

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

THIAGO LYRIO TEIXEIRA

**Mapeamento completo do exoma em displasias corticais
focais tipo II em crianças e adolescentes**

**RIBEIRÃO PRETO
2022**

THIAGO LYRIO TEIXEIRA

**Mapeamento completo do exoma em displasias corticais
focais tipo II em crianças e adolescentes**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Rubens
Machado

RIBEIRÃO PRETO

2022

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Teixeira, Thiago Lyrio

Mapeamento completo do exoma em displasias corticais focais tipo II em crianças e adolescentes. / Thiago Lyrio Teixeira; orientador Hélio Rubens Machado. - Ribeirão Preto: FMRP, 2022.

151f.: 6il.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2022.

1. Displasia cortical focal tipo II. 2. Exoma. 3. Epilepsia de difícil controle. 4. Malformações do desenvolvimento cortical.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Thiago Lyrio Teixeira

Título: Mapeamento completo do exoma em displasias corticais focais tipo II em crianças e adolescentes

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica.

Aprovado em: ____/____/____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

*“Dedico este trabalho a todas as crianças e famílias
que convivem diariamente com a epilepsia e suas
consequências. Saibam que não estão sozinhos nesta luta.”*

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hélio Rubens Machado, que desde a formação profissional sempre me estimulou à participação acadêmica e, uma vez nesta, sempre me impulsionou à excelência e ao crescimento profissional e científico. Muito obrigado pelo exemplo que transmite e inspira.

Ao Prof. Dr. Marcelo Volpon Santos, quem primeiro me orientou quanto ao ingresso na pós-graduação, foi fundamental nos primeiros passos e, desde então, sempre ajudou quando necessário.

Ao Prof. Dr. Joseph Gleeson e toda sua equipe, pela cooperação e parceria no desenvolvimento da pesquisa e na análise dos dados.

À Dra. Camila Araújo Bernardino Garcia que foi sempre tão prestativa e esteve sempre disponível para colaborar e ajudar em todas as etapas, desde a elaboração do projeto até a execução, sempre com paciência e bom humor.

Ao bioinformata Reginaldo Cruz Alves Rosa por todo o suporte e orientações na aplicação das técnicas de bioinformática, até então completamente estranhas e distantes para mim.

Ao Centro de Medicina Genômica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, por toda estrutura fundamental para o desenvolvimento do projeto.

Por fim, em especial, à minha família. Aos meus pais, por todo o estímulo aos estudos que recebo desde sempre, às custas de muito sacrifício dos mesmos. À minha esposa, de quem sempre recebi suporte e compreensão irrestrita em todo período da pós-graduação.

Apoio Financeiro

*O presente estudo foi realizado com apoio da
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
Superior - Brasil (CAPES)*

Resumo

TEIXEIRA, T. L. **Mapeamento completo do exoma em displasias corticais focais tipo II em crianças e adolescentes.** 151f. 2022. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2022.

A displasia cortical focal (DCF) compreende um espectro das malformações focais do desenvolvimento cortical, caracterizada pela alteração da citoarquitetura do córtex cerebral, observando-se no tipo II a presença de neurônios dismórficos com ou sem células em balão. Alterações genéticas, especialmente da via mTOR, são responsáveis pela sua gênese. Representam a maior causa de epilepsia farmacorresistente em crianças e são responsáveis por grande morbidade na população pediátrica. O objetivo deste estudo foi avaliar os possíveis genes envolvidos e os tipos de mutações responsáveis pelo surgimento da DCF tipo II em crianças e adolescentes. Foram incluídos dezoito pacientes consecutivos, com faixa etária entre zero a 18 anos de idade, submetidos a procedimento cirúrgico para tratamento de epilepsia de difícil controle no Hospital das Clínicas da Faculdade de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com diagnóstico histopatológico de DCF tipo II. Foram obtidas amostras do parênquima cerebral e de sangue periférico durante o procedimento cirúrgico para tratamento da epilepsia e realizada análise genômica do tecido cerebral por meio de três metodologias distintas: *Whole Exome Sequencing* (WES), Amplicon e Ampliseq. Os dados gerados foram analisados a partir de técnicas de bioinformática, em plataforma R, sendo alinhados contra o genoma de referência utilizando-se o algoritmo "bowtie2" (genoma humano - hg19). Mutações somáticas nos genes MTOR (93%), DEPDC5 (67%), PIK3CA (33%) e TSC1 (27%) foram encontradas em frequência maior do que a previamente descrita na literatura, podendo variar de acordo com a metodologia de pesquisa utilizada. Isso reforça a importância da via mTOR na gênese das DCF tipo II e evidencia a necessidade da adequada seleção da metodologia de pesquisa quando da busca por essas mutações. Mutações patogênicas nos genes GPAT2, BAGE2.BAGE3 e ARM CX4 foram observadas em mais de um dos pacientes da amostra estudada. Missense foi o tipo de mutação mais frequente nesses pacientes. Não houve nenhuma importante diferença do perfil genético e das mutações entre os pacientes com DCF tipo IIa e IIb.

Palavras chave: Displasia cortical focal tipo II. Exoma. Epilepsia de difícil controle. Malformações do desenvolvimento cortical.

Abstract

TEIXEIRA, T. L. **Complete exome mapping in type II focal cortical dysplasias in children and adolescents.** 151f. 2022. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2022.

Focal cortical dysplasia (FCD) comprises a spectrum of focal malformations of cortical development characterized by alterations in the cytoarchitecture of the cerebral cortex, with type II having dysmorphic neurons with or without balloon cells. Genetic alterations, especially of the mTOR pathway, are responsible for its genesis. They represent the major cause of drug-resistant epilepsy in children and are responsible for high morbidity in the pediatric population. The aim of this study was to evaluate the possible genes involved and the types of mutations responsible for the emergence of type II FCD in children and adolescents. Eighteen consecutive patients were included, aged between 0 and 18 years old, submitted to a surgical procedure for the treatment of refractory epilepsy at the Clinical Hospital of Ribeirão Preto/SP and with a histopathological diagnosis of focal cortical dysplasia type II. Brain parenchyma and peripheral blood samples were obtained during the surgical procedure for the treatment of epilepsy and genomic analysis of brain tissue was performed using three different methodologies: Whole Exome Sequencing (WES), Amplicon and Ampliseq. The generated data were analyzed using bioinformatics techniques, in R platform, being aligned against the reference genome using the "bowtie2" algorithm (human genome - hg19). Somatic mutations in the MTOR (93%), DEPDC5 (67%), PIK3CA (33%) and TSC1 (27%) genes were found at a higher frequency than previously described in the literature, and may vary according to the research methodology used. This reinforces the importance of the mTOR pathway in the genesis of type II FCD and highlights the need for an adequate selection of research methodology when searching for these mutations. Pathogenic mutations in the GPAT2, BAGE2, BAGE3 and ARM CX4 genes were seen in more than one of the patients in the studied sample. Missense was the most frequent type of mutation in these patients. There were no important differences in the genetic profile and mutations between patients with type IIa and IIb FCD.

Key words: Focal cortical dysplasia type II. Exome. Refractory epilepsy. Malformations of cortical development.

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação gráfica do preparo e enriquecimento da biblioteca genômica utilizando o <i>kit Nextera Exome Rapid Capture</i> (Illumina, EUA).....	53
Figura 2 - Fluxograma da metodologia aplicada para a análise de bioinformática	57
Figura 3 - Diagrama mostrando a localização de cada termo de exibição em relação à estrutura da transcrição	103
Figura 4 - Figura representativa da análise de todos os genes relacionados ao gene GPAT2 por meio da rede de interação de proteínas PP1 (também chamada de Network Medicine). Grupos de proteínas são indicados em cores diferentes. As linhas representam as associações funcionais previstas. Associações fortes estão representadas por linhas mais grossas. Os genes que não se apresentavam ligados à rede foram excluídos da análise.....	110
Figura 5 - Figura representativa da análise de todos os genes relacionados ao gene ARM CX4 por meio da rede de interação de proteínas PP1 (também chamada de Network Medicine). Os grupos de proteínas estão indicados em cores diferentes. As linhas representam as associações funcionais previstas. Associações fortes estão representadas por linhas mais grossas. Os genes que não se apresentavam ligados à rede foram excluídos da análise.....	111
Figura 6 - Figura representativa da análise de todos os genes relacionados ao gene BAGE por meio da rede de interação de proteínas PP1 (também chamada de Network Medicine). Os grupos de proteínas estão indicados em cores diferentes. As linhas representam as associações funcionais previstas. Associações fortes estão representadas por linhas mais grossas. Os genes que não se apresentavam ligados à rede foram excluídos da análise.....	112

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Metodologia(s) para análise genética utilizada(s) em cada uma das amostras incluídas no estudo	50
Tabela 2 - Características clínicas dos pacientes incluídos no estudo - Dados obtidos dos prontuários médicos revisados	69
Tabela 3 - Diagnósticos histopatológicos e resultados das microdissecções	70
Tabela 4 - Metodologia(s) para análise genética utilizada(s) em cada uma das amostras incluídas no estudo	71
Tabela 5 - Algoritmos para pesquisa de variantes utilizadas em cada uma das amostras submetidas à WES.....	72

Lista de Gráficos

Gráfico 1 -	Sexo X Engel - Gráfico de barras ilustrando a quantidade de pacientes do sexo masculino e feminino da amostra, bem como o Engel atingido em cada um desses subgrupos após o tratamento cirúrgico	60
Gráfico 2 -	Subtipo DCF Tipo II X Engel - Gráfico de barras ilustrando a quantidade de pacientes da amostra com diagnóstico de displasia cortical tipo IIa e IIb e o Engel atingido em cada um desses subgrupos após o tratamento cirúrgico	61
Gráfico 3 -	Lateralidade X Engel - Gráfico de barras ilustrando o lado do hemisfério cerebral acometido na amostra e o Engel atingido pelos pacientes da amostra, de acordo com essa variável	63
Gráfico 4 -	Localização Anatômica X Engel - Gráfico de barras ilustrando a distribuição de acometimento da displasia cortical focal tipo II de acordo com o lobo cerebral e o Engel atingido em cada um desses subgrupos após o tratamento cirúrgico	63
Gráfico 5 -	Frequência pré-operatória das crises epiléticas X Engel - Gráfico de barras ilustrando a frequência de crise epilética pré-operatória nos pacientes da amostra e o Engel atingido em cada um desses subgrupos após o tratamento cirúrgico	64
Gráfico 6 -	Idade de início da epilepsia X Engel - Gráfico de barras ilustrando a quantidade de pacientes da amostra de acordo com a idade de início da epilepsia e o Engel atingido em cada um desses subgrupos após o tratamento cirúrgico	65
Gráfico 7 -	Idade na época da cirurgia X Engel - Gráfico de barras ilustrando a idade dos pacientes da amostra na época da cirurgia e o Engel atingido em cada um desses subgrupos após o tratamento cirúrgico	66
Gráfico 8 -	Tempo de doença até a cirurgia X Engel - Gráfico de barras ilustrando o tempo de doença desde o início dos sintomas até a cirurgia nos pacientes da amostra e o Engel atingido em cada um desses subgrupos após o tratamento cirúrgico	67
Gráfico 9 -	Tempo de seguimento ambulatorial pós-operatório X Engel - Gráfico de barras ilustrando o tempo de seguimento ambulatorial pós-operatório dos pacientes da amostra e o Engel dos mesmos até o presente momento.....	68
Gráfico 10 -	Total de mutações identificadas pela metodologia Amplicon em diferentes regiões e efeitos.....	73

Gráfico 11 -	Total de mutações identificadas pela metodologia Amplicon em diferentes regiões após a aplicação dos filtros para regiões de interesse pelo potencial de patogenicidade.....	74
Gráfico 12 -	Gráfico EpiPrint demonstrando a prevalência de mutações, após a aplicação dos filtros de patogenicidade, bem como o efeito das mutações encontradas nas amostras com diagnóstico de displasia cortical focal tipo II e submetidas à pesquisa genética pela metodologia Amplicon.....	76
Gráfico 13 -	Total de mutações identificadas pela metodologia Ampliseq em diferentes regiões e efeitos.....	77
Gráfico 14 -	Total de mutações identificadas pela metodologia Ampliseq em diferentes regiões após a aplicação dos filtros para regiões de interesse pelo potencial de patogenicidade.....	78
Gráfico 15 -	Gráfico EpiPrint demonstrando a prevalência de mutações, após a aplicação dos filtros de patogenicidade, bem como o efeito das mutações encontradas nas amostras com diagnóstico de displasia cortical focal tipo II e submetidas à pesquisa genética pela metodologia Ampliseq.....	79
Gráfico 16 -	Total de mutações identificadas, antes dos filtros, e efeito das mutações, em cada um dos pacientes submetidos à análise pela metodologia WES.....	80
Gráfico 17 -	Total de mutações identificadas, antes dos filtros, em diferentes regiões e efeitos nos pacientes submetidos à análise pela metodologia WES.....	81
Gráfico 18 -	Total de mutações identificadas, após aplicação dos filtros, e tipo das mutações, em cada um dos pacientes submetidos à análise pela metodologia WES	82
Gráfico 19 -	Total de mutações pontuais identificadas pelo algoritmo Mutect2, antes dos filtros, e efeito das mutações, em cada um dos pacientes submetidos à análise pela metodologia WES	83
Gráfico 20 -	Total de mutações pontuais identificadas pelo algoritmo Strelka, antes dos filtros, e efeito das mutações, em cada um dos pacientes submetidos à análise pela metodologia WES	84
Gráfico 21 -	Total de mutações de inserção ou deleção identificadas pelo algoritmo Strelka, antes dos filtros, e efeito das mutações, em cada um dos pacientes submetidos à análise pela metodologia WES	84

Gráfico 22 -	Total de mutações identificadas, após aplicação dos filtros, e efeito das mutações, em cada um dos pacientes submetidos à análise pela metodologia WES.....	85
Gráfico 23 -	Total de mutações pontuais identificadas pelo algoritmo Mutect2, após aplicação dos filtros, e efeito das mutações, em cada um dos pacientes submetidos à análise pela metodologia WES.....	86
Gráfico 24 -	Total de mutações pontuais identificadas pelo algoritmo Strelka, após aplicação dos filtros, e efeito das mutações, em cada um dos pacientes submetidos à análise pela metodologia WES.....	86
Gráfico 25 -	Total de mutações de inserção ou deleção identificadas pelo algoritmo Strelka, após aplicação dos filtros, e efeito das mutações, em cada um dos pacientes submetidos à análise pela metodologia WES.....	87
Gráfico 26 -	Padrão e quantidade de trocas de bases nitrogenadas do DNA, após aplicação dos filtros, nas mutações pontuais de troca dos pacientes submetidos à análise pela metodologia WES	88
Gráfico 27 -	Gráfico EpiPrint demonstrando a prevalência de mutações, após a aplicação dos filtros de patogenicidade, bem como o efeito das mutações encontradas nas amostras com diagnóstico de displasia cortical focal tipo II e submetidas à pesquisa genética pela metodologia WES	90
Gráfico 28 -	Gráfico EpiPrint demonstrando a prevalência de mutações, após a aplicação dos filtros de patogenicidade, bem como o efeito das mutações encontradas em genes da via mTOR nas amostras com diagnóstico de displasia cortical focal tipo II e submetidas à pesquisa genética incluindo as três metodologias utilizadas no estudo: Amplicon, Ampliseq e WES	93
Gráfico 29 -	Gráfico EpiPrint demonstrando a prevalência de mutações, após a aplicação dos filtros de patogenicidade, bem como o efeito das mutações encontradas nas amostras com diagnóstico de displasia cortical focal tipo II e submetidas à pesquisa genética pela metodologia Amplicon.....	106
Gráfico 30 -	Gráfico EpiPrint demonstrando a prevalência de mutações, após a aplicação dos filtros de patogenicidade, bem como o efeito das mutações encontradas nas amostras com diagnóstico de displasia cortical focal tipo II e submetidas à pesquisa genética pela metodologia Ampliseq.....	107
Gráfico 31 -	Gráfico EpiPrint demonstrando a prevalência de mutações, após a aplicação dos filtros de patogenicidade, bem como o efeito das	

mutações encontradas em genes da via mTOR nas amostras com diagnóstico de displasia cortical focal tipo II e submetidas à pesquisa genética incluindo as três metodologias utilizadas no estudo: Amplicon, Ampliseq e WES. Há ainda a especificação de cada amostra analisada quanto ao subtipo específico da displasia cortical focal tipo IIa ou IIb 114

Lista de Siglas e Abreviaturas

CIREP-	Centro de Cirurgia de Epilepsia
DAE-	Drogas antiepilépticas
DCF-	Displasia cortical focal
EEG-	Eletroencefalograma
ExAC-	<i>Exome Aggregation Consortium</i>
GAIIX-	<i>Illumina Genome Analyzer IIX</i>
GATOR1-	<i>Gap Activity TOward Rags 1</i>
GFAP-	Proteína glial fibrilar ácida
GPAT2-	Glycerol-3-Phosphate-Acyltransferase 2
H&E-	Hematoxilina-eosina
HCFMRP-USP-	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HME-	Hemimegalencefalia
ILAE-	Liga Internacional Contra a Epilepsia
MDC-	Malformação do desenvolvimento cortical
mTOR-	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
mTORC1-	mTOR complex 1
mTORC2-	mTOR complex 2
PCR-	Reação em cadeia da polimerase
PI3K-	Phosphoinositide-3-kinase
PPI-	<i>Protein-Protein Interaction</i>
Rheb-	<i>Ras homolog enriched brain</i>
SBS-	<i>Sequencing-by-Synthesis</i>
SNVs-	<i>Single-nucleotide variants</i>
TSC1-	Produto da proteína do cromossomo 9q34 gene TSC1

TSC2-	Produto da proteína do cromossomo 16p13 gene TSC2
UMIs-	Identificadores moleculares únicos
VAF-	Frequência da variante alélica (do inglês Variant Allele Frequency)
WES-	<i>Whole Exome Sequencing</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1. Desenvolvimento cortical cerebral.....	26
1.2. Malformações do desenvolvimento cortical	27
1.2.1. Displasia cortical	29
1.2.1.1. Displasia cortical focal tipo I.....	31
1.2.1.2. Displasia cortical focal tipo II.....	32
1.2.1.3. Displasia cortical focal tipo III.....	33
1.2.2. Papel da via mTOR na patogênese das displasias corticais.....	33
1.2.3. Papel de outras vias na patogênese das displasias corticais.....	35
1.3. Epilepsias.....	35
1.3.1. Epilepsia de difícil controle	36
1.3.2. Classificação das crises epilépticas.....	37
1.3.3. Classificação das epilepsias.....	37
1.3.4. Genética nas epilepsias	38
1.3.5. Tratamento da epilepsia	39
1.3.6. Seleção de pacientes para tratamento cirúrgico da epilepsia	40
1.4. Justificativa	40
2. OBJETIVOS.....	42
1.1. Objetivo geral	43
1.2. Objetivos específicos.....	43
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	44
3.1. Aspectos éticos	46
3.2. Pacientes	46
3.3. Cálculo do tamanho amostral	47
3.4. Critérios de exclusão	47
3.5. Obtenção das amostras	48
3.6. Microdissecção das amostras	48
3.7. Análise patológica e imuno-histoquímica.....	49
3.8. Análise genômica	49
3.8.1. Extração de DNA - sangue	50
3.8.2. Extração de DNA - tecido	51
3.8.3. Análise da integridade do DNA.....	51
3.8.4. Sequenciamento do exoma	51
3.8.4.1. Triagem de variantes e validação de variantes da via mTOR.....	54
3.8.5. Análise de bioinformática.....	55
3.8.6. WES mapeamento e filtragem/leitura Amplicon	55
3.8.7. Identificação das variantes	55
3.8.8. Identificação das variantes somáticas específicas do cérebro	56
3.8.9. Etapas finais de filtragem das variantes identificadas	57
3.9. Análise estatística	57
3.10. Cooperação internacional.....	58
4. RESULTADOS.....	59
4.1. Caracterização clínica dos pacientes selecionados	60

4.1.1. Sexo	60
4.1.2. Diagnóstico histopatológico	61
4.1.3. Lateralidade.....	61
4.1.4. Ressonância magnética pré-operatória	62
4.1.5. Frequência pré-operatória das crises epiléticas.....	63
4.1.6. Idade de início da epilepsia	64
4.1.7. Idade na época da cirurgia	65
4.1.8. Tempo de doença.....	66
4.1.9. Seguimento ambulatorial pós-operatório	67
4.2. Microdissecção	70
4.3. Caracterização genética	71
4.3.1. Metodologias utilizadas na análise genética	71
4.3.2. Amplicon.....	73
4.3.2.1. Análise das variantes encontradas pelo Amplicon	73
4.3.2.2. Análise das variantes de interesse identificadas pelo Amplicon	74
4.3.3. Ampliseq.....	76
4.3.3.1. Análise das variantes encontradas pelo Ampliseq.....	77
4.3.3.2. Análise das variantes de interesse identificadas pelo Ampliseq	78
4.3.4. Whole exome sequencing (WES).....	80
4.3.4.1. Análise das variantes encontradas pela WES	80
4.3.4.2. Análise das variantes quanto à localização e ao tipo da mutação	83
4.3.4.3. Análise das variantes de interesse identificadas pelo WES.....	88
4.3.5. Todas as metodologias	92
5. DISCUSSÃO	94
5.1. Definição	95
5.2. Caracterização clínica e epidemiológica	96
5.3. Metodologia de pesquisa e mutações encontradas	101
5.4. Tipos de mutações e potencial de patogenicidade.....	102
5.5. Influência da via mTOR na DCF tipo II.....	104
5.6. Papel de outras vias já descritas na DCF tipo II.....	108
5.7. Demais genes encontrados no WES	109
5.8. Correlação genética com desfechos clínicos	113
5.9. Diferenciação genética da DCF tipo IIA e IIB.....	113
6. CONCLUSÕES	115
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117
8. ANEXOS	124
9. APÊNDICES	132

1- Introdução

1.1 Desenvolvimento cortical cerebral

O córtex cerebral dos mamíferos é uma complexa estrutura laminada que contém grande diversidade de neurônios e uma rica conectividade local e extrínseca (BYSTRON; BLAKEMORE; RAKIC, 2008). Esse córtex cobre quase todo o cérebro humano, o que só é possível devido ao enorme crescimento e aumento da sua área de superfície, ocorridos ao longo da evolução dos mamíferos (GOTZ; SOMMER, 2005). É formado a partir da região mais rostral do tubo neural, o prosencéfalo, que se divide em telencéfalo e diencéfalo. A região dorsal do telencéfalo dá origem ao córtex cerebral, que compreende o neocórtex, paleocórtex (córtex piriforme) e o arqueocórtex (hipocampo), enquanto o telencéfalo ventral se diferencia nos núcleos da base (GOTZ; SOMMER, 2005). A partir daí, passa por um complexo e organizado processo, começando com a produção dos precursores neuronais e gliais nas zonas germinativas, próximos aos ventrículos laterais e terceiro ventrículo, seguido pela migração desses neurônios para seus destinos (BARKOVICH; GRESSENS; EVRARD, 1992).

Um dos pontos principais do desenvolvimento do neocórtex é a migração neuronal. Ao longo de todo neuro-eixo novos neurônios pós-mitóticos são gerados de células pseudoestratificadas do neuroepitélio que circunda o ventrículo lateral nas ditas zonas germinativas (BIELAS *et al.*, 2004). O neocórtex consiste em seis camadas de neurônios que possuem morfologia e funções distintas. O desenvolvimento dessas camadas neuronais envolve a migração radial e tangencial de neurônios até suas posições laminares finais (BIELAS *et al.*, 2004).

A migração neuronal para o córtex cerebral ocorre durante o período embrionário, entre 10 e 20 semanas nos humanos, dando-se em três estágios. No primeiro estágio, o córtex primitivo consiste em apenas duas camadas: a zona proliferativa ventricular e a mais superficial pré-platô. A pré-platô deriva da primeira onda de migração de neurônios vindos da zona proliferativa. No segundo estágio, ondas de neurônios pós-mitóticos saem da zona proliferativa e se movem em direção radial para a superfície pial, onde dividem a zona pré-platô em zona marginal (acima) e subplatô (abaixo), estabelecendo uma nova zona chamada de platô cortical. Essa nova camada de células contribuirá para a formação das camadas 2 a

6 do córtex. Entre 12 e 20 semanas ondas sequenciais de neurônios migram da zona proliferativa para o platô cortical. Uma das características mais marcantes dessa formação cortical é o fato de ocorrer de dentro para fora, estando mais superficiais neurônios mais tardiamente formados e mais profundos neurônios mais precocemente formados (BIELAS *et al.*, 2004). No entanto, a camada mais superficial de neurônios migra através da zona subplatô. Essa migração tangencial ocorre em diferentes camadas do córtex em desenvolvimento, podendo inclusive ocorrer ao longo de grandes distâncias nas zonas intermediárias (BYSTRON; BLAKEMORE; RAKIC, 2008). Interneurônios também podem fazer parte desse processo. Cada onda de migração neuronal entra em contato com a zona marginal até encontrar alguma sinalização para parar. Além disso, neurônios destinados para uma camada em particular do neocórtex são gerados numa mesma data ou em datas próximas (BIELAS *et al.*, 2004). O estágio final do desenvolvimento cortical é a maturação neuronal, em que os neurônios recém-chegados, após alcançarem seu destino final, desenvolvem as conexões sinápticas (BIELAS *et al.*, 2004).

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

1.2 Malformações do desenvolvimento cortical

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

A exata incidência das MDC não é conhecida, no entanto, têm sido diagnosticadas com maior frequência desde a incorporação da ressonância

magnética na investigação de pacientes com epilepsia, retardo mental e déficit neurológico congênito (LEVENTER; GUERRINI; DOBYNS, 2008). É estimado que 25 a 40% das epilepsias intratáveis ou farmacorresistentes da infância podem ser atribuídas às MDC e que ao menos 75% dos pacientes com MDC terão epilepsia (LEVENTER; GUERRINI; DOBYNS, 2008).

Um esquema de classificação foi introduzido baseado na etapa mais precoce do processo de desenvolvimento cortical afetada (Anexo A). Entretanto, atualizações dela têm recaído mais sobre os aspectos genéticos e, dessa forma, longe do fim com as constantes descobertas (BARKOVICH *et al.*, 2012).

A classificação é baseada em três eventos embriológicos fundamentais da formação cortical. 1) Proliferação celular na matriz germinativa; 2) Migração das células do córtex cerebral em desenvolvimento e 3) Organização vertical e horizontal das células no córtex com o estabelecimento das ramificações axonais e dendríticas (Tabela 1) (BARKOVICH *et al.*, 1996). Dessa forma, as MDC são divididas em três grandes grupos e, dentro deles, subdivididas. Grupo I: Malformações secundárias à proliferação neuronal/glial anormal ou apoptose. Este grupo é subdividido em três categorias: proliferação reduzida ou apoptose acelerada (microcefalias); aumento da proliferação ou diminuição da apoptose (megalencefalias) e proliferação anormal (displasia cortical focal ou difusa). Grupo II: Malformações devido à migração neuronal anormal. Este grupo é subdividido em quatro subcategorias: Malformações resultantes de anormalidades do neuroependima (início da migração), incluindo principalmente heterotopia periventricular; Anormalidade generalizada de migração, incluindo principalmente as lissencefalias; Anomalias localizadas da migração transmantular, estando nessas principalmente as heterotopias e anormalidades devido à migração anormal/defeitos na membrana limitante. Grupo III: Malformações no desenvolvimento pós-migratório, com três subgrupos: polimicrogiria e esquizencefalia; displasias corticais focais (DCF) e microcefalia pós-migratória (BARKOVICH *et al.*, 2012).

Clinicamente, as MDC possuem grande diversidade de apresentação e podem gerar diferentes graus de incapacidade, sendo separadas em dois grandes grupos que, algumas vezes, se sobrepõem: MDC difusa precoce, com piores índices de desenvolvimento e desfechos neurológicos e MDC de início tardio, com

desfechos variáveis de acordo com o grau de envolvimento cerebral (GUERRINI; DOBYNS, 2014).

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

1.2.1 Displasia cortical

A DCF compreende um espectro das malformações focais do desenvolvimento cortical caracterizada pela alteração da citoarquitetura do córtex cerebral (CRINO, 2015a,b). O termo DCF foi usado pela primeira vez por Taylor et al. (1971) para descrever uma anormalidade histológica observada em espécimes cirúrgicas de dez pacientes com epilepsia (LEVENTER; GUERRINI; DOBYNS, 2008). Tem tamanho variado e pode se localizar em qualquer parte do cérebro; podendo ser, inclusive, multi-lobar. Está altamente associada com epilepsias farmacorresistentes (BLÜMCKE *et al.*, 2011, CRINO, 2015a), sendo a principal causa de epilepsia refratária na população pediátrica e a segunda/terceira etiologia mais comum nos adultos (JIN *et al.*, 2016; KABAT; KRÓL, 2012).

As DCFs são classificadas, geralmente, como sendo secundárias a alterações pós-migratórias do desenvolvimento, com evidências que suportam que podem resultar de injúria ao córtex durante estágios finais do desenvolvimento cortical (BARKOVICH *et al.*, 2012).

Historicamente, grande variedade de classificações tem sido proposta para as DCFs tentando relacionar achados patológicos com mecanismos de desenvolvimento. Após Taylor, adotou-se o sistema de classificação de Palmini, sendo também este, posteriormente, reestruturado e subdividido (CRINO, 2015a). Em 2011, a Comissão de Métodos Diagnósticos da Liga Internacional Contra a

Epilepsia (ILAE) criou uma nova classificação que distingue os subtipos de DCF baseada nas características histopatológicas (Anexo B) (BLÜMCKE *et al.*, 2011; CRINO, 2015a,b).

A DCF tipo I caracteriza-se por estratificação cortical anormal e é subdividida em três subtipos: Tipo Ia, com alterações nas microcolunas radiais que se assemelham ao padrão de organização microcolunar dos estágios iniciais do desenvolvimento cortical; Tipo Ib com alterações tangenciais da laminação cortical e o Tipo Ic, uma combinação de ambos. A DCF tipo II é subdividida em dois subgrupos: Tipo IIa, caracterizado pela presença de neurônios dismórficos e citomegálicos, sem contudo haver células em balão; e Tipo IIb, caracterizado por neurônios dismórficos/citomegálicos com presença de células em balão. As células em balão possuem um corpo celular alargado e opalescente, com aspecto vítreo e citoplasma eosinofílico. Por fim, o tipo III compreende aquelas DCFs com alterações patológicas adjacentes ou associadas à lesão cerebral principal, subdividido em quatro subtipos. Tipo IIIa, quando associado à esclerose hipocampal; Tipo IIIb, quando associado a tumores (Ganglioglioma, Tumor Neuroepitelial Disembrioblástico ou neoplasias associadas a epilepsia); Tipo IIIc, associado a malformações vasculares (malformação arterio-venosa, cavernoma, malformação vascular leptomeníngea, telangiectasia, meningoangiomas); e o Tipo IIId, quando associado a qualquer outra lesão adquirida durante o início da vida (lesão após traumatismo crânio-encefálico, gliose após injúria hipóxico-isquêmica ou sangramento perinatal, doença inflamatória ou infecciosa, dentre outras). Histopatologicamente, as DCFs tipo III apresentam anormalidades tipo I, incluindo laminação cortical alterada (BLÜMCKE *et al.*, 2011; CRINO, 2015a,b).

Outros tipos de malformações focais do desenvolvimento cortical, como a esclerose tuberosa, hemimegalencefalia (HME) e outras recém-descobertas síndromes de DCF não foram ainda incluídas na classificação da ILAE. No entanto, túberes corticais são histologicamente similares à DCF Tipo IIb, além do que, a HME pode ocorrer com ou sem células em balão, também se assemelhando à DCF Tipo IIb. Algumas epilepsias familiares focais podem apresentar características da DCF Tipo IIa ou IIb (CRINO, 2015b).

Dessa forma, levando-se em conta apenas os aspectos histopatológicos das malformações do desenvolvimento cortical, o grau de concordância entre observadores é baixo (BLÜMCKE *et al.*, 2021). O acréscimo de informações genéticas e imuno-histoquímicas a essa classificação aumenta o grau de concordância entre observadores, tendo BLÜMCKE *et al.* (2021) relatado aumento de 25% para 75% na concordância diagnóstica entre observadores quando acrescentaram um painel imuno-histoquímico à análise histopatológica com hematoxila e eosina.

Clinicamente, a epilepsia, geralmente farmacorresistente, é a principal manifestação das DCFs (BALDASSARI *et al.*, 2019; BLÜMCKE *et al.*, 2011; CRINO, 2015a). A DCF e HME representam a causa mais comum de crise epiléptica neocortical de início na infância, além de serem frequentemente refratárias ao tratamento medicamentoso e candidatas a tratamento cirúrgico (BALDASSARI *et al.*, 2019). Em alguns casos há também associação de atraso do desenvolvimento psicomotor, particularmente quando de início precoce (BLÜMCKE *et al.*, 2011; CRINO, 2015a). Geralmente, não há déficit neurológico focal, a não ser que grandes áreas do tecido cerebral estejam afetadas (BLÜMCKE *et al.*, 2011). Os sintomas podem surgir em qualquer idade, sendo mais comuns na infância (CRINO, 2015a).

A ressonância magnética é o método de imagem mais utilizado para o diagnóstico das DCFs, com características específicas e que podem diferir entre os diferentes subtipos da patologia (BLÜMCKE *et al.*, 2011).

1.2.1.1 Displasia cortical focal tipo I

A DCF tipo I pode afetar um lobo ou múltiplos lobos, mesmo quando a ressonância magnética pré-operatória é normal. Pode ser sutil e, assim, um desafio para o neuropatologista (CRINO, 2015a). Essas DCFs, quando isoladas, estão frequentemente associadas com crises convulsivas constantes, ressonância magnética normal e envolvimento multilobar, além de piores resultados com o tratamento cirúrgico (CRINO, 2015a). No que diz respeito à sua patogênese, as descrições na literatura do arsenal genético envolvido são mais escassas (JESUS-RIBEIRO *et al.*, 2021). A DCF tipo 1 é causada por gene não relacionado à via

mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) e que gera um defeito focal na migração neuronal ou falha focal na laminação cortical e ausência de neurônios citomegálicos (BALDASSARI *et al.*, 2019; JESUS-RIBEIRO *et al.*, 2021). Mutações somáticas no gene SCL35A2 que levam à N-glicosilação aberrante foram descritas em pacientes com DCF tipo I (BLÜMCKE *et al.*, 2021).

1.2.1.2 Displasia cortical focal tipo II

A DCF tipo II é comum nas séries cirúrgicas e a maior causa de epilepsia farmacorresistente em crianças. É mais comum nas áreas extratemporais, particularmente no lobo frontal, sendo tipicamente observada nas imagens de ressonância pré-operatória (CRINO, 2015a).

Indivíduos com DCF tipo II, indicados para cirurgia, geralmente têm início mais precoce das crises convulsivas, duração menor da epilepsia e maior frequência de crises comparados aos indivíduos com DCF tipo I (CRINO, 2015a). A DCF tipo II é, geralmente, caracterizada por hipo ou desmielinização da substância branca subcortical. Na imagem de ressonância magnética em T1 tais alterações causam borramento da transição cortico-subcortical, mimetizando um espessamento cortical (BLÜMCKE *et al.*, 2011; COLOMBO *et al.*, 2009). O aumento do sinal subcortical da substância branca é visível nas imagens em T2 e *FLAIR* (BLÜMCKE *et al.*, 2011). As alterações do sinal da substância branca, frequentemente, vão desde o topo do giro ou fundo do sulco até o ventrículo, refletindo as unidades radiais glioneurais, chamado de “Sinal Transmantle”, estando esse quase exclusivamente restrito às DCFs tipo IIb (BARKOVICH *et al.*, 1997, BLÜMCKE *et al.*, 2011). O borramento da transição córtico-subcortical nas ressonâncias em T1 e *FLAIR* é mais pronunciado do que na DCF tipo I (BLÜMCKE *et al.*, 2011).

Quanto à patogênese, a DCF tipo II é causada por variantes somáticas e germinativas em genes da via mTOR (sete já descritos: AKT3, DEPDC5, MTOR, PIK3CA, RHEB, TSC1, TSC2), gerando hiperativação da via mTOR e convergindo para um fenótipo comum com neurônios displásicos e/ou células em balão (BALDASSARI *et al.*, 2019).

1.2.1.3 Displasia cortical focal tipo III

Histopatologicamente, os subtipos da DCF tipo III apresentam anormalidades da DCF tipo I, incluindo laminação cortical alterada. No entanto, o achado de uma banda anormal de pequenos neurônios “granulares” na parte externa da camada II pode distinguir a DCF tipo I dos subtipos da DCF tipo III (CRINO, 2015a,b).

Os aspectos clínicos específicos da DCF tipo III, bem como as nuances da associação das patologias, ainda estão por serem melhor elucidados (BLÜMCKE *et al.*, 2011). Um estudo correlacionando especificamente o padrão do início ictal nos pacientes com epilepsia do lobo temporal e a associação de DCF tipo I e esclerose hipocampal mostrou que aproximadamente 40% das crises iniciaram-se no complexo amígdala/hipocampo, 35% do neocórtex temporal (incluindo a displasia cortical), 22% simultaneamente dos dois lugares e 2% de outras regiões (FAUSER; SCHULZE-BONHAGE, 2006).

