# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

#### BIANCA MARA ALVES DE ANDRADE

Estudo molecular da epilepsia mioclônica progressiva de Unverricht-Lundborg (emp1) na população brasileira

Ribeirão Preto

#### BIANCA MARA ALVES DE ANDRADE

# Estudo molecular da epilepsia mioclônica progressiva de Unverricht-Lundborg (emp1) na população brasileira

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Neurologia

Subárea: Neurociências e Ciências do Comportamento

Orientador: Prof. Dr. Wilson Marques

Júnior

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

# FICHA CATALOGRÁFICA

De Andrade, Bianca Mara Alves.

Estudo molecular da epilepsia mioclônica progressiva de Unverricht-Lundborg (emp1) na população brasileira. Ribeirão Preto, 2018.

p79.: il.;30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Neurologia.

Orientador: Marques Júnior, Wilson

- 1. DUL (Doença Unverricht-Lundborg). 2. CSTB.
- 3. Cistatina B. 4. EMP1 (Epilepsia Mioclonica Progressiva tipo 1).
- 5. Crises mioclonicas.

Unverricht-Lundborg (emp1) na popula	r da epilepsia mioclônica progressiva de ação brasileira. Dissertação apresentada à Universidade de São Paulo para obtenção do
Aprovado em:	
Banca Ex	aminadora
Prof. Dr.  Julgamento:	Instituição: Assinatura:

Dedico esta dissertação a minha mãe Maria Lucia e ao meu pai Luiz Carlos por sempre estarem ao meu lado e por serem os meus maiores exemplos de vida.

Dedico também ao meu esposo William por acreditar em meus sonhos, pelo apoio e pela confiança em minhas escolhas.

#### Agradecimentos

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida por iluminarem meu caminho e possibilitarem a conclusão de mais essa etapa na minha formação profissional.

Aos meus pais, Luiz Carlos e Maria Lúcia, pelo amor mais puro, incondicional e esforço despendido em minha formação pessoal e profissional.

Ao meu esposo, William, pela cumplicidade, amor, carinho e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos Luiz Henrique e Danilo por acreditarem em minhas escolhas e torcerem pela minha felicidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wilson Marques Júnior, ter tido a generosidade, a tranquilidade, a humildade, pela oportunidade e por todos os ensinamentos que me proporcionou nos caminhos científicos e pelo apoio na construção do conhecimento. Pela correção das minhas imperfeições e pela confiança em meu trabalho.

A Prof. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Ferreira da Rosa Sobreira pela generosidade de ter cedido as amostras de pacientes para o meu estudo.

Ao Prof. Dr. Charles Marques Lourenço pela atenção, pelos conhecimentos científicos e pelo auxilio durante a construção deste trabalho.

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, especialmente a Daiana, Larissa, Renato, Sandra, Silmara, Silvia, Vivian, pela contribuição na realização das metodologias, vivências compartilhadas e, principalmente, pela amizade.

À Sandra Elisabete Marques, que me deu a oportunidade de estagiar no laboratório, me proporcionou os conhecimentos das técnicas do laboratório com comprometimento, zelo e dedicação, pelo apoio e pela construção de nossa amizade.

À Silvia, que além de colega de trabalho se tornou uma amiga. Obrigada por acreditar em mim desde o começo, por todos os ensinamentos e conhecimentos que tem me passado, por toda a ajuda profissional e pela sincera amizade.

À Larissa e a Vivian, que tornaram minhas amigas, agradeço pelos grandes momentos vividos e por sempre me apoiarem e acreditarem em mim. Obrigada pela amizade.

Aos colegas de pós-graduação, Aline, Alex, Claudinha, Fernanda, Ivan, Reginaldo e Rafael (aluno de iniciação científica), pelas experiências e conhecimento compartilhados;

À Silvana, que foi secretária da Neurologia, pela disponibilidade, paciência e resolução de problemas;

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelos ensinamentos acadêmicos, científicos e pelo núcleo profissional de excelência.

À Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPQ, pela bolsa concedida durante os anos do curso;

Aos pacientes que participaram desta pesquisa, pois sem eles, nenhuma destas páginas estaria completa.

#### **RESUMO**

De Andrade, B. M. A. **Estudo molecular epilepsia mioclônica progressiva de Unverricht- Lundborg (emp1) na população brasileira.** 2018. 79 folhas. Dissertação (Mestrado) — Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A doença de Unverricht-Lundborg (DUL) é considerada uma doença rara, autossômica recessiva, sendo também denominada de Epilepsia Mioclônica Progressiva do tipo1 (emp1), causada por mutações no gene codificador (CSTB) da proteína cistatina B. A cistatina B é uma proteína essencial para a regulação dos processos fisiológicos do ser humano, e sua expressão reduzida parece ser a causa primária da EMP1. A doença em geral se inicia entre os seis e dezesseis anos, manifestando-se tanto como crises mioclônicas como por crises tônicoclônicas generalizadas. Trata-se de uma doença grave e limitante, cujo diagnóstico preciso é extremamente importante para as condutas apropriadas, incluindo aconselhamento genético. Este estudo tem como objetivo o estudo molecular e caracterização da expansão instável de repetição dodecamérica (CCCCGCCCCGCG) da região promotora 5' não traduzida do gene CSTB entre pacientes com suspeita de EMP1 na população brasileira. No presente estudo, selecionamos 64 pacientes entre eles 54 casos índices do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP) com suspeita de EMP1. Os restantes 10 casos eram parentes dos casos índices. Os 54 pacientes foram seguidos no setor de Epilepsia com diagnostico clinico e eletrofisiológico de EMP1, e foram encaminhados para o setor de Neurogenética para diagnostico molecular. Destes 54 casos índices, apenas 5 foram diagnosticados através da biologia molecular com expansão dodecamera acima de 30 repetições, sugestivo de DUL. Espera-se, com este estudo, identificar a população de pacientes com EPM1 que tenham mutação no gene CSTB e com os resultados de este projeto possibilitar assim um melhor entendimento da etiopatogenia e proporcionar um diagnóstico preciso dos casos de DUL.

**Palavras-chave**: DUL (Doença Unverricht-Lundborg). *CSTB*. Cistatina B. EMP1 (Epilepsia Mioclonica Progressiva tipo 1). Crises mioclonicas.

#### **ABSTRACT**

De Andrade, B. M. A. Molecular progressive myoclonic epilepsy study of Unverricht-Lundborg (emp1) in the Brazilian population. 2018. 79 pages. Dissertation (Master). Ribeirão Preto School of Medicine, University of Sao Paulo, 2018.

Unverricht-Lundborg disease (ULD) is considered a rare autosomal recessive disease, also known as Progressive Myoclonic Epilepsy Type 1 (EMP1), caused by mutations in the CSTB gene, which provides instructions for making a protein called Cystatin B. Such protein is essential for regulating a person's physiological processes, and its reduced expression seems to be the first cause of EMP1. Affected individuals usually begin showing signs and symptoms of the disorder between the ages of 6 and 16, which manifests both as myoclonus or as generalized tonic-clonic crises. It is a grave and limiting condition whose precise diagnosis is extremely important for appropriate conducts, including genetic counseling. This study has as a goal the molecular evaluation and characterization of the unstable expansion of the decametric repetition (CCCCGCCCCGCG) from the non-translated CSTB's 5' gene promoter region among Brazilian patients with suspected EMP1. In this study, 64 patients were selected, among them 54 key figures from Hospital das Clínicas of Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP) with suspected EMP1. The other 10 figures were related to the key figures. The 54 patients were followed in the Epilepsy sector with EMP1 clinical and electrophysiological diagnostics and were forwarded to the neurogenetics sector for a molecular diagnostic. From such 54 key figures, only 5 were diagnosed through molecular biology with decametric expansion above 30 repetitions, suggestive of ULD. This study is aimed to identify the EPM1 patients with CSTB genetic mutation and hopefully the results of this identification will enable a better understanding of the etiopathogeny and provide with a exact diagnosis of ULD cases.

**Keywords:** DUL (Unverricht-Lundborg disease). CSTB. Cystatin B. EMP1 (Progressive Myoclonic Epilepsy type 1). Myoclonic seizures.

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática da subdivisão das epilepsias
Figura 2 -	Os membros da super família das cistatinas e seus domínios
Figura 3 -	Conformação proteica da cistatina B
Figura 4 -	Interação entre o complexo da cistatinaB e a papaina
Figura 5 -	Uma visão geral da região genômica em torno do gene CSTB e do dodecamero
Figura 6 -	Regiões do gene CSTB
Figura 7 -	Ilustração da estrutura do gene CSTB e a localização e sequencia do normal polimórfico (2 ou 3 copias) 12-mer repetição (dodecamera)
Figura 8 -	Representação do modelo para a repressão da transcrição do gene CSTB em EPM1
Figura 9 -	Classificação de algumas enzimas proteoliticas
Figura 10 -	Visualização do resultado amplificação do produto PCR em condições descritas na Tabela 4 em gel de agarose 2,5%
Figura 11 -	Visualização do resultado amplificação da expansão
Figura 12 -	Visualização do resultado amplificação da expansão em condições descritas na Tabela 4 em gel de agarose 2,5%

Figura 13 -	Visualização do resultado amplificação da expansão
Figura 14 -	Visualização do resultado amplificação da expansão em condições descritas na Tabela 4 em gel de agarose 2,5%
Figura 15 -	Resultado da amplificação da variação polimorficas
Figura 16 -	Resultado da amplificação da variação polimorficas em condições descritas na Tabela 4 em gel de agarose 2,5%
Figura 17 -	Resultado da amplificação da variação polimorfica
Figura 18 -	Resultado da amplificação da variação polimorficas em condições descritas na Tabela 4 em gel de agarose 2,5%
Figura 19 -	Resultado da amplificação da variação polimorficas
Figura 20 -	Resultado da amplificação da variação polimorficas
Figura 21 -	Resultado da amplificação da variação polimorficas em condições descritas na Tabela 4 em gel de agarose 2,5%
Figura 22 -	Localização de repetições expansíveis responsáveis por doenças humanas 63
Figura 23 -	Visualização de estruturas de DNA incomuns formadas por repetições expansiveis
Figura 24 -	Amplificação definida da reação em cadeia da polimerase (PCR)usando DNA desaminado para as expansões repetidas
Figura 25 -	Detecção de PCR de repetições amplificadas da região dodecâmera no gene CSTB em 2% de gel de agarose

Figura 26 -	Detecção da repetição dodecâmera CSTB mutação por expansão feitra por
	PCR
Figura 27 -	Eletroforese em gel de agarose mostrando amplificados por PCR expansões de
	repetição dodecamera de alelos normais CTSB

# LISTA DE HEREDOGRAMAS

<b>Heredograma 1</b> – Familia do paciente DUL 7731	. 52
Heredograma 2 – Família do paciente DUL 7766	. 53

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Genética molecular da EMP
Tabela 2 –	Características clinicas entre as EMPs
Tabela 3 –	Mutações em CSTB subjacente à doença de Unverricht-Lundborg (EPM1) 34
Tabela 4 –	Descrição dos primers e condições para amplificação da expansão dodecamera
Tabela 5 –	Pesquisa da expansão do gene CSTB nos casos índice
Tabela 6 –	Características clinicas dos pacientes confirmados para DUL
Tabela 7 –	Valores de frequência mutacional expansão e variação polimórfica da região dodecamera

### LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

μL Microlitro

μM Micromolar

°C Graus Celsius

DAE Drogas Antiepileticas

DNA Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

DNTP Dexoxirribonucleotideos Fosfatados

DL Doença de Lafora

DRPLA Atrofia Dentatorrubropalidolusiana

DUL Doenca de Unverricht Lundborg

EDTA Etileno Diamino Tetracético

EEG Eletroencefalograma

EMP Epilepsia Mioclonica Progressiva

EMP1 Epilepsia Mioclonica Progressiva tipo 1

HC-FMRP Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

IBE Internation Bureau de Epilepsia

ILAE Internation League Against Epilepsy

KO Knockout

LCN Lipofuscinose Ceroide Neuronais

MERRF Myoclonic Epilepsy with ragged red fibres

MgCl<sub>2</sub> Cloreto de Magnésio

NG Nanograma

PB Pares Bases

PCR Reação cadeia polimerase

RPM Rotação por minuto

SNC Sistema Nervoso Central

TBE Tris Acido Borico Edta

TCLE Termo de Consentimento Livre Esclarecido

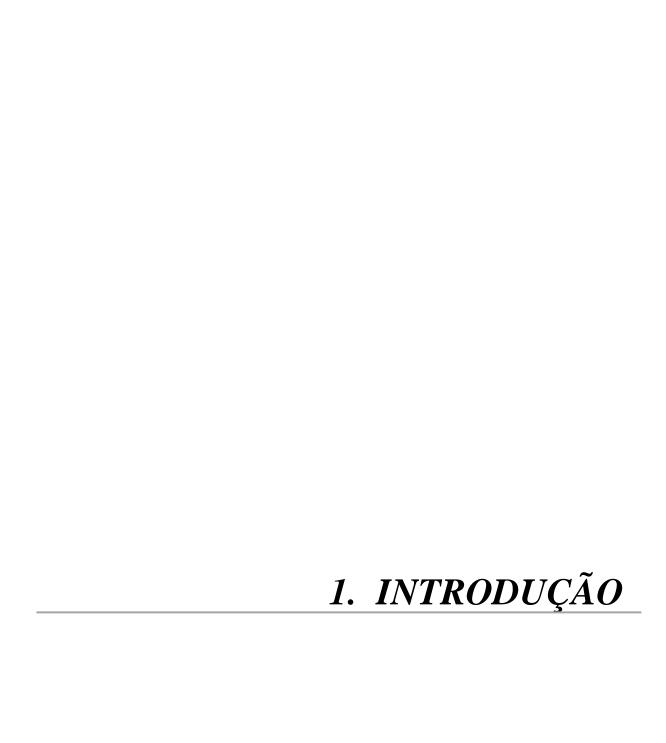
USP Universidade de São Paulo

# **SUMÁRIO**

1	INT	TRODUÇÃO	19				
	1.1	CONCEITOS SOBRE EPILEPSIA	20				
		1.1.1 Epilepsias Mioclonicas Progressivas	21				
	1.2 DOENÇA DE UNVERRICHT LUNDBORG (DUL) OU EPILEPSIA M						
		PROGRESSIVA TIPO 1 (EMP1)	24				
		1.2.1 Características clinicas	25				
		1.2.2 Diagnostico	25				
		1.2.3 Fisiopatologia	26				
		1.2.4 Cistatinas	26				
		1.2.5 Cistatina B e sua função biologica	28				
		1.2.6 Patogênense da EMP1	29				
		1.2.7 Gene <i>CSTB</i>	30				
		1.2.8 Mutações associadas a Epilepsia Mioclonica Progressiva tipo 1	31				
		1.2.8.1 Expansão do dodecâmero (CCCCGCCCGCG)n	31				
		1.2.8.2 Outras mutações	33				
		1.2.9 Catepsinas	34				
		1.2.10 Tratamento da EMP1	36				
	1.3	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	36				
2	OB	JETIVOS	38				
3	PA	CIENTES E MÉTODOS	40				
	3.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	41				
	3.2	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	41				
		3.2.1 Pacientes	41				
		3.2.2 Grupo Controle	41				
	3.3	MÉTODOS	42				
		3.3.1 Coleta de Sangue	42				
		3.3.2 Extração do DNA	42				
		3.3.3 Seleção dos primers	44				
		3.3.4 Reação em cadeia de polimerase (PCR)	44				

3.3.5 Análise mutacional (expansão dodecamera) do gene CSTB e verificação	o dos
produtos de PCR	45
3.3.6 Análise Bioinformatica	46
4 RESULTADOS	47
4.1 GRUPO CONTROLE	48
4.2 PACIENTES	48
4.3 HEREDOGRAMA DOS PACIENTES DUL 7731 E DUL 7766	52
4.4 DETECÇÃO DE EXPANSÕES ANORMAIS POR ELETROFORESE EM GE	L DE
AGAROSE A 2,5%	53
4.4.1 DUL 7731 e DUL 7766 com expansões de 62/62 repetições da região 53	UTR
dodecâmera do gene CSTB e um dos resultados confirmados foi através doe	studo
familiar da mãe portadora da DUL 7766	53
4.4.2 DUL 3156 e DUL 13385 com expansões de 62/62 repetições região 53	UTR
dodecâmera do gene CSTB	55
4.4.3 DUL 5062 com expansões de 62/62 repetições região 5'UTR dodecâme	
gene CSTB	56
4.5 APRESENTAÇÃO DA VARIAÇÃO POLIMORFICA (3/3), (2/2) E (2/3)	DC
DODECAMERO (CCCCGCCCGCG) EM PACIENTES INDICES NEGATI	VOS
PARA A EXPANSÃO	
4.6 EXPANSÕES ENCONTRADAS NA REGIÃO 5'UTR DODECAMERA DO C	
<i>CSTB</i>	
4.7 FREQUENCIA MUTACIONAL DA EXPANSÃO DODECAMERA DO G	
CSTB NA POPULAÇÃO BRASILEIRA COM A DOENÇA DE DU	
FREQUENCIA DA VARIAÇÃO POLIMORFICA DO DODECAM	
(CCCCGCCCCGCG) NO RESTANTE DOS INDIVIDUOS NEGATIVOS PAR	
EXPANSÃO	61
5 DISCUSSÃO	62
5.1 EM RELAÇÃO A EXPANSÃO E AOS METODOS DIAGNOSTICOS	63
5.2 A RESPEITO DA MUTAÇÃO (EXPANSÃO)	
5.3 VARIAÇÃO POLIMORFICA	68
6 CONCLUSÕES	70
7 BIBLIOGRAFIAS	. 72

8	APÊNDICE	76
9	ANEXO	78



#### 1.1 CONCEITOS SOBRE EPILEPSIA

A epilepsia é uma desordem cerebral caracterizada predominantemente pela recorrente e imprevisível interrupção da função cerebral normal, gerando descargas irritativas e as consequentes crises epiléticas (FISHER et al., 2005).

De acordo com International League Against Epilepsy (ILAE), em documento de 2005, a epilepsia é um "distúrbio cerebral causado por predisposição persistente do cérebro para gerar crises epilépticas e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicossociais e sociais da condição caracterizada pela ocorrência de pelo menos uma crise epilética" (FISHER et al., 2005).

O termo "desordem" é em geral mal compreendido pela população e minimiza a natureza séria da epilepsia, o que fez com que a ILAE e o International Bureau de Epilepsia (IBE) tenham redefinido epilepsia como sendo uma doença cerebral (FISHER et al., 2014).

A epilepsia é uma das condições neurológicas mais comuns dos seres humanos, com uma prevalência de 3% na população geral. A causa de pelo menos 40-50% de todas as formas de epilepsia não é conhecida, sendo classificadas como idiopáticas (Figura 1) (CERU et al., 2005).



Figura 1: Representação esquemática da subdivisão das epilepsias. Fonte: Adaptado de (CERU et al., 2005).

Nas epilepsias de causa genética, a hiperexcitabilidade neural está associada a mutações em vários genes envolvidos na comunicação neural e na produção de energia (NAPOLIONI, 2009).

#### 1.1.1 Epilepsias Mioclonicas Progressivas

As Epilepsias Mioclonicas Progressivas (EMPs) são um grupo bastante heterogêneo e incomum de epilepsias, com forte componente genético e evolução desfavorável. A deterioração neurológica é variável a depender da etiologia e pode levar a manifestações que alteram drasticamente as atividades de vida diária e qualidade de vida do paciente (SIQUEIRA, 2010).

O aparecimento dos sintomas varia desde a infância até a adolescência, mas podem aparecer na idade adulta. A maioria das desordens que causam EMP podem ser diagnosticadas com origem genética conhecida (ZUPANC; LEGROS, 2004).

As mioclonias são tipicamente fragmentadas e multifocais, sendo muitas vezes precipitadas pela postura, ação ou estímulos externos tais como luz, som ou contato. Elas são particularmente aparentes na musculatura da face e nas extremidades distais (SHAHWAN; FARRELL; DELANTY, 2005).

São reconhecidas, no momento, seis condições que causam a EMP, cuja identificação precisa foi possível devido aos avanços da genética molecular (SHAHWAN; FARRELL; DELANTY, 2005). As características comparativas entre as seis EMPs em negrito são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Genética molecular da EMP

Doença	Herança	Locus Cromossomo	Gene	Proteína	Função	Mutação
DUL	AR	Ch21q22.3	CSTB	Cistatina B	Inibidora protease cisteina	Expansão instável da repetição dodecamera ou mutações de ponto
Doença de Lafora	AR	Ch6q24 Ch6q22	EMP2A NHLRC1	Laforina 	Dupla especificidade proteína tirosina fosfatase	Mais de 20 mutações
MERRF	Maternal	Dna Mitocondrial	MTTK	tRNALys	Metabolismo e função mitocondrial	Mutações de ponto
LCN						
Clássica infância tardia	AR	Ch11p15	TPP1	Tripeptideo peptidase 1	-	Várias
Juvenil	AR	Ch6p	CLN3	-	-	1-02 kbp deleções
Adulto (Doença Kufs)	AR/AD	-	-	-	-	-
Variante tardia infantil finlandesa	AR	Ch13q21-q32	CLN5	-	-	CLN5 maioria finlandesa
Variante tardia infantil	AR	Ch15q21-23	CLN6	-	-	Várias
Sialidoses						
Tipo I	AR	Ch6p21.3	NEU1	Sialidase 1	-	Várias
Tipo II	AR	Ch20	NEU1	Sialidase 1	-	Várias
ADRPL	AD	Ch12p13.31	DRPLA	Atrofina 1	-	Expansão instável da repetição CAG

**DUL**-Doença de Unverricht Lundborg, **MERRF**- Epilepsia mioclonica com fibras vermelhas irregulares, **LCN**- Lipofuscinoses ceróides neuronais e **ADRPL**- Atrofia dentatorrubropa- lidoluisiana Fonte: Adaptado de (SHAHWAN; FARRELL; DELANTY, 2005)

A doença de Lafora (DL) é de herança autossômica recessiva. Na maioria dos pacientes, o inicio dos sintomas ocorre com o surgimento de crises epilépticas entre os 12 e os 17 anos de idade (SIQUEIRA, 2010), sendo caracterizada pela presença de epilepsia mioclonica, demência e corpos de Lafora, que são inclusão de poliglicanos intracelulares que se coram positivamente pelo Schiff e são encontrados nos neurônios, coração, músculo esquelético, fígado e células do duto da glândula sudorípara (SHAHWAN; FARRELL; DELANTY, 2005; SIQUEIRA, 2010).

Mais de 80 % dos pacientes com a doença tem uma mutação no gene *EMP2A* no cromossomo 6q24. A confirmação do diagnostico se dá pela identificação dos corpúsculos de Lafora em material de biopsia (SIQUEIRA, 2010).

A epilepsia mioclonica com fibras vermelhas irregulares ou myoclonic epilepsy with ragged red fibres (MERRF) é uma das causas comuns da EMP (SHAHWAN; FARRELL; DELANTY, 2005). A MERRF tem padrão de herança mitocondrial, também conhecido como

herança materna. Este padrão de herança associa-se aos genes *MT-TK*, *MT-TL1*, *MT-TH* e *MT-TS1*contidos no DNA mitocondrial, caracterizando-se a doença MERRF. Mutações no gene *MT-TK* são a causa mais comum de MERRF, ocorrendo em mais de 80% dos casos. Menos freqüentemente, mutações nos genes *MT-TL1*, *MT-TH e MT-TS1* foram relatados causando os sinais e sintomas da MERRF (SATISHCHANDRA; SINHA, 2010).

A síndrome MERRF se caracteriza por mioclonia, epilepsia generalizada, ataxia e fibras vermelhas rasgadas na biópsia muscular. Seu espectro clínico varia amplamente inclusive dentre os membros da mesma família, tendo a idade de início extremos de 3 a 62 anos (SIQUEIRA 2010).

Lipofuscinoses Ceróides Neuronais (LCN) são, coletivamente, a encefalopatia progressiva hereditária mais comum da infância, com frequência de 7-8 por 100.000 nascidos vivos. Todas as formas de LCNs são caracterizadas por morte neuronal progressiva no sistema nervoso central (SNC), causando epilepsia e progressivo declínio mental e físico (JALANKO; TYYNELA; PELTONEN, 2006). O acúmulo de lipopigmentos auto fluorescentes conhecidos como lipofuscina ceróide é o achado histológico comum a este grupo (SIQUEIRA 2010). A herança, em geral, é autossômica recessiva, com exceção de algumas formas adultas, onde predomina a herança autossômica dominante. (SIQUEIRA 2010).

A Sialidose do tipo I (síndrome mioclônica com mancha vermelho cereja) é causada pela deficiência da alfa neuraminidase. Tem início juvenil ou adulto com mioclonias de ação e intenção, crises tônico-clônicas e perda visual lenta e progressiva. As sialidoses são doenças de herança autossômica recessiva e o gene da sialidose humana (NEU1) se localiza no locus 6p21.3 (SIQUEIRA 2010).

A Sialidose do tipo II é uma doença grave de início infantil associado a deformidades ósseas, dismorfismo, mioclonia, mancha vermelho cereja e letalidade precoce (RAMANCHANDRAN et al., 2009). É causada por deficiência dos ácidos N-acetil neuraminidase e beta galactosialidase (SHAHWAN; FARRELL; DELANTY, 2005).

A atrofia dentatorrubropalidoluisiana (DRPLA) é uma doença neurodegenerativa rara, de herança autossômica dominante, caracterizada por ataxia cerebelar, coreoatetose, mioclonias, epilepsia, demência e sintomas psiquiátricos (SIQUEIRA 2010). Pacientes com início antes dos 20 anos freqüentemente apresentam o fenótipo de EMP, caracterizada por ataxia, convulsões, mioclonia e progressiva deterioração intelectual.

