

SIMONE SAYURI TSUNEDA

**REPERCUSSÃO MOLECULAR DE MUTAÇÕES
DETECTADAS EM GENES LIGADOS A DIFERENTES
FORMAS DE EPILEPSIA**

CAMPINAS

2007

SIMONE SAYURI TSUNEDA

**REPERCUSSÃO MOLECULAR DE MUTAÇÕES
DETECTADAS EM GENES LIGADOS A DIFERENTES
FORMAS DE EPILEPSIA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes

Apoio: FAPESP

CAMPINAS

2007

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

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

T789r Tsuneda, Simone Sayuri
Repercussão molecular de mutações detectadas em genes ligados a diferentes formas de epilepsia / Simone Sayuri Tsuneda. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

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

1. Epilepsia. 2. Genética. 3. Cérebro - Anormalidades. I. Cendes, Iscia Lopes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : “Molecular characterization of mutations identified in genes related to different epilepsies”

Keywords: • Epilepsy
• Genetic
• Cerebral abnormalities

Área de concentração : Neurociências

Titulação: Mestrado em Fisiopatologia Médica

Banca examinadora: Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes

Prof Dr João Pereira Leite

Profa. Dra. Marilisa Mantovani Guerreiro

Data da defesa: 26-02-2007

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Profa. Dra. Iscia Teresinha Lopes Cendes

MEMBROS:

1- Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes

2- Prof. Dr. João Pereira Leite

3- Profa. Dra. Marilisa Mantovani Guerreiro

4- Prof. Dr. Norberto Aguiar Cairasco

5- Profa. Dra. Carmem Silvia Bertuzzo

6- Prof. Dr. Li Li Min

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

Data: 26/02/2007

DEDICATÓRIA

Acredito que o modo de existir e co-existir seja o diferencial de cada ser vivo, já que, ao nascer, não escolhemos a cor dos olhos, o endereço do lar, a voz do pai, o clima do local ou os cabelos da mãe. Nascer com uma característica limitante, como uma alteração genética, pode soar como fatalidade. Mas ainda assim existe o livre-arbítrio, aquele que nos permite chorar ou sorrir, abraçar ou dar as costas a alguém. Por isso eu dedico orgulhosamente e agradeço profundamente aos pacientes que colaboraram com esse projeto. Pelos sorrisos, pela disponibilidade, pela força de espírito, por promover meu engrandecimento pessoal de forma tão positiva.

Dedico também esse trabalho às pessoas portadoras de epilepsia, que lutam diariamente contra o preconceito e a ignorância de um mundo pouco consciente.

AGRADECIMENTOS

Esse amontoado de papel é o resultado de dois anos de trabalho, que são a continuação de quatro anos de formação, os quais foram possíveis devido aos outros dezessete anos de aprendizado. Sendo assim, algumas pessoas devem ser lembradas por terem contribuído de alguma forma com esse livro. Agradeço imensamente...

... aos meus pais, Mitsu e Eliza, que dedicaram grande parte de sua força, coragem e energia a mim. Vivo para retribuir-lhes.

... aos meus irmãos, Matheus e Diogo, por simplesmente existirem, por serem uma das minhas maiores razões para sempre seguir em frente.

... a Ângela Drezza, Grace Kim e Júlia Badur, pela amizade, a única palavra capaz definir tanto que fizeram e fazem por mim.

... aos demais amigos da turma 2001 diurno da Biologia Unicamp, minha segunda família, que fizeram da Unicamp um novo lar para mim. O carinho que tenho por vocês é fora do comum.

... ao André, por tornar tudo tão mais fácil, mais simples e melhor.

... à Prof^ª Iscia, que sempre me creditou muito mais que eu julgava merecer.

... a Fábio Torres e Daniela Souza, que dividem os trabalhos dessa tese comigo. Trabalhar em grupo, teoricamente, é algo muito difícil, mas com vocês foi uma das coisas mais fáceis que já fiz.

... a Aline Marcelino, Anderson Tavares, André Zamboni, Bernardo Passarinho, Cláudia Morelli, Cyntia Correia, Danyella Dogini, Érika Freitas, Fábio Conte, Lidiane Rueda, Luciana Bonadia, Marcelo Murai, Mariana Saragiotto, Mariângela Grippo, Marilza Santos, Milena Simione, Miriam Contessotto, Patrícia Aguiar, Rafael Marchesini, Rafael Queiroz, Renato Santos, Rodrigo Secolin, Romênia Domingues, Tatiany Marques e Vinicius Pascoal, pelo auxílio técnico, e muito além disso, pelo companheirismo, pela habilidade de tornar a rotina muito mais agradável e o trabalho muito menos cansativo.

Não sei ao certo quão poderoso é o acaso.

Sei que ele foi muito generoso comigo.

Obrigada.

	<i>PÁG.</i>
RESUMO	<i>xii</i>
ABSTRACT	<i>xiv</i>
1- INTRODUÇÃO	16
2- OBJETIVOS	22
3- MATERIAIS E MÉTODOS	24
4- RESULTADOS	35
5- DISCUSSÃO	46
6- CONCLUSÕES	55
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
8- ANEXOS	64

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAM22	<i>A disintegrin and metalloproteinase domain 22</i>
ADPEAF	<i>Autosomal dominant partial epilepsy with auditory features</i>
cDNA	DNA complementar
DCX	Gene <i>doublecortin</i>
DDC	Desordens do desenvolvimento cortical
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetil sulfoxido
DNA	Ácido deosirribonucléico
dNTP	Deoxinucleotídeo trifosfato
EAR	<i>Epilepsy associated repeat</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELTLAD	Epilepsia de lobo temporal lateral autossômica dominante
EPTP	Epitempina
<i>FLN1</i>	Gene filamina 1
FLN1	Proteína filamina 1
HNPB	Heterotopia nodular periventricular bilateral
HUMARA	<i>Human Androgen Receptor</i>
Kv1	Canal de potássio voltagem-dependente tipo 1
Kv1.1	Subunidade 1 de Kv1
LB	Meio de cultivo Luria Bertani
<i>LGII</i>	<i>leucine glioma inactivated gene 1</i>
LGII	Proteína do gene <i>LGII</i>

<i>LIS1</i>	Gene lissencefalia 1
LRR	<i>Leucine rich repeats</i>
OPD1	Síndrome otopalatodigital tipo 1
OPD2	Síndrome otopalatodigital tipo 2
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RFLP	<i>Restriction fragment length polimorfism</i>
RM	Ressonância magnética
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SDS	Dodecilsulfato de sódio
snRNA	<i>Small nuclear RNA components</i>
snRNP	<i>Small nuclear ribonucleoproteins</i>
TBE	Tris-borato-EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
VNTR	<i>Variable number of tandem repeated</i>

LISTA DE TABELAS

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1- <i>Primers</i> desenhados para análise do gene <i>LGII</i>	28
Tabela 2- <i>Primers</i> desenhados para análise do gene <i>FLNI</i>	34
Tabela 3- Proteínas que interagem com as repetições de filamina.....	52

		PÁG.
Figura 1-	Heredograma da família estudada para a mutação no gene <i>LGII</i>	26
Figura 2-	Esquema de ciclagem de PCR do gene <i>LGII</i>	27
Figura 3-	Esquema de ciclagem de PCR de <i>FLNI</i>	30
Figura 4-	Esquema de ciclagem de PCR de HUMARA para testar mosaïcismo.....	33
Figura 5-	Foto de gel de agarose – extração de RNA de camundongo.....	36
Figura 6-	Foto de gel de agarose, PCR feita à partir de cDNA de camundongo com primers para <i>LGII</i>	37
Figura 7-	Foto de gel de agarose de PCR à partir de cDNA de pele humana.....	37
Figura 8-	Foto de gel de agarose de PCR à partir de cDNA de pele humana com primers para <i>LGII</i>	38
Figura 9-	Foto de gel de agarose de PCR à partir de cDNA de pele de pacientes portadores de mutação e controle com primers para <i>LGII</i>	38
Figura 10-	Gráficos de amplificação – PCR em Tempo Real. Análise do gene <i>LGII</i>	40
Figura 11-	Foto de gel de agarose de PCR usando cDNA de paciente portadores de mutação no gene <i>FLNI</i>	41
Figura 12-	Foto de gel de agarose de PCR para seqüenciamento.....	42
Figura 13-	Alinhamento das seqüências para análise de seqüenciamento do gene <i>FLNI</i>	43

Figura 14-	Foto de gel de agarose de PCR para teste de contaminação de amostras com DNA genômico.....	44
Figura 15-	Foto de gel de poliacrilamida para análise de mosaicismo.....	45
Figura 16-	Gráfico de comparação de resultados da expressão do gene <i>FLN1</i> em pacientes.....	45
Figura 17-	Esquema de mecanismo de <i>splicing</i>	49
Figura 18-	RM de pacientes estudados para o gene <i>FLN1</i>	53

RESUMO

A epilepsia acomete uma considerável parcela da população mundial (0,5 – 1%). Dentre suas causas destacam-se as epilepsias idiopáticas e as malformações corticais, por possuírem uma base genética bem definida. As epilepsias idiopáticas possuem uma etiologia genética, mas na maioria das vezes nenhuma anormalidade estrutural é identificável. Já as malformações corticais são desordens conseqüentes de falhas no desenvolvimento do córtex cerebral, por isso também denominadas de distúrbios do desenvolvimento cortical (DDC).

Analisando pacientes com Epilepsia de Lobo Temporal Lateral Autossômica Dominante (ELTLAD), nosso grupo localizou uma alteração no sítio de *splicing* no gene *LGII*. Nosso grupo também descreveu uma mutação de sentido trocado no gene *FLNI*, em duas pacientes (mãe e filha) acometidas por Heterotopia Nodular Periventricular, um tipo de DDC.

O objetivo principal desse projeto foi caracterizar, em nível molecular, essas alterações gênicas, como um primeiro passo na elucidação dos mecanismos destas desordens genéticas. Além disso, era nosso interesse observar se as alterações moleculares encontradas poderiam explicar a variabilidade clínica observada em nossos pacientes (Sheen *et al.*, 2001; Parrini *et al.*, 2004). Para tal, extraímos o RNAm dos pacientes portadores destas síndromes, convertendo-o em cDNA, que foi amplificado com *primers* específicos, e posteriormente seqüenciados. O RNAm dos pacientes acometidos por Heterotopia Nodular Periventricular foi extraído de sangue periférico. Já no caso de pacientes com EPADSA, obtivemos amostras de epiderme para obtenção do RNAm. Nossos experimentos indicam que o mecanismo molecular mais provável envolvido na mutação 1159G→C no gene *FLNI* é destruição do sítio doador de *splicing* do intron 6, levando à manutenção do intron 6 durante o processamento do RNAm e a conseqüente aquisição de um codon de parada prematuro que resultaria na síntese de uma proteína truncada. Quanto à análise da mutação IVS7(-2)A→G no gene *LGII*, infelizmente não fomos capazes de obter resultados conclusivos. O estudo *in silico* da proteína truncada que seria formada em decorrência da mutação no gene *FLNI* prediz a perda de domínios funcionais essenciais da proteína. Além disso, encontramos evidências experimentais de que as diferenças clínicas encontradas nas duas pacientes que apresentam a mesma mutação em *FLNI* (mãe e filha), podem em parte, ser explicadas por alterações no mecanismo de inativação randômica do cromossomo X.

ABSTRACT

Epilepsy is a very frequent condition, been present in around 0.5 to 1% of human population. Among the most frequent causes of epilepsy we can identify genetic predisposition to seizures and cortical malformations. The idiopathic epilepsies are regarded as caused by genetic mechanisms, most of them with no structural abnormalities being detected. By the other hand, malformations of cortical development (MCD) are the result of abnormalities during the normal developmental stages of the brain and will generally result in identifiable brain structural abnormalities.

We studied patients with a form of temporal lobe named autosomal dominant partial epilepsy with auditory features (ADPEAF) and identified a splicing site mutation in the *LGII* gene. In addition, we identified a point mutation in the *FLNI* gene in two patients (mother and daughter) with a type of MCD, periventricular nodular heterotopia.

The main objective of this project was to characterize the molecular defect resulting from both mutations, as well as to investigate if these mechanisms could explain the clinical variability observed in our patients. We extracted mRNA from patients carrying both mutations for subsequent synthesis of cDNA. In patients with *FLNI* mutation mRNA was obtained from peripheral blood and in patients with *LGII* mutation mRNA extractions were attempted from skin fibroblasts. Our results indicate that the molecular mechanism involved in the *FLNI* 1159G→C mutation is probably the destruction of the splicing donor site at intron 6, leading to the its transcription during mRNA processing, which, in turn, will add a premature stop codon resulting in a truncated protein. Unfortunately we were unable to obtain conclusive results in the *LGII* experiments. In addition, *in silico* prediction studies o the truncated FLNI1 protein shows that important functional domains are lost in the resulting mutated form. Furthermore, we found experimental evidence that the clinical variability observed in the two patients with *FLNI* mutation could be explained, at least in part, by abnormal skewed X chromosome inactivation.

1- INTRODUÇÃO

O termo epilepsia refere-se a um conjunto de síndromes, ou seja, conjuntos de sinais e sintomas de diferentes etiologias e prognósticos que, nesse caso, apresentam uma característica comum: a ocorrência de crises epiléticas. Tais crises ocorrem na ausência de condição tóxico-metabólica ou febril, sendo sua taxa de prevalência estimada entre 0,5 a 1% da população, o que faz das epilepsias um problema de saúde pública mundial (Borges *et al.*, 2004).

