UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Mutações somáticas em componentes da via mTOR em pacientes
diagnosticados com hemimegalencefalia e epilepsia.**

Aluna: Camila Araújo Bernardino Garcia

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas. Área de concentração: Morfologia e Medicina Experimental. Orientador: Prof. Dr. Hélio Rubens Machado. Departamento de Cirurgia e Anatomia.

**Ribeirão Preto
2018**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO PARCIAL OU TOTAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Garcia, Camila Araújo Bernardino

Mutações somáticas em componentes da via mTOR em pacientes diagnosticados com hemimegalencefalia e epilepsia.

88p; Il.; p.: 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Morfologia e Medicina Experimental.

Orientador: Machado, Hélio Rubens

1. Hemimegalencefalia. 2. Epilepsia. 3. Genética.

GARCIA, C.A.B. Mutações somáticas em componentes da via mTOR em pacientes diagnosticados com hemimegalencefalia e epilepsia, 2018. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas – opção: Morfologia e Medicina Experimental.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.	Instituição:
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof. Dr.	Instituição:
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof. Dr.	Instituição:
Julgamento: _____	Assinatura: _____

" Dedico este trabalho à todos que lutam pela ciência, e com as próprias mãos a torna possível".

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hélio Rubens Machado, que sempre ofereceu oportunidades para o meu crescimento científico. Muito obrigada pelo constante estímulo e irrestrita confiança que tem sempre depositado sobre mim, o que me deixa honrada.

Ao meu co orientador Prof. Dr. Wilson Araújo, pela orientação valiosa, pelo incentivo e presença constantes durante todo o doutorado e, acima de tudo, por abrir as portas do seu laboratório e ter proporcionado o meu amadurecimento profissional.

Ao Prof. Dr. Joseph Gleeson, pela orientação e todo o aprendizado durante o período na Universidade de San Diego.

Aos grandes amigos do Centro de Medicina Genômica- CMG e o Laboratório de Biologia Molecular - LGMB, por terem me recebido com tanta simpatia pela ajuda que todos sempre me ofereceram nessa jornada, além de amigos vocês se tornaram uma família para mim.

Aos meus amigos da pós-graduação que encontrei ao longo desses anos, agradeço pelas horas ouvindo minhas reclamações e pelas gratuitas e solidárias colaborações a mim oferecidas com atenção e paciência.

Ao PRONAS pelo auxílio financeiro para execução deste projeto.

À FAEPA pela administração e compromisso com este projeto.

À Fundação Hemocentro e o Centro de Medicina Genômica, pelo local e equipamentos de trabalho proporcionados.

À todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com a realização deste trabalho.

Em especial...

À minha família, a aos quais devo minhas bases existenciais, muito afeto recebido e um apoio constante ao meu aprimoramento ético e científico.

*“Se pude ver mais longe, foi por estar apoiado em ombros de gigantes”
Isaac Newton*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 DESENVOLVIMENTO CORTICAL CEREBRAL	13
1.2 MALFORMAÇÕES DO DESENVOLVIMENTO CORTICAL	16
1.2.1 DISPLASIA CORTICAL	18
1.2.2 EPILEPSIA	19
1.2.3 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DA HEMIMEGALENCEFALIA	21
1.2.4 ASPECTOS GENÉTICOS DA HEMIMEGALENCEFALIA	23
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	33
4.2 CASUÍSTICA	33
4.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	33
4.4 ANÁLISE PATOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA	34
4.5 ANÁLISES GENÔMICA	34
4.5.1 EXTRAÇÕES DE DNA - SANGUE	34
4.5.2 EXTRAÇÕES DE DNA - TECIDO	35
4.5.3 ANÁLISE DA INTEGRIDADE DO DNA	35
4.5.4 SEQUENCIAMENTO DO EXOMA	35
4.6 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA	38
4.6.1 MAPEAMENTO E FILTRAGEM/ LEITURA AMPLICON	38
4.6.2 IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES	38
4.6.3 IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES SOMÁTICAS ESPECÍFICAS DO CÉREBRO	39
4.7 ddPCR SCREENING E VALIDAÇÕES	40
5. RESULTADOS	41
5.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES SELECIONADOS	42
5.1.2 ANÁLISE DAS IMAGENS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA	42
5.1.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA	46
5.2. QUALIDADE DO SEQUENCIAMENTO	51
5.2.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS PACIENTES SELECIONADOS	53
5.2.2 TIPOS DE MUTAÇÕES E POTENCIAL DE PATOGENICIDADE	53
5.2.3 ANÁLISE DAS VARIANTES ENCONTRADAS	54
5.2.4 ANÁLISE DAS VARIANTES DE INTERESSE	58
5.4 ddPCR SCREENING E VALIDAÇÕES	62
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÃO	71
8 REFERÊNCIAS	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais alterações observadas em imagens de ressonância magnética.....	44
Tabela 2 - Principais informações clínicas coletadas a partir da revisão de prontuários médicos.....	48
Tabela 3 - Estatísticas do Sequenciamento do Exoma	52
Tabela 4: Mutações de genes na via mTOR em pacientes diagnosticados com HME.....	85
Tabela 5: Todas as mutações encontradas após a aplicação dos filtros de patogenicidade e seleção das regiões de interesse.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Figura representativa ilustrando a migração neuronal cortical, orientada por fibras radiais ao longo do tempo, levando a origem dos neurônios piramidais e astrócitos no córtex cerebral. (A) uma célula neuroepitelial (vermelha) na zona ventricular serve como progenitor para um neurônio piramidal (verde-azul), bem como uma célula glial radial (ouro). (B) o neurônio (azul) migra ao longo de um processo glial radial. (C) neurônios (azul) continuam a migrar como células progenitoras intermediárias (amarelo pequeno). (D) células progenitoras intermediárias começam a gerar neurônios (azul). (E) as células progenitoras na zona ventricular começam a dar origem para astrócitos (verde escuro). Interneurônios (roxo) gerados em outros lugares migram tangencialmente. CP, placa cortical; IZ, zona intermediária; VZ, zona ventricular. A VZ no início do desenvolvimento tem uma espessura de ~ 10 corpos celulares (50 a 100 µm). O CP varia em espessura de dois a três corpos celulares nos primeiros estágios de desenvolvimento, eventualmente formando um cérebro maduro córtex com 2 a 4 mm de espessura. *Adaptada da referência Poduri et al 2013*.....15

Figura 2: Figura comparativa do córtex normal e anormal ilustrando como ocorre a malformação do desenvolvimento cortical. As anomalias celulares são observadas na análise de histopatologia, que indicam um padrão generalizado de ruptura molecular subjacente à desorganização estrutural do córtex. *Adaptado de Lancet Neurology 2009.....18

Figura 3: Representação esquemática da via de sinalização do alvo de rapamicina em mamífero (mTOR). A HME é causada por mutações de ganho de função ou mutações de perda de função em genes relacionados ao mTOR. Setas pretas e barras transversais indicam ativação e inibição da fosforilação. *Adaptado D'GAMA et al., 2005.....25

Figura 4: Fluxograma das etapas experimentais realizadas no projeto de pesquisa.....32

Figura 5: Representação gráfica do preparo e enriquecimento da biblioteca genômica utilizando o kit *Nextera Exome Rapid Capture* (Illumina, EUA) (Modificado de ILLUMINA 2015).....37

Figura 6 - Fluxograma da metodologia aplicada para a análise de bioinformática.....40

Figura 7: Visão geral do fluxo do método de ddPCR de gotículas digitais. A mistura de PCR é fracionada em milhares de gotículas do tamanho de nanolitros usando tecnologia especializada de óleo e microfluídica. As gotículas são submetidas a ciclos térmicos em uma máquina de PCR padrão. Uma reação de PCR ocorre apenas nas gotículas que transportam o DNA alvo. Os produtos de PCR são detectados por um ensaio TaqMan. Resumidamente, a sonda TaqMan hibridiza para um local interno do produto de PCR. A sonda tem um fluoróforo 5' cuja fluorescência é extinta por um fluoróforo de 3'. Uma vez que a DNA polimerase atinja a sonda durante a etapa de extensão, a sonda é clivada pela atividade de exonuclease de 5' a 3' polymer da polimerase. Essa ação libera o fluoróforo do inibidor de modo que a fluorescência possa ser detectada quando excitada pelo comprimento de onda apropriado da luz. As gotículas são lidas uma a uma usando um leitor de gotas para fluorescência em cada um dos dois canais (FAM em azul e VIC em verde). Os dados são exibidos em um gráfico 2-D de gotículas positivas nos canais FAM e VIC, duplo positivo (aquela) e negativo duplo (cinza).....40

Figura 8: Ressonância magnética cerebral ponderadas em FLAIR, demonstrando as principais alterações morfológicas de indivíduos diagnosticados com hemimegalencefalia. As principais

alterações	encontradas	estão	descritas	na	tabela
1.....					46

Figura 8:	Fotomicrografia dos encéfalos dos pacientes diagnosticados com HME, representando as principais alterações. (A) HME-4146, setas indicam a presença de células balão, (B) HME-4146, neurônios citomegálicos e dismórficos, com acúmulo de substância de Nissl na periferia. Coloração: hematoxilina e eosina. (C) HME 4145 imunomarcção para NeuN, presença de neurônios heterotópicos na transição da substância branca para neocórtex, (D) HME 4145 imunomarcção para GFAP evidenciando astrogliose. (E) HME-6584 imunomarcção para NeuN, setas indicam neurofilamentos acumulando no corpo dos neurônios displásicos, (F) HME-6584, imunomarcção para NeuN, observa-se desorganização das camadas corticais IV, V, VI, com perda neuronal. (A, B, C, D, E) Objetiva de 40X. Barra: 100µm, (F) Objetiva de 100X. Barra: 20µm.....	50
-----------	--	-----------

Figura 10:	O Gráfico mostra o valor de qualidade Phred (eixo Y) em cada posição de um <i>read</i> de 55pb (eixo X). As linhas em verdes representam as reads que passaram nos filtros de qualidade para cada posição, já as linhas amarelas e vermelhas representam reads que foram excluídas da análise pois não apresentava parâmetros de qualidade aceitável.....	51
------------	---	-----------

Figura 11:	Diagrama mostrando a localização de cada termo de exibição em relação à estrutura da transcrição.....	53
------------	---	-----------

Figura 12:	Total de mutações identificadas em diferentes regiões e efeitos.....	54
------------	--	-----------

Figura 13:	Mutações identificadas em diferentes regiões após aplicação dos filtros de patogenicidade.....	55
------------	--	-----------

Figura 14:	Gráfico EpiPrint demonstrando a prevalência de mutações dentre todas as amostras. (A) Mutações em todos os casos diagnosticados com HME, após a aplicação dos filtros de seleção de regiões de interesse e patogenicidade. (B) Mutações em 8 casos com HME em diferentes regiões e efeitos sem aplicação de filtros dos filtros.....	57
------------	--	-----------

Figura 15:	Mutações identificadas em diferentes regiões após aplicação dos filtros de patogenicidade.....	58
------------	--	-----------

Figura 16	- Gráfico EpiPrint demonstrando a prevalência de mutações dentre as amostras, em diferentes regiões e efeitos, após a aplicação dos filtros, selecionando as variantes de interesse.....	60
-----------	--	-----------

Figura 17	- Figura representativa da análise de todos os genes através da rede de interação de proteínas PP1. Grupos de proteínas são indicados em cores diferentes. As linhas representam as associações funcionais previstas. Associações fortes são representadas por linhas mais grossas. Os genes que não se apresentavam ligados a rede foram excluídos da análise.....	61
-----------	---	-----------

Figura 18	- Figura representativa da análise realizada através de um screening de mutações de interesse.....	62
-----------	--	-----------

RESUMO

GARCIA, C.A.B. " Mutações somáticas em componentes da via mTOR em pacientes diagnosticados com hemimegalencefalia e epilepsia." 2018. 88f. School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto – SP, Brazil, 2018.

As displasias corticais focais constituem um grupo de malformações do desenvolvimento cortical cerebral. São consideradas a causa mais comum de epilepsia refratária na população pediátrica. A hemimegalencefalia faz parte deste grupo de malformação do desenvolvimento cortical e clinicamente devastadora em crianças, caracterizada pelo crescimento distorcido e anormal de um hemisfério cerebral. O mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) é uma proteína quinase, que normalmente funciona como um regulador central de importantes funções fisiológicas, incluindo o crescimento e proliferação celular, metabolismo, autofagia, e sobrevivência e morte celular. O objetivo deste estudo foi identificar o defeito genético específico da hemimegalencefalia analisando os genes das vias de sinalização do mTOR. Foram selecionados 10 pacientes diagnosticados com hemimegalencefalia com faixa etária entre 0 a 18 anos de idade. Os pacientes submetidos ao procedimento cirúrgico foram designados para a coleta do material biológico (sangue e tecido encefálico) para análise genômica. Foram encontradas variantes somáticas de três genes relacionados a via mTOR com alto índice de patogenicidade, sendo elas; mutações missense na *MTOR*, HME 6584 (c.7255G> A, p.Glu2419Lys), HME 4146 (c.7498A> T, p.L7105f) mutações missense do gene *PIK3CA*, HME 4149 E542K (c.1624G> A), HME 4143 (c.1258T> C, p.C420R). A hipótese mediante esses resultados é que a mutação somática de genes que estão presentes na via mTOR podem ser uma das causas genéticas da HME. Essas observações sugeriram que a HME representa um espectro de distúrbios do neurodesenvolvimento resultando de distintas progenitoras que são determinados pelo tempo em que a mutação ocorreu durante o desenvolvimento cerebral. Pode-se esperar que uma mutação que ocorre precocemente durante o desenvolvimento afete um grande número de células e resulte em uma malformação maior, ao passo que a mesma mutação ocorrendo mais tarde no desenvolvimento poderia causar uma menor malformação. No futuro, numerosas mutações somáticas em genes conhecidos ou novos serão, sem dúvida, reveladas em amostras de cérebros ressecados e assim, possíveis correlações entre genótipos e fenótipos podem emergir, permitindo que o diagnóstico clínico genético ajude a prever o desfecho do paciente.

Palavras chave: displasia cortical focal, hemimegalencefalia, patogênese molecular.

ABSTRACT

GARCIA, C.A.B. "Somatic mutations in components of the mTOR pathway in patients diagnosed with hemimegalencephaly and epilepsy." 2018. 88f. School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto – SP, Brazil, 2018.

Focal cortical dysplasias constitute a group of malformations of cerebral cortical development. They are considered the most common cause of refractory epilepsy in the pediatric population. Hemimegalencephaly is part of this group of malformation of cortical development and clinically devastating in children, characterized by the distorted and abnormal growth of a cerebral hemisphere. MTOR (Mammalian Target of Rapamycin) is a protein kinase, which normally functions as a central regulator of important physiological functions, including cell growth and proliferation, metabolism, autophagy, and cell death and survival. The aim of this study was to identify the specific genetic defect of hemimegalencephaly by analyzing the genes of the mTOR signaling pathways. Ten patients diagnosed with hemimegalencephaly with ages ranging from 0 to 18 years of age were selected. Patients submitted to the surgical procedure were assigned to the collection of biological material (blood and brain tissue) for genomic analysis. Somatic variants of three genes related to the mTOR pathway with high pathogenicity index were found; missense mutations in the *MTOR*, HME 6584 (c.7255G> A, p.Glu2419Lys), HME 4146 (c.7498A> T, p.Leu7105Phe) missense mutations of the *PIK3CA* gene, HME 4149 (c.1624G> A Glu542Lys), HME 4143 (c.1258 → C, p.Cys420Arg). The hypothesis by these results is that the somatic mutation of genes that are present in the mTOR pathway may be one of the genetic causes of HME. These observations have suggested that HME represent a spectrum of neurodevelopmental disorders resulting from distinct progenitors that are determined by the time the mutation occurred during brain development. A mutation that occurs early in development may be expected to affect a large number of cells and result in a larger malformation, whereas the same mutation occurring later in development could cause a minor malformation. In the future, numerous somatic mutations in known or new genes will undoubtedly be revealed in samples of resected brains and thus, possible correlations between genotypes and phenotypes may emerge, allowing genetic clinical diagnosis to help predict the outcome of the patient.

Keywords: focal cortical dysplasia, hemimegalencephaly, molecular pathogenesis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. DESENVOLVIMENTO CORTICAL CEREBRAL

A formação do córtex cerebral é organizada com envolvimento de múltiplos mecanismos moleculares, cascatas de sinalização e expressão de genes (MUNOZ; LOPEZ-MESAS; VALIENTE, 2010). Um dos fatores fundamentais que rege o desenvolvimento cortical é que os neurônios se originam em locais remotos daqueles em que futuramente irão se localizar, migrando por distâncias substanciais até alcançarem a sua posição final no córtex cerebral. Como as distâncias de migração são relativamente maiores, aliadas ao padrão de organização altamente complexo, o neocórtex parece mais suscetível a malformações comparativamente a outras estruturas, tais como o olho e a medula espinhal (BIELAS *et al.*, 2004; BRITANOVA *et al.*, 2006; LEGA *et al.*, 2014).

O tubo neural que irá formar o neuroeixo fecha-se precocemente na embriogênese. Assim, segue a condensação local, expansão e diverticulação, desencadeados por expressão compartimentalizada de genes e eventos celulares. Rostralmente, as vesículas telencefálicas originam os hemisférios cerebrais (SISODIYA, 2004).