#### INTRODUÇÃO

A DRPLA é causada por uma expansão instável de repetições CAG no gene *DRPLA*, localizado na região12p13.31(SHAHWAN; FARRELL; DELANTY, 2005). As alterações anatomopatológicas consistem de degeneração dos sistemas dentato-rubro-palido- luisiano. O diagnóstico é confirmado pela identificação do número anormal de repetições CAG no teste genético (SIQUEIRA 2010).

Algumas características clinicas entre as EMPs são apresentadas na Tabela 2 (SHAHWAN; FARRELL; DELANTY, 2005).

Tabela 2 – Características clinicas entre as EMPs

Doença	Idade de início (anos)	Convulsões Proeminentes	Sinais Cerebelares	Demência	Fundo	Dimorfismo
DUL	6-15	Mioclonias	Suave ou Tardio	Suave e tardia ou ausente	Normal	Não
Doença de Lafora	12-17	Miocloniase Convulsões occipitais	Cedo	Cedo e implacável	Normal	Não
MERRF	Qualquer idade	Mioclonias ++	Variável	Variável	Com ou sem atrofia ótica ou retinopatia	Com ou sem
LCN	Variável	Variável	Variável	Rapidamente Progressiva	Degeneração macular e falha visual, exceto doença Kufs	Não
Sialidoses	Variavel	Mioclonias +++	Gradual	Ausente no tipol; dificuldade para aprender no tipoll	Mancha Cherry- vermelha	TipoII ++
+ = característica proeminente.						

Fonte: Adaptado de (SHAHWAN; FARRELL; DELANTY, 2005)

# 1.2 DOENÇA DE UNVERRICHT LUNDBORG (DUL) OU EPILEPSIA MIOCLONICA PROGRESSIVA TIPO1 (EMP1)

A EMP1 é uma doença autossômica recessiva descrita por Unverricht, em 1891, e Lundborg, em 1903. Foi inicialmente reconhecida em 12 famílias finlandesas, sendo, posteriormente, descrita na Europa Meridional e Norte da África. Há também casos esporádicos relatados em diversas partes do mundo (SIQUEIRA, 2010).

A Finlândia apresenta a maior prevalência de DUL 4:100.000 nascidos vivos, mas as áreas do Mediterrâneo e da América do Norte também parecem ter prevalência aumentada (DUARTE et al., 2015).

#### 1.2.1 Características Clínicas

Os sintomas iniciais geralmente aparecem entre os seis e os dezesseis anos, tanto na forma de crises mioclônicas como na de crises tônico-clônicas generalizadas (KALVIAINEN et al., 2008).

A mioclonia torna-se mais frequente entre 5 a 10 anos após o início dos sintomas característicos, são progressivas e cerca de um terço dos pacientes tornam-se gravemente incapacitados, indo para cadeira de rodas, tornando-se incapazes de comer e beber sem auxílio (KALVIAINEN et al., 2008). Embora as mioclonias sejam incapacitantes e resistentes à terapia, os pacientes geralmente aprendem a suportá-las e, com suporte adequado, terem vida ativa. (KALVIAINEN et al., 2008).

As características anormais parecem ser mais proeminentes durante a fase inicial da doença, estando associadas aos abalos mioclônicos e às crises tónico-clônicas generalizadas, as quais tendem a diminuir ao longo da doença, refletindo uma estabilização no EEG (KALVIAINEN et al., 2008). Aproximadamente 15 anos após o início da doença há uma redução gradual das polipontas e da fotossensibilidade (FERLAZZO et al., 2007).

O fenótipo da EPM1 é mais heterogêneo do que se imaginava, sendo que no início podem aparecer ataxia de marcha, incoordenação apendicular, tremor intencional e disartria, havendo grande variabilidade quanto ao grau de gravidade do quadro clínico, mesmo em indivíduos da mesma família (KALVIAINEN et al., 2008) e apesar dessa piora global e progressiva que caracteriza a evolução desta doença, o quadro neurológico costuma se estabilizar após a quarta década de vida. (SIQUEIRA, 2010).

#### 1.2.2 Diagnóstico

O diagnóstico de DUL é baseado em três etapas (CRESPEL et al.,2016):

Avaliação clinica: uma combinação do histórico (idade de início, antecedentes familiares e étnicos, aspectos e progressão de convulsões e mioclonia) e exame clinico-neurológico, incluindo avaliação cognitiva mostrando a ausência de comprometimento severo e progressivo. A exclusão de manifestações como alteração da sensibilidade é igualmente importante.

<u>Avaliação complementar</u>: avaliação do EEG poligráfico e vídeo-gravações de EEG (com avaliação de mudançastempo) e estudos neurofisiológicos também podem ajudar a distinguir DUL de outras EMPs.

<u>Confirmação do diagnóstico</u>: demonstração da uma mutação característica nos 2 alelos no gene CSTB.

#### 1.2.3 Fisiopatologia

O gene *CSTB*, localizado na região 21q22.3, codifica a cistatina B (LALIOTI; ANTONARAKIS; SCOTT, 2003), sendo sua mutação responsável pela EMP1(LEHESJOKI, 2003). A perda geral da função da proteína cistatina B, devido sua expressão reduzida, parece ser a consequência patológica primária da maioria destas mutações (JOENSUU; LEHESJOKI; KOPRA, 2008).

#### 1.2.4 Cistatinas

As cistatinas constituem uma superfamília proteica de inibidores enzimáticos.

Sua principal função é garantir proteção de células e tecidos contra a atividade proteolitica das peptidases lisossômicas que são liberadas ocasionalmente na morte celular normal ou "intencionalmente" pela proliferação de células cancerosas ou por organismos invasores, como parasitas. Podem ser agrupadas em três grandes famílias de proteínas (Figura2) (ABRAHAMSON; FERNANDEZ; NATHANSON, 2003).

#### Cistatinas unico dominio

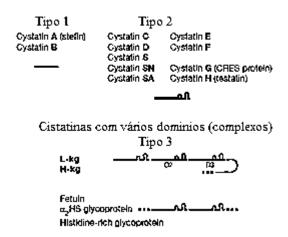


Figura 2: Os membros da super família das cistatinas e seus domínios Fonte: Adaptado de (ABRAHAMSON; FERNANDEZ; NATHANSON, 2003)

As cistatinas do tipo 1 são cistatinas intracelulares que estão presentes no citosol de muitos tipos de células. Elas são polipeptidos de cadeia simples de ~ 100 aminoácidos e não apresentam ligações dissulfureto e nem cadeias laterais de carboidratos (ABRAHAMSON; FERNANDEZ; NATHANSON,2003).

As cistatinas do tipo 2 são principalmente proteínas extracelulares e secretadas. São polipeptidos de cadeia simples que apresentam 120 aminoácidos e duas pontes de dissulfureto conservadas na extremidade C-terminal da sequência. (ABRAHAMSON; FERNANDEZ; NATHANSON,2003).

As cistatinas do tipo 3 são os kininógenos, proteínas multi-domínio. Essas proteínas são cistatinas de alta massa molecular (60-120 kDa) apresentando três domínios inibidores de cistatina de tipo 2 repetidos. São proteínas glicosiladas. Os kininógenos estão localizados em topografia intravascular, sendo encontrados no plasma sanguíneo e, como resultado de difusão, em líquidos sinoviais e amnióticos. (ABRAHAMSON; FERNANDEZ; NATHANSON,2003).

As cistatinas do tipo 1 possuem um domínio inibidor e são potentes inibidores da papaína e das catepsinas L, S e H. As cistatinas do tipo 2 (um domínio inibidor) são importantes inibidores de cisteína e protease endógenos de cisteína proteases de papaína, incluindo cisteínas de cisteína, proteases de parasitas como cruzipain e asparaginil endopeptidase de mamífero (ABRAHAMSON; FERNANDEZ; NATHANSON,2003).

28

INTRODUÇÃO

A atividade inibidora das cistatinas é vital para regulação dos processos fisiológicos,

limitando a atividade extremamente destrutiva das proteases alvo. As falhas nos mecanismos

biológicos que controlam as atividades de protease resultam em muitas doenças, incluindo

doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, osteoporose, artrite e câncer.( TURK;

STOKA; TURK, 2008).

1.2.5 Cistatina B e sua função biológica

A cistatina B é uma proteína monomérica, composta por 98 aminoácidos, sem ligações

dissulfureto intramoleculares (ULBRICH et al., 2014), com peso molecular de 11 Kda

(JOENSUU; LEHESJOKI; KOPRA, 2008). A cistatina humana consiste em uma folha beta

de cinco cadeias enrolada em torno de uma alfa-hélice de cinco curvas (Figura 3) (JOENSUU;

LEHESJOKI; KOPRA, 2008).

Figura 3: Conformação proteica da cistatina B

Fonte: ABRAHAMSON; FERNANDEZ; NATHANSON, 2003

Sua estrutura mostra que a sequência altamente conservada a região QVVAG, está

posicionada no final do primeiro hairpin  $\beta$ , interagindo com a parte inferior da fenda do site

ativo na proximidade direta do resíduo catalítico de cisteína da papaína (Figura 4) (TURK;

STOKA; TURK, 2008).

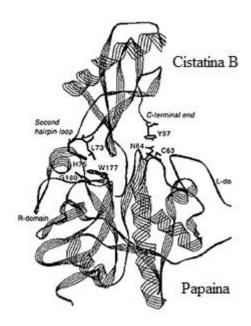


Figura 4: Interação entre o complexo da cistatinaB e a papaina Fonte: Adaptado de (POL; BJORK, 1999)

A cistatina B localiza-se no citosol, no núcleo e na superfície externa dos lisossomas. Interage e inibe a cisteína lisossomal da familia papaina que incluem as proteases catepsinas B, L, S e H. Estes achados sugerem um papel neuro-protetor para a cistatina B, a eliminação do excesso de hidrolases lisossómicas que se decompõem no citoplasma durante o estresse celular (RAMANCHANDRAN et al., 2009).

A evidência adicional sobre múltiplas funções da cistatina B vem do envolvimento de cistatinas no câncer, inflamação, imunidade nativa e de sua presença nas placas amilóides de doenças de Alzheimer, Parkinson e encefalopatias espongiformes (CIPOLLINI et al., 2008).

Em um complexo multiprotêico de cistatina B há uma função cerebelar específica e a perda desta função pode contribuir para a doença em pacientes com EPM1. (GIAIMO et al., 2002).

#### 1.2.6 Patogênese da EMP1

Foram realizados vários estudos com o intuito de esclarecer quais os mecanismos que causam a patogênese EMP, ou seja, entender a deficiência da cistatina B que resulta em EMP1.

#### INTRODUÇÃO

A marca neuropatológica da deficiência da cistatina B em camundongos é perda intensa de células de grânulos cerebelares devido à apoptose celular (JOENSUU; LEHESJOKI; KOPRA, 2008).

Estudos em ratos *knockout* (KO) para cistatinaB sugerem que esta proteína pode desempenhar um papel na proteção de neurônios no estresse oxidativo, conforme indicado por experimentos em culturas primárias de grânulos cerebelares de rato, onde o silenciamento da cistatina B aumenta a morte celular causada pela exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (LEHTINEN et al., 2009).

O estresse oxidativo induz a expressão da cistatina B nos neurônios dos grânulos cerebelares. Portanto o stress oxidativo provoca a cistatina B de forma a proteger os neurônios da morte cerebral, por inibição da atividade da catepsina B. Em contraste, nos neurônios com deficiência em CSTB, o estresse oxidativo levará ao aumento da atividade da catepsina B, provocará dano oxidativo e à morte neuronal (LEHTINEN et al., 2009).

Além de confirmar a perda de neurônios granulares cerebelares pela apoptose em camundongos, há outras descobertas que indicam que a atrofia neuronal é uma consequência importante da deficiência de cistatina B, independente dos eventos convulsivos, sugerindo um papel fisiológico dessa proteína na manutenção da estrutura neuronal normal. (SHANNON et al., 2002).

A cistatina B tem um papel na prevenção de dano celular e, assim, a EPM1 pode ser classificado como um transtorno neurodegenerativo primário. (FRANCESHETTI et al., 2007).

#### **1.2.7** Gene *CSTB*

O gene *CSTB* codifica a cistatina B e está localizado no cromossoma 21 no locus 21q22.3 (Figura 5)(LALIOTI 1998).

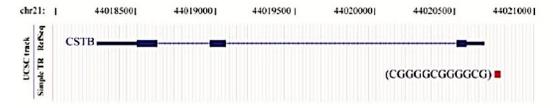


Figura 5: Uma visão geral da região genômica em torno do gene CSTB e do dodecamero Fonte: BOREL, 2012

#### INTRODUÇÃO

O CSTB é expresso de forma ubiquatariamente com um transcrito de 0,8 kb. É composto por três exons, dois introns (Figura 6) e dois potenciais locais de início de transcrição localizados a 67 e 78 nucleotídos abaixo da sequência de repetição polimórfica (5'-CCCCGCCCCGCG-3') (JOENSUU; LEHESJOKI; KOPRA, 2008).

A região promotora caracteriza-se por uma sequência típica de "housekeeping", rico em conteúdo GC (75%), um elevado nível de dinucleótidos CpG e vários locais de ligação Sp1 CCGCCC (ALAKURTTIet al., 2000).