1.2.2 Papel da via mTOR na patogênese das displasias corticais

A via mTOR é uma cascata de sinalização celular envolvida na patogênese de diversas malformações do desenvolvimento cortical (ROSSINI *et al.*, 2017). É uma serine/threonine quinase, altamente conservada em muitos organismos. A cascata de sinalização da mTOR está envolvida na manutenção da homeostase celular, no metabolismo energético, estresse oxidativo, na proliferação e sobrevivência, resposta a fatores de crescimento, diferenciação e migração, organização do citoesqueleto e autofagia (CRINO, 2015a,b; JESUS-RIBEIRO *et al.*, 2021). Essa via é influenciada por uma série de sinais celulares (insulina, fatores de crescimento, estresse) e também por diversas outras vias correlatas, de forma direta ou indireta, sendo a PI3K/AKT a principal via descrita até o momento, capaz de exercer influência sobre ela (RICE; WADHWANI, 2015).

A atuação da mTOR, como quinase, pode ser dividida em dois complexos heteroméricos: mTOR complex 1 (mTORC1) e mTOR complex 2 (mTORC2). O mTORC1 é modulado primariamente por meio do fator de crescimento da cascata de sinalização PI3K (phosphoinositide-3-kinase)-AKT-mTOR, e pela rapamicina, um

antibiótico inibidor da função e que age através da proteína de ligação FKBP12. O mTORC2 desempenha um papel regulatório indireto na mTORC1 através da via de sinalização AKT e é relativamente insensível à rapamicina (Anexo C) (CRINO, 2015a,b; JESUS-RIBEIRO *et al.*, 2021).

O mTORC1 é modulado acima pelo TSC1 (produto da proteína do cromossomo 9q34 gene TSC1) e TSC2 (produto da proteína do cromossomo 16p13 gene TSC2) via Rheb (Ras homolog enriched brain). Os efeitos dos receptores insulino-dependentes e de fatores de crescimento, do metabolismo energético celular e dos fatores induzidos pela hipóxia convergem no complexo TSC1/TSC2 (CRINO, 2015a,b). O GATOR1 (*Gap Activity TOWard Rags 1*) é outro complexo modulador da atividade da mTOR, recentemente identificado (MYERS; SCHEFFER, 2017).

As consequências da desregulação da via mTOR consistem, principalmente, na geração de severas alterações corticais, com morfologia celular anormal, frequentemente associadas com epilepsias intratáveis. Essas alterações neuropatológicas se devem à expressão aberrante de várias proteínas da via que não são normalmente ativadas durante o desenvolvimento cortical. Isso ocorre porque a mTOR age como regulador central de muitas etapas durante o desenvolvimento e maturação cortical cerebral, incluindo crescimento celular, proliferação, metabolismo energético, inflamação e plasticidade sináptica (ROSSINI *et al.*, 2017).

Estudos relacionando malformações do desenvolvimento cortical com mutações somáticas na via mTOR, em especial no gene MTOR, em genes do complexo GATOR1 (DEPDC5, NPRL2, NPRL3), PI3KCA e AKT3 têm sido realizados (CRINO, 2015b; ROSSINI *et al.*, 2017).

Lim *et al.* (2015), em experimento envolvendo a expressão cortical focal de mTOR mutada através da eletroporação intraútero de camundongos, observou prejuízo no processo de migração neuronal e surgimento de crises epiléticas espontâneas e neurônios citomegálicos nesses animais. Por outro lado, quando inibiu a mTOR com rapamicina não houve surgimento de neurônios citomegálicos e crises epiléticas. Dessa forma, ratificou o papel da via mTOR na gênese da DCF

(LIM *et al.*, 2015, PARRINI *et al.*, 2016), bem como seu papel como potencial alvo terapêutico a ser explorado (LIM *et al.*, 2015).

1.2.3 Papel de outras vias na patogênese das displasias corticais

Até o momento pouco se sabe sobre outras vias, independentes da via mTOR, diretamente relacionadas com a gênese das displasias corticais. Recentemente, Avansini *et al.* (2018) identificaram expressão aumentada dos genes NEUROG2 e RND2 (alvo do NEUROG2) na DCF tipo II. O NEUROG2 desempenha papel central na diferenciação neuronal em várias regiões do sistema nervoso central, com ação temporalmente exclusiva durante a neurogênese e espacialmente exclusiva na zona germinativa ventricular. Além disso, é um importante marcador de transição da neurogênese para gliogênese no período embrionário. Assim, sua superexpressão pode ser responsável pela geração de células aberrantes e neurônios dismórficos com características de célula de transição. Também, o RND2 exerce papel na migração neuronal radial (Anexo D).

O mecanismo proposto como responsável pela superexpressão do NEUROG2 envolve a baixa expressão de microRNAs (ex. hsa-let-7f, hsamiR-31 e hsa-miR-34a), uma classe de RNAs não-codificáveis que regulam a expressão genética na fase pós-transcrição (AVANSINI *et al.*, 2018).

A exata relação entre mutações somáticas na via mTOR e o mecanismo proposto pela NEUROG2, se é que existe, ainda necessita de melhor elucidação (AVANSINI *et al.*, 2018).

1.3 Epilepsia

A epilepsia, geralmente refratária, é a apresentação clínica mais comum de todos os tipos de DCF, bem como da esclerose tuberosa e HME. Os pacientes geralmente abrem o quadro na infância, precocemente, no entanto essas manifestações clínicas podem iniciar em qualquer idade (BALDASSARI *et al.*, 2019; BLÜMCKE *et al.*, 2011; CRINO, 2015a). É uma condição cerebral definida por pelo menos duas crises epiléticas não provocadas por nenhuma causa imediata

identificável e com intervalo maior que 24 horas entre elas, ou pela ocorrência de uma crise epilética não provocada por nenhuma causa imediata identificável associada a risco estimado de recorrência maior ou igual a 60% dentro dos próximos 10 anos (FISHER *et al.*, 2014). Crises epiléticas representam uma manifestação clínica de descargas anormais e excessivas de uma população de neurônios cerebrais. Consiste em um fenômeno transitório e repentino que pode incluir alteração da consciência, sintoma motor, sensitivo, autonômico ou psíquico que pode ser percebido pelo paciente ou por um observador (FISHER, 2017).

Trata-se de uma condição relativamente comum na população geral e uma das mais frequentemente tratadas pelos neurologistas. Sua taxa de incidência está relacionada à idade. As maiores taxas (de 100 a 233 por 100000) são observadas em crianças menores de um ano, com pico na primeira semana de vida. Essa taxa diminui na infância precoce para aproximadamente 60/100000, estando em torno de 30-40/100000 em adolescentes e adultos. Nos idosos, maiores de 65 anos, volta a subir para 100-170/100000. Esses valores variam de região para região, sendo maiores em países mais pobres e menos desenvolvidos (PANAYIOTOPOULOS, 2010). O diagnóstico é habitualmente clínico, sendo alguns meios complementares (eletroencefalografia, ressonância magnética, tomografia computadorizada) utilizados como medidas auxiliares para melhor caracterização ou confirmação diagnóstica (PANAYIOTOPOULOS, 2010).

1.3.1 Epilepsia de difícil controle

As epilepsias farmacorresistentes, também chamadas epilepsias de difícil controle, podem ser definidas como aquelas com resposta inadequada a um mínimo de duas drogas antiepiléticas de primeira linha, como monoterapia ou em combinação, adequadas para a síndrome epilética em tratamento (KWAN *et al.*, 2010). A duração recomendada é de pelo menos dois anos de tratamento em adultos, entretanto este pode ser um tempo muito longo para crianças ao se levar em conta as consequências para o seu desenvolvimento (PANAYIOTOPOULOS, 2010).

1.3.2 Classificação das crises epiléticas

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

1.3.3 Classificação das epilepsias

Também em 2017, a ILAE propôs uma nova estrutura de classificação das epilepsias que visa se associar e complementar a classificação das crises convulsivas. É composta por níveis de diagnósticos: tipo da crise convulsiva (descritos na seção anterior), tipo da epilepsia (focal, generalizada, focal e generalizada combinadas e desconhecida) e a síndrome epilética, quando presente. Prevê também a consideração do diagnóstico etiológico (estrutural, genético, infeccioso, metabólico, imune e desconhecido), sendo que um mesmo paciente pode ser enquadrado em mais de uma categoria etiológica (Anexo F) (SCHEFFER *et al.*, 2017).

Epilepsia generalizada é aquela que apresenta atividade generalizada no EEG (eletroencefalograma), podendo apresentar grande espectro de crises, dentre elas: ausência, mioclônica, atônica, tônica e tônico-clônica. O diagnóstico é feito pela

clínica e pelos achados do EEG (SCHEFFER *et al.*, 2017). A epilepsia focal inclui desordens unifocais ou multifocais, bem como crises envolvendo apenas um hemisfério. Amplo espectro de crises pode estar presente e o EEG interictal tipicamente apresenta descargas epileptiformes focais (SCHEFFER *et al.*, 2017). A epilepsia focal e generalizada combinadas, por fim, engloba aqueles pacientes que apresentam ambas as crises, focal e generalizada. É também diagnosticada a partir dos achados clínicos confirmados pelo EEG (SCHEFFER *et al.*, 2017).

O terceiro nível de classificação, quanto à síndrome epiléptica, diz respeito a um conjunto de características que inclui tipo de crises, achados do EEG e de imagem que tendem a ocorrer juntos e podem ter associação etiológica e implicações prognósticas e terapêuticas (SCHEFFER *et al.*, 2017).

1.3.4 Genética nas epilepsias

As primeiras descobertas de genes relacionados à epilepsia ocorreram na década de 1990 (BAMIKOLE *et al.*, 2019). Desde então, tal como nas DCFs, muito se tem estudado a respeito das alterações e características genéticas envolvidas na epilepsia e nas síndromes epiléticas. Nos últimos quinze anos, a lista de genes associados com epilepsia tem apresentado grande aumento. Isso tem ocorrido, principalmente, devido ao grande desenvolvimento da tecnologia envolvida na pesquisa e à maior capacidade de análises (PODURI, 2017). Em estudo publicado em 2017, a ILAE reportou 76 genes associados à epilepsia e identificados até então, sendo todos relacionados a diferentes grupos etários (FISHER, 2017).

O termo epilepsia genética inclui qualquer condição em que há epilepsia num contexto de uma variação genética. Em algumas desordens a epilepsia é a principal manifestação clínica, enquanto em outras é apenas um componente variável do fenótipo da doença (SANDS; CHOI, 2017). Nesse contexto, há um espectro variável de gravidade que vai desde formas benignas autolimitadas de epilepsia até encefalopatias epiléticas de início precoce (BAMIKOLE *et al.*, 2019; SANDS; CHOI, 2017). Além do que, as alterações genéticas dessas patologias variam dentro de um contínuo que inclui desde um número aberrante de cromossomos até uma discreta

substituição de nucleotídeos, podendo afetar desde a fisiopatologia até desfechos clínicos (SANDS; CHOI, 2017).

1.3.5 Tratamento da epilepsia

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

A cirurgia para tratamento da epilepsia é uma alternativa com comprovada eficácia na redução da frequência das crises convulsivas e na melhora da qualidade de vida do paciente. A segurança desse tipo de procedimento está bem estabelecida na literatura mundial, com risco de óbito menor que 2%. Dessa forma, é uma boa opção nos casos de epilepsia farmacorresistente (TRIPATHI; RAY; CHANDRA, 2016). No caso das DCFs, são responsáveis por até 50% das crianças submetidas a tratamento cirúrgico da epilepsia em algumas séries (LIM *et al.*, 2015), apresentando taxa de pacientes livres de crise após tratamento cirúrgico que varia entre 52 e 68,9% (JIN *et al.*, 2016; LIM *et al.*, 2015).

O tratamento cirúrgico em pacientes sem lesão identificável mostra-se menos eficaz. A presença de uma lesão epileptogênica identificável, também chamada de zona lesional, aponta geralmente a zona de início ictal, sendo sua completa ressecção o principal determinante da eficácia do resultado cirúrgico. Contudo, há situações em que uma área maior que a zona lesional compõe a zona epileptogênica. Nesses casos, uma ressecção mais ampla, além da lesão, se faz necessária (BLUME *et al.*, 2004).

1.3.6 Seleção de pacientes para tratamento cirúrgico da epilepsia

Pacientes que mantêm crises epiléticas apesar do tratamento com pelo menos duas medicações anti-epiléticas otimizadas têm menor chance de ficarem livres de crise apenas com tratamento medicamentoso e, por isso, especialmente aqueles com crises de alta morbidade são candidatos ao tratamento cirúrgico (JETTÉ; REID; WIEBE, 2014; JETTÉ; SANDRE; KEEZER, 2016).

A ressecção cirúrgica do foco epileptogênico em pacientes selecionados é altamente efetivo e com efeitos duradouros. Ainda assim, para aqueles em que a ressecção da zona epileptogênica não é possível em função da sobreposição de uma área eloquente do córtex, procedimentos não-ressectivos de desconexão podem ser indicados (JETTÉ; REID; WIEBE, 2014). Ainda que os melhores resultados sejam observados nos casos com epilepsia focal, o tratamento cirúrgico também pode ser considerado para pacientes sem uma lesão clara na ressonância e naqueles com epilepsia generalizada (JETTÉ; REID; WIEBE, 2014; JETTÉ; SANDRE; KEEZER, 2016).

1.4 Justificativa

As malformações do desenvolvimento cortical e a epilepsia refratária decorrente delas são responsáveis por grande morbidade na população pediátrica que afetam. Nesse grupo, as DCFs se destacam pela sua frequência e complexidade.

Mesmo diante dos recentes avanços da medicina no tratamento da epilepsia, uma parcela importante dessas crianças não obtém controle adequado das crises convulsivas após instituídas todas as linhas de tratamento disponíveis.

Compreender os mecanismos fisiopatológicos e, principalmente, as bases genéticas envolvidas nessa patologia permite maiores avanços terapêuticos, melhor caracterização prognóstica e, ainda, aconselhamento familiar mais adequado.

Além do mais, de acordo com Blümcke *et al.* (2011), a diferenciação clínica entre DCF Tipo IIa e IIb é uma questão ainda não resolvida. Essa diferenciação pode incluir, dentre outras, possíveis diferenças genéticas entre esses subtipos. A

distinção entre ambas as formas a partir de achados pontuais histopatológicos, que é o padrão vigente na literatura atual, precisará ser reconsiderada caso as demais diferenças não sejam bem documentadas. Portanto, determinar o perfil genético desses pacientes é um passo fundamental.

2. Objetivos

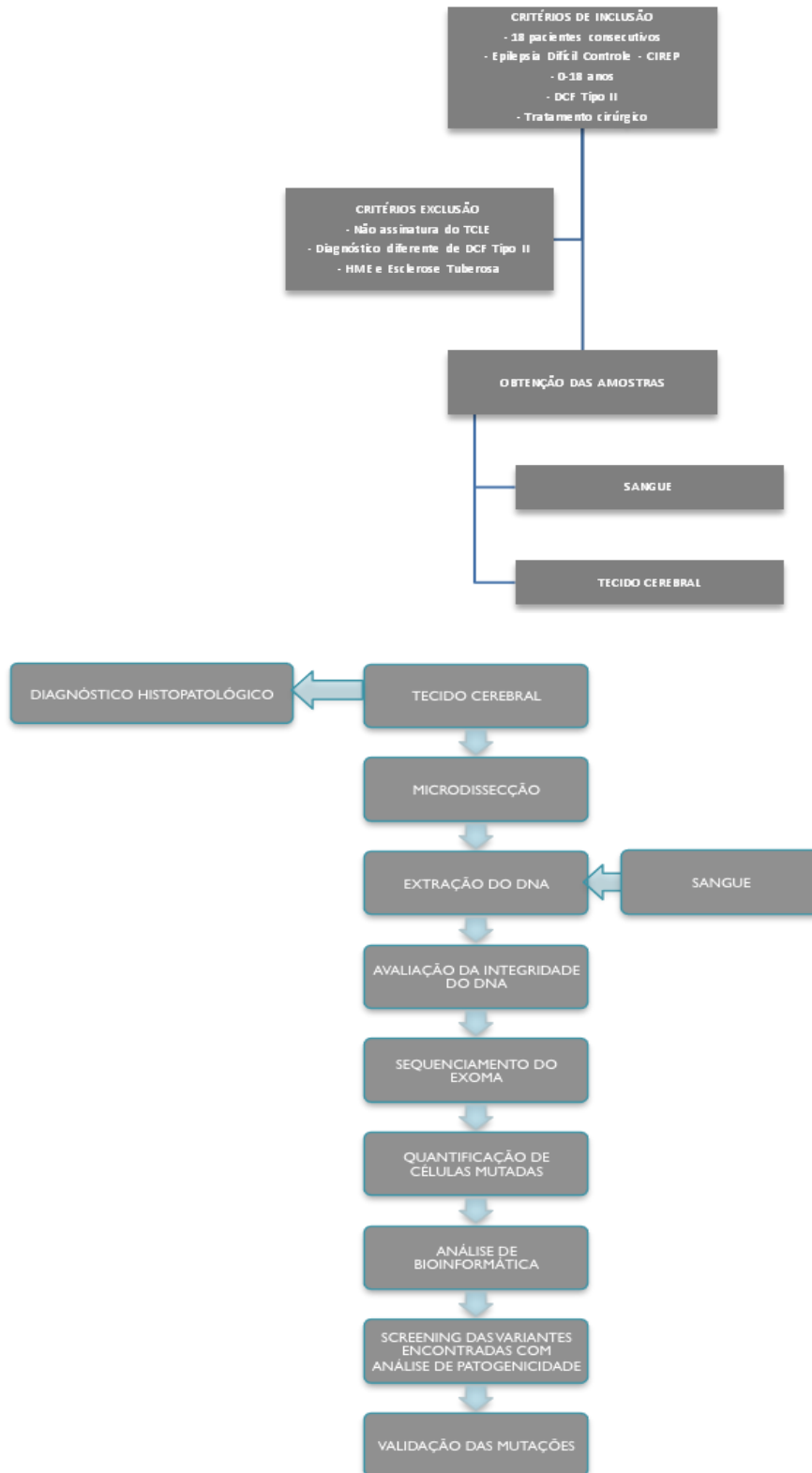
2.1 Objetivo geral

Realizar o mapeamento genético, identificando os genes mutados e o tipo das mutações de crianças e adolescentes portadores de epilepsia de difícil controle e DCF tipo II submetidos a tratamento cirúrgico.

2.2 Objetivos específicos

1. Identificar os genes mutados em crianças portadoras de DCF tipo II;
2. Identificar os tipos de mutações presentes nessa população;
3. Investigar possíveis vias genéticas e moleculares, incluindo a via mTOR e outras diferentes da mTOR, que possam estar alteradas e contribuindo na patogênese da DCF tipo II;
4. Buscar possíveis diferenças de mutações somáticas e padrão de mutação entre crianças portadoras de DCF tipo IIa e IIb.
5. Viabilizar futuras correlações entre essas mutações genéticas com características clínicas e epidemiológicas;

3. Casuística e Métodos



3.1 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), Processo nº 1810/2018 (Anexo G).

Todos os participantes receberam orientações sobre a natureza do estudo, seus objetivos e benefícios. Foram ainda informados que a pesquisa não lhes acarretaria riscos, ou despesas adicionais, e que a não aceitação não implicaria em qualquer prejuízo do tratamento. Foram incluídos aqueles que concordaram em participar do estudo e espontaneamente assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A).

3.2 Pacientes

Foram incluídos no estudo dezoito pacientes consecutivos, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, com idades entre zero e 18 anos, submetidos a procedimento cirúrgico para tratamento de epilepsia refratária no HCFMRP-USP, no período de maio de 2018 a dezembro de 2019, com diagnóstico histopatológico de DCF tipo II.

Os indivíduos foram selecionados para o tratamento cirúrgico a partir de critérios clínicos rigorosos, após extensa investigação no Centro de Cirurgia de Epilepsia (CIREP) do HCFMRP-USP, que envolveu realização de ressonância magnética e vídeoencefalograma, dentre outros possíveis exames, conforme fluxo assistencial normal do serviço. Após a avaliação de todos os dados clínicos e eletroencefalográficos, caso fosse identificada zona epileptogênica focal ou regional, o procedimento cirúrgico era proposto.

Para cada participante também foi coletada a história clínica completa, obtidos exames complementares pré e pós-operatórios, bem como laudo histopatológico e informações do seguimento ambulatorial após a cirurgia, incluindo o escore de Engel. Quanto ao acesso aos arquivos médicos e informações do prontuário, foi assegurada a privacidade, proteção da imagem e a não estigmatização dos participantes da pesquisa, garantindo a não utilização das

informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, inclusive em termos de autoestima, de prestígio e/ou de aspectos econômico-financeiros e garantia de manutenção do sigilo e da privacidade dos participantes da pesquisa durante todas as fases da pesquisa; conforme Resolução CNS nº 466 de 2012, itens III.2.i e IV.3.e.

3.3 Cálculo do tamanho amostral

Ainda que uma patologia extremamente importante no contexto da epilepsia em crianças, as DCFs são condições incomuns, se considerada a população geral, e ainda mais raras as que são elegíveis e dispõem da possibilidade de um procedimento cirúrgico para tratamento.

O HCFMRP-USP, baseado nos dados dos últimos cinco anos, tem realizado anualmente média de 27 cirurgias para tratamento de epilepsia em pacientes entre zero e 18 anos de idade, sendo que desse total 34% correspondem a malformações do desenvolvimento cortical. Para o cálculo do tamanho amostral foi adotado intervalo de confiança de 95% e admitido erro amostral de 5%, sendo aplicada a fórmula que se segue:

$$n = \frac{N \cdot Z^2 \cdot p \cdot (1 - p)}{Z^2 \cdot p \cdot (1 - p) + e^2 \cdot (N - 1)}$$

Onde:

n - amostra calculada

N - população

Z - variável normal padronizada associada ao nível de confiança

p - verdadeira probabilidade do evento

e - erro amostral

3.4 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo todos aqueles cujo responsável legal e/ou a criança não concordaram em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e aqueles em que o diagnóstico histopatológico foi diferente de DCF tipo II.

3.5 Obtenção das amostras

No ato cirúrgico, amostras do tecido cerebral foram obtidas por meio de biópsia de tecido cerebral da zona lesional, conforme determinado por exames pré-operatórios e, posteriormente, verificados durante o procedimento cirúrgico com auxílio de um sistema de neuronavegação intraoperatória, sem que isso tenha alterado a técnica operatória e/ou os passos técnicos cirúrgicos convencionais propostos para o caso. A amostra de tecido cerebral biopsiada foi, então, fracionada em duas partes, sendo uma enviada para análise e diagnóstico anatomopatológico, conforme o fluxo assistencial normal do hospital, e a outra transportada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer a -80°C em biorrepositório no HCFMRP-USP para ser, posteriormente, enviada para microdissecção e análise molecular. Uma amostra de sangue venoso também foi coletada no momento da cirurgia, sendo sempre utilizado o acesso venoso puncionado para o procedimento cirúrgico. Foram coletados 3 ml de sangue em tubo contendo EDTA e mantidos a 4°C até o momento de seu processamento.

3.6 Microdissecção das amostras

A amostra de tecido cerebral dos dezoito pacientes foi submetida à microdissecção. Esse processo visa a separação de um pequeno conjunto de células ou de uma porção selecionada de interesse dentro da amostra, com achados histopatológicos marcantes, e encaminhada para análise molecular; conferindo, assim, maior confiabilidade à amostra que será analisada seguindo uma metodologia padronizada.

Previamente ao processo de microdissecção, todo material passa pela autoclave. Álcool 70% com DEPC (DiethylPyroCarbonate) é usado para limpeza do criostato. Entre os cortes das amostras, a descontaminação do criostato é feito com RNAase. Durante todo esse processo, as amostras congeladas, previamente mantidas a -80°C , são mantidas em gelo seco. A partir de então monta-se a amostra num suporte de metal com gel Tissue-TekSakura e congela-a em nitrogênio líquido.

No criostato, faz-se um corte com 4 µm de espessura do material, cora-se a lâmina com hematoxilina-eosina (H&E) e, em seguida, a mesma é analisada sob visualização de microscópio óptico (Olympus CX31) com aumento de 40x pelo médico-neuropatologista, sendo identificada e marcada a área de interesse. Ainda com as amostras congeladas, a área de interesse marcada é microdissecada manualmente e o produto da microdissecção encaminhado para análise genômica.

3.7 Análise patológica e imuno-histoquímica

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

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

3.8 Análise genômica

A análise genômica das amostras foi realizada por meio de três diferentes metodologias, *Whole Exome Sequencing* (WES), Amplicon e Ampliseq, sendo que algumas amostras submetidas a mais de uma metodologia (Tabela 1).

Tabela 1 - Metodologia(s) para análise genética utilizada(s) em cada uma das amostras incluídas no estudo

	WES	Amplicon	AmpliSeq
FCD 4793			
FCD 4798			
FCD 4807			
FCD 4818			
FCD 4819			
FCD 4820			
FCD 4823			
FCD 5576			
FCD 5580			
FCD 5581			
FCD 5582			
FCD 5583			
FCD 5584			
FCD 6585			
FCD 6590			
FCD 6591			
FCD 6596			
FCD 6601			

3.8.1 Extração de DNA - sangue

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

3.8.2 Extração de DNA - tecido

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

3.8.3 Análise da integridade do DNA

O DNA extraído das amostras teve a pureza e concentração verificadas por meio do *Nanodrop® 8000* (Thermo Fisher Scientific, EUA) e *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen, EUA), respectivamente. Para verificar a pureza, foram utilizados 6 μ L de cada amostra (em triplicatas, sendo 2 μ L para cada análise). Amostras consideradas aptas à continuidade do experimento apresentaram valores da razão A260/280 entre 1,8 e 2. Para verificação da concentração das amostras foi utilizado o fluorímetro *Qubit® 2.0* e o *kit Qubit® Assay, Kit de DNA Broad Range Assay* (Invitrogen, EUA). Para se mensurar o tamanho do fragmento de cada amostra foi utilizado o equipamento *Fragment Analyzer*, seguindo a recomendação do fabricante. Só as amostras que estavam de acordo com os parâmetros foram encaminhadas para o sequenciamento do exoma.

3.8.4 Sequenciamento do exoma

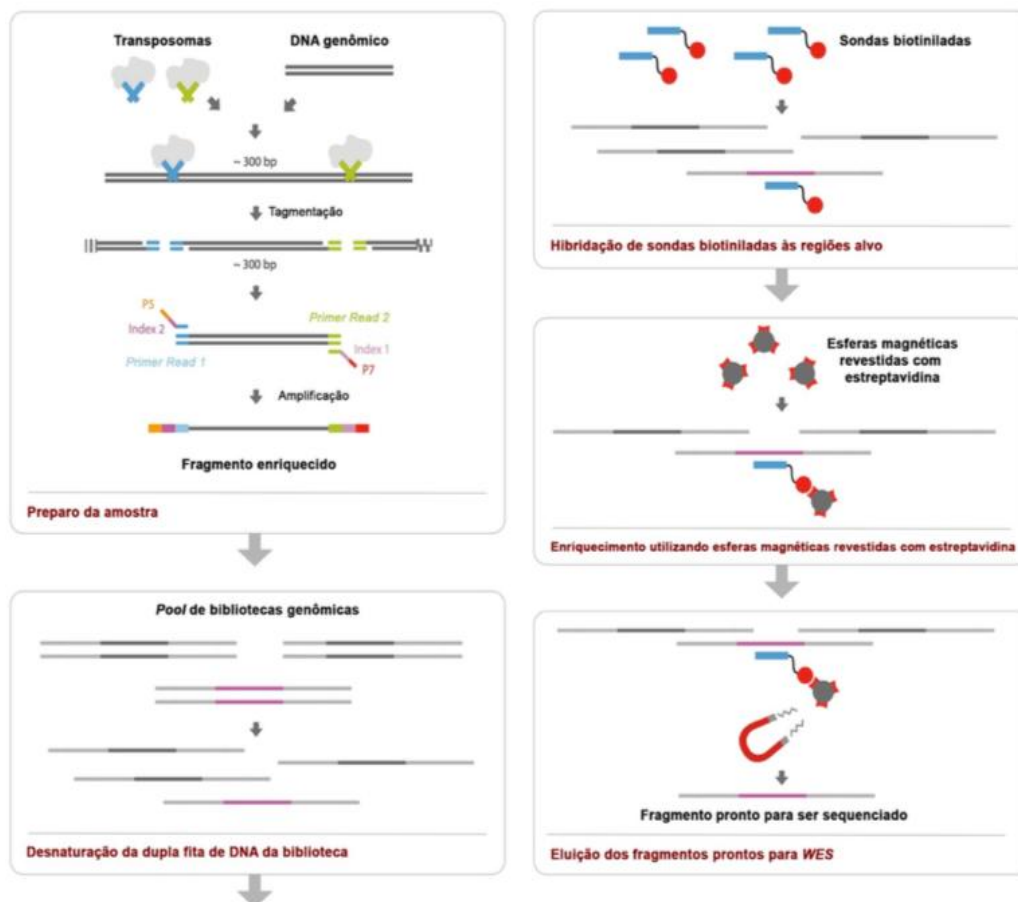
As bibliotecas de exoma foram preparadas com o *kit Nextera Exome Rapid Capture* (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). O DNA genômico foi corretamente quantificado por método fluorimétrico (*Qubit®*) e 50 ng de DNA de cada amostra foi utilizado na preparação das bibliotecas, seguindo as instruções do fabricante. Em

seguida, realizou-se a etapa de captura e enriquecimento do exoma com um conjunto de sondas altamente otimizadas para obtenção de cobertura igual ou maior que 50x abrangendo todo o exoma. Sondas de 95pb foram usadas na captura de 62Mb de regiões codificadoras de 20.794 genes. A primeira etapa consistiu na mistura do DNA devidamente quantificado com as sondas de captura. Em seguida, foram usadas esferas de estreptavidina para capturar as regiões alvos e aplicação de três lavagens para remoção de ligações não-específicas, deixando o material pronto para a segunda hibridação. O passo seguinte visou a amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase) da biblioteca. Nessa fase, foi crítica a quantificação da biblioteca e para isso foi realizada, além da quantificação fluorimétrica, uma quantificação absoluta por PCR em tempo real, utilizando-se o *kit* comercial *KAPA SYBR FAST* (KAPA Biosystems). Após a quantificação precisa, as bibliotecas foram diluídas de 8 a 10 pM de cada uma, usado para desnaturação e posterior *clusterização*, que consiste de três etapas: 1) amplificação dos *clusters*, 2) linearização e bloqueio e 3) hibridação dos *primers*. A primeira etapa foi realizada em uma estação de clusterização, no caso, o dispositivo fluídico chamado cBot. Portanto, as bibliotecas foram clusterizadas em uma *flowcell*, que é o suporte sólido da reação, com os reagentes *TruSeq PE Cluster Generation Kit v5* (Illumina Inc. San Diego, CA, USA). Durante a geração dos *clusters*, cada fragmento de cDNA das bibliotecas foi incorporado à superfície da *flowcell*, coberta com oligonucleotídeos complementares aos adaptadores, usados para amplificar o cDNA de forma isotérmica, dando origem aos *clusters*, ou seja, grupos ou colônias de fragmentos ligados à *flowcell*.

A linearização foi uma reação utilizada para retirar os adaptadores para assegurar que a hibridação e o sequenciamento ocorreram somente em uma das fitas de cada *cluster*. A etapa de bloqueio referiu-se à neutralização das hidroxilas presentes nas extremidades 3' dos *clusters* linearizados, para evitar a adição de substratos de fluoróforos ou qualquer outro segmento que não fosse o *primer* de sequenciamento. Uma desnaturação garantiu a formação de *templates* de fita simples, que foram hibridados aos *primers* de sequenciamento. Nesse ponto, a biblioteca esteve pronta para o sequenciamento, que foi realizado com o *kit TruSeq SBS kit v5* (Illumina Inc.), na configuração *paired-end 2x75bp* (de cada extremidade

dos transcritos foram sequenciados 75 nucleotídeos) em equipamento *Illumina Genome Analyzer Iix* (GAIix), baseado na tecnologia Solexa ou SBS (“Sequencing-by-Synthesis”), que permitiu a leitura massiva e paralela (simultânea) da sequência de nucleotídeos de milhões de fragmentos de DNA capturados das regiões codificadoras. A tecnologia SBS foi embasada na terminação da síntese da cadeia de DNA após a detecção do sinal fluorescente. Por terminação entendeu-se a clivagem do nucleotídeo marcado, já detectado, que possibilitou a adição do próximo nucleotídeo. Os eventos de incorporação e clivagem do nucleotídeo marcado e modificado ocorreram sucessivas vezes, dentro da *flowcell*; permitindo, desta forma, a leitura base a base e ao mesmo tempo eliminando possíveis erros em sequências com repetições da mesma base (regiões homopoliméricas) (Figura 1).

Figura 1 - Representação gráfica do preparo e enriquecimento da biblioteca genômica utilizando o kit *Nextera Exome Rapid Capture* (Illumina, EUA)



Fonte: Adaptado da plataforma ILLUMINA.COM.

3.8.4.1 Triagem de variantes e validação de variantes da via mTOR

O Amplicon é um método de sequenciamento direcionado e que permite analisar variações genéticas em regiões genômicas específicas. Este método utiliza PCR para criar sequências de DNA chamadas Amplicons a partir de regiões-alvo, que são previamente enriquecidas pela amplificação por PCR. Obtêm-se, nesse caso, variantes previamente validadas por PCR digital. Com a metodologia Amplicon, os seguintes genes foram pesquisados: MTOR, DEPDC5, AKT3, PIK3CA e TSC1.

O Ampliseq é uma ferramenta de sequenciamento de amostras de DNA de tecido fresco congelado com fluxo de trabalho baseado em PCR para uso em alvos específicos a partir de painéis pré-projetados de genes, que podem variar de alguns a centenas em uma única execução. No painel utilizado, as variantes foram previamente validadas por PCR digital. Com a metodologia Ampliseq foram analisados 80 genes que poderiam ter relação com os casos estudados. Dentre eles os principais foram: MTOR, PTEN, TSC2, AKT2, NF1, PIK3C2B, STZ2, NF2, TSC1, KRAS, RAF1, RPS6KA1, RPTOR, RRAGD, SOS1, STK11, MAP2K1, PIK3R2, SEC13, SOS2, TMEM127, DEPDC5, AKT1, AKT1S1, BRAF, DDIT4, FLCN, FNIP1, FNIP2, GSK3B, KLHL22, KPTN, LAMTOR2, NAPK3, NPRL3, PIK3C2G, PPP2R5E, RNF152, RPS6, SESN2, SGK1, SKP2, SLC38A9, SLC3A2, SLC7A5, AKT3 e PIK3CA.

As variantes encontradas pelo WES foram validadas por PCR digital de gotículas (ddPCR). Uma mistura de ddPCR SuperMix (Bio-Rad, Hercules, CA), sondas mutantes e de referência (0,25 μ M cada), *primers* diretos e reversos (0,9 μ M cada) e 30 ng de amostra de DNA foram emulsificados em 20.000 gotículas usando um QX200 Gerador de Gotas (Bio-Rad, Hercules, CA). A amplificação por PCR foi realizada usando os seguintes ciclos: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 60 segundos a 60°C e 10 minutos a 98°C. As amostras foram analisadas utilizando-se QX200 *Droplet Reader* e software *QuantaSoft* (Bio-Rad, Hercules, CA).

3.8.5 Análise de bioinformática

As análises de exomas sequenciados na plataforma Illumina foram realizadas no núcleo de bioinformática do Centro de Medicina Genômica do HCFMRP-USP e no Laboratório do Prof. Joseph Gleeson, na Universidade da Califórnia, em San Diego, Estados Unidos da América.

3.8.6 WES mapeamento e filtragem/leitura Amplicon

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

3.8.7 Identificação das variantes

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

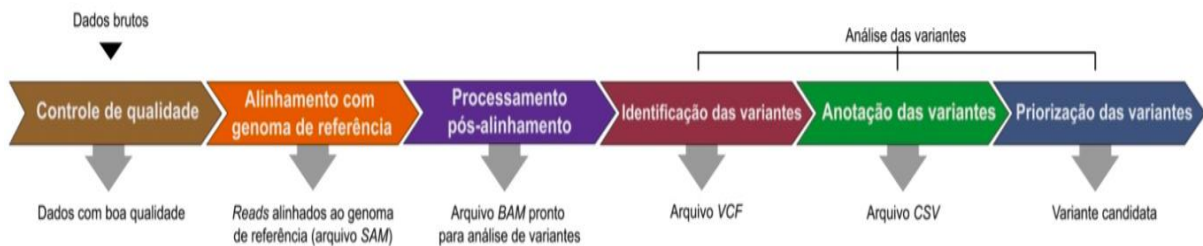
3.8.8 Identificação das variantes somáticas específicas do cérebro

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

Foram tabuladas como novas variantes somáticas específicas do cérebro usando dois tipos de chamadores de variantes somáticas com parâmetros padrão: Strelka 2 (v2.7.0) (SAUNDERS *et al.*, 2012) e muTect2 (v2) (CARTER *et al.*, 2012). Para cada indivíduo, considerou-se a amostra do cérebro como a “displasia” e a amostra de sangue “normal”.

Foram geradas chamadas somáticas específicas para o cérebro de alta qualidade, tomando a interseção de variantes identificadas tanto pelo Strelka quanto pelo muTect. Foram anotadas estas chamadas com consequências variantes (por exemplo, sinônimos, não-codificação, etc) e frequências alélicas do ExAC (LEK *et al.*, 2016) usando o Variant Effect Predictor (McLAREN *et al.*, 2016). Foram inseridos filtros para incluir apenas aquelas que resultaram em mudança na proteína (ou seja, missense, stop gain, splice site) e que tiveram uma frequência do alelo ExAC <1%.