Os neurônios têm origem nas células da camada subependimária da parede dos ventrículos, a chamada matriz germinativa. As células da matriz germinativa com diferenciação neuronal (neuroblastos), quando maduras, iniciam um processo de migração. A migração neuronal para o córtex cerebral ocorre durante o período embrionário, entre 10 e 20 semanas nos humanos, dando-se em três estágios. No primeiro estágio o córtex primitivo consiste em apenas duas camadas: a zona proliferativa ventricular e a mais superficial pré-platô. A pré-platô deriva da primeira onda de migração de neurônios vindos da zona proliferativa. No segundo estágio ondas de neurônios pós-mitóticos saem da zona proliferativa e movem-se em direção radial para a superfície pial, onde dividem a zona pré-platô em zona marginal (acima) e subplatô (abaixo), estabelecendo uma nova zona chamada de platô cortical. Essa nova camada de células contribuirá para a formação das camadas 2 a 6 do córtex. Entre 12 a 20 semanas ondas sequenciais de neurônios migram da zona proliferativa para o platô cortical. Uma das características mais marcantes dessa formação cortical é o fato de ocorrer de dentro para fora, estando mais superficiais neurônios mais tardiamente formados e mais profundos neurônios mais precocemente formados (BIELAS *et al.*,

2004). No entanto, a camada mais superficial de neurônios migra através da zona subplatô. Essa migração tangencial ocorre em diferentes camadas do córtex em desenvolvimento, podendo inclusive ocorrer ao longo de grandes distâncias nas zonas intermediárias (BYSTRON; BLAKEMORE; RAKIC, 2008). Interneurônios também podem fazer parte desse processo. Cada onda de migração neuronal entra em contato com a zona marginal até encontrar alguma sinalização para parar. Além disso, neurônios destinados para uma camada em particular do neocórtex são gerados numa mesma data ou em datas próximas. O estágio final do desenvolvimento cortical é a maturação neuronal, onde os neurônios recém-chegados, após alcançarem seu destino final, desenvolvem as conexões sinápticas (BIELAS et al., 2004).

Depois que o platô cortical é formado, ele passa por subsequente maturação, com aquisição da população glial, desenvolvimento de conexões inter-celulares e crescimento dendrítico. Os montantes de células do córtex imaturos tornam-se separados por um um crescente neurópila. Diferenciação morfológica e laminação tornam-se melhor definidas. Giração ocorre entre 21 e 40 semanas no cérebro humano, podendo perpetuar-se até o período pós-natal (SQUIER; JANSEN, 2010).

Após estarem organizados nas diversas camadas, os neurônios separam-se das fibras radiais e iniciam a formação e crescimento dos dendritos e das sinapses. As fibras radiais separam-se dos neurônios após a migração e dão origem às células gliais. A maior parte do processo de migração neuronal ocorre ao redor da 16ª semana de gestação, porém, acredita-se que este processo só termine por volta do 5º mês de vida (CRINO; MIYATA; VINTERS, 2002).

As conexões corticais formam-se muito precocemente e continuam a se desenvolver num mecanismo intrincado, que leva ao desenvolvimento das substâncias cinzentas e brancas. A maturação dos neurônios inicia-se antes do término da migração e inclui a formação e crescimento dos dendritos, desenvolvimento da excitabilidade e polaridade da membrana neuronal, sinaptogênese, síntese de neurotransmissores e mielinização dos axônios. As colaterais dos axônios, os ramos dendríticos e as sinapses que são formadas em excesso sofrem posteriormente, degeneração seletiva (CAFFREY et al., 2014).

Acredita-se que os neurônios diferenciam-se em diversos tipos morfológicos dependendo, especialmente, da fase embriológica em que foram gerados. A sulcação e giração cerebrais estão diretamente relacionadas com a migração neuronal, sendo responsáveis pelo aumento da superfície cortical, sem aumento de seu volume. Tais processos também se estendem ao período pós-natal, até aproximadamente o final do primeiro ano de vida (BIELAS *et al.*, 2004).

Embora a organização do córtex seja relativamente semelhante em todos os mamíferos, no ser humano há a expansão da área de superfície cortical associada à sofisticada citoarquitetura hexalaminar, formando assim, funções corticais complexas e elaboradas (KRIEGSTEIN; NOCTOR; MARTINEZ-CERDENO, 2006, RAKIC, 2009).

Figura 1 - Figura representativa ilustrando a migração neuronal cortical, orientada por fibras radiais ao longo do tempo, levando a origem dos neurônios piramidais e astrócitos no córtex cerebral. (A) uma célula neuroepitelial (vermelha) na zona ventricular serve como progenitor para um neurônio piramidal (verde-azul), bem como uma célula glial radial (ouro). (B) o neurônio (azul) migra ao longo de um processo glial radial. (C) neurônios (azul) continuam a migrar como células progenitoras intermediárias (amarelo pequeno). (D) células progenitoras intermediárias começam para gerar neurônios (azul). (E) as células progenitoras na zona ventricular começam a dar origem para astrócitos (verde escuro). Interneurônios (roxo) gerados em outros lugares migram tangencialmente. CP, placa cortical; IZ, zona intermediária; VZ, zona ventricular. A VZ no início do desenvolvimento tem uma espessura de ~ 10 corpos celulares (50 a 100 μm). O CP varia em espessura de dois a três corpos celulares nos primeiros estágios de desenvolvimento, eventualmente formando um cérebro maduro córtex com 2 a 4 mm de espessura. Adaptada da referência Poduri *et al* 2013.

1.2 MALFORMAÇÕES DO DESENVOLVIMENTO CORTICAL

As malformações do desenvolvimento cortical são definidas como um grupo heterogêneo de transtornos anatômicos corticais focais ou difusos, cujas características patológicas dependem principalmente do momento e localização em que o distúrbio ocorreu durante o desenvolvimento (Figura 2) (BARKOVICH *et al.*, 2011).

A expressão malformação do desenvolvimento cortical foi introduzida em 1996 para descrever um grupo de desordens que resultam de distúrbios do processo normal de desenvolvimento do córtex humano (DESIKAN; BARKOVICH, 2016, BARKOVICH *et al.*, 1996). Inclui uma larga variedade de desordens, que são as causas mais comuns de atraso do neurodesenvolvimento e epilepsia (DESIKAN; BARKOVICH, 2016, BARKOVICH *et al.*, 1996).

A incidência das malformações do desenvolvimento cortical não é claramente conhecida, no entanto, têm sido diagnosticadas com maior frequência desde a incorporação da ressonância magnética na investigação de pacientes com epilepsia, retardo mental e déficit neurológico congênito (LEVENTER; GUERRINI; DOBYNS, 2008). É estimado que 25 a 40% das epilepsias intratáveis ou fármaco-resistentes da infância podem ser atribuídas às malformações do desenvolvimento cortical e que ao menos 75% dos pacientes terão epilepsia (LEVENTER; GUERRINI; DOBYNS, 2008).

O estudo e a classificação das malformações do desenvolvimento cortical são complicados, pelo fato que duas malformações nunca são virtualmente idênticas (KUZNIECKY *et al.*, 1994). Porém uma recente classificação das malformações do desenvolvimento cortical dividem-se em 3 principais grupos, dependendo do momento que ocorre a alteração, grupo I malformações secundárias à proliferação anormal ou apoptose, Grupo II secundárias à migração anormal e Grupo III secundárias a defeitos pós migratórios (Figura 2)(BARKOVICH *et al.*, 2012; BARKOVICH *et al.*, 2010).

Fatores genéticos e ambientais atuam na patogênese das malformações do desenvolvimento cortical, os genes associados, estão envolvidos na proliferação e especificação celular, na migração neuronal e na organização cortical tardia. Em muitos casos, a etiologia das malformações do desenvolvimento cortical continua desconhecida, porém avanços nas áreas da biologia molecular e genética humana têm contribuído para a identificação de causas específicas (Figura 2) (PARRINI *et al.*, 2016).

Desse modo, os aspectos genéticos das malformações do desenvolvimento cortical têm ganhado importância nas classificações propostas e, devido aos avanços nas pesquisas, as atualizações das classificações são realizadas constantemente.

Até o presente momento, mais de cem genes já foram associados a um ou mais tipos de malformações do desenvolvimento cortical. As vias biológicas incluem, regulação do ciclo celular em diferentes etapas (especialmente mitose e divisão celular), apoptose, especificação do destino celular, estrutura e função do citoesqueleto, migração neuronal, função da membrana basal bem como diversos erros inatos do metabolismo. Outra gama de genes, especialmente os relacionados a HME, relacionam-se com mutações pós-zigóticas (GUERRINI; PARRINI, 2015).

As mutações de alguns genes são definidas como a causa da malformação do desenvolvimento cortical. Em um estudo, o sequenciamento total do exoma, evidenciou mutações recessivas do gene *WDR62*, em pacientes com diversos tipos de malformações do desenvolvimento cortical (BILGÜVAR *et al.*, 2010). Já em outro estudo, foram observadas mutações em cinco genes diferentes, (*LIS1*, *DCX*, *RELN*, e *ARX*) sendo eles, correlacionados com a causa de lissencefalia. Nos casos de polimicrogiria, que são considerados geneticamente heterogêneos, foram identificadas mutações nos genes *SPRX2*, *KIAA1279*, *GPR56*, *PAX6*, *TBR2*, *COL18A1*, *RABG3GAP1*, *TUB2B*. E em pacientes com heterotopia nodular periventricular apresentam mutações nos genes *FLNA1*, *ARFGEF2*, *LRP2* com variação no número de cópias. Nos pacientes diagnosticados com heterotopia subcortical em banda, são encontrados mutações nos genes *DCX*, *LIS1* e mutações no gene *EMX2* foram encontradas em pacientes com esquizencefalia, embora não em todos os casos (PARRINI *et al.*, 2016).

De fato as malformações apresentam um grande espectro de alterações histomorfológicas, moleculares, alterações clínicas heterogêneas e manifestações neuroradiológicas altamente variáveis, o que torna o estudo deste grupo de doenças ainda mais intrigante e desafiador.

Figura 2 - Figura comparativa do córtex normal e anormal ilustrando como ocorre a malformação do desenvolvimento cortical. As anomalias celulares são observadas na análise de histopatologia, que indicam um padrão generalizado de ruptura molecular subjacente à desorganização estrutural do córtex. *Adaptado de Lancet Neurology 2009.

1.2.1 DISPLASIA CORTICAL

As displasias corticais foram descritas por Taylor e colaboradores, em 1971, como uma arquitetura cortical desordenada com presença de grandes neurônios atípicos (TAYLOR *et al.*, 1971). Estas lesões displásicas caracterizam-se por alterações na microarquitetura do córtex cerebral, acompanhadas ou não por células anormais, principalmente neurônios dismórficos (gigantes, displásicos) e células em balão (KABAT *et al.*, 2012; SISODIYA, 2004).

A comissão de classificação e terminologia (ILAE) promoveu nos últimos anos, diversas adequações conceituais e estruturais acerca das displasias corticais e epilepsia. Dentre elas, um sistema de classificação reconhece três tipos de displasia cortical: Tipo I que apresenta desarranjo cortical, com subtipos sendo: Tipo Ia com laminação radial cortical anormal, Tipo Ib alteração tangencial nas seis camadas do neocórtex e Tipo Ic sendo a combinação de ambas. A displasia cortical do Tipo II apresenta sintomas clínicos mais graves, geralmente visto em crianças. Neste tipo, as mudanças mais

extensas ocorrem fora do lobo temporal com predileção para o lobo frontal e são subdivididas em dois tipos; a Tipo IIa, quando apresentam neurônios dismórficos sem células em balão e a Tipo IIb com neurônios dismórficos e com células em balão. Já as displasias corticais do Tipo III recentemente definidas como displasias associadas a outras lesões, são subdivididas em 4 grupos; Tipo IIIa sendo displasia cortical associada a esclerose hipocampal, Tipo IIIb displasias corticais associadas com tumores; Tipo IIIc displasias corticais associadas a malformações vasculares; enquanto Tipo IIId são os casos de displasias corticais associadas a outras lesões não classificadas previamente (lesão traumática, lesão isquêmica ou encefalite) (BLUMCKE *et al.*; 2011; MUHLEBNER *et al.*, 2014).

O diagnóstico radiológico das displasias corticais é feito principalmente pela ressonância magnética, que permite encontrar anormalidades na maioria das displasias corticais. Os achados mais comuns incluem: espessamentos corticais focais, áreas de espessamento cortical focal e borramento da transição entre substância branca e cinzenta (LEE; KIM, 2013).

1.2.2 EPILEPSIA

A característica clínica mais marcante e comum nas malformações do desenvolvimento cortical é a notável associação clínica com epilepsia. Estima-se que as malformações do desenvolvimento cortical sejam responsáveis por 20% de todos os casos de epilepsia e, em alguns casos de lesões extensas, tais como HME, as convulsões podem ocorrer em até 70 a 90% dos pacientes afetados. Mesmo pequenas malformações focais, tais como heterotopia ou displasia cortical focal, estão associadas a convulsões clinicamente intratável (CRINO *et al.*, 2002). Até 40% das crianças com epilepsia refratária possuem uma malformação cortical (KUZNIECKY, 1994).

A epilepsia é um distúrbio cerebral caracterizado por manifestações clínicas (crises) recorrentes e espontâneas. Estas manifestações clínicas, são causadas pelo disparo intenso, sincronizado e rítmico, de populações neuronais no sistema nervoso central, com tendência a se repetir ao longo da vida. O diagnóstico é fundamentalmente clínico e os meios complementares habitualmente utilizados, são o eletroencefalograma, a tomografia computadorizada ou a ressonância magnética, que servem para uma melhor caracterização da situação e avaliação da sua etiologia (VATTIPALLY *et al.*, 2006; JENNUM *et al.*, 2011).

A epilepsia é uma condição relativamente comum na população geral e uma das doenças mais frequentemente tratadas pelos neurologistas. Estima-se que 1% da população desenvolva epilepsia até os vinte anos de idade (BERG *et al.*, 2003). No entanto, este número é variável nas diversas regiões do mundo, estima-se que em países desenvolvidos seja de aproximadamente 50/100.000, enquanto que em países em desenvolvimento essa taxa deve aumentar para 100/100.000 pessoas. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, aproximadamente 0,8% da população mundial (50 milhões) é portadora de epilepsia. No Brasil é estimado que existam mais de três milhões de pessoas com epilepsia (ENGEL, *et al.*, 2003).

De acordo com a nova classificação da *Liga internacional contra a Epilepsia* (ILAE) de 2017, as crises epiléticas são divididas entre aquelas de início focal limitadas a um hemisfério cerebral ou de início generalizado com início clínico e eletroencefalográfico aparente nos dois hemisférios cerebrais. Há também aquelas de início desconhecido, que podem ou não, futuramente, serem enquadradas em um dos dois tipos previamente descritos. As crises de início focal são subdivididas entre aquelas que afetam ou não a consciência, antigamente designadas como crises parciais complexas ou simples, respectivamente. Crises que iniciam focalmente e depois se espalham bilateralmente, habitualmente com movimentos tônico-clônicos, são chamadas crises focais bilaterais. O termo crise generalizada fica restrito às crises com início nos dois hemisférios e o termo crises bilaterais para aquelas que generalizam secundariamente, uma vez que essa é mais um padrão de propagação do que propriamente um tipo de crise. As crises de início generalizado podem ainda ser divididas em motoras ou não-motoras (ausência), o que também é válido para as crises de início focal (FISHER, 2017).

O tratamento de primeira linha para os quadros de epilepsia reside na introdução de drogas anti-epiléticas (DAE) (PANAYIOTOPOULOS, 2010, BRODIE *et al.*, 2012). Cerca de 50 a 70% dos pacientes ficam livres de crise com a utilização de uma DAE adequadamente selecionada e em dose terapêutica, variando essa taxa a depender do tipo da crise epilética (PANAYIOTOPOULOS, 2010). A politerapia deve sempre ser evitada, se possível, no entanto é inevitável em cerca de 30 a 50% dos pacientes, que não conseguem controle adequado das crises com monoterapia (PANAYIOTOPOULOS, 2010). As chances de tornar-se livre de crise ficam cada vez menores a medida que mais drogas são acrescentadas (BRODIE *et al.*, 2012).

A cirurgia para tratamento da epilepsia é uma alternativa comprovada com eficácia, na redução da frequência das crises convulsivas e na melhora da qualidade de vida do paciente. A segurança desse tipo de procedimento está bem estabelecida na literatura mundial, tendo um risco de óbito menor que 2%. Dessa forma, é uma boa opção nos casos de epilepsia fármaco-resistente (TRIPATHI; RAY; CHANDRA, 2016).

Os fatores genéticos desempenham um papel importante na etiologia dos distúrbios da epilepsia. Estudos genômicos recentes usando a técnica de sequenciamento do exoma identificam um grande número de variantes genéticas, incluindo número de cópias e variante de nucleotídeo em um conjunto de genes de indivíduos com epilepsia. Essas descobertas contribuíram significativamente para avaliar a etiologia da epilepsia na clínica e desenvolver tratamento molecular específico (SCHUTTE *et al.*, 2016).

Existem alguns genes identificados como a causa primária da epilepsia (*CNKSR2*, *KCNQ2*, *SCN1A*, *CDKL5*, *STXBPI*, *CHD2*, *SCN3A*, *SCN9A*, *TSC2*, *MBD5*, *POLG*, *EFHC1* *MYH1*, e *CLCN6*) entre outros. Uma vez que quase todos esses genes regulam subunidades de canais iônicos moduladores da atividade neural, têm-se correlacionado essas mutações aos casos de epilepsia. As mutações identificadas nesses genes induzem as crises epiléticas por mecanismos que levam a uma facilitação dos estímulos excitatórios ou um impedimento das vias inibitórias (DAMIANO *et al.*, 2017, FULTON *et al.*, 2017, ZHOU *et al.*, 2016, WANG *et al.*, 2017, VEERAMAH *et al.*, 2013).

1.2.3 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DA HEMIMEGALENCEFALIA

A HME é uma malformação cerebral rara que envolve o crescimento distorcido e anormal de um hemisfério cerebral, embora grande parte dos indivíduos afetados possua a forma isolada da doença a HME é ocasionalmente associada a síndromes neurocutâneas, como esclerose tuberosa, hipomelanose de Ito, síndrome de Proteus e com as displasias corticais cerebrais tipo IIB. As regiões cerebrais afetadas podem apresentar lesões focais ou difusas, defeitos na migração neuronal, com áreas de polimicrogiria, paquigiria e heterotopia (BUSTAMANTE *et al.*, 2006; D'AGOSTINO *et al.*, 2004; D'GAMA *et al.*, 2005, (BARKOVICH *et al.*, 2012; BARKOVICH *et al.*, 2010).

