical spectrum

Eliane P. Herrera^I; Iara L. Brandão-Almeida^{II}; Catarina A. Guimarães^{III}; Ecila P. M. Oliveira^{III}; Maria Augusta Montenegro^{IV}; Fernando Cendes^V; Iscia Lopes-Cendes^{VI}; Carlos A.M. Guerreiro^V; Simone R.V. Hage^{VII}; Marilisa M. Guerreiro^V

^IAluna de Medicina; Departamento de Neurologia - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas SP, Brasil (FCM) - UNICAMP

^{II}Pós-graduanda; Genética Médica - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas SP, Brasil (FCM) – UNICAMP

^{III}Pós-graduanda; Departamento de Neurologia - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas SP, Brasil (FCM) – UNICAMP

^{IV}Professor Doutor; Departamento de Neurologia - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas SP, Brasil (FCM) - UNICAMP

^VProfessor Associado. Departamento de Neurologia - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas SP, Brasil (FCM) - UNICAMP

^{VI}Professor Associado. Genética Médica - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas SP, Brasil (FCM) - UNICAMP

^{VII}Professor Doutor; Departamento de Fonoaudiologia Faculdade de Odontologia de Bauru Universidade de São Paulo, Bauru SP, Brasil (FOB/USP)

[Endereço para correspondência](#)

RESUMO

Síndrome peri-sylviana (SP) refere-se a diversas manifestações clínicas que podem acompanhar lesões que comprometem a região peri-sylviana ou opercular, podendo ser adquirida, como em acidentes vasculares cerebrais ou encefalites virais, ou ser congênita. A SP congênita pode se manifestar com grande variação clínica e em idades precoces. Com o advento da ressonância magnética (RM) foi possível observar a presença de polimicrogiria (PMG) na região da fissura de Sylvius em diversos pacientes com quadro clínico de SP. O objetivo do presente estudo é analisar e divulgar essa entidade raramente diagnosticada por meio da descrição de uma família. A família em questão compõe-se de cinco indivíduos acometidos, sendo o distúrbio de linguagem a manifestação mais prevalente, ou seja, presente em todos eles. Epilepsia, déficit motor e sinais pseudobulbares (como sialorréia) foram evidenciados no paciente que mostrou maior alteração à RM (PMG difusa). A paciente com PMG parietal posterior e os outros três com RM normais tiveram manifestações clínicas mais sutis. Apesar da maioria das famílias descritas até o momento apresentar transmissão ligada ao cromossomo X, a nossa família sugere transmissão autossômica dominante, já que dois meninos afetados são filhos de homens também acometidos. Os nossos dados reforçam a idéia de que a SP apresenta heterogeneidade genética.

Palavras-chave: síndrome peri-sylviana, polimicrogiria, sinais pseudobulbares.

ABSTRACT

Perisylvian syndrome (PS) refers to a variety of clinical manifestations associated with lesions in the perisylvian or opercular region. Acquired lesions such as cerebrovascular diseases or virus encephalitis and congenital lesions such as polymicrogyria (PMG) may be implied as etiological factors. The onset of the PS may occur in early childhood. The aim of this study was to report one family with PS in order to draw attention to this rarely diagnosed entity. Our family has five affected patients, three children and two male adults. All of them had developmental language disorder. Epilepsy, motor deficit and pseudobulbar signs (such as drooling) were detected in one child who had diffuse PMG along the Sylvian fissure. Subtle clinical manifestations correlated with either subtle MRI

findings or normal MRI. Most reported families provide evidence suggestive of X-linked transmission. However, the most likely mode of inheritance in our family is autosomal dominant, since a male to male transmission was documented.

Key words: perisylvian syndrome, polymicrogyria, pseudobulbar sign.

Síndrome peri-sylviana (SP) ou opercular refere-se a diversas manifestações clínicas que podem acompanhar lesões que comprometem a região peri-sylviana ou opercular¹. A primeira descrição de quadro clínico correlacionado com lesão peri-sylviana foi de Foix, Chavany e Marie, em 1926, que relataram quadro de diplegia facioglossofaringomastigatória conseqüente a acidente vascular cerebral bilateral ao redor da fissura de Sylvius. Essas lesões, quando adquiridas, podem ser oriundas não só de acidentes vasculares cerebrais mas também de encefalites virais. No entanto, com o advento de novas tecnologias em neuroimagem, especialmente a ressonância magnética (RM), observações acerca de malformações do desenvolvimento cortical mostraram que a SP pode decorrer de malformação congênita da região peri-sylviana, mais especificamente de polimicrogyria (PMG), a qual refere-se a múltiplos microgiros ao redor da fissura de Sylvius, agrupados e com sulcos pouco pronunciados entre eles.

Um estudo realizado com 12 famílias², ao todo com 42 pacientes, mostrou que as manifestações clínicas são amplamente variadas entre as famílias e entre os membros de uma mesma família, mas comumente cursam com dificuldade à movimentação da língua (70,5% dos pacientes avaliados) e disartria (76%). Epilepsia ocorreu em 18 pacientes (43%). Esse foi o primeiro estudo com descrição de famílias comprometidas com a síndrome. A maioria dessas 12 famílias apresentava evidência genética sugestiva ou compatível com transmissão ligada ao cromossomo X. No entanto, a análise de outras duas famílias mostrou-se compatível com herança autossômica dominante, sendo que em uma delas não se pode descartar a possibilidade de herança autossômica recessiva com manifestação clínica variável também no heterozigoto. Dessa forma, mostrou-se que a SP apresenta provavelmente heterogeneidade genética e que múltiplos modos de herança podem estar envolvidos.

A presença de PMG ao redor da fissura de Sylvius em sujeitos com distúrbio específico de linguagem (DEL) tem levantado a possibilidade de que este quadro possa fazer parte da SP, cujo espectro clínico pode variar desde manifestações específicas do desenvolvimento da linguagem até quadros mais floridos que cursam com proeminentes sinais pseudobulbares e epilepsia refratária². Um estudo com 15 sujeitos evidenciou que a PMG pode ser um dos substratos neurobiológicos do DEL³.

No presente trabalho, apresentamos o estudo na região peri-sylviana confirmada por exame de RM, além de clínica compatível com a síndrome. Entendemos ser de relevância a divulgação de tal entidade clínico-radiológica em nosso meio, já que os estudos acerca dessa síndrome são escassos. Além disso, a única família brasileira descrita até o momento fez parte de um estudo multicêntrico internacional, sendo a presente família a primeira descrita em nosso meio. Pretendemos, assim, divulgar esta entidade ainda pouco diagnosticada.

MÉTODOS

Foram avaliadas até o momento seis famílias no Ambulatório do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Dessas, uma foi selecionada com o propósito de ser analisada mais detalhadamente e os dados resultantes dessa análise compõem o presente estudo. Os integrantes da família em questão foram submetidos a: história clínica detalhada; elaboração do heredograma; exame neurológico; avaliação neuropsicológica; avaliação fonoaudiológica e exame de neuroimagem pela RM.

No que se refere à história clínica, enfocamos: dados a respeito da gestação, parto e possíveis intercorrências perinatais; aquisições do desenvolvimento neuropsicomotor; pesquisa detalhada sobre possíveis sinais pseudobulbares, como déficits de sucção, sialorréia, alteração na deglutição, dificuldades para soprar, atraso na aquisição da linguagem ou alterações no desenvolvimento desta; e ocorrência de crises epiléticas. Elaboramos o heredograma da família interrogando sobre clínica semelhante em outros membros.

O exame neurológico deu atenção especial à movimentação da língua.

Para avaliação psicológica foram utilizados testes convenientes à faixa etária, aplicados por profissional da área. Os testes aplicados foram as escalas Wechsler de inteligência: WPPSI- teste de inteligência para pré-escolares⁴ para crianças de 4 a 6 anos, WISC III- escala de inteligência para crianças- 3a. edição⁵ para crianças com mais de 6 anos e WAIS-R- escala de inteligência para adultos- revisada⁶ para adultos.

Para a avaliação fonoaudiológica foram utilizados os seguintes procedimentos: Para as crianças: avaliação fonológica da criança⁷ para a investigação do sistema fonológico; prova de vocabulário do ABFW - teste de linguagem infantil⁸ para avaliação do vocabulário expressivo em crianças entre 4 e 6 anos; PPVT - peabody picture vocabulary test - revised, normatização brasileira⁹ e desenvolvimento do vocabulário receptivo-auditivo¹⁰; protocolo de avaliação de linguagem para as áreas de sintaxe e pragmática e praxias articulatórias e buco-faciais descritos em Hage¹¹. Para as crianças em idade escolar foi acrescentado: prova de consciência fonológica¹²; TDE - teste de desempenho escolar¹³ para avaliar o desempenho escolar e sua compatibilidade com a idade cronológica. Para os adultos: os adultos foram avaliados por meio de questionário e análise de amostra de suas habilidades de linguagem oral e escrita. No que se refere à leitura e escrita, para a análise da amostra escrita levou-se em consideração o nível de escolaridade do sujeito e o uso que o mesmo tem feito da escrita e leitura no seu cotidiano.

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Os membros da família assinaram o termo de consentimento informado.

RESULTADOS

Os dados da história clínica e exame neurológico constam da [Tabela 1](#). Os dados de neuroimagem, avaliações fonoaudiológica e neuropsicológica constam da [Tabela 2](#). O heredograma da família em questão é evidenciado na [Figura 1](#). Na [Figura 2](#) mostramos a imagem de um dos pacientes com PMG peri-sylviana.

Tabela 1. Características clínicas da família estudada.

Paciente	IC	AD Lgem	Epi	Sialo	Dif mast	Dif deglu	Dif sucção	Engasgo	Dif mov língua	Dif soprar	Exame neurol
II-4	43	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Normal
II-5	35	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Normal
III-4	8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Normal
III-6	6	+	+	+	-	-	+	-	-	+	Hemip. à D
III-7	7	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Normal

+, presente; -, ausente; IC, idade cronológica; AD Lgem, alterações no desenvolvimento da linguagem; Epi, epilepsia; Sialo, sialorréia; Dif mast, dificuldade à mastigação; Dif deglu, dificuldade à deglutição; Dif mov língua, dificuldade à movimentação da língua; Exame neurol, exame neurológico; Hemip. à D, hemiparesia à direita.