Os testes estatísticos e gráficos foram elaborados no R utilizando o *package R Commander* (FOX; ANDERSEN, 2005) e no *GraphPad Prism 6*, com nível de significância estabelecida em $p < 0,05$. Para análise da interação das proteínas (PPI - do inglês: Protein-Protein Interaction) foi usado o *Network String*, em que a análise de redes e atuação de cada proteína é definida pelas cores de cada círculo e espessura das linhas que interligam as variantes expressas (Figura 2).

Figura 2 - Fluxograma da metodologia aplicada para a análise de bioinformática

3.8.9 Etapas finais de filtragem das variantes identificadas

Após extraídas as variantes e aplicados os filtros iniciais, foi realizada uma nova etapa de filtragem visando excluir os falso-positivos e manter apenas as variantes possivelmente associadas ao fenótipo de interesse (EVRONY *et al.*, 2012).

Para as variantes obtidas a partir do WES, foram mantidas as exônicas e *splicing*, descartadas as *synonymous* e mantidas apenas aquelas com frequência populacional menor que 5%. Por fim, passaram todas aquelas variantes já previamente descritas como patogênicas pelo ClinVar e aquelas com valor no REVEL (ferramenta para predição de patogenicidade) igual ou superior a 0,5.

Os dados obtidos a partir da análise Amplicon e Ampliseq foram filtrados da seguinte forma: Foram mantidas as variantes exônicas e *splicing*, descartadas as *synonymous* e, dessas, mantidas apenas aquelas com frequência alélica menor que 5%.

3.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada a partir dos resultados obtidos pelo sequenciamento genômico total e após análise de bioinformática, conforme especificado acima, sendo esses resultados apresentados de forma descritiva e comparados a dados disponíveis na literatura.

3.10 Cooperação internacional

O estudo foi desenvolvido no HCFMRP-USP, sendo coordenado por este centro e seus pesquisadores responsáveis, com a colaboração entre a Universidade de São Paulo, Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e o CIREP, por meio dos pesquisadores Prof. Dr. Hélio Rubens Machado e Thiago Lyrio Teixeira, em parceria com o Centro de Medicina Genômica e os pesquisadores Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior, pós-graduanda Camila Araújo Bernardino Garcia e o bioinformata Reginaldo Cruz Alves Rosa, a Universidade da Califórnia de San Diego, Departamento de Neurociências, por meio do pesquisador Prof. Dr. Joseph Gleeson, e a Universidade da Califórnia de Los Angeles, Departamento de Neurocirurgia, por meio do pesquisador Gary Mathern.

4 . Resultados

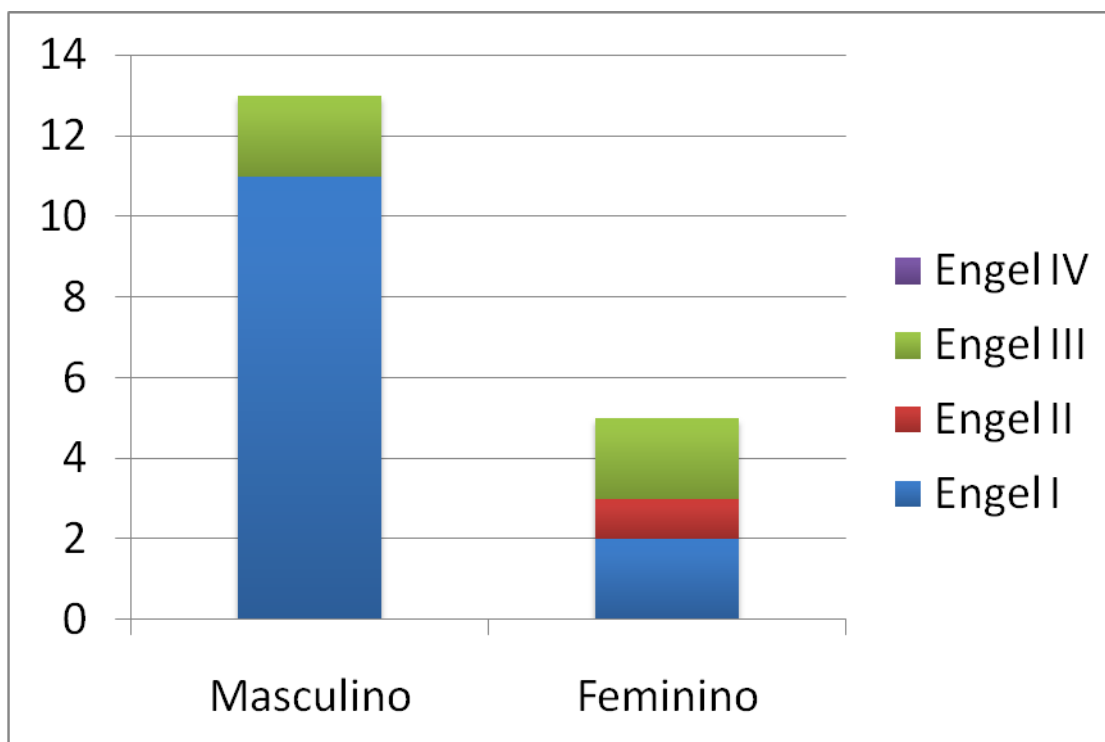
4.1 Caracterização clínica dos pacientes selecionados

Ao final do estudo foram obtidos 18 pacientes com diagnóstico de DCF tipo II submetidos a tratamento cirúrgico para controle da epilepsia.

4.1.1 Sexo

Dos 18 pacientes, 13 (72%) eram do sexo masculino e cinco (28%) do sexo feminino. Dos 13 masculinos, 11 obtiveram Engel 1 e dois Engel 3 após a cirurgia. Das cinco mulheres, duas obtiveram Engel 1, uma Engel 2 e duas Engel 3 após a cirurgia (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Sexo X Engel - Gráfico de barras ilustrando a quantidade de pacientes do sexo masculino e feminino da amostra, bem como o Engel atingido em cada um desses subgrupos após o tratamento cirúrgico



4.1.2 Diagnóstico histopatológico

Quanto ao diagnóstico histopatológico, sete pacientes (39%) foram diagnosticados com DCF tipo IIa, sendo que quatro obtiveram Engel 1 e três Engel 3. Onze pacientes (61%) foram diagnosticados com DCF tipo IIb; desses, nove obtiveram Engel 1, um Engel 2 e um Engel 3.

4.1.3 Lateralidade

Em 12 pacientes (67%), a lesão era à esquerda e em seis (33%) à direita. Dos seis com DCF à direita, cinco atingiram Engel 1 e um atingiu Engel 3 após o tratamento cirúrgico. Dos 12 com DCF à esquerda, oito atingiram Engel 1, um obteve Engel 2 e três alcançaram Engel 3 após a cirurgia (Gráficos 2 e 3).

Gráfico 2 - Subtipo DCF Tipo II X Engel - Gráfico de barras ilustrando a quantidade de pacientes da amostra com diagnóstico de displasia cortical tipo IIa e IIb e o Engel atingido em cada um desses subgrupos após o tratamento cirúrgico

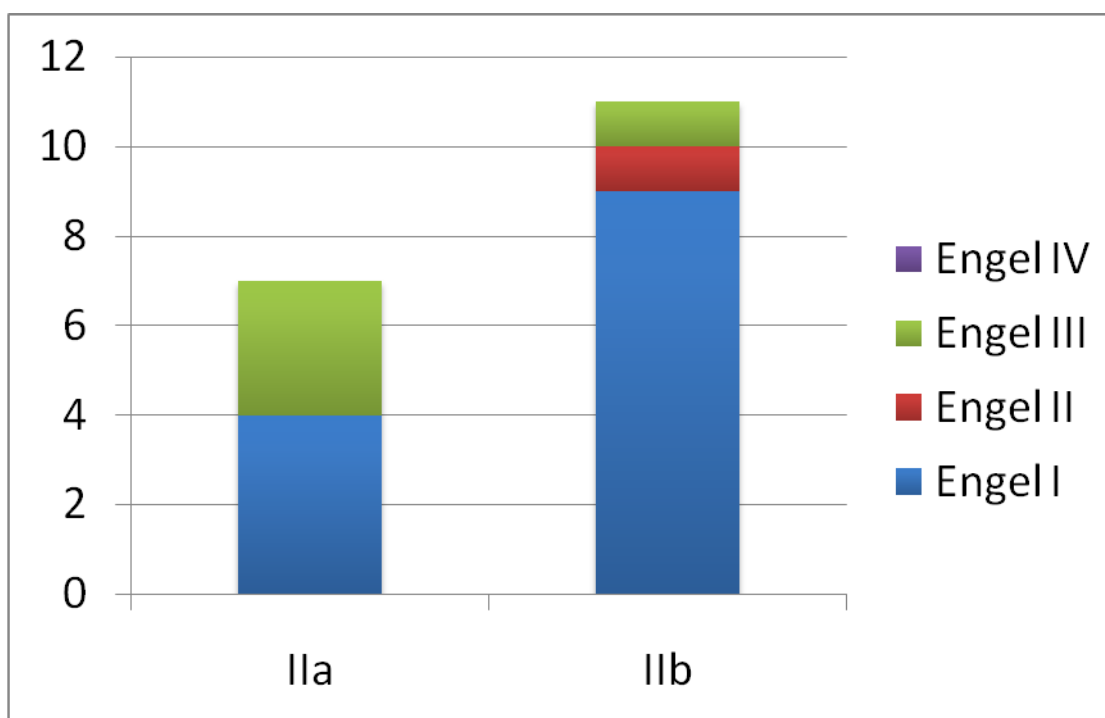
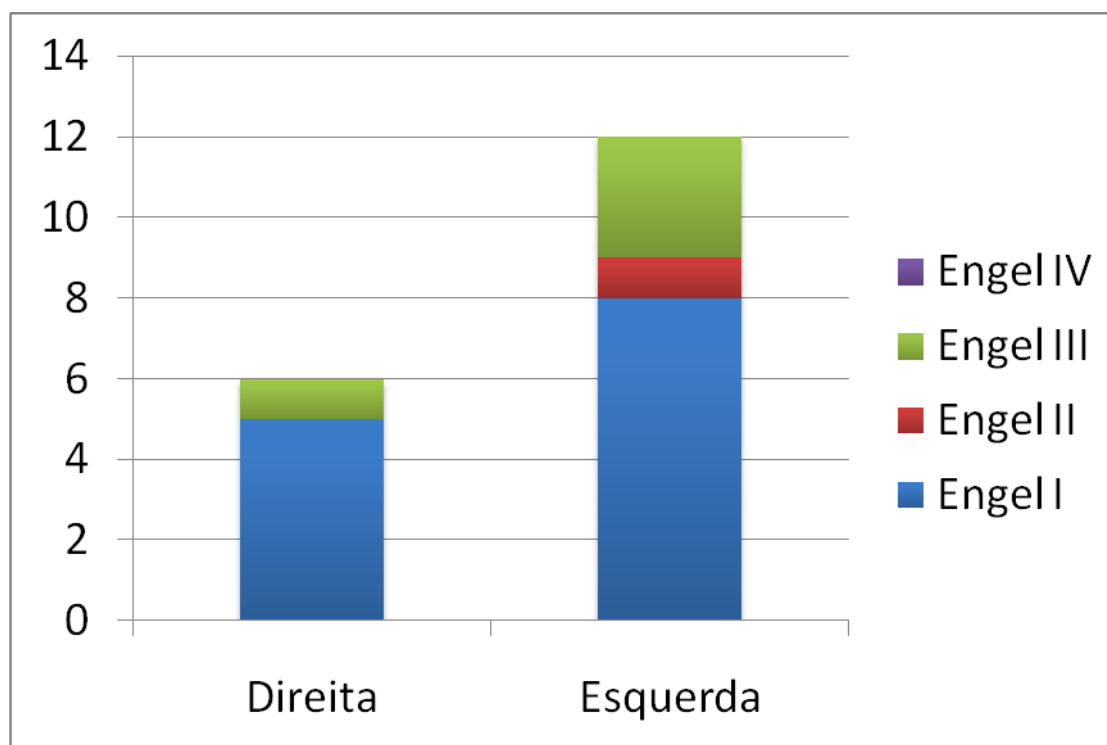


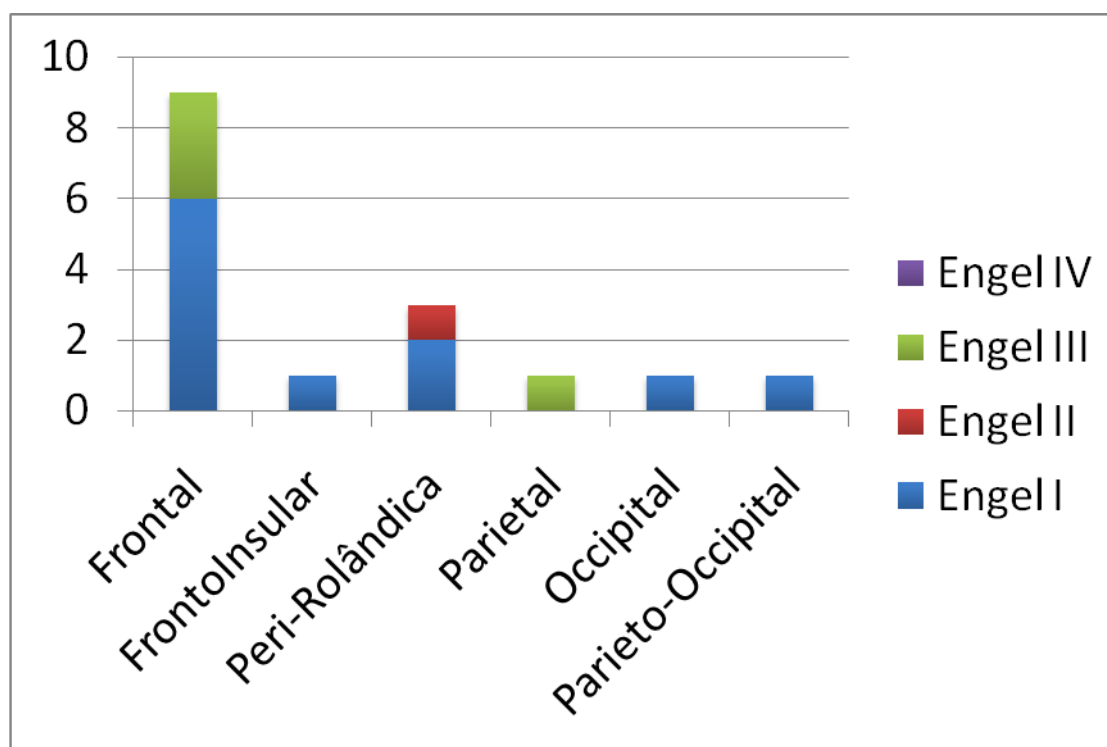
Gráfico 3 - Lateralidade X Engel - Gráfico de barras ilustrando o lado do hemisfério cerebral acometido na amostra e o Engel atingido pelos pacientes da amostra, de acordo com essa variável



4.1.4 Ressonância magnética pré-operatória

A ressonância magnética pré-operatória do crânio mostrou alterações em 16 pacientes (89%): nove (50%) no lobo frontal, um (5,5%) na região frontoinsular, três (17%) na região perirrolândica, um (5,5%) no lobo parietal, um (5,5%) no lobo occipital e um (5,5%) na região parieto-occipital. Dos nove pacientes com alteração da ressonância pré-operatória na região frontal, seis alcançaram Engel 1 e três Engel 3 após a cirurgia. O paciente com alteração na região frontoinsular atingiu Engel 1. Dos três pacientes com alterações perirrolândicas, dois obtiveram Engel 1 e um alcançou Engel 2 após a cirurgia. O paciente com alteração no lobo parietal atingiu Engel 3 e aqueles com alteração no lobo occipital e na região parieto-occipital Engel 1 após a cirurgia (Gráfico 4).

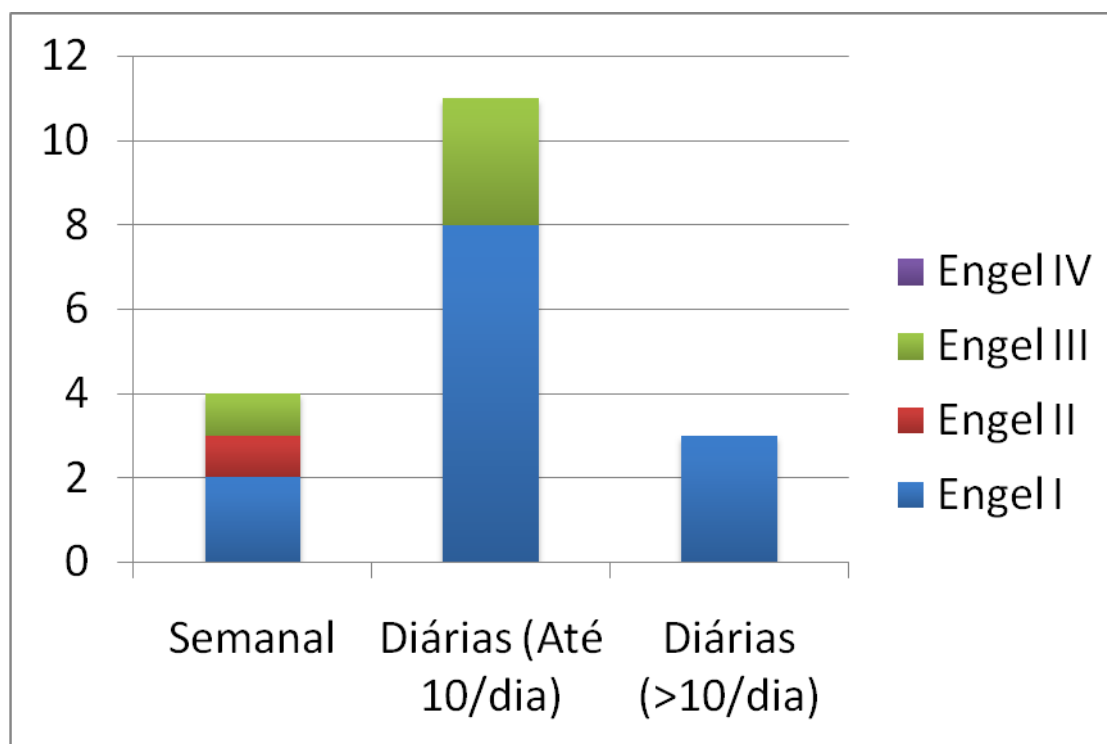
Gráfico 4 - Localização Anatômica X Engel - Gráfico de barras ilustrando a distribuição de acometimento da displasia cortical focal tipo II de acordo com o lobo cerebral e o Engel atingido em cada um desses subgrupos após o tratamento cirúrgico



4.1.5 Frequência pré-operatória das crises epiléticas

Com relação à frequência de crises epiléticas antes da cirurgia, quatro (22%) pacientes apresentavam crises semanalmente, 11 (61%) até 10 crises diárias e três (17%) mais que 10 crises diariamente. Os três pacientes que apresentavam crises diárias com frequência maior que 10 atingiram Engel 1 após a cirurgia. Dos 11 com crises diárias de até 10 crises por dia, oito atingiram Engel 1 e três Engel 3. Por fim, dos quatro pacientes que apresentavam crises semanais, dois atingiram Engel 1, um obteve Engel 2 e um Engel 3 (Gráfico 5).

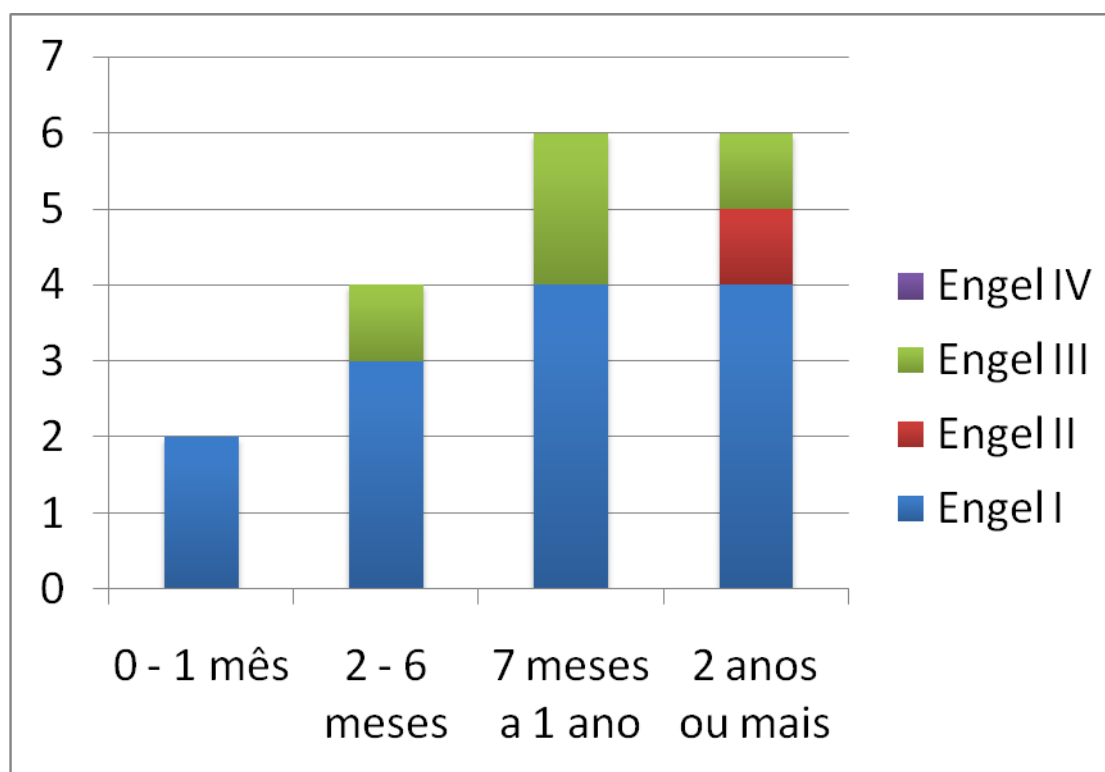
Gráfico 5 - Frequência pré-operatória das crises epiléticas X Engel - Gráfico de barras ilustrando a frequência de crise epilética pré-operatória nos pacientes da amostra e o Engel atingido em cada um desses subgrupos após o tratamento cirúrgico



4.1.6 Idade de início da epilepsia

A idade de início da epilepsia dos pacientes da amostra foi categorizada nos seguintes grupos: 0-1 mês; 2-6 meses; sete meses a um ano e dois anos ou mais. Dessa forma, dois (11%) pacientes tinham idade de início da epilepsia de zero a um mês, e ambos atingiram Engel 1 após a cirurgia. Quatro (22%) pacientes iniciaram a epilepsia de dois a seis meses de idade, sendo que três atingiram Engel 1 após a cirurgia e um alcançou Engel 3. Seis (33%) pacientes iniciaram a epilepsia entre sete meses e um ano de idade, sendo que quatro atingiram Engel 1 após a cirurgia e dois Engel 3. Por fim, seis (33%) pacientes tinham idade de início da epilepsia de dois anos ou mais, dos quais quatro obtiveram Engel 1 após a cirurgia, um atingiu Engel 2 e um Engel 3 (Gráfico 6).

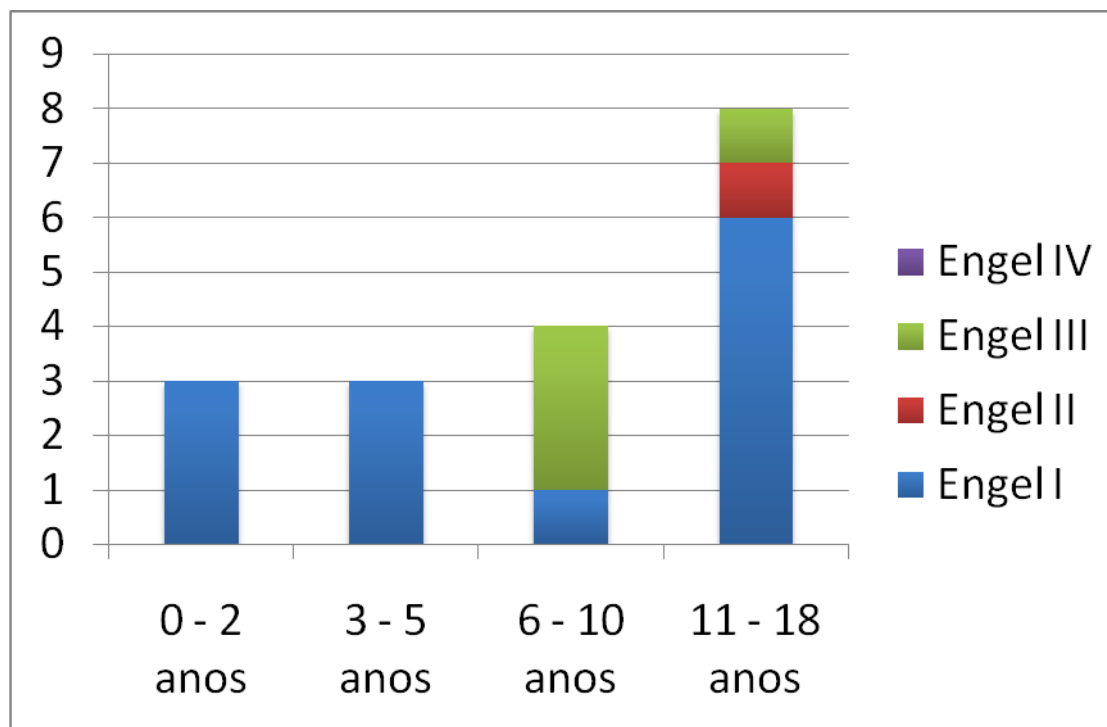
Gráfico 6 - Idade de início da epilepsia X Engel - Gráfico de barras ilustrando a quantidade de pacientes da amostra de acordo com a idade de início da epilepsia e o Engel atingido em cada um desses subgrupos após o tratamento cirúrgico



4.1.7 Idade na época da cirurgia

A idade do paciente quando da realização da cirurgia foi categorizada da seguinte forma: 0-2 anos; 3-5 anos; 6-10 anos; 11-18 anos. Assim sendo, três (16,5%) pacientes foram submetidos à cirurgia quando tinham entre zero e dois anos de idade e outros três (16,5%) quando tinham entre três e cinco anos de idade, e os seis obtiveram Engel 1. Quatro (22%) pacientes tinham entre seis e 10 anos quando foram submetidos ao tratamento cirúrgico, dos quais um atingiu Engel 1 e três alcançaram Engel 3. Por fim, oito (44,4%) pacientes foram tratados cirurgicamente quando tinham entre 11 e 18 anos de idade, sendo que seis atingiram Engel 1, um obteve Engel 2 e um Engel 3 (Gráfico 7).

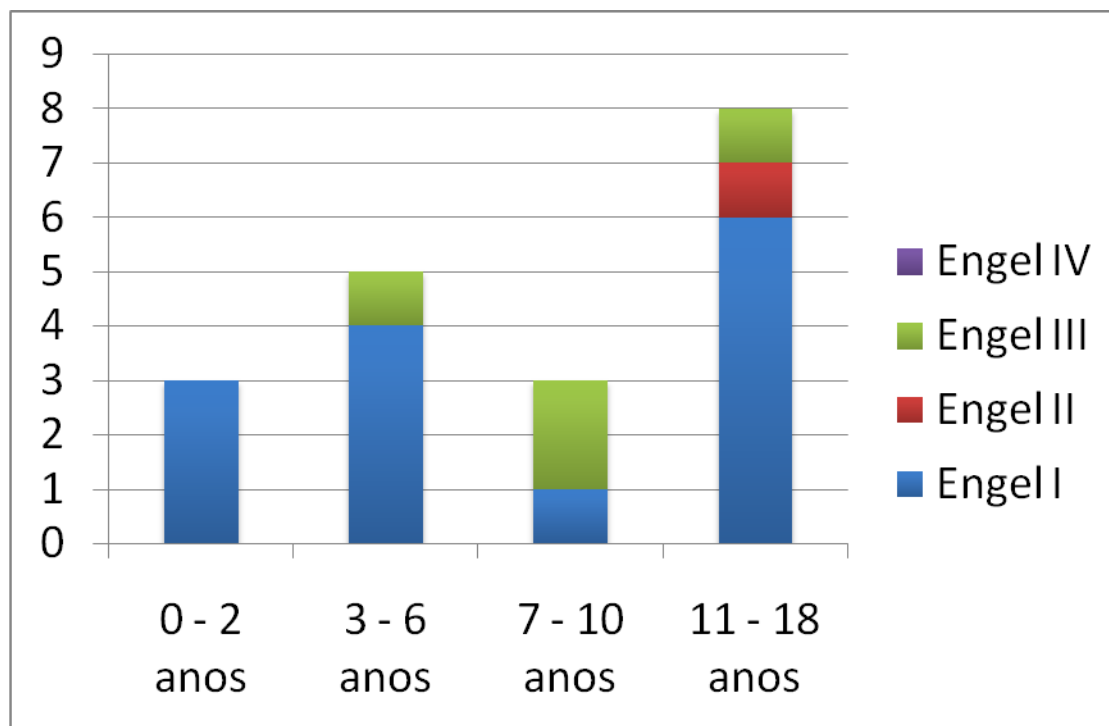
Gráfico 7 - Idade na época da cirurgia X Engel - Gráfico de barras ilustrando a idade dos pacientes da amostra na época da cirurgia e o Engel atingido em cada um desses subgrupos após o tratamento cirúrgico



4.1.8 Tempo de doença

Levando-se em consideração o tempo de doença até o tratamento cirúrgico, ou seja, a diferença entre a idade do paciente quando submetido ao tratamento cirúrgico e a idade de início da epilepsia, observou-se que: três pacientes se submeteram à cirurgia entre zero e dois anos (16,5%) e todos atingiram Engel 1 após a cirurgia; cinco foram operados entre três e seis anos (28%), dos quais quatro atingiram Engel 1 e um alcançou Engel 3 após a cirurgia; três foram submetidos à cirurgia entre sete e 10 anos (16,5%), com um atingindo Engel 1 e dois Engel 3; oito foram operados entre 11 e 18 anos (44,4%), sendo que seis obtiveram Engel 1, um atingiu Engel 2 e um Engel 3 após a cirurgia (Gráfico 8).

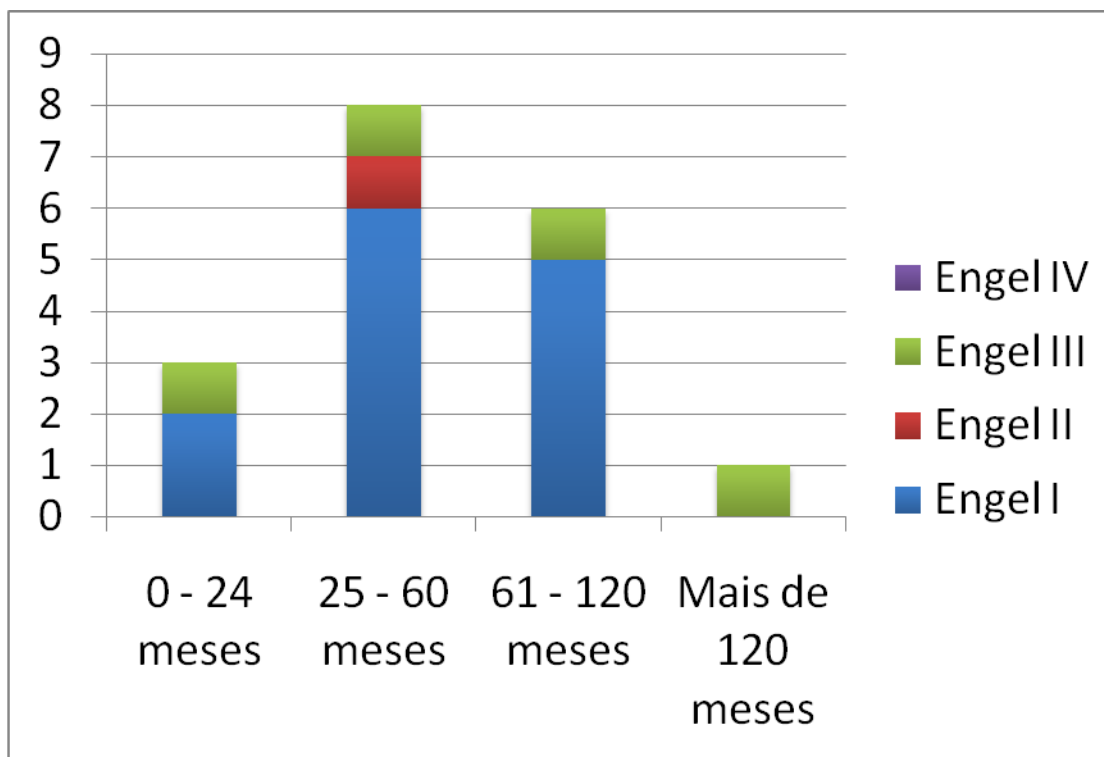
Gráfico 8 - Tempo de doença até a cirurgia X Engel - Gráfico de barras ilustrando o tempo de doença desde o início dos sintomas até a cirurgia nos pacientes da amostra e o Engel atingido em cada um desses subgrupos após o tratamento cirúrgico



4.1.9 Seguimento ambulatorial pós-operatório

Os 18 pacientes foram seguidos ambulatorialmente após a cirurgia por um período médio de 55,88 meses, com mediana de 51,5 meses. Dentre os seguidos entre 0-24 meses, dois atingiram Engel 1 e um obteve Engel 3. Dos seguidos entre 25-60 meses, seis obtiveram Engel 1, um alcançou Engel 2 e um Engel 3. Entre 61-120 meses, cinco alcançaram Engel 1 e um obteve Engel 3. Com 120 meses ou mais de seguimento, houve um Engel 3 (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Tempo de seguimento ambulatorial pós-operatório X Engel - Gráfico de barras ilustrando o tempo de seguimento ambulatorial pós-operatório dos pacientes da amostra e o Engel dos mesmos até o presente momento



A Tabela 2 detalha o perfil clínico dos pacientes da pesquisa.

Tabela 2 - Características clínicas dos pacientes incluídos no estudo - Dados obtidos dos prontuários médicos revisados

Identificação da Amostra	Sexo	Diagnóstico Histopatológico	Lado	Alteração RM Crânio	Frequência das Crises Epilépticas	Idade de Início da Epilepsia	ADNPM	Idade na Cirurgia	Tempo de Doença	Engel	Seguimento Pós-Op (Meses)
FCD 4793	M	DCF IIA	E	Parieto-Occipital	3-4 crises/dia	3 meses	Sim	3 anos	3 anos	1A	65
FCD 4798	M	DCF IIB	E	Giro Frontal Superior	Diárias	3 meses	Sim	1 ano e 10 meses	1 ano e 7 meses	1A	65
FCD 4807	M	DCF IIB	D	Fronto-Insular	20-30 crises/dia	4 meses	Sim	3 anos	3 anos	1A	26
FCD 4818	M	DCF IIB	E	Sem alterações	Semanal	1 ano	Sim	14 anos	13 anos	1A	55
FCD 4819	M	DCF IIA	E	Perirrolândica	Diárias	1 mês	Sim	3 anos	3 anos	1A	45
FCD 4820	F	DCF IIA	E	Giro Frontal Superior	Diárias	2 meses	Sim	6 anos	6 anos	3A	54
FCD 4823	M	DCF IIB	E	Fronto-Basal	Diárias	7 meses	Não	6 anos	6 anos	1A	49
FCD 5576	M	DCF IIA	D	Giro Frontal Médio	Diárias (Até 10 crises/dia)	2 anos	Não	11 anos	9 anos	1A	7
FCD 5580	F	DCF IIB	D	Occipital	Semanal	6 anos	Não	12 anos	6 anos	1A	98
FCD 5581	F	DCF IIA	E	Giros Frontal Médio e Superior	Diárias	6 anos	Não	9 anos	3 anos	3A	144
FCD 5582	M	DCF IIB	D	Giro Frontal Médio	Diárias	8 meses	Sim	1 ano e 3 meses	7 meses	1B	36
FCD 5583	M	DCF IIA	D	Giros Frontal Médio e Superior	Semanal	1 ano	Sim	7 anos	6 anos	3A	94
FCD 5584	F	DCF IIA	E	Redução Volumétrica Global	Diárias (Incontáveis)	1 mês	Sim	2 anos	2 anos	1A	100
FCD 6585	M	DCF IIB	E	Giro Pré-Central	20 crises/dia	9 meses	Sim	17 anos	16 anos	1A	24
FCD 6590	M	DCF IIB	D	Giro Frontal Médio	3-5 crises/dia	10 anos	Não	15 anos	5 anos	1A	74
FCD 6591	M	DCF IIB	E	Giros Frontal Médio e Superior	4-5 crises/dia	5 anos	Não	14 anos	9 anos	1A	31
FCD 6596	F	DCF IIB	E	Giro Pré-Central	3-4 crises/semana	2 anos	Sim	13 anos	11 anos	2B	30
FCD 6601	M	DCF IIB	E	Parietal	5 crises/dia	1 ano	Não	11 anos	10 anos	3A	9

4.2 Microdissecção

As amostras colhidas durante a cirurgia para tratamento da epilepsia foram submetidas à técnica de microdissecção para confirmação do diagnóstico histopatológico e avaliação da qualidade.

A depender da técnica cirúrgica utilizada em cada caso, uma região adjacente à zona lesional, em si, pode ter sido enviada para microdissecção. Esse é o caso, por exemplo, dos pacientes submetidos a cirurgias desconectivas. Isso explica o ocorrido em alguns pacientes, em que a microdissecção trouxe resultado diferente daquele obtido no estudo anatomopatológico. Ainda assim, em se tratando de patologia de origem genética e sabendo que no contexto da epilepsia a área adjacente à zona lesional também costuma exercer importante papel na gênese das crises, as amostras foram igualmente analisadas e submetidas ao estudo genético proposto (Tabela 3).