Em consequência dessas alterações, estes casos também apresentam comprometimento dos nervos cranianos, vasos cerebrais e cerebelo. Aumento do nervo olfativo ipsilateral, vasos cerebrais dilatados, hipertrofia hemicerebelar, e arquitetura anormal da folia cerebelar foram muitas vezes observados, embora sejam raros os casos com alargamento do nervo óptico ipsilateral e hemi-hipertrofia do tronco cerebral (BARKOVICH *et al.*, 2012; BARKOVICH *et al.*, 2011).

Nestes casos, mesmo tratando-se de anomalias de diferenciação neuronal e migração celular nos hemisférios cerebrais, o diagnóstico é feito principalmente por exames de imagens e análises clínicas (HUNG; WANG, 2005, FUSCO *et al.*, 1992, NAKAHASHI *et al.*, 2009).

O exame de ressonância magnética no pré-natal pode mostrar alargamento ventricular e difusão restrita sugerindo celularidade aumentada e distúrbio da mielinização no hemisfério afetado (AGID *et al.*, 2006). Em neonatos, achados ultrassonográficos incluem alargamento do hemisfério, espessamento dos ventrículos laterais, aumento da ecogenicidade da substância branca periventricular e deslocamento de estruturas da linha média (HUNG; WANG, 2005). O exame de ressonância magnética pós-natal, normalmente permite o diagnóstico correto e tipicamente revela aumento do encéfalo, envolvendo, pelo menos um lobo cerebral (BROUMANDI *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2014).

Pacientes com HME são clinicamente caracterizados por epilepsia intratável e em alguns casos apresentam hemiparesia e severo retardo neuropsicomotor em graus variados em relação à gravidade e local da lesão apresentam epilepsia não responsiva aos tratamentos medicamentosos e são encaminhados para o tratamento cirúrgico com abordagem de desconexão hemisférica (LEE *et al.*; 2012).

Em alguns casos, o foco ou focos epiléticos estão abrangendo todo hemisfério ou parte deles, as técnicas cirúrgicas de desconexão têm como principal objetivo controlar as crises removendo ou desconectando a área que as produz, com segurança, sem danificar funções vitais (LEE *et al.*; 2012, PODURI *et al.*; 2012).

Nos casos de HME, as principais técnicas cirúrgicas abordadas são as hemisferetomias sendo associadas a lobectomia temporal em alguns casos selecionados. O tratamento cirúrgico de desconexão tem índice reduzido de complicações advindas da técnica operatória, tais como: hemossiderose, hidrocefalia, hematomas intracranianos, meningite pós-operatória e osteomielite (TRIPATHI; RAY; CHANDRA, 2016).

O estudo histopatológico revela neurônios gigantes, células em balão, heterotopia neuronais e perda da definição da junção do córtex com a substância branca, além de extensão variável de astrocitose e astrogliose. Os pacientes com HME já são funcionalmente hemisferectomizados, pois essa malformação impede o desenvolvimento das funções corticais superiores relacionadas ao hemisfério envolvido (BARKOVICH *et al.*, 2012; BARKOVICH *et al.*, 2010).

Do ponto de vista funcional, esses pacientes desenvolvem-se com um único hemisfério cerebral, cujo funcionamento é ainda prejudicado pela atividade epileptogênica difusa contralateral. A idade ideal para a realização da abordagem cirúrgica, ainda é assunto controverso e existem poucos pacientes descritos na literatura que foram submetidos à cirurgia antes dos quatro meses de vida. De qualquer forma, é possível compreender os benefícios da intervenção precoce caso ocorra controle das crises epiléticas, possibilitando ganhos no desenvolvimento neuropsicomotor e melhor integração social da criança no futuro (TRIPATHI; RAY; CHANDRA, 2016)..

1.2.4 ASPECTOS GENÉTICOS DA HEMIMEGALENCEFALIA

A HME pode ocorrer esporadicamente sem associação genética familiar ou de gênero. O envolvimento focal de um hemisfério afetado e a discordância em gêmeos monozigóticos são sinais de que a fisiopatologia da HME está relacionada com mutações somáticas em células das áreas afetadas (FLORES-SARNAT, 2002).

Em alguns estudos, foi evidenciado que pacientes com HME apresentam mutações de genes que ativam anormalmente a via mTOR (LEE *et al.*; 2012, PODURI *et al.*; 2012, CAI *et al.*; 2014, WANG *et al.*; 2013). A via mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*), é uma cascata de sinalização celular envolvida na patogênese da HME e outros tipos de malformações do desenvolvimento cortical (ROSSINI *et al.*, 2016). A mTOR, é uma serine/threonine quinase que é altamente conservada em muitos organismos. A cascata de sinalização da mTOR, está envolvida na manutenção da homeostase celular, metabolismo energético, estresse oxidativo, proliferação e sobrevivência, resposta a fatores de crescimento, diferenciação e migração, organização do citoesqueleto e autofagia (CRINO, 2015).

Essa via é influenciada por uma série de sinais celulares (insulina, fatores de crescimento e estresse) e também por diversas outras vias correlatas, de forma direta ou

indireta, sendo a PI3K/AKT a principal via descrita até o momento capaz de exercer influência sobre ela (RICE; WADHWANI, 2015).

A atuação da mTOR, como quinase, pode ser dividida em dois complexos heteroméricos: mTOR complex 1 (mTORC1) e mTOR complex 2 (mTORC2). A mTORC1 é modulada primariamente através do fator de crescimento da cascata de sinalização PI3K(phosphoinositide-3-kinase)-AKT-mTOR, e pela rapamicina, um antibiótico inibidor da função e que age através da proteína de ligação FKBP12. A mTORC2 desempenha um papel regulatório indireto na mTORC1 através da via de sinalização AKT e é relativamente insensível a rapamicina (Figura 1) (CRINO, 2015,) (Figura 3).

O mTORC1, é modulado pelo TSC1 (produto da proteína do cromossomo 9q34 gene TSC1) e TSC2 (produto da proteína do cromossomo 16p13 gene TSC2) via Rheb (Ras homolog enriched brain). Os efeitos dos receptores insulino-dependentes e de fatores de crescimento, do metabolismo energético celular e dos fatores induzidos pela hipóxia convergem no complexo TSC1/TSC2 (CRINO, 2015). GATOR1 é outro complexo modulador da atividade da mTOR recentemente identificado (MYERS; SCHEFFER, 2017) (Figura 3).

As consequências da desregulação da via mTOR consistem, principalmente, na geração de severas alterações corticais, com morfologia celular anormal, frequentemente associadas com epilepsias intratáveis. Essas alterações neuropatológicas se devem a expressão aberrante de várias proteínas da via que não são normalmente ativadas durante o desenvolvimento cortical. Isso ocorre porque a mTOR age como regulador central de muitas etapas durante o desenvolvimento e maturação cortical cerebral, incluindo o crescimento celular e proliferação, metabolismo energético, inflamação e plasticidade sináptica (ROSSINI *et al.*, 2016).

A mTOR está envolvida em vários processos fisiológicos que podem contribuir para várias alterações histopatológicas nas malformações do desenvolvimento cortical. A maioria dos genes com mutações patológicas reprimem a atividade da proteína mTOR consequentemente levando a diminuição dos níveis de proliferação e crescimento celular e assim causam o fenótipo observados nos pacientes com HME (D'GAMA *et al.*, 2005) (Figura 3),. O estudo do papel da via mTOR na gênese na HME é de grande importância, visto que seu papel como um potencial alvo terapêutico ainda não é totalmente esclarecido.

Figura 3 - Representação esquemática da via de sinalização do alvo de rapamicina em mamífero (mTOR). A HME é causada por mutações de ganho de função ou mutações de perda de função em genes relacionados ao mTOR. Setas pretas e barras transversais indicam ativação e inibição da fosforilação. *Adaptado D'GAMA et al., 2005.

2. JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Há uma grande variedade de malformações do desenvolvimento cortical e cada uma delas tem seu grau de complexidade. A HME e outras malformações do desenvolvimento cortical representam causas comuns de epilepsia pediátrica intratável. Mesmo diante dos recentes avanços da medicina em relação ao tratamento da epilepsia, uma parcela importante dessas crianças não apresenta controle adequado das crises convulsivas, depois de instituídas todas as linhas de tratamento disponíveis. O estabelecimento de uma assinatura gênica para estes casos pode auxiliar a compreensão da patogênese molecular e celular, além de possibilitar a identificação de biomarcadores de prognósticos e terapêuticos.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é identificar os defeitos genéticos específicos da HME analisando os genes da via de sinalização mTOR.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar mutações somáticas que estão correlacionadas com a via mTOR;
- Associar a caracterização molecular de acordo com a clínica de pacientes com HME.
- Identificar nesses pacientes algum tipo de mutação somática em todas as vias de sinalização;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido com a colaboração da Universidade de São Paulo, através do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/SP e o Centro de Medicina Genômica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, Universidade da Califórnia de San Diego e a Universidade da Califórnia de Los Angeles.

Os pacientes selecionados são provenientes do Centro de Cirurgia de epilepsia - CIREP do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Todos os experimentos foram realizados na Universidade da Califórnia de San Diego, sob a orientação do Professor Dr. Joseph Gleeson, durante um período de 8 meses de estágio no exterior, com bolsa modalidade sanduíche (Capes). As análises dos resultados foram realizadas no núcleo de bioinformática do Centro de Medicina Genômica do Hospital das Clínicas (Figura 4).

Figura 4 - Fluxograma das etapas experimentais realizadas no projeto de pesquisa.

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Esse projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP/USP. Devido o compartilhamento de amostras para envio ao exterior, o presente projeto foi analisado e aprovado pelo Conselho Nacional de Ensino e Pesquisa (CONEP nº 6978/2015).

Em relação ao acesso aos arquivos médicos e informações dos prontuários, foi assegurada a privacidade, a proteção da imagem e a não estigmatização dos participantes da pesquisa, garantindo assim a não utilização das informações em prejuízo das pessoas, inclusive em termos de autoestima, de prestígio e/ou de aspectos econômico-financeiros e garantia de manutenção do sigilo e da privacidade dos participantes da pesquisa durante todas as fases da pesquisa; conforme Resolução CNS nº 466 de 2012, itens III.2.i e IV.3.e. Todos os casos possuem o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) assinado pelos pacientes.

4.2 CASUÍSTICA

Foram selecionados 10 pacientes diagnosticados com HME na faixa etária de 0 a 18 anos de idade, acompanhados no Centro de Cirurgia de epilepsia - CIREP do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Os indivíduos afetados foram submetidos a uma extensa avaliação pré-cirúrgica, incluindo ressonância magnética estrutural e vídeo-EEG, para localizar a zona epileptogênica e possíveis outros exames. A convergência de dados clínicos, eletroencefalográficos e de imagem sugeriram uma zona epileptogênica focal, regional ou hemisférica e neste caso um procedimento cirúrgico foi proposto.

4.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

O protocolo cirúrgico consistiu em uma biópsia do tecido lesado, fracionado em duas partes, uma para o encaminhamento de testes histopatológicos de rotina e a outra fração congelada em nitrogênio líquido. A amostra de sangue foi coletada no momento da cirurgia, não houve necessidade do puncionamento de uma veia exclusiva para este propósito, e assim foi utilizada a mesma veia puncionada para os exames de rotina,

foram coletados 3 ml de sangue em tubo contendo EDTA, mantido a 4°C até o momento de seu processamento.

4.4 ANÁLISE PATOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA

As porções cerebrais foram cortadas em secções de 5 µm de espessura e montadas em lâminas histológicas, coradas com hematoxilina-eosina (H & E), com intuito de avaliar padrões gerais de arquitetura celular, distribuição de estruturas e densidade celular.

Ensaio de proteína glial fibrilar ácida (GFAP) foram realizados para avaliar a distribuição e aspectos morfológicos dos astrócitos, bem como NeuN para analisar o arranjo de neurônios em colunas e camadas. O polímero Spring - Biocience foi aplicado nas lâminas e foram incubadas durante a noite a 4 ° C, com o respectivo anticorpo anti-GFAP primário 1: 2000 (anti-GFAP (DAKO 6F2, Dinamarca) e anticorpo anti-NeuN 1: 750 anti-NeuN (CHEMICON A60). Estes foram revelados com 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma). Finalmente, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina, lavadas em água corrente e desidratadas por soluções crescentes de etanol crescentes e xilol, fixadas em Permount™. A documentação fotográfica foi feita com um microscópio de luz AxiosKop2 plus (Carl Zeiss) e uma câmera digital AxioCamHrc (Carl Zeiss), conectada a um computador equipado com o software Axio Vision 3.1 (Carl Zeiss).

4.5 ANÁLISES GENÔMICA

4.5.1 EXTRAÇÃO DE DNA - SANGUE

O DNA genômico foi extraído da amostra de sangue através do procedimento automatizado por *beads* magnéticas utilizando o kit DNA purification AS1010 (Promega) no equipamento Maxwell® (Promega). Primeiramente, o tubo contendo a amostra de sangue foi centrifugado a 2000 g por 20 min à 4°C para a obtenção do *buffycoat*. Em seguida, o *buffycoat* foi transferido para o cartucho contendo todos os reagentes necessários para a lise celular e obtenção do material genético, este foi transferido para um eppendorf 1.5ml e mantido em freezer -30° C.

4.5.2 EXTRAÇÃO DE DNA – TECIDO

O DNA genômico foi extraído das amostras de tecido cerebral através do kit Puregene Core Kit A (Qiagen). As amostras foram maceradas utilizando um homogeneizador, em seguida foram adicionados 300 µl do reagente para lise celular, mantidos em banho maria 65°C por 1 hora, e adicionados 1,5 RNase e mantidos novamente por 1 hora em banho maria 37° C. Após foram incubados em gelo por 3 minutos e adicionados 100µl solução de precipitação de proteína, as amostras foram centrifugadas por 3 min a 16.000g. Mediante visualização do pellet, esse foi retirado do sobrenadante e adicionado 300 µl de isopropanol e mantido em freezer -30° C.

4.5.3 ANÁLISE DA INTEGRIDADE DO DNA

O DNA extraído das amostras teve a pureza e a concentração verificados por meio do *Nanodrop® 8000* (Thermo Fisher Scientific, EUA) e *Qubit® 2.0 Fluoremeter* (Invitrogen, EUA), respectivamente. Para verificar a pureza, foram utilizados 6 µL de cada amostra (em triplicatas, sendo 2 µL para cada análise). Amostras consideradas aptas à continuidade do experimento apresentaram valores da razão A260/280 entre 1,8 e 2. Para verificação da concentração das amostras foi utilizado o fluorímetro *Qubit®2.0* e o kit *Qubit® Assay Kit dsDNA Broad Range Assay* (Invitrogen, EUA).

4.5.4 SEQUENCIAMENTO DO EXOMA

As bibliotecas de exoma foram preparadas com o kit *Nextera Exome Rapid Capture* (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). O DNA genômico foi corretamente quantificado por método fluorimétrico (Qubit) e 50ng de DNA de cada amostra foi utilizado na preparação das bibliotecas, seguindo as instruções do fabricante. Em seguida realizado a etapa de captura e enriquecimento do exoma com um conjunto de sondas altamente otimizadas para obtenção de cobertura igual ou maior que 50x abrangendo todo exoma. Sondas de 95pb foram usadas na captura de 62Mb de regiões codificadoras de 20.794 genes. A primeira etapa consistiu na mistura do DNA devidamente quantificado com as sondas de captura. Em seguida, foram usadas esferas de estreptavidina para capturar as regiões alvos e aplicação de três lavagens para remoção de ligações não-específicas, deixando o material pronto para a segunda

hibridação. O passo seguinte visou na amplificação por PCR da biblioteca. Nessa fase, foi crítica a quantificação da biblioteca e para isso foi realizado, além da quantificação fluorimétrica, uma quantificação absoluta por PCR em tempo real, utilizando-se o kit comercial KAPA SYBR FAST (KAPA Biosystems) (Figura 5). Após a quantificação precisa, as bibliotecas foram diluídas de 8 a 10pM de cada uma, usados para desnaturação e posterior *clusterização*, que consiste de 3 etapas: 1) amplificação dos clusters, 2) linearização, bloqueio e 3) hibridação dos primers. A primeira etapa é realizada em uma estação de clusterização, no caso o dispositivo fluídico chamado cBot. Portanto, as bibliotecas foram clusterizadas em uma *flow cell*, que é o suporte sólido da reação, com os reagentes *TruSeq PE Cluster Generation Kit v5* (Illumina Inc. San Diego, CA, USA). Durante a geração dos clusters, cada fragmento de cDNA das bibliotecas foi incorporado à superfície da *flow cell*, que coberta com oligonucleotídeos complementares aos adaptadores, usados para amplificar o cDNA de forma isotérmica, dando origem aos clusters, ou seja, grupos ou colônias de fragmentos ligados a *flow cell*. A linearização foi uma reação feita para retirar os adaptadores para assegurar que a hibridação e o sequenciamento ocorreram somente em uma das fitas de cada cluster. A etapa de bloqueio referiu-se a neutralização das hidroxilas presentes nas extremidades 3' dos clusters linearizados, para evitar a adição de substratos de fluoróforos ou qualquer outro segmento que não seja o *primer* de sequenciamento. Uma desnaturação garantiu a formação de templates de fita simples, que foram hibridados aos primers de sequenciamento. Nesse ponto, a biblioteca esteve pronta para o sequenciamento, que foi realizado com o kit *TruSeq SBS kit v5* (Illumina Inc.), na configuração *paired-end* 2x75bp (de cada extremidade dos transcritos foram sequenciados 75 nucleotídeos) em equipamento *Illumina Genome Analyzer IIx* (GAIIx), baseado na tecnologia Solexa ou SBS (“Sequencing-by-Synthesis”), que permitiu a leitura massiva e paralela (simultânea) da sequência de nucleotídeos de milhões de fragmentos de DNA capturadas das regiões codificadoras. A tecnologia SBS foi embasada na terminação da síntese da cadeia de DNA após a detecção do sinal fluorescente. Por terminação entendeu-se a clivagem do nucleotídeo marcado, já detectado que possibilitou a adição do próximo nucleotídeo. Os eventos de incorporação e clivagem do nucleotídeo marcado e modificado ocorreram sucessivas vezes, dentro da *flow cell*, permitindo, desta forma, a leitura base a base e ao mesmo tempo eliminando possíveis erros em sequências com repetições da mesma base (regiões homopoliméricas) (Figura 5).