Tabela 2. Avaliação multidisciplinar.

Pacientes	RM	Avaliação fonoaudiológica	Avaliação neuropsicológica		
			QIT	QIV	QIE
II-4	Normal	DEL com alterações na linguagem escrita	102-méd	95-méd	116-médsu
II-5	Normal	DEL com alterações na linguagem escrita	98-méd	90-méd	113-médsu
III-4	PMGPP	DEL com alterações na linguagem escrita	109-méd	105-méd	113-médsu
III-6	PMGPSD	DEL Significativo	*	*	80-médf
III-7	Normal	DEL leve	125-sup	124-sup	122-méd

RM, ressonância magnética; PMGPP, polimicrogiria parietal posterior; PMGPSD, polimicrogiria peri-sylviana difusa; DEL, distúrbio específico do desenvolvimento de linguagem; QIT, quociente de inteligência total; QIV, quociente de inteligência verbal; QIE, quociente de inteligência de execução; méd, média; médsup, média superior; médf, média inferior; sup, superior. *Paciente III-6 não possui descrição de QIT e QIV em razão da dificuldade de realização da avaliação verbal.

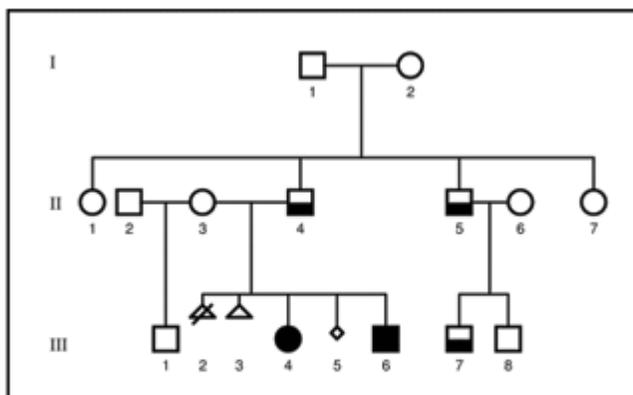


Fig 1. Heredograma da família enfatizando que os indivíduos III-4 e III-6 apresentam polimicrogiria na RM, enquanto os outros acometidos clinicamente têm RM normal.

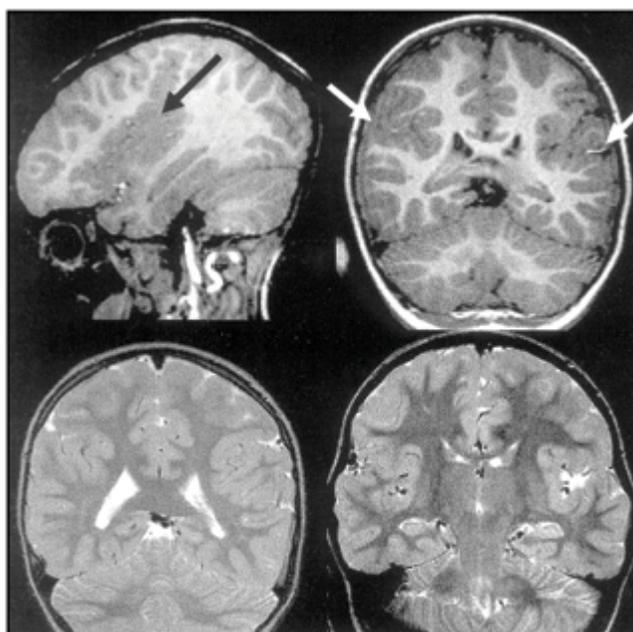


Fig 2. Imagem da RM do paciente III-6 evidenciando polimicrogiria peri-sylviana difusa bilateral.

DISCUSSÃO

De acordo com a história clínica, dois irmãos do sexo masculino são os primeiros da família que conhecidamente apresentam alguns dos sintomas da entidade estudada. Ambos são casados, sem consangüinidade marital, têm dois filhos cada, e destes, três apresentam manifestações da síndrome (dois meninos e uma menina). Apesar da maioria das famílias descritas até o momento apresentar transmissão ligada ao cromossomo X, a nossa família sugere transmissão autossômica dominante, já que dois meninos afetados são filhos de homens também acometidos. Os nossos dados reforçam a idéia de que a SP provavelmente apresenta heterogeneidade genética.

Embora os estudos a respeito desta entidade sejam escassos, tem-se mostrado que a SP apresenta amplo espectro clínico, podendo envolver variados graus de déficits pseudo-bulbares, diplegia facial, disartria, dificuldade de protrusão de língua e epilepsia¹⁴. Em um estudo com 12 crianças¹⁵, todas com PMG peri-sylviana, 7 (50%) apresentavam epilepsia, variando no tempo, freqüência e tipo de crises, incluindo espasmos infantis (1), crise tônico-clônica generalizada (1), parcial complexa (2), parcial motora (2) e crises febris (1). Como as observações iniciais foram recolhidas em centros de epilepsia, esta era uma manifestação bastante freqüente e geralmente grave nas primeiras descrições¹⁴. Entretanto, na medida em que novos estudos foram realizados com diferentes populações, observou-se que a epilepsia não é condição obrigatória dessa síndrome, e quando presente, é geralmente de fácil controle². Na família estudada, apenas um dos pacientes apresenta epilepsia, tendo tido até o momento três episódios.

Dentre as manifestações clínicas da SP, o distúrbio específico do desenvolvimento de linguagem vem se mostrando cada vez mais freqüente. DEL se caracteriza por aquisição inadequada de linguagem em crianças sem qualquer outra alteração do desenvolvimento cognitivo. São crianças que apresentam audição normal à audiometria, ausência de transtornos cerebrais crônicos pela avaliação neurológica clínica, ausência de alteração estrutural na morfologia bucal e discrepância entre habilidades intelectuais verbais e não verbais (sendo estas geralmente normais)¹. Alguns podem apresentar dislexia na evolução. O distúrbio de linguagem envolvendo as modalidades oral e escrita é o sintoma mais prevalente na presente família, sendo observado em todos os seus componentes afetados.

Salientamos que nossos pacientes têm cognição preservada e audição normal, ambas avaliadas por profissionais das áreas em questão, e portanto nossos pacientes se enquadram nos critérios de DEL.

A presença de sinais pseudobulbares foi encontrada em somente dois dos pacientes estudados, destacando-se a sialorréia importante, dificuldade de sucção e de soprar no indivíduo III-6, e sialorréia no paciente III-7. A alteração da motricidade da língua, relatada como freqüente na SP, não foi observada em nossa amostragem.

Com relação à neuroimagem, procedemos a investigação com RM nos cinco pacientes, havendo visualização de PMG peri-sylviana difusa em um deles e PMG parietal posterior em outro, sendo estes irmãos (III-4, III-6). A PMG parietal posterior é considerada como parte do mesmo fenômeno, pois sua distribuição ocorre no extremo de uma linha imaginária que se estende além da fissura de Sylvius. A imagem dos outros três pacientes revelou-se normal. Montenegro e col.¹⁶ verificaram que de uma série de 17 pacientes com SP, sete apresentavam PMG restrita à área parietal posterior da fissura de Sylvius e mostravam leve disartria, enquanto que os outros 10 apresentavam comprometimento difuso em torno de toda a fissura de Sylvius e evoluíram com alterações pseudobulbares e até mesmo epilepsia. Também Guerreiro e col.¹ observaram que crianças com PMG difusa em torno da fissura de Sylvius tinham clínica manifesta de DEL muito mais grave, incluindo os diversos aspectos da linguagem (habilidades pragmáticas, vocabulário, fonologia, sintaxe) e dispraxia verbal, enquanto que as crianças que apresentavam PMG limitada às áreas parietais apresentavam em geral alterações fonológicas e sintáticas, sem alterações práxicas. Em nosso estudo, o paciente III-6 é o mais acometido não só quanto à linguagem, mas também quanto ao déficit pseudobulbar, e é o único com epilepsia na família. Corroborando com o que é sabido na literatura, a imagem desse paciente é a mais extensa entre os dois com alteração na RM, visualizando-se PMG difusa bilateral ao redor da fissura de Sylvius. Por outro lado, a nossa paciente III-4 apresentou PMG restrita às áreas posteriores cerebrais e quadro clínico mais discreto que seu irmão. Acreditamos que alterações muito sutis ainda não possam ser detectadas pela tecnologia atual de neuroimagem, e isso pode justificar a RM normal encontrada nos pacientes com manifestações mais leves de nossa família.

Assim, o nosso estudo reforça a idéia de que a SP apresenta nítida correlação clínico-radiológica com correspondente espectro de gravidade, sendo que as manifestações clínicas mais leves se acompanham de achados sutis à RM e quadros clínicos mais graves ou floridos costumam se acompanhar de comprometimento cortical mais extenso.

REFERÊNCIAS

1. Guerreiro MM, Hage SRV, Guimarães CA, et al. Developmental language disorder associated with polymicrogyria. *Neurology* 2002;59:245-250. [[Medline](#)]
2. Guerreiro MM, Andermann E, Guerrini R, et al. Familial perisylvian polymicrogyria: a new familial syndrome of cortical maldevelopment. *Ann Neurol* 2000;48:39-48. [[Medline](#)]
3. Hage SRV, Guerreiro MM. Distúrbio específico de linguagem: aspectos lingüísticos e neurobiológicos. In Ferreira LP, et al. (eds). *Tratado de fonoaudiologia*, 2004:977-986.
4. Wechsler D. *Test de inteligencia para preescolares*. Buenos Aires: Paidós, 1991.
5. Wechsler D. *Escala de inteligência para crianças*, 3a. edição. São Paulo: Casa do Psicólogo, 2002.
6. Wechsler D. *Intelligence scale for adults - revised*. New York: The Psychological Corporation, 1981.
7. Yavas M, Hernandorena CLM, Lamprecht RR. *Avaliação fonológica da criança: reeducação e terapia*. Porto Alegre: Artes Médicas, 1992.
8. Andrade CRF, Befi-Lopes DM, Fernandes FDM, Wertzner HF. *ABFW-Teste de linguagem infantil*. Carapicuíba: Pró-Fono, 2000.
9. Capovilla FC, Capovilla AGS. Desenvolvimento lingüístico na criança brasileira dos dois aos seis anos: tradução e standardização do peabody picture vocabulary test e da language development survey de Rescorla. *Ciência Cognitiva: teoria, pesquisa e aplicação*, 1997:353-380.