Tabela 3 - Diagnósticos histopatológicos e resultados das microdissecções

Amostra	Diagnóstico Histopatológico	Microdissecção
FCD 4793	DCF IIA	DCF IIA
FCD 4798	DCF IIB	DCF IIB
FCD 4807	DCF IIB	DCF IIB
FCD 4818	DCF IIB	Ausência de DCF na amostra
FCD 4819	DCF IIA	DCF IIA
FCD 4820	DCF IIA	DCF IIA
FCD 4823	DCF IIB	Ausência de DCF na amostra
FCD 5576	DCF IIA	DCF IIA
FCD 5580	DCF IIB	DCF IIB
FCD 5581	DCF IIA	DCF IIA
FCD 5582	DCF IIB	DCF IIB
FCD 5583	DCF IIA	DCF IIA
FCD 5584	DCF IIA	DCF IIA
FCD 6585	DCF IIB	DCF IIA
FCD 6590	DCF IIB	DCF IIA
FCD 6591	DCF IIB	DCF IIA
FCD 6596	DCF IIB	DCF IIB
FCD 6601	DCF IIB	DCF IIB

4.3 Caracterização genética

4.3.1 Metodologias utilizadas na análise genética

Quanto ao estudo genético, as amostras foram submetidas a três diferentes metodologias para análise dos dados obtidos (Amplicom, Ampliseq e WES). Aquelas em que o WES foi adotado foram, ainda, submetidas a dois diferentes algoritmos (Strelka e Mutect2) para identificação de quaisquer variantes *de novo* nas amostras cerebrais (linhagem somática). Ambas as ferramentas são úteis para detecção de mutações somáticas com baixa frequência alélica e em amostras geneticamente heterogêneas, apesar de serem algoritmos que se baseiam em diferentes modelos de probabilidade. O Strelka foi utilizado para detecção de mutações pontuais de troca, inserções e deleções, e o Mutect2 foi aplicado apenas para mutações pontuais de troca. As Tabelas 4 e 5 mostram qual(is) foi(foram) a(s) metodologia(s) de análise utilizada(s) em cada amostra do estudo.

Tabela 4 - Metodologia(s) para análise genética utilizada(s) em cada uma das amostras incluídas no estudo

	WES	Amplicon	AmpliSeq
FCD 4793			
FCD 4798			
FCD 4807			
FCD 4818			
FCD 4819			
FCD 4820			
FCD 4823			
FCD 5576			
FCD 5580			
FCD 5581			
FCD 5582			
FCD 5583			
FCD 5584			
FCD 6585			
FCD 6590			
FCD 6591			
FCD 6596			
FCD 6601			

Tabela 5 - Algoritmos para pesquisa de variantes utilizadas em cada uma das amostras submetidas à WES

	Strelka - snv	Strelka - InDel	Mutect2
FCD 4793	SIM	SIM	SIM
FCD 4798	SIM	SIM	SIM
FCD 4807	SIM	SIM	SIM
FCD 4818	NÃO	NÃO	SIM
FCD 4819	SIM	SIM	SIM
FCD 4820	SIM	SIM	SIM
FCD 4823	SIM	SIM	SIM
FCD 5576	Somente Amplicon e AmpliSeq	Somente Amplicon e AmpliSeq	Somente Amplicon e AmpliSeq
FCD 5580	Somente Amplicon	Somente Amplicon	Somente Amplicon
FCD 5581	Somente Amplicon e AmpliSeq	Somente Amplicon e AmpliSeq	Somente Amplicon e AmpliSeq
FCD 5582	Somente Amplicon e AmpliSeq	Somente Amplicon e AmpliSeq	Somente Amplicon e AmpliSeq
FCD 5583	Somente Amplicon e AmpliSeq	Somente Amplicon e AmpliSeq	Somente Amplicon e AmpliSeq
FCD 5584	Somente AmpliSeq	Somente AmpliSeq	Somente AmpliSeq
FCD 6585	NÃO	SIM	SIM
FCD 6590	Somente Amplicon e AmpliSeq	Somente Amplicon e AmpliSeq	Somente Amplicon e AmpliSeq
FCD 6591	SIM	SIM	NÃO
FCD 6596	SIM	SIM	SIM
FCD 6601	NÃO	SIM	NÃO

Por fim, entendendo que há mutações que ocorrem em regiões do DNA não fundamentais para a estrutura e função da proteína (Ex: intergenic, intron, downstream, upstream), bem como há mutações que ocorrem em regiões importantes da estrutura do DNA; mas que, ainda assim, não comprometem a estrutura ou função da proteína sintetizada (Ex: synonymous) e, dessa forma, apresentam baixo potencial patogênico, uma série de filtros foram aplicados nas variantes encontradas, independente da metodologia utilizada para a obtenção dessas variantes. A depender do local do DNA onde ocorre e do efeito da mutação em si, maior será seu potencial em alterar a função da proteína sintetizada e, conseqüentemente, maior será seu potencial patogênico.

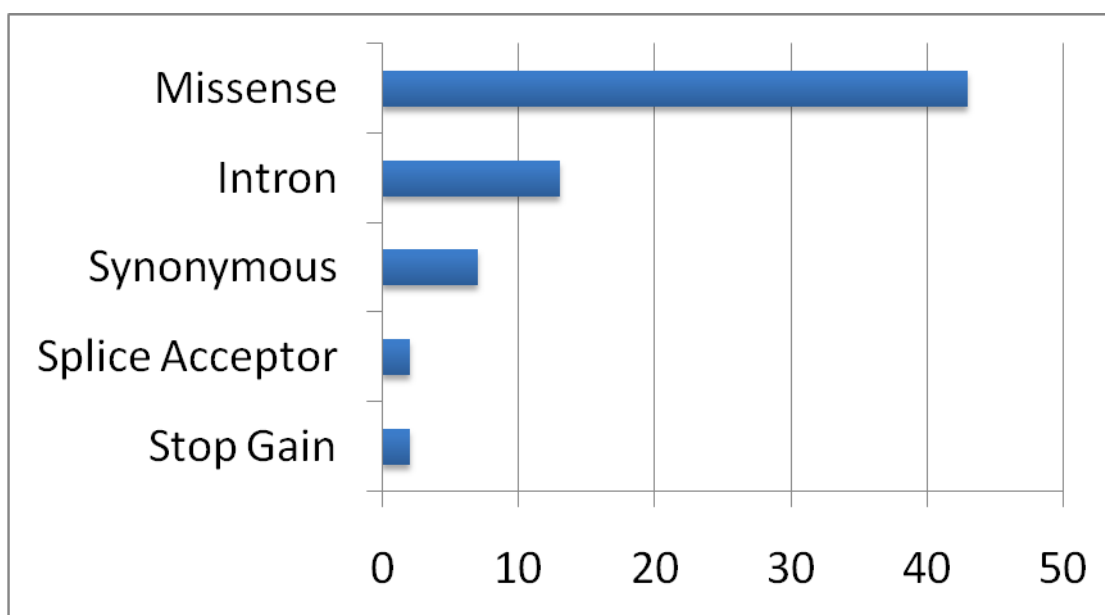
4.3.2 Amplicon

O Amplicon é um método de sequenciamento direcionado e que permite analisar variações genéticas em regiões genômicas específicas. Este método utiliza PCR para criar sequências de DNA chamadas Amplicons a partir de regiões-alvo que são previamente enriquecidas por meio de amplificação por PCR. Obtêm-se, nesse caso, variantes previamente validadas por PCR digital.

4.3.2.1 Análise das variantes encontradas pelo Amplicon

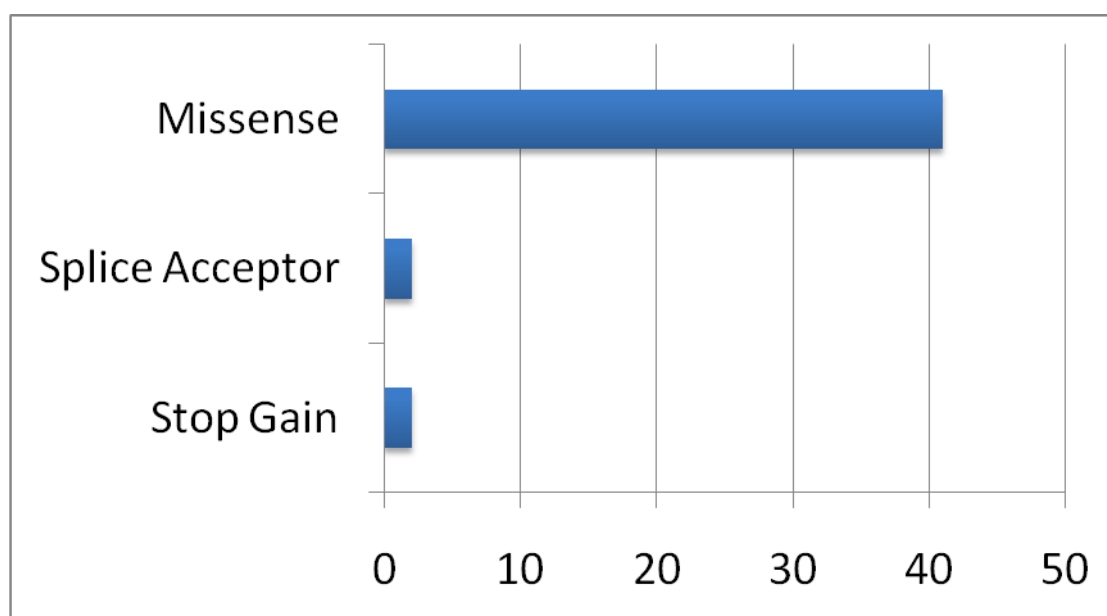
O Amplicon foi aplicado em quatorze (FCD 4793, 4798, 4807, 4819, 5576, 5580, 5581, 5582, 5583, 6585, 6590, 6591, 6596 e 6601) das dezoito amostras e identificou 67 variantes, sendo 13 em regiões intrônicas, 43 do tipo missense, sete *synonymous*, duas do tipo *stop gain* e duas *splice acceptor* (Gráfico 10).

Gráfico 10 - Total de mutações identificadas pela metodologia Amplicon em diferentes regiões e efeitos



Os dados obtidos a partir da análise Amplicon foram ainda filtrados. Foram mantidas apenas as variantes exônicas e *splicing*, descartadas as *synonymous* e, dessas, mantidas apenas aquelas com frequência alélica menor que 5%. Após aplicação dos filtros, restaram 45 variantes com potencial patogênico, das quais 41 eram do tipo *missense*, duas *stop gain* e duas *Splice acceptor* (Gráfico 11).

Gráfico 11 - Total de mutações identificadas pela metodologia Amplicon em diferentes regiões após a aplicação dos filtros para regiões de interesse pelo potencial de patogenicidade



4.3.2.2 Análise das variantes de interesse identificadas pelo Amplicon

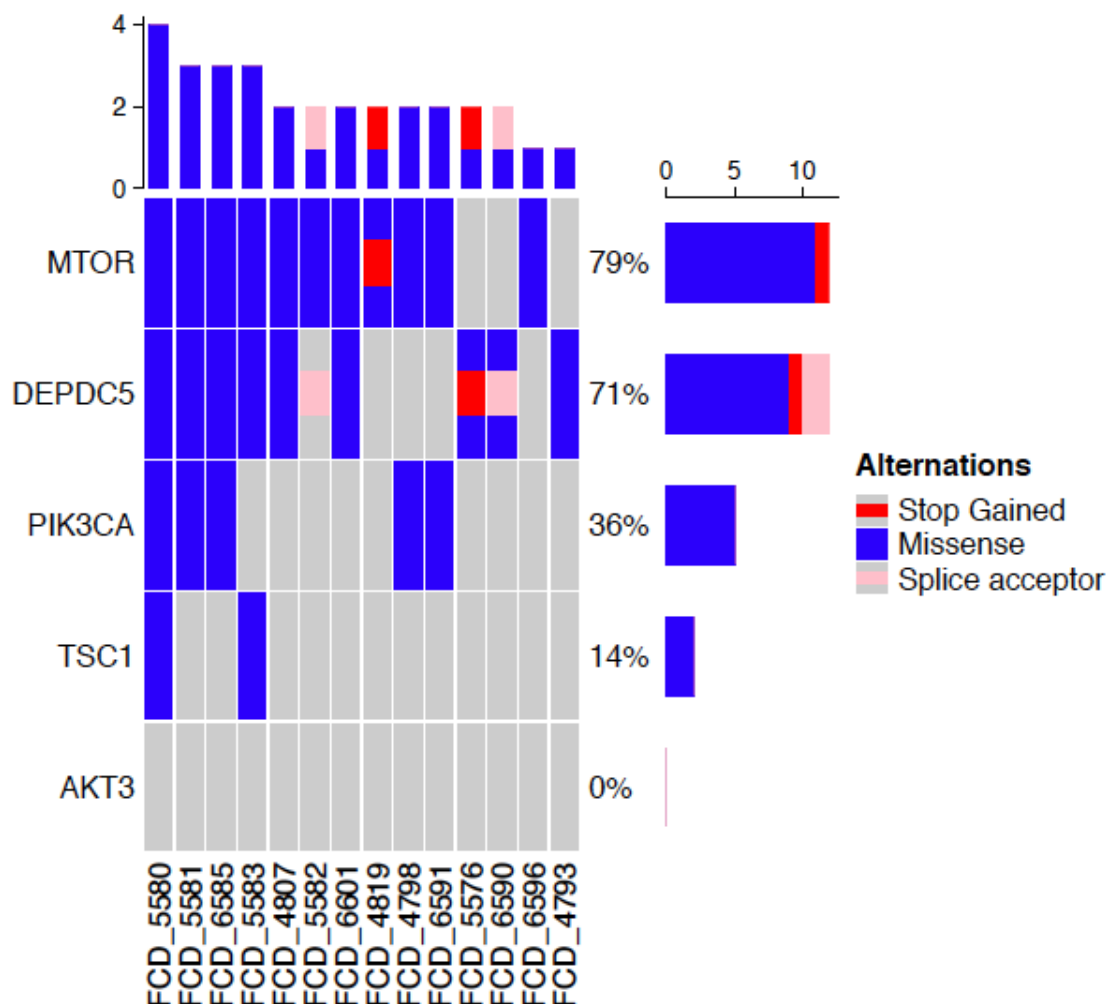
Os genes pesquisados pela metodologia Amplicon foram genes específicos da via mTOR, previamente descritos na literatura, relacionados à patogênese da DCF (MTOR, DEPDC5, AKT3, PIK3CA e TSC1). Em onze pacientes (79%) (FCD 4798, 4807, 4819, 5580, 5581, 5582, 5583, 6585, 6591, 6596 e 6601) foram detectadas uma ou mais mutações no gene MTOR, sendo *missense* o tipo predominante, e apenas um *stop gain* foi identificado neste grupo. Dez pacientes (71%) (FCD 4793, 4807, 5576, 5580, 5581, 5582, 5583, 6585, 6590 e 6601) tiveram

uma ou mais mutações identificadas no gene DEPDC5, sendo essas predominantemente missense, mas encontrando ainda duas *splice acceptor* e uma *stop gain*. Em cinco pacientes (36%) (FCD 4798, 5580, 5581, 6585 e 6591) foram observadas mutações no gene PIK3CA, todas missense. O gene TSC1 estava mutado em dois pacientes (14%) (FCD 5580 e 5583), sendo ambas as mutações do tipo missense. Não foi detectada nenhuma mutação do gene AKT3 nesses quatorze pacientes utilizando a técnica Amplicon.

Detalhes das mutações encontradas estão expostos no Apêndice B.

Após análise das variantes encontradas foi construído um gráfico em ambiente R utilizando o pacote ComplexHeatmap, denominado EpiPrint. Neste gráfico as colunas representam os pacientes e os genes mutados em cada um deles encontram-se dispostos nas linhas. A cor de da célula (cruzamento da linha com a coluna) representa o tipo de mutação ocorrida. Ao lado direito de cada linha está expressa a porcentagem da amostra em que aquele gene esteve mutado. No topo do gráfico está exposta a quantidade daqueles genes que a amostra em questão apresentou mutada. Esse gráfico tem por objetivo clarear a análise quanto aos genes mutados em cada amostra e o tipo das mutações encontradas. O EpiPrint dos resultados do Amplicon está exposto no Gráfico 12.

Gráfico 12 - Gráfico EpiPrint demonstrando a prevalência de mutações, após a aplicação dos filtros de patogenicidade, bem como o efeito das mutações encontradas nas amostras com diagnóstico de displasia cortical focal tipo II e submetidas à pesquisa genética pela metodologia Amplicon



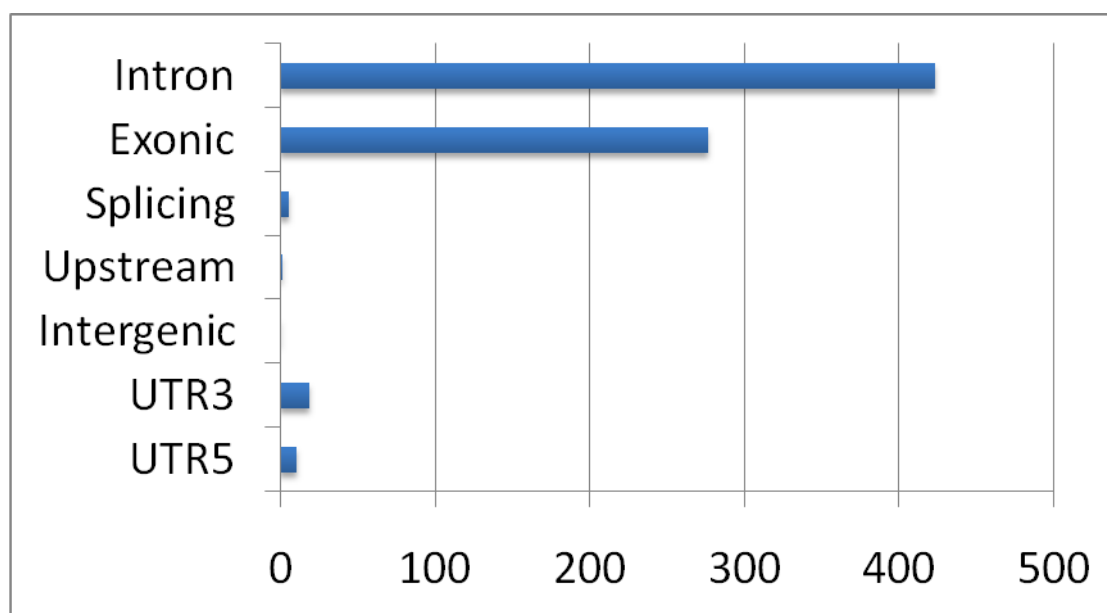
4.3.3 Amplicon

O Amplicon é uma ferramenta de sequenciamento de amostras de DNA de tecido fresco congelado com fluxo de trabalho baseado em PCR para uso em alvos específicos a partir de painéis pré-projetados de genes, que podem variar de alguns a centenas em uma única execução. No painel utilizado, as variantes foram previamente validadas por PCR digital.

4.3.3.1 Análise das variantes encontradas pelo Ampliseq

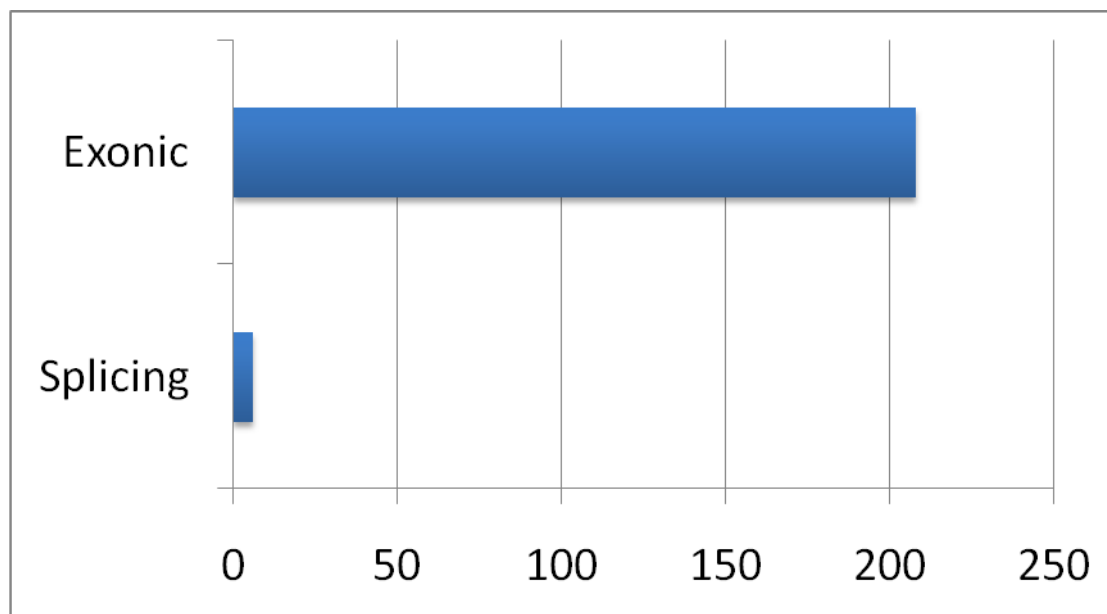
Foram encontradas 740 variantes utilizando a ferramenta Ampliseq. Dessas, 424 se localizavam em regiões intrônicas, 277 em regiões exônicas, uma em região intergênica, seis em regiões de *splicing*, dois *upstream*, 19 em sítios de *splicing* UTR3 e 11 em sítios de *splicing* UTR5 (Gráfico 13).

Gráfico 13 - Total de mutações identificadas pela metodologia Ampliseq em diferentes regiões e efeitos



Tal como no Amplicon, os dados obtidos a partir da análise Ampliseq foram ainda filtrados, sendo mantidas apenas as variantes exônicas e *splicing*, descartadas as *synonymous* e, dessas, mantidas apenas aquelas com frequência alélica menor que 5%. Após a aplicação dos filtros, foram obtidas 214 variantes com potencial patogênico, das quais seis eram em sítios de *splicing* e as demais em regiões exônicas (Gráfico 14).

Gráfico 14 - Total de mutações identificadas pela metodologia Ampliseq em diferentes regiões após a aplicação dos filtros para regiões de interesse pelo potencial de patogenicidade



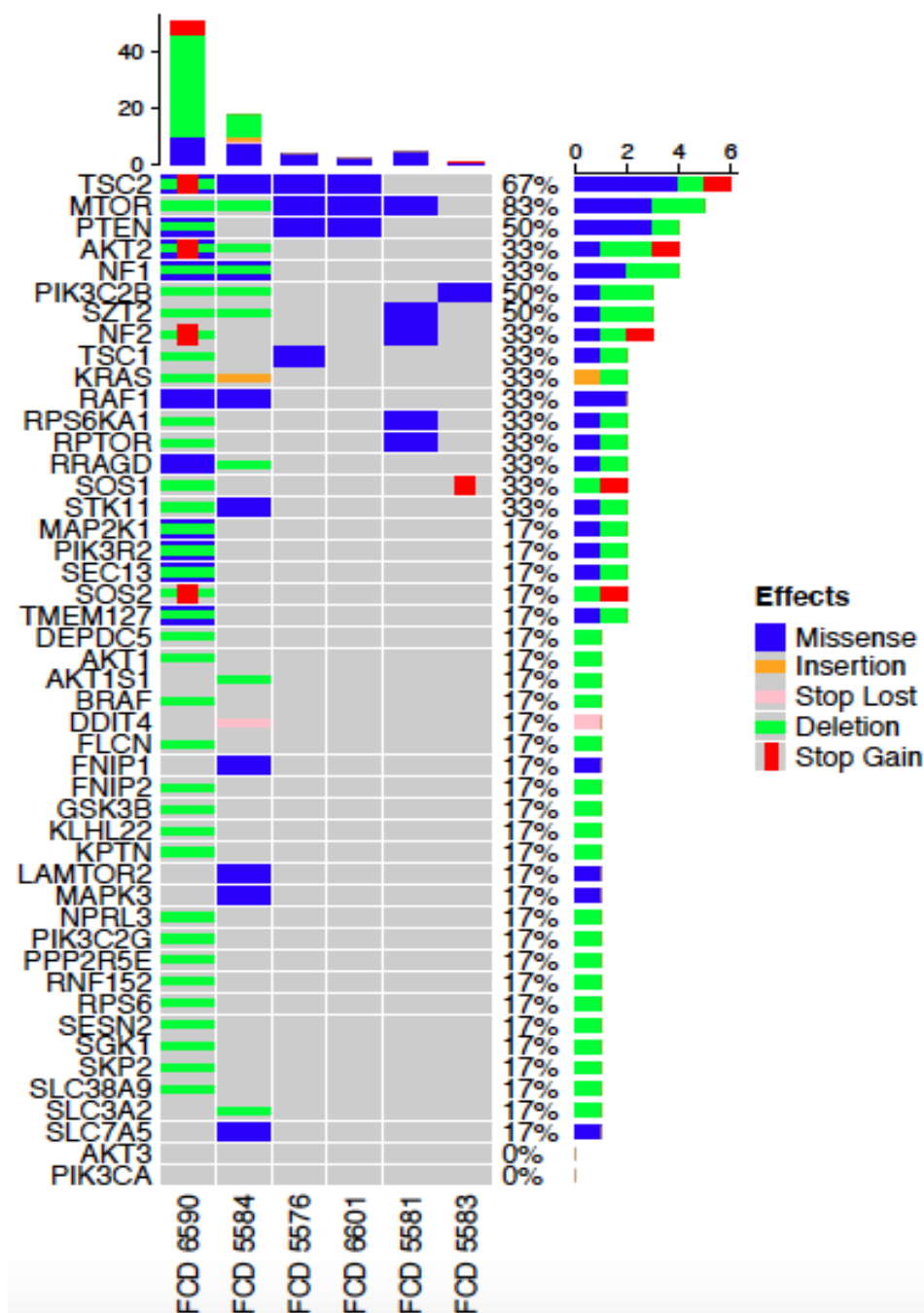
4.3.3.2 Análise das variantes de interesse identificadas pelo Ampliseq

Das sete amostras submetidas à análise do painel Ampliseq, o paciente FCD 5582 não apresentou nenhuma mutação nos genes pesquisados. Dos seis demais pacientes submetidos à análise por Ampliseq (FCD 5576, 5581, 5583, 5584, 6590 e 6601), cinco apresentaram mutações no gene MTOR (três missenses e duas deleções), quatro no gene TSC2 (predominantemente missense), três no gene PTEN (predominantemente missense), um no gene DEPDC5 (deleção) e dois no gene TSC1 (uma deleção e uma missense). Os genes AKT3 e PIK3CA não estiveram mutados nesses pacientes.

Outros genes foram ainda pesquisados devido à sua relevância em outras patologias cerebrais. Nesta amostra, destacaram-se com mutações presentes em três pacientes o PTEN (FCD 5576, 6590 e 6601), o PIK3C2B (FCD 5583, 5584 e 6590) e o SZT2 (FCD 5581, 5584 e 6590). Mutações presentes em dois pacientes foram encontradas nos genes AKT2 (FCD 5584 e 6590), NF1 (FCD 5584 e 6590), NF2 (FCD 5581 e 6590), TSC1 (FCD 5576 e 6590), KRAS (FCD 5584 e 6590),

RAF1 (FCD 5584 e 6590), RPTOR (FCD 5581 e 6590), RPS6KA1 (FCD 5581 e 6590), RRAGD (FCD 5584 e 6590), SOS1 (FCD 5583 e 6590) e STK11(FCD 5584 e 6590) (Gráfico 15).

Gráfico 15 - Gráfico EpiPrint demonstrando a prevalência de mutações, após a aplicação dos filtros de patogenicidade, bem como o efeito das mutações encontradas nas amostras com diagnóstico de displasia cortical focal tipo II e submetidas à pesquisa genética pela metodologia Ampliseq



4.3.4 Whole exome sequencing (WES)

Para pesquisa das mutações pela técnica WES, duas metodologias para pesquisa de mutações pontuais (Strelka e Mutect2) e uma metodologia para pesquisa de inserções e deleções (Strelka) foram utilizadas.

4.3.4.1 Análise das variantes encontradas pela WES

Foram encontradas 942 mutações pontuais pela Mutect2, 204 mutações pontuais pela Strelka e 1814 mutações dos tipos inserção ou deleção pela Strelka, totalizando 2960 mutações antes da aplicação dos filtros. Dessas, a maioria estava presente em regiões intrônicas e, algumas outras, em regiões do DNA não fundamentais e/ou não capazes de comprometer a estrutura e função da proteína (Gráficos 16 e 17).

Gráfico 16 - Total de mutações identificadas, antes dos filtros, e efeito das mutações, em cada um dos pacientes submetidos à análise pela metodologia WES

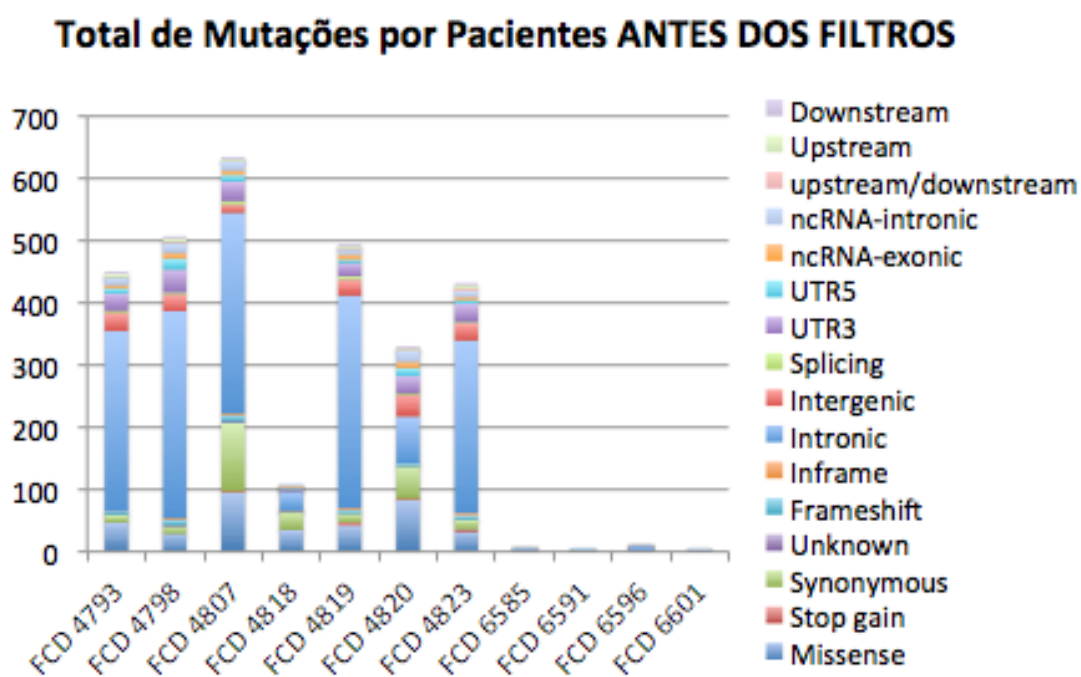
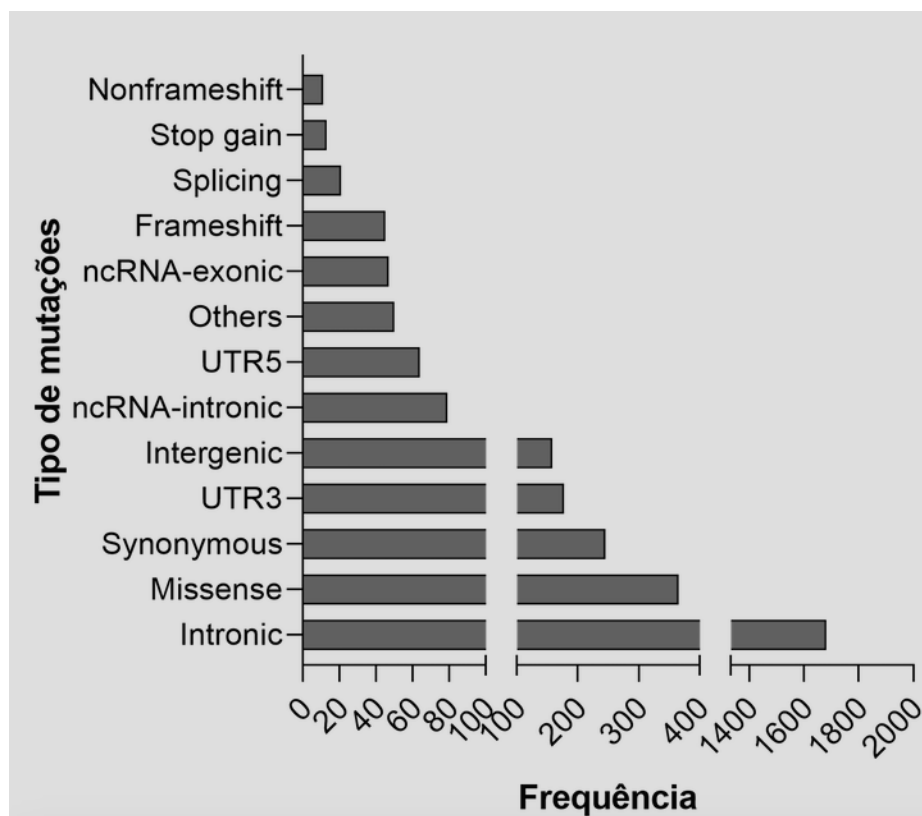


Gráfico 17 - Total de mutações identificadas, antes dos filtros, em diferentes regiões e efeitos nos pacientes submetidos à análise pela metodologia WES



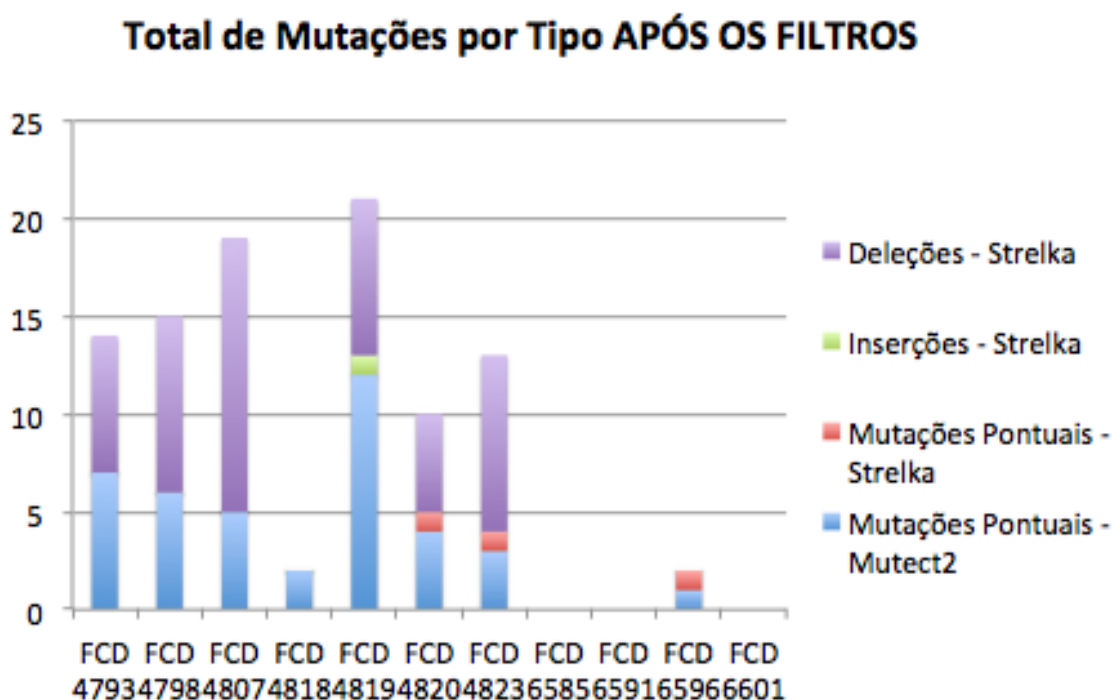
Na técnica WES, após o processamento das sequências alinhadas, são extraídas milhares de variantes das regiões do genoma. Contudo, é fundamental classificar e excluir os falso-positivos por meio de um processo de filtragem que visa manter apenas as variantes possivelmente associadas ao fenótipo de interesse (EVRONY et al., 2012). Portanto, a partir desses resultados, foi aplicado um filtro, mantendo-se apenas as variantes exônicas e *splicing*, descartadas as *synonymous* e mantendo apenas aquelas com frequência populacional menor que 5%. Por fim, passaram todas aquelas variantes, já previamente descritas, como patogênicas pelo ClinVar e aquelas com valor no REVEL (ferramenta para predição de patogenicidade) igual ou superior a 0,5.

Após a aplicação dos filtros para predição de patogenicidade chegou-se a um total de 96 mutações. Dessas, 40 mutações pontuais pela técnica Mutect2 e três pela Strelka, sendo que apenas uma mutação se repetiu em ambas as técnicas

(Mutação exônica do gene MTOR no paciente FCD 6596). Pela técnica Strelka para pesquisa de inserções e deleções, chegou-se a um total de 53 mutações (uma inserção e 52 deleções).