A crise epilética é causada por descargas elétricas excessivas e transitórias das células nervosas, resultantes da movimentação iônica anormal através da membrana neuronal. Existem várias causas para a ocorrência de crises epiléticas, como distúrbios metabólicos, traumas crânio-encefálico, estados febris, defeitos genéticos, malformações corticais, dentre outros.

As epilepsias de origem genética são normalmente agrupadas em três grupos principais de acordo com o mecanismo genético envolvido: desordens cromossômicas, desordens Mendelianas, nas quais há um único gene (ou um gene principal) envolvido, e as não-Mendelianas ou complexas, que estão possivelmente envolvidas com vários *loci* e fatores ambientais. Cerca de 120 doenças Mendelianas nas quais existe a ocorrência de epilepsia já foram descritas (Robinson e Gardiner, 2004).

1.1- Epilepsia Parcial Autossômica Dominante com Sintomas Auditivos (EPADSA)

Dos vários tipos de epilepsias, a epilepsia do lobo temporal (ELT) é a mais freqüente e representa 40% de todas as síndromes epiléticas (Sutula, 1990). Dentre as epilepsias de lobo temporal destaca-se um subtipo denominado de Epilepsia Parcial Autossômica Dominante com Sintomas Auditivos (EPADSA) que é caracterizada pela ocorrência de aura com componente auditivo precedendo as crises parciais complexas que apresentam, em geral, evolução benigna. Esta síndrome possui padrão de herança autossômico dominante sendo que uma parte das famílias possui ligação genética no cromossomo 10q24 (Ottman *et al.*, 1995; Poza *et al.*, 1999; Winawer *et al.*, 2000).

Kalachikov *et al.* (2002) descreveram mutações no gene *LGII*, localizado nesta mesma região, como responsáveis por esta síndrome. Esse gene foi primeiramente identificado em pacientes com gliomas de alto grau no qual havia perda de ambos os alelos por alterações citogenéticas como translocação balanceada e perda de heterozigose (Chernova *et al.*, 1998) e estudos posteriores confirmaram o envolvimento do gene *LGII* com a EPADSA (Morant-Redolat *et al.*, 2002; Gu *et al.*, 2002; Pizutti *et al.*, 2003; Michelucci *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2003), cujas mutações têm sido identificadas em cerca de 50% das famílias portadoras de EPADSA (Michelucci *et al.*, 2003; Berkovic *et al.*, 2004; Ottman *et al.*, 2004).

O gene *LGII* ocupa cerca de 36.9kb e é constituído de 8 exons que variam entre 72 e 1197pb. Seu RNAm, de 2.254pb (porção codificante de 1674pb), é expresso principalmente no sistema nervoso. A proteína LGII apresenta uma seqüência peptídeo sinal na região N-terminal e três repetições funcionais ricas em leucina (LRR – *leucine rich repeat*) flanqueadas por *clusters* de seqüências ricas em cisteína. A região carboxi-terminal é composta de sete repetições em *tandem* de cerca de 45 aminoácidos, denominadas epitempinas ou regiões associadas à epilepsia (EPTP/EAR), que seriam remanescentes do domínio estrutural de folha β -pregueada (Furlan *et al.*, 2006), o que inclui a proteína LGII na superfamília de proteínas EPTP (Staub *et al.*, 2002). É interessante citar que as proteínas contendo domínios LRR estão envolvidas em processos de ligação, interações proteína-proteína e vias bioquímicas de transdução de sinal (Kobe *et al.*, 1994; 1995), portanto, a presença de quatro resíduos de cisteína flanqueando as repetições LRR pode indicar que o gene *LGII* pertence ao maior grupo da superfamília das proteínas LRR: a dos receptores e proteínas de adesão (Kobe *et al.*, 1994). Mas a exata função da proteína LGII ainda é desconhecida e muito se tem pesquisado nesse sentido. Senechal *et al.* (2005) apresentaram evidências que a apontam como uma proteína secretada, ou seja, não seria uma proteína transmembrana e não estaria confinada a um compartimento intracelular. Em um trabalho publicado em março de 2006 por Schulte *et al.*, a proteína LGII estaria relacionada ao canal de potássio Kv1, formando um complexo com sua sub-unidade Kv1.1, que atua na transmissão sináptica no sistema nervoso central, antagonizando a rápida inativação causada pela sub-unidade Kv β 1, atividade que seria prejudicada por mutações na região C-terminal da proteína. Fukata *et al.*, em artigo publicado em setembro de 2006,

descreveram a interação específica mediada pelos domínios EPTP/EAR da proteína LGI1 com a ADAM22, essa última também relacionada à epilepsia. Ambas proteínas seriam co-expressas em hipocampo e esse complexo atuaria na transmissão sináptica, mais especificamente a transmissão glutamérgica, já que o complexo seria ancorado pela proteína PSD-95, que atua na organização de receptores de glutamato do tipo AMPA e NMDA. Já em um trabalho publicado em outubro de 2006, Sirerol-Piquer *et al.* confirmam a secreção celular da proteína LGI1, além de demonstrar que tal secreção apenas ocorre se a mesma estiver glicosilada e se seus domínios EPTP/EAR estiverem intactos.

Recentemente nosso grupo detectou através de seqüenciamento automático do gene *LGII* a alteração IVS7(-2)A→G, que provavelmente leva à formação de um RNAm aberrante resultando em uma proteína truncada (Kobayashi *et al.*, 2003). No entanto este é apenas um possível efeito da mutação, já que a mesma poderia levar à síntese de um RNAm instável e de fácil degradação. Desta forma, as crises poderiam ser causadas pela produção de um polipeptídeo anormal ou pela haploinsuficiência da proteína LGI1.

1.2- O desenvolvimento do córtex cerebral

Distúrbios no desenvolvimento cortical (DDC) constituem uma das principais causas de doença mental e epilepsia (Kuzniecky, 1993). Cerca de 8% dos pacientes com epilepsia que procuram tratamento em centros especializados são portadores de alguma forma de DDC, correspondendo à segunda etiologia mais freqüente de epilepsia refratária, atrás apenas da epilepsia de lobo temporal associadas à esclerose hipocampal (Semah, 1998). Avanços na elucidação de mecanismos básicos de formação do córtex e exames de ressonância magnética (RM) têm demonstrado que os DDC também podem ser consequência de fatores genéticos, e não apenas de insultos pré-natais.

O desenvolvimento do córtex cerebral humano pode ser dividido em três grandes estágios: proliferação, migração e diferenciação. A proliferação é caracterizada por uma extensa divisão dos precursores neuronais na zona ventricular, com início entre a 4ª e 6ª semana de vida do embrião. Depois de cerca de duas semanas inicia-se a fase de

migração, na qual os primeiros neurônios pós-mitóticos migram para formar a pré-placa e as demais ondas migratórias irão então formar a placa cortical, que irá dividir a pré-placa em duas camadas, uma mais externa que dará origem à camada I do córtex maduro e uma camada mais interna chamada de sub-placa. O movimento dos neurônios se dá através da ligação com as fibras gliais radiais, que dessa forma, agem direcionando a migração desde a matriz germinativa até os limites do córtex. Os neurônios recém-chegados à placa cortical organizam-se em camadas para desenvolver o córtex adulto, e ultrapassam os neurônios mais antigos, acumulando-se progressivamente em camadas mais superficiais num padrão denominado de *inside-out* (Angevine, 1961). Uma vez que os neurônios imaturos chegam às suas localizações definitivas, estes estabelecem uma série específica de conexões pela extensão de seus axônios e dendritos, caracterizando a fase de organização cortical. Uma falha dos mecanismos genéticos em qualquer destes três estágios do desenvolvimento cortical pode levar ao desenvolvimento de DDC.

As anormalidades de proliferação e diferenciação interferem precocemente com a formação cortical, afetando diretamente os precursores neurogliais, o que resulta em uma arquitetura cortical anormal com um excesso de neurônios piramidais de orientação anormal, células em balão e neurônios gigantes displásicos. Os distúrbios relacionados à migração neuronal raramente apresentam estes tipos celulares, sendo caracterizados pela presença de neurônios imaturos organizados em nódulos ou bandas heterotópicas que interferem difusamente com o padrão giral (Hannan *et al.*, 1999; Spreafico *et al.*, 1998). Por fim, as anormalidades referentes à organização cortical são aquelas nas quais se acredita que o defeito ocorreu após ter se realizado a migração neuronal, ao menos parcialmente.

1.2.1- Heterotopia Nodular Periventricular (HNP)

A heterotopia nodular periventricular (HNP) é um distúrbio da fase de migração, no qual uma fração dos neurônios pós-mitóticos parece ser incapaz de deixar a zona ventricular, resultando, no adulto, em nódulos de neurônios diferenciados próximo à zona ventricular, enquanto outros neurônios migram normalmente formando o córtex maduro (Barkovich e Kjos, 1992; Fox *et al.*, 1998, Eksioglu *et al.*, 1996).

Quando a HNP ocorre em famílias, o padrão de herança é dominante ligado ao cromossomo X, afetando principalmente mulheres, já que os homens em sua grande maioria não sobrevivem à gestação (Kuzniecky, 1993, Huttenlocher *et al.*, 1994). A principal manifestação neurológica da HNP é a epilepsia (Eksioglu *et al.*, 1996, Dubeau *et al.*, 1993), provável consequência da localização heterotópica dos nódulos neuronais, enquanto a ocorrência de deficiência grave nas funções cognitivas não é comum. Os homens afetados, quando sobrevivem, falecem precocemente devido a problemas de coagulação sanguínea (Fox *et al.*, 1998).

O gene responsável pela HNP foi clonado na região genômica Xq28 (Fox *et al.*, 1998), possui 48 exons e codifica um RNAm de 8.368pb (porção codificante de 7944pb), de expressão em todos os tecidos. O seu produto foi identificado como a filamina 1 (Garcia-Higuera *et al.*, 1996), uma proteína de 280kD que realiza ligação cruzada com a actina, sugerindo que sua função na migração neuronal esteja ligada à estrutura do citoesqueleto. A grande maioria das mutações descritas se encontram localizadas nos seis primeiros éxons codificantes (Garcia-Higuera *et al.*, 1996; Walsh e Cepko, 1992), sendo essa a região do gene que codifica um importante domínio funcional envolvido na ligação com a actina (Fox *et al.*, 1998; Poussaint *et al.*, 2000). Nosso grupo identificou recentemente uma mutação localizada na terceira base do último códon do exon 6, uma substituição (1159G>C). Esta mutação tem dois possíveis efeitos: 1) levar à troca de um glutamato por um aspartato, dois aminoácidos de propriedades semelhantes na posição 329 da proteína ou 2) levar à destruição do sítio doador de *splicing* do intron 6.

Mutações de sentido trocado no gene *FLN1* têm sido relacionadas a síndromes que afetam múltiplos órgãos, como a síndromes otopalatodigital (OPD) tipos 1 e 2, displasia frontometáfiseal e a síndrome de Melnick-Needles (Robertson *et al.*, 2003), enquanto mutações de sítio de *splicing* e sem sentido estão envolvidas com heterotopia nodular periventricular. Ainda não foi definida a razão de tamanha discrepância entre doenças decorrentes de mutações no mesmo gene e estabelecer as consequências moleculares da mutação identificada seria um primeiro passo na elucidação dessa questão.

2- OBJETIVOS

2.1- Analisar, do ponto de vista molecular, o mecanismo patogênico das mutações:

2.1.1- IVS7(-2)A→G no gene *LGII*, em 4 pacientes pertencentes à mesma família e com diagnóstico de epilepsia parcial autossômica dominante com sintomas auditivos.

2.1.2- 1159G→C no gene *FLNI*, em 2 pacientes, mãe e filha, com diagnóstico de heterotopia nodular periventricular.

2.2- Procurar estabelecer correlações entre os achados moleculares e fenotípicos dos pacientes.

***3- MATERIAIS E
MÉTODOS***

3.1- Aspectos éticos

Os pacientes participaram desse projeto após assinatura de um formulário de consentimento livre e esclarecido (anexo 2). Um código foi designado para cada paciente, identificando suas amostras de sangue e DNA, assim como os dados clínicos coletados por questionário, com o intuito de assegurar sua privacidade. Esse estudo obteve aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (anexo 1).

3.2- Mutação no gene *LGII*:

- Pacientes:

Foram utilizadas amostras de pele de 4 pacientes portadores da mutação IVS7(-2)A→G no gene *LGII*. Os pacientes são membros de uma mesma família (Figura 1) e foram diagnosticados para Epilepsia Parcial Autossômica Dominante com Sintomas Auditivos no ambulatório de Neurologia do Hospital das Clínicas da Unicamp, seguindo critérios determinados pelas recomendações da ILAE (International League Against Epilepsy). Esses pacientes foram submetidos a exames de ressonância magnética de alta resolução e avaliação clínica detalhada.

- Extração de RNAm de tecido epitelial:

O tecido extraído (cerca de 2cm²) foi macerado com o auxílio do aparelho *Polytron*, já em Trizol na proporção de 1mL para cada 50mg de tecido macerado. Essa mistura foi homogeneizada e recebeu 200µL de clorofórmio. Após nova homogeneização por 15s, incubou-se a mistura por 3 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugou-se a mesma a 12000g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi removida e adicionou-se 0,5mL de isopropanol, incubando à temperatura ambiente por 15 minutos. A amostra foi novamente centrifugada nas mesmas condições. Removeu-se o sobrenadante e o RNA foi lavado 2 vezes com 1mL de etanol 75% e centrifugado a 7500g por 3 minutos a 4°C. Após a retirada do etanol do tubo, ele foi deixado para secar à temperatura ambiente por 10 minutos e o RNA foi ressuscitado em 50µL de água *RNase-free*. Primeiramente, a

extração de RNA foi testada com tecido de camundongo *Balb C nude*, seguindo para amostras de pele humana cedidas pelo Ambulatório de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Unicamp, e, depois disso, para amostras de pacientes portadores de mutação.