10. Capovilla FC, Nunes LROP, Nogueira D, et al. Desenvolvimento do vocabulário receptivo-auditivo da pré-escola à oitava série: normatização fluminense baseada em aplicação coletiva da tradução brasileira do Peabody picture vocabulary test. *Ciência Cognitiva: teoria, pesquisa e aplicação*, 1997:381-440.
11. Hage SRV. Distúrbio específico do desenvolvimento da linguagem: subtipos e correlações neuroanatômicas. Tese, UNICAMP, Campinas 2000.
12. Capovilla AG, Capovilla FC. Prova de consciência fonológica: desenvolvimento de dez habilidades da pré-escola à segunda série. *Temas sobre Desenvolvimento* 1998;37:14-20.
13. Stein LM. Teste de desempenho escolar. São Paulo, 1994.
14. Kuzniecky R, Andermann F, Guerrini and the CBPS Multicenter Collaborative Study. Congenital bilateral perisylvian syndrome: study of 31 patients. *Lancet* 1993;341:608-612.
15. Gropman AL, Barkovich AJ, Vezina LG, Conry JA, Dubovsky EC, Packer RJ. Pediatric congenital bilateral perisylvian syndrome: clinical and MRI features en 12 patients. *Neuropediatrics* 1997;28:198-203. [[Medline](#)]
16. Montenegro MA, Guerreiro MM, Lopes-Cendes I, Cendes F. Bilateral posterior parietal polymicrogyria: a mild form of congenital bilateral perisylvian syndrome? *Epilepsia* 2001;42:845-849. [[Medline](#)]

Congenital Bilateral Perisylvian Syndrome (CBPS): familial occurrence, clinical and psycholinguistic aspects correlated with MRI

I.L. Brandão-Almeida MD, MS⁽¹⁾; M.M. Guerreiro MD,PhD⁽²⁾; S.R.V. Hage PhD⁽³⁾; E.P.M. Oliveira MS⁽²⁾; C.A. Guimarães BSc⁽²⁾; D.V.M. Abramides,BS⁽³⁾; M.A. Montenegro MD,PhD⁽²⁾; F. Cendes MD,PhD⁽²⁾ and I. Lopes-Cendes MD,PhD⁽¹⁾

Department of Neurology (2) and Medical Genetics (1) , State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Department of Speech Pathology(3), University of São Paulo (FOB), Bauru, SP, Brazil

Keywords : Epilepsy, polymicrogyria, malformations of cortical development, neuronal migration disorder.

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

Departamento de Genética Médica

Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP

Cidade Universitária “Zeferino Vaz”

Campinas SP, Brazil, CEP 13084-971

E-mail: icendes@unicamp.br

Summary: Purpose: Congenital bilateral perisylvian syndrome (CBPS) is a malformation of cortical development most frequently caused by perisylvian polymicrogyria. Typically, patients have an increased number and smaller cortical folds than usually found in the normal brain. Clinical spectrum of this syndrome is wide, commonly associated with epilepsy, pseudobulbar palsy, varying degrees of cognitive deficits and language disorder.

The aim of this study was to correlate the clinical and neuroradiologic data with the psycholinguistic aspects in patients with bilateral perisylvian polymicrogyria.

Design/Methods: Thirty two patients (twenty two males and 10 females) with a mean age of 17.4 years (range, 5-65 years) were studied. Fourteen were isolated patients and 18, belonging to 5 unrelated kindreds, had familial recurrence of polymicrogyria (PMG). We performed a clinical investigation of patients and their families, MRI scanning and neuropsychological tests and language evaluation at initial examination. Their cognitive level was assessed using one of the Wechsler intelligence scales. Language testing was performed according to a semi structured protocol that evaluated vocabulary, free conversation, repetition and the following language's aspects: phonologic, syntactic, semantic, pragmatic and lexical.

Results: Twenty-eight patients had a polymicrogyric appearance of the perisylvian cortex, characterizing the syndrome named bilateral perisylvian polymicrogyria. One had unilateral perisylvian polymicrogyria and only 3 patients had normal perisylvian region, one had bilateral parietal posterior PMG and two had bilateral frontal PMG. Prenatal events, such as hypertension, twin pregnancy, drug addiction, vaginal bleeding and fever at 20th gestational week were reported in 14 patients. All patients had similar neurologic dysfunction, mainly primarily pseudobulbar paresis. Hemiparesis was present in only 3 patients. Only 7 of our patients had epilepsy. Specific language impairment was found in 13 patients and psychological assessment showed that global cognitive deficit was not present in most of them, although they usually have lower verbal IQ when compared to their performance IQ. None of our patients had facial dysmorphic features.

Conclusions: Severity of clinical manifestations in CBPS is correlated with the extent of cortical involvement. The bilateral perisylvian polymicrogyria follows familial recurrence with variable degrees involving perisylvian regions. Epilepsy is not a common feature in patients with CBPS. Most of the patients with PMG have history of speech delay or language difficulties. Dyslexia can be founded in patients with bilateral posterior parietal PMG and their cognitive profiles and language skills are equally poor without global dysfunction.

INTRODUCTION

Congenital bilateral perisylvian polymicrogyria (CBPP) is a rare neurological disorder characterized by an excess of small gyri, shallow sulci and abnormal cortical lamination^(1,2). There is polymicrogyric cortex distributed in variable extensions around the sylvian fissure. Unilateral cases usually present with congenital hemiparesis, while bilateral cases have pseudobulbar paralysis of the oropharyngoglossal region. PMG is associated in 50 to 85% of patients with epilepsy⁽³⁾ therefore, both unilateral and bilateral cases have a high rate of epilepsy⁽⁴⁾. Other types of bilateral polymicrogyria selectively affect different cortical areas, but CBPP is the most frequent form. Only few cases with large, bilateral frontoparietal PMG have previously been described^(5,6,7). Although most cases of CBPP are sporadic, several families have been reported with a pattern consistent with X-linked inheritance⁽⁸⁾. In these families, clinical manifestations are extremely variable and male patients tend to be affected more often and more severely. CBPP often results in a typical clinical syndrome that is manifested by pseudobulbar palsy, epilepsy, and various degrees of cognitive deficits, which causes difficulties with expressive speech and feeding. In Paediatric population, CBPP has different manifestations than in adults.⁽⁹⁾ The characterization of patients with polymicrogyria offers an opportunity to assess the impact of anatomic abnormalities on cognitive function.

PATIENTS AND METHODS

Ascertainment of patients and their families

We performed a detailed clinical investigation of 32 patients and their families. Family histories were obtained and pedigrees were constructed. Eighteen patients, belonging to 5 unrelated kindreds, had familial recurrence of polymicrogyria. Criteria for diagnosis included clinical presentation of CBPS or language disturbance without hearing deficits, mental retardation or oral motor/structural abnormalities, both of cases with PMG on imaging studies. We systematically interviewed patients and their family members according to a standard detailed questionnaire, emphasizing family history of problems with phonation and delayed speech, motor development and occurrence of prenatal events during the first two trimesters of the pregnancy. Particular attention was paid to the seizure

history, age at onset, type, frequency and response to treatment. Diagnosis of epilepsy was defined by at least two recurrent unprovoked seizures based on family descriptions, and using the International League Against Epilepsy classification⁽¹⁰⁾. Clinical seizure patterns among the patients who had epilepsy were generalized tonic-clonic seizures, partial with secondary generalization or infantile spasms. All controlled with AED monotherapy or seizure-free for at least five years, at the time of neuropsychological test. All patients were examined by clinical neurologists and they performed imaging studies. MRI scans were performed in a 2T scanner (Elscent Prestige®), and included T1- and T2- weighted images in three orthogonal planes, as well as thin coronal T1 inversion recovery (IR) images. Informed consent was obtained in accordance with human study protocols approved by Medical School Ethics Committee of our university hospital. Neuropsychological test was assessed using the Wechsler Intelligence Scale for Children-III (WISC-III)¹¹, Wechsler preschool and Primary Scale of Intelligence (WPPSI)¹² or Wechsler Adult Intelligence Scale - Revised (WAIS-R)¹³. Language evaluation was performed by two child speech therapists (EPMO and SRVH). Spontaneous language and free conversation were evaluated according to a semi structured protocol that characterized the following aspects of language: phonologic, syntactic, semantic, pragmatic and lexical. Besides, some aspects of reading and writing were also assessed. The tests and protocols used were: Yavas Protocol, Peabody Picture Vocabulary Test – revised (PPVT) , Brazilian Standardization by Capovilla and Capovilla, Phonological Conscience Test and Scholar Performance. (14,15,16,17,18).

MRI studies:

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

matrix 252X328, FOV=21X23cm; (4) T1-weighted 3D gradient echo, acquired in the sagittal plane (1mm thick, flip angle=35°; TR=22, TE=9, matrix 256X220, FOV=23X25cm). MRI visual analyses were performed using multiplanar reconstruction on an OMNIPRO® workstation.