A frequência da variante alélica (VAF - do inglês Variant Allele Frequency) das amostras e a profundidade das *reads* de cada uma dessas 96 variantes detectadas estão descritas na tabela do Apêndice B. A VAF média foi de 0,4419, com mediana de 0,031 (3,1%). Se excluídos os quatro valores de VAF acima de 1,0 (9,747; 9,728; 9,158; 9,346), por entender que esses representam um erro, já que estão acima de 100%, tem-se uma VAF média final de 0,048, ou seja, 4,8%. Excluindo-se três variantes em que a profundidade das *reads* apresentou erro, a média encontrada da profundidade das *reads* das outras 93 variantes foi de 260,52 (Gráfico 18).

Gráfico 18 - Total de mutações identificadas, após aplicação dos filtros, e tipo das mutações, em cada um dos pacientes submetidos à análise pela metodologia WES



Após os filtros houve predomínio de missense e *frameshift*. A mutação missense (“mutação de sentido errado”) caracteriza-se por uma troca de base nitrogenada, mantendo o comprimento da fita de DNA que seja capaz de alterar a sequência de aminoácidos na cadeia polipeptídica. Dessa forma, altera a estrutura e pode alterar a função da proteína sintetizada, o que justifica seu potencial patogênico. A mutação *frameshift* (“mutação de troca de fase de leitura”), por sua vez, ocorre quando a adição ou remoção de bases nitrogenadas de DNA altera a estrutura de leitura de um gene (um quadro de leitura consiste em grupos de três bases - códon - que codificam para um aminoácido). Ao alterar um aminoácido tem também seu potencial patogênico justificado, por alterar a estrutura da proteína sintetizada (Gráficos 22 a 25).

Gráfico 22 - Total de mutações identificadas, após aplicação dos filtros, e efeito das mutações, em cada um dos pacientes submetidos à análise pela metodologia WES

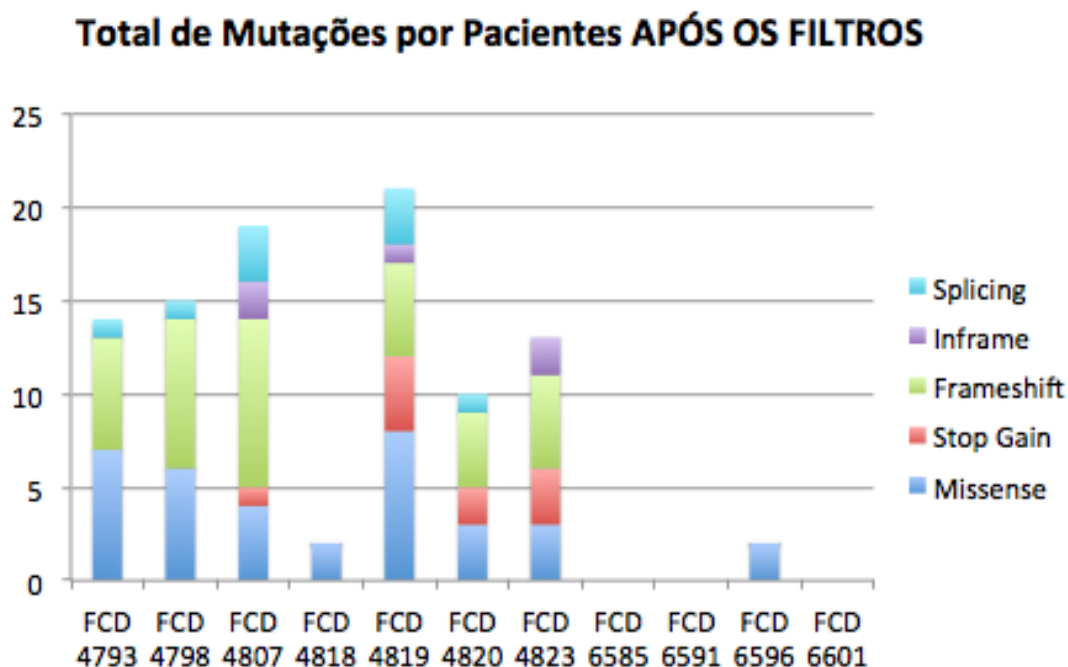


Gráfico 23 - Total de mutações pontuais identificadas pelo algoritmo Mutect2, após aplicação dos filtros, e efeito das mutações, em cada um dos pacientes submetidos à análise pela metodologia WES

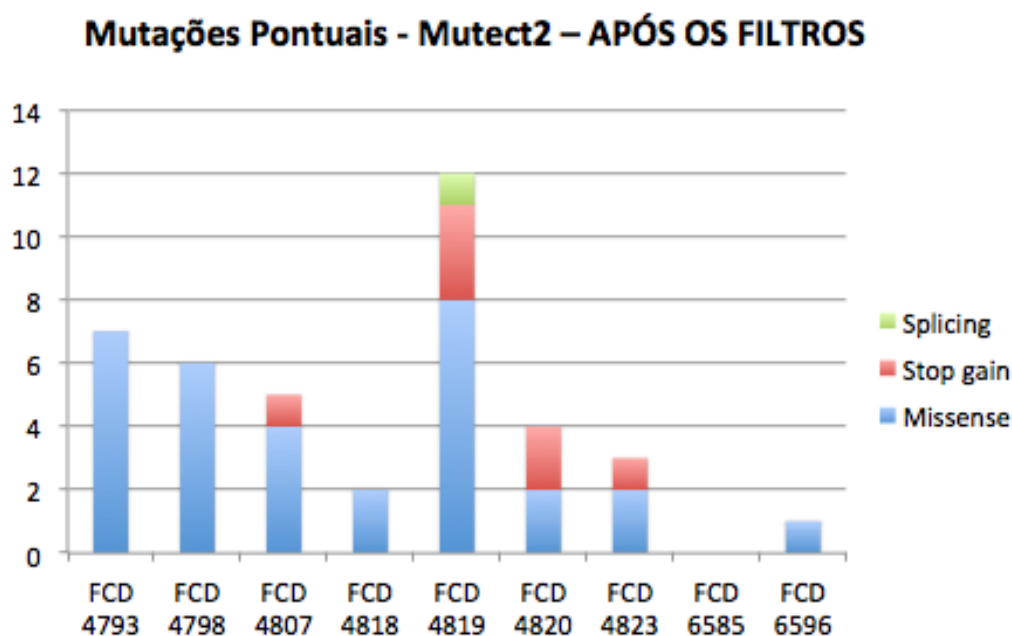


Gráfico 24 - Total de mutações pontuais identificadas pelo algoritmo Strelka, após aplicação dos filtros, e efeito das mutações, em cada um dos pacientes submetidos à análise pela metodologia WES

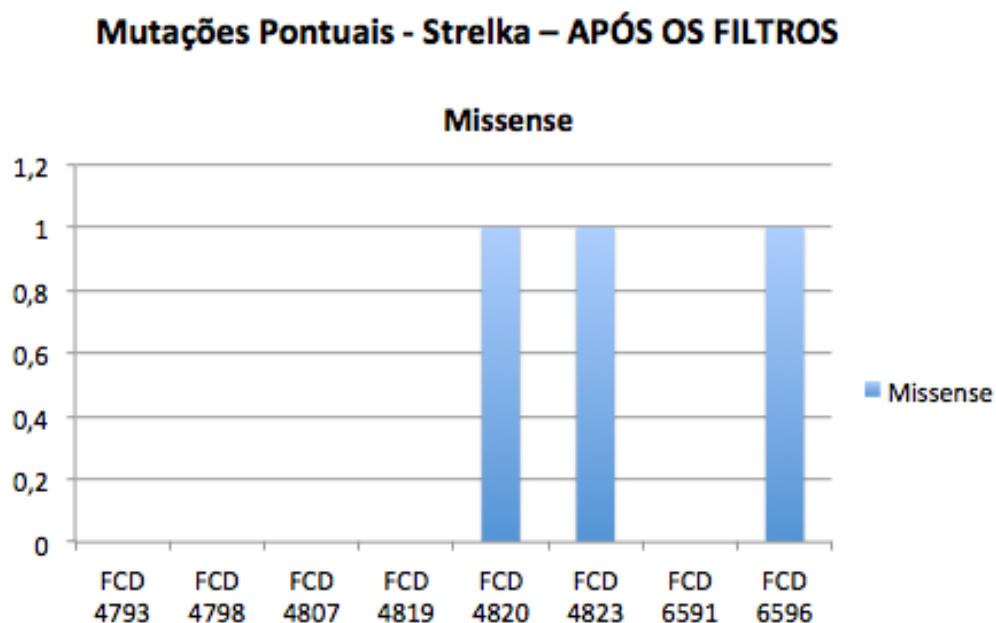
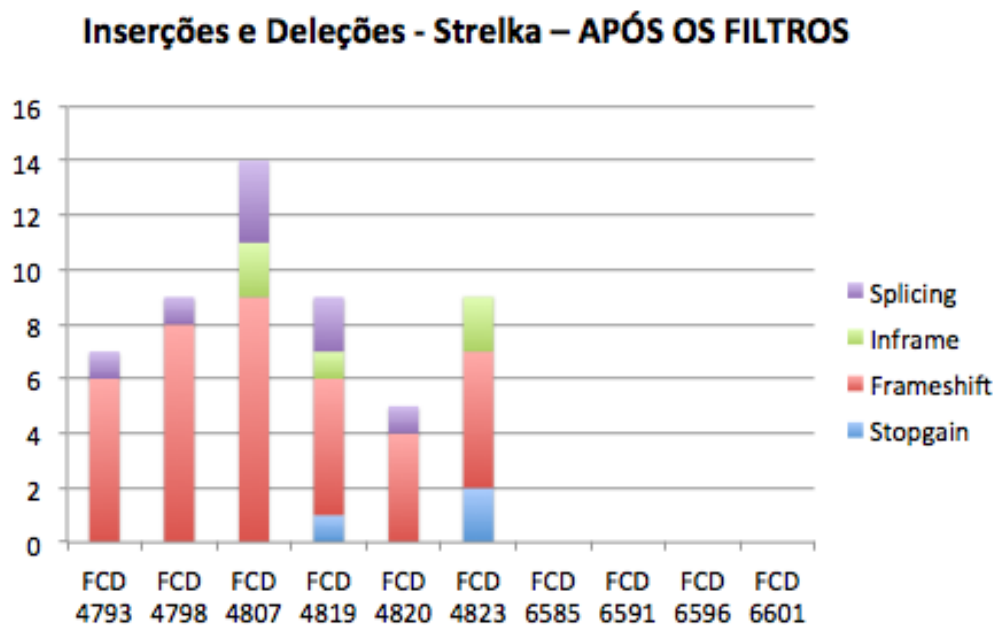
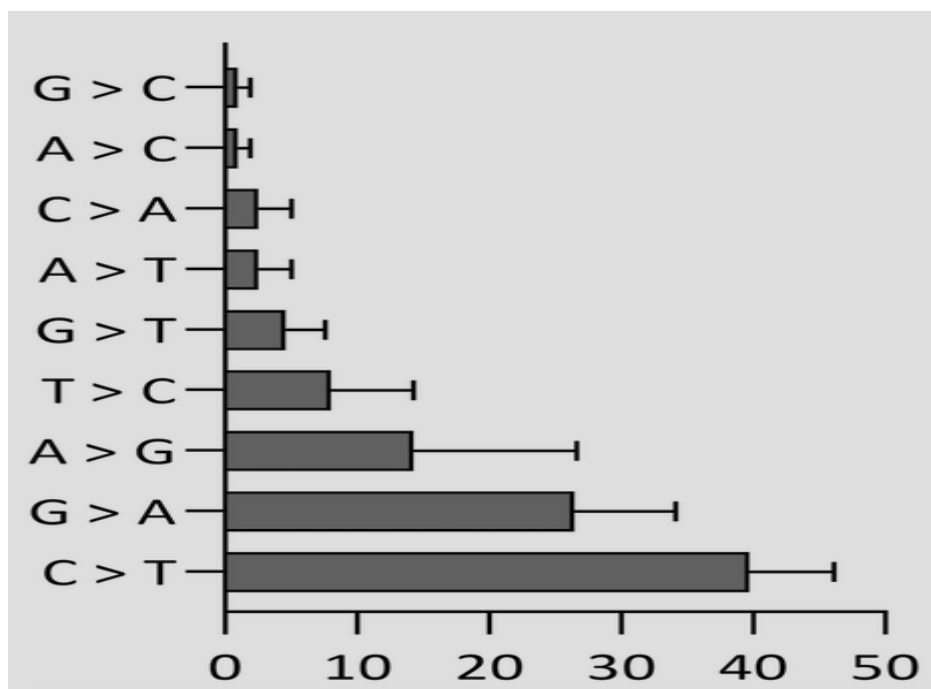


Gráfico 25 - Total de mutações de inserção ou deleção identificadas pelo algoritmo Strelka, após aplicação dos filtros, e efeito das mutações, em cada um dos pacientes submetidos à análise pela metodologia WES



Das mutações pontuais de troca, que passaram nos filtros de patogenicidade, houve predomínio da troca C>T (Gráfico 26).

Gráfico 26 - Padrão e quantidade de trocas de bases nitrogenadas do DNA, após aplicação dos filtros, nas mutações pontuais de troca dos pacientes submetidos à análise pela metodologia WES

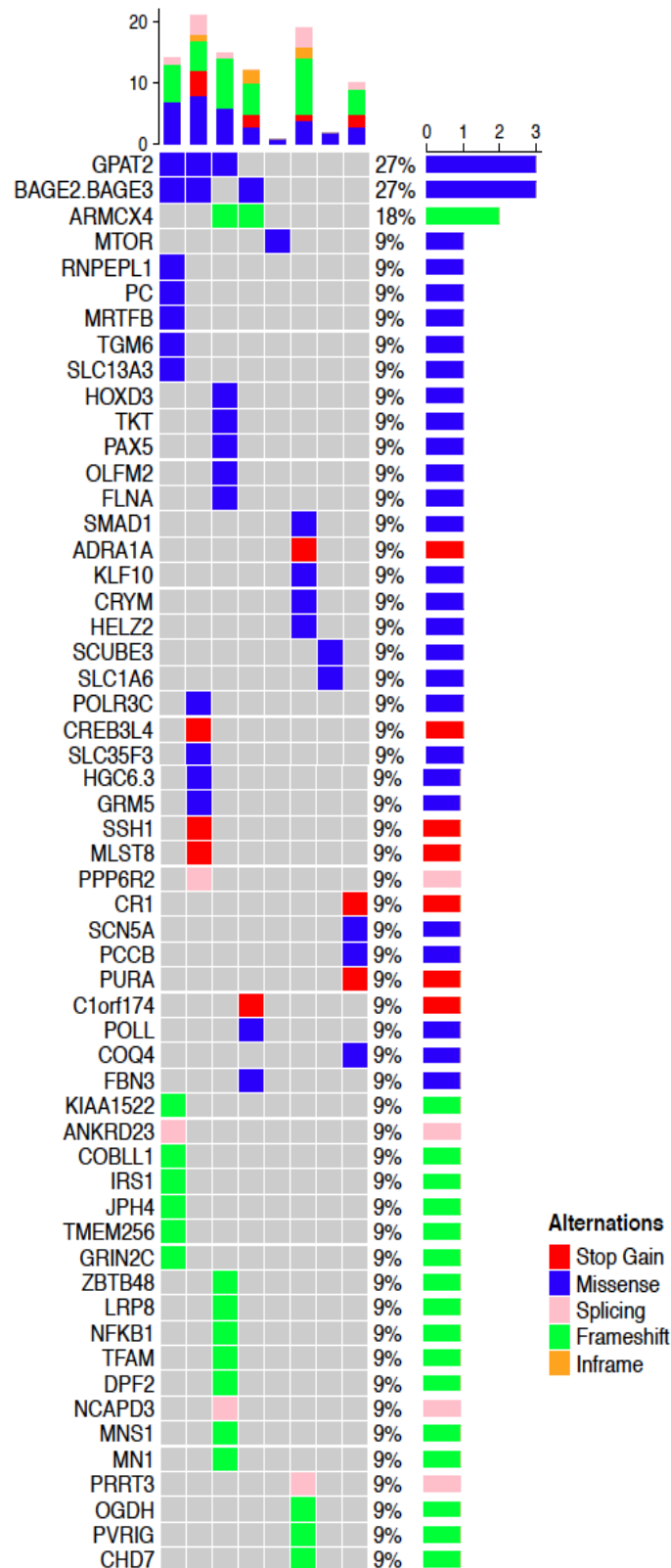


4.3.4.3 Análise das variantes de interesse identificadas pelo WES

Por meio da metodologia WES diversos genes apresentaram mutações que passaram em todos os filtros de patogenicidade aplicados. Essas mutações, portanto, possuem potencial patogênico presumido e estão listadas no Gráfico 27. Dentre os genes listados destacam-se os que tiveram variantes patogênicas identificadas em mais de uma amostra/paciente, sendo eles o GPAT2, o BAGE2.BAGE3 e o ARMCX4. O GPAT2 apresentou mutações patogênicas identificadas em três (FCD 4793, 4798 e 4819) das oito amostras (27%), todas do tipo missense. O gene BAGE2.BAGE3 apresentou mutação patogênica também em três (FCD 4793, 4819 e 4823) das oito amostras (27%), sendo também todas do tipo missense. O ARMCX4 evidenciou mutação do tipo missense identificada em duas amostras (FCD 4798 e 4823) (18%). Ainda pela metodologia WES identificou-se mutação do gene MTOR em apenas uma amostra (FCD 6596) dentre as oito

analisadas (9%), sendo esta do tipo missense. Outros genes, já descritos na literatura, como participantes do processo da gênese da displasia cortical, como o DEPDC5, AKT3, PIK3CA, TSC1 e TSC2 não apresentaram variantes patogênicas nessas oito amostras/pacientes identificadas pelo método do WES.

Gráfico 27 - Gráfico EpiPrint demonstrando a prevalência de mutações, após a aplicação dos filtros de patogenicidade, bem como o efeito das mutações encontradas nas amostras com diagnóstico de displasia cortical focal tipo II e submetidas à pesquisa genética pela metodologia WES



continua

4.3.5 Todas as metodologias

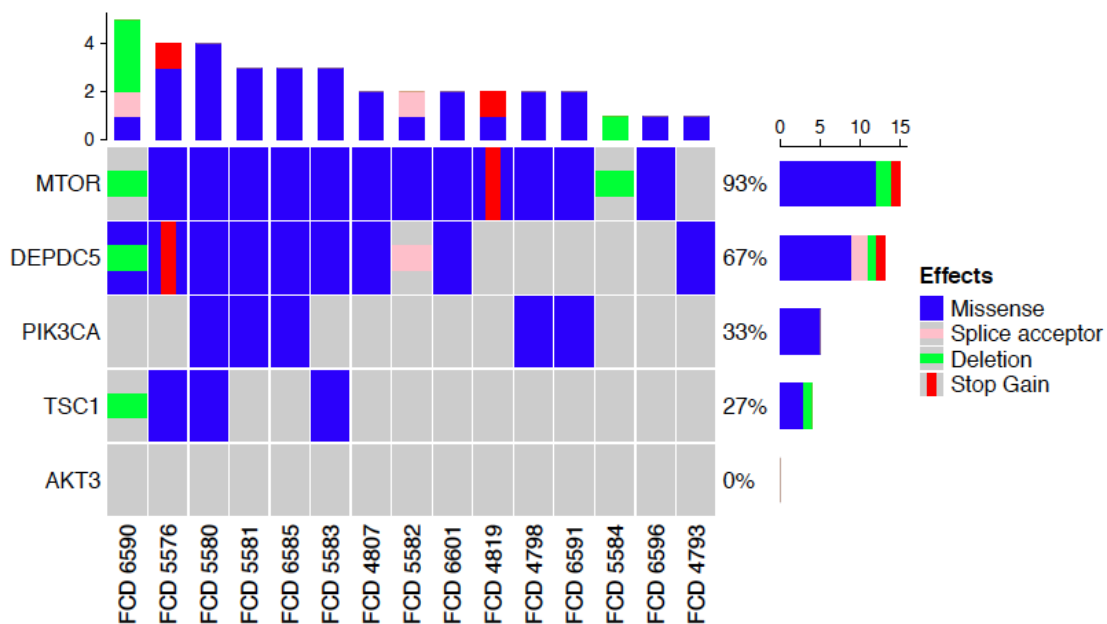
Considerando, então, as mutações já descritas na literatura como atuantes no processo de patogênese da displasia cortical tipo II (BALDASSARI *et al.*, 2019), foram analisadas todas as amostras de forma conjunta, independente da(s) metodologia(s) utilizada(s), buscando-se definir a real prevalência das mutações desses genes, haja vista discordância na literatura (BALDASSARI *et al.*, 2019; IFFLAND II; CRINO, 2017).

Levando-se em conta todas as amostras estudadas, houve mutação do MTOR em 14 pacientes (tipo missense em 12 pacientes, tipo deleção em dois e *stop gain* em um paciente, em que também houve missense).

O gene DEPDC5 foi o segundo com mais mutações nas amostras analisadas: 10 pacientes apresentaram mutações nesse gene (sete exclusivamente missense, um exclusivamente *splice acceptor*, uma deleção em paciente que também apresentava missense e um *stop gain* em paciente que também tinha missense). Cinco pacientes apresentaram mutações do tipo missense no gene PIK3CA, quatro mutações no gene TSC1, sendo três missenses e uma deleção. Não foram encontradas variantes patogênicas no gene AKT3 nessas amostras estudadas.

As amostras FCD 4818, 4820, e 4823 não apresentaram mutações ou variantes patogênicas nesses genes, em específico (MTOR, DEPDC5, PIK3CA, TSC1 e AKT3). Dessas três, duas delas (FCD 4818 e 4823), conforme Tabela 3, eram exatamente as duas amostras que não apresentavam sinais de DCF na microdissecção realizada, ou seja, eram tecidos pertencentes à zona epileptogênica, porém localizados em área adjacente à área da DCF, em si (Gráfico 28).

Gráfico 28 - Gráfico EpiPrint demonstrando a prevalência de mutações, após a aplicação dos filtros de patogenicidade, bem como o efeito das mutações encontradas em genes da via mTOR nas amostras com diagnóstico de displasia cortical focal tipo II e submetidas à pesquisa genética incluindo as três metodologias utilizadas no estudo: Amplicon, Ampliseq e WES



5. Discussão

5.1. Definição

A DCF pode ser definida, segundo a ILAE 2011, como uma malformação congênita do córtex cerebral caracterizada por alteração focal da citoarquitetura do córtex cerebral com (FCD tipo II) ou sem (FCD tipo I) a presença de neurônios dismórficos (BLÜMCKE *et al.*, 2011; CRINO, 2015a). É secundária a alterações pós-migratórias do desenvolvimento cortical (BARKOVICH *et al.*, 2012) e costumam resultar de afecção ocorrida durante estágios finais do desenvolvimento cortical, justificando sua apresentação focal no córtex cerebral (BARKOVICH *et al.*, 2012).

Dados recentes da literatura sugerem a ocorrência de mutações somáticas durante o desenvolvimento cerebral como possíveis responsáveis pela DCF (NAKASHIMA *et al.*, 2015). O período em que essas mutações ocorrem, durante esse desenvolvimento, pode ser determinante para o surgimento de DCF tipo II ou HME (SARNAT *et al.*, 2015), com tendência de ocorrência em período mais tardio no caso das DCF. Tal fato faz com que ambas as patologias compartilhem diversas características genéticas, especialmente na via de sinalização PI3K/AKT3/mTOR, mantendo, contudo, cada uma suas particularidades (NAKASHIMA *et al.*, 2015).

A VAF representa a proporção de DNA molecular no espécime original carregando a variante, e é obtida a partir da porcentagem de sequências de leitura correspondentes a uma variante de DNA específica dividida pela cobertura geral naquele *locus*. A VAF é, assim, uma medida importante da representatividade da variante encontrada na amostra estudada (STROM, 2016). Os *loci* heterozigotos tendem a ter VAFs próximas de 50%, *loci* homozigotos próximo a 100% e *loci* de referência próximo a 0%. Na pesquisa de mutações somáticas, a contaminação de células normais e a heterogeneidade da lesão, em si (tumor, DCF), se combinam para gerar VAFs imprevisíveis (STROM, 2016).

A VAF média encontrada na presente casuística foi de 0,048, ou seja, 4,8%, e a mediana de 0,031, que representa 3,1%. Esses valores são congruentes com as VAFs relatadas por Baldassari *et al.* (2019) para os casos de DCF tipo II e menores em relação àquelas habitualmente descritas para HME (BALDASSARI *et al.* 2019; GARCIA *et al.*, 2020). Isso corrobora a ideia de que ambas compreendam espectros diferentes de uma mesma patologia, cuja extensão da malformação seja apenas o reflexo da taxa de mosaicismos das mutações ocorridas.

A taxa de mosaïcismo da mutação no gene MTOR, por exemplo, como descrito por Marsan e Baulac (2018), correlaciona-se positivamente com a extensão da malformação do cérebro, variando desde baixas taxas, nos casos de DCF, até altas taxas nos pacientes com HME. Nos casos focais tende a ser maior no epicentro da lesão, na área mais epileptogênica (MIRZAA *et al.*, 2016).

As DCFs tipo II são, portanto, habitualmente secundárias a mutações somáticas patogênicas, especialmente da via mTOR. Apenas em alguns casos decorrem de mutações iniciais germinativas que, contudo, quando em genes repressores da via mTOR, normalmente dependem de uma segunda mutação associada, geralmente somática, que justifica a distribuição focal da lesão displásica (BALDASSARI *et al.*, 2019; BLÜMCKE *et al.*, 2021).

5.2 Caracterização clínica e epidemiológica

Ainda que o diagnóstico definitivo dependa do estudo anatomopatológico da lesão, a ressonância magnética do encéfalo ainda é, atualmente, a melhor ferramenta para diagnóstico pré-operatório da DCF, estando alterada na maioria dos casos (KABAT; KRÓL, 2012) e sendo positiva em um percentual de 63 a 98% dos pacientes (BAST *et al.*, 2006). A presente amostra apresentou alteração localizatória sugestiva de DCF tipo II na ressonância pré-operatória de 16 pacientes (88,8%).

A lesão displásica focal pode apresentar tamanho variado e se localizar em qualquer parte do cérebro, podendo ser inclusive multilobar (BLÜMCKE *et al.*, 2011, CRINO, 2015a), estando a DCF tipo I mais associada com epilepsia do lobo temporal e a DCF tipo II com epilepsia extra-temporal, especialmente do lobo frontal (KABAT; KRÓL, 2012). O acometimento do lobo frontal, presente na ressonância pré-operatória de 10 pacientes (55,5%) da amostra, pode ser explicado simplesmente pela grande dimensão desse lobo e a maior representatividade do mesmo em relação ao parênquima cerebral como um todo, já que se trata do maior lobo cerebral em extensão. Não há, portanto, à luz do conhecimento atual e nem nenhum achado genético do estudo que garanta haver qualquer tipo de predileção celular ou genética para o surgimento dessas mutações nas populações neuronais que irão migrar para o lobo frontal, ou se tal achado se deve apenas à maior

dimensão proporcional do lobo frontal. Há predomínio do sexo masculino (ORTIZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2013), tal como visto na série consecutiva de casos aqui apresentada, em que 72% das crianças (13 em 18) eram do sexo masculino.

As DCFs representam a principal causa de epilepsia refratária na população pediátrica e a segunda/terceira etiologia mais comum nos adultos, sendo esse o sintoma mais comum de apresentação da patologia (JIN *et al.*, 2016; KABAT; KRÓL, 2012) e que, frequentemente, determina a necessidade de tratamento cirúrgico nessa população (MAYNARD *et al.*, 2017). A epilepsia tem, habitualmente, início precoce, na infância. (KABAT; KRÓL, 2012). Sintomas associados, como atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e/ou déficit neurológico focal são menos comuns (MAYNARD *et al.*, 2017), não sendo isoladamente indicação para tratamento cirúrgico nessa patologia. Atraso do desenvolvimento neuropsicomotor foi identificado em 11 pacientes (61,11%) desta série cirúrgica, sendo o segundo achado clínico mais comum (MAYNARD *et al.*, 2017), podendo ser consequência da epilepsia refratária ou simplesmente da malformação cerebral em si.

Esta série foi realizada a partir de casos cirúrgicos em crianças com epilepsia farmacorresistente, contudo se sabe que alguns pacientes com DCF não apresentam epilepsia à época do diagnóstico, podendo este ser um achado de exame em ressonância de encéfalo realizada para outras finalidades, como cefaleia, quadros psiquiátricos, trauma craniano e atraso do desenvolvimento, de acordo com Maynard *et al.* (2017).

A sintomatologia tende a se manifestar mais precocemente nas lesões maiores. Caracteristicamente, a DCF tipo II tende a ter início mais precoce dos sintomas em relação à DCF tipo I (KABAT; KRÓL, 2012). Na casuística apresentada, um terço dos pacientes (6 em 18) iniciou a epilepsia antes dos seis meses de idade. Se considerado até o final do primeiro ano de vida, 66% (12 de 18) das crianças apresentaram a primeira crise convulsiva antes de completarem um ano de idade. No entanto, ainda que seja uma patologia congênita, a manifestação clínica pode surgir apenas tardiamente, sendo que um terço dos pacientes desta série apresentou início da epilepsia após um ano de idade.

O diagnóstico da DCF costuma ser mais precoce em crianças com epilepsia farmacorresistente (MAYNARD *et al.*, 2017), contudo o início mais precoce da

epilepsia não significa, necessariamente, maior frequência de crises ou pior resultado pós-operatório. No presente estudo, os dois pacientes com início da epilepsia no primeiro mês de vida atingiram Engel 1 após o tratamento cirúrgico, enquanto apenas três dos quatro (75%) pacientes com início da epilepsia entre dois e seis meses de idade e quatro dos seis (66,6%) com início da epilepsia entre sete meses e um ano atingiram Engel 1.

Mesmo aqueles com história de múltiplas crises diárias podem alcançar bons resultados pós-operatórios, muitas vezes superiores a pacientes com frequência mais esporádica de crises, tendo os três pacientes (100%) com mais de 10 crises diárias alcançado Engel 1 após o tratamento cirúrgico contra dois dos quatro (50%) que apresentavam crises com frequência semanal antes da cirurgia. Estes achados permitem inferir, que a frequência de crises pré-operatória não é, por si só, suficiente para contraindicar o tratamento cirúrgico e tampouco predizer prognóstico pós-operatório.

Baseado apenas em achados de ressonância, Maynard *et al.* (2017) observaram que 21 dos 38 pacientes (55,26%) com epilepsia e DCF no hemisfério esquerdo tinham epilepsia farmacorresistente, comparados a apenas 10 dos 30 (33,33%) em que a DCF estava localizada no hemisfério direito. Ainda que possa ser este um fator isolado para maior refratariedade da epilepsia, por si só, há sabidamente maiores dificuldades e limitações técnicas para qualquer abordagem cirúrgica no hemisfério cerebral esquerdo por ser este dominante na maioria da população, responsável pela linguagem, fazendo com que a cirurgia nessa região tenha uma tendência mais conservadora. Na série cirúrgica apresentada, portanto, pacientes com acometimento do hemisfério esquerdo obtiveram pior resultado cirúrgico em relação àqueles com acometimento do hemisfério direito. Enquanto 83,33% (5 em 6) dos pacientes com acometimento do hemisfério direito apresentaram Engel 1 no pós-operatório, apenas 66,66% (8 em 12) com acometimento do hemisfério esquerdo alcançaram Engel 1.

A localização da DCF é, portanto, isoladamente um fator capaz de influenciar o prognóstico de controle das crises após o tratamento cirúrgico. Além do hemisfério cerebral esquerdo, citado previamente, Fauser *et al.* (2004) encontraram maior taxa de pacientes livres de crises após cirurgia para tratamento da displasia cortical do

lobo temporal. Esse foi um dos motivos citados pelos autores para justificar os melhores resultados cirúrgicos obtidos nas DCF tipo I, que se localizam mais comumente no lobo temporal. Na presente casuística, restrita aos casos de DCF tipo II, não houve nenhum paciente com lesão isolada em lobo temporal, contudo áreas eloquentes como região perirrolândica e lobo parietal apresentaram piores resultados cirúrgicos quando comparadas às lesões do lobo occipital, parieto-occipital ou frontal mais distante da área motora.

Bjellvi et al em recente metanálise realizada em 2019 encontraram uma associação positiva entre curta duração da epilepsia e pacientes livre de crise após o tratamento cirúrgico para a epilepsia. O tempo entre o início da epilepsia e o tratamento cirúrgico é, portanto, outro fator capaz de afetar o resultado pós-operatório, na medida em que quanto maior for esse tempo, menor tende a ser a chance de ótimo controle das crises convulsivas após a abordagem cirúrgica (BIJELLVI *et al.*, 2019; SALEMDAWOD *et al.*, 2021). Estes achados reforçam esta tese, sendo observado Engel 1 nos três pacientes da amostra com até dois anos de doença e em apenas um dos três (33,3%) com tempo de doença entre sete e 10 anos. Além da técnica cirúrgica, em si, a duração da epilepsia é o único fator modificável associado a um desfecho positivo pós-operatório (BIJELLVI *et al.*, 2019). Há que se destacar, portanto, a grande importância do diagnóstico precoce da displasia cortical, da pronta identificação de eventual refratariedade da epilepsia e do rápido referenciamento do paciente para centros especializados que possam avaliar e oferecer o tratamento cirúrgico adequado a esses pacientes (BIJELLVI *et al.*, 2019).

Fauser *et al.* (2015), em sua extensa série cirúrgica envolvendo 211 pacientes (adultos e crianças), apontaram como fatores preditores para se tornar livre de crises após a cirurgia a ressecção completa da zona epileptogênica, baixa idade na época da cirurgia e localização unilobar da lesão.

Salemdawod *et al.* (2021), em estudo retrospectivo com 50 crianças submetidas a tratamento cirúrgico para DCF tipo II, concluíram que a duração da epilepsia, ressecção completa da lesão, baixa idade na época da cirurgia e o número de medicações antiepilépticas antes da cirurgia poderiam ser utilizados como preditores de bom controle de crise pós-operatória.

Tal como encontrado nas séries de Fauser et al. (2015) e Salemdawod *et al.* (2021), também neste estudo as crianças com baixa idade na época da cirurgia apresentaram melhor resultado no controle das crises epiléticas no pós-operatório, sendo que as seis crianças (100%) operadas até os cinco anos de idade atingiram Engel 1, em comparação com apenas uma das quatro (25%) entre seis e 10 anos e seis das oito (75%) crianças entre 11 e 18 anos.

Esforços têm sido feitos buscando agilizar o diagnóstico da patologia e o reconhecimento da refratariedade da epilepsia. Em se tratando de uma patologia congênita e com alterações genéticas presentes desde o nascimento, espera-se que alterações genéticas características possam ajudar nesse reconhecimento. Estudos das vias genéticas envolvidas na gênese da patologia, bem como o desenvolvimento de métodos e ferramentas adequadas que possam identificar precocemente as alterações presentes nessas vias, são cada vez mais necessários. Há uma expectativa ainda de que essas alterações genéticas possam, na prática clínica, ter, além do papel diagnóstico, eventual valor prognóstico para esses pacientes.

A adequada mensuração do peso e da contribuição de cada variável capaz de afetar o desfecho clínico pós-operatório ainda depende de séries maiores e maior quantidade de estudos a esse respeito. A contribuição genética e a presença de possíveis marcadores genéticos de bom ou mau prognóstico pós-operatório é uma informação ainda não respondida na literatura médica. É ainda mais desafiador, em qualquer série cirúrgica, comparar diferentes resultados a partir das diversas técnicas cirúrgicas empregadas e diferentes experiências cirúrgicas das equipes envolvidas no tratamento. Entretanto, é importante ter em mente que dificilmente a influência de uma única variável será mais importante do que a análise conjunta de todas as variáveis envolvidas; e juntamente com o contexto em que se encontra inserido o paciente quando se espera inferir sobre a chance de controle das crises convulsivas no pós-operatório (FAUSER *et al.*, 2015).

O tempo de seguimento pós-operatório é, por fim, um ponto fundamental a ser avaliado em qualquer série que envolva resultado de tratamento cirúrgico para epilepsia. Petrik *et al.* (2021), em estudo retrospectivo com 99 pacientes que apresentaram recorrência da epilepsia após dois anos do tratamento cirúrgico, encontraram tempo médio para recorrência de 56,6 meses após a cirurgia,

validando, nesse aspecto, os achados do presente estudo, que apresentou tempo médio de seguimento de 55,88 meses, com mediana de 51,5 meses, próximo ao tempo médio capaz de se detectarem as recidivas, de acordo com os autores. Séries com seguimento pós-operatório muito curto podem não ser capazes de identificar eventuais recidivas nos pacientes estudados. Petrik *et al.* (2021) identificaram como principais fatores para recorrência a ressecção incompleta da lesão epileptogênica e/ou a existência de outras vias epileptogênicas não detectadas previamente à cirurgia, ou surgidas posteriormente.

5.3 Metodologia de pesquisa e mutações encontradas

A metodologia aplicada para o estudo genético das amostras pode influenciar o resultado obtido e deve ser levada em consideração. As diferentes metodologias disponíveis para a pesquisa das mutações podem ser mais eficazes em diferentes finalidades, podendo ser complementares em determinadas situações.

O Amplicon e Ampliseq são métodos de sequenciamento direcionado e que permitem analisar variações genéticas em regiões genômicas específicas, bem como buscar alvos específicos a partir de painéis pré-projetados de genes. Esses métodos foram aplicados em 14 pacientes da amostra.

O Amplicon é um método de sequenciamento direcionado e que permite analisar variações genéticas em regiões genômicas específicas. Este método utiliza PCR para criar sequências de DNA chamadas Amplicons a partir de regiões-alvo que são previamente enriquecidas por meio de amplificação por PCR. Obtêm-se, nesse caso, variantes previamente validadas por PCR digital.