Figura 5 - Representação gráfica do preparo e enriquecimento da biblioteca genômica utilizando o *kit Nextera Exome Rapid Capture* (Illumina, EUA) (Modificado de ILLUMINA 2015).

4.6 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

As análises de exomas sequenciados na plataforma Illumina foram realizadas no núcleo de bioinformática do Centro de Medicina Genômica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

4.6.1 WES MAPEAMENTO E FILTRAGEM/LEITURA AMPLICON

O sequenciamento e amplificação das amostras pareadas de cérebro e sangue foram realizados com hexâmeros aleatórios como identificadores moleculares únicos (UMIs), para marcar fragmentos de DNA individuais e remover duplicatas de PCR. As UMIs foram primeiramente removidas das leituras de sequenciamento de amplificação e anexadas ao nome de leitura usando o extrato de `umi_tools` (SMITH *et al.*, 2017). Estas leituras foram então alinhadas com a versão hg19 do genoma de referência humana com sequências de chamariz usando `bwa-mem` com parâmetros padrão. Para remover as duplicatas de PCR, as leituras foram agrupadas com base em seu local mapeado e na IHM e filtradas para produzirem apenas um par de leituras por grupo usando a dedução de `umi_tools`. Finalmente, os indels realinhados usando o `IndelRealigner` (v3.5) do GATK (DEPRISTO *et al.*, 2011).

4.6.2 IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES

As variantes para as chamadas das SNVs e indels germline foram realizadas de acordo com as melhores práticas do GATK's. As variantes foram primeiramente chamadas em cada amostra usando `HaplotypeCaller` e, em seguida, a genotipagem conjunta foi realizada em todas as amostras usando `Combine GVCFs` e `Genotype GVCFs`. As variantes foram anotadas com consequências funcionais (por exemplo, sinônimo, não-codificação, etc) e frequências alélicas do Exome Aggregation Consortium (ExAC) (LEK *et al.*, 2016) usando o `Variant Effect Predictor` (MCLAREN *et al.*, 2016)

4.6.3 IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES SOMÁTICAS ESPECÍFICAS DO CÉREBRO

Para identificar variantes somáticas específicas do cérebro, primeiro compilou-se uma lista de variantes em genes da via mTOR, que foram previamente associados a casos de displasia cortical focal e HME. Em seguida, tabulou-se o número de pares de leituras que contêm os alelos de referência e alternados em cada uma dessas variantes. A amostra de cérebro apresentou pelo menos dois pares lidos com o alelo alterado em

variantes conhecidas, então foi considerado uma variante somática específica do cérebro.

Foram tabuladas como novas variantes somáticas específicas do cérebro usando dois tipos de chamadas variantes somáticas com parâmetros padrão: strelka (v2.7.0) e muTect (v3.1) (SAUNDERS *et al.*, 2012) Para cada indivíduo, considerou-se a amostra do cérebro como a “displasia” e a amostra de sangue “normal”. São geradas chamadas somáticas específicas para o cérebro de alta qualidade, tomando a interseção de variantes identificadas tanto pelo strelka quanto pelo muTect. Foram anotadas estas chamadas com consequências variantes (por exemplo, sinônimos, não-codificação, etc) e frequências alélicas do Exome Aggregation Consortium (ExAC) (LEK *et al.*, 2016) usando o Variant Effect Predictor (MCLAREN *et al.*, 2016). Foram inseridos filtros para incluir apenas aquelas que resultaram em uma mudança na proteína (ou seja, missense, stop gain, splice site) e que tiveram uma frequência do alelo ExAC <1%.

Por fim as variantes identificadas foram anotadas e uma tabela separada por tabulação (para ser aberta no excel), e gerada com o software snpEff e scripts. Uma vez anotadas, as variantes foram classificadas em relação a sua patogenicidade, por meio de busca em banco de dados e predição de patogenicidade em sites específicos (UMD predictor – <http://umd-predictor.eu/> e CADD – <http://cadd.gs.washington.edu/>). Os testes estatísticos e gráficos foram feitos no R utilizando o package R Commander (FOX, 2005) e no GraphPad Prism 6, com um nível de significância estabelecida em $p < 0,05$. Para análise da interação das proteínas PPI, foi usado o *Network String*, a análise de redes e atuação de cada proteína é definida pelas cores de cada círculo e espessura das linhas que interligam as variantes expressas (Figura 6).

Figura 6 - Fluxograma da metodologia aplicada para a análise de bioinformática.

4.7 ddPCR SCREENING e VALIDAÇÕES

Para as validações das mutações selecionadas, foram comparadas as amostras de DNA extraídas do sangue periférico e tecido encefálico usando o equipamento QX200 Dropet Digital, que permitiu a quantificação absoluta de número de células em mutação. O fluxo de trabalho ddPCR começa como qualquer outro ensaio de PCR (Figura 7).

A reação ddPCR foi composta de 10 μ l de ddPCR Master Mix (Bio-Rad), 12,5 pmol para cada primer, 6,25 pmol de cada probe, e 5 μ l de DNA. As amostras foram preparadas em duplicatas com 10% de volume adicional e as gotas geradas (gerador de gotícula QX200, Bio-Rad, Munique, Alemanha). A PCR foi realizada como se segue: desnaturação inicial a 95 ° C durante 10 min, a amplificação em ciclos de 40 a 95 ° C durante 30 s e 60 ° C durante 1 min, e desativação da enzima a 98 ° C durante 10 min. Para todas as medidas, foi utilizado um tempo de subida de 2 ° C/s. Em seguida, as gotas foram analisados no leitor QX200 gota (Bio-Rad). Os dados foram analisados com o software Quantasoft 1,7 (Bio-Rad), (Figura 7).

Figura 7 - Visão geral do fluxo do método de ddPCR de gotículas digitais. A mistura de PCR é fracionada em milhares de gotículas do tamanho de nanolitros usando tecnologia especializada de óleo e microfluídica. As gotículas são submetidas a ciclos térmicos em uma máquina de PCR padrão. Uma reação de PCR ocorre apenas nas gotículas que transportam o DNA alvo. Os produtos de PCR são detectados por um ensaio TaqMan. Resumidamente, a sonda TaqMan hibridiza para um local interno do produto de PCR. A sonda tem um fluoróforo 5' cuja fluorescência é extinta por um fluoróforo de 3'. Uma vez que a DNA polimerase atinja a sonda durante a etapa de extensão, a sonda é clivada pela atividade de exonuclease de 5' a 3' da polimerase. Essa ação libera o fluoróforo do inibidor de modo que a fluorescência possa ser detectada quando excitada pelo comprimento de onda apropriado da luz. As gotículas são lidas uma a uma usando um leitor de gotas para fluorescência em cada um dos dois canais (FAM em azul e VIC em verde). Os dados são exibidos em um gráfico 2-D de gotículas positivas nos canais FAM e VIC, duplo positivo (aquela) e duplo negativo (cinza).

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES SELECIONADOS

Os pacientes analisados, tinham idade entre 4 meses a 14 anos na época da cirurgia, sendo, 6 do sexo masculino e 4 do sexo feminino. Foram categorizados com epilepsia de difícil controle e por isso foram encaminhados para a abordagem cirúrgica.

A idade de início da epilepsia variou entre 1º dia de vida até 9 meses de idade, a frequência de crises pré-operatórias na maioria dos casos foi de 1 a 6 vezes / dia parcial e generalizada. Somente um caso apresentava crises mais severas com frequência maior, podendo apresentar 20 crises diárias. Dos 10 casos estudados 8 pacientes apresentavam sinais de atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (Tabela1).

O Engel pós-operatório I foi atingindo em todos os pacientes no tempo de seguimento de um a seis meses. Após um ano de pós-operatório, oito pacientes mantiveram o score de I e apenas dois pacientes foram categorizados com score de II (Tabela 1).

5.1.2 ANÁLISE DAS IMAGENS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

Nos pacientes selecionados para este estudo, foram avaliadas imagens de ressonância magnética de todo o hemisfério e estruturas adjacentes ao hemisfério envolvido, incluindo os nervos cranianos, espaços subdurais e subaracnóides, vasos cerebrais, tronco encefálico e cerebelo. Esses achados foram revisados para os lados ipsilateral e contralateral. A assimetria foi um dos aspectos-chave para análise. O protocolo de ressonância magnética incluiu a cobertura total do cérebro com sequências sem intervalo de alta resolução 2D axial ponderada T2 spin-echo, axial e coronal T2 FLAIR (Figura 7).

Os resultados da análise por RM demonstraram que 5 pacientes tinham alterações no hemisfério direito do cérebro e o hemisfério cerebral esquerdo nos demais, 8 pacientes foram categorizados como HME hemisférica, quando todo o hemisfério é afetado e 2 subhemisférica é quando menos do que todo o hemisfério é afetado (ex: quadrante posterior do hemisfério, mais comum, ou o quadrante anterior do hemisfério).

Na maioria dos casos observou-se um hemisfério cerebral com aumento de seu volume, com efeito de massa que geralmente comprime o corpo do ventrículo lateral e

acarreta desvio de linha média em sentido contralateral. Os giros espessos, sulcos pouco definidos e a margem cortical interna indistinta (Tabela 1) (Figura 8).

Tabela 1: Principais alterações observadas em imagens de ressonância magnética

ID	Classificação	Pré-operatório	Pós-operatório
HME-4143	Hemisférica	Corte axial e coronal de RNM em FLAIR evidenciando aumento de volume do hemisfério cerebral e cerebelar esquerdos, com dilatação do ventrículo lateral e área de hipsinal periventricular.	Corte axial de RNM em FLAIR com sinais pós-operatórios de exérese do opérculo fronto-parietal, dilatação ventricular e desconexão do hemisfério cerebral esquerdo
HME-4144	Subhemisférica	Corte axial e coronal de RNM em FLAIR evidenciando aumento do volume do hemisfério cerebral direito e alteração difusa de sinal do parênquima cerebral no hemisfério cerebral direito, predominantemente em região temporo-parieto-occipital.	Corte axial de RNM em FLAIR com sinais pós-operatórios de desconexão posterior temporo-parieto-occipital a direita.
HME-4145	Hemisférica	Corte axial e coronal de RNM em FLAIR evidenciando alteração de sinal e da morfologia dos giros em todo hemisfério esquerdo.	Corte axial de RNM em FLAIR com sinais pós-operatórios de exérese do opérculo fronto-parietal, dilatação ventricular e desconexão do hemisfério cerebral esquerdo.
HME-4146	Hemisférica	Corte axial em T2 e coronal em FLAIR de RNM evidenciando alteração de sinal e da morfologia dos giros em todo hemisfério esquerdo	Corte axial de RNM em FLAIR com sinais pós-operatórios de exérese do opérculo fronto-parietalesquerdo, amígdalo-hipocampectomia desconexão hemisférica a esquerda.
HME-4147	Hemisférica	Corte axial e coronal de RNM em FLAIR evidenciando giros com morfologia alterada em região frontal mesial direita e do cíngulo, com discreto espessamento cortical..	Corte axial de RNM em FLAIR com sinais pós-operatórios de exérese do opérculo frontal e desconexão anterior do lobo frontal a direita.

HME-4148	Hemisférica	Corte axial e coronal de RNM em FLAIR evidenciando aumento de volume do hemisfério cerebral direito, alteração da morfologia habitual, com espessamento cortical, predominantemente em região fronto-parieto-insular, e dilatação do ventrículo lateral direito.	Corte axial de RNM em FLAIR com sinais pós-operatórios de exérese do opérculo frontoparietal e grande parte do lobo frontal direito complementada com desconexão hemisférica a direita
HME-4149	Hemisférica	Corte axial e coronal de RNM em FLAIR evidenciando aumento de volume do hemisfério cerebral a direita, espessamento cortical, dilatação do ventrículo lateral e área de hipersinal periventricular.	Corte axial de RNM em T2 com sinais pós-operatórios de exérese do opérculo fronto-parietal e grande parte do lobo frontal direito complementada com desconexão hemisférica a direita
HME-6577	Subhemisférica	Corte axial e coronal de RNM em FLAIR evidenciando alteração morfológica em sulcos e giros do hemisfério cerebral direito, marcadamente em região temporo-occipito-parietal, associado a alteração de sinal peri-ventricular dilatação do átrio ventricular a direita	Corte axial de RNM em FLAIR com sinais pós-operatórios de desconexão temporo-parieto-occipital a direita
HME-6584	Hemisférica	Corte axial e coronal de RNM em FLAIR evidenciando aumento do volume do hemisfério cerebral direito, dilatação do ventrículo lateral.	Corte axial de RNM em FLAIR com sinais pós-operatórios de desconexão temporo-parieto-occipital a esquerda, associada a encéfalomalacea temporo-temporo-occipital sequelar pós-AVC isquêmico.
HME-6593	Hemisférica	Corte axial e coronal de RNM em FLAIR evidenciando aumento de volume do hemisfério cerebral esquerdo, espessamento cortical, dilatação do ventrículo lateral e área de hipersinal periventricular	Corte axial de RNM em FLAIR com sinais pós-operatórios de exérese do opérculo fronto-parietal, polo frontal e desconexão do hemisfério esquerdo

Figura 8 - Ressonância magnética cerebral ponderadas em FLAIR, demonstrando as principais alterações morfológicas de indivíduos diagnosticados com hemimegalencefalia. As principais alterações encontradas estão descritas na tabela 1.

5.1.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA

As principais características encontradas na análise histológica incluíram dislaminação cortical, grandes neurônios atípicos, células balão, heterotopia neuronal e astrocitose com calcificação distrófica. Os neurônios heterotópicos na substância branca estavam presentes em um padrão radial sugestivo de migração neuronal aberrante. Vários neurônios grandes foram distróficos com anormalidades do citoesqueleto, como neurofilamentos fosforilados. A maioria das células balão eram de origem astrocitária, sendo positiva para proteína ácida fibrilar glial e negativa para os marcadores neuronais (Figura 9).

As células balão apresentavam um grande corpo celular e citoplasma eosinofílico vítreo opalescente, com a coloração em hematoxilina e eosina (H & E), em alguns casos, houve a presença da substância de Nissel e núcleos múltiplos. Os dados da análise histológica foram apresentados individualmente na tabela 2.

Figura 9 - Fotomicrografias dos encéfalos dos pacientes diagnosticados com HME, representando as principais alterações. (A) HME-4143, setas indicam a presença de células balão, (B) HME-4143, neurônios citomegálicos e dismórficos, com acúmulo de substância de Nissel na periferia. Coloração: hematoxilina e eosina. (C) HME 4145 imunomarcacão para NeuN, presença de neurônios heterotópicos na transição da substância branca para neocórtex, (D) HME 4143 imunomarcacão para GFAP evidenciando astrogliose. (E) HME-6584 imunomarcacão para NeuN, setas indicam neurofilamentos acumulando no corpo dos neurônios displásicos, (F) HME-6584, imunomarcacão para NeuN, observa-se desorganização das camadas corticais IV, V, VI, com perda neuronal. (A, B, C, D, E) Objetiva de 40X. Barra: 100µm, (F) Objetiva de 100X. Barra: 20µm.

Tabela 2 - Principais informações clínicas coletadas a partir da revisão de prontuários médicos

ID	HME-6577	HME-4143	HME-4146	HME-4147	HME-4144	HME-4148	HME-6593	HME- 4145	HME-4149	HME-6584
Sexo	M	M	F	F	F	F	M	M	M	M
Data de nascimento	13/11/2011	13/05/2007	26/01/2012	01/02/2013	05/09/2012	07/06/2014	05/04/2012	23/10/2001	16/09/2002	04/11/2002
Início da Epilepsia	1d	3m	9m	3m	1m	1d	3m	3m	3m	8m
Frequência de crises mensais/Pré-operatório	600	3	80	120	150	150	3	120	120	150
ADNPM	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Hemiparesia	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
Desvio ocular nistagmo	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim
Macrocefalia	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Número de Medicamentos	8	5	5	3	4	4	5	3	4	7
Tipo de crise	Parciais	Parciais com generalização secundária	Parciais	Parciais	Parciais	Parciais	Parciais	Parciais com generalização secundária	Generalizadas	Parciais com generalização secundária
Idade na cirurgia	1	5	2	1	2	0	4	6	6	13
Tempo de Internação na UTI	1	2	5	2	2	6	3	1	2	28
Tratamento reoperação	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1
Tipo de cirurgia	Desconexão TPO direita	Hemisferectomia Esquerda	Hemisferectomia Esquerda	Lobectomia Frontal Direita	Quadrantectomia Posterior Direita	Hemisferectomia Direita	Lobectomia Frontal Esquerda	Hemisferectomia Esquerda	Hemisferectomia Direita	Hemisferectomia Esquerda
Perda sanguínea cirúrgica	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não

Comprometimento neuropsicomotor	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Diagnóstico. Histopatológico	DN,GA	PMG, GA, NH, BC	CG,CN,BC,GA	CG,NH,DN	CD,GA,CN,DN, BC	CD, GA, CG	DN,BC,CG	CN, CD, NH,GA	CD,BC	DN, BC, CD, PMG
Engel 1mês	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I- B
Engel 6meses	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I- B
Engel 1ano	II	I	I	I	II	I	I	I	I	I- B
História Gestacional e Perinatal	*	*	*	Oligodramnio 7 meses de gestação	*	*	*	*	Mãe com hipertensão gestacional. Exame de ultrassom evidenciando ventrigulomegalia	*
História Familiar	Tio materno tem esquizofrenia. Mãe tem tricotilomania com TAG	Tio do pai e avó materna tem epilepsia, ambos início tardio	*	Pai apresenta desmaios. Prima diagnosticada com malformação do desenvolvimento cortical, ambos sem diagnóstico com epilepsia.	Mãe portadora de esclerose tuberosa com epilepsia. Avô materno com marcha hipocromica com epilepsia.	*	Primos paternos com epilepsia	*	Meia irmã paterna e tia paterna com epilepsia	*

Legenda: CG gliose de chaslin's, BC células em balão, CD desmielinização cortical, CN neurônios citomegálicos, DN neurônios dismórficos, NH heterotopia, PMG polimicrogiria, GA astrogliose, - não se aplica, *sem intercorrências.