RESULTS

Table 1-2 list pertinent data from the 32 patients with the diagnosis of polymicrogyria, confirmed by magnetic resonance imaging (MRI) in this study. Computed tomography (CT) was performed in only one individual (II-9, table 1-family 2) that unfortunately used a metallic femur prothesis and information on brain MRI is not available in this case. Bilateral Sylvian-fissure cortex involvement and a variable extent of the lobes adjacent were present in (fig. 1) 28 patients (87.5%) and one of them had closed lip schizencephaly. Unilateral Sylvian-fissure cortex involvement with extent of posterior parietal lobe was observed in only 1 patient. The other 3 patients had normal Sylvian-fissure cortex, from which 2 with bilateral polymicrogyria in lobe frontal and 1 with bilateral involvement of the lobe posterior parietal. Of the 29 patients in whom polymicrogyria involve the Sylvian-fissure cortex, 10 had posterior parietal involvement, 5 had fronto-parietal, 1 frontal and 13 had extensive multilobar involvement. Eighteen patients, belonging to 5 unrelated kindreds without no known parental consanguinity; in one family dizygotic male twins were both affected (fig.2 pedigree) and fourteen patients were isolated cases with parental consanguinity reported in one of them (table2). Ten of the patients were female. Age at the time of study ranged from 5 years to 65 years. All pregnancies were reportedly uneventful, with the exception of 3 mothers in the families 1, 4 and 5, respectively (see table 1) that had a history of hypertension, twin pregnancy and using of AED. The mothers of patients: 1, 4, 6, 7, 8, 10 and 12 (table 2) reported prenatal event : drug addiction, precocious contraction, hypertension, fever and vaginal bleeding. The last three cases required hospitalization. Labor and delivery were normal and full term for all patients with the exception of patients II-1 and II-2, family 4(table1) who were premature at 30 weeks gestation. Associated malformations were not documented in none of the patients. Seizures were reported in 6 of the 32 patients; four of these had polymicrogyria in the bilateral Sylvian-fissure, one had

unilateral and all of these involving the parietal e/or frontal lobe, whereas one had lesions confined to the Sylvian-fissure with bilateral involvement. By history, the seizures were generalized tonic-clonic (table1) in patients II-4(fam.1), II-1(fam.4) and III-6(fam.5). Patients 3, 11 and 12 (table.2) had three seizures patterns: partial complex, generalized tonic-clonic and infantile spasms. Of the 6 patients with seizures, two had controlled with AED and four have remained seizure-free during the last five years and were not on anticonvulsants. The median age at onset of epilepsy was 4.3 (range 8 mo -13 years). Neurologic findings revealed pseudobulbar signs in 24 patients, like oromotor incoordination with inability to isolate the tongue from the mandible on lateral tongue movements or to protrude it. Hemiparesis was present in 2 patients, double hemiparesis in one and microcephaly in 2 patients (HC < - 2SD). Neurologic examination normal was observed in 28 patients, referring normal examination to strength, deep tendon reflexes, sensory system, cranial nerves, and coordination. Delayed motor milestones with axial hypotonia were reported in only 5 of the 32 patients, whereas development of language was delayed in 29 patients. Language testing revealed: 13 patients had specific language impairment (SLI) and speech was absent in 2 of them, normal examination in 3, language impairment (LI) in 10, characterized by dyslexia in 4 of them and six of the 32 patients were not evaluated so far. In the families 2 and 5 (table1), the individuals II-9 and II-4, both without polymicrogyria, had diagnosis of dyslexia. In all patients evaluated comprehension of language was more advanced than expressive speech. Neuropsychological assessment in a series of 26 of the 32 patients (table1-2) revealed that only 3 patients had performance IQ scores intellectually deficient. In these patients the involvement cortical has extent to frontal lobe in two cases and the other one resulting in more severe bilateral perisylvian polymicrogyria. Global cognitive deficit was not present in most of the patients.

DISCUSSION

Polymicrogyria is a brain dysgenesis with a complex nosology. Although It is currently included within disorders of neuronal migration, controversy exists as to whether polymicrogyria is a malformation, secondary to arrest of neuronal migration, or a postmigrational disruption at 20-24 week's gestation, perhaps due to vascular injuries^(19,20).

Analysis of experimentally induced polymicrogyria in animals favors interference with the later stages of migration. In this animal model, the inner cortical layers, which migrate earlier, are injured and the subsequent migration of the outer cortical layers results in the formation of multiple small convolutions⁽²¹⁾. The high incidence of bilateral lesions in the perisylvian region has been used as evidence for fetal hypotension and ischemic cortical damage as the underlying factor, but toxic and direct infectious damage certainly can not be excluded, particularly in case of unilateral lesions. Apart from the theories of pathogenesis from fetal injuries, genetic contribution to the development of polymicrogyria in some patients is supported by reports of familial cases makes it evident that gene mutations cause this brain anomaly in many instances^(22,23,24,25,26). The diagnosis can be made accurately by MR imaging. In this study, we used three Barkovich's criteria to identify 32 patients with polymicrogyria: abnormal gyral pattern, increased cortical thickness and irregularity of the cortical white matter junction⁽²⁷⁾. Unilateral polymicrogyria was characterized by the presence of a normal hemisphere and contralateral hemispheric polymicrogyria with reduced volume. In this series, congenital bilateral perisylvian syndrome (CBPS), which is most frequently caused by perisylvian polymicrogyria was present in 28 of the 32 patients. The only schizencephaly case in the present series support the traditional concept that polymicrogyria and schizencephalies result from the same pathogenetic processes⁽²⁸⁾. The majority of 32 patients described were adolescents or children and some of them have been presented elsewhere^(22,29,30). To summarize, we have studied 18 patients in 5 families (fig 2) which presented bilateral polymicrogyria with involvement of the Sylvian fissure in 17 cases and normal Sylvian fissure in 1 case (table 1). The others 14 patients were sporadic (table 2), with bilateral perisylvian polymicrogyria in 11 cases and 1 with unilateral perisylvian polymicrogyria. Two of the 14 had bilateral polymicrogyria with normal Sylvian fissure. Bilateral polymicrogyria involved the perisylvian regions more frequently in specific locations: posterior parietal lobe, fronto parietal and frontal. Patients with posterior parietal cortical involvement tended to present with a milder form of clinical signs like observed anterior studies^(22,29,30). In this study, history of major prenatal injury has been present in isolated cases of PMG and in clinically more severe familial case, however prenatal history could not provide evidence for a specific aetiology of this disorder. In 60% of the patients there were relate to feeding difficulties in the perinatal period, as well as

swallowing and sucking problems. Speech delay was found in 91% of the cases. An explanation is that patients and family members, including in this study were selected to perform MR image on basis in speech delay or abnormal language skill. Patients III-6 (table 1), and patients 6, 9 and 12 (table 2) had major signs of the neurologic involvement like the anatomic extent of the cortical lesion and abnormal neurological examination. Pseudobulbar signs characterized by difficulties with palatal and tongue movements, with variable limited protrusion and lateral movements were found in 78% of our patients. The results indicate that the extent of cortical involvement is very important in the determination of patients' prognoses. In familial and sporadic cases, male have been more severely affected than female. The bilateral PMG form suggest a genetic etiology and at least two syndromes of focal PMG have been identified: locus for bilateral perisylvian was localized on chromosome Xq28 and mapped the locus and recognized the gene *GPR56* on chromosome 16q12.2-21 to the bilateral frontoparietal syndrome^(1,31). The family 1 have been presented for one of us and now, we adds others affected members.⁽²²⁾. In our data, the mode of inheritance in families is compatible with X-linked transmission exception for the family 5 because of supposed male-to-male transmission. In family 5 (table 1), member II-4 has language impairment (dyslexia), normal MR image. The others members have variable degree of pseudobulbar signs with diferent images phenotype. It's possible to conclude that cases of polymicrogyria are clinically, etiologically and morphologically heterogeneous and that identical morphology does not imply similar eatiology. These cortical regions in specific syndromes suggest that underlying genetic factors may influence cortical development in a topologically specific manner⁽³²⁾. The severity of clinical manifestation correlates with the extent of cortical involvement. Bilateral or large unilateral lesions indicate a poor prognosis. Cognitive deficit was frequently associated with bilateral PMG or correlated with frontal involvement. Hemiparesis was often present when PMG was dominantly unilateral or was associated with schizencephaly like others reported^(27,33,34). However, there was not epilepsy refractory to AED treatment in our series, differently as previously described by several other authors^(35,36). Only 6 of our 32 patients (19%) had seizures, such as infantile spasms (IS), generalized tonic-clonic (GTC) and complex partial (CP). Severity of epilepsy varied from at least two seizures to easily controlled seizures. As others have found, there is no correlation between the type of epilepsy and the location of

the cortical involvement⁽⁹⁾. In our patients, age at seizures onset ranged from 8 months to 13 years with average age of 4.3 years whereas, in another series, epilepsy occurred in 58% of 12 patients with CBPS and seizures started at an early age⁽⁹⁾. Perisylvian PMG has been also associated with developmental dyslexia⁽²⁹⁾. Our study adds recurrence of dyslexia in families which polymicrogyria has been associated with parietal cortex (table 1). Dyslexia is defined as a specific reading disorder despite of normal intelligence and conventional teaching. One of the most influential theories to explain problems suffered by dyslexics assumes that dyslexia is caused by deficits of the magnocellular system. This system, that is responsible for processing fast sensory information, projects mostly to the parietal cortex. According to this theory, dyslexia could be caused by a specific parietal dysfunction⁽³⁷⁾. On the other hand, in two individuals in our families (II-9 family 2 and II-4 family 5) was not possible to associate PMG image in parietal cortex with dyslexia. However, most individuals with dyslexia do not have cortical lesions on brain MRI. The anatomical findings are relevant to understand the factors involved in the aetiology of dyslexia. Furthermore, dyslexia as a specific phonological deficit, results in much variation in phenotypes associated with disorders known to have a genetic component. This could explain the presence of dyslexia as a comorbidity between polymicrogyria. In addition, psychological assessment showed that global cognitive deficit was not present in most of the patients, although they usually have presented lower verbal IQ when compared to their performance IQ.

ACKNOWLEDGEMENTS This study was supported by CAPES and FAPESP, São Paulo, Brazil (grants # 03/01264-0). We thank all the family members who participated in this study.