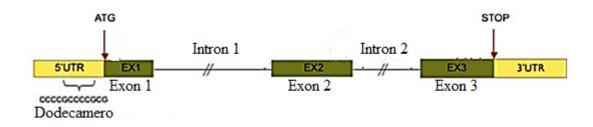


Figura 6: Regiões do gene CSTB

Fonte: Adaptado de (JOENSUU; LEHESJOKI; KOPRA, 2008)

#### 1.2.8 Mutações associadas a Epilepsia Mioclonica Progressiva tipo1

#### 1.2.8.1 Expansão do dodecâmero (CCCCGCCCCGCG)n

A mutação mais frequente no gene CSTB na EPM1, mesmo entre pacientes de diferentes origens étnicas, é uma expansão instável de repetição dodecamérica de bases (CCCCGCCCCGCG) no sentido 5´ da região promotora não traduzida (SHAHWAN; FARRELL; DELANTY, 2005).

A maioria dos alelos normais contém 2 ou 3 repetições (Figura 7), enquanto os indivíduos afetados podem ter expansões do dodecâmero em ambos os alelos, expansão em um e mutações de ponto no outro ou, raramente, mutação de ponto em ambos os alelos. A expansão associada ao fenótipo da doença contém de 30 a 80 repetições. (LALIOTI; ANTONARAKIS; SCOTT, 2003).

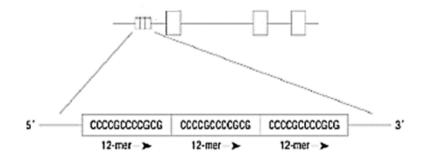


Figura7: Ilustração da estrutura do gene CSTB e a localização e sequencia do normal polimórfico (2 ou 3 copias)12-mer repetição (dodecamera)

Fonte: Adaptado de (NOCKLAIEN et al., 2000).

Uma alteração no espaçamento do sitio de iniciação da transcrição, devido a repetição da expansão (Figura 8), está entre as causas da redução de expressão da CSTB, sendo portanto a causa da EMP1 (LALIOTI; ANTONARAKIS; SCOTT, 2003).

A expansão resulta em uma alteração no gene CSTB reduzindo os níveis de expressão do mRNA. Assim, em pacientes homozigotos para a expansão se verifica uma queda da expressão inferior a 10% comparado com os controles. Estes dados são compatíveis com os estudos promotores in vitro que indicou redução significativa da atividade do promotor de CSTB em presença da mutação de expansão (JOENSUU; LEHESJOKI; KOPRA, 2008).

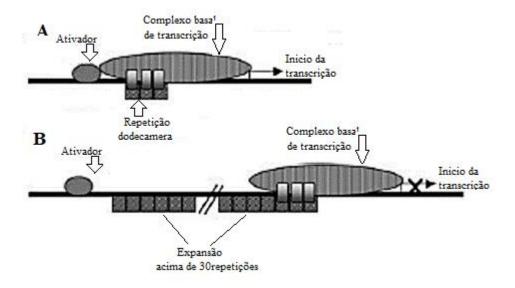


Figura8: Representação do modelo para a repressão da transcrição do gene CSTB em EPM1. A Quando duas a três repetições dododecamer está presente, o ativador de transcrição pode interagir com ocomplexo de transcrição basal. B Mostra a incapacidade do ativador de transcrição para interagir com o complexo, devido a expansão, que deslocou seu site de ligação para uma distância não permissiva.

Fonte: Adaptado de (LALIOTI; ANTONARAKIS; SCOTT, 2003).

#### 1.2.8.2 Outras mutações

Além da expansão, pelo menos 9 outras mutações foram descritas na EPM1 (Tabela 3). A perda geral da função da proteína CSTB, devido sua expressão reduzida, parece ser a consequência patológica primária na maioria delas (JOENSUU; LEHESJOKI; KOPRA, 2008).

As nove mutações CSTB subjacentes a EPM1 afetam os sites de splice (c.67-1G> C, c.168G> A, c.168 +1 \_18del, c.169-2A> G) resultam em mudanças de aminoácidos(c.10G> C, p.G4R; c.149G> A, p.G50E; c.212A> C,p.Q71P) ou promovem o aparecimento de proteínas truncadas (c.202C> T,c.218 219delTC) produzindo um codon de parada prematuro (p.R68X) ou um deslocamento de frameshift (p.L73fsX3) ( JOENSUU; LEHESJOKI; KOPRA, 2008). Com a exceção de p.G4R, essas mutações ocorreram na forma de heterozigotos compostos, apresentando o outro alelo uma expansão. As mutações c.10G> C e c.149G> A resultam na substituição de aminoácidos glicina conservados nas posições 4 e 50 no N-terminal e no primeiro hairpin loop da cistatina B, respectivamente, o que provavelmente afeta a interação com as catepsinas (JOENSUU; LEHESJOKI; KOPRA, 2008). Alternativamente, eles podem mudar a estabilidade ou duração do efeito inibitório da cistatina b. A c.212A> C mutação resulta em uma substituição da glutamina pela prolina na posição 71, perto do segundo hairpin loop do CSTB envolvido na ligação da catepsina. (JOENSUU; LEHESJOKI; KOPRA, 2008).

#### INTRODUÇÃO

Tabela 3- Mutações em CSTB subjacente à doença de Unverricht-Lundborg (EPM1)

Mutações	Posição da mutação no gene/tipo	Consequência da predição na proteína	Referencias
Expansão repetição dodecamera	5 UTR/expansão	Redução da expressão cistatina B	Lafreniere et al.(1997),Lalioti et al.(1997b),Virtaneva et al. (1997)
c.10G>C	Exon 1/missense	p.G4R	Lalioti et al. (1997)a
c.67-1G>C	Intro 1/ sitio splice	p.delV23_K56	Pennacchio et al. (1996), Bespalova et al. (1997b), Lafr'eniere et al. (1997), Lalioti et al. (1997a)
c.149G>A	Exon 2/missense	p.G50E	Joensuu et al. (2007)
c.168>A	Exon 2/sitio splice	Aberrante splicing?	Kagitani-Shimono et al. (2002)
c.168 + 1_18 del	Intron 2/deleção	p.delV23_K56p.V57EfsX28	Joensuu et al. (2007)
c.169-2A>G	Intron 2/sitio splice	Aberrante splicing?	Pennacchio et al. (1996); Lafr`eniere et al. (1997), de Haan et al. (2004)
c.202C>T	Exon 3/nonsense	p.R68X	Pennacchio et al. (1996); Lafr`eniere et al. (1997), de Haan et al. (2004)
c.212A>C	Exon 3/missense	p.Q71P	Haan et al.(2004)
c.218_219delT C	Exon 3/deleção	p.L73fsX3	Bespalova et al. (1997a), Lafr`eniere et al. (1997), Lalioti et al. (1997a)

Fonte: Adaptado de (JOENSUU; LEHESJOKI; KOPRA, 2008).

Estudos realizados com pacientes heterozigotos compostos para a repetição da expansão dodecamera com mutações c.202C>T parecem resultar em uma forma mais severa de EPM1 do que pacientes homozigotos para a expansão (KOSKENCORVA et al; 2011).

#### 1.2.9 Catepsinas

A degradação intracelular de proteínas é uma característica universal das células eucarióticas, sendo vital para a nutrição, rotação das proteínas, sinalização intracelular, desenvolvimento e outros processos fisiológicos importantes, como a apresentação de antígenos e a imunidade. Um dos principais compartimentos da proteólise intracelular é o sistema endossomo-lisosoma (GUHA e PADH 2008). Os lisossomas oferecem uma via vesicular altamente orquestrada para o transporte e degradação complexa e multi-enzimatica das proteínas. Os endossomas contêm níveis significativos de proteases como catepsinas e são locais de proteólise intracelular potente, desempenhando funções seletivas e exclusivas (GUHA e PADH 2008).

#### INTRODUÇÃO

As catepsinas são protéases (Figura 9) que, em condições fisiológicas, estão localizadas no interior dos lisossomas (CHWIWRALSKI; WELTE; BUHLING, 2006). As funções específicas das catepsinas estão freqüentemente associadas à localização restrita do tecido, como as catepsinas S, V e K. Embora as catepsinas B, H, L,F, C, X e O sejam ubíquos quanto `a sua distribuição, isso não impede que se envolvam em alguns processos mais especializados (TURK; STOKA; TURK, 2001).

Em resposta a certos sinais, elas são liberadas dos lisossomos para o citoplasma, onde desencadeiam a morte celular apoptótica através de várias vias, incluindo a ativação de caspases ou a liberação de fatores pro-apoptose das mitocôndrias (CHWIWRALSKI; WELTE; BUHLING, 2006).

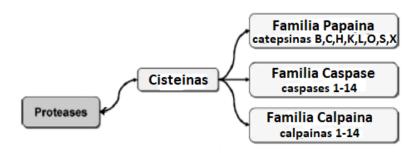


Figura 9. Classificação de algumas enzimas proteoliticas.

Fonte: Adaptado de (CHWIWRALSKI; WELTE; BUHLING, 2006).

A apoptose é um processo crucial na regulação da homeostase em quase todos os órgãos e tecidos. A desregulação no processo de apoptose conduz definitivamente ao desenvolvimento de doença (CHWIWRALSKI; WELTE; BUHLING, 2006).

O distúrbio do equilíbrio normal da atividade enzimática pode levar a condições patológicas e as proteases cisteinas lisossomais não são exceção. Eles foram associados a uma série de doenças, tais como como artrite reumatoide, osteoartrite, câncer, doenças neurologicas, osteoporose e doenças lisossomais (TURK et al.,2001).

#### 1.2.10 Tratamento da EMP1

As EMP são de difícil tratamento e a maioria é refratária às drogas antiepilépticas. Além da epilepsia, as EMPs também resultam numa continua deterioração neurológica (CERU et al., 2005).

As EMPs como um grupo de epilepsias que não são acessíveis à ressecção cirúrgica (MALEK; STEWART; GREENE, 2015).

Os medicamentos antiepilépticos são o principal suporte da terapia e melhoram o controle das crises.

Para o tratamento estabelecido da DUL com drogas antiepilepticas (DAE) leva a varias terapias com uma combinação de vários medicamentos. As combinações são acido valproico + levetiracetam ou topiramato ou zonisamida, com uma benzodiazepina adicional (uma combinação de três a cinco drogas é bastante usual). Também pode-se alternar entre diferentes benzodiazepinas em caso de tolerância. Em caso de agravamento transitório com intensa mioclonia e convulsões em série, não deve haver mudança abrupta no regime habitual (exceto pela interrupção de um agravamento potencialmente de DAE), e IV benzodiazepina deve ser usado, bem como, por um período limitado, IV fenobarbital ou fenitoína (CRESPEL et al., 2016).

O aconselhamento genético fornece informações para indivíduos e famílias em relação à história natural, tratamento, modo de herança e riscos genéticos para outros membros da família. Grupos de apoio também foram estabelecidos para indivíduose famílias para fornecer informações, suporte e contatocom outras pessoas afetadas. (KALVIAINEN et al., 2008).

#### 1.3 JUSTIFICATIVAS DO ESTUDO

As EMPs, são um grupo raro, mas extremamente severo de epilepsia, que pode comprometer de maneira muito importante a sobrevivência do paciente e a qualidade de vida do paciente e de sua família. Dentro deste contexto, é extremamente importante oferecer um diagnóstico definitivo e seguro, permitindo elaborar um prognóstico adequado e permitindo a procura de possíveis vias terapêuticas. Adicionalmente, possibilitará estudos futuros, epidemiológicos, fenotípicos e terapêuticos, a respeito da EMP1 no Brasil, assim como o

#### INTRODUÇÃO

estabelecimento de protocolo de investigação molecular para os pacientes com epilepsia mioclônica.

### 2. OBJETIVOS

#### **OBJETIVOS**

O objetivo deste estudo é a pesquisa da expansão instável dodecamérica (CCCCGCCCCGCG) presente na região promotora 5' não traduzida do gene CSTB entre pacientes com suspeita de EMP1,cujo DNA foi encaminhado para análise no Laboratório de DNA do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental.

# 3. PACIENTES E MÉTODOS

#### 3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo passou por análise e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto — Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP) oficio nº1582/2016, de acordo com o processo HCRP nº1036/2016 (ANEXO).

#### 3.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

#### 3.2.1 Pacientes

Foram estudados 64 pacientes entre eles 54 casos índices, todos em seguimento no setor de Epilepsia com diagnostico clinico e eletrofisiológico de EMP1, que foram encaminhados para o setor de Neurogenética para diagnostico molecular. Os restantes 10 casos eram parentes dos casos índices. Os critérios diagnósticos da EMP1 foram apresentados no termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) (APENDICE). Não foram incluídos os pacientes, ou famílias, que não desejaram participar do estudo.

Todos pacientes participantes destes estudos foram testados para expansão instável da região dodecamérica do gene CSTB, através da técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR) para amplificação de marcadores expandidos na região dodecamera do gene CSTB.