5.2. QUALIDADE DO SEQUENCIAMENTO

Aplicações do sequenciamento do exoma para identificar variantes patogênicas no âmbito da medicina genômica têm sido desenvolvidas recentemente, sendo assim para investigar o papel da via mTOR em pacientes com HME, adotou-se essa metodologia nas amostras de tecido pareados com o sangue nos 10 pacientes selecionados. No sequenciamento do exoma, foram gerados um total de 365 milhões de *reads*. Destes, 87 % passaram os filtros iniciais pré-estabelecidos pela Illumina. A maioria das *reads* apresentou uma boa qualidade ($Q > 28$). A qualidade da cobertura do sequenciamento foi de 305,00. Após a aplicação dos filtros, foi novamente analisada a qualidade do sequenciamento no software Fastqc, a média de cobertura após os filtros foram de 347,02 (Figura 10).

Os dados de números de total de sequencia analisadas, sequencias que saíram da análise por não terem um padrão de qualidade, média da qualidade do mapeamento e reads duplicadas por amostras encontram-se na tabela 3.

Figura 10 - O Gráfico mostra o valor de qualidade Phred (eixo Y) em cada posição de um *read* de 55bp (eixo X). As linhas em verdes representam as reads que passaram nos filtros de qualidade para cada posição, já as linhas amarelas e vermelhas representam reads que foram excluídas da análise pois não apresentava parâmetros de qualidade aceitável.

Tabela 3 - Estatísticas do Sequenciamento do Exoma.

ID	% Reads Duplicadas	% Média da qualidade do mapeamento	Comprimento médio da sequência	% Sequência que falhou nos filtros de qualidade	Total de sequências
HME-4143_BI_1	34.9%	47%	76 bp	8%	232.5
HME-4143_Br_2	37.3%	47%	76 bp	8%	260.2
HME-4144_Br_1	36.4%	46%	76 bp	8%	242.9
HME-4144_Br_2	32.0%	48%	76 bp	8%	702.4
HME-4145_Br_1	38.4%	47%	76 bp	8%	339.0
HME-4145_Br_2	36.1%	47%	76 bp	8%	214.4
HME-4146-Br_1	30.0%	51%	124 bp	17%	94.3
HME-4146-Br_2	31.6%	51%	123 bp	17%	104.0
HME-4147-BL_1	35.2%	47%	147 bp	8%	0.1
HME-4147-BR_2	12.7%	46%	133 bp	8%	0.3
HME-4149-BR_1	38.5%	47%	147 bp	17%	0.2
HME-4149_BI_2	34.2%	47%	76 bp	8%	206.7
HME-4148_Br_1	36.7%	49%	76 bp	8%	177.7
HME-4148_Br_2	35.8%	47%	76 bp	8%	227.5
HME-6577-BI_1	15.8%	46%	136 bp	8%	0.2
HME-6577-Br_2	32.6%	47%	146 bp	17%	0.1
HME-6584-BI_1	31.6%	47%	145 bp	17%	0.2
HME-6584-Br_2	14.8%	46%	137 bp	17%	0.2
HME-6593-BI_1	37.8%	47%	147 bp	17%	0.1
HME-6593-Br_2	31.8%	47%	145 bp	17%	0.2

*BL: Sangue/*BR: Cérebro

5.2.2 TIPOS DE MUTAÇÕES E POTENCIAL DE PATOGENICIDADE

Quanto ao tipo de mutação, na casuística selecionada para este estudo, mutações do tipo missense foram as mais frequentes dentre as variantes com alta predição de patogenicidade, segundo ferramenta CADD para os genes mais mutados. Utilizando a ferramenta UMD, dentre as variantes com alta predição de patogenicidade, as mutações do tipo splice e, novamente, missense foram as mais frequentes. A importância do tipo da mutação apresentada pela variante reside no fato de que, a depender do tipo da mutação e do local dentro do gene em que ela ocorre, terá um maior potencial em alterar a função da proteína e, dessa forma, ser patogênica. Mutações que ocorrem em regiões do DNA não fundamentais para a estrutura e função da proteína, como intergênicas ou as introns, bem como aquelas que, mesmo que ocorram em regiões essenciais mas que não comprometam a estrutura e função da proteína sintetizada, como sinônimas, por exemplo, terão baixo potencial patogênico e são habitualmente excluídas da análise num momento inicial após gerados os dados brutos das variantes de cada amostra (Figura 11).

Mutações do tipo missense, sendo elas as mais frequentes na casuística apresentada, caracteriza-se pela troca de uma ou mais bases, resultando em uma sequência diferente de aminoácidos, porém com o comprimento preservado. Através dessa troca de aminoácidos altera a estrutura e pode alterar a função da proteína sintetizada tendo, portanto, potencial patogênico (ENSEMBL.ORG).

Figura 11 - Diagrama mostrando a localização de cada termo de exibição em relação à estrutura da transcrição. *Adaptado da plataforma ENSEMBL.ORG.

5.2.3 ANÁLISE DAS VARIANTES ENCONTRADAS

Na análise dos casos selecionados foram encontradas 373.376 variantes. Em relação a região que abrigava estas mutações, 8.903 estavam em regiões de éxons não codificantes, enquanto 129.700 mutações foram identificadas em regiões codificantes, dentre elas, mutações missense, frameshift, de ganho de códon de parada, regiões de interações entre proteínas e, inserções e deleções, nas regiões intrônicas identificadas 262.189 mutações foram em regiões de íntrons, enquanto que 8.987 mutações estavam afetando regiões de sítios de splicing, como regiões 5' e 3' UTR (Figura 12).

Figura 12 - Total de mutações identificadas em diferentes regiões e efeitos.

Para uma amostra, usualmente são extraídas aproximadamente 40.000 variantes das regiões do genoma, após processamento das sequências alinhadas, é de grande importante classificá-las como falso-positivos. Desta forma, torna-se necessária a filtragem daquelas variantes possivelmente associadas ao fenótipo de interesse e aquelas que podem resultar em associações equivocadas. Assim, fica evidente a necessidade de

formas eficientes de anotação destas variantes (EVRONT *et al.*, 2012). Foram excluídas as mutações que estavam em regiões não codificantes, regiões intrônicas e regiões splicing, em seguida as variantes foram classificadas em relação a sua patogenicidade, aquelas que não foram classificadas, foram excluídas da análise.

Do resultado das filtragens, as variantes restantes foram analisadas individualmente, foram identificadas 195 variantes em regiões codificantes, sendo elas, 4 inframe deletion, 2 splice acceptor, 5 stop gain, 29 frameshift, 154 missense variant (Figura 13).

Figura 13 - Mutações identificadas em diferentes regiões após aplicação dos filtros para seleção das regiões de interesse.

Após a análise geral de todas as variantes foi construído um gráfico em ambiente R, utilizando o pacote Complex Heatmap, as colunas representam os pacientes e os genes expressos em cada um deles, as cores são relacionadas à região que a variante foi encontrada, já a patogenicidade é representada por diferentes cores em formato de uma linha, titulado como EpiPrint este gráfico que tem como objetivo ilustrar os genes mais mutados em diferentes regiões e efeitos de patogenicidade. A importância do tipo da mutação apresentada pela variante reside no fato de que, a depender do efeito da mutação e do local dentro do gene em que ela ocorre, terá um maior potencial em alterar a função da proteína e, dessa forma, ser patogênica. É possível observar na figura 14^a, que após a aplicação dos filtros para analisar os genes das regiões de interesse, os 95 genes mais mutados foram mais expressos nos pacientes HME 4145 e HME 4146, estes

apresentavam mais variantes em relação aos demais, as mutações com efeito missense foram mais frequente na casuística apresentada, esse tipo de mutação caracteriza-se pela troca de uma ou mais bases, resultando em uma sequência diferente de aminoácidos porém com o comprimento preservado. Através dessa troca de aminoácidos altera a estrutura e pode alterar a função da proteína sintetizada tendo, portanto, potencial patogênico.

Porém ao observar os outros casos há uma notável ausência de variantes, como pode-se observar na figura 14B, foi gerado um gráfico com todas as mutações presentes nos 8 casos, sem aplicação de filtros de patogenicidade. Os casos apresentam mais mutações que ocorrem em regiões do DNA não fundamentais para a estrutura e função da proteína, como intergenic variant, intron variant, downstream variant, upstream variant etc, bem como aquelas que, mesmo que ocorram em regiões essenciais mas que não comprometam a estrutura e função da proteína sintetizada, como synonymous variant, por exemplo, terão baixo potencial patogênico e são habitualmente excluídas da análise num momento inicial após gerados os dados brutos das variantes de cada amostra (Figura 14).

Figura 14 - Gráfico EpiPrint demonstrando a prevalência de mutações dentre todas as amostras. (A) Mutações em todos os casos diagnosticados com HME, após a aplicação dos filtros de seleção de regiões de interesse e patogenicidade. (B) Mutações em 8 casos com HME em diferentes regiões e efeitos sem aplicação de filtros dos filtros.

Após a aplicação dos filtros para seleção da região de estudo, foram selecionadas as variantes em relação a alta predição de patogenicidade, para isto foi utilizado a ferramenta CADD (Combined Annotation Dependent Depletion - <http://cadd.gs.washington.edu>) com limiar de 10,0. Aquelas que obtiveram um score maior de 10.0 foram mantidas para análise como potenciais patogênicos tendo em vista o tipo de mutação que as mesmas carregavam.

Em adição, 7 mutações foram preditas como patogênicas, 21 mutações provavelmente patogênicas, estas previamente descritas pelo ClinVar e outras ferramentas de predição de patogenicidade. Já 2 mutações sem anotação ou informação sobre eles nas bases de dados foram classificadas como VUS. A maioria dessas mutações VUS podem ser consideradas uma nova mutação por todas as ferramentas de predição utilizadas (Figura 15).

Figura 15 - Mutações identificadas em diferentes regiões após aplicação dos filtros para seleção das regiões de interesse e pela patogenicidade através da ferramenta CADD.

5.2.4 ANÁLISE DAS VARIANTES DE INTERESSE

Os algoritmos Streak e MuTect foram usados para analisar conjuntamente os conjuntos de dados WES emparelhados entre o sangue e o cérebro e identificar quaisquer variantes *de novo* nas amostras de cerebrais (não na linha germinativa). Embora ambas as ferramentas sejam úteis para detectar mutações somáticas com baixas frequências alélicas em amostras geneticamente heterogêneas, esses algoritmos são

baseados em diferentes modelos de probabilidade derivados de abordagens independentes, como citado nos materiais e método.

Na análise das variantes que estão correlacionadas com a via mTOR, foram encontradas mutações no tecido cerebral em 4 pacientes, essas mutações não foram encontradas no sangue, e assim, caracterizadas como mutações somáticas (Anexo 2).

Em dois pacientes com HME, identificamos mutações missense na *MTOR*, HME 6584 (c.7255G> A, p.Glu2419Lys), está foi validada somente pela checagem dos dados brutos através da plataforma IGV, HME 4146 (c.7498A> T, p.Leu7105Phe) com taxa de 6% através da análise pelo ddPCR (Anexo 2), ambos apresentavam uma alteração da morfologia marcante em todo hemisfério, crises epiléticas com alta frequência pré cirúrgica e atraso neuropsicomotor (Tabela 2) (Figura 8). Outros dois pacientes apresentaram mutações missense do gene *PIK3CA*, HME 4149 p.Glu542Lys (c.1624G> A) com taxa de 11% através da análise pelo ddPCR, HME 4143 (c.1258T> C, p.Cys420Arg) com taxa de 22% através da análise pelo ddPCR (Anexo 2), os dois pacientes apresentavam aumento de volume do hemisfério cerebral, espessamento cortical marcante com dilatação do ventrículo lateral e área de hipersinal periventricular e um atraso neuropsicomotor importante . A hipótese mediante esses resultados é que a mutação somática de genes que estão presentes na via mTOR mesmo sendo de baixa prevalência podem ser uma das causas genéticas da HME.

Em um paciente (HME 4143), identificamos mutações somáticas no *DEPDC5*: um stop codon (c.856C>T, p.Arg286), sendo validada pela metodologia ddPCR, com taxa de 5%. (Figura 8) (Anexo 2), evidenciando nas imagens de ressonância magnética o aumento de volume do hemisfério cerebral e cerebelar esquerdo, com dilatação do ventrículo lateral e área de hipersinal periventricular (Figura 8).

Para mostrar de forma completa todas as variantes de interesse, foi construído um gráfico em ambiente R, utilizando o pacote Complex Heatmap, que leva em consideração também a patogenicidade das mutações de interesse encontradas, após a filtragem ampla, mantendo somente as mutações patogênicas, provavelmente patogênicas e VUS, observa-se os 30 genes mais expressos em cada indivíduo em diferentes regiões e efeitos de patogenicidade, nota-se que o gene *MTOR* e o *PIK3CA* são os mais expressos na nossa casuística, com maior porcentagem de expressão, sendo considerados mutações patogênicas de alto impacto, cinco pacientes não apresentaram mutações patogênicas nas regiões de interesse, esse fato pode ser explicado pelos filtros

escolhidos para seleção das variantes, assim excluindo todas as variantes que não eram de interesse para esta análise (Figura 16).

Figura 16 - Gráfico EpiPrint demonstrando a prevalência de mutações dentre as amostras, em diferentes regiões e efeitos, após a aplicação dos filtros, selecionando as variantes de interesse.

Os estudos envolvendo investigação genética nas malformações do desenvolvimento cortical vem contribuindo para explicação dos mecanismos fisiopatológicos, porém os estudos das vias compostas por vários genes ou combinação deles tem se mostrado muito mais promissor do que análise individualmente de cada gene. Neste contexto, foi realizada uma análise utilizando redes de interações PPI também chamada de *Network Medicine*.

Todos as proteínas observadas nos pacientes foram analisados em relação a sua interação, as diferentes proteínas são mostradas na rede de PPI e as que não apresentam interações foram excluídas da análise e os grupos de proteínas são indicados em cores diferentes. As linhas representam as associações funcionais previstas, associações fortes são representadas por linhas mais grossas. Através da análise de PPI foi possível concluir que os genes expressos nos casos de HME tem uma importante interação, possibilitando uma melhor classificação molecular e identificação de vias de sinalização que se tornam desreguladas mediante mutações genicas, a análise das redes possibilitou elucidar a interação entre fenótipo e genótipo, visto que a maioria dos genes expressos na rede estão relacionados com a via mTOR.

Figura 17- Figura representativa da análise de todos os genes através da rede de interação de proteínas PPI. Grupos de proteínas são indicados em cores diferentes. As linhas representam as associações funcionais previstas. Associações fortes são representadas por linhas mais grossas. Os genes que não se apresentavam ligados a rede foram excluídos da análise.

5.4 ddPCR SCREENING e VALIDAÇÕES

Algumas variantes não identificadas no sequenciamento do exoma foram testadas para averiguação se estavam presentes nas amostras biológicas dos pacientes selecionados. Através da análise de PCR digital foi possível identificar mutações de interesse, porém o alto custo da análise e a alta complexidade da metodologia limitam a

frequência desse tipo de análise. Foram selecionadas variantes que atuam na via mTOR e que já tenham sido citadas na literatura ou encontradas em outros pacientes com HME, participantes de outros projetos do nosso grupo de pesquisa, sendo elas; *MTOR* C14834, *MTOR* E642K, *MTOR* L1460P, *DEPDC5* A1040, *PIK3CA* H1047R.

De todas variantes testadas, somente uma foi considerada positiva. A mutação do gene *PIK3CA* p.H1047R foi encontrada no paciente HME 6593 com uma porcentagem de 13.1% no cérebro e 0% no sangue (Figura 17).

Figura 18 - Figura representativa da análise realizada através de um screening de mutações de interesse (A) Controle negativo (B) HME 6593 os droplets em cor laranja representam a porcentagem de mutação.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O diagnóstico de HME é feito principalmente com imagem e achados clínicos. O diagnóstico clínico pode ser feito em casos sindrômicos, mas a imagem cerebral é essencial em casos isolados. A ressonância magnética pré-natal pode revelar aumento ventricular e difusão restrita, sugerindo aumento da celularidade e mielinização avançada no hemisfério afetado. Em neonatos, os achados ultrassonográficos cranianos incluem aumento do hemisfério, espessamento do ventrículo lateral, espessamento da substância branca periventricular com aumento da ecogenicidade e deslocamento das estruturas da linha média. A ressonância magnética pós-natal geralmente permite o diagnóstico correto e tipicamente revela um encéfalo aumentado envolvendo pelo menos um lobo, com um córtex espesso; giros amplos; diferenciação anormal de matéria cinza-branca com sinal anormal; heterotopia neuronal, assimetria do ventrículo e gânglios da base e anormalidades da cápsula interna. O aumento do lobo occipital costuma deixá-lo a deslocar-se ao longo da linha média (SANTOS *et al.*, 2014).

Em pacientes com associação de HME e complexo de esclerose tuberosa, um hemisfério pode apresentar paquigiria, imagens de substância branca de alta intensidade, nódulos gliais subependimais e mineralização difusa. O hemisfério afetado pode se tornar menor com a progressão da doença e pode não ser maior do que o hemisfério normal oposto no momento da imagem. O hemisfério não HME pode ser normal ou ter tubérculos corticais, estes casos também apresentam comprometimento dos nervos cranianos, vasos cerebrais e cerebelo. Aumento do nervo olfativo ipsilateral, vasos cerebrais dilatados, hipertrofia hemicerebelar, e arquitetura anormal da folia cerebelar foram muitas vezes observados, embora sejam raros os casos com alargamento do nervo óptico ipsilateral e hemi-hipertrofia do tronco cerebral (BARKOVICH *et al.*, 2012; BARKOVICH *et al.*, 2011).