REFERENCES

1. Villard L, Nguyen K, Cardoso C, Martin CL, Weiss AM, Sifry-Platt M, Grix AW, Graham Jr JM, Winter RM, Leventer RJ, Dobyns WB. A Locus for bilateral perisylvian polymicrogyria maps to Xq28. *Am.J.Genet* 2002; 70:1003-1008.
2. Villard L. Polymicrogyria. Orphanet Encyclopedia. August 2004.
3. Kobayashi E, Bagshaw AP, Jansen A, et al. Intrinsic epileptogenicity in polymicrogyric cortex suggested by EEG-fMRI BOLD responses. *Neurology* 2005; 64:1263-1266.
4. Kotini A, Camposano S Hara K, et al. Cortical thickness in a case of congenital unilateral perisylvian syndrome.
5. Sztriha L, Nork M. Bilateral symmetrical fronto parietal polymicrogyria. *European Journal of Paediatric Neurology* 2002; 6:229-232.
6. Piao X, Basel-Vanagaite L, Straussberg R, Grant EP, Pugh EW, Doheny K, Doan B, Hong SE, Shugart YY, Walsh CA. An Autosomal recessive form of bilateral fronto parietal polymicrogyria maps to chromosome 16q12.2-21. *Am. J. Hum. Genet* 2002; 70:1028-1033.
7. Chang B S, Piao X, Bodell A, et al. Bilateral fronto parietal polymicrogyria: Clinical and radiological features in 10 families with linkage to chromosome 16. *Ann Neurol* 2003; 53:596-606.
8. Foldvary-Schaefer N, Bautista J, Andermann F, et al. Focal malformations of cortical development. *Neurology* 2004;62(6):S14-S19.
9. Gropman AL, Barkovich AJ, Vezina LG, et al. Pediatric congenital bilateral perisylvian syndrome: Clinical and MRI features in 12 patients. *Neuropediatrics* 1997; 28: 198-203.
10. Commission on classification and terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* 1985; 26:268-278.

11. Figueiredo, VLM. WISC-III: Escala de Inteligência Wechsler para crianças, Terceira Edição. Adaptação e padronização de uma amostra brasileira: São Paulo, SP: Casa do Psicólogo, 2002.
12. Wechsler, D. Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence- Revised. San Antonio, Tx: The Psychological Corporation, 1989.
13. Wechsler, D. Wechsler Adult Intelligence Scale – Revised. San Antonio, Tx: The Psychological Corporation, 1981.
14. Yavas, M.; Hernandorena, CLM.; Lamprecht, RR. *Avaliação Fonológica da criança: reeducação e terapia*. Porto Alegre: Artes Médicas, 1992.
15. Stein, LM. TDE – *Teste de Desempenho Escolar*. São Paulo: Casa do psicólogo, 1994.
16. Capovilla, AGS. & Capovilla, FC. Prova de Consciência Fonológica. In: Capovilla, AGS & Capovilla, FC. *Problemas de Leitura e Escrita*. São Paulo: Ed. Memnon, 2003.
17. Grégoire J, Piérart B. Avaliação dos problemas de leitura: os novos modelos teóricos e suas implicações diagnósticas. Porto Alegre, RS: Artes Médicas, 1997.
18. Condemarin, M, Blomquist, M. Dislexia: manual de leitura corretiva. Porto Alegre, RS, Artes Médicas, 1989.
19. Golden JA. Cell migration and cerebral cortex development. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2001;27:22-28.
20. Van Bogaert P, David P, Gillain CA, et al. Perisylvian dysgenesis: clinical, EEG, MRI and glucose metabolism features in 10 patients. *Brain* 1998;121:2229-2238.
21. Hayashi N, Tsutsumi Y, Barkovich AJ. Polymicrogyria without porencephaly/schizencephaly. MRI analysis of the spectrum and the prevalence of macroscopic findings in the clinical population.
22. Guerreiro MM, Andermann E, Guerrini R, et al. Familial perisylvian polymicrogyria: a new familial syndrome of cortical maldevelopment. *Ann Neurol* 2000;48:39-48.
23. Miller SP, Shevell M, Rosenblatt B, Silver K, et al. Congenital bilateral perisylvian presenting as congenital hemiplegis. *Neurology* 1998;50:1866-1869.

24. Bartolomei F, Gavaret M, Dravet C, et al. Familial epilepsy with unilateral and bilateral malformations of cortical development *Epilepsia* 1999;40:47-51.
25. Borgatti R, Triulzi F, Zucca C, et al. Bilateral perisylvian polymicrogyria in three generations. *Neurology* 1999;52:1910-1913.
26. Caraballo RH, Cersosimo RO, Mazza E, et al. Focal polymicrogyria in mother and son. *Brain Dev* 2000;22:336-339.
27. Barkovich AJ, Hevner R and Guerrini R. Syndromes of bilateral symmetrical polymicrogyria. *Am J Neuroradiol* 1999;20:1814-1821.
28. Barth PG. Disorder of neuronal migration. *Can J Neurol Sci* 1987;14:1-16.
29. Guerreiro MM, Hage SRV, Guimarães CA, et al. Developmental language disorder associated with polymicrogyria. *Neurology* 2002;59:245-250.
30. Montenegro MA, Guerreiro MM, Lopes-Cendes I and Cendes F. Bilateral posterior parietal polymicrogyria: a mild form of congenital bilateral perisylvian syndrome. *Epilepsia* 2001;42(7):845-849.
31. Piao X, Hill RS, Bodell A, et al. G protein - coupled receptor-dependent development of human frontal cortex. *Science* 2004; 303:2033-2036.
32. Chang BS, Piao X, Giannini C, et al. Bilateral generalized polymicrogyria (BGP). A distinct syndrome of cortical malformation. *Neurology* 2004;62:1722-1728.
33. Barkovich AJ, Kjos BO. Schizencephaly: correlation of clinical findings with MR characteristics. *Am J Neuroradiol* 1992; 13:85-94.
34. Guerrini R, Barkovich J, Sztriha L, et al. Bilateral frontal polymicrogyria. A newly recognized brain malformation syndrome. *Neurology* 2000;54:909-913.
35. Kuzniecky R, Andermann F, Guerrini R. The epileptic spectrum in the congenital bilateral perisylvian syndrome. *Neurology* 1994;44:379-385.
36. Guerrini R. Genetic malformation of the cerebral cortex and epilepsy. *Epilepsia* 2005;46:32.
37. Jaskowski P, Rusiak P. Posterior parietal cortex and developmental dyslexia. *Acta Neurobiol Exp* 2005;65(1):79-94.

Mutation Analysis of the *EMX2* gene in patients with Bilateral Perisylvian polymicrogyria

I.L. Brandão-Almeida⁽¹⁾; R. Secolin⁽¹⁾; F.R. Torres⁽¹⁾; D.A. Souza⁽¹⁾, N. F. Santos⁽¹⁾, S.R.V. Hage⁽³⁾; C.A. Guimarães⁽²⁾; E.P. M. Oliveira⁽²⁾; M.A. Montenegro⁽²⁾; F. Cendes⁽²⁾; I. Lopes-Cendes⁽¹⁾ and M.M. Guerreiro⁽²⁾

Department of Neurology (2) and Medical Genetics (1), University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Department of Speech Pathology(3), University of São Paulo (FOB), Bauru, SP, Brazil

Summary: Bilateral perisylvian polymicrogyria is one of the well recognized clinical Polymicrogyria syndromes. Polymicrogyria (PMG) is radiographically, clinically and genetically heterogeneous cortical malformation and is often seen in association with other developmental brain malformation such as schizencephaly. Mutations in *EMX2* gene were associated with some cases of schizencephaly which represents the most severe form of PMG spectrum. This gene is known to control the development of the cerebral cortex and in particular the proliferation and possibly the migration of cortical neuroblasts. The pathogenesis of PMG is unknown but It is considered to be a neuronal migration and organization disorder caused by an injury or defects in placenta perfusion possibly related to genetics factors, until not totally clear or extrinsic causes like intrauterine infections for cytomegalovirus. In this study we performed mutations analysis at the *EMX2* gene in patients with PMG using Single-strand conformational polymorphism (SSCP) analysis and silver staining.

Methods: We performed a detailed clinical investigation of patients and their families and pedigrees were constructed. In addition, patients were also assessed by neuropsychological tests and language evaluation. For neuroimaging studies we use high resolution volumetric MRI with multiplanar reconstruction. Mutation screening was performed by the polymerase chain reactions (PCRs) for exon amplification and PCR products were analysed by single strand conformation polymorphism (SSCP) and were visualized by silver staining.

Results: All patients included in this study had MRI scans with diagnosis of PMG. Twenty one of the 30 patients were male. Their ages at the time of study ranged from 4 to 65 years. Each of the three exons of the *EMX2* gene was separately amplified by PCR and subject to SSCP analysis. No mutations were uncovered in any of the 30 patients screened by SSCP.

Conclusions: Affected individuals with PMG present a variable phenotype which is largely dependent on the location and size of the affected area. The PMG was bilateral in 29 (97%) patients. The cortex in the Sylvian fissures was involved in 90%. The lobes involved in PMG were frontal 7%, posterior parietal 33%, frontoparietal 17%. The clinical spectrum thus ranges from individuals with severe neonatal encephalopathies to normal adults with normal neurologic evaluation and very specific cognitive defects caused by a limited PMG focus. Despite limited verbal IQ, our results support the observation that perisylvian polymicrogyria does not necessarily lead to intellectual disability and may be one of the neurobiological substrates of both entities: SLI and disorder of the written language. Polymicrogyria appear not to have genetic background in the *EMX2* gene, since that in a large cohort of patients in our study, no mutation was noted in the *EMX2* gene.

Keywords Polymicrogyria, schizencephaly, *EMX2* homeobox genes, SSCP analysis

Introduction

Polymicrogyria (PMG) is a brain malformation characterized by abnormal cortical lamination and excessive number of small gyri and prominent convolutions¹. There are at least two different types of histological patterns: unlayered type and four-layered type; in both, the cortical ribbon is abnormally thin, excessively folded, and may show fusion of adjacent gyri. Layered and unlayered PMG can be both found in the same individual, thus suggesting that they belong to the same malformation spectrum.² Both types of polymicrogyria have been associated with schizencephaly.^{3,4} Schizencephaly is a rare congenital defect of the cortex, involving a full-thickness cleft of the cerebral hemispheres

with consequent communication between the ventricle and pericerebral subarachnoid spaces⁵. According to some authors, PMG represents a superficial cortical injury and schizencephaly results in a more severe injury, that extends deeply into the hemisphere and destroy completely the radial glial fibers.⁶ Topographic distribution of PMG is variable, the majority being, bilateral symmetrical perisylvian PMG and a minority in the inferior and medial aspects of the cerebral hemispheres or the occipital lobes. The severity of clinical manifestations correlates with the extent of cortical involvement. Bilateral or large unilateral lesions indicate a poor prognosis.⁷ Clinical features consist of epilepsy in most patients, and varying degrees of cognitive deficits, facial diplegia, dysarthria, swallowing difficulties and palatal dysfunction such as poor articulation and poor tongue movements. The incidence of the different PMG forms is unknown, but the frequency of cortical dysplasia in general is estimated to be 1 in 2500 newborns.² The pathogenesis of PMG is still mysterious. Most cases are sporadic, but the presence of bilateral symmetric polymicrogyria, in particular, is often taken to suggest a genetic etiology.³ The locus for bilateral perisylvian PMG has been localized to chromosome Xq28⁸ and bilateral frontoparietal on chromosome 16, which is caused by mutations in the *GPR56* gene.⁹ Mutations in the *EMX2* gene have been described in schizencephaly, which could be the most severe form of polymicrogyria spectrum.^{9,10}

The objective of this study was to investigate the possibility that a mutation in the homeobox gene *EMX2* may be involved in Bilateral polymicrogyria Perisylvian. We present a detailed clinical investigation of 30 patients with the diagnosis of PMG based on findings from high resolution MRI . Single-strand conformational polymorphism (SSCP) analysis from Polymerase Chain Reaction (PCR) products was used to identify possible mutations of the gene *EMX2*.