O Ampliseq é uma ferramenta de sequenciamento de amostras de DNA de tecido fresco congelado com fluxo de trabalho baseado em PCR para uso em alvos específicos a partir de painéis pré-projetados de genes, que podem variar de alguns a centenas em uma única execução. No painel utilizado, as variantes foram previamente validadas por PCR digital. Com este método buscou-se avaliar especialmente os genes já previamente descritos na patogênese da DCF tipo II, em especial aqueles da via mTOR, para entender se sua participação poderia ser ainda mais relevante do que a já descrita na literatura. A frequência de mutações

patogênicas encontradas nesses genes foi, na presente casuística, maior que a descrita em outras séries da literatura.

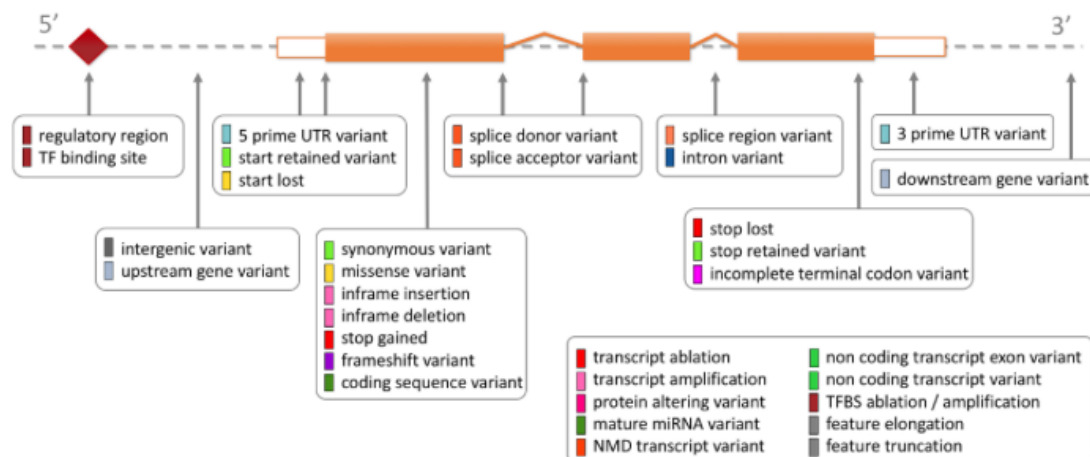
A taxa de mosaïcismo da mutação no gene MTOR nos casos de DCF tende a ser maior no epicentro da lesão, na área mais epileptogênica (MIRZAA *et al.*, 2016). Ainda assim, regiões adjacentes, que são, muitas vezes, ressecadas a depender da técnica cirúrgica utilizada, são enviadas para análise e mesmo que não contenham as alterações histopatológicas diagnósticas da DCF tipo II, podem apresentar as alterações genéticas responsáveis pela epileptogênese, em si, ou pela malformação tecidual. Isso fica claro ao se notar que as amostras FCD 4818 e 4823, cuja microdissecção tecidual não encontrou sinais de DCF, apresentaram diversas mutações patogênicas relacionadas à patologia.

O Amplicon e Ampliseq promovem uma pesquisa mais direcionada e são sabidamente mais úteis para mutações já conhecidas e descritas. O WES, por outro lado, é uma ferramenta mais útil quando se busca por variantes patogênicas em um universo de milhares de variantes aleatórias. Por fornecer uma amostra quase aleatória de variantes, o WES pode deixar passar algumas mutações patogênicas presentes no tecido estudado. Além disso, o simples achado de uma variante em uma amostra celular não significa dizer que a mesma é patogênica ou potencialmente patogênica. É necessário que ela seja capaz de alterar a estrutura final da proteína gerada e, dessa forma, gerar repercussão clínica no paciente. Algumas premissas são necessárias para que isso corra e os filtros de patogenicidade aplicados nas variantes encontradas em cada amostra, tal como descrito na metodologia, possam identificar aquelas com essa capacidade.

5.4 Tipos de mutações e potencial de patogenicidade

Na presente casuística, mutações do tipo missense foram de longe as mais frequentes dentre as variantes com alta predição de patogenicidade após aplicação de todos os filtros (Figura 3).

Figura 3 - Diagrama mostrando a localização de cada termo de exibição em relação à estrutura da transcrição



Fonte: Adaptado da plataforma ENSEMBL.ORG.

A importância do tipo da mutação apresentada pela variante reside no fato de que, a depender do tipo da mutação e do local dentro do gene em que ela ocorre, terá maior potencial para alterar a função da proteína e, dessa forma, ser identificada como patogênica.

Mutações que ocorrem em regiões do DNA não fundamentais para a estrutura e função da proteína, como *intergenic_variant* ou *intron_variant*, bem como aquelas que, mesmo que ocorram em regiões essenciais, mas que não comprometam a estrutura e função da proteína sintetizada, como *synonymous_variant*, por exemplo, apresentam baixo potencial patogênico e são habitualmente excluídas da análise no momento inicial após gerados os dados brutos das variantes de cada amostra.

As mutações tipo Missense, mais frequentes no presente estudo, caracterizam-se pela troca de uma ou mais bases, resultando em uma sequência diferente de aminoácidos, porém com o comprimento preservado (ENSEMBL.ORG). Por meio dessa troca de aminoácidos altera-se a estrutura e pode também alterar a função da proteína sintetizada tendo, portanto, potencial patogênico.

5.5 Influência da via mTOR na DCF tipo II

A DCF tipo II é, então, uma patologia complexa, de extrema relevância clínica e com tratamento cirúrgico, ainda que desafiador, muitas vezes, necessário. Seu mecanismo fisiopatológico ainda não está completamente elucidado. O próprio entendimento e a diferenciação patológica entre os subtipos da DCF (IIa e IIb) ainda são pouco claros. A chave para essas respostas parece estar no estudo do material genético desses pacientes.

Como dito, a mTOR é uma *serione/threonine* quinase cuja cascata de sinalização está envolvida em funções celulares essenciais como a manutenção da homeostase celular, metabolismo energético, estresse oxidativo, proliferação e sobrevivência, resposta a fatores de crescimento, diferenciação e migração, organização do citoesqueleto e autofagia (CRINO, 2015a,b; JESUS-RIBEIRO *et al.*, 2021). Dessa forma, a mTOR é uma via de sinalização celular frequentemente envolvida na patogênese de diversas malformações do desenvolvimento cortical (ROSSINI *et al.*, 2017) e que pode ser influenciada por uma série de sinais celulares ou por outras vias correlatas, de forma direta ou indireta (RICE; WADHWANI, 2015).

Lim *et al.* (2015) encontraram mutação do gene MTOR em 15,6% dos pacientes do estudo. Mirzaa *et al.* (2016) identificaram o gene MTOR mutado ao realizarem o sequenciamento do exoma de oito pacientes com DCF e/ou HME. Nenhum outro gene foi identificado.

Estudos correlacionando a DCF tipo II com mutações somáticas na via mTOR, em genes como o gene MTOR (BALDASSARI *et al.*, 2019; LIM *et al.*, 2015; ROSSINI *et al.*, 2017), DEPDC5, NPRL2, NPRL3 (SIM *et al.*, 2016, WECKHUYSSEN *et al.*, 2016), PI3KCA e AKT3 (JANSEN *et al.* 2015), têm sido publicados nos últimos anos.

Experimentos intervencionistas, como o realizado por Lim *et al.* (2015), reforçam esta tese. Os autores, em estudo envolvendo a expressão cortical focal de mTOR mutada por meio da eletroporação intraútero de camundongos, observaram prejuízo no processo de migração neuronal e surgimento de crises epiléticas espontâneas e neurônios citomegálicos nesses animais. Por outro lado, quando inibiram a mTOR com rapamicina não houve surgimento de neurônios citomegálicos

e crises epilépticas. Dessa forma, ratificaram o papel da via mTOR na gênese da DCF (LIM *et al.*, 2015, PARRINI *et al.*, 2016), bem como seu papel de potencial alvo terapêutico a ser explorado (LIM *et al.*, 2015).

Baldassari *et al.* (2019), em estudo com amostras de tecido cerebral obtidas de 80 crianças submetidas a tratamento cirúrgico para epilepsia de difícil controle, conseguiram elucidar 63% dos casos de DCF tipo II/HME por meio do achado de mutações em genes da via mTOR.

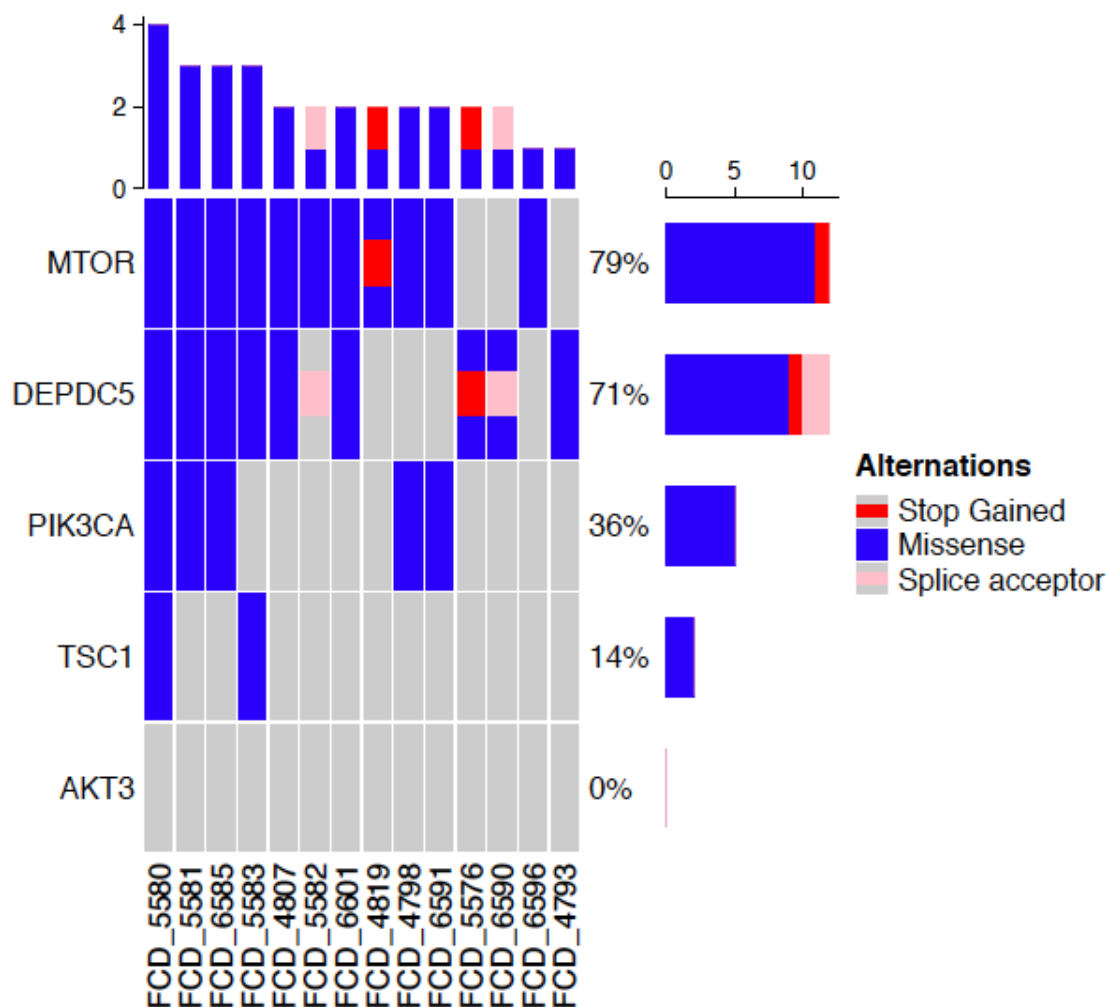
Ainda no campo das malformações do desenvolvimento cortical, Lee *et al.* (2012) realizaram o sequenciamento do exoma de 20 pacientes com diagnóstico de HME e encontraram mutações somáticas *de novo* em 30% dos indivíduos em pelo menos um dos genes PIK3CA, AKT3 e mTOR.

Mutações somáticas do gene MTOR em indivíduos com DCF variam entre 15,6 - 46% nos diferentes estudos encontrados na literatura e, ainda assim, são de longe as mutações mais descritas (MARSAN; BAULAC, 2018).

Neste estudo, em que foram aplicadas três diferentes metodologias, a frequência encontrada de mutação em genes da via mTor foi consideravelmente maior do que o descrito na literatura, especialmente quando empregadas as técnicas Amplicon e/ou Ampliseq. Isso pode demonstrar, em última análise, a participação ainda mais relevante da via mTor na patogênese da DCF tipo II, mais do que previamente imaginado.

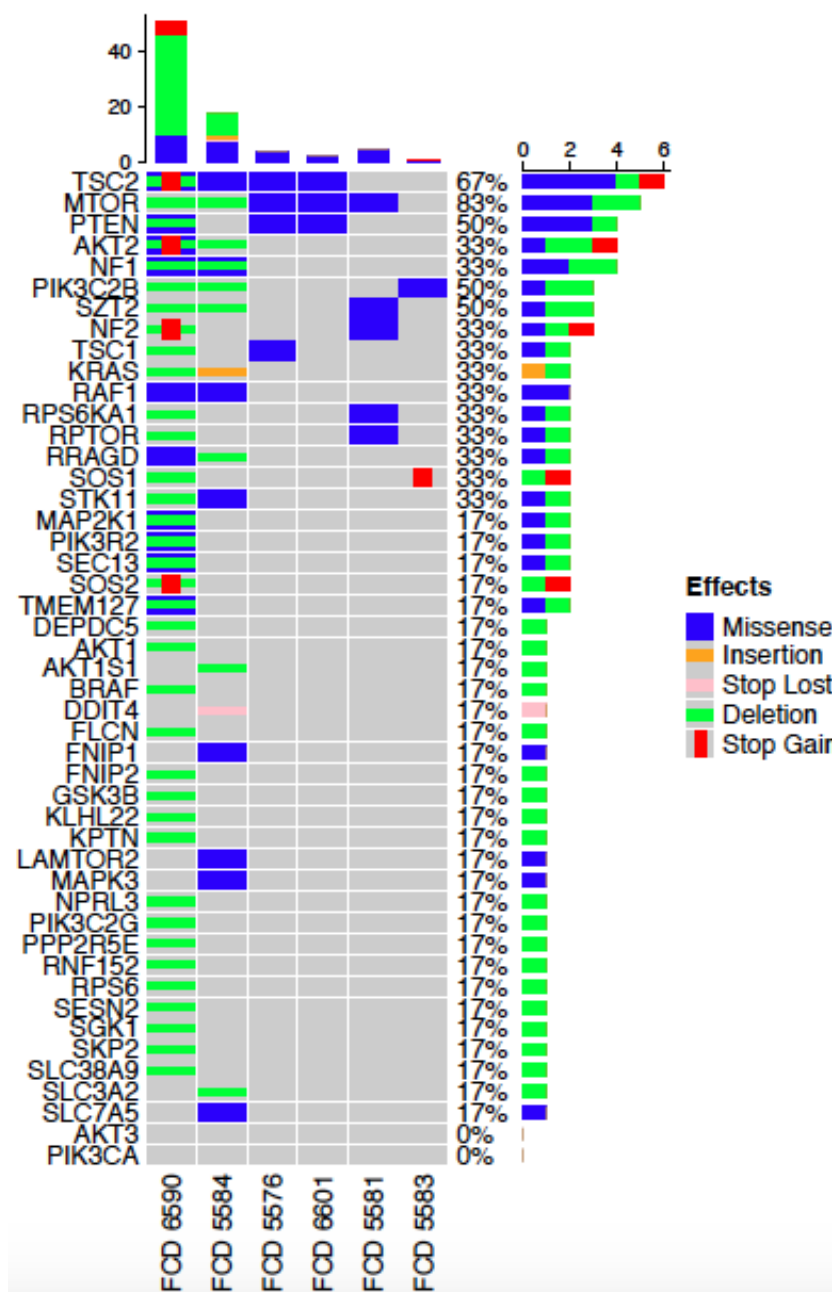
Se considerada apenas a metodologia Amplicon, o gene MTOR apresentou-se mutado em 11 dos 14 pacientes (79%), o DEPDC5 em 10 de 14 (71%), o PIK3CA em cinco de 14 (36%), TSC1 em dois de 14 (14%) e o AKT3 em nenhum paciente. Pelo menos um desses cinco genes estava mutado nos 14 pacientes submetidos ao Amplicon (Gráfico 29).

Gráfico 29 - Gráfico EpiPrint demonstrando a prevalência de mutações, após a aplicação dos filtros de patogenicidade, bem como o efeito das mutações encontradas nas amostras com diagnóstico de displasia cortical focal tipo II e submetidas à pesquisa genética pela metodologia Amplicon



A análise pelo Amplicon evidenciou mutação do gene MTOR em cinco dos seis pacientes (83%), do gene TSC1 em dois dos seis (33%), do gene DEPDC5 em um dos seis (17%) e nenhuma mutação dos genes AKT3 e PIK3CA. Considerando esses cinco genes, apenas um dos seis pacientes (16,66%) não apresentou mutação em nenhum deles (Gráfico 30).

Gráfico 30 - Gráfico EpiPrint demonstrando a prevalência de mutações, após a aplicação dos filtros de patogenicidade, bem como o efeito das mutações encontradas nas amostras com diagnóstico de displasia cortical focal tipo II e submetidas à pesquisa genética pela metodologia Ampliseq



Ao se utilizar a metodologia WES, apenas um entre os onze pacientes da amostra (9%) apresentou mutação do gene MTOR, em contraposição a onze dos

quatroze (79%) em que foi aplicado o Amplicon, e cinco dos seis (83%) submetidos ao Ampliseq.

Há importante evidência de que a escolha da metodologia adequada para investigação das mutações nos pacientes com DCF tipo II, bem como a aplicação de painéis específicos e bem direcionados, pode alcançar maior sensibilidade de detecção, próxima a 100% no caso da via mTOR (BALDASSARI *et al.*, 2019). A aplicabilidade clínica dessas informações na assistência às crianças portadoras de epilepsia e os resultados obtidos dependerão, portanto, primeiramente, da correta escolha do método de pesquisa das mutações. Na prática clínica e também na pesquisa acadêmica, ter em mente a finalidade desejada e o objetivo que se busca atingir são fundamentais no resultado obtido, uma vez que disso depende a escolha da metodologia aplicada para a pesquisa genética.

5.6 Papel de outras vias já descritas na DCF tipo II

Ainda que muito importante na patogênese da DCF tipo II, a via mTOR tem sido questionada como única responsável. Adachi *et al.* (2017) publicaram um caso de síndrome de Cowden associada à DCF e epilepsia secundárias a uma mutação no gene PTEN. Terrone *et al.* (2016) avaliaram um paciente com mutação *de novo* no gene PIK3R2 como responsável por um quadro clínico que envolvia DCF, confirmada por exame de imagem. Avansini *et al.* (2018) identificaram expressão aumentada dos genes NEUROG2 e RND2 (alvo do NEUROG2) na DCF tipo II. A relação desses genes com a via mTOR ainda é pouco esclarecida. O NEUROG2 desempenha papel central na diferenciação neuronal em várias regiões do sistema nervoso central, com ação temporalmente exclusiva durante a neurogênese, e o RND2 exerce papel na migração neuronal radial.

Esses dois últimos não foram identificados no presente estudo por meio da metodologia WES e não estavam incluso nos painéis aplicados pelos métodos Ampliseq e Amplicon. O fato de não terem sido identificados com a metodologia WES pode ser explicado de duas formas: devido à baixa frequência de mutação nesses genes, ainda menor que a do gene MTOR, não por acaso sendo pouco descritos na literatura, ou devido ao rigor dos filtros que foram aplicados aos dados

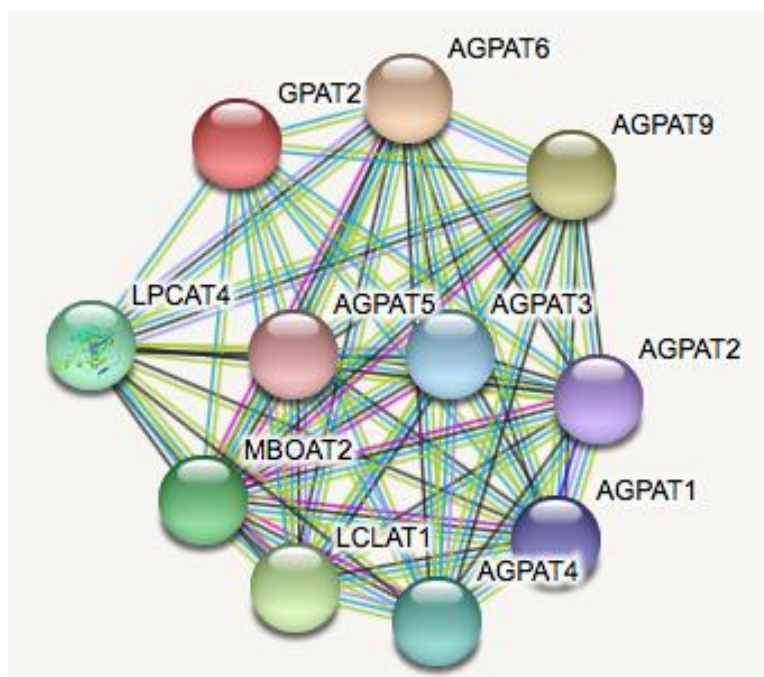
brutos obtidos para garantir que apenas variantes com alto potencial para patogenicidade fossem analisadas. No gene *NEUROG2*, por exemplo, foi observada uma variante em um dos pacientes avaliados (FCD-6601), porém essa variante não apresentava critérios para alto potencial de patogenicidade, com bom grau de confiabilidade, sendo excluída do resultado final.

5.7 Demais genes encontrados no WES

Os filtros aplicados nas variantes encontradas pela metodologia WES na presente amostra revelaram uma série de mutações em diversos outros genes que não foram ainda descritos na literatura como tendo qualquer relação direta com a patogênese da DCF cerebral. Contudo, por terem aparecido mutados em mais de uma amostra no presente estudo, vale um olhar mais próximo nos seguintes genes: *GPAT2*, *BAGE2*.*BAGE3* e *ARMCX4*.

O Glycerol-3-Phosphate-Acyltransferase 2 (*GPAT2*) possui ação mitocondrial, responsável pela síntese de glicerolipídeos, e já foi identificado com expressão aumentada em células de câncer de mama (OMIM.ORG) e associado também à Lipodistrofia tipo Berardinelli (ORPHANET). A Figura 4 mostra os vários genes com os quais se relaciona de forma direta, segundo o site STRING-DB.ORG.

Figura 4 - Figura representativa da análise de todos os genes relacionados ao gene GPAT2 por meio da rede de interação de proteínas PP1 (também chamada de Network Medicine). Grupos de proteínas são indicados em cores diferentes. As linhas representam as associações funcionais previstas. Associações fortes estão representadas por linhas mais grossas. Os genes que não se apresentavam ligados à rede foram excluídos da análise



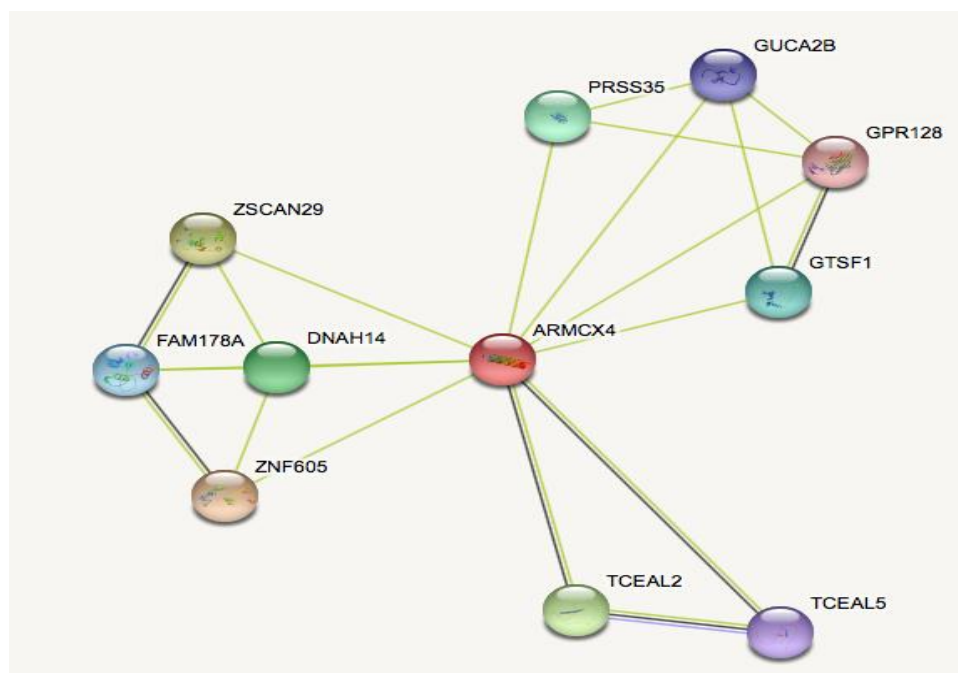
O GPAT1, gene com ação próxima ao GPAT2, já foi associado em estudo com camundongos a um efeito protetor contra a apoptose de células tronco induzidas por hipóxia por meio da ativação da via mTOR (LEE *et al.*, 2016).

No presente estudo, o GPAT2 apresentou mutação nas amostras FCD 4793, 4798 e 4819, sendo os três pacientes do sexo masculino, com DCF em lobo esquerdo, com início da epilepsia bem precoce (até três meses de idade), com frequência diária de crises, além de atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, e tendo alcançado Engel 1A após a cirurgia. Chama atenção o início bastante precoce da epilepsia nos três pacientes que apresentaram mutação no GPAT2. As FCDs 4793 e 4819 eram do subtipo IIa e a FCD 4798 subtipo IIb, além de terem localizações diferentes.

O gene ARMCX4 (Armadillo Repeat Containing X-Linked 4), de função ainda desconhecida, gera um produto que interage com outras proteínas em uma

variedade de processos celulares (GENECARDS.ORG). Chang *et al.* (2017) identificaram o ARM CX4 como potencial gene de passagem, cuja alteração molecular gerada levou à ativação de vias, dentre elas a mTOR, envolvidas com o câncer endometrial. A Figura 5 demonstra os vários genes com os quais se relaciona de forma direta o gene ARM CX4, segundo o site STRING-DB.ORG.

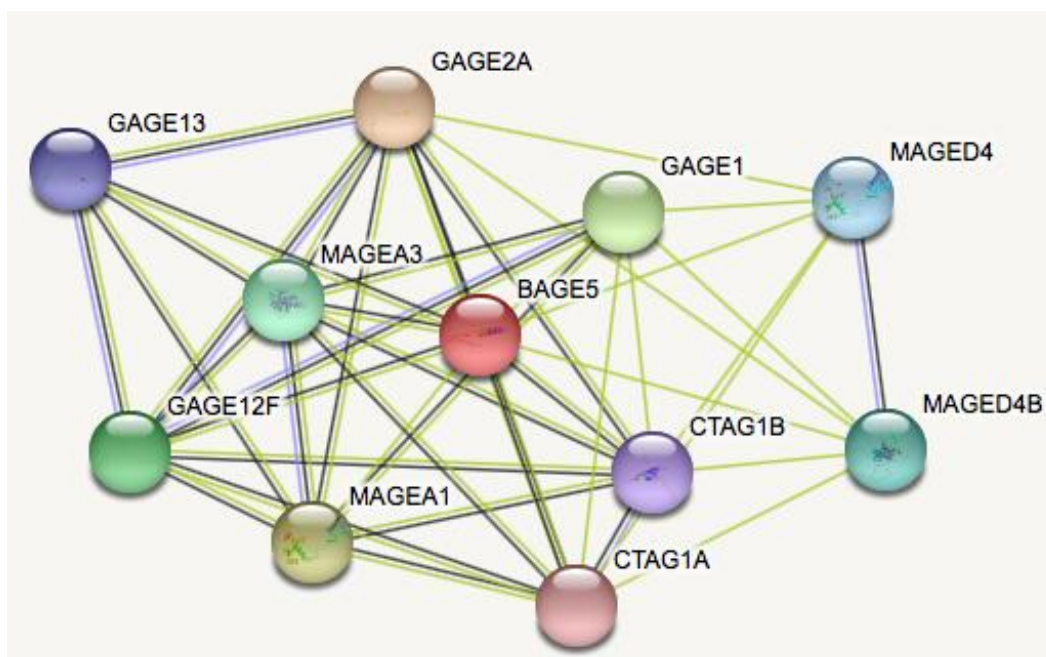
Figura 5 - Figura representativa da análise de todos os genes relacionados ao gene ARM CX4 por meio da rede de interação de proteínas PP1 (também chamada de Network Medicine). Os grupos de proteínas estão indicados em cores diferentes. As linhas representam as associações funcionais previstas. Associações fortes estão representadas por linhas mais grossas. Os genes que não se apresentavam ligados à rede foram excluídos da análise



O ARM CX4 apresentou mutação nos pacientes FCD 4798 e 4823, sendo ambos do sexo masculino, DCF tipo IIb, localizadas no lobo frontal esquerdo, com frequência diária de crises convulsivas e início da epilepsia até os sete meses de idade. Ambas alcançaram Engel 1A após o tratamento cirúrgico. Ainda que sejam apenas dois casos, notam-se bastantes semelhanças entre ambos no que diz respeito a subtipo, localização e padrão e resposta da epilepsia.

Os genes da família BAGE, em especial o BAGE5, foram previamente descritos na literatura estando relacionados à tumorigênese do câncer de ovário, tireoide e rabdmiossarcoma, não havendo nenhuma correlação próxima descrita com a via mTOR ou com a gênese de malformações cerebrais (STRING-DB.ORG) (Figura 6).

Figura 6 - Figura representativa da análise de todos os genes relacionados ao gene BAGE por meio da rede de interação de proteínas PP1 (também chamada de Network Medicine). Os grupos de proteínas estão indicados em cores diferentes. As linhas representam as associações funcionais previstas. Associações fortes estão representadas por linhas mais grossas. Os genes que não se apresentavam ligados à rede foram excluídos da análise



A mutação patogênica na família do BAGE foi identificada nas amostras FCD 4793, 4819 e 4823, sendo todos os pacientes do sexo masculino, com alteração do hemisfério esquerdo, com frequência diária de crise epiléptica, início da epilepsia até os sete meses de idade e com Engel 1A após a cirurgia. Todos apresentavam subtipos e localizações diferentes.

Pela técnica WES, além dos três genes supracitados, outros não relacionados à via mTOR foram identificados com mutação patogênica, contudo não foram

analisados de forma isolada por terem sido identificados em apenas uma das onze amostras submetidas à WES.

5.8 Correlação genética com desfechos clínicos

Não há, até o momento, publicado na literatura, nenhum estudo que correlacione mutações genéticas específicas, tipos de mutações, quantidade de mutações ou genes mutados com o desfecho clínico e/ou características epidemiológicas desses pacientes. Isso ocorre, especialmente, ainda pelo baixo número de estudos a respeito do tema e a recente descoberta e utilização das ferramentas para análises genéticas nesses pacientes. O presente estudo não visa e tampouco pode responder com exatidão tais questões. Estudos futuros serão necessários para trazer essas respostas.

5.9 Diferenciação genética da DCF tipo IIa e IIb

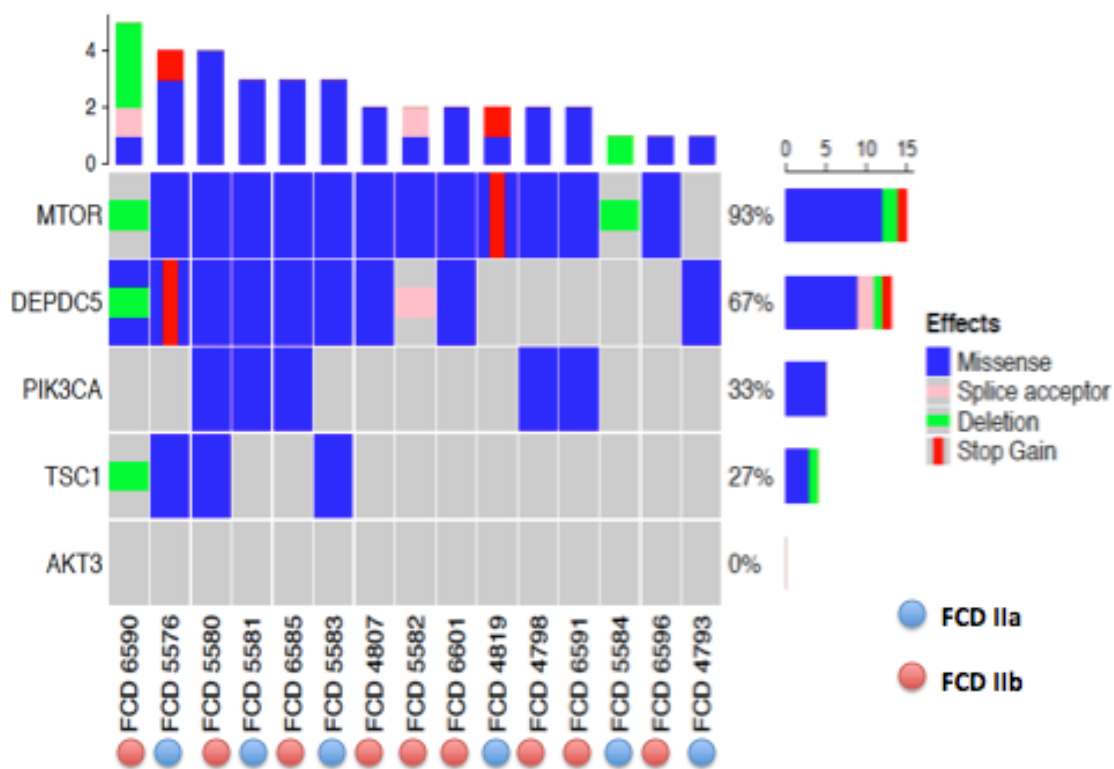
Dos sete pacientes com diagnóstico histopatológico de DCF tipo IIa, quatro (57,1%) alcançaram Engel 1 e três (42,9%) Engel 3, ao passo que dos 11 pacientes com diagnóstico histopatológico de DCF tipo IIb, nove (81,8%) atingiram Engel 1, um paciente (9,1%) alcançou Engel 2 e um (9,1%) Engel 3. Tais dados mostram tendência a melhor desfecho pós-operatório na DCF tipo IIb, contudo não são por si só conclusivos devido ao pequeno tamanho da amostra.

Geneticamente, levando-se em consideração os genes da via mTOR, já descritos previamente, não houve exclusividade da presença de mutação ou do tipo de mutação em nenhum deles no que diz respeito aos subgrupos de DCF tipo IIa e IIb, como mostra o gráfico 31. De todos, o que mostrou distribuição mais desigual entre os dois subtipos foi o PIK3CA, que dentre os cinco pacientes com mutação, quatro (80%) eram DCF tipo IIb.

Até onde se tem conhecimento, não há nenhuma descrição na literatura quanto a diferenças genéticas claras entre os subtipos IIa e IIb de DCF tipo II. Não se evidenciou também, na presente amostra, nenhuma alteração genética capaz de diferenciar os subtipos IIa e IIb de DCF tipo II. Tal fato levanta a questão quanto a

real diferença entre os dois subtipos, haja vista que a presença ou não de célula em balão pode se justificar apenas pela representatividade da amostra enviada para análise histopatológica.

Gráfico 31 - Gráfico EpiPrint demonstrando a prevalência de mutações, após a aplicação dos filtros de patogenicidade, bem como o efeito das mutações encontradas em genes da via mTOR nas amostras com diagnóstico de displasia cortical focal tipo II e submetidas à pesquisa genética incluindo as três metodologias utilizadas no estudo: Amplicon, Ampliseq e WES. Há ainda a especificação de cada amostra analisada quanto ao subtipo específico da displasia cortical focal tipo IIa ou IIb



6. Conclusões

As DCFs tipo II são secundárias a alterações pós-migratórias do desenvolvimento cortical e resultam de alterações genéticas, habitualmente somáticas, que tendem a ocorrer em período mais tardio do desenvolvimento cortical.

Vários são os genes que se encontram mutados nas crianças com DCF tipo II, dos quais se destacaram no presente estudo o MTOR, DEPDC5, PIK3CA e TSC1, pertencentes à via mTOR, além dos genes GPAT2, ARMCX4 e BAGE2.BAGE3.

Missense foi, de longe, o tipo de mutação mais encontrada, sendo também identificadas mutações do tipo *stop gain*, *splicing*, *inframe* e *frameshift*.

A via mTOR é a principal responsável pela gênese da DCF tipo II, com ocorrência de mutações em genes dessa via, nesses pacientes, ainda maior do que previamente descrito na literatura, como demonstrado pelo presente estudo. O papel de outras vias, ainda que já descrito, segue dependente de outros estudos que possam reafirmar e confirmar a sua real participação como mecanismos independentes ou apenas correlacionados à própria via mTOR.

A diferenciação entre a DCF tipo IIa e IIb, ainda que bem definida do ponto de vista histopatológico, não se mostrou evidente do ponto de vista genético e molecular, não sendo observada diferença do perfil de mutações entre os pacientes com diagnóstico de DCF tipo IIa e IIb neste estudo.