A ressonância magnética oferece imagem estrutural de alta resolução do cérebro e tem cobertura cerebral completa, permitindo avaliação das principais anormalidades estruturais cerebrais observadas em pacientes com HME, incluindo tamanho dos ventrículos laterais, aumento da espessura da substância cinzenta cortical, padrões anormais de giros, aumento da intensidade do sinal na substância branca subcortical, atrofia ou hipertrofia hemisférica, desmielinização, gliose e aspecto hamartomatoso de segmentos lobar ou multilobar. Porém as alterações mais frequentes são as

polimicrogurias, lisencefalias, agurias, paquigurias e heterotopias da matéria cinzenta. (SHROT *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2014).

Foram também observadas algumas anomalias morfológicas fora do hemisfério envolvido. Sabe-se que paciente com HME podem também apresentar uma condição que não envolve apenas o hemisfério cerebral, mas também os nervos cranianos, os vasos cerebrais e o cerebelo. Um estudo retrospectivo observou-se frequentemente aumento do nervo olfativo ipsilateral, vasos cerebrais dilatados, hipertrofia hemocerebelar e arquitetura anormal da folia cerebelar, embora o aumento do nervo óptico ipsilateral e a hemihipertrofia do tronco encefálico fossem raros (Tabela 1) (Figura 8) (SHROT *et al.*, 2018).

O fator de crescimento nervoso (NGF), que é produzido e liberado pelas células cerebrais, está envolvido na regulação da atividade da colina acetiltransferase, que é altamente expresso em regiões do sistema nervoso central inervadas pelos neurônios colinérgicos magnocelulares do prosencéfalo basal, incluindo o hipocampo, bulbo olfativo e neocórtex (CONNOR *et al.*, 1998). Antonelli e colaboradores demonstraram aumento dos níveis teciduais de NGF e numerosas células positivas para receptores de NGF de alta afinidade em tecidos de pacientes diagnosticados com HME comparado com tecidos cerebrais controle. Além disso, não apenas neurônios, mas também pequenos vasos sanguíneos e fibras nervosas exibiram positividade de receptores de NGF de alta afinidade (ANTONELLI *et al.*, 2004). Nossos resultados podem ser explicados pelos achados deste estudo. O aumento ipsilateral do hemisfério afetados e malformação desordenada dos giros cerebelares e também dilatações vasculares cerebrais podem ser devidas em parte ao aumento do NGF e às células positivas ao receptor do NGF de alta afinidade, cuja interação desempenha um papel crucial no crescimento, diferenciação e promoção do reparo neuronal.

A característica típica desses casos, é a notável presença de neurônios dismórficos (significativamente aumentados com acúmulo de proteínas de neurofilamentos) e células balão. Na formação da camada cortical a laminação cortical é frequentemente interrompida a partir da camada II, o teor de mielina também pode estar alterado na substância branca subcortical subjacente. Outras anormalidades na camada cortical são frequentemente encontradas e não devem ser classificadas separadamente, incluindo a organização anormal da camada isocortical adjacente à lesão principal, bem como neurônios heterotópicos na camada 1 ou substância branca. Lesões histopatológicas semelhantes são observadas em tubérculos corticais, displasias

corticais tipo IIB e outras e outras malformações do desenvolvimento cortical como as esquizencefalias (BLUMCKE *et al.*; 2011).

As principais características encontradas na análise histológica dos casos selecionados incluíram dislaminação cortical, grandes neurônios atípicos, células balão, heterotopia neuronal e astrocitose com calcificação distrófica. Os neurônios heterotópicos na substância branca estavam presentes em um padrão radial sugestivo de migração neuronal aberrante. Vários neurônios grandes foram distróficos com anormalidades do citoesqueleto, como neurofilamentos fosforilados. A maioria das células balão eram de origem astrocitária, sendo positiva para proteína ácida fibrilar glial e negativa para os marcadores neuronais. As células balão apresentavam um grande corpo celular e citoplasma eosinofílico vítreo opalescente, com a coloração em hematoxilina e eosina (H & E), em alguns casos, houve a presença da substância de Nissel e núcleos múltiplos.

Alguns estudos observaram células balão reunidas em pequenos agregados, mas também e deslocadas dentro de tecido cerebral adjacente "normal" (GARBELLI *et al.*, 1999; URBACH *et al.*, 2002). Essas células usualmente são ligadas a proteína ácida fibrilar glial variável (GFAP) e padrões de coloração de neurofilamentos. Em exemplos raros, a coexpressão de ambos os marcadores foi relatada sugerindo a determinação da linhagem glial e neuronal, isto é, células intermediárias (UHLMANN *et al.*, 2002). As células de balão também podem expressar a variante GFAP-delta (MARTINIAN *et al.*, 2009), ou outros marcadores de células estaminais, isto é, integrinas SOX2, CD133, beta-1 ou o antigénio onco-fetal CD34 (FAUSER *et al.*, 2004, YASIN *et al.*, 2010)

Modelos anteriores de camundongos mostraram que a ativação da via mTOR através de mutações em genes que regulam essa via, podem ocasionar defeitos de laminação cortical. No entanto, as interações glia, neuroglia e mutações genéticas, também podem estar contribuindo para a patogênese da HME, especialmente em relação ao supercrescimento cortical anormal, nos casos em que a mutação somática ocorre em um progenitor que dá origem a ambos os tipos de células. Em conjunto, análises de modelo camundongo podem sugerir que mutações somáticas que ativam a via mTOR em progenitores telencefálicos dorsais causam um conjunto de displasias corticais e HME, e também a ativação na linhagem do neurônio excitatório é essencial para a formação das malformações do desenvolvimento cortical. (MAGRI *et al.*, 2013; MEIKLE *et al.*, 2007; ROY *et al.*, 2015; UHLMANN *et al.*, 2002; ZENG *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2009).

Neste projeto, revisamos a compreensão atual do papel da via mTOR e das vias paralelas em relação aos casos de HME, nossos resultados hipotetizam a presença de mutações somáticas cerebrais, que são cada vez mais identificadas em casos de malformação do desenvolvimento cortical. As mutações genéticas dos genes da via mTOR estão associadas a casos diagnosticados com HME, em indivíduos com epilepsia. Essa observação relativamente recente de mutações em genes da via mTOR em epilepsias focais levanta a possibilidade de que os inibidores de mTOR possam ter benefícios terapêuticos mais amplos para pessoas com epilepsia (LEE *et al.*, 2012).

Na análise das variantes que estão correlacionadas com a via mTOR, foram encontradas mutações no tecido cerebral em 4 pacientes, essas mutações não foram encontradas no sangue, e assim, caracterizadas como mutações somáticas (Anexo 2). Estes dados conferem com resultados de outros estudos, que são conclusivos em relação a causa molecular da HME, a hipótese é que a HME pode ser causada por mutações pontuais do tipo *de novo*, sendo caracterizadas como mutações somáticas, que são definidas como uma alteração no DNA que ocorre após a concepção. Mutações somáticas podem ocorrer em qualquer uma das células do corpo, exceto as células germinativas (espermatozóide e óvulo) e, portanto, não são passadas para as crianças. No caso de eventos *de novo*, essas mutações ocorreram no desenvolvimento desenvolvimento inicial (D’GAMA *et al.*, 2015).

Em dois pacientes com HME, foram identificadas mutações do gene MTOR, outros dois pacientes apresentaram mutações missense do gene *PIK3CA*, a hipótese mediante esses resultados é que a mutação somática de genes que estão presentes na via mTOR mesmo sendo de baixa prevalência podem ser uma das causas genéticas da HME. A mTOR refere-se a uma via essencial que regula o crescimento celular em resposta a uma vasta gama de estímulos. A rapamicina, inicialmente usada como imunossupressor, inibiu um elemento crítico nessa via. A desregulação da via mTOR tem sido implicada em muitas condições patológicas, incluindo displasias do sistema nervoso central. O estudo de Lee e colaboradores realizaram sequenciamento completo do exoma no tecido cerebral em pacientes com HME submetidos à cirurgia e compararam isso com a sequência genética do paciente proveniente do sangue. Eles identificaram mutações no tecido cerebral afetado em genes da via mTOR em 6/20 pacientes com HME, e não encontraram a mesma alteração no sangue, sugerindo que rupturas desta via podem estar implicadas ou mesmo causadoras da doença. Um paciente teve uma mutação somática em AKT3, outra mutação somática em MTOR e

quatro pacientes tiveram a mesma mutação somática em PIK3CA. Todos os três genes são essenciais dentro da via mTOR (LEE *et al.*, 2012) (Anexo 1).

Diversos estudos relatam a correlação de genes da via mTOR com pacientes diagnosticados com HME. Poduri e colaboradores, observou mutação somática em tecido cerebral do gene AKT3 em 2/20 (10%). Conti e colaboradores identificaram uma duplicação em mosaico na AKT3 em 1/16 (6%). Jansen e colaboradores relataram 3 variantes de ativação em AKT3 e PIK3CA em 3/33 (10%). D'Gama e colaboradores detectaram mutações ativadoras em PIK3CA em 4/53 (8%). No geral, as variantes patogênicas em PIK3CA são responsáveis por 6 a 25% das malformações do desenvolvimento cortical com frequência alélica de mutações em mosaico de aproximadamente 31% no HME (Anexo 1). (JANSEN *et al.*; 2015, PODURI *et al.*, 2012; D'GAMA *et al.*, 2017). Essas alterações genéticas podem influenciar o fenótipo do indivíduo e esta informação pode oferecer alternativas farmacológicas para o tratamento (KRUEGER *et al.*, 2013).

Em um paciente identificamos mutações somáticas no DEPDC5, sabe-se que o DEPDC5 é integrado ao complexo GATOR1 que inibe a atividade da mTORC1 nas condições de privação de aminoácidos, prevê-se que as mutações de perda de função nos genes GATOR1, resultem em atividade excessiva da cinase mTORC1. Vários estudos investigaram, por imunohistoquímica, os níveis de fosforilação do substrato S6 de mTORC1 no tecido cerebral pós-operatório de indivíduos mutados nos genes GATOR1. Níveis aumentados de fosforilação S6 foram observados em indivíduos com HME, confirmando que variantes patogênicas em genes do complexo GATOR1 são a causa hiperatividade da mTORC1 (BAULAC *et al.*, 2015, IFFLAND *et al.*, 2018).

Marsan e colaboradores mostrou que mTORC1 está hiperativo nos camundongos no gene DEPDC5 e que uma única injeção pré-natal de rapamicina pode resgatar seu atraso total de crescimento, demonstrando que a letalidade embrionária é causada pela hiperativação de mTORC1. Hughes e colaboradores confirmaram hiperatividade mTORC1 em ratos DEPDC5 e relataram defeitos vasculares do sangue, malformações do desenvolvimento corticais e linfáticas subjacentes à letalidade embrionária (MARSAN *et al.*, 2016, MARSAN *et al.*, 2018, HUGHES *et al.*, 2017).

Scheffer e colaboradores concluíram que famílias com mutações germinativas no DEPDC5 têm epilepsia, mas apenas algumas têm displasia cortical diagnosticadas radiograficamente (SCHEFFER *et al.*, 2014). A descoberta de que o DEPDC5 está

associado a casos de HME após epilepsia focal hereditária esclarece a evidência de que o *DEPDC5* atua como um inibidor de mTORC1, esses genes inibidores podem ser responsáveis por mudanças estruturais no córtex com a presença de células dismórficas (BAULAC *et al.*, 2015; YUSKAITIS *et al.*, 2018). (Anexo 1)

Embora o papel das mutações somáticas em casos de HME correlacionados com Síndrome de Proteus, algumas evidências iniciais foram recentemente encontradas, sendo considerada uma síndrome rara de supercrescimento (LINDHURST *et al.*, 2011). Apesar que na nossa análise as mutações destes genes não foram encontradas nas regiões de interesse, Lee e colaboradores relataram que a HME está no mesmo grupo que os hamartomas corticais do Complexo Esclerose Tuberosa (TSC) e das displasias corticais. Nos casos de TSC ligados à presença de displasia com células de balão, têm sido descritos cada vez mais associados a distúrbios da via mTOR e pelo menos nos astrocitomas gigantes do TSC, e clinicamente o inibidor de mTOR everolimus é usado com sucesso no tratamento destes distúrbios. O relacionamento próximo já pode sugerir um caminho funcional compartilhado (LEE *et al.*, 2012) (Anexo 2).

Algumas mutações não foram encontradas, pois a relação entre profundidade de cobertura do sequenciamento e sensibilidade para detectar mutações somáticas patogênicas, podem ter sido insuficientes. Isto explica o fato de alguns estudos na literatura revelarem mutações e sendo elas não relatadas na nossa análise. Um grupo de pesquisadores não identificaram mutações alto impacto de patogenicidade dos genes *TSC1* e *TSC2*, na primeira análise, porém em uma segunda tentativa realizado pelo mesmo grupo, com a maior profundidade de cobertura alcançada permitiu identificar uma mutação somática de *TSC2*, previamente indetectável, presente somente em 7% das células cerebrais. Algumas mutações encontradas em nosso estudo, estavam presentes em apenas 2% das células cerebrais. A falta de mutação fora do cérebro enfatiza que o sequenciamento do DNA derivado do tecido cerebral é necessário para o diagnóstico genético em praticamente todos os casos HME, porém a dependência da sensibilidade da profundidade de cobertura sugere que existem casos de HME ainda mais “não resolvidos” podendo refletir mutações somáticas presentes em frequências alélicas ainda menores (XUE *et al.*, 2016).

Atualmente, pacientes com HME e epilepsia intratável confiam em ressecção cirúrgica para tentativa de controle de crises. Com a identificação de mutações em genes de pacientes com HME, é possível entender mecanismos moleculares envolvidos nesses

casos e com a esperança de que inibidores de mTOR atualmente sendo estudados podem ser eficazes para pacientes com HME (PODURI, 2014). Recentemente, vários modelos de ratos com malformações do desenvolvimento cortical focal mostraram melhora nas convulsões após o tratamento com inibidores da via mTOR (BAEK *et al.*, 2015; LIM *et al.*, 2015; ROY *et al.*, 2015; WINAWER *et al.*, 2018).

Alguns estudos observaram mutações na linhagem neuronal e em células progenitoras específicos de neurônios, sugerindo que a ativação anormal da via mTOR nos neurônios são suficientes para desencadear as malformações do desenvolvimento cortical com áreas epileptogênicas focais. Embora Roy e colaboradores tenham descritos os efeitos da expressão do gene *PIK3CA* (p.H1047R) começando em idades embrionárias ou neonatais tardias, outro estudo usando camundongos com expressão de *PIK3CA* (p.H1047R), confirmou que a mesma mutação na idade embrionária inicial, também causa a superprodução de neurônios na camada superficial, que são gerados após os neurônios da camada profunda. Isso tem implicações significativas para as malformações do desenvolvimento cortical, observa-se que o início das mutações genéticas tem relação com o grau de anomalias presentes no tecido cerebral (Figura16) (ROY *et al.*, 2015; D'GAMA *et al.*, 2017; MARSAN *et al.*, 2018).

Novas tecnologias na área da genética molecular têm surgido, como o sequenciamento do exoma que evidencia novos genes para epilepsias idiopáticas associada ao atraso no desenvolvimento. A identificação de genes envolvidos na etiologia de diversas formas de epilepsia, não só aumenta o conhecimento acerca das vias moleculares envolvidas na epileptogênese, como poderá ter grande repercussão no diagnóstico e prognóstico (VEERAMAH *et al.*, 2013; MAJOLO *et al.*, 2018).

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Estudos genéticos estabeleceram um papel importante das mutações somáticas do cérebro nos genes da via mTOR e na etiologia da HME. Esses achados revelaram a existência biomarcadores moleculares pertencentes à via mTOR. Essas observações sugeriram que a HME representam um espectro de distúrbios do neurodesenvolvimento resultando de distintas progenitores que são determinados pelo tempo em que a mutação ocorreu durante o desenvolvimento cerebral. Pode-se esperar que uma mutação que ocorre precocemente durante o desenvolvimento afete um grande número de células e resulte em uma malformação maior, ao passo que a mesma mutação ocorrendo mais tarde no desenvolvimento poderia causar uma menor malformação. No futuro, numerosas mutações somáticas em genes conhecidos ou novos serão, sem dúvida, reveladas em amostras de cérebros ressecados e assim, possíveis correlações entre genótipos e fenótipos podem emergir, permitindo que o diagnóstico clínico genético ajude a prever o desfecho do paciente. Além disso, o conhecimento sobre a rapamicina evoluiu nos últimos anos, os inibidores de mTOR representam uma opção terapêutica promissora para o tratamento da epilepsia. Os estudos que estão sendo desenvolvidos estão ajudando na compreensão de mecanismos subjacentes precisos da via de sinalização mTOR na epilepsia, e extensa modelagem pré-clínica ou estudos experimentais, também levando em conta a identificação e fabricação de novos inibidores de mTOR com características farmacêuticas mais favoráveis para tratar pacientes diagnosticados com epilepsia.

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

AGID, R.; LIEBERMAN, S.; NADJARI, M.; GOMORI, J. M. Prenatal MR diffusion-weighted imaging in a fetus with hemimegalencephaly. **Pediatr Radiol**, v. 36, n. 2, Feb, p.138-140. 2006

AGRICOLA, K.; TUDOR, C. Everolimus treatment of refractory epilepsy in tuberous sclerosis complex. **Ann Neurol**, v. 74, n. 5, Nov, p. 679–87. 2013.

ANTONELLI, A.; CHIARETTI, A.; AMENDOLA, T, ET AL. Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in human paediatric hemimegalencephaly. **Neuropediatrics**, v.35, p.35-39. 2004.