#### 3.2.2 Grupo controle

O grupo controle foi constituído por 55 indivíduos que apresentava mais de 40 anos, e não tinham epilepsia ou doença neurodegenerativa, o mesmo acontecendo em sua família. Estes indivíduos foram recrutados dentre os acompanhantes no ambulatório do Hospital da Clinicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Apresentamos aos voluntários o projeto de pesquisa e estes concordaram em participar livremente de nosso estudo.

#### 3.3 MÉTODOS

#### 3.3.1 Coleta de Sangue

Aproximadamente 10 mL de sangue foram colhidos de todos os participantes do estudo, após assinatura do (TCLE), utilizando-se o sistema de coleta a vácuo com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra – acético) a 4°C.

#### 3.3.2 Extração do DNA

Algumas amostras do DNA genômico foram extraídas no Centro Medicina Genomico (CMG) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP). A extração foi realizada pelo kit Maxwell®16 Blood DNA Purification seguindo as instruções do fabricante Promega.

Outra parte das amostras foram extraídas no laboratório de Neurogenética, seguindo as recomendações descritas pelo fabricante PureGene (Gentra), para evitar altas concentrações de sais nas amostras. Não houve retenção de amostras para armazenamento em banco, o DNA genômico coletado de amostras de sangue venoso e outros materiais biológicos foram descartados após a realização do estudo.

As etapas para extração do DNA foram:

#### Dissolução Celular

- 1. Adicionar a 300ul de sangue, 900ul de RBC Lysis Solution (tampão de lise de glóbulos vermelhos), vórtex por 15 segundos, encubar 1 minuto a temperatura ambiente, invertendo gentilmente 10 vezes durante a incubação.
- Centrifugar por 20 minutos a 13.000-16.000 rpm. Remover o sobrenadante com uma pipeta deixando apenas o pellet visível de células brancas, deixando um líquido residual de 10-20 ul.
- 3. Vórtex o tubo vigorosamente por 10s para ressuspender as células brancas no líquido residual.

4. Adicionar 300ul de Cell Lysis Solution (Solução de Lise de células brancas). homogeneizar lentamente com a pipeta.

#### Precipitação de Proteína

- 1. Adicionar 100ul de Protein Precipitation Solution na célula lisada.
- 2. Vórtex vigorosamente na maior velocidade por 20 segundos para misturar uniformemente a proteína com as células lisadas.
- 3. Centrifugar de 13,000-16,000 por 1 minuto. As proteínas precipitadas ficarão ao fundo como um botão marron. Se o pellet de proteína não estiver nessa cor escura repita o passo 2, deixe a amostra encubada no gelo por 5 minutos e repita o passo 3.

#### Precipitação do DNA

- 1. Pegar o sobrenadante contendo DNA, deixando o pellet de proteína (marron), colocar em um microtubo de 1,5 ml e adicionar 300 ul de isopropanol (2-propanol) 100%.
- 2. Misture a amostra invertendo gentilmente 50 vezes. (Nesse momento vê-se a nuvem de DNA)
- 3. Centrifugar à 13.000-16.000 rpm por 1 minuto.
- 4. Descartar o sobrenadante cuidadosamente, o DNA poderá estar visível como um pequeno pellet esbranquiçado ou transparente, e muitas vezes invisível.
- 5. Adicionar 300ul de etanol 70%, inverter o tubo várias vezes para lavar o pellet de DNA. Centrifugar à 13.000-16.000 rpm por 1 minuto.
- 6. Descartar o sobrenadante e permanecerá apenas o pellet de DNA.

(Deixar os microtubos abertos até que o etanol se evapore)

#### Hidratação do DNA

- 1. Adicionar 30 ul de DNA Hidratation Solution (ou água milliq autoclavada).
- 2. Encubar por 5 minutos à 65°Cpara acelerar a hidratação. Estocar o DNA a 4°C. Quando for estocá-lo por longo tempo, armazenar em freezer -20°C ou -80°C.

#### 3.3.3 Seleção dos Primers

A sequência dos primers utilizados na análise para a pesquisa de expansão instável da região dodecamérica do gene CSTB, foram as mesmas empregadas por (JOENSUU et al.,2007) (Tabela 4). As sequencias nucleotídicas obtidas foram conferidas no *site* (<a href="http://genome.ucsc.edu">http://genome.ucsc.edu</a>).

Tabela 4 - Descrição dos primers e condições para amplificação da expansão dodecamera

Região	Sequência do primer	Fragmento	Ta
	(5' >3')	(pb)	(Cº)
5'UTR	2F CCCGGAAAGACGATACCAG * 1R GAGGAGGCACTTTGGCTTC *	193 193+(>360)	57

pb - pares de bases; F - *Forward*; R - *Reverse*; Ta - temperatura de *annealing*; Fonte: Adaptado de (JOENSUU et al., 2007).

#### 3.3.4 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

A reação de PCR foi montada à temperatura de aproximadamente 4°C (no gelo), usando 1μl de DNA genômico (200ng) do paciente; 0,25μl dos *primers* (20μM), *sense* e *anti-sense*, específico para cada região a ser amplificada (Tabela 4); 5μl de tampão 10X com MgCl2 (50mM); 2,5μl de dNTPs (200mM); 0,75μl de polimerase *GoTaq*(5U/μl) (Promega); completando 15,25μl de *H2O free Dnase*.

O perfil térmico foi realizado como descrito a seguir: 95°C, por 5 minutos; 40 ciclos: 95°C por 30 segundos, temperatura de anelamento padronizado a 58 °C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos; extensão final a 72°C por 10 minutos e 4°C para conservação.

### 3.3.5 Análise mutacional (expansão dodecamera) do gene CSTB e verificação dos produtos de PCR.

No presente estudo, foram feitas análises da expansão instável da região 5'UTR dodecâmera do gene CSTB e a verificação dos fragmentos de PCR amplificados. Detectamos bandas acimas de 517 pares de bases o que resulta em números de fragmentos acima de 30 a 80 repetições dodecâmera, o que caracteriza a DUL (LALIOTI; ANTONARAKIS; SCOTT, 2003).

Observamos a quantidade de pares de bases 3 cópias de repetição (3/3) - 193/193 pares de bases, 2 cópias de repetições (2/2) - 181/181 pares de bases e 2/3 cópias de repetição com 181/193 pares de bases em cada fragmento, que está descrita para a população Caucasiana normal (Mumoli et al., 2015).

Para todas as experiências realizadas foram utilizados um controle normal (3/3-193pb), um controle positivo (62/62-900/900pb), um portador (3/62 – 193/900pb).

#### Região 5'UTR dodecâmera do gene CSTB – 193 pares de bases.

Mutação: aproximadas 62/62 repetições na região dodecâmera (CCCCGCCCGCG)n.

Cálculo: nº total de bases — 157(região residual sem a expansão) = nº de repetições 12(região dodecâmera)

A análise da expansão instável da região dodecamerica do gene CSTB e a validação dos fragmentos de PCR amplificados foram efetuados por electroforese (técnica usada como método analítico e preparativo, pois separa as moléculas de DNA e sua identificação pelo tamanho do fragmento específico no gel) a 2,5%, em tampão tris,ácido bórico e EDTA (TBE) 1X (*Invitrogen*), onde se aplicou 15µl de produto amplificado e se comparou com um marcador de peso molecular de 100pb (*Ladder*). A visualização destes fragmentos foi feita através de um transiluminador de luz ultra-violeta.

#### 3.3.6 Análise Bioinformática

A consulta da sequência de referência do gene *CSTB* (ENSG00000160213) foi efetuada na base de dados *Ensembl Genome Browser*.

### 4. RESULTADOS

#### 4.1 GRUPO CONTROLE

No presente estudo, o grupo controle foi constituído por 55 indivíduos normais com as características já citadas em pacientes e métodos. Em todos eles a pesquisa da expansão no gene CSTB foi normal. Os genótipos encontrados foram: os dois alelos apresentando 3 repetições (3/3) - 193/193 pares de bases; os dois alelos apresentando 2 repetições (2/2)-181/181 pares de bases ou um alelo com 2 repetições e o outro com 3 repetições - 181/193 pares de bases (Figura 10).

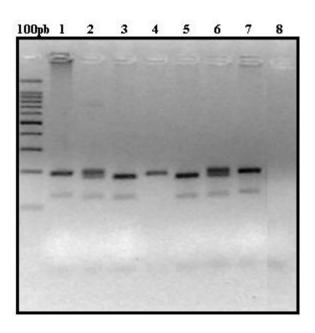


Figura 10. Visualização do resultado amplificação do produto PCR em condições descritas na Tabela 4 em gel de agarose 2,5%. Faixa 1, 4 e 7 indivíduos normais com 3 cópias de repetição; Faixa 2 e 6 individuos normais com dois diferentes alelos 2 e 3 cópias de repetição; Faixa 3 e 5 individuos normais com 2 cópias de repetição. Faixa 1 marcador de peso molecular 100pb. Faixa 8 controle negativo.

#### 4.2 PACIENTES

Avaliamos 64 pacientes entre eles 54 casos índices do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP) com suspeita de EMP1. Os restantes 10 casos eram parentes dos casos índices.

Dos 54 casos índices, 49 apresentaram número de expansões dentro dos limites da normalidade (Tabela 5). Cinco pacientes apresentaram expansões anormais (figuras 11, 12, 13 e 14), confirmando DUL (3156, 5062, 7731,7766 e 13385).

Tabela 5 - Pesquisa da expansão do gene CSTB nos casos índice.

Tabela 5 - Pesquisa da expansão do gene CSTB nos casos índice.						
	DUL	Alelo 1		Alelo 2		
		Nº par de bases	Nº expansões	Nº par de bases	N° expansões	
	2529	181	2	193	3	
	3154	193	3	193	3	
Positivo	3156	900	62	900	62	
	3311	181	2	193	3	
	3517	193	3	193	3	
	3915	193	3	193	3	
	4666	181	2	193	3	
	4667	181	2	181	2	
Positivo	5062	900	62	900	62	
Caso índice	5676	181	2	181	2	
Mãe(5676)	6333	181	2	181	2	
	6006	181	2	181	2	
	6007	181	2	181	2	
	6058	193	3	193	3	
	6059	181	2	193	3	
	6107	181	2	193	3	
	6187	181	2	193	3	
	6225	181	2	193	3	
	6226	181	2	193	3	
	6324	193	3	193	3	
	6461	193	3	193	3	

Caso índice	6583	181	2	193	3
Irma(6583)	6584	193	3	193	3
	6711	193	3	193	3
	6818	193	3	193	3
	6982	193	3	193	3
	6990	193	3	193	3
	6991	181	2	181	2
Caso índice	7057	193	3	193	3
Pai (7057)	7058	193	3	193	3
	7132	193	3	193	3
Positivo	7731	900	62	900	62
Caso índice Positivo	7766	900	62	900	62
Mãe (7766)	7767	193	3	900	62
	8853	193	3	193	3
	9241	193	3	193	3
Caso índice	9289	193	3	193	3
Irma (9289)	9290	193	3	193	3
Caso índice	9497	193	3	193	3
Irma (9497)	9498	193	3	193	3
	10510	181	2	193	3
	10689	193	3	193	3
	10720	193	3	193	3
	10788	193	3	193	3
	11014	193	3	193	3
	11023	193	3	193	3
Caso índice	11179	193	3	193	3
Pai (11179)	11180	181	2	193	3
Irma (11179)	11181	181	2	193	3
Mãe (11179)	11209	181	2	193	3
	11215	193	3	193	3
	11268	181	2	193	3
	11489	181	2	181	2
	11609	193	3	193	3

	11644	193	3	193	3
	11797	193	3	193	3
	12033	193	3	193	3
	12088	193	3	193	3
Caso índice	12238	193	3	193	3
Irmão(12238)	12242	193	3	193	3
	12422	193	3	193	3
	12978	181	2	181	2
Positivo	13385	900	62	900	62
	13539	181	2	193	3

Na tabela a abaixo, podemos visualizar algumas características com diagnostico clinico e eletrofisiológico de EMP1 dos 5 pacientes confirmados para a expansão (Tabela 6).

Tabela 6 - Características clinicas dos pacientes confirmados para DUL

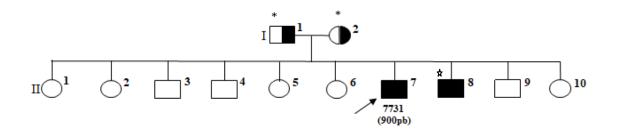
DUL 3156	Idade atual  47 anos	Sexo  masculino	Idade de início dos sintomas (anos)	Característica Clinica  Mioclonias de mãos, tremor postural e intensão.  Alteração comportamental.
5062	44 anos	masculino	*	Desmaios com perda de consciência, crises convulsivas, tremores nas extremidades, dificuldade de marcha, movimentos tonico-clonicos generalizados.  Exame EEG houve relatos de abalos musculares rápidos (mioclonias).
7731	35 anos	masculino	12	Abalos mioclonicos generalizados com perda de consciência. Marcha com base alargada e ataxia axial e apendicular moderada.
7766	31 anos	feminino	*	Mioclonias generalizadas.Incapacidade motora necessitando de cadeira de rodas

13385	43 anos	feminino	12	Crise epiléptica tipo tonico-clonico
				generalizada
				Piora progressiva do quadro tremor de membros, associado com rigidez principalmente de membros inferiores e dificuldades de deambular.
*= idado	e de sintomas de	esconhecido.		