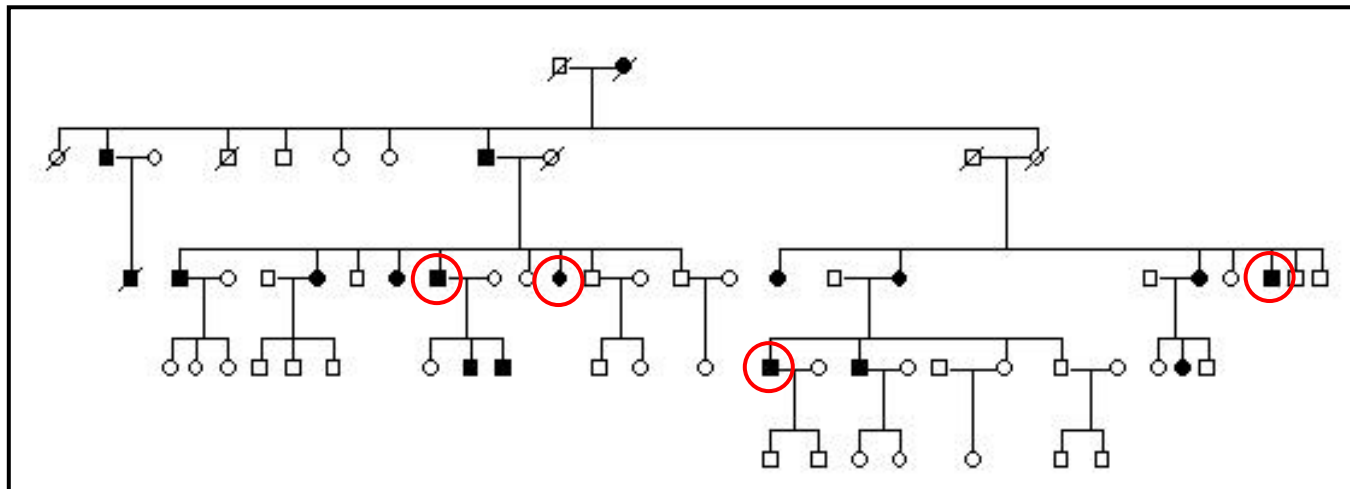


Figura 1- Heredograma da família estudada para o gene *LGII*. Em destaque, os pacientes que aceitaram participar desse estudo.

- Transformação do RNA em cDNA:

A obtenção da 1ª fita de cDNA à partir do RNA extraído de epiderme foi realizada utilizando-se o kit de RT-PCR *Improm II Reverse Transcriptase System* (Promega).

A amplificação do cDNA de *LGII* foi realizada pela técnica da PCR, utilizado-se para tal seqüências de *primers* específicas que abrangessem todo o produto transcricional. As reações foram preparadas para um volume final de 15µL, contendo 40ng de cDNA, 100ng de cada seqüência de *primer*, sense e antisense, 10mM de dNTP, 1 unidade de Taq DNA polimerase e 2mM MgCl₂. Tais reações foram submetidas à seguinte ciclagem:

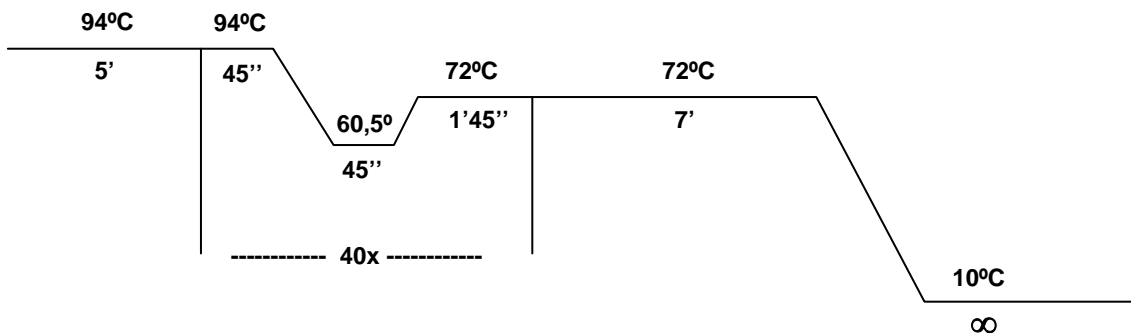


Figura 2- Ciclagem de PCR LGI1, com temperaturas e tempo de imersão.

- Análise dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 1x, para a possível detecção de bandas anômalas.

- PCR em Tempo Real

Como a ausência de bandas anômalas, o mecanismo da mutação poderia estar relacionado à produção de RNAm instáveis. Para refutar ou confirmar esta hipótese, decidimos fazer uso da técnica de PCR em Tempo Real (*real time PCR*) com objetivo de analisar uma possível expressão diferenciada do gene nos pacientes portadores de mutação. Essa técnica monitora a fluorescência emitida como um indicador da produção do amplificado durante cada ciclo do PCR. Portanto, essa técnica é baseada na detecção e quantificação de um repórter fluorescente, sendo o aumento do sinal proporcional ao acúmulo de produto de PCR. Quantificando a emissão em cada ciclo é possível analisar a reação de PCR durante a fase exponencial onde o primeiro aumento significativo na quantidade de produto de PCR se correlaciona diretamente com a quantidade inicial de DNA molde. Essa fluorescência pode ser obtida através de dois métodos principais de marcação: pelo uso de SYBR Green, que para fluorescer liga-se a ácidos nucléicos dupla-fita; ou pelo método TaqMan[®], que atua através de sondas específicas para a sequência estudada que contenham fluoróforo. Ambos métodos podem ser aplicados fazendo uso do equipamento ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Nesse estudo foi adotado o método TaqMan[®], com primers e sondas fornecidos pela empresa Applied Biosystems (*assay-ID Mm00522315_m1*).

Tabela 1- *primers* desenhados para análise do gene *LGII*

<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>
<i>LGII</i> sense	5' TTCGTCGACGCATGGAATCAGAA 3'
<i>LGII</i> antisense	5' ATTTGTCGACTCATGCGCTTAAGT 3'

3.3- Mutação no gene da *FLNI*

- Pacientes:

Nesse estudo foram analisadas duas pacientes portadoras de HNP, filha (paciente 1) e mãe (paciente 2). A confirmação do quadro clínico foi feita através de exames de neuroimagem, realizados por profissionais do Laboratório de Neuroimagem do Departamento de Neurologia da FCM – UNICAMP. Ambas pacientes são portadoras da mutação 1159G>C no gene *FLNI* e concordaram participar do estudo através da assinatura de um formulário de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM – UNICAMP (protocolo 383/2000) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP (protocolo 516/2001).

- Extração de RNA de sangue periférico e obtenção da 1ª fita de cDNA:

Foram coletados em tubos de EDTA cerca de 20mL de sangue venoso de um indivíduo não portador de HNP e das pacientes. As amostras foram diluídas em solução de NaCl 0,9% na proporção de 1:1 (1 sangue: 1 solução NaCl 0,9%). A um tubo estéril de 15mL contendo 6,0mL de Ficoll-Paque[®] Plus (Amersham Bioscience) foram adicionados os 8,0mL da mistura anterior. O Ficoll-Paque[®] é um polímero que separa o sangue por meio de uma mistura de quatro fases: 1-hemácias, 2-FICOLL, 3- leucócitos, 4-Plasma, sendo a última fase de menor densidade. No processo de transferência do sangue diluído para o tubo contendo Ficoll-Paque[®] tomou-se o cuidado para que ambos não se misturassem. Os tubos foram então centrifugados a 400xg, por 30 minutos a 18°C, em rotor tipo *swinging bucket*. A camada de leucócitos formada pelo gradiente foi coletada com auxílio de pipeta *Pasteur* e as células transferidas para um novo tubo estéril de 15mL. A

seguir completou-se o volume para 14mL com solução NaCl 0,9%, e nova centrifugação foi realizada a 100xg por 10 minutos a 18°C. Em seguida o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1mL de reagente Trizol (GibcoBRL) e homogeneizadas por agitação. O conteúdo foi então transferido para tubo estéril de 1,5mL, onde foram adicionados a cada tubo 200µL de clorofórmio seguindo com agitação por 15 segundos, os tubos foram então incubados por 3 minutos em temperatura ambiente e centrifugados a 12000xg por 15 minutos a 4°C. A fase superior foi coletada e transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 500µL de álcool isopropílico a cada tubo, seguindo agitação e incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. Nova centrifugação a 12000xg por 10 minutos a 4°C foi realizada, e o sobrenadante descartado. O RNA total foi lavado em 1mL de etanol 75% e foi feita nova centrifugação por 5 minutos a 7500xg a 4 °C. Após a completa secagem à temperatura ambiente, esse precipitado foi ressuspendido em 30µL de água DEPC 0,01% (água tratada com 0,01% dietilpirocarbonato).

As amostras foram, então, submetidas à eletroforese para a constatação da integridade das bandas de RNA ribossômico 18S e 28S.

A partir desse RNA foi realizada uma transcrição reversa para obtenção da primeira fita de cDNA, utilizando-se o kit *Improm II Reverse Transcriptase System* (Promega)

- Amplificação da seqüência de interesse à partir do cDNA:

A amplificação do cDNA de *FLNI* foi realizada por PCR. Para tal, foi construído um par de seqüências de *primers* específicas (tabela 1 – seqüências *FLNI* 6-7), utilizando o programa *Gene Runner*[®], que abrangesse a região com a mutação, do início do éxon 6 ao final do éxon 7. As reações de PCR foram preparadas para um volume final de 15µL, contendo 40ng de cDNA, 100ng de cada seqüência de *primer*, sense e antisense, 10mM de dNTP, 1 unidade de Taq DNA polimerase, 2mM MgCl₂ e DMSO, na proporção de 10% do volume da reação.

Os ciclos de reação se deram da seguinte forma:

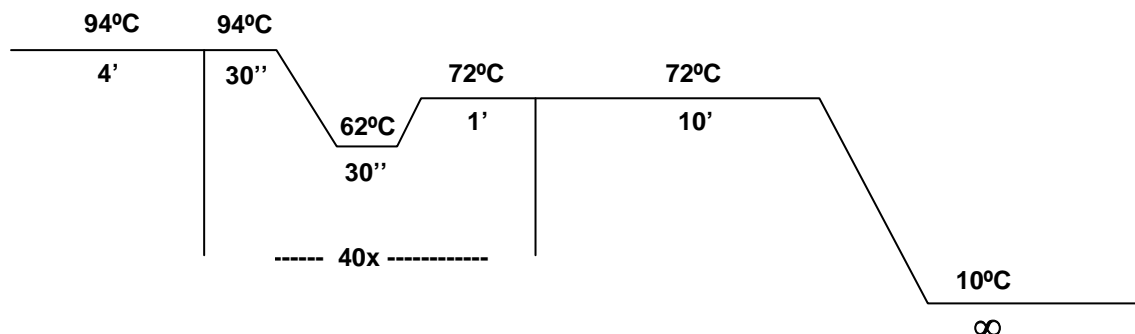


Figura 3- Ciclagem de PCR de *FLNI*, com as temperaturas e o tempo de imersão.

- Análise dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 1x, fazendo uso de marcador molecular de 100pb. As bandas de controles normais e dos pacientes com a mutação foram excisadas e purificadas com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

- Clonagem do produto de amplificação através do RNAm de *FLNI*

Como os *primers FLNI 6-7* precisam da adição de DMSO para seu melhor desempenho, devido à alta quantidade de CGs resultando em temperaturas de anelamento muito altas, os produtos de PCR são clonados em pGEM, possibilitando seu sequenciamento automático.

O vetor pGEM, um vetor de alta cópia e fácil manuseio, foi empregado para obtenção de grande quantidade do inserto. Foi utilizado o kit *pGEM-T Easy Vector System* (Promega), que permite a clonagem direta de produtos de PCR sem a necessidade de digestão e purificação.

Seguindo o protocolo do kit, a reação de ligação ocorre *overnight* (12 a 16h), a 4°C, em solução contendo tampão de reação 1x, 5 unidades de enzima *T4 DNA Ligase*, inserto e plasmídeo na proporção 5:1 (respectivamente) e água *nuclease-free* para volume final de 50µL.

Após a ligação, o plasmídeo contendo o fragmento de interesse foi inserido em células competentes da linhagem DH5a de *Eschereria coli* seguindo protocolo de transformação por choque térmico. Nessa técnica, após adicionado 1,5µL de produto da reação de ligação às células competentes, estas são mantidas em gelo por 30 minutos e levadas a banho de 42° por 1,5 minuto, e então, trazidas ao gelo por mais 1 minuto. Em seguida, 1mL de meio LB é adicionado e as células permanecem sob agitação (240rpm) por 1 hora, a 37°C. Após a incubação, as células e o meio são centrifugados a 1000g por 10 minutos para que as células sejam concentradas, e em seguida retira-se o excesso de meio (900 ul) sendo o restante utilizado para ressuspender e plaquear as bactérias em placas de Petri estéreis contendo meio LB-ágar com β-galactosidade e ampicilina, onde são deixadas para crescer e formar colônias, *overnight* a 37°C.