Material and Methods.

Patients

A total of 30 patients including 5 unrelated families with recurrence cases were evaluated. Patients were interviewed and examined by 2 clinical neurologists , detailed medical histories and complete neurologic examinations were performed. Family histories were obtained and

pedigrees were constructed and we systematically investigated family members of patients with the clinical presentation of perisylvian PMG and any patient with language impairment. In addition, the patients were assessed by neuropsychological tests and language evaluation. Informed consent was obtained in accordance with human study protocols approved by the National Ethics Commission in Research (CONEP) and DNA samples were collected from 30 patients with the diagnosis of perisylvian polymicrogyria, confirmed by magnetic resonance imaging (MRI) seen consecutively at our university hospital from January 2003 to October 2004.

Methods

Scans was performed in a 2T scanner with T1- and T2-weighted images in three orthogonal planes, using our epilepsy protocol. Neuropsychological function was assessed using Weschler Intelligence Scales and speech evaluation with investigation of: vocabulary, phonology, syntax, pragmatic, reading and writing also was performed. DNA was isolated from peripheral lymphocytes of affected patients and we realized polymerase chain reactions (PCRs) for exon amplification and PCR products were analyzed by the technique of detecting mutations as single-stranded conformational polymorphisms (SSCP) is a convenient method of screening for possible mutations¹¹ and SSCP bands may be visualized by silver staining¹².

Results

A total of 30 patients, including 9 females and 21 males with PMG diagnosed by MRI were examined. Ages ranged from 4 from 65 years old. Sixteen patients had familial recurrence cases without consanguinity history. Twenty seven patients had a polymicrogyria appearance of the perisylvian cortex. More detailed imaging analysis revealed that 12 patients had bilateral perisylvian polymicrogyria and 1 patient had schizencephaly associated with diffuse PMG . Eight with bilateral posterior parietal, 5 with bilateral frontoparietal and 1 with unilateral posterior parietal. Three patients had normal perisylvian cortex with polymicrogyria frontal in 2 patients and in 1 patient posterior parietal polymicrogyria. Twenty two patients had similar Neurologic dysfunction, mainly

pseudobulbar paresis, such as poor articulation and poor tongue movements. Seven had normal Neurologic examination. One had severe neonatal encephalopathies. Prenatal events were reported in 14 patients like hypertension and vaginal bleeding. Epilepsy was present in 6 patients. Seizures were well controlled using anti-epileptic drugs in all the 6 patients. Seizures were commonly consisted of generalized tonic-clonic and two patients had febril seizures. Neuropsychologic studies showed that patients have lower verbal IQ as compared to performance IQ or They have normal IQ and normal language evaluation. In eleven patients speech/language evaluation showed specific language impairment (SLI), also known as developmental dysphasia or developmental language disorder is diagnosed when there is a marked impairment in the development of expressive and or receptive language that is not associated with mental retardation, autism, hearing impairment or neurological disorder. Dyslexia was observed in 2 patients. Language impairment was observed in 8 patients and 2 patients were normal evaluation. Seven could not be evaluated. Mutations analysis in *EMX2* gene were absent in this group of the patients with polymicrogyria. Representative SSCP results are demonstrated in Figure 1.

Discussion

EMX2 is a human homologue of the *Drosophila empty spiracles* gene (*ems*), which is a homeodomain-containing transcription factor with important functions in early head development¹³. Early in *Drosophila* development, *ems* is expressed in an anterior stripe, and mutation or deletion of *ems* leads to the loss of a specific group of anterior head and sensory structures¹³. Vertebrates have two *ems* homologues, *EMX2* and *EMX1*, which have highly conserved primary structures¹⁴. Both *EMX1* and *EMX2* contain the conserved homeodomain and are involved in embryonic central nervous system (CNS) development. The comparison of human genes with their homologs in other species has been a powerful and successful technique to identify the genetic basis of disease. Comparison of human and murine homeobox genes has led to the identification of genes that, when mutated, result in human disease. Severe mutations (frameshift or splicing mutations) are in fact associated with severe bilateral forms of schizencephaly, whereas milder mutations (missense mutations) are associated with less-severe manifestations of the disorder like demonstrated

Faiella et al ⁵. The description of a few familial cases of schizencephaly associated with *EMX2* mutations raise the possibility that genetic factors could play a relevant role in the pathogenesis of this brain malformation¹⁵ besides, the presence of different mutations in cases severe schizencephaly supports the hypothesis that *EMX2* is required for the correct formation of human cerebral cortex.

Barkovich et al demonstrated that schizencephaly and polymicrogyria are the result of the same ischemic cortical damage in the early postmigrational period. The Barkovich' hypothesis is supported by the fact that the cortical infoldings occur in approximately the same locations as the transhemispheric clefts of schizencephaly, the presence of infoldings of various depths, and the fact that both schizencephaly and cortical infoldings are lined by polymicrogyria certainly suggests a common pathogenetic origin for the mechanism of formation.

Our data report a analysis of the 3 exons at the *EMX2* gene in cohort of 30 patients with polymicrogyria and in one of them, schizencephaly was present in a mild form associated with polymicrogyria.

Therefore, some cases of schizencephaly and Polymicrogyria appear not to have genetic background in the *EMX2* gene, since that in a large cohort of patients in our study, no mutation was noted in the *EMX2* gene.

References.

1. Chang BS, Piao X, Giannini C, Cascini GD, Scheffer I, Woods CG, Topcu M, Tezcan K, Bodell A, Leventer RJ, Barkovich AJ, Grant PE, Walsh CA. Bilateral generalized polymicrogyria (BGP). A distinct syndrome of cortical polymicrogyria. *Neurology* 2004;62:1722-1728.
2. Villard L. Polymicrogyria. Orphanet Encyclopedia. August 2004
3. Levine DN, Fisher MA, Caviness VS Jr. Porencephaly with microgyria: a pathologic study. *Acta Neuropathol* . 1974;29:99-113.
4. Hayashi N, Tsutsumi Y, Barkovich AJ. Polymicrogyria without porencephaly/schizencephaly. MRI analysis of the spectrum and the prevalence of macroscopic findings in the clinical population. *Neuroradiology*. 2002;44:647-655.
5. Faiella A, Brunelli S, Granata T, D'Incerti L, Cardini R, Lenti C, Battaglia G, Boncinelli E. A number of schizencephaly patients including 2 brothers are heterozygous for germline mutations in homeobox gene *EMX2*. *Eur J Hum Genet* 1997; 5:186-190.
6. Barkovich AJ, Kjos BO. Schizencephaly: correlation of clinical findings with MRI characteristics. *AJNR Am J Neuroradiol* 1992;13:85-94.
7. Brandão-Almeida IL, Hage SRV, Guimarães CA, Santos NF, Oliveira EPM, Montenegro MA, Torres FR, Secolin R, Li LM, Cendes F, Lopes-Cendes I, Guerreiro MM. Congenital Bilateral Perisylvian Polymicrogyria Syndrome: Clinical, EEG, MR Imaging, Aspects Psycholinguistics and Genetics. *J Epilepsy Clin Neurophysiol* 2004;10(1):7-12.
8. Villard L, Nguyen K, Cardoso C, Martin CL, Weiss AM, Sifry-Platt M, Grix AW, Graham Jr JM, Winter RM, Leventer RJ, Dobyns WB. A Locus for bilateral perisylvian polymicrogyria maps to Xq28. *Am.J.Genet* 2002; 70:1003-1008.
9. Piao X, Hill RS, Bodell A, Chang BS, Basel-Vanagaite L, Straussberg R, Dobyns WB, Qasrawi B, Winter RM, Innes AM, Voit T, Ross ME, Michaud JL, Descarrie JC, Barkovich AJ, Walsh CA. G protein-coupled receptor-dependent development of human frontal cortex. *Science* 2004;303:2033-2036.

10. Brunelli S, Faiella A, Capra V, Nigro V, Simeone A, Cama A, Boncinelli E. Germline Mutations in the homeobox gene EMX2 in patients with severe schizencephaly. *Nature Genetics* 1996;12:94-96.
11. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, and Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase Chain reaction. *Genomics* 1989; 5:874-879.
12. Hager J, Blanche H, Sun F, Vionnet N, Vaxillaire M, Poller W, Cohen D, Czernichow P, Velho G, Robert JJ, Cohen N, and Froguel P. Six mutations in the glucokinase gene identified in MODY by using a non radioactive sensitive screening technique. *Diabetes* 1994; 43:730-733.
13. Dalton D, Chadwick R, McGinnis. Expression and embryonic function of empty spiracles: a *Drosophila* homeo box gene with two patterning functions on the anterior posterior axis of the embryo. *Genes Dev.* 1989; 3:1940-1956.
14. Noonan FC, Mutch DG, Mallon MA, Goodfellow PJ. Characterization of the homeodomain gene EMX2: sequence conservation, expression analysis, and a search for mutation in endometrial cancers. *Genomics.* 2001; 76(1-3):37-44.
15. Granata T, Farina L, Faiella A, Cardini R, Díncerti L, Boncinelli E, Battaglia G. Familial schizencephaly associated with EMX2 mutation. *Neurology* 1997; 48:1403-1406.