#### 4.3 HEREDOGRAMA DOS PACIENTES DUL 7731 E DUL 7766

O heredograma dos pacientes DUL7731 e DUL 7766 é visto abaixo. Não foi possível uma análise precisa das demais famílias.

#### **DUL 7731:**

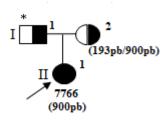


Heredograma 1 - Família do paciente DUL 7731.

<sup>\*</sup>portadores pela história.

<sup>\*</sup>positivo pela história.

#### **DUL 7766:**



Heredograma 2 - Família do paciente DUL 7766. \*portador pela historia.

## 4.4 DETECÇÃO DE EXPANSÕES ANORMAIS POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 2,5%.

Foram encontradas expansões anormais no gene CSTB em 5 dos 54 pacientes índices com suspeita de DUL (3156, 5062, 7731, 7766 e 13385), quer em homozigose ou em heterozigose composta.

Os demais 49 casos índices apresentaram número de repetições dentro dos limites da normalidade, conforme visto acima.

# 4.4.1 DUL 7731 e DUL 7766 com expansões de 62/62repetições da região 5'UTR dodecâmera do gene CSTB e um dos resultados confirmados foi através do estudo familiar da mãe portadora da DUL 7766.

Na análise molecular foi detectado no DUL7731 e na DUL 7766 expansões em homozigose na região dodecâmera, resultando em 62/62 repetições nesta região em um total de fragmentos com tamanho de 900/900 pares de bases.

A mãe portadora da DUL 7766 da doença apresenta a expansão com repetições de 3/62 em heterozigose o que corresponde, respectivamente, a fragmentos com tamanhos de 193/900 pares de bases.

Podemos verificar nas imagens realizadas em eletroforese por gel de agarose 2,5% correspondentes a tal expansão do DUL 7731 (Figura 11) e da DUL7766 e sua a mãe portadora (Figura 12), e dos indivíduos controles com 3/3 – 193 pares de bases.

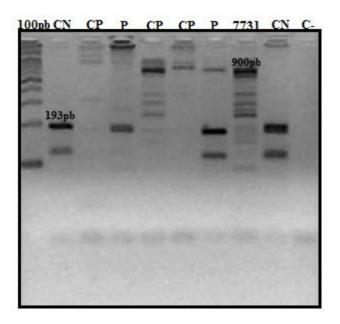


Figura11: Visualização do resultado amplificação da expansão em condições descritas na Tabela 4 em gel de agarose 2,5% - CN:controle normal, CP:controle positivo para expansão, P: portador, C-:controle negativo sem amostra e marcador de peso molecular 100pb.

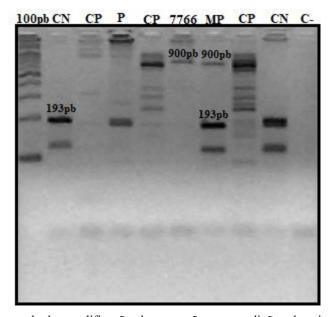


Figura 12: Visualização do resultado amplificação da expansão em condições descritas na Tabela 4 em gel de agarose 2,5% - CN: controle normal, CP: controle positivo para expansão, P: portadora, MP: mãe portadora, C: controle negativo sem amostra e marcador de peso molecular 100pb.

### 4.4.2 DUL 3156 e DUL 13385 com expansões de 62/62 repetições da região 5'UTR dodecâmera do gene CSTB.

Na análise molecular foi detectado no DUL 3156 e no DUL 13385 expansões em homozigose na região dodecâmera,resultando em 62/62 repetições nesta região em um total de fragmentos com tamanho de 900/900 pares de bases.

Observamos na imagem feita em eletroforese por gel de agarose 2,5% correspondente a tal expansão do DUL 3156 e da DUL 13385 (Figura 13) e do indivíduo controle com 3/3 -193 pares de bases.

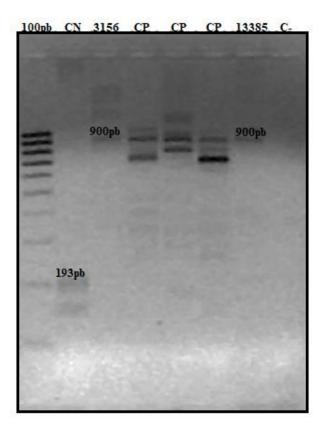


Figura13: Visualização do resultado amplificação da expansão em condições descritas na Tabela 4 em gel de agarose 2,5% - CN: controle normal, CP: controle positivo para expansão, C-:controle negativo sem amostra e marcador de peso molecular 100pb.

### 4.4.3 DUL 5062 com expansões de 62/62 repetições da região 5'UTR dodecâmera do gene CSTB.

Feita análise molecular, foi detectado no DUL 5062 expansões com 62/62 repetições em homozigose na região dodecâmera em um total de fragmentos com tamanho de 900/900 pares de bases.

Podemos notar na imagem feita em eletroforese por gel de agarose 2,5% correspondente a expansão do DUL5062 (Figura 14) e do indivíduo controle com 3/3-193 pares de bases.

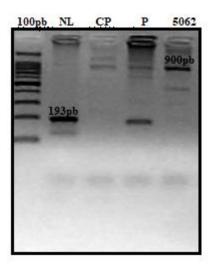


Figura14:Visualização do resultado amplificação da expansão em condições descritas na Tabela 4 em gel de agarose 2,5% - CN: controle normal, CP: controle positivo para expansão, P: portador, Marcador de peso molecular 100pb.

# 4.5 APRESENTAÇÃO DA VARIAÇÃO POLIMORFICA (3/3), (2/2) E (2/3) DO DODECÂMERO (CCCCGCCCGCG) EM PACIENTES ÍNDICES NEGATIVOS PARA A EXPANSÃO.

Através de nossas análises moleculares, demonstramos o comportamento da variação polimórfica nos pacientes índices negativos para a expansão (Figuras 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21).

Os indivíduos homozigotos com 3 cópias de repetição (3/3) - 193/193 pares de bases, indivíduos homozigotos com 2 cópias de repetições (2/2)- 181/181 pares de bases e

indivíduos heterozigótico (dois diferentes alelos do gene da doença com 2/3 cópias de repetição com 181/193 pares de bases em cada fragmento.

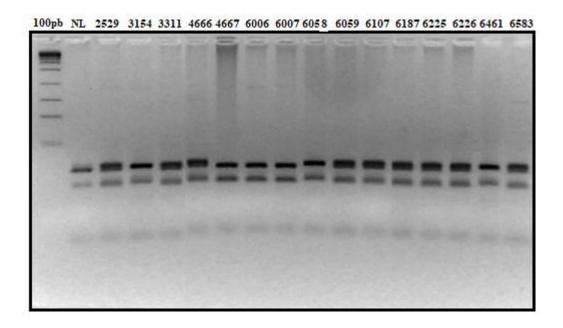


Figura 15: Resultado da amplificação da variação polimorficas em condições descritas na Tabela 4 em gel de agarose 2,5% - Pacientes **3154**, **6058** e **6461** homozigotos com 3 cópias de repetição; Pacientes **2529**, **3311**, **4666**, **6059**, **6107**, **6187**, **6225**, **6226** e **6583** compostos heterozigotos com dois diferentes alelos 2 e 3 cópias de repetição; Pacientes **4667**, **6006** e **6007**, homozigotos com 2 cópias de repetição. Marcador de peso molecular 100pb. NL:controle normal.

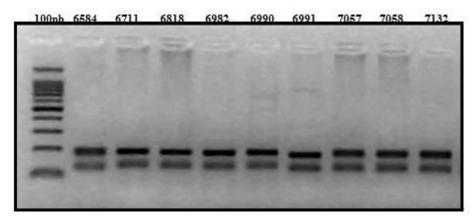


Figura 16: Resultado da amplificação da variação polimorficas em condições descritas na Tabela 4 em gel de agarose 2,5% - Pacientes **6584**, **6711**, **6818**, **6982**, **6990**, **7057**, **7058** e **7132** homozigotos com 3 cópias de repetição; Paciente **6991** homozigoto com 2 cópias de repetição. Marcador de peso molecular 100pb.

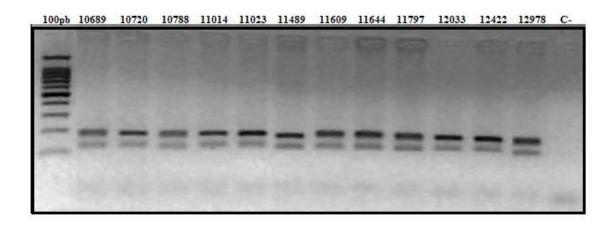


Figura 17: Resultado da amplificação da variação polimorficas em condições descritas na Tabela 4 em gel de agarose 2,5% - Pacientes **10689**, **10720**, **10788**, **11014**, **11023**, **11609**, **11644**, **11797**, **12033** e **12422** homozigotos com 3 cópias de repetição; Pacientes **11489** e **12978** homozigotos com 2 cópias de repetição. Marcador de peso molecular 100pb; C- controle negativo.

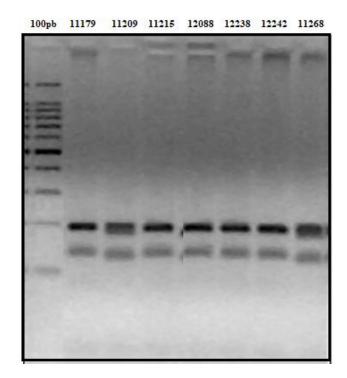


Figura 18: Resultado da amplificação da variação polimorficas em condições descritas na Tabela 4 em gel de agarose 2,5% - Pacientes **11179**, **11215**, **12088**, **12238** e **12242** homozigotos com 3 cópias de repetição; Pacientes **11209** e **11268** compostos heterozigotos com dois diferentes alelos 2 e 3 cópias de repetição. Marcador de peso molecular 100pb.

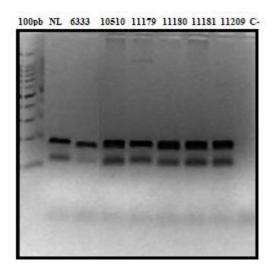


Figura 19: Resultado da amplificação da variação polimorficas em condições descritas na Tabela 4 em gel de agarose 2,5% - Paciente 11179 homozigoto com 3 cópias de repetição; Pacientes 10510, 11180, 11181 e 11209 compostos heterozigotos com dois diferentes alelos 2 e 3 cópias de repetição. Marcador de peso molecular 100pb. Pacientes 6333 homozigotos com 2 cópias de repetição. Marcador de peso molecular 100pb; NL-controle normal; C- controle negativo.

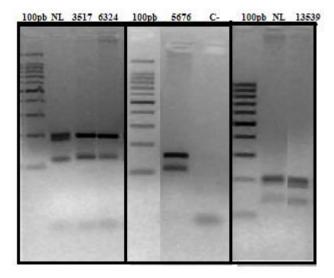


Figura 20: Resultado da amplificação da variação polimorficas em condições descritas na Tabela 4 em gel de agarose 2,5% - Pacientes **3517 e 6324** homozigotos com 3 cópias de repetição; Paciente **13539** composto heterozigoto com dois diferentes alelos 2 e 3 cópias de repetição. Paciente **5676** homozigotos com 2 cópias de repetição. Marcador de peso molecular 100pb; NL-controle normal; C- controle negativo.

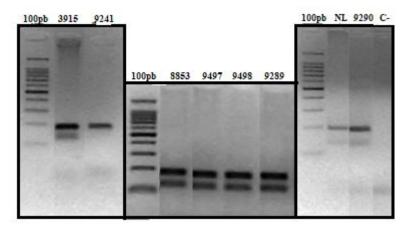


Figura 21: Resultado da amplificação da variação polimorficas em condições descritas na Tabela 4 em gel de agarose 2,5% - Pacientes **3915**, **9241**, **8853**, **9497**, **9498**, **9289** e **9290** homozigotos com 3 cópias de repetição;NL- controle normal; C- controle negativo.

### 4.6 EXPANSÕES ENCONTRADAS NA REGIÃO 5'UTR DODECÂMERA DO GENE CSTB.

Analisando a região dodecamera do gene CSTB, nós identificamos nos 5 pacientes com suspeita de DUL pesquisados, expansões em homozigose no valor acima de 30 repetições.

O DUL7731 e DUL 7766 com expansões de 62/62 repetições em homozigose com um fragmento de tamanho de 900/900 pares de bases. A mãe portadora da doença do DUL 7766 apresentando uma expansão com repetições de 3/62 em heterozigose o que corresponde, respectivamente, a fragmentos com tamanhos de 193/900 pares de bases.

Já os DUL 3156 e DUL 13385 apresentaram também expansões no valores de 62/62 repetições em homozigose ,cujo o tamanho do fragmento é de 900/900 pares de bases. O DUL 5062 apresentou expansões de 62/62 repetições também em homozigose com fragmento de tamanho de 900/900 pares de bases.