As colônias recombinantes foram selecionadas através da resistência ao antibiótico ampicilina e perda de atividade do gene β-galactosidase. Estas colônias são, então, transferidas para meio LB líquido com ampicilina, no qual se multiplicam *overnight* a 37°C sob agitação constante de 220rpm.

Os plasmídios contendo o inserto foram extraídos através de protocolo de minipreparação, no qual o meio LB com as bactérias é transferido para um tubo ependorfe e centrifugado a 14000rpm, durante 30-60s. Em seguida, o sobrenadante é descartado e adiciona-se 300µL de solução contendo Tris HCl (pH 8.0) e EDTA (pH 8.0), na proporção 5:1 e RNase A. O conteúdo é vortexizado, recebendo 300µL de solução NaOH e SDS 1%. Agita-se o tubo por inversão suave e incuba-se a solução a temperatura ambiente durante 5min, para a adição de 300µL de acetato de potássio 3M (pH 5,5). Agita-se por inversão novamente, formando-se um precipitado branco, que são os restos celulares. Centrifuga-se novamente a 14000rpm durante 10min a 14°C, para, em seguida, coletar de 700 a 800 µL do sobrenadante para um novo tubo, evitando o precipitado. O sobrenadante coletado recebe 400µL de isopropanol, que é homogeneizado por inversão e centrifugado a

14000rpm durante 10min, a 4°C. Descarta-se o sobrenadante e adiciona-se 500 a 700µL de etanol 70%, invertendo o tubo, o qual é submetido a centrifugação a 14°C durante 4 a 5min para precipitação do DNA. Descarta-se o etanol, centrifugando rapidamente de novo para retirar o restante possível de etanol com uma pipeta. Seca-se completamente o DNA a 37°C (por cerca de 5min) para ressuspende-lo em 20 a 50µL de TE ou água milliQ autoclavada para armazenamento a -20°C.

- Seqüenciamento dos fragmentos

O seqüenciamento automático dos fragmentos de interesse foi realizado utilizando o aparelho ABI 377 e o kit Big Dye Terminator v3.1 Cyle Sequencing kit (Applied Biosystems). As reações foram realizadas com os primers *SP6* e *T7* do vetor pGEM na reação, para uma melhor performance.

- Teste de contaminação de amostras de cDNA:

Devido a alguns resultados encontrados no seqüenciamento automático dos fragmentos amplificados, foi efetuada uma nova PCR com *primers* específicos (tabela 1 – seqüência intrônica) para regiões de intron, no intuito de detectar uma possível contaminação com DNA genômico nas amostras de cDNA seqüenciadas. As condições utilizadas foram as mesmas já descritas para a reação de PCR, com exceção da temperatura de anelamento utilizada nos ciclos, que foi de 59°C.

3.2.1- Mosaicismo: detecção de inativação preferencial do cromossomo X

A inativação preferencial do cromossomo X poderia explicar a diferença no quadro clínico dos pacientes estudados. Para tal, decidimos empregar a técnica do gene HUMARA (*human androgen receptor*), que possui uma região RFLP do tipo VNTR, que devido ao seu número altamente variável de seqüências repetidas de DNA, pode ser utilizado como identificador de cada alelo. Baseando-se no princípio de que a metilação de sítios desse gene, que situa-se no cromossomo X, está relacionada à inativação desse cromossomo (Allen *et al*, 1992), as amostras de DNA genômico dos pacientes são

submetidas à digestão com a enzima de restrição *HpaII*, cujo sítio de restrição pode sofrer metilação, o que inibe sua ação. O produto da digestão é amplificado através de uma PCR com *primers* específicos para esse gene marcados com fluoróforo FAM, cujo anelamento ao DNA *template* pode ser comprometido pela ação da enzima *HpaII*. A reação de PCR é preparada para um volume final de 14µL, com 100ng de cada seqüência de *primer*, sense e antisense, dNTP a 10mM, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase e 2mM MgCl₂. A reação foi submetida à seguinte ciclagem:

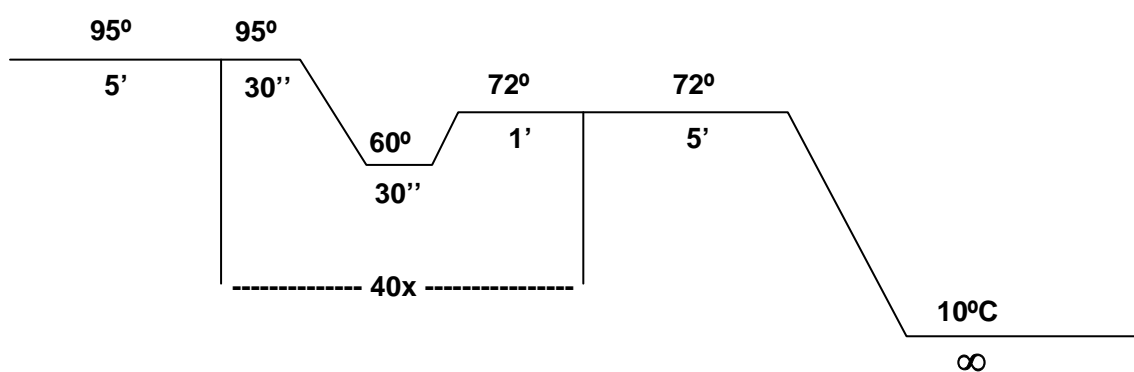


Figura 4- Ciclagem de PCR do gene HUMARA para testar mosaïcismo, com as temperaturas e o tempo de imersão.

O produto dessa PCR é analisado em gel de poliacrilamida 6%, que permite a visualização dos alelos através de migração diferenciada por tamanho e a diferença na intensidade da fluorescência emitida por cada banda é detectada através da análise da imagem pelo aparelho Typhoon[®]. Se um cromossomo estiver inativado preferencialmente, será possível detectar uma diferença na intensidade das bandas, devido à digestão diferenciada do DNA *template*.

Tabela 2- *primers* desenhados para análise do gene *FLNI*

<i>Primers</i>	<i>Seqüência</i>
<i>FLNI</i> 6-7 sense	5' GCATCGAGCCCACAGGCAACATG 3'
<i>FLNI</i> 6-7 antisense	5' CTCGAGAGTCCCCGTCACCTCGG 3'
Intrônica sense	5' CCGCATTTAAAGGGCTCGCT 3'
Intrônica antisense	5' GCGTGAAAGTGTCTGCTGGA 3'
HUMARA sense	5'- TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC - 3'
HUMARA antisense	5'- GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT - 3'

3.2.2- Mosaicismo: comparação de expressão entre pacientes

No intuito de complementar os dados obtidos com a técnica do gene HUMARA e confirmar o mecanismo da mutação, foi realizada a análise do cDNA dos pacientes através da técnica de PCR em Tempo Real (*Real Time PCR*),

Para esse estudo utilizamos o método TaqMan[®], sintetizando *primers* específicos, através da *Assays on Demand choice*, da empresa Applied Biosystems. Tais seqüências apresentam a sonda fluorescente localizada na região do intron 6.

4- RESULTADOS

4.1- Gene *LGII*

- Extração de RNA e obtenção da primeira fita de cDNA:

Inicialmente, o protocolo de extração de RNA foi testado a partir de pele de camundongo *Balb C nude*. Devido à composição da epiderme, um tecido queratinizado, a maceração com nitrogênio líquido foi altamente trabalhosa, daí o emprego do *Polytron*, facilitando o trabalho (figura 5).

O RNA obtido da pele de camundongo foi, então, submetido à uma RT-PCR e o cDNA produto dessa reação foi utilizado em uma PCR com *primers* específicos, tanto para α -tubulina, atestando o sucesso da RT-PCR, quanto para o gene *LGII* em camundongo, confirmando sua expressão no tecido (figura 6).

Com a aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, amostras de pele humana foram obtidas no Ambulatório de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Unicamp. O mesmo protocolo de extração de RNA foi seguido e o produto da extração foi submetido a uma RT-PCR, cujo produto foi testado com *primers* de β -actina (figura 7).

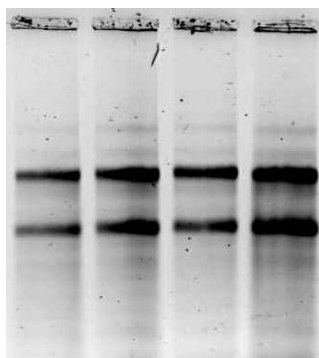


Figura 5- Foto de gel de agarose com amostras de RNA de camundongo obtidas da extração diretamente de tecido.

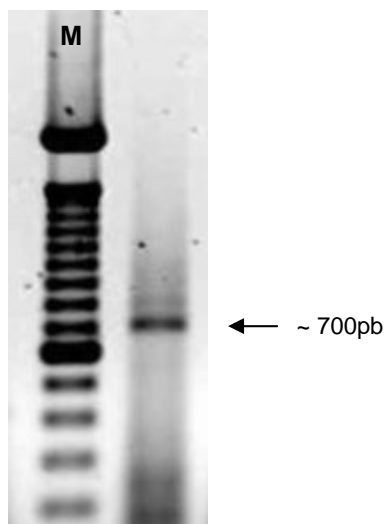


Figura 6- Foto de gel de agarose: resultado de PCR feita à partir de cDNA de camundongo com primers de *LGII* (700 pb). M: marcador de peso molecular 100pb.

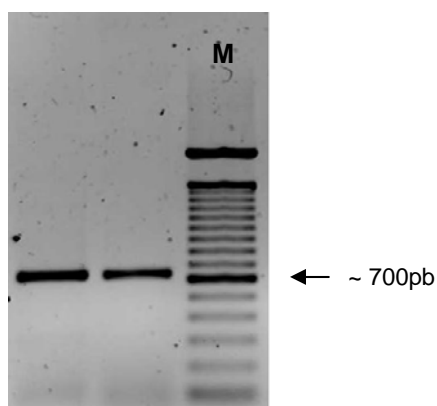


Figura 7- Gel de agarose: PCR à partir de cDNA de pele humana utilizando primers de β -actina. M: marcador de peso molecular 100pb.

Comprovado o funcionamento da RT-PCR, o cDNA obtido de pele humana foi submetido a uma PCR utilizando primers específicos que abrangessem toda a seqüência do gene *LGII*. Como controle de reação, foi utilizado cDNA de hipocampo, no qual a expressão de *LGII* é comprovada. A reação apresentou resultado positivo (figura 8).

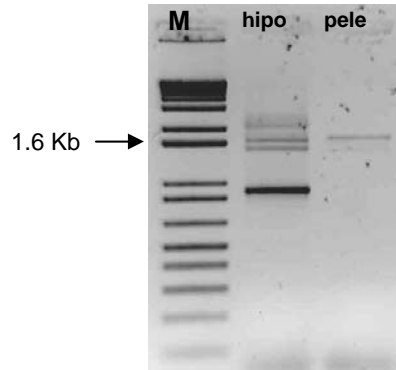


Figura 8- Gel de agarose: PCR à partir de cDNA de pele humana com primers para *LGII*, utilizando cDNA de hipocampo humano como controle. M: marcador de peso molecular 1 kb plus

O RNA dessas amostras foi extraído, por protocolo estabelecido por esse projeto, e submetido a RT-PCR, sendo o cDNA resultante amplificado com os mesmos *primers* específicos para o gene, assim como o cDNA de pele do controle. A análise em gel de agarose dessa reação (figura 9) não apontou bandas anômalas em nenhum dos pacientes estudados.

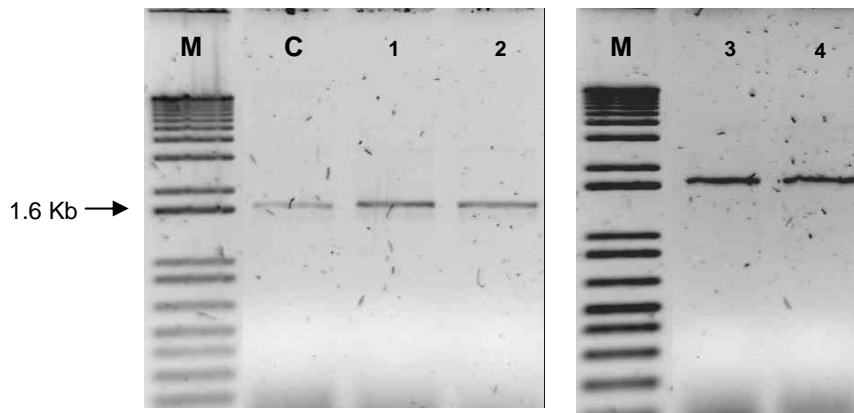


Figura 9- Gel de agarose: PCR à partir de cDNA de pele de pacientes (1,2,3 e 4) portadores de mutação e controle (C), com primers para *LGII*. Marcador molecular 1kb plus.

Dado esse resultado, primers foram construídos inicialmente para testar a expressão desse gene através da técnica do PCR em Tempo Real, pelo método *TaqMan*.

Os gráficos obtidos com a PCR em Tempo Real apontaram uma expressão muito baixa do gene *LGII* em tecido epitelial, de tal forma que não foi possível analisar diferenças de expressão entre os pacientes e o controle. As reações foram realizadas utilizando primers para o gene 18S como controle endógeno, que atestaram a qualidade da reação. Uma amostra de cDNA de hipocampo humano foi analisada juntamente com as amostras de tecido epitelial, comprovando a funcionalidade dos *primers* (figura 10).