A correlação entre as mutações presentes e as características clínicas, epidemiológicas e o desfecho clínico ainda depende de maior aplicabilidade das ferramentas para pesquisa genética na prática clínica diária, o que viabilizaria uma avaliação em maior escala dos pacientes com DCF tipo II. A adequada seleção da metodologia para pesquisa genética também é fator primordial no estudo das mutações nesses pacientes, seja para fins de aplicação clínica ou de pesquisa acadêmica.

7. Referências Bibliográficas¹

¹Elaboradas de acordo com as Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses da USP: Documento Eletrônico e Impresso - Parte I (ABNT) 4ª ed. São Paulo: SIBi/USP, 2020.

ADACHI, T. *et al.* Cowden syndrome with a novel PTEN mutation presenting with partial epilepsy related to focal cortical dysplasia. **Intern Med**, v. 57, n. 1, p. 97-9, 2018.

AVANSINI, S.H. *et al.* Dysregulation of NEUROG2 plays a key role in focal cortical dysplasia. **Ann Neurol**, v. 83, n. 3, p. 623-35, 2018.

BALDASSARI, S. *et al.* Dissecting the genetic basis of focal cortical dysplasia: a large cohort study. **Acta Neuropathol**, n. 138, n. 6, p. 885-900. 2019.

BAMIKOLE, O. J. *et al.* Genetics of epilepsy. **J Neurol Neurophysiol**, v. 10, p. 3, 2019.

BARKOVICH, A. J.; GRESSENS, P.; EVRARD, P. Formation, maturation, and disorders of brain neocortex. **AJNR**, v. 13, n. 2, p. 423-46, 1992.

BARKOVICH, A. J. *et al.* A Classification scheme for malformations of cortical development. **Neuropediatrics**, v. 27, n. 2, p. 59-63, 1996.

BARKOVICH, A. J. *et al.* Focal transmantle dysplasia: A specific malformation of cortical development. **Neurology**, v. 49, n. 4, p. 1148-52, 1997.

BARKOVICH, A. J. *et al.* developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. **Brain**, v. 135, n. 5, p. 1348-69, 2012.

BAST, T. *et al.* Focal cortical dysplasia: prevalence, clinical presentation and epilepsy in children and adults. **Acta Neurol Scand**, v. 113, n. 2, p. 72-81, 2006.

BIELAS, S. *et al.* Cortical neuronal migration mutants suggest separate but intersecting pathways. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 20, p. 593-618, 2004.

BJELLVI, J. *et al.* Epilepsy duration and seizure outcome in epilepsy surgery - A systematic review and meta-analysis. **Neurology**, v. 93, n. 2, p. 159-66, 2019.

BLÜMCKE, I. *et al.* The clinic-pathological spectrum of focal cortical dysplasias: A consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. **Epilepsia**, v. 52, n. 1, p. 158-74, 2011.

BLÜMCKE, I. *et al.* Toward a better definition of focal cortical dysplasia: An iterative histopathological and genetic agreement trial. **Epilepsia**, v. 62, n. 6, p. 1416-28, 2021.

BLUME, W. T. *et al.* Indices of resective surgery effectiveness for intractable nonlesional focal epilepsy. **Epilepsia**, v. 45, n. 1, p. 46-53, 2004.

BRODIE, M. J. *et al.* Patterns of treatment response in newly diagnosed epilepsy. **Neurology**, v. 78, n. 20, p. 1548-54, 2012.

BYSTRON, I.; BLAKEMORE, C.; RAKIC, P. Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 2, p. 110-22, 2008.

CARTER, S. L. *et al.* Absolute quantification of somatic DNA alterations in human cancer. **Nat Biotechnol**, v. 30, p. 413-21, 2012.

CHANG, Y. S. *et al.* Identification of novel mutations in endometrial cancer patients by whole-exome sequencing. **Int J Oncol**, v. 50, n. 5, p. 1778-84, 2017.

COLOMBO, N. *et al.* Imaging of malformations of cortical development. **Epileptic Disord**, v. 11, n. 3, p. 194-205, 2009.

CRINO, P. B. Focal cortical dysplasia. **Semin Neurol**, v. 35, n. 3, p. 201-8, 2015a.

CRINO, P. B. mTOR signaling in epilepsy: Insights from malformations of cortical development. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 5, n. 4, p. a022442, 2015b.

dePRISTO, M. A. *et al.* A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. **Nat Genet**, v. 43, n. 5, p. 491-8, 2011.

DESIKAN, R. S.; BARKOVICH, A. J. Malformations of cortical development. **Ann Neurol**, v. 80, n. 6, p. 797-810, 2016.

ENSEMBL BLOG. **Ensembl Variation - Calculated variant consequences**. Disponível em: https://www.ensembl.org/info/genome/variation/prediction/predicted_data.html#consequences. Acesso em: 19 jul. 2018.

EVRONY, G. D. *et al.* Single-neuron sequencing analysis of L1 retrotransposition and somatic mutation in the human brain. **Cell**, v. 151, n. 3, p. 483-96, 2012.

FAUSER, S. *et al.* Focal cortical dysplasias: 67 patients in relation to histological subtypes and dual pathology. **Brain**, v. 127, Pt 11, p. 2406-18, 2004.

FAUSER, S.; SCHULZE-BONHAGE, A. Epileptogenicity of cortical dysplasia in temporal lobe dual pathology: an electrophysiological study with invasive recordings. **Brain**, v. 129, n. 1, p. 82-95, 2006.

FAUSER, S. *et al.* Long-term seizure outcome in 211 patients with focal cortical dysplasia. **Epilepsia**, v. 56, n. 1, p. 66-76, 2015.

FISHER, R. S. *et al.* A practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475-82, 2014.

FISHER, R. S. The new classification of seizures by the international league against epilepsy. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 17, n. 6, p. 48, 2017.

FISHER, R. S. *et al.* Operational classification of seizures types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 522-30, 2017.

FOX, J.; ANDERSEN, R. **Using the R statistical computing environment to teach social statistics courses.** 2005. Disponível em: <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Teaching-with-R.pdf>. Acessado em: 28 jul. 2018.

GARCIA, C. A. B. *et al.* mTOR pathway somatic variants and the molecular pathogenesis of hemimegalencephaly. **Epilepsia Open**, v. 5, n. 1, p. 97-106, 2020.

GENECARDS.ORG. **The human gene database.** Disponível em: <https://www.genecards.org>. Acesso em: 22 jul. 2018.

GOTZ, M.; SOMMER, L. Cortical development: the art of generating cell diversity. **Development**, v. 132, n. 15, p. 3327-32, 2005.

GUERRINI, R.; DOBYNS, W. B. Malformations of cortical development: clinical features and genetic causes. **Lancet Neurol**, v. 13, n. 7, p. 710-26, 2014.

GUERRINI, R.; PARRINI, E. Malformations of Cortical Development (MCD): Genetic aspects. **Epileptologie**, v. 32, p. 129-38, 2015.

IFFLAND II, P. H.; CRINO, P. B. Focal Cortical Dysplasia: Gene Mutations, Cell Signaling, and Therapeutic Implications. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v.12, p. 547-71. 2017.

IILUMINA.COM. Disponível em: https://www.afternic.com/forsale/ilumina.com?utm_source=TDFS&utm_medium=sn_affiliate_click&utm_campaign=TDFS_GoDaddy_DLS&traffic_type=TDFS&traffic_id=GoDaddy_DLS. Acessado em 29 mai. 2022.

JANSEN, L.A. *et al.* PIK3/AKT pathway mutations cause a spectrum of brain malformations from megalencephaly to focal cortical dysplasia. **BRAIN**, v. 138, Pt 6, p. 1613-28, 2015.

JESUS-RIBEIRO, J. *et al.* Genomic and epigenetic advances in cortical focal dysplasia types I and II: A scoping review. **Front Neurosci**, v. 14, p. 580357, 2021.

JETTÉ, N.; REID, A. Y.; WIEBE, S. Surgical management of epilepsy. **CMAJ**, v. 186, n. 13, p. 997-1004, 2014.

JETTÉ, N.; SANDRE, J. W.; KEEZER, M. R.; Surgical treatment for epilepsy: the potential gap between evidence and practice. **Lancet Neurol**, v. 15, n. 9, p. 982-94, 2016.

JIN, B. *et al.* A longitudinal study of surgical outcome of pharmaco-resistant epilepsy

caused by focal cortical dysplasia. **J Neurol**, v. 263, n. 12, p. 2403-10, 2016.

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

KWAN, P. *et al.* Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. **Epilepsia**, v. 51, n. 6, p. 1069-77, 2010.

LEE, H. J. *et al.* Glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 upregulation by O-GlcNAcylation of Sp1 protects against hypoxia-induced mouse embryonic stem cell apoptosis via mTOR activation. **Cell Death Dis**, v. 7, n. 3, p. e2158, 2016.

LEE, J. H. *et al.* De novo somatic mutations in componentes of the PIK3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly. **Nat Genet**, v. 44, n. 8, p. 941-5, 2012.

LEK, M. *et al.* Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. **Nature**, v. 536, n. 7616, p. 285-91, 2016.

LEVENTER, R. J.; GUERRINI, R.; DOBYNS, W.B. Malformations of cortical development and epilepsy. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 10, n. 1, p. 47-62, 2008.

LIM, J.S.; *et al.* Brain somatic mutations in MTOR cause focal cortical dysplasia type II leading to intractable epilepsy. **Nat Med**, v. 21, n. 4, p. 395-400, 2015.

MARSAN, E.; BAULAC, S. Review: Mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway, focal cortical dysplasia and epilepsy. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 44, n. 1, p. 6-17, 2018.

MAYNARD, L. M. *et al.* Epilepsy prevalence and severity predictors in MRI-identified focal cortical dysplasia, **Epilepsy Res**, v. 132, p. 41-9, 2017.

McLAREN, W. *et al.* The ensembl variant effect predictor. **Genome Biol**, v. 17, n. 1, p. 122, 2016.

MIRZAA, G. M. *et al.* Wide spectrum of developmental brain disorders from megalencephaly to focal cortical dysplasia and pigmentary mosaicism caused by mutations of MTOR. **JAMA Neurol**, v. 73, n. 7, p. 836-45, 2016.

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

NAKASHIMA, M. *et al.* Somatic mutations in the MTOR gene cause focal cortical dysplasia type IIb. **Ann Neurol**, v. 78, n. 3, p. 375-86, 2015.

OMIM.ORG. **Omin human genetics knowledge for the world.** Online Mendelian Inheritance in Man. Disponível em: <https://www.omim.org>. Acesso em: 22 jul. 2018.

ORPHANET. **O portal sobre doenças raras e medicamentos órfãos**. Disponível em: <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>. Acesso em: 22 jul. 2018.

ORTIZ-GONZÁLEZ, X. R. *et al.* Focal cortical dysplasia is more common in boys than girls. **Epilepsy Behav**, v. 27, n. 1, p. 121-3, 2013.

PANAYIOTOPOULOS, C. P. A clinical guide to epileptic syndromes and their treatment. 2nd ed., Springer, 2010, 578p.

PARRINI, E. *et al.* Genetic basis of brain malformations. **Mol Syndromol**, v. 7, n. 4, p. 220-33, 2016.

PETRIK, S. *et al.* Epilepsy surgery: Late seizure recurrence after initial complete seizure freedom. **Epilepsia**, v. 62, n. 5, p. 1092-104, 2021.

PODURI, A. When should genetic testing be performed in epilepsy patients?. **Epilepsy Curr**, v. 17, n. 1, p. 16-22, 2017.

RICE, G. B.; WADHWANI, N. R. PI3K/AKT pathway and brain malformations. **Pediatr Neurol Briefs**, v. 29, n. 7, p. 52, 2015.

ROSSINI, L. *et al.* FCD Type II and mTOR pathway: evidence for different mechanisms involved in the pathogenesis of dysmorphic neurons. **Epilepsy Res**, v. 129, p. 146-56, 2017.

SALEMDAWOD, A. *et al.* Predictors of postoperative long-term seizure outcome in pediatric patients with focal cortical dysplasia type II at a German tertiary epilepsy center. **J Neurosurg Pediatr**, v. 29, n. 1, p. 83-91, 2021.

SANDS, T. T.; CHOI, H. Genetic testing in pediatric epilepsy. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 17, n. 5, p. 45, 2017.

SARNAT, H. B. *et al.* Timing in neural maturation: arrest, delay, precociousness, and temporal determination of malformations. **Pediatr Neurol**, v. 52, n. 5, p. 473-86, 2015.

SAUNDERS, C. T. *et al.* Strelka: Accurate somatic small-variant calling from sequenced tumor-normal sample pairs. **Bioinformatics**, v. 28, n. 14, p. 1811-7, 2012.

SCHEFFER, I. E. *et al.* ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 512-21, 2017.

SIM, J. C. *et al.* Familial cortical dysplasia caused by mutation in the mammalian target of rapamycin regulator NPRL3. **Ann Neurol**, v. 79, n. 1, p. 132-7, 2016.

SMITH, T.; HEGER, A. Umi-tools: Modeling sequencing errors in unique molecular identifiers to improve quantification accuracy. **Genome Res**, v. 27, n. 3, p. 491-9, 2017.

SQUIER, W.; JANSEN, A. Abnormal development of the human cerebral cortex. **J Anat**, v. 217, n. 4, p. 312-23, 2010.

STRING-DB.ORG. **Protein-protein interaction networks functional enrichment analysis**. Disponível em: <https://string-db.org/>. Acesso em: 22 jul. 2018.

STROM, S. P. Current practices and guidelines for clinical next-generation sequencing oncology testing, **Cancer Biol Med**, v. 13, n. 1, p. 3-11, 2016.

TAYLOR, D. C. *et al.* Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 34, n. 4, p. 369-87, 1971.

TERRONE, G. *et al.* De novo PIK3R2 variant causes, polymicrogyria, corpus callosum hyperplasia and focal cortical dysplasia. **Eur J Hum Genet**, v. 24, n. 9, p. 1359-62, 2016.

TRIPATHI, M.; RAY, S.; CHANDRA, P. S. Presurgical evaluation for drug refractory epilepsy. **Int J Surg**, v. 36, Pt B, p. 405-10, 2016.

WECKHUUSEN, S. *et al.* Involvement of GATOR complex genes in familial focal epilepsies and focal cortical dysplasia. **Epilepsia**, v. 57, n. 6, p. 994-1003, 2016.

8. Anexos

ANEXO A - MALFORMAÇÕES DO DESENVOLVIMENTO CORTICAL

Malformations of cortical development

I. Malformations due to abnormal neuronal and glial proliferation

A. Generalized

- 1) ↓ Proliferation – Microlissencephaly
 - a) Thin cortex
 - b) NL cortex
- 2) ↑ Proliferation – *none known*
- 3) Abnormal proliferation (abnormal cell types)

none known – probably not compatible with survival

B. Focal or multifocal

- 1) ↓ Proliferation – *none known*
- 2) ↑ Proliferation – *none known*
- 3) Abnormal proliferation (abnormal cell types)
 - a) Non-neoplastic:
 - i) Tuberosus sclerosis, Types 1 and 2
 - ii) Focal cortical dysplasia with balloon cells
 - iii) Hemimegalencephaly
 - a) Isolated
 - b) In neurocutaneous syndromes
 - i) Epidermal nevus syndrome
 - ii) Hypomelanosis of *Itô*
 - iii) Neurofibromatosis Type 1
 - iv) Focal transmantle dysplasia
 - b) Neoplastic (associated with disordered cortex)
 - i) DNET
 - ii) Ganglioglioma
 - iii) Gangliocytoma

II. Malformations due to abnormal neuronal migration

A. Generalized

- 1) Classical (Type 1) lissencephaly (agyria-pachygyria spectrum)
 - a) Chromosome 17-linked
 - i) *Miller-Dieker* syndrome†
 - ii) Isolated lissencephaly sequencet
 - b) X-linked
 - i) X-linked lissencephaly††
 - ii) Subcortical band heterotopiat†
 - c) Other loci
 - i) isolated lissencephaly sequence
 - ii) Other syndromes
- 2) Cobblestone (Type 2) lissencephalies
 - a) *Fukuyama* congenital muscular dystrophy
 - b) *Walker-Warburg* syndrome*
 - c) *Muscle-eye brain disease**
- 3) Lissencephaly – not otherwise classified
- 4) Heterotopia

- a) Subependymal
 - i) X-linked (bilateral periventricular nodular heterotopia)
 - ii) Sporadic
- b) Subcortical
- c) Cortical infoldings (symmetric)
- d) Marginal glioneuronal heterotopia

B. Focal or multifocal malformations in neuronal migration

- 1) Focal agyria/pachygyria (partial lissencephaly)
 - a) Bilateral posterior pachygyria
 - b) Bilateral parietal pachygyria
- 2) Focal or multifocal heterotopia
 - a) Focal subependymal nodular
 - b) Focal subcortical nodular
 - c) Focal mixed subcortical/subependymal
 - d) Cortical infoldings (unilateral)
 - e) Marginal glioneuronal heterotopia
 - i) Fetal alcohol syndrome
 - ii) Other
- 3) Focal or multifocal heterotopia with organizational abnormality of the cortex
 - a) Focal subependymal nodular
 - b) Focal subcortical nodular
 - c) Focal mixed subcortical/subependymal
 - i) *Aicardi* syndrome
 - ii) Peroxisomal disorders
 - iii) Multiple acyl CoA dehydrogenase deficiency
 - d) Cortical infoldings (unilateral or asymmetric)
 - e) Marginal glioneuronal heterotopia
- 4) Excessive single ectopic white matter neurons

III. Malformations due to abnormal cortical organization

A. Generalized

- 1) Polymicrogyria (PMG)

B. Focal or multifocal

- 1) Polymicrogyria/schizencephaly
 - a) Bilateral symmetric polymicrogyria
 - i) Bilateral anterior PMG
 - ii) Bilateral perisylvian PMG
 - iii) Bilateral posterior PMG
 - b) Asymmetric PMG
 - c) Schizencephaly and mixed schizencephaly/PMG
- 2) Focal or multifocal cortical dysplasia without balloon cells
- 3) Microdysgenesis

IV. Malformations of cortical development, not otherwise classified

†, ††, * Allelic or possibly allelic

Fonte: Adaptado de Barkovich *et al.* (1996).

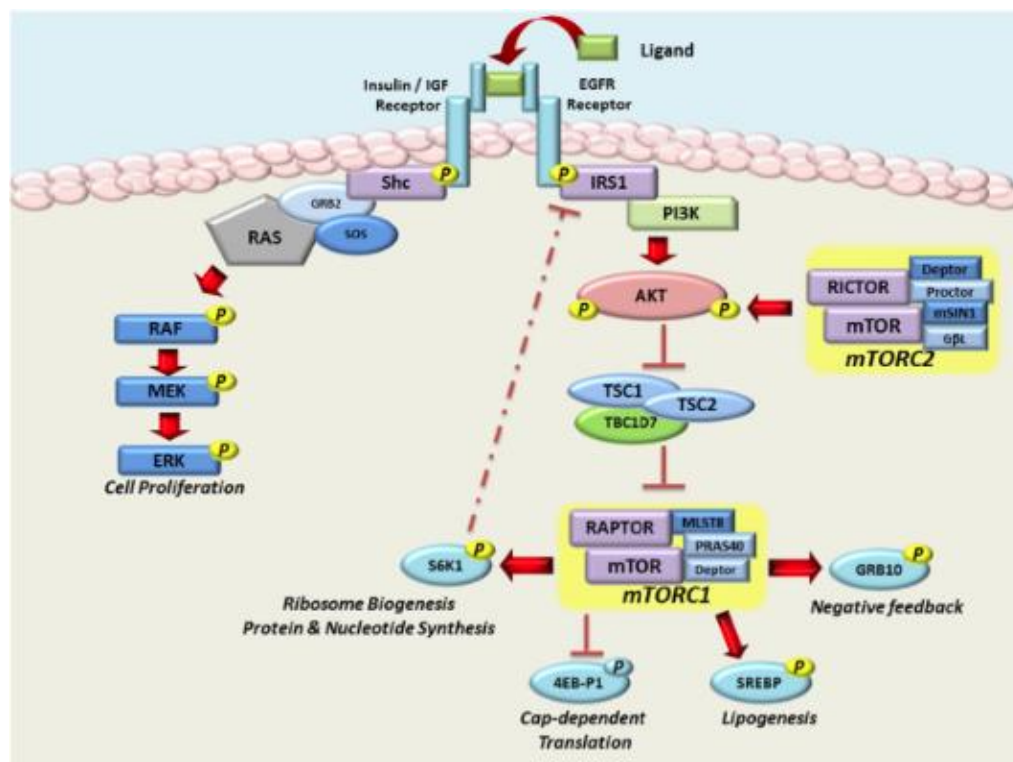
ANEXO B - CLASSIFICAÇÃO DAS DISPLASIAS CORTICAIS FOCAIS

FCD Type I (isolated)	Focal Cortical Dysplasia with abnormal radial cortical lamination (FCD Ia)	Focal Cortical Dysplasia with abnormal tangential cortical lamination (FCD Ib)		Focal Cortical Dysplasia with abnormal radial and tangential cortical lamination (FCD Ic)
FCD Type II (isolated)	Focal Cortical Dysplasia with dysmorphic neurons (FCD IIa)		Focal Cortical Dysplasia with dysmorphic neurons and balloon cells (FCD IIb)	
FCD Type III (associated with principal lesion)	Cortical lamination abnormalities in the temporal lobe associated with hippocampal sclerosis (FCD IIIa)	Cortical lamination abnormalities adjacent to a glial or glio-neuronal tumor (FCD IIIb)	Cortical lamination abnormalities adjacent to vascular malformation (FCD IIIc)	Cortical lamination abnormalities adjacent to any other lesion acquired during early life, e.g., trauma, ischemic injury, encephalitis (FCD IIId)

FCD Type III (not otherwise specified, NOS): if clinically/radiologically suspected principal lesion is not available for microscopic inspection

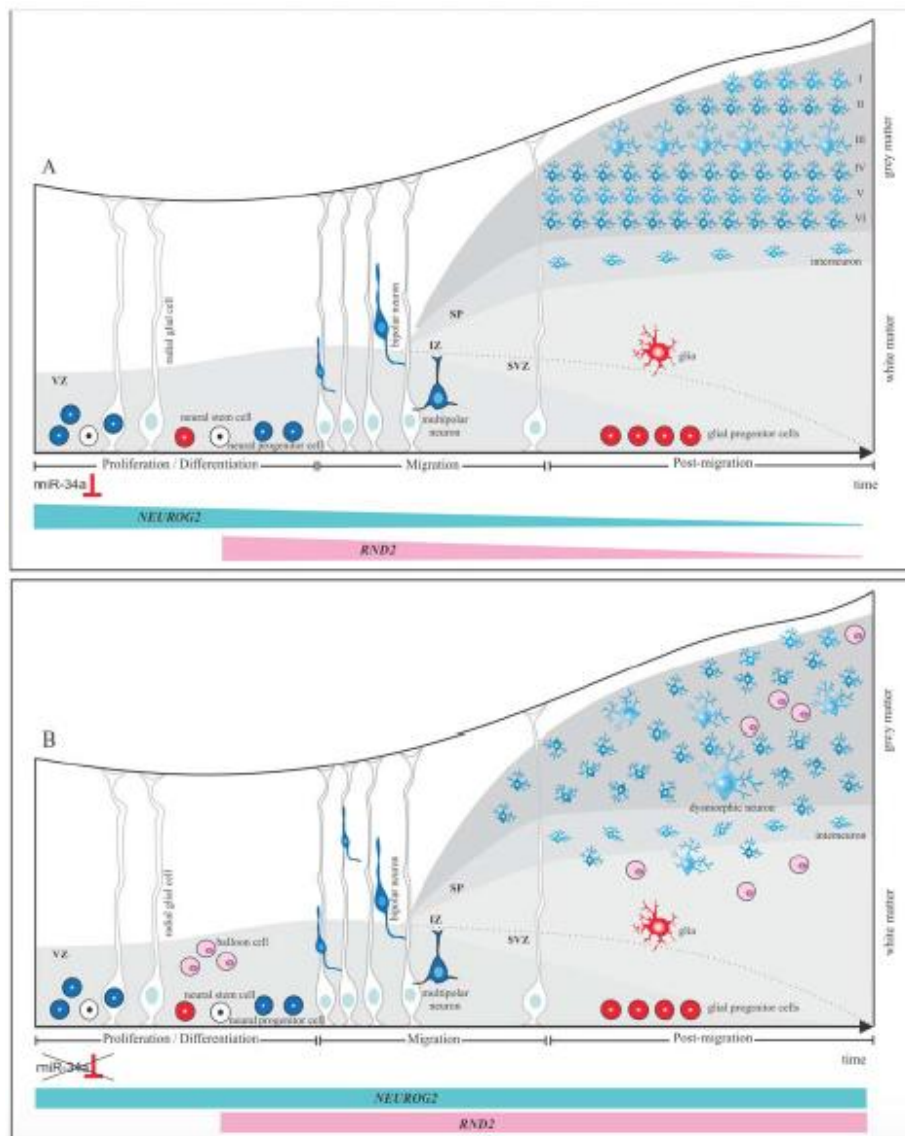
Fonte: Adaptado de Blümcke *et al.* (2011).

ANEXO C - ESQUEMATIZAÇÃO DA VIA mTOR



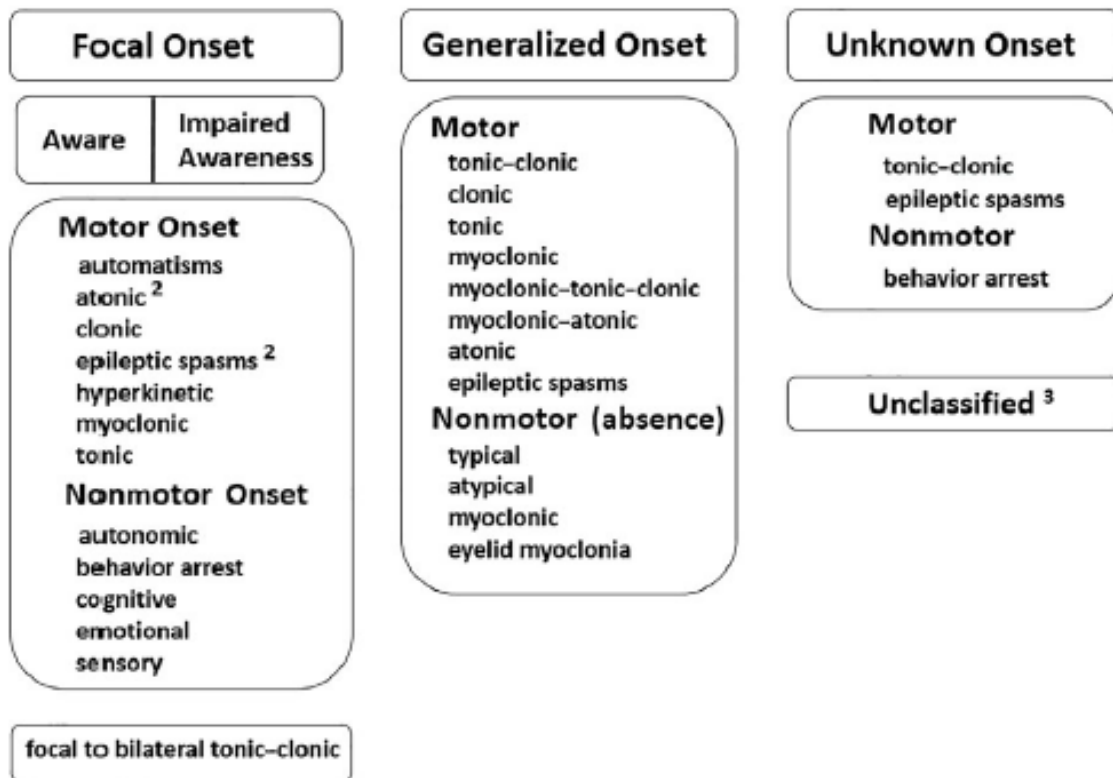
Fonte: Adaptado de Garcia *et al.* (2020).

ANEXO D - ESQUEMA DE DESENVOLVIMENTO CORTICAL NORMAL E DESENVOLVIMENTO CORTICAL DESORGANIZADO E COM NEURÔNIOS DISMÓRFICOS EM FUNÇÃO DA NÃO INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DOS GENES *NEUROG2* e *RND2*



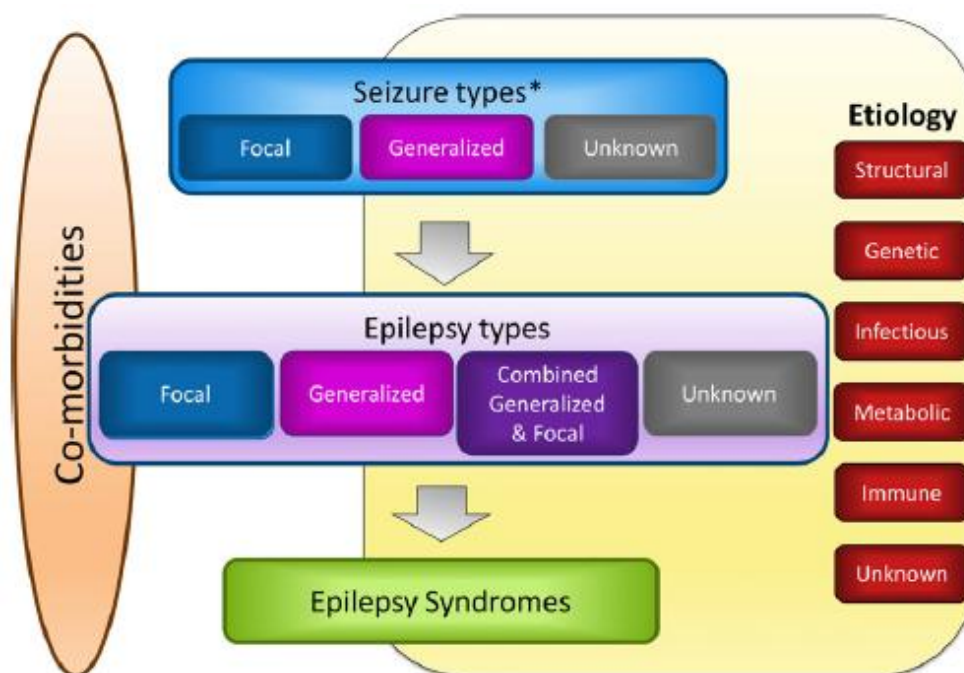
Fonte: Adaptado de Avansini *et al.* (2018)

ANEXO E - CLASSIFICAÇÃO DAS CRISES EPILÉPTICAS - ILAE 2017



Fonte: Adaptado de Fisher *et al.* (2017)

ANEXO F- CLASSIFICAÇÃO DAS EPILEPSIAS



Fonte: Adaptado de Scheffer *et al.* (2017).

ANEXO A - COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



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



Ofício nº 915/2018
CEP/MGV

Ribeirão Preto, 05 de abril de 2018.

Processo HCRP nº 1810/2018

Prezado Pesquisador,

O trabalho intitulado “**MAPEAMENTO GENÉTICO DAS DISPLASIAS CORTICAIS FOCAIS TIPO II NAS EPILEPSIAS TRATADAS CIRURGICAMENTE**” – **Projeto de Pesquisa Versão 2 – 19/03/2018**, foi analisado “AD REFERENDUM” pelo Comitê de Ética em Pesquisa e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 2 – 19/03/2018.

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

Ilustríssimo Senhor
THIAGO LYRIO TEIXEIRA
Depto. de Cirurgia e Anatomia

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro PE/CONEP nº 5440
(16)3602-2228/cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

9. Apêndices

APÊNDICE A - TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO (Para pacientes de 0-7 anos)

Título da pesquisa: Mapeamento genético das displasias corticais focais tipo II nas epilepsias tratadas cirurgicamente

Pesquisadores responsáveis:

Thiago Lyrio Teixeira - (27)99909-2153 / thiagolteixeira@hotmail.com

Prof. Dr. Hélio Rubens Machado - (16) 98162-5523 / hrmachad@gmail.com

O(a) filho do(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte deste estudo, assine ao final deste documento em duas vias. Caso o(a) senhor(a) não aceite que ele(a) participe da pesquisa, não será penalizado(a) de forma alguma e seu atendimento e tratamento não serão prejudicados na Instituição.

O objetivo da pesquisa é buscar uma melhor compreensão das características genéticas das displasias corticais focais tipo II, uma das principais causas de epilepsia em crianças, bem como entender como elas se relacionam com as características clínicas e com o prognóstico para, dessa forma, buscar desenvolver e melhorar as formas de tratamento e abordagem dessa enfermidade.

Caso concorde em participar, o (a) filho (a) do(a) senhor(a) deverá, no dia da cirurgia e apenas após a anestesia geral, submeter-se a uma coleta de amostra de sangue (de mais ou menos 3 colheres de chá) ou uma amostra de saliva da sua boca, bem como separaremos um pedaço do cérebro (mais ou menos do tamanho de uma cabeça de cotonete) que for retirado por causar a crise convulsiva (essa parte seria retirada independente do estudo, pois é parte do tratamento com cirurgia) e vamos enviá-los para o laboratório onde serão realizadas as análises da pesquisa. Essa coleta não fugirá ao procedimento cirúrgico ou pós-operatório habitual e nem tampouco irá prejudicar ou atrasar o tratamento em curso.

Os riscos ou desconfortos da pesquisa são mínimos, uma vez que os procedimentos adotados já o seriam feitos como parte do tratamento cirúrgico indicado. Dentre eles, devemos mencionar que a coleta do sangue pode doer um pouco ou gerar desconforto e

contusão no local da picada o que habitualmente passa em poucos minutos. Se ainda assim houver algum problema, faremos o atendimento médico. Há uma chance de que a participação neste estudo possa trazer algum estresse psicológico, já que algumas pessoas envolvidas em estudos ou familiares podem sentir-se ansiosos sobre a possibilidade de possuírem algum problema. Se estas sensações surgirem em qualquer momento do estudo, você poderá entrar em contato conosco e nós providenciaremos auxílio e encaminhamento para aconselhamento.

Cabe lembrar que esse estudo não tem propósito terapêutico imediato, e sim a médio e longo prazo. Os benefícios esperados da pesquisa são a melhor caracterização genética das displasias corticais focais tipo II e, a partir disso, obter ferramentas e dados para melhor entender a patologia e assim desenvolver melhores opções terapêuticas clínicas e cirúrgicas, bem como de aconselhamento e seguimento.

A participação do(a) seu(a) filho(a) nesta pesquisa é voluntária e o(a) senhor(a) tem liberdade de deixar de participar do estudo a qualquer momento, bastando apenas avisar algum dos pesquisadores. Além disso, caso não aceite participar o seu atendimento e tratamento no Hospital será exatamente o mesmo, sem nenhum prejuízo.

Será mantido sigilo absoluto dos dados obtidos individualmente neste estudo, para assegurar a privacidade dos participantes. Caso o(a) senhor(a) se sinta prejudicado em participar desta pesquisa, o(a) senhor(a) poderá buscar indenização de acordo com as normas vigentes no país.

Os pesquisadores estarão disponíveis para qualquer dúvida a qualquer momento durante o estudo e o sr.(a) tem a garantia de acesso aos resultados da pesquisa.

Caso tenha dúvidas sobre aspectos éticos desta pesquisa o(a) senhor(a) também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é composto por um grupo de pessoas que são responsáveis por supervisionam pesquisas em seres humanos que estão feitos na instituição e tem a função de proteger e garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos os participantes de pesquisa que se voluntariam a participar de um a pesquisa. O CEP do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto fica no subsolo do hospital e funciona das 8:00 às 17:00, o telefone de contato é (16) 3602-2228.

Esta pesquisa está vinculada ao biorrepositório denominado “Biorepósito de tecidos cerebrais” criado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP com o objetivo de guardar amostras de cérebro e sangue de pacientes afetados pela epilepsia e, assim, viabilizar os estudos genômicos que serão

desenvolvidos no Centro de Medicina Genômica nessa pesquisa e, também, para tantas outras que poderão advir das mesmas amostras devidamente armazenadas. Gostaríamos de convidá-lo (a) a autorizar a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do material biológico humano de cérebro e sangue de seu filho(a) para fins de pesquisa e análise científica.

Este material será coletado durante o procedimento cirúrgico programado como tratamento para controle da epilepsia, a ser realizado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto-SP. Após coletado será guardado em biorrepositório do mesmo hospital e também no Centro de Medicina Genômica localizado em prédio anexo, no Campus Universitário (Telefone 16 3602-1000), Avenida Bandeirantes, 3900, onde as amostras serão armazenadas por dez anos. Os pesquisadores responsáveis pela equipe se comprometem a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a amostra do cérebro e sangue será identificada por meio de etiqueta com nome completo e número de registro do prontuário eletrônico.

A participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que a amostra de seu filho(a) seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. O (A) Sr. (a) também tem o direito de retirar seu consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado a qualquer momento. Será esclarecido(a) em qualquer aspecto que desejar e os pesquisadores estarão sempre disponíveis, antes, durante ou depois, para tirar todas as dúvidas. Não haverá nenhum custo ao participante e nem tampouco ajuda financeira ao mesmo.

Solicitamos também os dados de contato do(a) senhor(a), para que seja possível encontrá-lo(a) posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse. Também solicitaremos sua autorização, se necessário, para o descarte do material armazenado caso o mesmo mostre-se inadequado ou insuficiente para adequada análise biológica.

Declaramos para os devidos fins que a cada a nova pesquisa o Sr.(a) será contatado para a utilização do material biológico armazenado neste biorrepositório, e também a nova pesquisa será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Solicitamos seus dados de contato e sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de participação. Também afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada e rubricada, será entregue ao senhor (a).