4.7 FREQUÊNCIA MUTACIONAL DA EXPANSÃO DODECÂMERA DO GENE CSTB NA POPULAÇÃO BRASILEIRA COM A DOENÇA DE DUL E FREQUÊNCIA DA VARIAÇÃO POLIMÓRFICA DO DODECÂMERO (CCCCGCCCGCG) NO RESTANTE DOS INDIVÍDUOS NEGATIVOS PARA A EXPANSÃO.

Nós avaliamos neste estudo a frequência mutacional da expansão dodecâmerado gene CSTB, em 54 casos índices da população brasileira com quadro clínico de EMP1. Entre os 54 pacientes encontramos: cinco pacientes positivos para expansões dodecâmera no gene CSTB, todas com 62/62 repetições em homozigose com fragmento de tamanho 900/900 pares de bases. Assim, a frequência mutacional da expansão dodecâmera no gene CSTB, apresenta 9,26% (Tabela 7) na população brasileira.

Conjuntamente, foi analisada a variação polimórfica da região dodecâmera (CCCCGCCCCGCG) nos 49 indivíduos restantes, cujo resultados deram negativo para a expansão, obtivemos 53,7% de indivíduos homozigotos com 3 cópias de repetição (3/3) com fragmento de tamanho de 193/193 pares de bases, 12,96% de indivíduos homozigotos com 2 cópias de repetições (2/2) com fragmentos de tamanho de 181/181 pares de bases e 24,07% de indivíduos heterozigótico (dois diferentes alelos mutantes do gene da doença com 2/3 cópias de repetição com 181/193 pares de bases em cada fragmento) (Tabela 7).

Tabela 7 – Valores de freqüência mutacional expansão e variação polimórfica da região dodecamera

Alterações Constatadas (Número de repetições)	Porcentagem De Indivíduos
62/62	9,26%
3/3	53,7%
2/2	12,96%
2/3	24,07%

# 5. DISCUSSÃO

#### 5.1 EM RELAÇÃO A EXPANSÃO E AOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

As expansões repetidas são dinâmicas, e a herança e a progressão da doença são influenciadas pelo tamanho e pela taxa de expansão (USDIN; HOUSE; FREUDENREICH, 2015).

As expansões dinâmicas decorrem da instabilidade do DNA repetido em um mesmo lócus, ocasionando maior propensão a deslizes da enzima DNA polimerase. Estes deslizes acarretam a inserção de mais nucleotídeos nesse segmento, resultando na expansão. Assim, a ocorrência da primeira mutação aumenta a chance de novos deslizes nesses sítios, levando a mais deslizes e expansões. (RICHARDS; SUTHERLAND, 1992).

As expansões tanto podem resultar na perda como no de ganho de função. Nos mecanismos que envolvem a perda da função, o produto do gene ou não é produzido ou é gerado em níveis baixos ((BROUWER; WILLEMSEN; OOSTRA, 2009).

A maioria dessas desordens são causadas pela expansão das repetições de tripletos (CGG) n • (CCG) n, (CAG) n • (CTG) n, (GAA) n • (TTC) n e (GCN) n • (NGC) n. Mas doenças também podem resultar de expansões maiores, incluindo tetranucleotídeos (CCTG) n • (CAGG) n, pentanucleotideos (ATTCT) n • (AGAAT) n e até dodecanucleotideos (C4GC4GCG) n • (CGCG4CG4) n. (Figura 22) (MIRKIN., 2007).

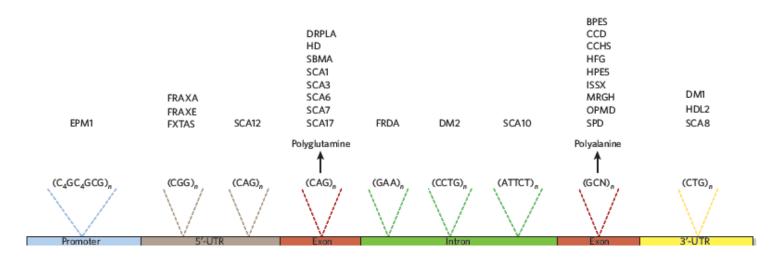


Figura 22: Localização de repetições expansíveis responsáveis por doenças humanas. A sequência e localização dentro de um gene genérico de repetições expansíveisque causam doenças humanas são mostradas. Fonte: Adaptado de (MIRKIN., 2007)

As repetições expansíveis podem ser localizadas em vários regiões de seus genes residentes: primeiro, as regiões codificantes, como ocorre em numerosas doenças mediadas por poliglutamina ou polialanina corre em proteínas; em segundo lugar, as 5 regiões não traduzidas (5'-UTRs), como no caso síndrome X frágil, retardo mental frágil X associado à site FRAXE, tremor frágil X e síndrome de ataxia e espinocerebelosa ataxia 12; terceiro, 3'-UTR, como é observado para a distrofia miotônica 1, ataxia espinocerebelosa 8 e doença de Huntington 2; quarto, introns, como no caso da distrofia miotônica 2, ataxia de Friedreich e ataxia espinocerebelosa 10; e o quinto, regiões promotoras, como ocorre em progressivo epilepsia mioclônica 1 (MIRKIN., 2007).

O DNA repetitivo pode formar várias estruturas incomuns, exemplos dos quais são mostrados (Figura 23) o qual podemos visualizar modelos de expansões. A largura da estrutura da corrida repetitiva é mostrada em vermelho, sua vertente complementar em verde e flanqueando DNA em bege.

Na figura **a** um *hairpin* imperfeito formado por (CNG) n repetições; em **b**, um quadruplexlike estrutura formada pela repetição (CGG) n, retângulos marrons indicam G quartetos e o retângulo amarelo indica um motivo em i; na figura **c**, um slippedstranded estrutura formada pela (CTG) n • (CAG) n repete; figura **d**, H-DNA e DNA grudados formado pela repetição (GAA) n • (TTC) n. Apenas uma possível isoforma, na qual a corda de homopurina é doada para o triplex, é mostrada para ambas as estruturas. O emparelhamento reverso de Hoogsteen é indicado por asteriscos. Na figura **e**, um elemento de desenrolamento de DNA formado pela (ATTCT) n • (AGAAT) n repete (MIRKIN., 2007).

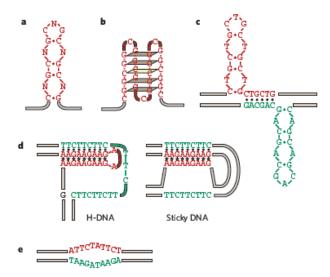


Figura 23: Visualização de estruturas de DNA incomuns formadas por repetições expansíveis Fonte (MIRKIN., 2007).

No presente estudo, a replicação da expansão dodecamera nos pacientes pesquisados, foi um desafio, por ser uma região rica em estruturas formadas por GC e por conseguir amplificar tais fragmentos de interesse. Consultamos os artigos dos respectivos autores (Horiuchi et al., 2005), (Kecmanovic et al., 2014) e (Joensuu et al., 2007) para tentarmos a replicação da região dodecamera.

De acordo com o artigo de Horiuchi et al., 2005 (Figura 24) foi realizado desaminação química por bisulfito de sódio que converte seletivamente resíduos de citosina não metilados para uracila em DNA de cadeia simples, o que diminui os problemas acompanhando um alto conteúdo de GC durante a amplificação por PCR. Este estudo indicou que a PCR pareceu amplificar essas expansões, apresentou resultados de seqüenciamento ou a repetição, mas não exata em números.

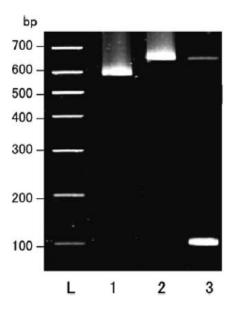


Figura 24:Amplificação definida da reação em cadeia da polimerase (PCR)usando DNA desaminado para as expansões repetidas. (L)marcador 100pb,(1)homozigoto expansão de 600 pb de um indivíduo afetado é filho do individuo (3); (2)-aexpansão homozigótica de 680pb; (3)-um heterozigoto de uma repetição dupla, normal a expansão de 680 pai de 1.

Fonte: Horiuchi et al., 2005

No artigo de Kecmanovic et al., 2014 (Figura 25), devido ao alto conteúdo do GC, a visualização da expansão foi um grande desafio experimental, resolvido neste estudo usando o kit de PCR para a amplificação de longo fragmentos e betaína, que, como o DMSO, reduz estrutura secundária formada por regiões ricas em GC e facilita a visualização em gel de agarose corado com brometo de etídio.

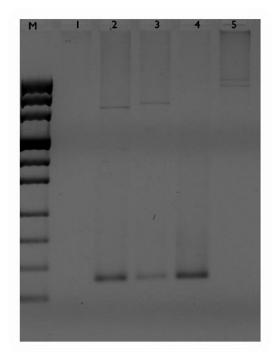


Figura 25: Detecção de PCR de repetições amplificadas da região dodecâmera no gene CSTB em 2% de gel de agarose. (M)marcador(1) água, (2, 3) portador heterozigótico para expansão, (4) alelo na faixa de tamanhos normal e (5) expansão homozigótica. Fonte Kecmanovic et al., 2014

Já no artigo de Joensuu et al., 2007 (Figura 26) foi utilizada a técnica de hibridização por Southern Blot, que consiste em utilizar sondas que emitem radiação que marcam os fragmentos de DNAs alvos e um protocolo com Kit de enzimas especificas para amplificação de longos fragmentos.

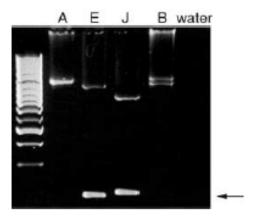


Figura 26:Detecção da repetição dodecâmera CSTB mutação por expansão feitra por PCR. (**A, B**) pacientes homozigóticos com expansão determinada pela análise de Southern. (**E**) individuo heterozigoto compostopara a expansão e as mutações missense c.149G4A; individuo(**J**) é composto heterozigoto para a expansãoe as mutações deletion c.168þ1\_18del. Para o marcador, utilizou-se uma escala de DNA de 100 pb. A seta indica ofragmento de um alelo normal de aproximadamente 193 pb com três cópias da repetição portadores da expansão para heterozigotos. Pacientes A e Bhomozigoto para a mutação de expansão. Fonte: Joensuu et al., 2007

Na análise dos fragmentos estudados por eletroforese em gel de agarose nós testamos várias temperaturas, sendo necessário encontrar a temperatura ideal para o estudo da região onde está a mutação, de forma que a mesma seja visualizada. Como já relatado, houve um pouco de dificuldade para amplificar a região de interesse, por ser um fragmento rico em GC. Houve várias tentativas com Kits específicos para auxiliar na técnica de PCR e conseguir uma boa visualização dos fragmentos das expansões da região dodecamera. Conseguimos à amplificação através da enzima Promega®, que é utilizada em outro protocolo de expansão no caso Ataxia de Friedreich no laboratório. Depois de várias tentativas com mudança de tempo de ciclagem e a utilização da enzima Promega, foi possível amplificar o fragmento da expansão com sucesso.

#### 5.2 A RESPEITO DA MUTAÇÃO (EXPANSÃO)

A repetição dodecamera (12 nucleotídeos) da mutação (expansão) no gene da cistatina B (CSTB) é responsável por aproximadamente 90% dos casos em todo o mundo e 99% dos casos de EPM1 na Finlândia, sendo a homozigosidade para esta expansão considerada a mutação fundadora na população finlandesa (Hyppönen et al, 2015).

No estudo de (Laliot 2003), foram encontradas cinco mutações pontuais, algumas recorrentes, prováveis para causar expressão gênica e função anormal da proteína, identificada pela análise de muitos pacientes com EPM1. Estas mutações do CSTB representaram apenas cerca de 10% (23/236) dos alelos examinados da EMP1.

A doença de Unverricht-Lundborg também é comum no norte da África, mas é menos comum na Europa ocidental (Moulard et al,2002). Foi realizado um estudo de haplótipos de cromossomos da doença de Unverricht-Lundborg com uma expansão de repetição dodecamera no gene CSTB, a causa mais freqüente do distúrbio. Eles descobriram que 29 dos 47 pacientes (61,7%) do norte da África compartilhavam o mesmo haplótipo, estabelecendo assim um efeito fundador nessa população.

Em nosso estudo obtivemos as seguintes análises:

No paciente DUL7731 foram identificadas expansões em homozigose na região dodecâmera, resultando em 62/62 repetições nesta região em um total de fragmentos com tamanho de 900/900 pares de bases. Apesar de enxergarmos alguns resquicios de produto da ciclagem da enzima, por ser uma região com fragmento grande, não houve alteração no diagnostico.

Na paciente DUL7766 também foram identificadas expansões em homozigose na região dodecâmera, resultando em 62/62 repetições nesta região em um total de fragmentos com tamanho de 900/900 pares de bases, sendo posteriormente confirmada a segregação familiar através do estudo da mãe portadora.

Nos pacientes DUL3156 e DUL 13385 também foram identificadas expansões em homozigose na região dodecâmera, resultando em 62/62 repetições nesta região em um total de fragmentos com tamanho de 900/900 pares de bases.