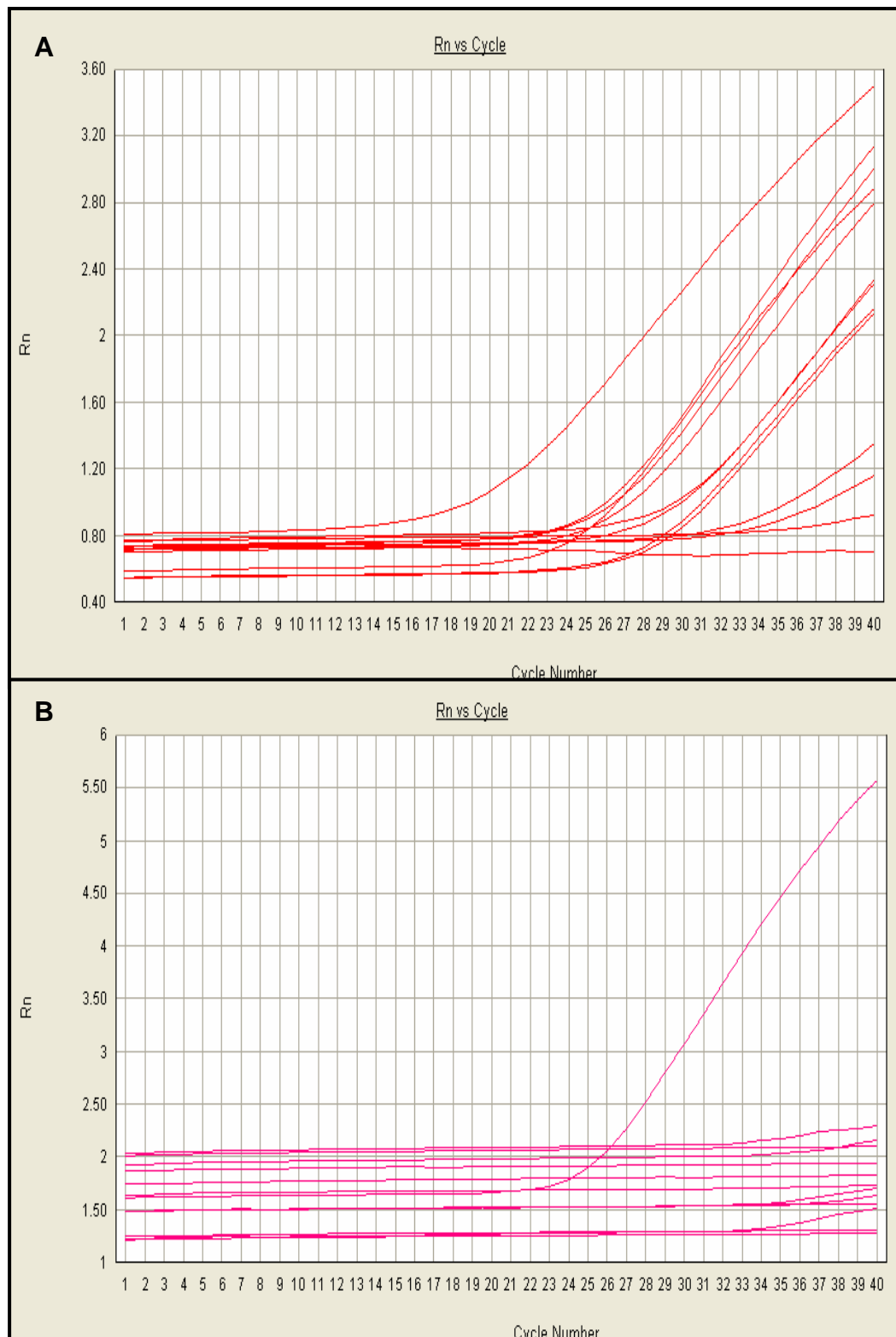


Figura 10- Gráficos de amplificação – PCR em Tempo Real. Onde A corresponde à reação com controle endógeno e B corresponde à reação com primers específicos para *LGII*. A curva observada em B é a reação com material de hipocampo humano.

4.2- Gene *FLNI*

- Obtenção da 1ª fita de cDNA e amplificação do gene *FLNI*:

A partir de sangue coletado de pacientes portadores de mutação foi extraído RNA, o qual foi submetido a uma RT-PCR.

Para testar o sucesso da reação de RT-PCR, foi realizada uma PCR com *primers* para o gene da β -actina, comprovando a qualidade da mesma (figura 11).

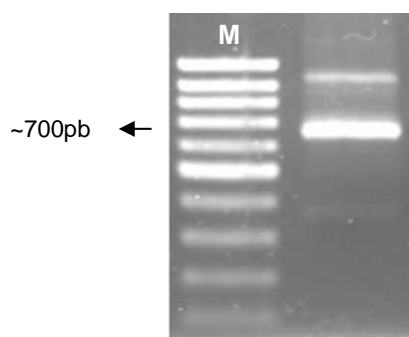


Figura 11- Gel de agarose com produto de PCR usando cDNA de paciente com mutação e primers para β -actina. M: marcador de peso molecular 100pb.

Esse cDNA, em seguida, serviu de *template* para uma PCR utilizando os *primers* específicos para a região da mutação. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 1% em tampão TBE 1x, atestando a expressão do gene *FLNI* em sangue periférico, tanto no paciente controle quanto naqueles com mutação. A análise em gel de agarose também evidenciou bandas anômalas para pacientes com mutação, além da presença das bandas esperadas.

As seqüências de interesse foram purificadas e clonadas em vetor pGEM, sendo o vetor inserido em células de *E. coli*. O produto da minipreparação foi, em seguida, amplificado com *primers* SP6 e T7, específicos para o vetor pGEM e os produtos da PCR (figura 12), então, submetido ao protocolo de seqüenciamento automático.

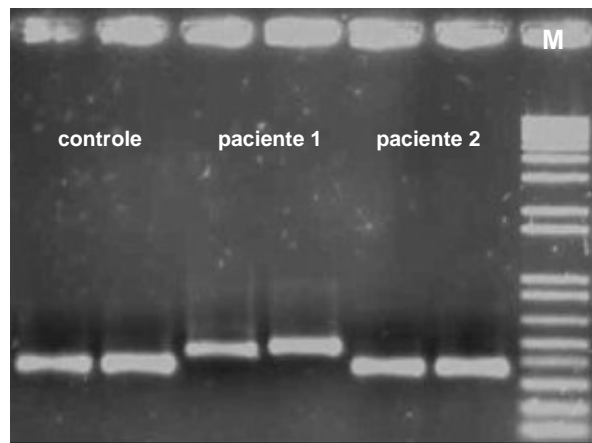


Figura 12- Gel de agarose – amplificação resultante de minipreparação com *primers SP6* e *T7* de pacientes controle e mutados. Marcador molecular 1kb plus.

- Seqüenciamento dos fragmentos:

O seqüenciamento automático dos fragmentos apontou a manutenção do intron 6 nos indivíduos portadores de mutação. O programa MultAlign, depositado no site Expasy[®], foi utilizado para a comparação dos fragmentos obtidos com a seqüência do DNA genômico do gene (figura 13). A seqüência do paciente 1, apesar de apresentar a manutenção do intron 6, não apresentou a mutação, levantando duas hipóteses: contaminação das amostras com DNA genômico ou artefato de técnica do próprio seqüenciamento.

Para testar a hipótese de contaminação por DNA genômico, as amostras de cDNA foram submetidas a uma PCR com primers específicos para regiões intrônicas, utilizando DNA genômico como controle. Como resultado, não obtivemos amplificação nas amostras de cDNA (figura 14).

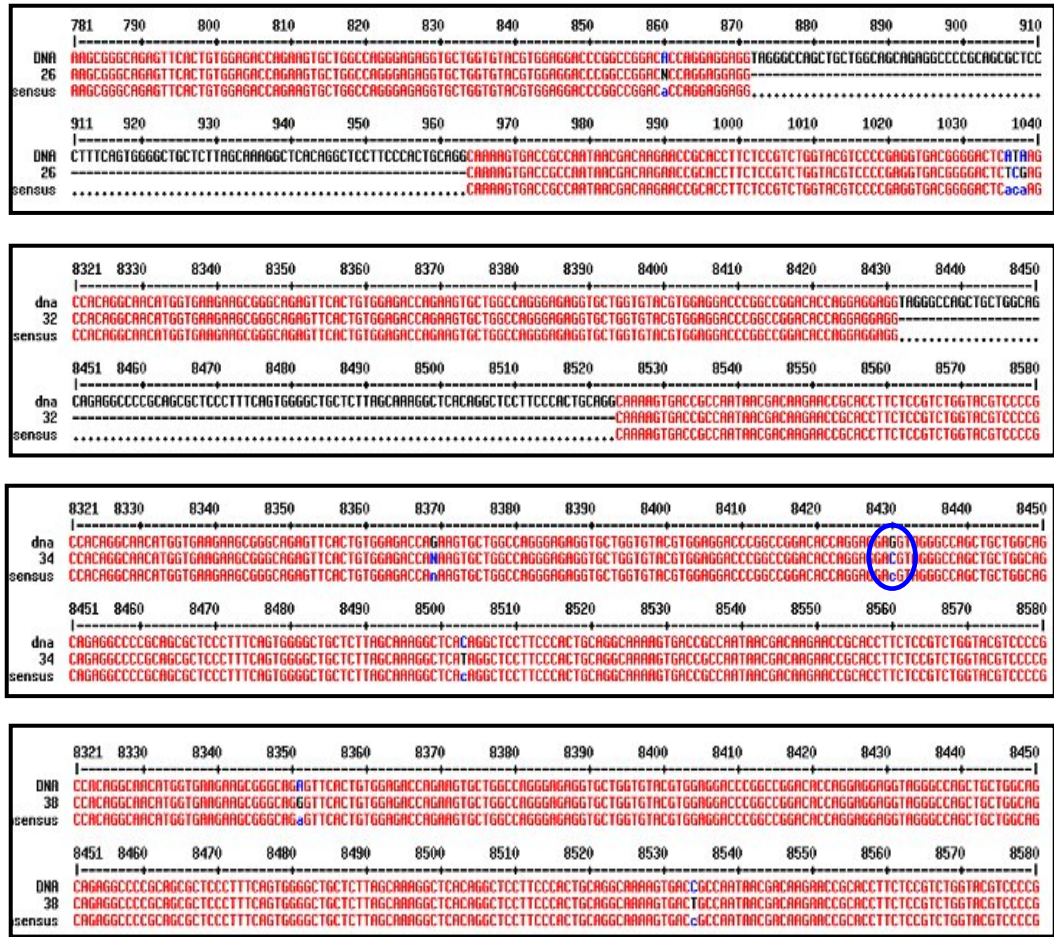


Figura 13- Alinhamento das seqüências dos pacientes controle, 1 e 2, respectivamente, com seqüência de DNA genômico do gene *FLN1*. No destaque, a mutação em estudo.

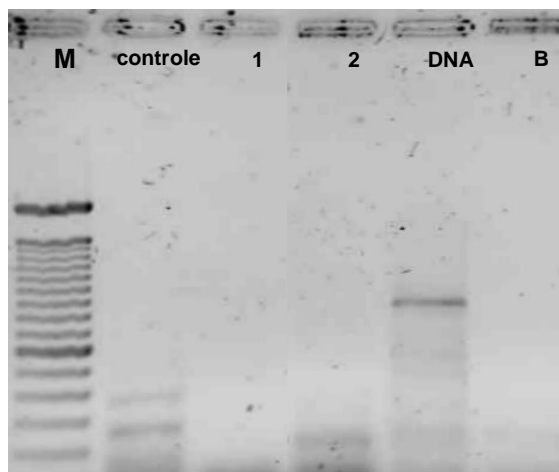


Figura 14- Gel de agarose: PCR com primers intrônicos para cDNA de pacientes controle, 1 e 2, utilizando DNA genômico como controle da reação. Marcador de peso molecular 100pb.

Como os resultados sugerem a manutenção do intron 6 como mecanismo da mutação, sua seqüência foi traduzida, com ajuda da ferramenta *Translate Tool* disponível no site www.expasy.org. A análise indicou a presença de um codon de parada no intron 6.

Para a hipótese de inativação preferencial do cromossomo X, a PCR com primers específicos para o gene HUMARA foi realizada e seu produto digerido com enzimas de restrição para os sítios de possível metilação. A análise do gel de poliacrilamida pelo Typhoon[®] (figura 15) apontou diferenças no padrão de bandas da paciente 1, o que não ocorreu com o padrão de bandas da paciente 2, que seria resultado de uma inativação preferencial de um dos cromossomos X da paciente 1.

Seguimos para a análise através do PCR em Tempo Real, que mostrou uma maior expressão de alelos possuidores da seqüência intrônica no paciente 1, em relação ao paciente 2 (figura 16). Os dados foram analisados estatisticamente através do teste qui quadrado, que apontou diferença significativa entre ambas pacientes, com p de 0,0015, ou seja, significativo, já que consideramos $p < 0,01$ para nossas análises.

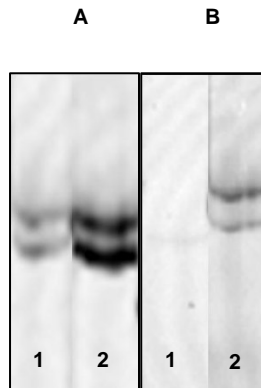


Figura 15- Gel de poliacrilamida: DNA de pacientes 1 e 2 não-digeridos (A) e amplificados após digestão (B). Note que apenas o paciente 1 apresentou diferença no padrão de bandas.