BAEK, S.T.; COPELAND, B.; YUN, E.J.; KWON, S.K.; GUemez-GAMBO, A. A.; SCHAFER, A. E.; KIM, S.; KANG, H.C.; SONG, S.; MATHERN, G.W, ET AL. An AKT3-FOXG1-reelin network underlies defective migration in human focal malformations of cortical development. **Nature medicine**. v. 21, p. 1445-1454. 2015.

BARKOVICH, A. J. Current concepts of polymicrogyria. **Neuroradiology**, v. 52, n. 6, Jun, p.479-487. 2010.

BARKOVICH, A. J.; GUERRINI, R.; KUZNIECKY, R. I.; JACKSON, G. D.; DOBYNS, W. B. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. **Brain**, v. 135, n. Pt 5, May, p.1348-1369. 2012.

BARKOVICH, A. J.; KUZNIECKY, R. I.; JACKSON, G. D.; GUERRINI, R.; DOBYNS, W. B. Classification system for malformations of cortical development: update 2001. **Neurology**, v. 57, n. 12, Dec 26, p.2168-2178. 2001.

BERG, A.T., BLACKSTONE, N.W. Of cabbages and kings: perspectives on classification from the field of systematics. **Epilepsia**, v. 44, n. 1 Jan, p 1-13. 2003.

BIELAS, S.; HIGGINBOTHAM, H.; KOIZUMI, H.; TANAKA, T.; GLEESON, JG. Cortical neuronal migration mutants suggest separate but intersecting pathways. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 20,n.1, Nov, p.593-618. 2004.

BILGÜVAR, K.; OZTÜRK, A.K.; LOUVI. A.; KWAN. K.Y.; CHOI. M.; TATLI. B.; YALNIZOĞLU. D.; TÜYSÜZ. B.; CAĞLAYAN. A.; GÖKBEN. S.; KAYMAKÇALAN. H.; BARAK. T.; BAKIRCIOĞLU. M.; YASUNO. K.; SANDERS. S.; ZHU. Y.; YILMAZ. S.; DINÇER. A.; JOHNSON. M.H.; BRONEN. R.A.; KOÇER. N.; PER. H.; MANE. S.; PAMIR. M.N.; YALÇINKAYA. C.; KUMANDAŞ. S.; TOPÇU. M.; OZMEN. M.; SESTAN. N.; LIFTON. R.P.; STATE. M.W.; GÜNEL. M.; Whole-exome sequencing identifies recessive WDR62 mutations in severe brain malformations. **Nature**, v.9, Sept, p. 207-10. 2010.

BLUMCKE, I.; THOM, M.; ARONICA, E.; ARMSTRONG, D. D.; VINTERS, H. V.; PALMINI, A.; JACQUES, T. S.; AVANZINI, G.; BARKOVICH, A. J.; BATTAGLIA, G.; BECKER, A.; CEPEDA, C.; CENDES, F.; COLOMBO, N.; CRINO, P.; CROSS, J. H.; DELALANDE, O.; DUBEAU, F.; DUNCAN, J.; GUERRINI, R.; KAHANE, P.; MATHERN, G.; NAJM, I.; OZKARA, C.; RAYBAUD, C.; REPRESA, A.; ROPER, S. N.; SALAMON, N.; SCHULZE-BONHAGE, A.; TASSI, L.; VEZZANI, A.; SPREAFICO, R. The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: a consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. **Epilepsia**, v. 52, n. 1, Jan, p.158-174. 2011.

BRITANOVA, O.; ALIFRAGIS, P.; JUNEK, S.; JONES, K.; GRUSS, P.; TARABYKIN, V. A novel mode of tangential migration of cortical projection neurons. **Dev Biol**, v. 298, n. 1, Oct 1, p.299-311. 2006.

BRODIE, M.J.; BARRY, S.J.E.; BAMAGOUS, G.A.; NORRIE, J.D.; KWAN, P. Patterns of treatment response in newly diagnosed epilepsy. **Neurology**, v. 78, n. 20, May, p. 1548-1554. 2012.

BROUMANDI, D. D.; HAYWARD, U. M.; BENZIAN, J. M.; GONZALEZ, I.; NELSON, M. D. Best cases from the AFIP: hemimegalencephaly. **Radiographics**, v. 24, n. 3, May-Jun, p.843-848. 2004.

BUSTAMANTE, T.; MACHADO, H.R.; SAKAMOTO A.S. Hemimegalencephaly and Epilepsy: An Overview. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**, v. 12, n. 2, May, p. 99-105. 2006.

BYSTRON, I.; BLAKEMORE, C.; RAKIC, P. Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 2, Feb, p.110-122. 2008.

CAFFREY, J. R.; HUGHES, B. D.; BRITTO, J. M.; LANDMAN, K. A. An In Silico Agent-Based Model Demonstrates Reelin Function in Directing Lamination of Neurons during Cortical Development. **PLoS One**, v. 9, n. 10, Oct 21, p-110415. 2014.

CONNOR, B.; DRAGUNOW, M. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. **Brain Res Rev**, v. 27, p.1–39. 1998.

CRINO, P. B.; MIYATA, H.; VINTERS, H. V. Neurodevelopmental disorders as a cause of seizures: neuropathologic, genetic, and mechanistic considerations. **Brain Pathol**, v. 12, n. 2, Apr, p.212-233. 2002.

CRINO, P. B.; MIYATA, H.; VINTERS, H. V. Neurodevelopmental disorders as a cause of seizures: neuropathologic, genetic, and mechanistic considerations. **Brain Pathol**, v. 12, n. 2, Apr, p.212-233. 2002.

CRINO, P.B. mTOR Signaling in Epilepsy: Insights from Malformations of Cortical Development. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 5, n. 4, Apr, p. a022442. 2015.

D’GAMA, A.M.; GENG, Y.; COUTO, J.A.; MARTIN, B.; BOYLE, E.A.; LACOURSIERE, C.M.; HOSSAIN, A.; HATEM, N.E.; BARRY, B.J.; KWIATKOWSKI, D.J.; VINTERS, H.V.; BARKOVICH, A.J.; SHENDURE, J.; MATHERN, G.W.; WALSH, C.A.; PODURI, A. Mammalian target of rapamycin pathway mutations cause hemimegalencephaly and focal cortical dysplasia. **Ann Neurol**, v. 77, p. 720-05. 2015.

D’AGOSTINO, M. D.; BASTOS, A.; PIRAS, C.; BERNASCONI, A.; GRISAR, T.; TSUR, V. G.; SNIPES, J.; JUHASZ, C.; CHUGANI, H.; GUERRINI, R.; CROSS, H.; ANDERMANN, E.; DUBEAU, F.; MONTES, J.; OLIVIER, A.; ANDERMANN, F. Posterior quadrant dysplasia or hemi-hemimegalencephaly: a characteristic brain malformation. **Neurology**, v. 62, n. 12, Jun 22, p.2214-2220. 2004.

dami

DAMIANO, J.A., BURGESS, R.; KIVITY, S.; LERMAN-SAGIE, T.; AFAWI, Z.; SCHEFFER, I.E.; BERKOVIC, S.F.; HILDEBRAND, M.S. Frequency of CNKSR2 mutation in the X-linked epilepsy-aphasia spectrum. **Epilepsia**, Jan. p. 1-4. 2017.

DEPRISTO, MA.; E. BANKS, R.E. POPLIN, K.V. GARIMELLA, J.R. MAGUIRE, C. HARTL, A.A. PHILIPPAKIS, G. DEL ANGEL, M.A RIVAS, M. HANNA, A. MCKENNA, T.J. FENNEL, A.M. KERNYTSKY, A.Y. SIVACHENKO, K. CIBULSKIS, S.B. GABRIEL, D. ALTSHULER, AND M.J.DALY. A framework for variation discovery and genotyping using next- generation DNA sequencing data. **Nat Genet.** n. 43(5): 491–498.2011.

D'GAMA, A.M.; GENG, Y.; COUTO, J.A.; MARTIN, B.; BOYLE, E.A.; LACOURSIERE, C.M.; HOSSAIN, A.; HATEM, N.E.; BARRY, B.J.; KWIATKOWSKI, D.J.; VINTERS, H.V.; BARKOVICH, A.J.; SHENDURE, J.; MATHERN, G.W.; WALSH, C.A.; PODURI, A. Mammalian target of rapamycin pathway mutations cause hemimegalencephaly and focal cortical dysplasia. **Ann Neurol**, v. 77, n. 4, Apr, p. 720-5. 2005.

D'GAMA, A.M; WOODWORTH,M.B; HOSSAIN, A.A; BIZZOTTO, S; HATEM, N.E; LACOURSIERE,C.M; NAJM,I; YING,Z; YANG,E; BARKOVIC, A.J; KWIATKOWSKI,D.J; VINTERS,H.V; MADSEN, J.R; MATHERN,G.W; BLÜMCKE,I; PODURI,A; WALSH,C,A. Somatic Mutations Activating the mTOR Pathway in Dorsal Telencephalic Progenitors Cause a Continuum of Cortical Dysplasias. **Cell Rep**.v.21, n.13, p. 3754-3766. 2017.

ENGEL; J.R. Reply to “Of cabbages and kings: some considerations on classifications, diagnostic schemes, semiology, and concepts”. **Epilepsia** v. 44. p. 4–6. 2003.

ENSEMBL GENOME BROWSER 93. Disponível em: https://www.ensembl.org/info/genome/variation/prediction/predicted_data.html#consequences. Acesso em: 02 setembro. 2018.

EVRONY GD, CAI X, LEE E, HILLS LB, ELHOSARY PC, LEHMANN HS, PARKER JJ, ATABAY KD, GILMORE EC, PODURI A. Single-neuron sequencing analysis of L1 retrotransposition and somatic mutation in the human brain. *Cell*. 2012; 151:483–496.

FISHER, R.S. The New Classification of Seizures by the international League Against Epilepsy. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 17, n. 6, Jun, p. 48. 2017.

FLORES-SARNAT, L. Hemimegalencephaly: part 1. Genetic, clinical, and imaging aspects. **J Child Neurol**, v. 17, n. 5, May, p.373-384; discussion 384. 2002.

FULTON, S.P.; POPPEL, K.; MCGREGOR, A.L.; MUDIGOUDAR, B.; WHELESS, J.W. Vagus Nerve Stimulation in Intractable Epilepsy Associated With SCN1A Gene Abnormalities. **J Child Neurol**, Jan vol.1, n.1 , .2017.

FUSCO, L.; FERRACUTI, S.; FARIELLO, G.; MANFREDI, M.; VIGEVANO, F. Hemimegalencephaly and normal intellectual development. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 55, n. 8, Aug, p.720-722. 1992

GUERRINI, R.; PARRINI, E. Malformations of Cortical Development (MCD): Genetic Aspects. **Epileptologie**, v. 32, p. 129-138. 2015.

HUGHES J, DAWSON R, TEA M, MCANINCH D, PILTZ S, JACK-SON D, STEWART L, RICOS MG, DIBBENS LM, HARVEY NL, THOMAS P. Knockout of the epilepsy gene *Depdc5* in mice causes severe embryonic dysmorphology with hyperactivity of mTORC1 signalling. **Sci Rep** 2017; 7: 12618

HUNG, P. C.; WANG, H. S. Hemimegalencephaly: cranial sonographic findings in neonates. **J Clin Ultrasound**, v. 33, n. 5, Jun, p.243-247. 2005

IFFLAND,P.H; BAYBIS, M; BARNES, A.E; LEVENTER, R.J; LOCKHART, P.J; CRINO, P.B. *DEPDC5* and *NPRL3* modulate cell size, filopodial outgrowth, and localization of mTOR in neural progenitor cells and neurons. **Neurobiol Dis**. v. 114. p184-193. 2018

JANSEN, L.A.; MIRZAA, G.M.; ISHAK, G.E.; O'ROAK, B.J.; HIATT, J.B.; RODEN, W.H.; GUNTER, S.A.; CHRISTIAN, S.L.; COLLINS, S.; ADAMS, C.; RIVIÈRE, J.B.; ST-ONGE, J.; OJEMANN, J.G.; SHENDURE, J.; HEVNER, R.F.; DOBYNS, W.B. PI3K/AKT pathway mutations cause a spectrum of brain malformations from megalencephaly to focal cortical dysplasia. **Brain**, v. 138, n. 6, Jun, p. 1613-28. 2015.

JENNUM, P.; GYLLENBORG, J.; KJELLBERG, J. The social and economic consequences of epilepsy: a controlled national study. **Epilepsia**, v. 52, n. 5, May, p.949-956. 2011.

KABAT, J.; KROL, P. Focal cortical dysplasia - review. **Pol J Radiol**, v. 77, n. 2, Apr, p.35-43. 2012.

KRIEGSTEIN, A.; NOCTOR, S.; MARTINEZ-CERDENO, V. Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 11, Nov, p.883-890. 2006.

KRUEGER, D.A.; WILFONG, A.A.; HOLLAND-BOULEY, K.; ANDERSON, A.E.; KUZNIECKY, R. I. Magnetic resonance imaging in developmental disorders of the cerebral cortex. **Epilepsia**, v. 35, n.6,Suppl, p.S44-56. 1994.

LEE, J. H.; HUYNH, M.; SILHAVY, J. L.; KIM, S.; DIXON-SALAZAR, T.; HEIBERG, A.; SCOTT, E.; BAFNA, V.; HILL, K. J.; COLLAZO, A.; FUNARI, V.; RUSS, C.; GABRIEL, S. B.; MATHERN, G. W.; GLEESON, J. G. De novo somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly. **Nat Genet**, v. 44, n. 8, Aug, p.941-945. 2012.

LEE, S. K.; KIM, D. W. Focal cortical dysplasia and epilepsy surgery. **J Epilepsy Res**, v. 3, n. 2, Dec, p.43-47. 2013.

LEGA, B.; MULLIN, J.; WYLLIE, E.; BINGAMAN, W. Hemispheric malformations of cortical development: surgical indications and approach. **Childs Nerv Syst**, v. 30, n. 11, Nov, p.1831-1837. 2014.

LIM JS, KIM WI, KANG HC, KIM SH, PARK AH, PARK EK, CHO YW, KIM S, KIM HM, KIM JA, ET AL. Brain somatic mutations in MTOR cause focal cortical dysplasia type II leading to intractable epilepsy. **Nature medicine**. v. 21, p. 395-400. 2015.

LINDHURST, M.J.; SAPP,J.C.; TEER, J.K.; JOHNSTON,J.J.; FINN, E.M.; PETERS, K.; TURNER, J.; CANNONS, J.L.; BICK, D.; BLAKEMORE, L, ET AL. A mosaic

activating mutation in AKT1 associated with the Proteus syndrome. **N Engl J Med.** v.365, p. 611-619.2011.

MEIKLE L, TALOS DM, ONDA H, POLLIZZI K, ROTENBERG A, SAHIN M, JENSEN FE, KWIATKOWSKI DJ complex neuropathology in mouse models. **Dis Model Mech.**; v. 6, p.1185–1197. 2013.

MAJOLO,F; MARINOWIC, D.R; MACHADO, D.C; DA COSTA, J.C. mTOR pathway in focal cortical dysplasia type 2: What do we know? **Epilepsy Behav.** V.85, n.1, p.85-157. 2018

MARSAN E, ISHIDA S, SCHRAMM A, WECKHUYSEN S, MUR- ACA G, LECAS S, LIANG N, TREINS C, PENDE M, ROUSSEL D, LE VAN QM, MASHIMO T, KANEKO T, YAMAMOTO T, SAKUMA T, MAHON S, MILES R, LEGUERN E, CHARPIER S, BAULAC S. Depdc5 knockout rat: a novel model of mTOR. **Neurobiol Dis.** 2016; 89: 180–9

MARSAN, E; BAULAC, S. mTOR pathway, focal cortical dysplasia and epilepsy. **Neuropathol App Neurobiol.** V.44, n.1, p.6-17. 2018

MONKOL LEK. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. v. 536. n.18. p.285. 2016

MUHLEBNER, A.; GROPPPEL, G.; DRESSLER, A.; REITER-FINK, E.; KASPRIAN, G.; PRAYER, D.; DORFER, C.; CZECH, T.; HAINFELLNER, J. A.; CORAS, R.; BLUMCKE, I.; FEUCHT, M. Epilepsy surgery in children and adolescents with malformations of cortical development-Outcome and impact of the new ILAE classification on focal cortical dysplasia. **Epilepsy Res**, v. 108, n. 9, Nov, p.1652-1661. 2014.

MUNOZ, J.A.; LOPEZ-MESAS, M.; VALIENTE, M. Minimum handling method for the analysis of phosphorous inhibitors of urolithiasis (pyrophosphate and phytic acid) in urine by SPE-ICP techniques. **Anal Chim Acta**, v. 658, n. 2, Jan 25, p.204-208. 2010.

MYERS, K.A.; SCHEFFER, I.E. DEPDC5 as a potential therapeutic target for epilepsy. **Expert Opinion On Therapeutic Targets**, v. 21, n. 6, Jun, p. 591-600. 2017.

NAJM, I.M.; SARNAT,H.B; BLÜMCKE,I. Review: The international consensus classification of Focal Cortical Dysplasia - a critical update 2018. **Neuropathol Appl Neurobiol.** v. 44. n. 1. p.18-31. 2018

NAKASHASHI, M.; SATO, N.; YAGISHITA, A.; OTA, M.; SAITO, Y.; SUGAI, K.; SASAKI, M.; NATSUME, J.; TSUSHIMA, Y.; AMANUMA, M.; ENDO, K. Clinical and imaging characteristics of localized megalencephaly: a retrospective comparison of diffuse hemimegalencephaly and multilobar cortical dysplasia. **Neuroradiology**, v. 51, n. 12, Dec, p.821-830. 2009

PANAYIOTOPOULOS, C.P. A Clinical Guide to Epileptic Syndromes and their Treatment. 2nd ed., Springer. 2010.

PARRINI, E.; CONTI, V.; DOBYNS, W.B.; GUERRINI, R.;. Genetic Basis of Brain Malformations. **Mol Syndromol**, v. 7, n. 4. Sep, p. 220–233. 2016.