No paciente DUL 5062 foram identificadas expansões em homozigose na região dodecâmera, resultando em 62/62 repetições nesta região em um total de fragmentos com tamanho de 900/900 pares de bases. Ao analisarmos, houve também alguns resquicios de produto da ciclagem da enzima, por ser uma região com fragmento grande, não houve alteração no diagnostico.

#### 5.3 VARIAÇÃO POLIMÓRFICA.

A variação polimórfica da região dodecamera (CCCCGCCCGCG) foi baseada e consultada no artigo (Mumoli et al., 2015) (Figura 27).

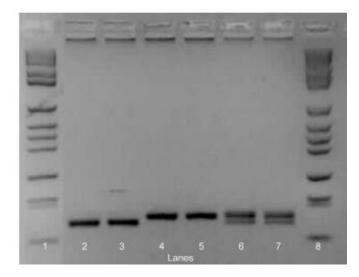


Figura 27:Eletroforese em gel de agarose mostrando amplificados por PCR expansões de repetição dodecamera de alelos normais CTSB.Faixas 2 e 3 pacientes homozigotos com 2 cópias de repetição; Faixas 4 e 5 pacientes homozigotos com 3 cópias de repetição; Faixas 6 e 7 compostos heterozigóticos (dois diferentes alelos mutantes do gene da doença com 2 e 3 cópias de repetição; Faixa 1 e 8 marcadores ladder.

Em relação aos resultados obtidos neste estudo sobre as variações polimórficas relativamente com 3 repetições, está descrita a sua frequência como sendo de 52% para a população Caucasiana normal (Mumoli et al., 2015).

# 6. CONCLUSÕES

A Doença de Unverricht-Lundborg (DUL) por ser considerada uma doença autossômica recessiva, rara, grave e limitante, o diagnóstico preciso é extremamente importante para as condutas apropriadas.

A implementação desse estudo genético e o diagnostico laboratorial desta doença, foi muito importante, visto como mais um recurso que possibilitou um conhecimento do impacto real em termos de saúde pública. Neste estudo os dados permitiram concluir que:

- Os estudos moleculares foram importantes para identificar a existência da DUL na população brasileira, bem como para determinar a presença da expansão 5'UTR dodecâmera do gene CSTB nos indivíduos pesquisados.
- O diagnóstico molecular foi possível em 9,26% dos indivíduos pesquisados com diagnósticos clinico de DUL.
- As seguintes variações polimórficas foram encontradas nos indivíduos restantes, em ordem de frequência decrescente: 3/3(53,7%),2/2(12,96%) e 2/3(24,07%).

### 7. BIBLIOGRAFIA

ABRAHAMSON, M.; FERNANDEZ, M. A.; NATHANSON, C. A. Cystatins. Biochem, v. 70, p. 179-199, 2003.

ALAKURTTI, K. et al. Characterization of the cystatin B gene promoter harboring the dodecamer repeat expanded in progressive myoclonus epilepsy, EPM1. Elsevier Science, v. 245, p. 65-73, 2000.

BOREL, C. et al. Tandem repeat sequence variation as causative Cis-eQTLs for protein-coding gene expression variation: The case of CSTB. Human Mutation, v. 33, p. 1302-1309, 2012.

BROUWER, J. R.; WILLEMSEN, R.; OOSTRA, B. A. Microsatellite repeat instability and neurological disease. Bioessays, v. 31, p. 71-83, 2009.

CERU, S. et al. Protein aggregation as a possible cause for pathology in a subset of familial Unverricht–Lundborg disease. Elsevier, v. 64, p. 955-959, 2005.

CHWIWRALSKI, C. E.; WELTE, T.; BUHLING, F. Cathepsin-regulated apoptosis. Apoptosis, v. 11, p. 143-149, 2006.

CIPOLLINI, E. et al. Cystatin B and its EPM1 mutants are polymeric and aggregate prone in vivo. Elsevier, v. 1783, p. 312-322, 2008.

CRESPEL, A. et al. Unverricht-Lundborg disease. Epileptic Disord, v. 18, p. 28-37, 2016.

DUARTE, A. J. et al. Characterization of a rare Unverricht–Lundborg disease mutation. Elsevier. [s.v], p. 68-71, 2015.

FERLAZZO, E. et al. Long-term evolution of EEG inUnverricht-Lundborg disease. Elsevier, v. 73, p. 219-227, 2006.

FISHER, R. S. et al. A practical clinical definition of epilepsy. Epilepsia, v. 55, p. 475-482, 2014.

FISHER, R. S. et al. Epileptic Seizures and Epilepsy:Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). Epilepsia, v. 46, p. 470-472, 2005.

FRANCESCHETTI, S. et al. A pathogenetic hypothesis of Unverricht–Lundborg disease onset and progression. Elsevier, v. 25, p. 675-685, 2007.

GIAIMO, R. D. et al. New insights into the molecular basis of progressive myoclonus epilepsy: a multiprotein complex with cystatin B. Hum Mol Genet, v.23, p. 2941-2950, 2002.

GUHA,S.; PADH,H. Catepsinas : fundamentais effectors de endolysosomal proteólise. Biochem Biophys, v. 45, p. 75-90, 2008.

HYPPONEN,J. et al. Refining the phenotype of Unverricht Lundborg diase (EMP1). A population wide finnish study, v.84, p. 1529-1536, 2015.

HORIUCHI, H. et al. Polymerase chain reaction-based analysis using deaminated DNA of dodecamer expansions in *CSTB*, associated with Unverricht-Lundborg myoclonus epilepsy. Genet Test, v. 4, p. 328-333, 2005.

JALANKO, A.; TYYNELA, J.; PELTONEN, L. From genes to systems: New global strategies for the characterization of NCL biology. Elsevier, [s.v], p. 934-944, 2006

JOENSUU, T.; LEHESJOKI, A.; KOPRA, O. Molecular Background of EPM1-Unverricht-Lundborg Diase. Epilepsia, v. 49, p.557-563, 2008.

JOENSUU, T. et al. Cystatin B: mutation detection, alternative splicing and expression in progressive myclonus epilepsy of Unverricht-Lundborg type (EPM1) patients. Nature, v. 15, p. 185-193, 2007.

KALVIAINEN, R. et al. Clinical Picture of EPMI-Unverricht-Lundborg Diase. Epilepsia, v. 49, p. 549-556, 2008.

KECMANOVIC, M. et al. A Shared Haplotype Indicates a Founder Event in Unverricht–Lundborg Disease Patients from Serbia. International Journal of Neuroscience, v. 124, p. 102-109, 2014.

KOSKENKORVA, P. et al. Severer Phenotype in Unverricht-Lundborg Disease (EPM1) patients compound heterozygous for the dodecamer repeat expansion and the c.202C 1 T mutation in the CSTB Gene. Karger, v.8, p. 515-522, 2011.

LALIOTI, M.; ANTONARAKIS, S.; SCOTT, H. The epilepsy, the protease inhibitor and the dodecamer: progressive myoclonus epilepsy, cystatin b and a 12-mer repeat expansion. Karger, v. 100, p. 213-223, 2003.

LALIOTI, M. et al. A PCR amplification method reveals instability of the dodecamer repeat in progressive myoclonus epilepsy (EPM1) and no correlation between the size of the repeat and age at onset. Hum Genet, v. 62, p. 842-847, 1998.

LEHESJOKI, A. Molecular background of progressive myoclonus epilepsy. Embo, v. 22, p. 3473-3478, 2003.

LEHTINEN, M. et al. Cystatin B deficiency sensitizes neurons to oxidative stress in progressive myoclonus epilepsy, EPM1. Neurosci, v. 29, p. 5910-5915, 2009.

MALEK, N.; STEWART, W.; GREENE, J. The progressive myoclonic epilepsies. Pract Neurol, v. 15, p. 164-171, 2015.

MIRKIN, S. M. Expandable DNA repeats and human disease. Nature, v. 447, p. 932-940, 2007.

MOULARD, B. et al. Haplotype study of West European an North African Unverricht Lundborg chromosomes evidence for a few founder mutations. Hum Genet. v.111, p. 255-262, 2002.

MUMOLI, L. et al. No evidence of a role for cystatin B gene in juvenile myoclonic epilepsy. Epilepsia, [s.v], p.1-4, 2015.

NAPOLIONI, V. Recent Patents on Epilepsy Genetics. Recent patents on DNA & gene sequences, v. 3, p. 183-192, 2009.

NOKELAINEN, P. et al. Patient with 2 different repeat expansion mutations. Neurol, v. 57, p. 1199-1203, 2000.

POL, A.; BJORK, I. Importance of the Second Binding Loop and the C-Terminal End of Cystatin B (Stefin B) for Inhibition of Cysteine Proteinases. Biochemistry, v. 575, p. 10519-10526, 1999.

RAMACHANDRAN, N. et al. The autosomal recessively inherited progressive myoclonus epilepsies and their genes. Epilepsia, v. 50, p. 29-36, 2009.

RICHARDS, R.; SUTHERLAND, G. Dynamic mutations: a new class of mutations causing human disease. Cell, v. 70, p. 709-12, 1992.

SHANNON, P. et al. Neuropathological changes in a mouse model of progressive myoclonus epilepsy: cystatin B deficiency and Unverricht-Lundborg disease. Neurol, v. 61, p. 1085-1091, 2002.

SATISHCHANDRA, P.; SINHA, S. Progressive Myoclonic Epilepsy. Neurology, v. 58, p. 514-522, 2010.

SHAHWAN, A.; FARRELL, M.; DELANTY, N. Progressive Myoclonic Epilepsies: a review of genetic and therapeutic aspects. Lancet Neurol, v. 4, p. 239-248, 2005.

SIQUEIRA, L. F. M. Progressive myoclonic epilepsies: review of clinical, molecular and therapeutic aspects. Neurocienc, v. 18, p. 561-571, 2010.

TURK, V.; STOKA, V.; TURK, D. Cystatins: Biochemical and structural properties, and medical relevance. Bioscience, [s.v], p. 5406-5420, 2008.

TURK, V.; STOKA, V.; TURK, D. Lysosomal cysteine proteases:facts and opportunities. Embo, v. 20, p. 4629-4633, 2001.

ULBRICH, L. et al. Cystatin B and SOD1: Protein–protein interaction and possible relation to neurodegeneration. Springer, v. 34, p. 205-213, 2014

USDIN, K.; HOUSE, N.; FREUDENREICH, C. Repeat instability during DNA repair: Insights from model systems. Biochem Mol Biol, v. 50, p. 142-167, 2015.

ZUPANC, M. L.; LEGROS, B. Progressive Myoclonic Epilepsy. The Cerebellum, v. 3, p. 156-171, 2004.

## 8. APÊNDICE



# Hospital das Clinicas Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo



#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa "EPILEPSIA MIOCLÔNICA PROGRESSIVA DE UNVERRICHT – LUNDBORG (EPM1). Nesta pesquisa pretendemos análise molecular do gene CSTB entre a população brasileira com EPM tipo 1.O motivo que nos leva a estudar é a investigação do gene e os seus conhecimentos adquiridos serão muito importantes para que conheçamos melhor esta doença, que é ainda pouco conhecida. A identificação do gene permitirá, elaborar um prognóstico adequado e permitindo a procura de possíveis vias terapêuticas.

Para realizar este teste,precisamos de 10ml de sangue. Além da dor da picada, ocasionalmente podem aparecer pequenos hematomas, sem maiores consequências. Não haverá retenção de amostras para armazenamento em banco, o DNA genômico coletado de amostras de sangue venoso e outros materiais biológicos serão descartados após a realização do estudo. Para participar deste estudo o Sr (a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira.

O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) é atendido (a) pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo.

O (A) Sr (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar. Qualquer informação adicional poderá ser obtida com pesquisadora Bianca Mara Alves de Andrade ou com o Prof. Dr. Wilson Marques Jr., no Ambulatório de Neurogenetica do Hospital das Clinicas de Ribeirão Preto da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, ou no telefone 3602-2228.

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo, assim como os benefícios e os riscos de participar dele. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, através deste termo, dou livremente meu consentimento para participar deste estudo.

	/
Assinatura do participante ou do responsável legal	Data



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



Ribeirão Preto, 11 de maio de 2016.

Oficio nº 1582/2016 CEP/MGV

#### PROCESSO HCRP nº 1036/2016

Prezados Pesquisadores,

O trabalho intitulado "ESTUDO MOLECULAR DA EPILEPSIA MIOCLÔNICA PROGRESSIVA DE UNVERRICHT - LUNDBORG (EMP1) NA POPULAÇÃO BRASILEIRA" - Projeto de Pesquisa Versão 2 datada de abril de 2016, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 427ª Reunião Ordinária realizada em 09/05/2016, e enquadrado na categoria: APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido TCLE versão 1.0 de abril de 2016.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa. Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustrissimos Senhores

**BIANCA MARA ALVES DE ANDRADE** PROF. DR. WILSON MARQUES JUNIOR (Orientador)

Depto. de Neurociências e Ciências do Comportamento

Registro Plataforma Brasil /CONEP nº 5440 (016) 3602-2228

cep@hcrp.usp.br