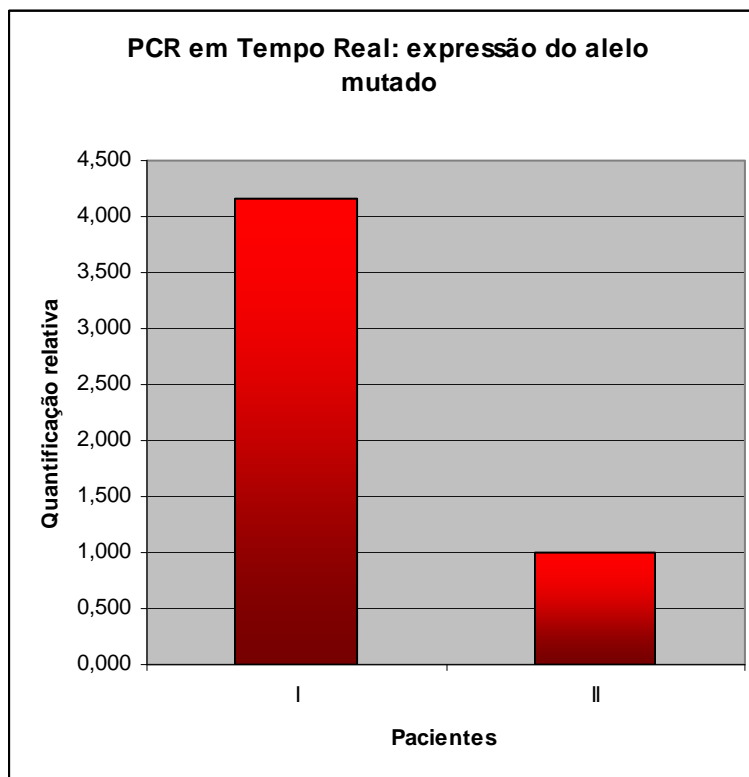


Figura 16- Gráfico de comparação da expressão detectada através de PCR em Tempo Real da seqüência mutada no paciente 1, quando comparada à expressão no paciente 2.

5- DISCUSSÃO

O processamento do RNAm é uma etapa essencial na síntese protéica, definindo exatamente o quanto do material genético será expresso pelo refinamento da transcrição. Sendo assim, as seqüências de introns são reconhecidas e removidas com grande precisão e, em seguida, os exons são ligados entre si, em um processo denominado *splicing*.

O *splicing* é realizado pelo spliceossomo, um complexo ribonucleoprotéico de alto peso molecular (60S) cujas peças formadoras reúnem-se já próximas ao pré-RNAm. Suas subunidades são os snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*), moléculas que apresentam 1 dos 5 snRNAs (*small nuclear RNA components*), U1, U2, U4, U5 e U6, associado a uma grande variedade de proteínas (Thanaraj e Clark, 2001; Newman, 1997). Tais subunidades sofrem rearranjo durante todo o processo de *splicing*, tanto através de mudanças na sua composição, quanto na sua conformação dentro do complexo, possibilitando a ação catalítica específica do spliceossomo (Konarska e Query, 2005). É importante citar que a especificidade dessa reação é essencial para seu sucesso. Os sítios de ligação do spliceossomo no RNAm são seqüências altamente conservadas, do ponto de vista evolutivo, e a existência de mutações nesses sítios pode prejudicar todo o processo.

O processo de *splicing* envolve dois passos catalíticos, com uma reação de transesterificação em cada um. Primeiramente ocorre a quebra da ligação entre a extremidade 5' do intron e o respectivo exon e, em seguida, é quebrada a ligação entre a extremidade 3' do intron e o exon consecutivo, ligando ambos exons e descartando a seqüência intrônica. Durante essas quebras, uma adenina é designada para efetuar o ataque à ligação fosfodiéster entre bases específicas da junção exon-intron.

Para a iniciar a separação da seqüência intrônica, a subunidade U1 do spliceossomo liga-se ao pré-RNAm, no sítio de *splicing* 5', através da identificação do dinucleotídeo GT, e utilizando na ligação os 3 nucleotídeos anteriores a esse dinucleotídeo, além dos 8 nucleotídeos seguintes a ele. O dinucleotídeo GT, que apresenta a variante GC, é o primeiro par de nucleotídeos da seqüência intrônica. Em seguida, a interação do pré-RNAm com a subunidade U1 substituída por interações com as subunidades U5 e U6. A subunidade U2 reconhece o chamado *branchpoint* através do dinucleotídeo AG, encontrado no final da maioria das seqüências intrônicas, ou através de uma extensão de

polipirimidina, que situa-se nas posições -5 a -10 de nucleotídeos do intron, dependendo da seqüência em questão. O *branchpoint* é importante, pois determina a base adenina que irá executar a primeira quebra de ligação no sítio de *splicing* 5'. O sítio de ligação da U2 é específico, compreendendo além do dinucleotídeo AG, os dois nucleotídeos seguintes. As subunidades U2 e U6 pareiam-se, formando uma hélice descontínua no centro do spliceossomo cataliticamente ativo, enquanto suas seqüências adjacentes ligam-se, então, ao *branchpoint* do intron e ao sítio de *splicing* 5'. Essa série de ligações de ambas subunidades molda uma estrutura que auxilia a ação da adenina, cujo grupo OH ataca uma ligação fosfodiéster no sítio de *splicing* 5', resultando na primeira transesterificação e na liberação tanto do exon 5', quanto da estrutura intermediária formada pelo intron e pelo exon 3', chamada de *lariat*. Já a subunidade U5, que apresenta uma seqüência de 9 nucleotídeos conservados em um *loop* de 11 nucleotídeos, interage com as seqüências de exon nos sítios de *splicing* 5' e 3', auxiliado pela subunidade U1. Sua função está relacionada ao ancoramento da estrutura intermediária *lariat* e ao alinhamento de ambos exons para que possam ser ligados após o 2º passo catalítico.

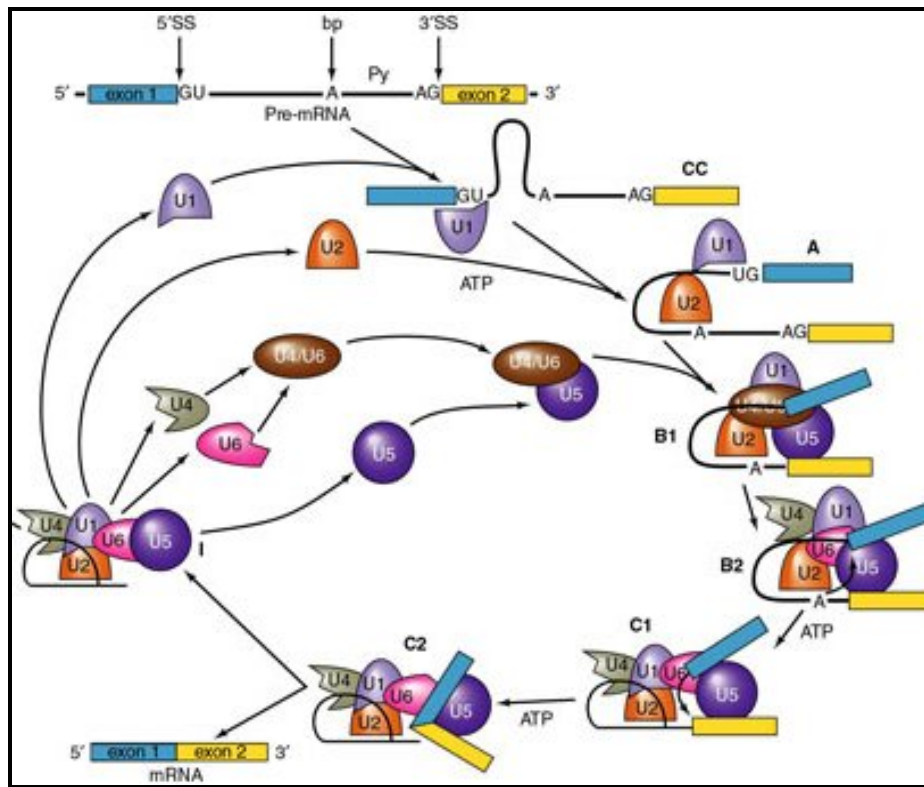


Figura 17- Esquema detalhado de ação das subunidades do spliceossomo durante o processo de *splicing*. Figura retirada de www.uic.edu

No 2º passo catalítico, o grupo OH do exon 5' que perdeu o grupo fosfato na primeira transesterificação ataca a ligação fosfodiéster entre o intron e o exon 3', liberando a seqüência intrônica, que será degradada. Em seguida, a subunidade U5 age através da interação com as posiçõesceptoras de ambos exons, promovendo sua união.

5.1- Gene *LGII*

A análise de pacientes com mutação no gene *LGII* não obteve o sucesso esperado. As análises em gel de agarose não apontaram a produção de RNAm aberrante, mas essa hipótese não pode ser totalmente excluída, já que a mutação descrita, IVS7(-2)A→G, encontra-se no intron 7, dois nucleotídeos antes do início do exon 8, o

último do gene. Essa análise foi feita no intuito de verificar, como mecanismo de ação dessa mutação, a destruição do sítio de *splicing* 3' do intron 7.

Como já discutido, os dois últimos nucleotídeos da sequência intrônica são de extrema importância para o processo de *splicing*, atuando como sítio de reconhecimento para o spliceossomo. Nesse caso de dano ao sítio de *splicing* 3' do intron 7, existe a possibilidade de manutenção desse intron na sequência, já que o local de mutação afeta exatamente o sítio de reconhecimento da subunidade U2 do spliceossomo, prejudicando a primeira transesterificação e, conseqüentemente, todo o resto do processo. Isso resultaria num RNAm de tamanho acima do normal, o qual não foi detectado por esse estudo.

Seguimos para análise de expressão do gene através da técnica de PCR em Tempo Real, sem sucesso. Para a análise foi utilizado RNA extraído de tecido epitelial dos pacientes, e não de tecido nervoso, onde a expressão desse gene é comprovadamente significativa. Essa pode ser a explicação para o insucesso de nossos experimentos, a expressão baixa do gene em tecido epitelial, a ponto que a técnica utilizada seja incapaz de detectar. Seria ideal realizar os testes com material extraído de tecido de sistema nervoso central, o que, no caso de pacientes com uma forma tão benigna de epilepsia, é quase impossível.

Como já descrito anteriormente, a proteína LGI1 apresenta sete domínios EPTP/EAR na região carboxi-terminal, o que a inclui na superfamília de proteínas epitempinas. A mutação estudada nesse projeto localiza-se no final do intron 7, prejudicando, em nível protéico, o 2º domínio EPTP e um sítio de glicosilação. Segundo estudos de Sirerol-Piquer *et al.* (2006), a secreção da proteína LGI1 só ocorre se os domínios EPTP estiverem intactos e se a proteína estiver glicosilada. Já no trabalho de Fukata *et al.* foi descrito a ação dos domínios EPTP na ligação da proteína LGI1 com a proteína ADAM22, que atuam como um complexo regulando a transmissão sináptica entre neurônios.

7.2- Gene *FLN1*

Quando a mutação 1159G>C foi descrita por nosso grupo, na tese de mestrado intitulada “*Estudo de mutações em genes responsáveis por diferentes formas de distúrbios do desenvolvimento cortical*”, foram levantadas duas hipóteses para seu mecanismo de ação: troca de aminoácidos, um glutamato por um aspartato, ou destruição do sítio doador de *splicing* do íntron 6, sendo, desde então, a segunda alternativa mais considerada, devido à localização da mutação e ao fato de que o mecanismo de *splicing* é altamente conservado entre espécies.

A mutação 1159G>C encontra-se na última base do exon 6 do gene *FLN1*, local que seria sítio de reconhecimento e ligação da subunidade U1 do spliceossomo ainda no início do processo de *splicing*, e da subunidade U5, cuja função se estende a ambos passos catalíticos do processo e cuja atuação é submetida à ação da subunidade U1. A interação da subunidade U1 se dá através do pareamento de bases com o pré-RNAm (Thanaraj e Clark, 2001), esclarecendo e reforçando nossos resultados que descrevem o mecanismo dessa mutação como a destruição do sítio doador de *splicing* do intron 6, já que ele prejudicaria o *splicing* ainda no seu início, com o *mismatch* da subunidade U1.

Com a manutenção do intron 6 durante o processamento do RNAm, essa seqüência adquire um codon de parada. O intron 6 foi analisado através do programa Translate Tool, depositado no site www.expasy.org. Sendo assim, a tradução desse RNAm seria interrompida no início de sua extensão, já que o gene *FLN1* possui 48 exons, perdendo os outros 42 exons, ou seja, a maior parte de sua estrutura. Isso implica, principalmente, na perda do sítio de dimerização. Para desempenhar sua principal função, que é a ligação cruzada com actina, a proteína FLN1 atua em dímeros, que ganham flexibilidade devido a presença dos domínios hinge, os quais também deixam de ser traduzidos.

A localização do códon de parada descrito também resulta na perda de 23 das 24 repetições de filamina. É importante citar que as repetições de filamina 14 a 24 apresentam sítios de interação com 45 proteínas de funções diversas (Robertson, 2005 – tabela 3), como transdução de sinal celular, receptores de membrana,

receptores de hormônios, proteases, coagulação sanguínea e migração celular, essas duas últimas intimamente ligadas ao fenótipo de heterotopia nodular periventricular.