ANEXO II- Parecer do comitê de etica em pesquisa . FCM-UNICAMP.



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

✉ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas, SP

☎ (0__19) 3788-8936

fax (0__19) 3788-8925

✉ cep@head.fcm.unicamp.br

CEP, 27/07/05
(PARECER PROJETO 383/2000)

PARECER

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETOS: “ESTUDO DAS MUTAÇÕES EM GENES RESPONSÁVEIS POR DIFERENTES FORMAS DE DESORDEM DO DESENVOLVIMENTO CORTICAL”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Fábio Rossi Torres

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a emenda que introduz a aluna Iara Brandão de Almeida como co-responsável pelo sub-projeto: **ESTUDO MOLECULAR E DE CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO NA POLIMICROGIRIA PERISYLVIANA BILATERAL CONGÊNITA**, no protocolo de pesquisa supracitado.

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

ANEXO III- Formulário de consentimento informado para pesquisa médica

Universidade Estadual de Campinas



Departamento de Genética Médica

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 1 de 3

Título do Projeto: Estudo Clínico e de Genética molecular em Polimicrogiria

Pesquisadores Responsáveis: Dra. Iara L. Brandão de Almeida, Dra. Neide Ferreira dos Santos, Dra. Marilisa M. Guerreiro e Dra. Íscia T. Lopes Cendes

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidado (a) a participar em um projeto de pesquisa envolvendo pacientes e famílias de indivíduos com polimicrogiria. O objetivo geral do estudo é o de isolar genes responsáveis por essa doença através de métodos de genética molecular. A identificação desses genes pode eventualmente melhorar o diagnóstico e levar a uma melhor abordagem dessa doença.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e famílias. Eu serei submetido a um exame físico neurológico para estabelecer meu estado clínico. Além disso, poderei ser submetido a um eletroencefalograma (EEG), ressonância magnética de crânio, avaliação fonoaudiológica e neuropsicológica. Uma amostra de sangue venoso será colhida (20 a 30 ml, o equivalente a duas colheres de sopa). Hospitalização não será necessária. Os procedimentos mencionados acima, e coleta da amostra de sangue, fazem parte dos cuidados médicos de rotina para um paciente com polimicrogiria.

RISCO E DESCONFORTO:

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



FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 2 de 3

Título do projeto: Estudo Clínico e de Genética molecular em Polimicrogria

Pesquisadores Responsáveis: Dra. Iara L. Brandão de Almeida, Dra. Neide Ferreira dos Santos, Dra. Marilisa M. Guerreiro e Dra. Íscia T. Lopes Cendes

VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação nesse estudo e que o meu diagnóstico e o meu tratamento provavelmente não serão modificados. Contudo, os resultados desse estudo podem, a longo prazo, oferecer vantagens para os indivíduos com Polimicrogria, possibilitando um melhor diagnóstico e tratamento mais adequados. É importante notar que o diagnóstico pré-sintomático não faz parte dessa pesquisa, mas se eu desejar obter orientação genética, ela será oferecida nos ambulatórios do serviço de genética clínica do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), tel. (019) 3788-8908.

SIGILO:

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

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

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Eu entendo que posso requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. A Dra. Iara L. Brandão de Almeida, Dra. Neide Ferreira dos Santos, Dra. Marilisa M. Guerreiro e Dra. Íscia T. Lopes Cendes tel (019) 3788-8907 estarão disponíveis para responder minhas questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contactar a secretaria da comissão de ética da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (019)3788-7232.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO: Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue) sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC- UNICAMP. Eu reconheço também que os

médicos responsáveis por este estudo, poderão interromper a minha participação a qualquer momento que julgarem apropriado.

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 3 de 3

Título do projeto: Estudo Genético Clínico em Polimicrogria

Pesquisadores Responsáveis: Dra. Iara L. Brandão de Almeida, Dra. Neide Ferreira dos Santos, Dra. Marilisa M. Guerreiro e Dra. Íscia T. Lopes Cendes

Eu confirmo que o(a) Dr(a). _____
me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos, desconforto e possíveis vantagens advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

Nome do participante ou responsável

Assinatura do participante ou responsável

data

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

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

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado

data



ANEXO IV . Formulário de avaliação Clínica

Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Genética Médica

**FORMULÁRIO PARA AVALIAÇÃO CLÍNICA DE PACIENTES COM SD.
PERISYLVIANA**

Data da consulta: _____
Nome: _____ **HC:** _____
Data de nascimento: _____ **Local** _____ **Escolaridade:** _____
Pai _____ **DN** _____ **Escolaridade** _____ **P**
rofissão _____
Mãe _____ **DN** _____ **Escolaridade** _____ **P**
rofissão _____
Consanguinidade entre os pais: () Sim () Não
Sobrenome da Família: _____
Origem étnica dos quatro avós: Maternos: _____ / _____ **Paternos:**
_____ / _____
Status clínico: _____ (Sintomático/ Não Sintomático)
Endereço: _____

História Clínica: () Ausência / (X) Presença (informe a idade gestacional no qual ocorreu)

1. Evento Pré-natal:

() Sangramento Transvaginal(Id) _____ / () Contratilidade Uterina
Precoce(Id) _____ / () Diabetes Gestacional(Id) _____ / () Hipertensão
Gravídica(Id) _____ / () Uso de medicação durante gestação(Id) _____
() Alcool (Id) _____ () Tabaco(Id) _____ () Drogas
ilícitas(Id) _____ / _____
Outros _____

2. Parto : () Cirúrgico () Espontâneo () Forceps () Feto único () Gemelar

3. Nascimento:

() Termo (Id) _____ () Prematuridade (Id) _____ / Peso nascimento _____ PC _____ () Ventilação mecânica (Id) _____ () crise convulsiva neonatal () Outros _____

4. História de Epilepsia na família () Sim () Não **5. História Pessoal de Epilepsia** () Sim () Não

6. Evolução : Sinais Pseudobulbares / () Ausência / (X) Presença (informe a idade na qual ocorreu)

- 6.1 Dificuldade de Sucção : () _____
- 6.2 Engasgo: () _____
- 6.3 Dificuldade de deglutição: () _____
- 6.4 Sialorreia: () _____
- 6.5 Dificuldade de Mastigação: () _____
- 6.6 Dificuldade de Soprar () _____

7. Idade de Início:

I. Desenvolvimento

Neuromotor: _____

II. Desenvolvimento de Linguagem:

8. Anomalias Associadas a SD. Perisylviana:

- 8.1 Artrogripose: : () _____
- 8.2 Micrognatia: () _____
- 8.3 Pectus excavatum: () _____
- 8.4 Perda Auditiva: () _____
- 8.5 Outras _____

9. Exame Neurológico: PC=

Sinais Pseudobulbares: (Movimentação de palato e língua, reflexo de vômito)

Avaliação de Força Motora:

Tônus:

10. Heredograma ⇒

ANEXO V- Encaminhamento de amostras de sangue para o laboratório de Genética Molecular

Seguir as instruções para coleta de amostras de sangue para extração direta de DNA e contactar o laboratório de genética molecular para obter autorização para a coleta (fone:3788-89-02).

Data da coleta:_____ Nome do paciente:_____

Idade:_____

Filho de consanguíneos: () sim () não

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

HC:_____

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

Ambulatório:_____

Docente

Responsável:_____

Diagnóstico

Clínico:_____

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

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

ANEXO VI

Semeadura e Preparação Citológica

Técnica de cultura temporária de linfócitos do sangue periférico para obtenção de cromossomos metafásicos, segundo modificações da técnica descrita por Moorhead e col., Exp. Cell. Res 1960; 20: 616-619.

Obs.: Todo o processo, desde a obtenção do material até o tratamento com colchicina, deve ser feito sob completas condições de assepsia, para evitar qualquer tipo de contaminação do material que comprometa a cultura e interfira no crescimento celular.

PROTOCOLO

Colheita

- 1) Colher de 3 a 5 mL de sangue por punção venosa, com seringa estéril descartável, previamente umedecida em heparina (liquemine Roche[®] 5.000 µg/ml), para evitar coagulação;
- 2) Deixar a seringa na posição vertical, para sedimentar o plasma (+- 1 mL). Trocar a agulha com a qual foi feita a coleta;
- 3) Desprezar parte do plasma;

Semeadura

- 4) Em frascos de vidro estéreis (capacidade total de 20 a 25 mL), ou tubos cônicos estéreis de 15mL, colocar 4,5 mL de meio de cultura enriquecido com 20% de soro fetal bovino, 0,2 mL de fitohemaglutinina, antibióticos e acertar o pH (com HCl ou NaOH) entre 6,8 – 7,0 (ou utilizar meio comercial pronto, completo e específico para sangue periférico); Adicionar 20–25 gotas de sangue total (ou \cong 0,5 mL de plasma + “camada intermediária”), levemente homogenizado. Misturar, tampar o frasco, etiquetá-lo e colocar na estufa a 37°C por 72 horas.

Colchicinização

- 5) Após esse período (\cong 72 horas), retirar o frasco de cultura da estufa e na câmara asséptica colocar 0,1 mL de colchicina (para bloquear as fibras do fuso e obter células em metáfases) para cada 5 mL de cultura;
- 6) Colocar novamente na estufa a 37°C por 1 a 1 hora e ½;

Preparação Citológica

- 7) Após esse período, retirar da estufa, agitar o frasco de forma a ressuspender bem as células e transferir a suspensão para tubos de centrifuga (no caso de culturas semeadas em frascos de vidro estéreis);
- 8) Centrifugar a 1000-1200 rpm por 10-12 minutos;
- 9) Retirar o sobrenadante, sem misturar o sedimento;
- 10) Acrescentar gradativamente 4 mL no total de Solução Hipotônica (1+3) a 37°C (KCl a 0,075 M, para se obter cromossomos espalhados), deixando escorrer pelo tubo e homogenizar levemente o material com pipeta Pasteur;
- 11) Deixar os tubos na estufa a 37°C por \cong 10 – 15 minutos;
- 12) Em seguida, adiciona-se 0,5mL de Solução Fixadora recém-preparada de metanol e ácido acético na proporção 3:1;
- 13) Centrifugar a 1000-1200 rpm por 10-12 minutos, desprezando-se o sobrenadante.

Fixação

- 14) Procede-se à fixação do material, adicionando-se 4 mL de sol. fixadora e ressuspende-se o material com pipeta Pasteur;
- 14) Em seguida, centrifuga-se à 1000-1200 rpm por 10-12'; retirar o sobrenadante, sem ressuspender o sedimento;
- 15) Colocar 4 mL de fixador e homogenizar;
- 16) Deixar na geladeira (\cong 4°C) pelo menos 1 hora;
- 17) Centrifuga-se e procede-se a troca do fixador mais 2 vezes como nos itens 15 e 16, até que a suspensão fique com aspecto límpido;
- 18) Finalmente, acrescenta-se somente 0,3 a 0,5 mL de fixador ao sedimento (para se obter uma suspensão celular).

Preparo das Lâminas

- As lâminas devem estar muito bem lavadas e limpas, e podem ser feitas molhadas (imersas em água deionizada gelada) ou secas.

19) Ressuspende-se o sedimento no fixador e pinga-se 2 a 3 gotas na lâmina levemente inclinada;

20) Enxuga-se a parte posterior da lâmina com papel absorvente e passa-se algumas vezes rapidamente na chama de uma lamparina a álcool, sem deixar esquentar muito, até que a lâmina fique seca..

Técnicas de Coloração

O estudo dos cromossomos (CARIÓTIPO) é feito através de diferentes técnicas de coloração na lâmina com o material pingado.

A coloração dos cromossomos pelo corante GIEMSA (Coloração Convencional) é utilizada para o estudo da morfologia geral dos cromossomos, permitindo sua classificação em grupos (de **A** a **G**) de acordo com o seu tamanho e posição do centrômero (Metacêntrico, Submetacêntrico e Acrocêntrico).

Para um estudo mais detalhado dos cromossomos, são necessárias técnicas de Bandamento cromossômico (a mais utilizada para análise de rotina é a Banda **G**), que permite a identificação de cada par cromossômico.

Coloração sólida:

Obtida através de técnica de coloração convencional Giemsa, com uma solução a 5% de Giemsa (solução de azul eozina e azul de metileno, Merck) em tampão Sorensen pH 6,8, durante 7 a 8 minutos.

Bandamento G:

Obtida segundo técnica de SANCHEZ e col. (1973). Esta técnica consiste na coloração das lâminas com corante Wright diluído em tampão fosfato 0,06M na proporção 1:3 durante 2 a 3 minutos.

Critério de análise

Determinação Cariotípica:

Foram analisadas 10 metáfases consecutivas sob bandamento G a partir das culturas de 72 horas para a caracterização do cariótipo dos pacientes.

ANEXO VII

PROTOCOLO PARA TÉCNICA DE FISH

Usar sempre lâminas preparadas antes do uso.

1. Lavar a lâmina em 2 x SSC por 2 minutos à temperatura ambiente.
2. Desidratar em álcool 70%, 85% e absoluto por 2 minutos em cada à temperatura ambiente.
3. Deixar secar rapidamente e colocar a 37°C por pelo menos 2 minutos.
4. Pré-aquecer a lamínula selecionada por pelo menos 1 minuto a 37°C.
5. Misturar o tubo da sonda e pré-aquecer uma alíquota de 10µl por amostra a 37°C por pelo menos 2 minutos.
6. Adicionar 10µl da sonda na área marcada na lâmina previamente, onde se encontra um número de células ideal.
7. Colocar a lamínula previamente aquecida sobre a lâmina preparada
8. Deixar a solução da sonda se espalhar sob a lamínula, pressionando levemente.
9. Selar as bordas da lamínula aplicando a solução de borracha para assegurar completo selamento.
10. Assegurar-se que a solução de borracha esteja completamente seca, colocando-a a 37°C por pelo menos 5 minutos antes de proceder o passo seguinte.

DENATURACÃO

1. Checar se a temperatura da placa aquecedora está a 75°C usando o termômetro de superfície, e checar se não há solução de borracha ou outro material sob a lâmina que possa causar problemas com a transferência de temperatura.
2. Denaturar a sonda e o DNA alvo colocando as lâminas preparadas na placa aquecedora, com a superfície de temperatura de 75°C, por **2 minutos**.

HIBRIDACÃO

Hibridar as lâminas em uma câmara úmida escura a 37°C “overnight”.

LAVAGEM

Há dois tipos de Lavagens rigorosas com e sem formamida:

- A lavagem com o protocolo de formamida conduz a ótimos resultados.
- O protocolo sem formamida é delineado para rápidos resultados.

Preparação das soluções de lavagem

A . Sistema sem Formamida

1. Preparar um coplim contendo 0,4 x SSC.

Colocar em banho-maria e deixar chegar a 72°C; ajustar o pH para 7,0.

2. Preparar um coplim contendo 2 x SSC a 0,05% TWEEN 20.

Deixar a temperatura ambiente.

Passos das lavagens

Sistema de lavagem sem formamida

1. Remover a lamínula cuidadosamente com uma pinça e colocar em um coplim contendo 0,4 x SSC a 72°C por 2 minutos.

2. Colocar a lâmina em um coplin à temperatura ambiente contendo 2 x SSC a 0,05% de TWEEN 20 por 30 segundos.

3. Escorrer o excesso do líquido em um papel de filtro.

CUIDADO! Não deixar a lâmina secar. Evitar processar mais do que seis lâminas através das lavagens rigorosas ao mesmo tempo.

4. Depois da incubação remover com cuidado a lamínula e todos os traços de borracha da lâmina, com uma pinça.

5. Lavar a lâmina através das três lavagens nos coplins com 50% formamida\1 x SSC 5 minutos em cada a 45°C. **Descartar a lamínula e não reutilizá-la.**

6. Lavar a lâmina 5 minutos em um coplim contendo recém preparado 1 x SSC a 45°C.

7. Lavar a lâmina em um coplin contendo tampão recém preparado 1 x ST 45°C. Lavar a lâmina em 5 minutos em 1 x ST a temperatura ambiente.
8. Escorrer o excesso do líquido e, pelas bordas, absorver com papel de filtro.

COLORAÇÃO

1. Adicionar 10 µl **DAPI\PI-antifade** à região marcada na lâmina.
2. Colocar uma lamínula padrão para microscopia de fluorescência sobre a lâmina.
3. Deixar a coloração se desenvolver no escuro por 10 minutos antes de observar.
4. Observar sob microscópio de luz epifluorescente com os filtros certos.

OBS.

As sondas são sensíveis à luz. Os resultados não serão bons quando as sondas são expostas à mínima quantidade de luz durante estes procedimentos, com tudo, não é necessário trabalhar no escuro.

MICROSCOPIA POR EPIFLUORESCÊNCIA

1. Lâmpada de mercúrio de 100w.
2. O microscópio deve estar bem centralizado.
3. Objetivas devem ser de 40x ou 60x de imersão.
4. O filtro para rastreamento pode ser duplo (DAPI\FITC) porém o melhor é o triplo (DAPI\FITC\TRITC ou DAPI-FITC-TEXAS RED).

MATERIAL NECESSÁRIO PARA TÉCNICA DE FISH

- **2 x SSC –100ml**
(20 x SSC - solução estoque que pode ser guardada durante 1 ano à 4°C:
175,3g Cloreto de sódio; 88,2g Citrato de sódio. Completar 1 litro com água destilada.
Ajustar o pH com HCl para 7,0.
Para fazer 4 x SSC diluir a solução estoque 1:5 e para fazer 2 x SSC diluir a solução estoque 1:10).

- 0,4 SSC pH 7,0 a 72°C →100 ml
- 2 x SSC a 0,05% de Tween 20 →100ml
- 1 x ST tampão →300ml

(ST: solução + concentrada de 4 x SSC, 0,05% Tween. Pode ser preparado em grande quantidade e deixado à temperatura ambiente.

p. ex., para fazer 10 litros→2 litros de 20 x SSC, 8 litros de água destilada e 5ml de Tween 20).

- Álcool 70% →100ml
- Álcool 85% →100ml
- Álcool absoluto →100ml
- Eppendorf de 0,050ml →5µl.
- Lamínula
- Lâminas super limpas em etanol/éter
- Parafilm →10cm
- Coplins →13µl
- Cuba plástica, envolta com papel alumínio, com capacidade para serem colocados três coplins protegidos da luz.
- Pinça →1µl
- Luvas
- Banho Maria à 37°C
- Banho Maria de precisão à 75°C
- Micropipetadores para 10 e 20 µl.
- Ponteiras para os micropipetadores.
- Estufa à 37°C.
- Placa aquecedora de alta precisão a 75°C.
- Termômetro de superfície

Células em suspensão no fixador

ANEXO VIII - Protocolo para coloração com prata

Preparo de Soluções

I. Pré-tratamento

150 ml ácido acético

150 ml etanol 100%

completar para 1,5 ml com água deionizada

II. Oxidação

21 ml de ácido nítrico

completar para 1,5 ml de água deionizada

III. Impregnação

1,5g prata

completar para 1,5 ml de água deionizada

Quando for usar colocar 2 ml de formaldeído

IV. Revelação

11,13g carbonato de sódio

7,5 ml tiosulfato de sódio (50mg/100ml)

Completar para 1,5 ml de água deionizada

Quando for usar colocar 2 ml de formaldeído

Procedimento:

Colocar a placa na solução de pré-tratamento por 20 minutos. Essa solução deve ser guardada. Após, lavar a placa com água miliq por 30 segundos. Deixar na solução de oxidação por 3 minutos. Lavar com água miliq por 30 segundos. Deixar na solução de

impregnação por 30 minutos. Lavar com água miliq por 30 segundos. Colocar na solução de revelação até as bandas aparecerem. Voltar na solução de pré-tratamento.

Preparo das placas:

Diluição do Bind

1,0 ml de etanol

5ul ácido acético

3ul de Bind silase

Espalhar na placa maior

Esperar secar por 30 minutos

Repel: Passar na placa menor, nos pentes e espaçadores. Deixar secar por 10 minutos.