Dados do participante:

Nome: _____, RG: _____,
 Endereço: _____, nº _____,
 Bairro _____, cidade _____, telefone _____

Abaixo também seguem os dados de contato do pesquisador responsável, caso o(a) senhor(a) tenha alguma dúvida posteriormente.

Nome do participante: _____

Assinatura: _____ **data:** _____

Nome do pesquisador: Thiago Lyrio Teixeira

Contato (16) 3602-2592 / (27) 99909-2153/ (16) 98232-8888 **/Email:**
 thiagolteixeira@hotmail.com

Assinatura: _____ **data:** _____

Dados do responsável legal ou testemunha (caso aplicável):

Nome legível: _____

Assinatura: _____ data: _____

Pesquisador _____

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA GUARDA DE
MATERIAL BIOLÓGICO (Para pacientes de 7-15 anos)**

Título da pesquisa: Mapeamento genético das displasias corticais focais tipo II nas epilepsias tratadas cirurgicamente

Pesquisadores responsáveis:

Thiago Lyrio Teixeira - (27)99909-2153 / thiagolteixeira@hotmail.com

Prof. Dr. Hélio Rubens Machado - (16) 98162-5523 / hrmachad@gmail.com

O(a) filho do(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte deste estudo, assine ao final deste documento em duas vias. Caso o(a) senhor(a) não aceite que ele(a) participe da pesquisa, não será penalizado(a) de forma alguma e seu atendimento e tratamento não serão prejudicados na Instituição.

O objetivo da pesquisa é buscar uma melhor compreensão das características genéticas das displasias corticais focais tipo II, uma das principais causas de epilepsia em crianças, bem como entender como elas se relacionam com as características clínicas e com o prognóstico para, dessa forma, buscar desenvolver e melhorar as formas de tratamento e abordagem dessa enfermidade.

Caso concorde em participar, o (a) filho (a) do(a) senhor(a) deverá, no dia da cirurgia e apenas após a anestesia geral, submeter-se a uma coleta de amostra de sangue (de mais ou menos 3 colheres de chá) ou uma amostra de saliva da sua boca, bem como separaremos um pedaço do cérebro (mais ou menos do tamanho de uma cabeça de cotonete) que for retirado por causar a crise convulsiva (essa parte seria retirada independente do estudo, pois é parte do tratamento com cirurgia) e vamos enviá-los para o laboratório onde serão realizadas as análises da pesquisa. Essa coleta não fugirá ao procedimento cirúrgico ou pós-operatório habitual e nem tampouco irá prejudicar ou atrasar o tratamento em curso.

Os riscos ou desconfortos da pesquisa são mínimos, uma vez que os procedimentos adotados já o seriam feitos como parte do tratamento cirúrgico indicado. Dentre eles, devemos mencionar que a coleta do sangue pode doer um pouco ou gerar desconforto e contusão no local da picada o que habitualmente passa em poucos minutos. Se ainda assim houver algum problema, faremos o atendimento médico. Há uma chance de que a participação neste estudo possa trazer algum estresse psicológico, já que algumas pessoas envolvidas em estudos ou familiares podem sentir-se ansiosos sobre a possibilidade de

possuírem algum problema. Se estas sensações surgirem em qualquer momento do estudo, você poderá entrar em contato conosco e nós providenciaremos auxílio e encaminhamento para aconselhamento.

Cabe lembrar que esse estudo não tem propósito terapêutico imediato, e sim a médio e longo prazo. Os benefícios esperados da pesquisa são a melhor caracterização genética das displasias corticais focais tipo II e, a partir disso, obter ferramentas e dados para melhor entender a patologia e assim desenvolver melhores opções terapêuticas clínicas e cirúrgicas, bem como de aconselhamento e seguimento.

A participação do(a) seu(a) filho(a) nesta pesquisa é voluntária e o(a) senhor(a) tem liberdade de deixar de participar do estudo a qualquer momento, bastando apenas avisar algum dos pesquisadores. Além disso, caso não aceite participar o seu atendimento e tratamento no Hospital será exatamente o mesmo, sem nenhum prejuízo.

Será mantido sigilo absoluto dos dados obtidos individualmente neste estudo, para assegurar a privacidade dos participantes. Caso o(a) senhor(a) se sinta prejudicado em participar desta pesquisa, o(a) senhor(a) poderá buscar indenização de acordo com as normas vigentes no país.

Os pesquisadores estarão disponíveis para qualquer dúvida a qualquer momento durante o estudo e o sr.(a) tem a garantia de acesso aos resultados da pesquisa.

Caso tenha dúvidas sobre aspectos éticos desta pesquisa o(a) senhor(a) também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é composto por um grupo de pessoas que são responsáveis por supervisionam pesquisas em seres humanos que estão feitos na instituição e tem a função de proteger e garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos os participantes de pesquisa que se voluntariam a participar de um a pesquisa. O CEP do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto fica no subsolo do hospital e funciona das 8:00 às 17:00, o telefone de contato é (16) 3602-2228.

Esta pesquisa está vinculada ao biorrepositório denominado “Biorepósito de tecidos cerebrais” criado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP com o objetivo de guardar amostras de cérebro e sangue de pacientes afetados pela epilepsia e, assim, viabilizar os estudos genômicos que serão desenvolvidos no Centro de Medicina Genômica nessa pesquisa e, também, para tantas outras que poderão advir das mesmas amostras devidamente armazenadas. Gostaríamos de convidá-lo (a) a autorizar a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do

material biológico humano de cérebro e sangue de seu filho(a) para fins de pesquisa e análise científica.

Este material será coletado durante o procedimento cirúrgico programado como tratamento para controle da epilepsia, a ser realizado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto-SP. Após coletado será guardado em biorrepositório do mesmo hospital e também no Centro de Medicina Genômica localizado em prédio anexo, no Campus Universitário (Telefone 16 3602-1000), Avenida Bandeirantes, 3900, onde as amostras serão armazenadas por dez anos. Os pesquisadores responsáveis pela equipe se comprometem a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a amostra do cérebro e sangue será identificada por meio de etiqueta com nome completo e número de registro do prontuário eletrônico.

A participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que a amostra de seu filho(a) seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. O (A) Sr. (a) também tem o direito de retirar seu consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado a qualquer momento. Será esclarecido(a) em qualquer aspecto que desejar e os pesquisadores estarão sempre disponíveis, antes, durante ou depois, para tirar todas as dúvidas. Não haverá nenhum custo ao participante e nem tampouco ajuda financeira ao mesmo.

Solicitamos também os dados de contato do(a) senhor(a), para que seja possível encontrá-lo(a) posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse. Também solicitaremos sua autorização, se necessário, para o descarte do material armazenado caso o mesmo mostre-se inadequado ou insuficiente para adequada análise biológica.

Declaramos para os devidos fins que a cada a nova pesquisa o Sr.(a) será contatado para a utilização do material biológico armazenado neste biorrepositório, e também a nova pesquisa será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Solicitamos seus dados de contato e sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de participação. Também afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada e rubricada, será entregue ao senhor (a).

Dados do participante:

Nome: _____, RG: _____,
 Endereço: _____, nº _____,
 Bairro _____, cidade _____, telefone _____

Abaixo também seguem os dados de contato do pesquisador responsável, caso o(a) senhor(a) tenha alguma dúvida posteriormente.

Nome do participante: _____

Assinatura: _____ **data:** _____

Nome do pesquisador: Thiago Lyrio Teixeira

Contato (16) 3602-2592 / (27) 99909-2153/ (16) 98232-8888 **/Email:**
 thiagolteixeira@hotmail.com

Assinatura: _____ **data:** _____

Dados do responsável legal ou testemunha (caso aplicável):

Nome legível: _____

Assinatura: _____ data: _____

TERMO DE ASSENTIMENTO

Para pacientes de 7-15 anos

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) para participar da pesquisa chamada Mapeamento Genético das Displasias Corticais Focais Tipo II nas Epilepsias Tratadas Cirurgicamente. Neste estudo pretendemos entender melhor sobre a origem da sua doença.

O motivo que nos leva a estudar esse assunto é a necessidade de descobrir novas informações sobre como a doença acontece no seu corpo e assim conseguir melhores maneiras de tratar as convulsões. Analisando seus exames buscaremos entender melhor a influência genética nas epilepsias e descobrir melhor como tudo acontece e, assim, poder tentar controlar e evitar as convulsões em você e também em outras pessoas que têm os mesmos sintomas. Isso pode mudar e melhorar a vida de todos que têm as crises e também aqueles ao redor.

Para este estudo as crianças selecionadas terão entre 0 e 18 anos de idade e serão somente aquelas em que a cirurgia foi o tratamento escolhido para a epilepsia. A pesquisa será feita no Hospital das Clínicas de Ribeirão e, para isso, apenas depois que você já estiver anestesiada para a cirurgia, vamos coletar uma amostra de sangue (de mais ou menos 3 colheres de chá) ou uma amostra de saliva da sua boca, bem como iremos separar um pedaço do cérebro (mais ou menos do tamanho de uma cabeça de cotonete) que for retirado por causar a crise convulsiva (essa parte seria retirada independente do estudo, pois é parte do tratamento com cirurgia) e vamos enviá-los para o laboratório onde serão realizados os exames para descobrirmos como começou a doença.

Para participar deste estudo, o responsável por você (seu pai ou sua mãe ou seu responsável legal) deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. Você não terá nenhum custo, nem receberá nenhuma ajuda financeira. Você será esclarecido(a) em qualquer aspecto que desejar e estaremos sempre disponíveis, antes, durante ou depois, para tirar todas as suas dúvidas. Estará livre para participar ou recusar-se, e pode sair do estudo a qualquer momento se assim desejar. O responsável por você também poderá retirar sua participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e se você desejar não participar isso não vai trazer nenhuma desvantagem na forma que será atendido(a) pelo pesquisador e por todos aqueles envolvidos no seu tratamento. Sua identidade será mantida em segredo absoluto. Você não será identificado em nenhuma publicação.

Este estudo apresenta risco adicional mínimo, uma vez que vai utilizar material que já seria coletado para fins do tratamento cirúrgico. Dentre os riscos, a coleta do sangue pode doer um pouco, pode haver desconforto e contusão no local da picada e uma possível fraqueza, mas em alguns minutos isso deve passar. Se caso tiver com algum problema nós faremos o atendimento médico. Há uma chance de que a participação neste estudo cause estresse psicológico, já que algumas pessoas envolvidas em estudos podem sentir-se ansiosas sobre a possibilidade de possuírem algum problema. Se estas sensações surgirem em qualquer momento do estudo, você poderá entrar em contato conosco e nós providenciaremos auxílio e encaminhamento para aconselhamento.

Se você tiver alguma dúvida, você pode me perguntar ou conversar com o pesquisador Thiago Lyrio Teixeira. Eu escrevi os telefones no final do texto, você pode ligar a cobrar e a qualquer dia e horário. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma via será arquivada com a gente e a outra via será fornecida a você para guardar na sua casa.

Eu, _____ fui informado(a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações, e o meu responsável poderá modificar a decisão de participar se assim o desejar. Tendo o consentimento do meu responsável já assinado, declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma via deste termo assentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20 ____ .

Se você concorda em participar assine nessa linha

Dados do pesquisador responsável:

Nome: Thiago Lyrio Teixeira - Assinatura _____

Telefone para contato (16) 3602-2592 / (27) 99909-2153/ (16) 98232-8888

Email: thiagolteixeira@hotmail.com

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO (Para pacientes de 15-18 anos)

Título da pesquisa: Mapeamento genético das displasias corticais focais tipo II nas epilepsias tratadas cirurgicamente

Pesquisadores responsáveis:

Thiago Lyrio Teixeira - (27)99909-2153 / thiagolteixeira@hotmail.com

Prof. Dr. Hélio Rubens Machado - (16) 98162-5523 / hrmachad@gmail.com

O(a) filho do(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte deste estudo, assine ao final deste documento em duas vias. Caso o(a) senhor(a) não aceite que ele(a) participe da pesquisa, não será penalizado(a) de forma alguma e seu atendimento e tratamento não serão prejudicados na Instituição.

O objetivo da pesquisa é buscar uma melhor compreensão das características genéticas das displasias corticais focais tipo II, uma das principais causas de epilepsia em crianças, bem como entender como elas se relacionam com as características clínicas e com o prognóstico para, dessa forma, buscar desenvolver e melhorar as formas de tratamento e abordagem dessa enfermidade.

Caso concorde em participar, o (a) filho (a) do(a) senhor(a) deverá, no dia da cirurgia e apenas após a anestesia geral, submeter-se a uma coleta de amostra de sangue (de mais ou menos 3 colheres de chá) ou uma amostra de saliva da sua boca, bem como separaremos um pedaço do cérebro (mais ou menos do tamanho de uma cabeça de cotonete) que for retirado por causar a crise convulsiva (essa parte seria retirada independente do estudo, pois é parte do tratamento com cirurgia) e vamos enviá-los para o laboratório onde serão realizadas as análises da pesquisa. Essa coleta não fugirá ao procedimento cirúrgico ou pós-operatório habitual e nem tampouco irá prejudicar ou atrasar o tratamento em curso.

Os riscos ou desconfortos da pesquisa são mínimos, uma vez que os procedimentos adotados já o seriam feitos como parte do tratamento cirúrgico indicado. Dentre eles, devemos mencionar que a coleta do sangue pode doer um pouco ou gerar desconforto e contusão no local da picada o que habitualmente passa em poucos minutos. Se ainda assim houver algum problema, faremos o atendimento médico. Há uma chance de que a participação neste estudo possa trazer algum estresse psicológico, já que algumas pessoas

envolvidas em estudos ou familiares podem sentir-se ansiosos sobre a possibilidade de possuírem algum problema. Se estas sensações surgirem em qualquer momento do estudo, você poderá entrar em contato conosco e nós providenciaremos auxílio e encaminhamento para aconselhamento.

Cabe lembrar que esse estudo não tem propósito terapêutico imediato, e sim a médio e longo prazo. Os benefícios esperados da pesquisa são a melhor caracterização genética das displasias corticais focais tipo II e, a partir disso, obter ferramentas e dados para melhor entender a patologia e assim desenvolver melhores opções terapêuticas clínicas e cirúrgicas, bem como de aconselhamento e seguimento.

A participação do(a) seu(a) filho(a) nesta pesquisa é voluntária e o(a) senhor(a) tem liberdade de deixar de participar do estudo a qualquer momento, bastando apenas avisar algum dos pesquisadores. Além disso, caso não aceite participar o seu atendimento e tratamento no Hospital será exatamente o mesmo, sem nenhum prejuízo.

Será mantido sigilo absoluto dos dados obtidos individualmente neste estudo, para assegurar a privacidade dos participantes. Caso o(a) senhor(a) se sinta prejudicado em participar desta pesquisa, o(a) senhor(a) poderá buscar indenização de acordo com as normas vigentes no país.

Os pesquisadores estarão disponíveis para qualquer dúvida a qualquer momento durante o estudo e o sr.(a) tem a garantia de acesso aos resultados da pesquisa.

Caso tenha dúvidas sobre aspectos éticos desta pesquisa o(a) senhor(a) também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é composto por um grupo de pessoas que são responsáveis por supervisionam pesquisas em seres humanos que estão feitos na instituição e tem a função de proteger e garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos os participantes de pesquisa que se voluntariam a participar de um a pesquisa. O CEP do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto fica no subsolo do hospital e funciona das 8:00 às 17:00, o telefone de contato é (16) 3602-2228.

Esta pesquisa está vinculada ao biorrepositório denominado “Biorepósito de tecidos cerebrais” criado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP com o objetivo de guardar amostras de cérebro e sangue de pacientes afetados pela epilepsia e, assim, viabilizar os estudos genômicos que serão desenvolvidos no Centro de Medicina Genômica nessa pesquisa e, também, para tantas outras que poderão advir das mesmas amostras devidamente armazenadas. Gostaríamos de convidá-lo (a) a autorizar a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do

material biológico humano de cérebro e sangue de seu filho(a) para fins de pesquisa e análise científica.

Este material será coletado durante o procedimento cirúrgico programado como tratamento para controle da epilepsia, a ser realizado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto-SP. Após coletado será guardado em biorrepositório do mesmo hospital e também no Centro de Medicina Genômica localizado em prédio anexo, no Campus Universitário (Telefone 16 3602-1000), Avenida Bandeirantes, 3900, onde as amostras serão armazenadas por dez anos. Os pesquisadores responsáveis pela equipe se comprometem a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a amostra do cérebro e sangue será identificada por meio de etiqueta com nome completo e número de registro do prontuário eletrônico.

A participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que a amostra de seu filho(a) seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. O (A) Sr. (a) também tem o direito de retirar seu consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado a qualquer momento. Será esclarecido(a) em qualquer aspecto que desejar e os pesquisadores estarão sempre disponíveis, antes, durante ou depois, para tirar todas as dúvidas. Não haverá nenhum custo ao participante e nem tampouco ajuda financeira ao mesmo.

Solicitamos também os dados de contato do(a) senhor(a), para que seja possível encontrá-lo(a) posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse. Também solicitaremos sua autorização, se necessário, para o descarte do material armazenado caso o mesmo mostre-se inadequado ou insuficiente para adequada análise biológica.

Declaramos para os devidos fins que a cada a nova pesquisa o Sr.(a) será contatado para a utilização do material biológico armazenado neste biorrepositório, e também a nova pesquisa será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Solicitamos seus dados de contato e sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de participação. Também afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada e rubricada, será entregue ao senhor (a).

Dados do participante:

Nome: _____, RG: _____,
 Endereço: _____, nº _____,
 Bairro _____, cidade _____, telefone _____

Abaixo também seguem os dados de contato do pesquisador responsável, caso o(a) senhor(a) tenha alguma dúvida posteriormente.

Nome do participante: _____

Assinatura: _____ **data:** _____

Nome do pesquisador: Thiago Lyrio Teixeira

Contato (16) 3602-2592 / (27) 99909-2153/ (16) 98232-8888 **/Email:**
 thiagolteixeira@hotmail.com

Assinatura: _____ **data:** _____

Dados do responsável legal ou testemunha (caso aplicável):

Nome legível: _____

Assinatura: _____ data: _____

TERMO DE ASSENTIMENTO
Para pacientes de 15-18 anos

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) para participar da pesquisa chamada Mapeamento Genético das Displasias Corticais Focais Tipo II nas Epilepsias Tratadas Cirurgicamente. Neste estudo pretendemos entender melhor sobre a origem da sua doença.

O motivo que nos leva a estudar esse assunto é a necessidade de descobrir novas informações sobre como a doença acontece no seu corpo e assim conseguir melhores maneiras de tratar as convulsões. Analisando seus exames buscaremos entender melhor a influência genética nas epilepsias e descobrir melhor como tudo acontece e, assim, poder tentar controlar e evitar as convulsões em você e também em outras pessoas que têm os mesmos sintomas. Isso pode mudar e melhorar a vida de todos que têm as crises e também aqueles ao redor.

Para este estudo as crianças selecionadas terão entre 0 e 18 anos de idade e serão somente aquelas em que a cirurgia foi o tratamento escolhido para a epilepsia. A pesquisa será feita no Hospital das Clínicas de Ribeirão e, para isso, apenas depois que você já estiver anestesiada para a cirurgia, vamos coletar uma amostra de sangue (de mais ou menos 3 colheres de chá) ou uma amostra de saliva da sua boca, bem como iremos separar um pedaço do cérebro (mais ou menos do tamanho de uma cabeça de cotonete) que for retirado por causar a crise convulsiva (essa parte seria retirada independente do estudo, pois é parte do tratamento com cirurgia) e vamos enviá-los para o laboratório onde serão realizados os exames para descobrirmos como começou a doença.

Para participar deste estudo, o responsável por você (seu pai ou sua mãe ou seu responsável legal) deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. Você não terá nenhum custo, nem receberá nenhuma ajuda financeira. Você será esclarecido(a) em qualquer aspecto que desejar e estaremos sempre disponíveis, antes, durante ou depois, para tirar todas as suas dúvidas. Estará livre para participar ou recusar-se, e pode sair do estudo a qualquer momento se assim desejar. O responsável por você também poderá retirar sua participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e se você desejar não participar isso não vai trazer nenhuma desvantagem na forma que será atendido(a) pelo pesquisador e por todos aqueles envolvidos no seu tratamento. Sua identidade será mantida em segredo absoluto. Você não será identificado em nenhuma publicação.

Este estudo apresenta risco adicional mínimo, uma vez que vai utilizar material que já seria coletado para fins do tratamento cirúrgico. Dentre os riscos, a coleta do sangue pode doer um pouco, pode haver desconforto e contusão no local da picada e uma possível fraqueza, mas em alguns minutos isso deve passar. Se caso tiver com algum problema nós faremos o atendimento médico. Há uma chance de que a participação neste estudo cause estresse psicológico, já que algumas pessoas envolvidas em estudos podem sentir-se ansiosas sobre a possibilidade de possuírem algum problema. Se estas sensações surgirem em qualquer momento do estudo, você poderá entrar em contato conosco e nós providenciaremos auxílio e encaminhamento para aconselhamento.

Se você tiver alguma dúvida, você pode me perguntar ou conversar com o pesquisador Thiago Lyrio Teixeira. Eu escrevi os telefones no final do texto, você pode ligar a cobrar e a qualquer dia e horário. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma via será arquivada com a gente e a outra via será fornecida a você para guardar na sua casa.

Eu, _____ fui informado(a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações, e o meu responsável poderá modificar a decisão de participar se assim o desejar. Tendo o consentimento do meu responsável já assinado, declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma via deste termo assentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20 ____ .

Se você concorda em participar assine nessa linha

Dados do pesquisador responsável:

Nome: Thiago Lyrio Teixeira - Assinatura _____

Telefone para contato (16) 3602-2592 / (27) 99909-2153/ (16) 98232-8888

Email: thiagolteixeira@hotmail.com

APÊNDICE B - Tabela com todas as mutações encontradas após a aplicação dos filtros de patogenicidade e seleção das regiões de interesse nos pacientes submetidos à metodologia WES

ID	CHR	POS	REF	ALT	GENE	HGVS_C	HGVS_P	EFEITO	READ DEPTH	VAF	Varsome
FCD 4793	2	96688929	G	A	GPAT2	<u>c.2074C>T</u>	p.Arg692Cys	Missense	59	0.051	VUS
FCD 4793	2	241516048	T	C	RNPEPL1	<u>c.1607T>C</u>	p.Leu536Pro	Missense	397	0.015	VUS
FCD 4793	11	66618738	C	T	PC	<u>c.1996G>A</u>	p.Ala666Thr	Missense	513	9,747	VUS
FCD 4793	16	14311072	A	G	MRTFB	<u>c.442A>G</u>	p.Arg148Gly	Missense	86	0.035	VUS
FCD 4793	20	2384259	G	A	TGM6	<u>c.1126G>A</u>	p.Ala376Thr	Missense	222	0.023	Benign
FCD 4793	20	45204226	C	T	SLC13A3	<u>c.1318G>A</u>	p.Ala440Thr	Missense	145	0.034	VUS
FCD 4793	21	11058322	C	T	BAGE2;BAGE3	<u>c.118G>A</u>	p.Asp40Asn	Missense	267	0.022	VUS
FCD 4793	1	33236486	GC	G	KIAA1522	<u>c.1712del</u>	p.Pro571HisfsTer81	Frameshift	196	0,03743316	Likely Pathogenic
FCD 4793	2	97507924	TG	T	ANKRD23	<u>c.175-3del</u>	xxxxxx	Splicing	276	0,02661597	VUS
FCD 4793	2	165551295	CA	C	COBLL1	<u>c.2720del</u>	p.Leu907CysfsTer12	Frameshift	324	0,02931596	Pathogenic
FCD 4793	2	227661663	GC	G	IRS1	<u>c.1791del</u>	p.His598ThrfsTer38	Frameshift	286	0,03396226	Likely Pathogenic
FCD 4793	14	24040435	GC	G	JPH4	<u>c.1504del</u>	p.Ala502GlnfsTer8	Frameshift	291	0,03383459	VUS
FCD 4793	17	7307002	TG	T	TMEM256	<u>c.91del</u>	p.Gln31AsnfsTer26	Frameshift	432	0,02168675	VUS
FCD 4793	17	72851074	TG	T	GRIN2C	<u>c.157del</u>	p.Gln53ArgfsTer139	Frameshift	208	0,03608247	Pathogenic
FCD 4798	2	96688929	G	A	GPAT2	<u>c.2074C>T</u>	p.Arg692Cys	Missense	73	0.068	VUS
FCD 4798	2	177036982	C	T	HOXD3	<u>c.1279C>T</u>	p.Pro427Ser	Missense	390	0.015	VUS
FCD 4798	3	53276255	G	T	TKT	<u>c.111C>A</u>	p.His37Gln	Missense	358	0.014	VUS
FCD 4798	9	36966694	C	T	PAX5	<u>c.632G>A</u>	p.Gly211Asp	Missense	377	0.013	VUS
FCD 4798	19	9965152	G	A	OLFM2	<u>c.1075C>T</u>	p.Arg359Trp	Missense	514	9,728	VUS
FCD 4798	X	153596019	C	T	FLNA	<u>c.710G>A</u>	p.Gly237Asp	Missense	172	0.029	VUS
FCD 4798	1	6642305	GC	G	ZBTB48	<u>c.882del</u>	p.Thr295HisfsTer12	Frameshift	236	0,03181818	Pathogenic
FCD 4798	1	53793510	CTG	C	LRP8	<u>c.73_74del</u>	p.Gln25AlafsTer10	Frameshift	23	0,13636364	VUS
FCD 4798	4	103501694	GC	G	NFKB1	<u>c.738del</u>	p.Asn247MetfsTer5	Frameshift	131	0,03937008	Pathogenic
FCD 4798	10	60148569	CA	C	TFAM	<u>c.441del</u>	p.Glu148SerfsTer2	Frameshift	42	0,14705882	VUS
FCD 4798	11	65112082	GC	G	DPF2	<u>c.673del</u>	p.Gln225ArgfsTer102	Frameshift	190	0,02659574	Pathogenic
FCD 4798	11	134078847	TA	T	NCAPD3	<u>c.795-3del</u>	xxxxxx	Splicing	112	0,06521739	VUS
FCD 4798	15	56736722	CT	C	MNS1	<u>c.605del</u>	p.Lys202SerfsTer9	Frameshift	102	0,05208333	VUS
FCD 4798	22	28196402	GC	G	MN1	<u>c.129del</u>	p.Pro45LeufsTer8	Frameshift	505	0,01419878	Pathogenic
FCD 4798	X	100745228	AG	A	ARMCX4	<u>c.1654del</u>	p.Ala552LeufsTer393	Frameshift	215	0,02590674	Likely Pathogenic
FCD 4807	4	146435998	C	T	SMAD1	<u>c.233C>T</u>	p.Ser78Phe	Missense	256	0.016	VUS
FCD 4807	8	26722097	G	T	ADRA1A	<u>c.390C>A</u>	p.Tyr130Ter	Stopgain	546	9,158	VUS
FCD 4807	8	103662511	C	A	KLF10	<u>c.1292G>T</u>	p.Cys431Phe	Missense	298	0.013	VUS
FCD 4807	16	21288889	G	A	CRYM	<u>c.187C>T</u>	p.Pro63Ser	Missense	257	0.016	VUS
FCD 4807	20	62199795	C	T	HELZ2	<u>c.1646G>A</u>	p.Gly549Asp	Missense	403	0.015	VUS

continua

continuação

ID	CHR	POS	REF	ALT	GENE	HGVS_C	HGVS_P	EFEITO	READ DEPTH	VAF	Varsome
FCD 4807	3	9991858	TA	T	PRRT3	<u>c.-57-3del</u>	xxxxxx	Splicing	221	0,03940887	Likely Benign
FCD 4807	7	44733496	GC	G	OGDH	<u>c.1413del</u>	p.Ile472PhefsTer4	Frameshift	447	0,01609195	Pathogenic
FCD 4807	7	99817847	TG	T	PVRIG	<u>c.236del</u>	p.Gly79AlafsTer245	Frameshift	82	0,075	Likely Pathogenic
FCD 4807	8	61655031	AC	A	CHD7	<u>c.1044del</u>	p.Asn349MetfsTer3	Frameshift	312	0,02721088	Pathogenic
FCD 4807	9	79999547	GTGA	G	VPS13A	<u>c.9267_9269del</u>	p.Asp3089del	Inframe	18	0,16666667	Benign
FCD 4807	12	118511748	GC	G	VSIG10	<u>c.974del</u>	p.Gly325AlafsTer3	Frameshift	367	0,01966292	Pathogenic
FCD 4807	13	52990060	TA	T	VPS36	<u>c.1068-3del</u>	xxxxxx	Splicing	211	0,03553299	VUS
FCD 4807	15	57884289	CG	C	GCOM1;MYZAP	<u>c.61del</u>	p.Ala21ArgfsTer13	Frameshift	191	0,04891304	VUS
FCD 4807	19	643527	AG	A	FGF22	<u>c.444del</u>	p.Arg150GlyfsTer75	Frameshift	344	0,02970297	VUS
FCD 4807	19	14910637	GA	G	OR7C1	<u>c.311del</u>	p.Phe104SerfsTer12	Frameshift	531	0,02658487	VUS
FCD 4807	20	44569490	TC	T	PCIF1	<u>c.435del</u>	p.Ser146ValfsTer8	Frameshift	550	0,01498127	Pathogenic
FCD 4807	21	34882121	CT	C	GART	<u>c.2420del</u>	p.Lys807ArgfsTer7	Frameshift	304	0,02405498	VUS
FCD 4807	21	47707039	TA	T	YBEY	<u>c.210+12del</u>	xxxxxx	Splicing	95	0,06593407	VUS
FCD 4807	X	68725178	TCTG	T	FAM155B	<u>c.72_74del</u>	p.Cys24del	Inframe	161	0,09558824	VUS
FCD 4818	6	35210917	T	C	SCUBE3	<u>c.1813T>C</u>	p.Tyr605His	Missense	235	0.021	VUS
FCD 4818	19	15079226	C	T	SLC1A6	<u>c.437G>A</u>	p.Gly146Asp	Missense	159	0.025	VUS
FCD 4819	1	145608466	C	T	POLR3C	<u>c.341G>A</u>	p.Gly114Asp	Missense	223	0.018	VUS
FCD 4819	1	153941607	C	T	CREB3L4	<u>c.376C>T</u>	p.Gln126Ter	Stopgain	589	0.012	Pathogenic
FCD 4819	1	234455874	C	T	SLC35F3	<u>c.1178C>T</u>	p.Ala393Val	Missense	47	0.064	VUS
FCD 4819	2	96688929	G	A	GPAT2	<u>c.2074C>T</u>	p.Arg692Cys	Missense	79	0.038	VUS
FCD 4819	3	66419911	C	T	SLC25A26	<u>c.578C>T</u>	p.Ala193Val	Missense	124	0.032	VUS
FCD 4819	3	171330216	G	A	PLD1	<u>c.2735C>T</u>	p.Ala912Val	Missense	166	0.024	VUS
FCD 4819	6	168377271	G	A	HGC6.3	<u>c.62C>T</u>	p.Ser21Phe	Missense	49	0.061	VUS
FCD 4819	11	88300372	C	T	GRM5	<u>c.2479G>A</u>	p.Ala827Thr	Missense	535	9,346	VUS
FCD 4819	12	109186035	C	T	SSH1	<u>c.1953G>A</u>	p.Trp651Ter	Stopgain	228	0.022	Likely Pathogenic
FCD 4819	16	2256168	C	T	MLST8	<u>c.82C>T</u>	p.Gln28Ter	Stopgain	462	0.011	Pathogenic
FCD 4819	21	11058322	C	T	BAGE2;BAGE3	<u>c.118G>A</u>	p.Asp40Asn	Missense	242	0.017	VUS
FCD 4819	22	50875933	A	C	PPP6R2	<u>c.1684-2A>C</u>	xxxxxx	Splicing	88	0.125	VUS
FCD 4819	1	103496802	TG	T	COL11A1	<u>c.652-3del</u>	xxxxxx	Splicing	93	0,13953488	VUS
FCD 4819	2	190670539	TA	T	PMS1	<u>c.488del</u>	p.Lys163SerfsTer15	Frameshift	105	0,08695652	VUS
FCD 4819	3	101284008	CA	C	TRMT10C	<u>c.393del</u>	p.Lys131AsnfsTer3	Frameshift	138	0,04132231	VUS
FCD 4819	4	15938177	CT	C	FGFBP1	<u>c.78del</u>	p.Val27Ter	Stopgain	297	0,02380952	VUS
FCD 4819	5	158630629	GT	G	RNF145	<u>c.86del</u>	p.Asn29ThrfsTer13	Frameshift	123	0,09259259	VUS
FCD 4819	5	162884088	TA	T	NUDCD2	<u>c.239-3del</u>	xxxxxx	Splicing	52	0,12195122	VUS
FCD 4819	9	96080206	TC	T	WNK2	<u>c.679del</u>	p.Thr2267ProfsTer49	Frameshift	450	0,01616628	Likely Pathogenic
FCD 4819	11	1651199	A	AGGCCGTG GCTCC	KRTAP5-5	<u>c.132_133insCGTG GCTCCGCGC</u>	p.Gly44_Cys45insArgGlySerGly	Inframe	11	0,7	VUS
FCD 4819	16	67183549	CA	C	B3GNT9	<u>c.839del</u>	p.Leu280ArgfsTer71	Frameshift	639	0,01663894	VUS

continua

conclusão

ID	CHR	POS	REF	ALT	GENE	HGVS_C	HGVS_P	EFEITO	READ DEPTH	VAF	Varsome
FCD 4820	1	207787753	C	T	CR1	<u>c.6580C>T</u>	p.Arg2194Ter	Stopgain	129	0.031	VUS
FCD 4820	3	38592041	G	A	SCN5A	<u>c.5660C>T</u>	p.Ala1887Val	Missense	267	0.015	VUS
FCD 4820	3	136035883	G	A	PCCB	<u>c.1067G>A</u>	p.Gly356Asp	Missense	197	0.020	Likely Pathogenic
FCD 4820	5	139494499	C	T	PURA	<u>c.733C>T</u>	p.Arg245Ter	Stopgain	472	0.011	Pathogenic
FCD 4820	9	131095803	G	C	COQ4	<u>c.677G>C</u>	p.Gly226Ala	Missense	xxx	0,10227273	VUS
FCD 4820	2	152108087	AT	A	RBM43	<u>c.406del</u>	p.Ile136SerfsTer4	Frameshift	292	0,03225806	VUS
FCD 4820	11	77885567	TC	T	KCTD21	<u>c.33del</u>	p.Lys12SerfsTer10	Frameshift	549	0,01489758	VUS
FCD 4820	12	54118913	TG	T	CALCOCO1	<u>c.113del</u>	p.Pro38GlnfsTer66	Frameshift	520	0,015625	Pathogenic
FCD 4820	20	50781298	TA	T	ZFP64	<u>c.449-3del</u>	xxxxxx	Splicing	117	0,07142857	Likely Benign
FCD 4820	X	70607282	GC	G	TAF1	<u>c.2400del</u>	p.Asn801IlefsTer31	Frameshift	244	0,02136752	Pathogenic
FCD 4823	1	3807135	G	A	C1orf174	<u>c.616C>T</u>	p.Gln206Ter	Stopgain	116	0.034	Pathogenic
FCD 4823	10	103339380	C	T	POLL	<u>c.1558G>A</u>	p.Ala520Thr	Missense	552	0.011	VUS
FCD 4823	21	11058295	G	A	BAGE2;BAGE3	<u>c.145C>T</u>	p.Pro49Ser	Missense	239	0.038	VUS
FCD 4823	19	8131083	A	T	FBN3	<u>c.8150T>A</u>	p.Leu2717Gln	Missense	xxx	0,02268041	VUS
FCD 4823	3	65372849	TTC	T	MAG1	<u>c.2470_2471del</u>	p.Glu824AsnfsTer31	Frameshift	239	0,02620087	VUS
FCD 4823	4	15938177	CT	C	FGFBP1	<u>c.78del</u>	p.Val27Ter	Stopgain	317	0,03215434	VUS
FCD 4823	6	31762737	GC	G	VARS	<u>c.257del</u>	p.Gly86AlafsTer22	Frameshift	455	0,0215311	Pathogenic
FCD 4823	6	42897357	TTGC	T	CNPY3;CNPY3-GNMT	<u>c.74_76del</u>	p.Leu25del	Inframe	234	0,09659091	VUS
FCD 4823	17	44076685	GC	G	STH	<u>c.45del</u>	p.Thr16GlnfsTer16	Frameshift	458	0,01576577	VUS
FCD 4823	17	59465991	GA	G	BCAS3	<u>c.2682del</u>	p.Lys894AsnfsTer73	Frameshift	98	0,06976744	VUS
FCD 4823	19	14083666	GCCACTGCCACCC CCGCCACCGCCT CCCCCGCCGCCG CCGCCACCA	G	RFX1	<u>c.1158_1202del</u>	p.Gly387_Gly401del	Inframe	127	0,13043478	VUS
FCD 4823	20	58467046	AT	A	SYCP2	<u>c.2362del</u>	p.Met788Ter	Stopgain	122	0,06422018	VUS
FCD 4823	X	100745228	AG	A	ARMCX4	<u>c.1654del</u>	p.Ala552LeufsTer393	Frameshift	245	0,02631579	Likely Pathogenic
FCD 6596	1	11217299	A	G	MTOR	<u>c.4379T>C</u>	p.Leu1460Pro	Missense	370	0.065	Pathogenic
FCD 6596	1	11217299	A	G	MTOR	<u>c.4379T>C</u>	p.Leu1460Pro	Missense	xxx	0,05898491	Pathogenic