Tabela 3- Proteínas que interagem com as repetições de filamina. Robertson, 2005.

Table 1	
Proteins reported to interact with filamin A.	
Function	Interacting protein
Coagulation	Tissue factor, glycoprotein 1b α
Ion channels	Kv4.2 potassium channel, Kir2.1 potassium channel, HCN1 pacemaker channel
Cell-cell and cell-matrix adhesion	Integrins β 2, β 1A, β 1D, β 3, β 7
Immune regulation	Fc γ R1, SEK-1, TRAF2, FAP52, Tc-mip
Signal transduction	RalA, RhoA, Rac1, Cdc42, Trio, ROCK/Rho-kinase, Caveolin, SHIP-2, SMADs, Ca ²⁺ sensing receptor, protein kinase C
Proteases	Furin, granzyme B, presenilin 1 and 2
Membrane receptors	Dopamine D2/D3 receptors, metabotropic glutamate receptor 7b, acetylcholine receptor, μ -opioid receptor
Hormone receptors	Thyroid-stimulating hormone receptor, insulin receptor, androgen receptor
Extracellular matrix	Decorin
Nuclear functions	BRCA2, cv heat shock protein
Cell polarity/Migration	FILIP, Migfilin
Cytoskeletal components	F-actin, Filamin B
Unknown functions	Prostate specific antigen, PDZ/LIM-domain containing protein

Proteins reported to interact with filamin A. Interactants are grouped into broad categories according to current understanding of their overall function. The evidence for each interaction with filamin A is indicated.

A mesma tese de mestrado “*Estudo de mutações em genes responsáveis por diferentes formas de distúrbios do desenvolvimento cortical*” descreve o quadro clínico das pacientes aqui analisadas. Nessa descrição consta que ambas pacientes pertencem à mesma família, sendo filha (paciente 1) e mãe (paciente 2). A paciente 1 apresenta deficiência mental moderada e crises intratáveis desde os 4 anos de idade. Os achados de neuroimagem (figura 18a) demonstram a presença de heterotopia nodular periventricular, com nódulos ectópicos bilaterais de substância cinzenta cortical. Já a paciente 2 não apresenta retardo mental e tem crises parciais facilmente controladas com medicação. Seus exames de neuroimagem (figura 18b) mostram a presença de heterotopia nodular periventricular clássica, semelhante ao quadro encontrado na paciente 1. Aqui fica clara a disparidade no quadro fenotípico das pacientes.

A análise comparativa realizada através de PCR em Tempo Real apontou uma maior expressão do alelo mutado na paciente 1, quando comparada à paciente 2 e, complementar a esse dado, os testes de inativação preferencial do cromossomo X apontaram um resultado positivo na paciente 1. Portanto, nossos dados sugerem uma explicação molecular para tal diferença nos quadros fenotípicos, sendo esses o resultado de um mosaicismos nas pacientes, causado pela metilação desigual do cromossomo X. É importante citar que todas as análises foram feitas com material genético extraído de tecido sangüíneo, e não de tecido do sistema nervoso central dos pacientes. A obtenção desse tecido, no momento, é impraticável e seria a forma ideal de prosseguir com os estudos dessa tese.

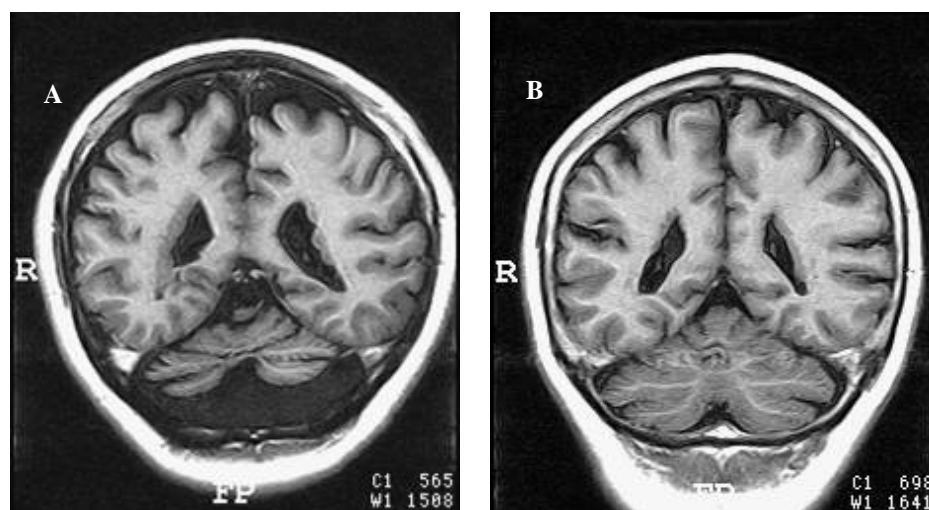


Figura 18- Imagens obtidas através de ressonância magnética das pacientes 1 (a) e 2 (b).

O mosaicismos geralmente está ligado a casos cuja mutação é nova, e não foi geneticamente herdada. Casos de mosaicismos têm sido descritos em pacientes portadores de mutação nos genes *DCX* e *LIS1*, que estão intimamente ligados a desordens de migração neuronal (Kato *et al.*, 2001; Sicca *et al.*, 2003). No caso da HNP, o mosaicismos tem surgido como uma explicação para a descrição de casos dessa desordem em pacientes do sexo masculino (Guerrini *et al.*, 2004; Parrini *et al.*, 2004). Além disso, no mesmo estudo,

Parrini *et al.* descreveram um caso de mosaicismo em uma paciente do sexo feminino com um fenótipo mais brando que o esperado, já que a mutação que ela portava (c.568_569insG) também resulta em um códon de parada prematuro, assim como na paciente 1. Mas ainda não foi notificado um caso em que haja excessiva expressão do alelo mutado, resultando em um quadro clínico mais grave, o que torna nosso caso ainda mais interessante.

Essa tese constitui um ótimo exemplo da grande heterogeneidade clínica encontrada nas patogenias agrupadas como epilepsias. Tal disparidade faz da investigação molecular uma ferramenta fundamental no entendimento de seus mecanismos, atuando como fator propulsor no avanço e desenvolvimento de tratamentos que proporcionem uma melhor qualidade de vida aos pacientes.

6- CONCLUSÕES

- Determinamos que o mecanismo mais provável envolvido na mutação 1159G→C no gene *FLNI* é a destruição do sítio doador de *splicing* do íntron 6, levando a manutenção do intron 6 durante o processamento do RNAm e a conseqüente aquisição de um codon de parada prematuro que levaria a síntese de uma proteína truncada.

- Quanto a análise da mutação IVS7(-2)A→G no gene *LGII*, foi comprovado que a mutação não produz um RNAm aberrante, mas a análise de expressão não apresentou resultados conclusivos.

- Encontramos evidências experimentais de que as diferenças clínicas encontradas nas duas pacientes que apresentam a mesma mutação em *FLNI* (mãe e filha), podem em parte, ser explicadas por alterações no mecanismo de inativação randômica do cromossomo X.

***7- REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet.* 1992; 51(6):1229-39.

Angevine JB, Sidman, RL. Autoradiographic study of the cell migration during histogenesis of the cerebral cortex in the mouse. *Nature* 1961; 192: 766-768

Barkovich AJ and Kjos BO. Gray matter heterotopias: MR characteristics and correlation with developmental and neurological manifestations. *Radiology* 1992, 182: 493-499

Berkovic SF, Izzillo P, McMahon JM, Harkin LA, McIntosh AM, Phillips HA, Briellmann RS, Wallace RH, Mazarib A, Neufeld MY, Korczyn AD, Scheffer IE, Mulley JC. ; LGII mutations in temporal lobe epilepsies.; *Neurology.* 2004 Apr 13;62(7):1115-9

Borges MA, Min LL, Guerreiro CA, Yacubian EM, Cordeiro JA, Tognola WA, Borges AP, Zanetta DM. Urban prevalence of epilepsy: populational study in Sao Jose do Rio Preto, a medium-sized city in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.* 2004 Jun;62(2A):199-204.

Chernova OB, Somerville RP, Cowell, JK. A novel gene, *LGII*, from 10q24 is rearranged and downregulated in malignant brain tumors. *Oncogene.* 1998; 17:2873-81

Dubeau F et al. Periventricular nodular heterotopia: clinical manifestations and strategies for surgical treatment of intractable seizures. *Epilepsia* 1993, 34: 127

Eksioglu YZ, Scheffer IE, Cardenas P, Knoll J, DiMario F, Ramsby G, Berg M, Kamuro K, Berkovic SF, Duyk GM, Parisi J, Huttenlocher PR, Walsh CA.; Periventricular heterotopia: an X-linked dominant epilepsy locus causing aberrant cerebral cortical development. *Neuron* 1996, 16: 77-87

Faiella, A.; Brunelli, S.; Granata, T.; D'incerti, L.; Cardini, R.; Lenti, C. et al. A number of schizencephalic patients including 2 brothers are heterozygous for germline mutations in the homeobox gene *EMX2*. *Eur J Hum Genet,* 5: 186-90, 1997

Fox JW et al. Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* 1998, 21: 1315-1325

Fukata Y, Adesnik H, Iwanaga T, Brecht DS, Nicoll RA, Fukata M.; Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulate synaptic transmission.; *Science*. 2006 Sep 22;313(5794):1792-5.

Furlan S, Roncaroli F, Forner F, Vitiello L, Calabria E, Piquer-Sirerol S, Valle G, Perez-Tur J, Michelucci R, Nobile C.; The LGI1/epitempin gene encodes two protein isoforms differentially expressed in human brain. *J Neurochem*. 2006 Aug;98(3):985-91. Epub 2006 Jun 19.

Huttenlocher PR et al. Periventricular heterotopia and epilepsy. *Neurology* 1994, 44: 51-55.

Garcia-Higuera I, Fenoglio J, Li Y et al. Folding of proteins with WD-repeats: comparison of six members of the WD-repeat, superfamily to the G protein beta subunit. *Biochemistry* 1996, 35: 13985-13994.

Granata, T.; Battaglia, G.; D'incerti, L.; Franceschetti, S.; Spreafico, R.; Battino, D. et al. Schizencephaly: neuradiologic and epileptologic findings. *Epilepsia*, 37: 1185-93, 1996

Gu W, Brodtkorb E, Steinlein OK. LGI1 is mutated in familial temporal lobe epilepsy characterized by aphasic seizures. *Ann Neurol*. 2002; 52:364-7

Guerreiro CAM, Guerreiro MM, Cendes F, Lopes-Cendes I. Desordens do desenvolvimento cortical. *Epilepsia*. 2º edição. Lemos Editorial: 265-281

Guerrini R, Mei D, Sisodiya S, Sicca F, Harding B, Takahashi Y, Dorn T, Yoshida A, Campistol J, Kramer G, Moro F, Dobyns WB, Parrini E.; Germline and mosaic mutations of FLN1 in men with periventricular heterotopia. *Neurology*. 2004 Jul 13;63(1):51-6.

Hannan AJ, Servotte S, Katsnelson A et al. Characterization of nodular neuronal heterotopia in children. *Brain* 1999; 122: 219-238.

Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B, Winawer M, Barker-Cummings C, Martinelli Boneschi F, Choi C, Morozov P, Das K, Teplitskaya E, Yu A, Cayanis E, Penchaszadeh G, Kottmann A.H., Pedley TA, Hauser W.A., Ottman R, Gilliam T.C.; Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features; *Nat Genet*. 2002 Mar;30(3):335-41.

Kato M, Kanai M, Soma O, Takusa Y, Kimura T, Numakura C, Matsuki T, Nakamura S, Hayasaka K.; Mutation of the doublecortin gene in male patients with double cortex syndrome: somatic mosaicism detected by hair root analysis. *Ann Neurol*. 2001 Oct;50(4):547-51.

Kobayashi E, Santos NF, Torres FR, Secolin R, Sardinha LAF, Lopes-Cendes I, *et al*. MRI abnormalities in familial temporal lobe epilepsy with auditory auras. *Arch Neurol* (2003) 60: 1546-1551.

Kobe B, Deisenhofer J. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci*. 1994; 19:415-21.

Kobe B, Deisenhofer J. Proteins with leucine-rich repeats. *Curr Opin Struct Biol*. 1995; 5:409-16.

Konarska MM, Query CC.; Insights into the mechanisms of splicing: more lessons from the ribosome.; *Genes Dev*. 2005 Oct 1;19(19):2255-60. Review.

Kuzniecky R, Murro A, King D, *et al*. Magnetic resonance imaging in childhood intractable partial epilepsies: pathologic correlations. *Neurology* 1993; 43: 681-697

Meisler MH, Kearney J, Ottman R, Escayg A. Identification of epilepsy genes in human and mouse. *Ann Rev Genet*. 2001; 35:567-88.

Merendino L, Guth S, Bilbao D, Martinez C, Valcarcel J.; Inhibition of msl-2 splicing by Sex-lethal reveals interaction between U2AF35 and the 3' splice site AG.; *Nature*. 1999 Dec 16;402(6763):838-41.

Michelucci R, Poza JJ, Sofia V, de Feo MR, Binelli S, Bisulli F, *et al*. Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: clinical spectrum, new epitempin mutations and genetic heterogeneity in seven european families. *Epilepsia*. 2003; 44 (10):1289-97

Moore, MJ; Intron recognition comes of AGE.; *Nat Struct Biol*. 2000 Jan;7(1):14-6.

Morante-Redolat JM, Gorostidi-Pagola A, Piquer-Sirerol S, Saenz A, Poza JJ, Galan J, *et al*. Mutations in the LGI1/Epitempin gene on 10q24 cause autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Hum Mol Genet*. 2002; 11:1119-27

Newman, AJ; The role of U5 snRNP in pre-mRNA splicing; *The EMBO Journal* Vol.16 No.19 pp.5797–5800, 1997

Ottman R, Risch N, Hauser WA, Pedley TA, Lee JH, Barker-Cummings C, Lustenberger A, Nagle KJ, Lee KS, Scheuer ML, et al.; Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q.; *Nature Genetics* 1995 May;10(1):56-60.

Ottman R, Winawer MR, Kalachikov S, Barker-Cummings C, Gilliam TC, Pedley TA, Hauser WA. ; LGI1 mutations in autosomal dominant partial epilepsy with auditory features.; *Neurology*. 2004 Apr 13;62(7):1120-6.

Parrini E, Mei D, Wright M, Dorn T, Guerrini R.; Mosaic mutations of the FLN1 gene cause a mild phenotype in patients with periventricular heterotopia. *Neurogenetics*. 2004 Sep;5(3):191-6. Epub 2004 Jul 28.

Parrini E, Ramazzotti A, Dobyns WB, Mei D, Moro F, Veggiotti P, Marini C, Brilstra EH, Dalla Bernardina B, Goodwin L, Bodell A, Jones MC, Nangeroni M, Palmeri S, Said E, Sander JW, Striano P, Takahashi Y, Van Maldergem L, Leonardi G, Wright M, Walsh CA, Guerrini R.; Periventricular heterotopia: phenotypic heterogeneity and correlation with Filamin A mutations.; *Brain*. 2006 Jul;129(Pt 7):1892-906.

Pitto M, Raimondo F, Zoia C, Brighina L, Ferrarese C, Masserini M, Enhanced GM1 ganglioside catabolism in cultures fibroblasts from Alzheimer patients, *Neurobiology of Aging*, 2005; 26:833-838.

Pizutti A., Flex E., Bonaventura CD, Dottorini T, Egeo G, Manfredi M, *et al.* Epilepsy with auditory features: a LGI1 gene mutation suggests a loss-of-function mechanism. *Ann Neurol*. 2003; 53:396-9

Poussaint, T.Y.; Fox, J.W.; Dobyns, W.B.; Radtke, R.; Scheffer, I.E.; Berkovic, S.F.; Periventricular nodular heterotopia in patients with filamin-1 gene mutations: neuroimaging findings. *Pediatr Radiol*, 30: 748-55, 2000

Poza JJ, Saenz A, Martinez-Gil A, Cheron N, Cobo AM, Urtasun M, *et al.* Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: clinical and genetic study of a large Basque pedigree linked to chromosome 10q. *Ann Neurol*. 1999; 45:182-8

Robertson SP.; Filamin A: phenotypic diversity.; *Curr Opin Genet Dev.* 2005 Jun;15(3):301-7. Review.

Robertson P.S.; Twigg, S.F.R.; Sutherland – Smith, A.J.; Biancalana, V.; Gorlin, R.J.; Horn, D.; et al. Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformation in humans. *Nature Genet* 2003; 33: 487-91,.

Robinson R., Gardiner M.; Molecular basis of Medelian idiopathic epilepsies; *Ann Med* 2004; 36:89-97.

Sander JWAS, Shorvon SD. Epidemiology of the epilepsies. *J Neurol Neurosurg Psychiatr.* 1996; 61:433-43.

Santos NF, Sousa SC, Kobayashi E, Torres FR, Sardinha JA, Cendes F, Lopes-Cendes I.; Clinical and genetic heterogeneity in familial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 2002;43 Suppl 5:136.

Schulte U, Thumfart JO, Klocker N, Sailer CA, Bildl W, Biniössek M, Dehn D, Deller T, Eble S, Abbass K, Wangler T, Knaus HG, Fakler B.; The epilepsy-linked Lgi1 protein assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by Kvbeta1; *Neuron.* 2006 Mar 2;49(5):697-706.

Semah F, Picot MC, Adam MD et al. Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology* 1998; 51: 1256-1262

Senechal K.R., Thaller C., Noebels J.L., ADPEAF mutations reduce levels of secreted LGI1, a putative tumor suppressor protein linked to epilepsy. *Human Molecular Genetics,* 2005, 14:1613–1620

Sheen VL, Dixon PH, Fox JW, Hong SE, Kinton L, Sisodiya SM, Duncan JS, Dubeau F, Scheffer IE, Schachter SC, Wilner A, Henchy R, Crino P, Kamuro K, DiMario F, Berg M, Kuzniecky R, Cole AJ, Bromfield E, Biber M, Schomer D, Wheless J, Silver K, Mochida GH, Berkovic SF, Andermann F, Andermann E, Dobyns WB, Wood NW, Walsh CA.; Mutations in the X-linked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females. *Hum Mol Genet.* 2001 Aug 15;10(17):1775-83.

Sicca F, Kelemen A, Genton P, Das S, Mei D, Moro F, Dobyns WB, Guerrini R.; Mosaic mutations of the LIS1 gene cause subcortical band heterotopia. *Neurology*. 2003 Oct 28;61(8):1042-6.

Sirerol-Piquer MS, Ayerdi-Izquierdo A, Morante-Redolat JM, Herranz-Perez V, Favell K, Barker PA, Perez-Tur J., The epilepsy gene LGI1 encodes a secreted glycoprotein that binds to the cell surface. *Hum Mol Genet*. 2006 Dec 1;15(23):3436-45. Epub 2006 Oct 26.

Spreafico R, Pasquier B, Minotti L et al. Immunocytochemical investigation on dysplastic human tissue from epileptic patients. *Epilepsy Res* 1998; 32: 34-48

Staub E, Perez-Tur J, Siebert R, Nobile C, Moschonas NK, Deloukas P, Hinzmann B.; The novel EPTP repeat defines a superfamily of proteins implicated in epileptic disorders.; *Trends Biochem Sci*. 2002 Sep;27(9):441-4. Review.

Sutula TP. Experimental models of temporal lobe epilepsy: new insights from the study of kindling and synaptic reorganization. *Epilepsia*. 1990; 31:45-54.

Sutula TP. Experimental models of temporal lobe epilepsy: new insights from the study of kindling and synaptic reorganization. *Epilepsia*. 1990; 31:45-54.

Thanaraj TA, Clark F.; Human GC-AG alternative intron isoforms with weak donor sites show enhanced consensus at acceptor exon positions. *Nucleic Acids Res*. 2001 Jun 15; 29(12):2581-93.

Walsh C, Cepko CL. Widespread dispersion of neuronal clones across functional regions of the cerebral cortex. *Science* 1992; 255: 434-440

Winawer MR, Ottman R, Hauser AW, Pedley TA. Autosomal dominant partial epilepsy with auditory features: defining the phenotype. *Neurology*. 2000; 54:2173-6

Wolpert, S.M.; Barnes, P.D. MRI in Pediatric Neuroradiology. Mosby Year Book, St. Louis, 1992.

Wu S, Romfo CM, Nilsen TW, Green MR.; Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35. *Nature*. 1999 Dec 16;402(6763):832-5.

8- ANEXOS

ANEXO 1- RELATÓRIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP.
☎ (0_19) 3788-8936
FAX (0_19) 3788-7187
🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisac/etica/index.html
✉ cep@fcm.unicamp.br

CEP, 22/11/05.
(Grupo I)

PARECER PROJETO: N° 748/2005
CAAE: 1526.0.146.000-05

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “REPERCUSSÃO MOLECULAR DE MUTAÇÕES DETECTADAS EM GENES LIGADOS A DIFERENTES FORMAS DE EPILEPSIA”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Simone Sayuri Tsuneda

INSTITUIÇÃO: FCM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 04/10/2005

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 22/11/06

II - OBJETIVOS

Analisar as mutações 115G →C no gene FLN1, IVS7(-2)A→G no gene LGI1 e 796C→A no gene EMX2 em pacientes com epilepsia de Lobo temporal Lateral Autossômica Dominante, em pacientes com Heterotopia Nodular Periventricular e pacientes com Esquizencefalia. Analisar *in silico* o possível efeito dessas mutações nas estruturas secundária e terciária das proteínas dos genes estudados.

III - SUMÁRIO

Serão convocados 1 paciente portador de cada Síndrome. Será realizada biópsia de pele, extração de RNA, transcriptase reversa e amplificação, sequenciamento de DNA e PCR em tempo real. O RNA a partir de leucócitos encontra-se no banco de material biológico do laboratório de Genética Molecular. Será utilizado como controle amostra de pele de cirurgias plásticas que seriam descartadas.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Estudo bem estruturado, com métodos adequados. Consta TCLE para a biópsia de pele dos pacientes. Solicita-se dispensa do TCLE para o material arquivado e para a amostra controle, uma vez que utilizará material de descarte. Frente a importância do estudo e a dificuldade de acesso ao paciente controle, recomendamos a aprovação do estudo com dispensa do TCLE para a amostra controle, mas a inclusão do TCLE da biópsia a autorização para uso do mRNA estocado.

V - PARECER DO CEP

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

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

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).


O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de novembro de 2005.


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



FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS				FR-072664	
Projeto de Pesquisa REPERCUSSÃO MOLECULAR DE MUTAÇÕES DETECTADAS EM GENES LIGADOS A DIFERENTES FORMAS DE EPILEPSIA					
Área de Conhecimento 2.02 - Genética			Grupo Grupo II	Nível Não se Aplica	
Área(s) Temática(s) Especial(s) 1.1-Genética Humana				Fase Não se Aplica	
Unitermos EPILEPSIAS, MALFORMAÇÕES CORTICAIS, EXPRESSÃO GÊNICA, MUTAÇÕES GÊNICAS					
Sujeitos na Pesquisa					
Nº de Sujeitos no Centro 3	Total Brasil 3	Nº de Sujeitos Total 3	Grupos Especiais (Menores de 18) (Deficientes Mentais)		
Placebo NÃO	HIV / AIDS NÃO	Wash-out NÃO	Sem Tratamento Específico NÃO	Banco de Materiais Biológicos NÃO	
Pesquisador Responsável					
Pesquisador Responsável Simone Sayuri Tsuneda			CPF 008.123.949-17	Identidade 68018358	
Área de Especialização Biologia			Maior Titulação Bacharel	Nacionalidade Brasileira	
Endereço R Conselheiro Paula Sousa, 212			Bairro Barão Geraldo	Cidade Campinas - SP	
Código Postal 13083-080	Telefone 37888902 /	Fax 37888909	Email stsuneda@fcm.unicamp.br		
Termo de Compromisso Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Data: ____/____/____ Assinatura _____					
Instituição Onde Será Realizado					
Nome UNICAMP/Faculdade de Ciências Médicas - SP			CNPJ 46.506.842/5000-13	Nacional/Internacional Nacional	
Unidade/Órgão Faculdade de Ciências Médicas			Participação Estrangeira NÃO	Projeto Multicêntrico NÃO	
Endereço Rua Tessália Vieira de Camargo 126			Bairro Barão Geraldo	Cidade Campinas - SP	
Código Postal 13084-97	Telefone 19 37888936	Fax 19 37887187	Email cep@fcm.unicamp.br		
Termo de Compromisso Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução. Nome: _____ Data: ____/____/____ Assinatura _____					
Patrocinador					
Nome Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP			CNPJ 50.844.053/0001-10		
Endereço Rua Pio XI 1500			Bairro Alto da Lapa	Cidade São Paulo - SP	
Código Postal 05468-901	Telefone 3645-2383	Fax (11) 3838-4000	Email info@trieste.fapesp.br		
Responsável Carlos Henrique de Brito Cruz			Cargo / Função Diretor Científico		

O Projeto deverá ser entregue no CEP em até 30 dias a partir de 28/09/2005. Não ocorrendo a entrega nesse prazo esta Folha de Rosto será INVALIDADA.

ANEXO 2- FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Genética Médica

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Página 2 de 3

Projeto: Estudos Genéticos em Epilepsia

Investigador Principal: Simone Tsuneda e Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes

VANTAGENS:

Eu entendo **que não obterei nenhuma vantagem direta** com a minha participação nesse estudo e que o meu diagnóstico e tratamento provavelmente não serão modificados. Contudo, os resultados desse estudo podem, a longo prazo, oferecer vantagens para os indivíduos com epilepsia e suas famílias, possibilitando um melhor diagnóstico e um tratamento mais adequado.

É importante notar que o diagnóstico pré-sintomático não faz parte dessa pesquisa, mas se eu desejar obter orientação genética, ela será oferecida nos ambulatórios do serviço de Genética Clínica do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), telefone (19) 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 de informação médica.

Se os resultados ou informações fornecidos forem utilizados para fins de publicação científica, minha identidade será preservada.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Eu entendo que posso requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. A Dra Iscia Lopes Cendes, telefone (19) 3788.8907, estará disponível para responder minhas questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações, contactar a secretaria da comissão de ética da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP, telefone (19) 3788.7232.

RECUSA OU DESISTÊNCIA DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento, interrompendo a minha participação no estudo, a qualquer momento, sem comprometer os cuidados médicos que recebo ou receberei futuramente no HC – UNICAMP. Eu reconheço também que a Dra Iscia Lopes Cendes pode interromper a minha participação nesse estudo a qualquer momento que julgar apropriado.



Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Genética Médica

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Página 3 de 3

Projeto: Estudos Genéticos em Epilepsia

Investigador Principal: Simone Tsuneda e Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes

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

Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

Eu autorizo a estocagem e utilização do RNA que será obtido das células da minha amostra de pele.

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