PODURI, A. DEPDC5 does it all: shared genetics for diverse epilepsy syndromes. **Annals of neurology**. V. 75, p. 631-633. 2014.

PODURI, A.; EVRONY, G.D.; CAI. X. WALSH, CA. Somatic mutation, genomic variation, and neurological disease. **Science**, v. 5, Jul n.1 , p.3 , 2013.

RICE, G.B.; WADHWANI, N.R. PI3K/AKT Pathway and Brain Malformations. **Pediatric Neurology Briefs**, v. 29, n. 7, Jul, p. 52. 2015.

ROSSINI, L.; VILLANI, F.; GRANATA, T.; TASSI, L.; TRINGALI, G.; CARDINALE, F.; ARONICA, E.; SPREAFICO, R.; GARBELLI, R. FCD Type II and mTOR pathway: evidence for different mechanisms involved in the pathogenesis of dysmorphic neurons. **Epilepsy Research**, v. 129, Jan, p. 146-156. 2017.

ROY, A.; SKIBO, J.; KALUME, F.; NI, J.; RANKIN, S.; LU, Y.; DOBYNS, W.B.; MILLS, G.B.; ZHAO, J.J.; BAKER, S.J.ET AL. Mouse models of human PIK3CA-related brain overgrowth have acutely treatable epilepsy. **Elife**. v.4.2015.

SANTOS,A.C.;ESCORSIROSSET,S.;SIMAO,G.N.; TERRA,V.C.; VELASCO,T.; NEDER,L.;SAKAMOTO, A.C.; MACHADO, H.R. Hemispheric dysplasia and hemimegalencephaly: imaging definitions.**Childs Nerv Syst**,v.30,n.11, Nov, p.1813-21.2014.

SATO,N.; YAGISHITA,A.; OBA,H.; MIKI,Y.;NAKATA,Y.;YAMASHITA,F.;NEMOTO,K.;SUGAI,K.;SASAKI,M.Hemimegalencephaly:a study of abnormalities occurring outside the involved hemisphere.**Ajnr Am J Neuroradiol**,v.28,n.4, Apr, p.678-81.2007.

SAUNDERS,C.T; WONG, W.S; SWAMY, S, BECQ,J, MURRAY, L.J, CHEETHAM, R.K. Strelka: accurate somatic small-variant calling from sequenced tumor-normal sample pairs. **Bioinformatics** (Oxford, England). v. 15. n. 14. p.1811-7. 2012.

SCHEFFER IE, HERON SE, REGAN BM, MANDELSTAM S, CROMPTON DE, HODGSON BL, LICCHETTA L, PROVINI F, BISULLI F, VADLAMUDI L,. Mutations in mammalian target of rapamycin regulator DEPDC5 cause focal epilepsy with brain malformations. **Annals of neurology**. 2014; 75:782–787.

SCHUTTE, S.S.; SCHUTTE, R.J.; BARRAGAN, E.V.; O'DOWD, D.K.;. Model systems for studying cellular mechanisms of SCN1A-related epilepsy. **J Neurophysiol**, v.115, n.4, Apr, p. 1755-66. 2016.

SHROT,S; HWANG, M; STAFSTROM, C.E; HUISMAN, T.A.G.M; SOARES, B.P. Dysplasia and overgrowth: magnetic resonance imaging of pediatric brain abnormalities secondary to alterations in the mechanistic target of rapamycin pathway. **Neuroradiology**. v. 60. n.2. p.137-150. 2018.

SISODIYA, S. M.;. Malformations of cortical development: burdens and insights from important causes of human epilepsy. **Lancet Neurol**, v. 3, n. 1, Jan, p.29-38. 2004.

TAYLOR, D. C.; FALCONER, M. A.; BRUTON, C. J.; CORSELLIS, J. A. Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 34, n. 4, Aug, p.369-387. 1971.

TRIPATHI, M.; RAY, S.; CHANDRA, P.S. Presurgical evaluation for drug refractory epilepsy. **International Journal of Surgery**, v. 36. p. 405-410. 2016.

UHLMANN EJ, WONG M, BALDWIN RL, BAJENARU ML, ONDA H, KWIATKOWSKI DJ, YAMADA K, GUTMANN DH. Astrocyte-specific TSC1 conditional knockout mice exhibit abnormal neuronal organization and seizures. **Annals of neurology**. 2002; 52:285–296. [PubMed: 12205640]

TOM SMITH, ANDREAS HEGER, IAN SUDBERY. UMI-tools: modeling sequencing errors in Unique Molecular Identifiers to improve quantification accuracy. v. 27:n. 1. P. 1–9. Jun 2017.

VATTIPALLY, V. R.; BRONEN, R. A. MR imaging of epilepsy: strategies for successful interpretation. **Magn Reson Imaging Clin N Am**, v. 14, n. 2, May, p.225-247. 2006.

VEERAMAH, K.R.; JOHNSTONE, L.; KARAFET, TM.; WOLF, D.; SPRISLER, R.; SALOGIANNIS, J.; BARTH-MARON, A.; GREENBERG, ME.; STUHLMANN, T.; WEINERT, S.; JENTSCH, T.J.; PAZZI, M.; RESTIFO, L.L.; TALWAR, D.; ERICKSON, R.P. Exome sequencing reveals new causal mutations in children with epileptic encephalopathies. **Epilepsia**, v. 54, n.7, p. 1270-80. 2013.

WANG, D.; ZEESMAN, S.; TARNOPOLSKY, M.A.; NOWACZYK, M.J.; Duplication of AKT3 as a cause of macrocephaly in duplication 1q43q44. **Am J Med Genet**, v. 8 Aug. p. 2016-9. 2013.

WANG, Y.; DU, X.; BIN, R.; YU, S.; XIA, Z.; ZHENG, G.; ZHONG, J.; ZHANG, Y.; JIANG, Y.H.; WANG. Y. Genetic Variants Identified from Epilepsy of Unknown Etiology in Chinese Children by Targeted Exome Sequencing. **Sci Rep**, v.11, n. 7, Jan. 2017.

WINAWER, M.R; GRIFFIN, N.G; SAMANAMUD, J; BAUGH,E.H; RATHAKRISHNAN, D; RAMALINGAM,S; ZAGZAG, D; SCHEVON, C.A; DUGAN, P; HEGDE,M; SHETH, S.A; MCKHANN, G.M; DOYLE,W.K; GRAN, G.A; PORTER, B.E; MIKATI, M.A; MUH,C.R; MALONE, C.D; BERGIN, A.M.R; PETERS, J.M; MCBRIAN, D.K; PACK, A.M; AKMAN,C.I; LACOURSIERE,C.M;

KEEVER,K.M; MADSEN,J.R; YAN,E; LIDOV,H.G.W; SHAIN,C; ALLEN,A.S; CANOLL, P.D; CRINO,P.B; PODURI,A.H; HEINZEN,E.L. Somatic SLC35A2 variants in the brain are associated with intractable neocortical epilepsy. **Ann Neurol.** v. 83, n. 6. p. 1133-1146. 2018

XUE, Y.; WILCOX, W.R.; Changing paradigm of cancer therapy: precision medicine by next-generation sequencing. **Cancer Biol Med.** v. 13, p. 12-18. 2016.

YUSKAITIS, C.J; JONES,B.M; WOLFSON, R.L; SUPER,C.E; DHAMNE, S.C; ROTENBERG, A; SABATINI, D.M; SAHIN,M; PODURI, A. A mouse model of DEPDC5-related epilepsy: Neuronal loss of Depdc5 causes dysplastic and ectopic neurons, increased mTOR signaling, and seizure susceptibility. **Neurobiol Dis.** v.111. p. 91-101. 2018.

ZENG LH, RENSING NR, ZHANG B, GUTMANN DH, GAMBELLO MJ, WONG M. Tsc2 gene inactivation causes a more severe epilepsy phenotype than Tsc1 inactivation in a mouse model of tuberous sclerosis complex. **Hum Mol Genet.** 2011; 20:445–454.

ZHOU J, BLUNDELL J, OGAWA S, KWON CH, ZHANG W, SINTON C, POWELL CM, PARADA LF. Pharmacological inhibition of mTORC1 suppresses anatomical, cellular, and behavioral abnormalities in neural- specific Pten knock-out mice. **J Neurosci.** 2009; 29:1773–1783.

ZHOU, X.; ZHUANG, F.; LI, H.; ZHENG, K.; HONG, Z.; FENG, W.; ZHOU, W.; CHEN, J. Calmodulin regulates KCNQ2 function in epilepsy. **Am J Transl Res,** v. 12, n. 15, Dec, p. 5610-5618. 2016.

Anexo 1

Tabela 4: Mutações de genes na via mTOR em pacientes diagnosticados com HME.

<i>HME</i>				
<i>Gene</i>	<i>DNA (Nucleotide change)</i>	<i>Protein (amino acid change)</i>	<i>Brain mosaic rate (%)</i>	<i>Ref</i>
AKT3	c.49C>T	p.Glu17Lys	17.4	Poduri <i>et al.</i> , 2012.
			28	Lee <i>et al.</i> , 2012.
			18	Jasen <i>et al.</i> , 2015
MTOR	c.4448C>T	p.Cys1483Tyr	14	D’Gama <i>et al.</i> , 2015
			9.7	Lee <i>et al.</i> , 2012.
PIK3CA	c.1624G>A	p.Glu542Lys	16	Lee <i>et al.</i> , 2012.
			31	Jasen <i>et al.</i> , 2015
			28	D’Gama <i>et al.</i> , 2015
PIK3CA	c.1633G>A	p.Glu545Lys	N/A	Lee <i>et al.</i> , 2012.
			17	D’Gama <i>et al.</i> , 2015
			18	D’Gama <i>et al.</i> , 2015
PIK3CA	c.1631C>A	Thr544Asn	31	D’Gama <i>et al.</i> , 2015
PIK3CA	c.3140A>G	p.His1047Arg	13	D’Gama <i>et al.</i> , 2015
MTOR	c.4448C>T	p.Cys1483Tyr	14	D’Gama <i>et al.</i> , 2015
MTOR	c.5005G>T	p.Ala1669Ser	44	D’Gama <i>et al.</i> , 2015
DEPDC5	c.1265G>A	p.Arg422Gln	N/A	D’Gama <i>et al.</i> , 2015
TSC2	c.5138G>A	p.Arg1713His	Germline50%	D’Gama <i>et al.</i> , 2015

Anexo 2

Tabela 5: Todas as mutações encontradas após a aplicação dos filtros de patogenicidade e seleção das regiões de interesse.

ID	CHR	POS	VARIANTE	GENE	HGVS_C	HGVS_P	Exon	EFEITO	IMPACTO	DEPH
HME-4146	12	52204038	TA>T	AC068987.1	c.90delA	p.Lys30fs	1	Frameshift_variant	HIGH	460
HME-4146	9	18776784	G>T	ADAMTSL1	c.2557G>T	p.Gly853Trp	19	Missense_variant	MODERATE	133
HME-4146	22	36661897	GC>G	APOL1	c.1067delC	p.Pro356fs	7	Frameshift_variant	HIGH	584
HME-4146	3	49897254	C>G	CAMKV	c.1003G>C	p.Ala335Pro	11	Missense_variant	MODERATE	169
HME-4145	13	103381995	CA>C	CCDC168	c.7164delT	p.Phe2388fs	1	Frameshift_variant	HIGH	258
HME-4145	15	93545433	G>GA	CHD2	c.4173dupA	p.Gln1392fs	33	Frameshift_variant	HIGH	256
HME-4145	22	32193674	C>T	DEPDC5	c.856C>T	p.Arg286*	12	Stop_gained	HIGH	699
HME-4146	17	18653309	C>CT	FBXW10	c.954dupT	p.Pro319fs	3	Frameshift_variant	HIGH	658
HME-4145	2	227660628	T>G	IRS1	c.2827A>C	p.Lys943Gln	1	Missense_variant	MODERATE	585
HME-4146	12	53227844	GC>G	KRT79	c.200delG	p.Gly67fs	1	Frameshift_variant	HIGH	602
HME-4146	19	48997151	C>G	LMTK3	c.3979G>C	p.Ala1327Pro	13	Missense_variant	MODERATE	105
HME-4145	1	74575212	G>GT	LRRIQ3	c.732dupA	p.Gln245fs	5	Frameshift_variant	HIGH	239
HME-4145	4	164450129	A>C	MARCH1	c.1409T>G	p.Phe470Cys	10	Missense_variant	MODERATE	260
HME-4145	MT	6431	A>G	MT-CO1	c.528A>G	p.Ile176Met	1	Missense_variant	MODERATE	1763
HME-4145	MT	5319	A>G	MT-ND2	c.850A>G	p.Thr284Ala	1	Missense_variant	MODERATE	1448
HME-4145	MT	12662	A>G	MT-ND5	c.326A>G	p.Asn109Ser	1	Missense_variant	MODERATE	1227
FCD-6584	1	11174420	C>T	MTOR	c.7255G>A	p.Glu2419Lys	53	Missense_variant	MODERATE	465
HME-4146	X	17744453	C>T	NHS	c.2164C>T	p.Pro722Ser	6	Missense_variant	MODERATE	454
HME-4145	14	79454391	T>G	NRXN3	c.3136T>G	p.Ser1046Ala	13	Missense_variant	MODERATE	318
HME-4145	9	125391770	C>CA	OR1B1	c.44dupT	p.Leu15fs	1	Frameshift_variant	HIGH	199
HME-4145	4	160277040	A>C	RAPGEF2	c.4204A>C	p.Thr1402Pro	23	Missense_variant	MODERATE	371
HME-4146	2	152293859	GC>G	RIF1	c.1482delC	p.Asp495fs	12	Frameshift_variant	HIGH	404
HME-4146	9	35548440	GC>G	RUSC2	c.1927delC	p.Leu643fs	2	Frameshift_variant	HIGH	525
HME-4145	13	23914686	AT>A	SACS	c.3328delA	p.Ile1110fs	9	Frameshift_variant	HIGH	246
HME-4146	19	1116867	TC>T	SBNO2	c.1762delG	p.Glu588fs	16	Frameshift_variant	HIGH	1054
HME-4146	13	23808762	C>A	SGCG	c.208C>A	p.His70Asn	3	Missense_variant	MODERATE	222
HME-4145	11	63078478	G>GA	SLC22A10	c.1607dupA	p.Asn536fs	10	Frameshift_variant	HIGH	348
HME-4146	11	63149670	CA>C	SLC22A9	c.1005delA	p.Lys335fs	6	Frameshift_variant	HIGH	247
HME-4145	5	176813480	G>A	SLC34A1	c.445G>A	p.Gly149Arg	5	Missense_variant	MODERATE	852
HME-4146	3	136573485	GA>G	SLC35G2	c.192delA	p.Arg66fs	2	Frameshift_variant	HIGH	517
HME-4146	1	11169377	A>T	MTOR	c.7498A>T	p.L7105f	7	Missense_variant	MODERATE	105
HME-4149	3	178936082	G>A	PIK3CA	c.1624G>A	p.E542K	8	Missense_variant	MODERATE	90
HME-4143	3	178927980	T>C	PIK3CA	c.1258T>C	p.C420R	6	Missense_variant	MODERATE	93

Anexo 3

Ministério da Educação - MEC
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES
Setor Bancário Norte, Quadra 2, Bloco L, Lote 06
CEP 70040-020 - Brasília, DF

Prezado (a) Senhor (a),
CAMILA ARAUJO BERNARDINO GARCIA
Joaquim Zeferino - 1065
Vila Santos Dumont
Franca - São Paulo
Brasil
14.405-273

16 de Maio de 2018

Processo: PDSE 88881.131913/2016-01

CARTA DE REGULARIZAÇÃO - DOCUMENTOS DE RETORNO

Prezado(a) Ex-bolsista,

Confirmamos o recebimento dos documentos referentes à prestação de contas de retorno do período de estudos no exterior, com bolsa na modalidade **DOCTORADO SANDUÍCHE**.

Após o seu retorno, inicia-se o período previsto para o cumprimento da permanência obrigatória no Brasil, denominado interstício, durante o qual V.S.^a deverá permanecer no país por período igual ao da vigência da bolsa financiada pela CAPES.

Ao término do interstício, V.S.^a deverá atualizar seu **Currículo Lattes**, citando a sua participação no Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior, mencionando a CAPES como instituição de fomento, e enviar documentos que comprovem sua permanência no País.

No caso de seus estudos no exterior terem lhe rendido algum prêmio, patente, publicação ou sua experiência tenha gerado algum evento de impacto na sua comunidade no exterior ou no Brasil, V.S.^a deverá mencionar isso no seu relatório final online, bem como entrar em contato conosco, via LINHA DIRETA (<https://linhadireta.capes.gov.br/linhadireta>), para que possamos divulgar essas realizações inspiradoras neste grupo de excelência que são os ex-bolsistas CAPES.

Atenciosamente,

Adi Balbinot Junior

Coordenador (a) Geral de Acompanhamento e Monitoramento de Resultados

Esta assinatura independe de reconhecimento de firma, por se tratar de documento público

- Art. 19, Inciso II - Constituição Federal do Brasil

Anexo 4

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Genética da displasia cortical focal e epilepsias tratadas por neurocirurgia

Pesquisador: Camila Araújo Bernardino Garcia

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;;)

(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniente com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;;)

Versão: 6

CAAE: 45039915.0.0000.5440

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.575.305

Anexo 5

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 08 de junho de 2016

Ofício nº 1922/2016
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 6978/2015

**“GENÉTICA DA DISPLASIA CORTICAL FOCAL E EPILEPSIAS TRATADAS POR
NEUROCIRURGIA”**

Prezados Senhores,

O Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 429ª Reunião Ordinária, realizada em 06/06/2016, analisou e aprovou as respostas frente às recomendações solicitadas pela CONEP referentes ao Termo de Assentimento -15 à 18 anos – versão de 20/05/2016 e o Termo de Assentimento – 7 à 15 anos, versão 20/05/2016.

Atenciosamente.

DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP