

**LUCIANA MIDORI INUZUKA NAKAHARADA**

**Encefalopatias epilépticas e do desenvolvimento:  
caracterização clínica e genética**

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

Programa de Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Kok

**São Paulo**

**2022**

**LUCIANA MIDORI INUZUKA NAKAHARADA**

**Encefalopatias epilépticas e do desenvolvimento:  
caracterização clínica e genética**

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

Programa de Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Kok

**São Paulo**

**2022**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nakaharada, Luciana Midori Inuzuka  
Encefalopatias epilépticas e do desenvolvimento  
: caracterização clínica e genética / Luciana Midori  
Inuzuka Nakaharada. -- São Paulo, 2022.  
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Neurologia.  
Orientador: Fernando Kok.

Descritores: 1.Encefalopatia epiléptica e do  
desenvolvimento 2.Encefalopatia epiléptica  
3.Epilepsia 4.Genética 5.Sequenciamento de nova  
geração 6.Sequenciamento completo do exoma  
7.Epilepsia de difícil controle 8.Epilepsia  
resistente a medicamentos

USP/FM/DBD-217/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

# Dedicatória

---

A **Guilherme e Henrique**, meus queridos filhos  
compreensivos e adoráveis

A **Celso**, meu esposo, pelo apoio incondicional,  
incentivo, suporte e companheirismo.

A **meus pais Martha e Kentaro**,  
meus exemplos de vida.

Para **meu irmão Marcelo**,  
minha inspiração e “porto seguro”



# Agradecimentos

---

Ao longo desta longa e desafiadora jornada, muitas pessoas foram importantes para a execução deste estudo e a todas serei eternamente grata.

A meu querido orientador Prof. Dr. Fernando Kok, pessoa que eu admiro desde a minha residência médica e que tenho orgulho de dizer “meu orientador”. Ele me ensinou as “artes e manhas do DNA” em troca de algumas informações de eletroencefalograma e epilepsia.

A minha amiga e sócia Dra. Eliana Garzon, que me ensinou a arte de atender pacientes com excelência, não mediu esforços para transmitir seu conhecimento e inspira-me todos os dias com sua bondade e humildade.

A minha querida amiga e mentora Lúcia Inês-Macedo Souza, que abraçou comigo este projeto de doutorado, ensinando-me a “arte de focar”, nunca desistir e fazer as coisas sempre com alegria e disposição.

As minhas eternas ajudantes e “segundas mães de meus filhos” Ivonete e Simone, sem elas seria muito difícil finalizar com tranquilidade esta pesquisa.

Aos amigos que colaboraram no apoio a meu projeto de doutorado e artigos que fazem parte desta tese, do Hospital Sírio Libanês, INISP (Instituto de Neurologia Integrada de São Paulo), Hospital Menino Jesus, Ambulatório de Neurogenética da FMUSP-SP, Mendelics Análises Genômica e outros serviços: Ana Carolina Pegoraro, André Pessoa, Anderson Rodrigues Brandão de Paiva, Bruno Della Ripa Rodrigues, Charles Marques Lourenço, Christiane Cobas, Claudio Melo De Gusmão, Daniela V. Pachito, Danielle Patriota de Oliveira, Danielli Blanco, Debora Gejer, Fabíola Monteiro, Fernanda Monti, Fernando Freua, Flavia Piazzon, Gláucia Alonso, Gustavo Melo Almeida, Gustavo Mercenas, João Paulo Kitajima, Juliana Gurgel; Katiane Saião Souza Cabral, Keiko Abe, Larissa Costa, Larissa Mota Eleutério, Letícia Soster, Lúcia Sukys Claudino, Luciana Mello, Luisa Simonsen, Luiza Ramos, Luiz Gustavo Almeida, Marcela Gregório, Matheus Guerra-Peixe, Mirian Salvadori Guaranha, Natalia Mata Longo, Ronan Vieira e Vânia Muniz Nacle.

Aos queridos professores e amigos: Dra. Regina França Fernandes, Dra. Vera C. Terra, Dr. Américo C. Sakamoto e Dra. Elza Márcia Yacubian que foram muito importantes e decisivos em minha vida pessoal e profissional em São Paulo.

Aos queridos amigos que me entenderam em todos os momentos que estive um pouco ausente: Regina, Paulo, Isabel, Vivian, Alessandra, Giuliana, Márcia, Hiro, Milena, Alvio, Flavio, Mauricio, Cris, Andrea, Paulo, Tatiana e Eva.

Aos queridos neurorradiologistas: Hae Wong, Maria da Graça Martin, Daniel de Souza Delgado e Luis Filipe Godoy pela ajuda incondicional nos exames de neuroimagem.

A minha amiga e instrutora de *mindfulness* Laura Damian, que me ajudou a manter minha essência e paz neste período.

Ao professor de neurofisiologia Claudio Felipe Kolling da Rocha, que ensinou a arte da neurofisiologia de uma forma simples e didática.

Aos profissionais Breno Clemente Júnior e Gilson André da Silva que auxiliaram brilhantemente nas ilustrações e tabelas.

Aos professores Colin David e Soraya Imon de Oliveira (*in memoriam*) pela ajuda no inglês impecável.

À equipe do HCFMUSP, em especial, Reiko e Thais, secretárias do Departamento de Neurologia, pelo apoio irrestrito nas questões administrativas.

Aos pacientes e seus familiares, motivo último do esforço aqui empreendido, por compartilharem comigo suas histórias, terem disponibilidade de participar do estudo e pelo tanto me ensinaram.

A toda minha família Inuzuka-Nakaharada, por todo apoio e vibração a cada conquista.

Aos meus pais, que sempre acreditaram em mim.

*O que importa não é o que lhe acontece,  
mas como você reage a isso.*

Epicteto

# Normatização

---

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

# Sumário

---

Lista de Abreviaturas e Siglas .....	x
Lista de Figuras .....	xiii
Lista de Tabelas.....	xiv
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvi
<b>CAPÍTULO 1</b>	
Introdução, Objetivos, Revisão de Literatura, Casuística e Métodos.....	1
<b>I INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
<b>II OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
2.1 Objetivo principal.....	5
2.2 Objetivos secundários .....	5
<b>III REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>6</b>
3.1 Definições de crise epiléptica, epilepsia e síndrome epiléptica.....	6
3.2 Classificações das crises epilépticas, da epilepsia e das síndromes epilépticas .....	7
3.3 Encefalopatias epilépticas e do desenvolvimento (DEE).....	10
3.4 Epidemiologia .....	14
3.5 Aspectos genéticos na investigação das epilepsias .....	14
3.5.1 Aspectos básicos de genética.....	15
3.5.2 Tipos de testes genéticos .....	18
3.5.3 Ferramentas bioinformáticas de apoio ao diagnóstico .....	21
3.6 Aspectos clínicos e genéticos das DEEs .....	23
3.7 Fisiopatologia das DEEs.....	24
3.7.1 Proteínas de transporte transmembrana.....	26
3.7.2 Proteínas receptoras, reguladoras da sinalização e efetoras .....	29
3.7.2.1 Proteínas receptoras (proteínas relacionadas com a liberação de neurotransmissores e receptores metabotrópicos) .....	29
3.7.2.2 Proteínas reguladoras da sinalização.....	31
3.7.2.3 Proteínas consideradas efetoras.....	33
3.7.3 Proteínas relacionadas com a regulação transcricional e o processamento de ácidos nucleicos .....	35
3.8 DEE associada ao gene <i>SCN1A</i> .....	35
<b>IV CASUÍSTICA E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
4.1 Desenho do estudo .....	37
4.2 Local .....	37
4.2.1 Avaliação clínica e neurofisiológica.....	37
4.2.2 Avaliação de neuroimagem .....	37
4.2.3 Estudo genético.....	37
4.3 Amostra.....	38
4.3.1 Fluxo e seleção dos pacientes .....	38

4.3.2 Critérios de inclusão .....	38
4.3.3 Critérios de exclusão .....	38
4.4 Cálculo amostral .....	39
4.5 Procedimentos.....	39
4.5.1 Avaliação clínica .....	39
4.5.2 Exames complementares .....	39
4.6 Análise e apresentação dos dados.....	42
4.7 Aspectos éticos .....	42
CAPÍTULO 2	
Resultados gerais.....	43
CAPÍTULO 3	
Artigos 1 e 2 <i>SCN3A</i> .....	66
CAPÍTULO 4	
Artigo <i>ATP6V1B2</i> .....	79
CAPÍTULO 5	
Artigo <i>KCNT2</i> .....	87
CAPÍTULO 6	
Artigo <i>MECP2</i> .....	94
CAPÍTULO 7	
Discussão e Conclusões.....	105
I DISCUSSÃO .....	106
II CONCLUSÕES .....	119
8 ANEXOS.....	120
9 REFERÊNCIAS .....	136
APÊNDICES .....	147
Apêndice A - Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.....	148
Apêndice B Aprovação do Comitê de Pesquisa da Sociedade Beneficente de Senhoras do Hospital Sírio Libanês .....	149
Apêndice C - Termo de consentimento livre e esclarecido .....	150
Apêndice D - Termo de consentimento livre e esclarecido (Mendelics) .....	152
Apêndice E - Endereços eletrônicos dos artigos científicos relacionados a esta tese publicados em revistas indexadas .....	153
Apêndice F - Critérios diagnósticos para DEE segundo ILAE (2021).....	154
Apêndice G - Genes testados nos painéis genéticos em 2017 e 2021 .....	159
Apêndice H - Tipos de tratamento estabelecidos, potencial ou hipotético e perspectivas futuras com relação às variantes patogênicas de vários genes relacionados às DEEs.....	160

# Listas

---

## ABREVIATURAS E SIGLAS

ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
ADNPM	Atraso de desenvolvimento neuropsicomotor
AMPA	Ácido Alfa-Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
AMPc	AMP cíclico
ASO	<i>Antisense oligonucleotides</i> – oligonucleotídeos antisense
B	<i>Benign</i>
CADD	<i>Combined Annotation Dependent Depletion</i>
CAPPesq	Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa
CDG	<i>Congenital disorder of glycosylation</i>
CGH-Array	<i>Comparative Genomic Hybridization - Array</i>
CNV	<i>Copy Number Variation</i>
CTCB	Crise tônico-clônica bilateral
CTCG	Crise tônico-clônica generalizada
DBS	<i>Deep Brain Stimulation</i>
DEE	<i>Developmental and Epileptic Encephalopathy</i>
DEEIP	<i>Developmental and Epileptic Encephalopathy</i> – Encefalopatia Epiléptica e do Desenvolvimento de Início Precoce
DI	Deficiência intelectual
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPM	Desenvolvimento neuropsicomotor
EE	Encefalopatia epiléptica
EEIE	<i>Epileptic Encephalopathy, Infantile Early</i>
EEG	Eletroencefalograma
EICFM	Epilepsia da Infância com Crises Focais Migratórias
EMP	Encefalopatia Mioclônica Precoce
EPGP	<i>The Epilepsy Phenome/Genome Project</i>
Epi25	<i>Epi25 Collaborative</i>

ExAC	<i>Exome Aggregation Consortium</i>
FAC	Fármaco anticrise
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
FLAIR	<i>Fluid attenuated inversion recovery</i>
GABA	Ácido gama amino-butírico
GEFS+	<i>Generalized Epilepsy with Febrile Seizures - plus</i>
GTP	Guanosina-trifosfato
GOF	<i>Gain of function</i>
GnomAD	<i>Genome Aggregation Database</i>
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HSL	Hospital Sírio Libanês
IBE	<i>International Bureau of Epilepsy</i>
Indel	Inserção ou deleção
IGV	<i>Integrative Genomics Viewer</i>
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
Kv	Canal de potássio voltagem dependente
LB	<i>Likely Benign</i>
LBE	Liga Brasileira de Epilepsia
LOF	<i>Loss of function</i>
LP	<i>Likely Pathogenic</i>
Mb	<i>Mega bases</i>
MLPA	<i>Multiplex Ligand-Dependent Probe Amplification</i>
Nav	Canal de sódio voltagem dependente
Nav1.1	Canal de sódio voltagem dependente tipo 1
Nav1.2	Canal de sódio voltagem dependente tipo 2
Nav1.3	Canal de sódio voltagem dependente tipo 3
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NINDS	<i>National Institute of Neurological Disorders and Stroke</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance In Man</i>
P	<i>Pathogenic</i>
pb	pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>



pLI	<i>Probability of being loss of function intolerant</i>
Polyphen	<i>Polymorphism Phenotyping</i>
REM	<i>Rapid Eye Movement</i>
RM	Ressonância Magnética
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
SD	Síndrome de Dravet
SE	<i>Status epilepticus</i>
SEEI	Síndrome com Espasmos Epilépticos Infantis
SLG	Síndrome de Lennox-Gastaut
SLK	Síndrome de Landau-Kleffner
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SNP-Array	<i>Single Nucleotide Polymorphism - Array</i>
SO	Síndrome de Ohtahara
SW	Síndrome de West
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
Uniprot	<i>Universal Protein Resource</i>
Vídeo-EEG	Vídeo-eletroencefalograma
VUS	<i>Variant of Unknown Significance</i>
WES	<i>Whole exome sequencing</i>
WGS	<i>Whole genome sequencing</i>

## FIGURAS

<b>Figura 1</b> -	Esquema ilustrativo da classificação das crises epiléticas segundo ILAE 2017.....	8
<b>Figura 2</b> -	Esquema ilustrativo da classificação das epilepsias segundo a ILAE, 2017.....	9
<b>Figura 3</b> -	Esquema ilustrativo das síndromes epiléticas de causas genéticas monogênicas.....	24
<b>Figura 4</b> -	Esquema ilustrativo de uma célula neuronal com as principais localizações do produto proteico relacionados aos mecanismos fisiopatológicos que levam à DEE.....	25
<b>Figura 5</b> -	Esquema ilustrativo das proteínas de transporte transmembrana.....	27
<b>Figura 6</b> -	Esquema ilustrativo das vias de sinalização intracelular desencadeadas por uma molécula extracelular.....	29
<b>Figura 7</b> -	Esquema ilustrativo dos receptores acoplados à proteína G (metabotrópicos).....	31
<b>Figura 8</b> -	Fluxograma dos 150 pacientes com DEEs analisados.....	44
<b>Figura 9</b> -	Exemplo de padrão de EEG do tipo IV.....	47
<b>Figura 10</b> -	Exemplo de EEG com surto supressão.....	47
<b>Figura 11</b> -	RM de crânio do caso 4 com variante patogênica em <i>ATPIA3</i> , com um ano de idade.....	48
<b>Figura 12</b> -	RM de crânio do caso 57 com variante patogênica em <i>RHOBTB2</i> .....	48
<b>Figura 13</b> -	Fluxograma dos 108 pacientes do Grupo A.....	50
<b>Figura 14</b> -	Fluxograma dos 42 pacientes do Grupo B.....	51
<b>Figura 15</b> -	Gráfico do padrão de herança dos 112 casos conclusivos.....	53
<b>Figura 16</b> -	Gráfico com o mecanismo mutacional dos 98 casos monoalélicos.....	54
<b>Figura 17</b> -	Gráfico com o mecanismo mutacional dos 14 casos bialélicos (28 mecanismos mutacionais).....	55
<b>Figura 18</b> -	Visão geral do IGV do paciente do sexo masculino com a variante patogênica em <i>PCDH19</i> (localizado no cromossomo X).....	56
<b>Figura 19</b> -	Eletroesferograma mostrando o Sequenciamento Sanger dos familiares do caso 44 (variante patogênica em <i>MECP2</i> ).....	56
<b>Figura 20</b> -	Representação do IGV do NGS da irmã do paciente 44 com Síndrome de Rett.....	57
<b>Figura 21</b> -	Esquema ilustrativo da proteína SCN1A.....	65

## TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Características clínicas da amostra de 112 pacientes com teste molecular positivo.....	46
<b>Tabela 2 -</b>	Características clínicas da amostra de 38 pacientes com teste molecular negativo.....	49
<b>Tabela 3 -</b>	Aspectos relevantes de 13 casos positivos após a reanálise do exoma.....	52
<b>Tabela 4 -</b>	Características gerais dos pacientes identificados com variantes patogênicas em genes que codificam proteínas de transporte .....	59
<b>Tabela 5 -</b>	Características gerais dos pacientes identificados com variantes patogênicas em genes que codificam proteínas receptoras, mediadoras da sinalização e efetoras .....	61
<b>Tabela 6 -</b>	Características gerais dos pacientes identificados com variantes patogênicas em genes envolvidos com a regulação transcricional, estrutura da cromatina e processamento de ácidos nucleicos .....	62
<b>Tabela 7 -</b>	Dados genéticos dos 22 pacientes com DEEs e variantes patogênicas no gene <i>SCN1A</i> .....	64

# Resumo

---

Nakaharada LMI. *Encefalopatias epilépticas e do desenvolvimento*: caracterização clínica e genética [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

A encefalopatia epiléptica e do desenvolvimento (DEE) constitui um grupo de condições clínicas nas quais o desenvolvimento neuropsicomotor mostra-se alterado independentemente da epilepsia e, frequentemente, de causa genética. O objetivo deste estudo foi descrever as características clínicas e genéticas de uma coorte retrospectiva e parcialmente prospectiva com DEE de início antes dos dois anos de vida. Os critérios de exclusão foram: casos de DEE com prováveis causas ambientais ou decorrentes de anomalias cromossômicas identificadas por microarray cromossômico ou cariótipo; condições clinicamente reconhecíveis, tais como esclerose tuberosa, neurofibromatose e lipofuscinose ceróide. Os pacientes realizaram investigação molecular por sequenciamento Sanger ou por sequenciamento de nova geração, NGS (painel de genes de epilepsia ou exoma completo). De janeiro de 2016 a janeiro de 2021, 150 pacientes foram elegíveis para este estudo. A idade mediana de início de crises foi de 3,2 meses. O diagnóstico genético foi confirmado (casos positivos) em 112 indivíduos: 109 por NGS, sendo 90 exomas e 19 painéis de epilepsia e três por sequenciamento Sanger. Dos 38 indivíduos restantes, considerados como casos negativos: 31 exomas e sete painéis de epilepsia. No conjunto dos 112 casos positivos incluídos nesta investigação, a epilepsia focal e generalizada combinada foi a mais frequente com 55,4% (62/112) e, quando foi possível reconhecer a síndrome, espasmos epilépticos infantis correspondeu a 23,2% (26/112). Os padrões eletrográficos mais encontrados foram aqueles com atividade de base desorganizada e paroxismos multifocais e generalizados (50,9%). Foram identificadas alterações potencialmente patogênicas em 62 genes distintos e duas microdeleções cromossômicas envolvendo mais de um gene. O padrão de herança mais frequente foi o autossômico dominante, correspondendo a 69% dos casos (77/112), seguido por ligado ao X (19%) e finalmente o autossômico recessivo (12%). Um indivíduo apresentava mosaïcismo somático e três pacientes herdaram a variante patogênica decorrente de mosaïcismo presuntivamente gonadal. O mecanismo mutacional mais frequente em todos os padrões de herança foi *missense*. Entre os 112 casos positivos, o grupo das canalopatias foi a causa mais frequente (44/112, 39,3%), incluindo *SCN1A*, presente em 22 pacientes. Entre os casos positivos, seis tinham malformação do desenvolvimento cortical. Dos 150 pacientes, 108 foram incluídos neste estudo antes da realização do teste genético: para este subgrupo, a taxa de positividade inicial foi 60,2% (65/108). Dos 43/108 inicialmente negativos, foi possível conduzir uma reanálise em 26 deles, obtendo um resultado positivo em 10 deles (38,5%), após um intervalo médio de 4,2 anos (mediana de 5,8 anos). Este estudo sugere considerável causa genética nas DEEs de início nos primeiros anos de vida. A investigação genética, preferencialmente por sequenciamento do exoma, deve ser considerada como um exame de primeira linha na avaliação das DEEs, mesmo em casos com malformação do desenvolvimento cortical. Recomenda-se uma reanálise periódica de exoma negativo em pacientes com DEEs. A possibilidade de mosaïcismo gonadal deve ser sempre considerada no aconselhamento genético.

Descritores: Encefalopatia Epiléptica e do Desenvolvimento; Encefalopatia Epiléptica; Epilepsia; Genética; Sequenciamento de nova geração; Sequenciamento completo do exoma; Epilepsia de difícil controle; Epilepsia farmacorresistente.

# Abstract

---

Nakaharada LMI. *Epileptic and developmental encephalopathies: clinical and genetic characterization* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Developmental and epileptic encephalopathies (DEE) are a group of clinical conditions in which neuropsychomotor development is impacted independently of epilepsy, often with a genetic etiology. We sought to describe clinical and genetic characteristics of a DEE cohort, combining retrospective and prospective case series of individuals with DEE and onset before two years of age. Exclusion criteria included individuals with probable environmental DEEs or those due to chromosomal abnormalities identified by chromosomal microarray or karyotype, in addition to recognizable conditions such as tuberous sclerosis, neurofibromatosis, and ceroid lipofuscinosis. Molecular investigation was performed through Sanger sequencing or next-generation sequencing (NGS) through targeted panels or whole exome. From January 2016 through January 2021, we collected data from 150 eligible subjects. Median age of seizure onset was 3.2 months. A genetic diagnosis was confirmed in 112 individuals: 109 by NGS (90 exomes and 19 targeted panels) and three by Sanger sequencing. In the remaining 38 individuals, 31 exomes and 7 panels were negative. In the subset of individuals with positive genetic testing, combined focal and generalized epilepsy was the most frequently encountered pattern, present in 55.4% (62/112) individuals; infantile spasms were found in 23.2% (26/112). The most frequent EEG findings comprised disorganized background with multifocal and generalized epileptiform discharges in 50.9%. Pathogenic variants were present in 62 single genes, and two individuals had microdeletions spanning more than one gene. The most frequent inheritance pattern was autosomal dominant (69%, 77/112), followed by X-linked (19%), and autosomal recessive (12%). One individual had somatic mosaicism, and three individuals inherited the pathogenic variant through presumed gonadal mosaicism. In all inheritance patterns, the most frequently observed mutational mechanism was missense. Channelopathies were the most frequent etiology (39.3%); 22 individuals had pathogenic variants in *SCN1A*. Among positive cases, six had malformation of cortical development. Of the 150 subjects, 108 were enrolled prior to genetic testing. In this subset, the diagnostic yield of NGS was 60.2% (65/108). Reanalysis was feasible in 26/43 individuals with negative results. A conclusive diagnosis was obtained in 38.5% (10/26), after a median interval of 5.8 years. In conclusion, this study suggests a considerable genetic burden in early-onset DEEs. NGS (preferably exome), should be considered as an early complementary diagnostic test, even in those individuals with malformations of cortical development. Patients with negative results may benefit from periodic reanalysis of genetic data. Gonadal mosaicism should be considered during genetic counseling.

Keywords: Developmental and Epileptic Encephalopathy; Epilepsy; Epilepsy; Genetics; Next-generation sequencing; Whole exome sequencing; Pharmacoresistant epilepsy.

# **CAPÍTULO 1**

## **Introdução, Objetivos, Revisão de Literatura, Casuística e Métodos**

---

## I INTRODUÇÃO

As encefalopatias epiléticas e do desenvolvimento (DEE- *Developmental and Epileptic Encephalopathy*) constituem um grupo heterogêneo de doenças neurológicas que afetam indivíduos de várias faixas etárias. O termo DEE é utilizado em condições clínicas no qual o desenvolvimento cognitivo e/ou comportamento são prejudicados e relacionados tanto à etiologia de base como a encefalopatia epilética (EE) (Wirrell et al., 2022).

Os termos EE e DEE necessitam ser definidos pois passaram nos últimos anos, por mudanças conceituais.

O termo EE foi reconhecido e definido pela ILAE (*International League Against Epilepsy*), em 2010, como uma condição neurológica com a presença de intensa atividade epileptiforme, levando a perdas cognitivas e alterações comportamentais, acima e além do esperado pela doença subjacente, podendo piorar ao longo do tempo. A EE pode ter início na vida intrauterina ou pós-natal. A deterioração neurológica pode ser global ou seletiva, e pode ocorrer de forma progressiva e apresentar-se com espectro variável de gravidade. Os prejuízos neurológicos das crises epiléticas potencialmente, podem ocorrer em associação com qualquer forma de epilepsia. Um exemplo disso é a EE por estado de mal epilético (SE, *status epilepticus*) elétrico do sono, no que a cognição e/ou o comportamento podem melhorar de forma importante com o controle de crises epiléticas e com a resolução da atividade epileptiforme interictal (Berg et al., 2010).

Neste estudo, o termo DEE será empregado em casos com causas genéticas confirmadas ou presumidas, que contribuiriam, tanto para o quadro de epilepsia quanto para a encefalopatia. Nestes casos, mesmo que haja o controle de crises epiléticas, o desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM) mantém-se alterado. Na infância este conjunto de doenças, mais especificamente, de início até os dois anos de vida, será a temática principal do estudo. Em sua maioria, as crises epiléticas nas DEE são farmacorresistentes e representam um desafio na investigação e no tratamento. Com o avanço das técnicas moleculares de investigação genética pelo sequenciamento de nova geração (NGS, *Next Generation Sequencing*, também

conhecido, como *deep sequencing* e *sequencing and resequencing*), muitos casos não esclarecidos puderam ter seu diagnóstico etiológico definido, demonstrando a importância da investigação genética nos casos de DEE.

Uma questão muito importante na identificação de novos fenótipos em DEE, é ocorrer grande variabilidade nas manifestações clínicas associadas a cada gene; e as síndromes epiléticas mostram também, de modo geral, uma grande heterogeneidade genética. O fenótipo auxilia a interpretação da relevância dos resultados genéticos do indivíduo, além de auxiliar os pesquisadores a compreender a patogênese e guiar para melhor terapia (McTague et al., 2016).

Existem vários mecanismos fisiopatológicos nas DEEs: canalopatias, disfunção da sinapse, defeitos de transporte, distúrbios na sinalização, alterações transcricionais e no reparo do DNA (McTague et al., 2016). Muitos genes previamente sem fenótipo associado estão sendo descritos como responsáveis pelas DEEs, novos mecanismos e funções dos diferentes genes estão sendo estudados tanto no sistema nervoso como em outros tecidos.

Ao longo dos seis anos deste estudo, acompanhamos o grande avanço da genética, sobretudo na temática da epilepsia e, particularmente, nas DEEs. Em 2016, existiam apenas 37 genes catalogados no OMIM (*Online Mendelian Inheritance In Man*) como responsáveis pelas DEE. Ao longo desses anos, aproximadamente, 10 novos genes, por ano, foram inseridos nesta plataforma e, até abril de 2022, foram catalogados 102 genes associados às DEEs ([www.omim.org](http://www.omim.org)).

Vale ressaltar que houve um avanço muito importante na área da genética, além da diminuição dos custos dos testes moleculares. Nesse contexto, a identificação da variante patogênica, nos pacientes com DEEs, vem auxiliando, cada vez mais, na orientação terapêutica, na definição prognóstica e no aconselhamento genético. Outros aspectos muito importantes quando se estabelece a causa das DEEs são: redução do tempo da jornada do diagnóstico, menor realização de exames complementares desnecessários, tratamento mais especializado, incluindo escolha de melhores fármacos anticrises (FAC) e outras terapias.

Nesta tese, será destacada uma série de pacientes com DEE, de início antes dos dois anos de vida, procurando-se correlacionar o fenótipo das DEEs com o genótipo identificado.



Esta tese será dividida em sete capítulos sendo o primeiro relacionado à revisão de literatura, objetivos, material e métodos; o segundo, relacionado aos resultados da casuística de uma série de casos; do terceiro ao sexto, os artigos publicados em periódicos com revisão por pares, gerados a partir desta tese; o sétimo, a discussão e conclusões.

## **II OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo principal**

Descrever as características clínicas e genéticas de uma série de pacientes com diagnóstico de DEE com início de crises epiléticas até o segundo ano de vida.

### **2.2 Objetivos secundários**

- avaliar o desempenho do NGS no diagnóstico das DEEs;
- avaliar o papel da reanálise periódica dos dados de NGS em casos negativos de DEE;
- contribuir para a caracterização clínica e genética de algumas formas de DEEs;
- avaliar a frequência dos diferentes genes associados às DEEs em nossa casuística; e
- propor um roteiro de investigação das DEEs.

### III REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Definições de crise epiléptica, epilepsia e síndrome epiléptica

Define-se **crise epiléptica** como a ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas em razão da atividade neuronal anormal excessiva e síncrona cerebral (Fisher et al., 2014)

A **epilepsia** é um distúrbio cerebral caracterizado por uma predisposição persistente de gerar crises epiléticas, associada às consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais (Fisher et al., 2014).

As ligas e agências internacionais como a ILAE e a IBE (*International Bureau for Epilepsy*) consideram a epilepsia como uma doença e não como um distúrbio. O uso do termo “distúrbio” não é aconselhado por reduzir a relevância desta condição e por minimizar uma série de problemas relacionados à epilepsia (Fisher et al. 2014).

A definição prática e operacional da epilepsia requer a ocorrência, tal como descrito a seguir (Fisher et al., 2014; Fisher, 2017a):

- a) pelo menos, duas crises não provocadas (ou reflexas), com um intervalo entre elas maior e superior a 24 horas ou;
- b) uma crise não provocada (ou reflexa), cuja probabilidade de ocorrência de crises subsequentes é pelo menos de 60%; e
- c) diagnóstico de uma síndrome epilética.

No item b, a probabilidade igual ou superior a 60% foi considerada por ser uma chance maior de recorrência de crises na população geral, no período de dez anos. Os fatores de risco de recorrência, após a primeira crise, foram tema de vários estudos, sendo os principais a alteração do eletroencefalograma (EEG) e crises epiléticas secundárias a alguma lesão. Nestes casos, há risco entre 60-70% de recorrência de crises epiléticas (Berg, 2008; Fisher et al. 2014).

A epilepsia é considerada resolvida nos indivíduos que tiveram uma síndrome idade-dependente e que estão fora da faixa etária de risco de ocorrência de crises ou

naqueles indivíduos que ficaram livres de crises epiléticas, no mínimo, nos últimos 10 anos e sem FAC nos últimos cinco anos. Nessa concepção, o termo “resolvida” não é, necessariamente, idêntico aos conceitos de “cura” ou de “remissão” (Fisher et al., 2014).

A **síndrome epilética** é definida como um conjunto de características incluindo tipos clássicos de crises epiléticas, EEG e neuroimagem que tendem a ocorrer em conjunto. Estas características são sobretudo relacionadas à idade (início das crises e remissão, quando aplicável), fatores desencadeantes, variação durante o dia, prognóstico e comorbidades. Além disso, as síndromes podem ter implicações etiológicas, prognósticas e terapêuticas (Wirrell et al., 2022).

As definições práticas e revisadas destes termos auxiliam na padronização dos dos conceitos entre pesquisadores e pacientes e permitem intervenções precoces, incluindo o tratamento para se evitar risco de novas crises, progressão da epilepsia e início de comorbidades (Fisher et al., 2014).

Nessa tese, utilizaremos todos estes termos no contexto da investigação diagnóstica, caracterização clínica, em especial, em faixas etárias.

### **3.2 Classificações das crises epiléticas, de epilepsia e das síndromes epiléticas**

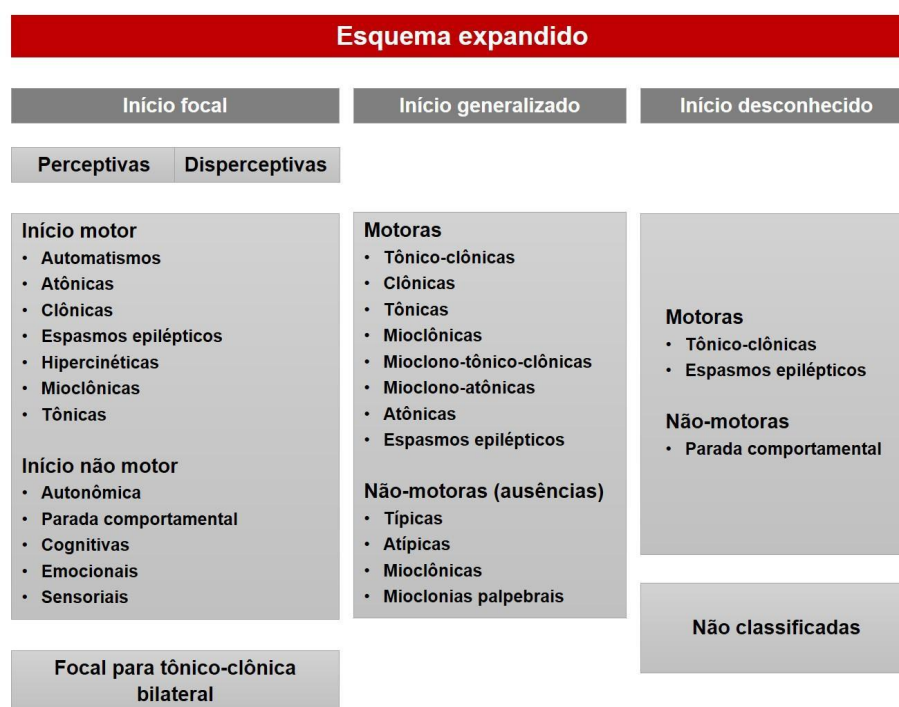
A última versão da classificação das crises pela ILAE as definiu em quatro categorias. As crises (Fisher et al., 2017a, 2017b) (Figura 1):

a) Início focal: perceptivas ou disperceptivas:

- com início motor: automatismos, atônicas, clônicas, espasmos epiléticos, hipercinéticos, mioclônicas, tônicas;
- com início não motor: autonômicas, parada comportamental, cognitivas, emocionais e sensoriais;
- com início focal evoluindo para tônico-clônica bilateral;

b) Início generalizado:

- com manifestações motoras: tônico-clônicas, clônicas, tônicas, mioclônicas, mioclônico-tônico-clônicas, mioclônicas-atônicas, atônicas, espasmos epiléticos;
  - com manifestações não motoras (ausências): típicas, atípicas, mioclônicas, mioclonias palpebrais;
- c) Início desconhecido: motoras (tônico-clônicas, espasmos epiléticos) ou não motoras (parada comportamental); e
- d) Não classificadas.

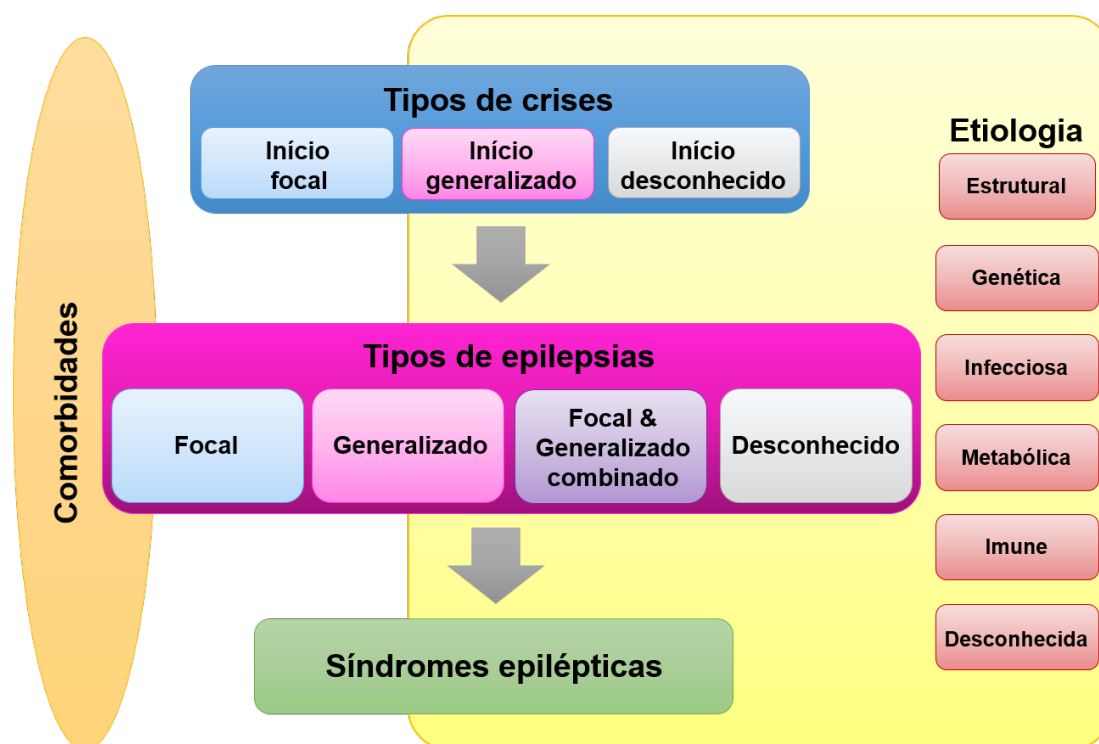


**Figura 1** - Esquema ilustrativo da classificação das crises epiléticas, conforme a ILAE, 2017 (traduzido para o português e cedido pela Liga Brasileira de Epilepsia- LBE)

Com a evolução do conhecimento e com a determinação de novas etiologias para as epilepsias, a classificação das crises de 1981 e das epilepsias de 1989, não contemplavam todas as possibilidades de estratificação e caracterização. Em 2010, novas concepções começaram a ser utilizadas nas classificações, incluindo as epilepsias de causas genética, estrutural e metabólica. O termo desconhecido também foi incluído nessa classificação. Estes novos termos foram introduzidos para

substituir as etiologias até então definidas como idiopática, sintomática e criptogênica (Berg et al., 2010).

Na Figura 2, que ilustra a nova classificação das epilepsias, conforme a ILAE (2017), demonstram-se, no primeiro nível, as crises epiléticas seguidas, no segundo nível, os tipos de epilepsias e, no terceiro nível, as síndromes epiléticas. Outros aspectos importantes foram acrescentados nesta classificação, como as etiologias e as comorbidades das epilepsias (Fisher et al., 2017a, 2017b; Scheffer et al., 2017).



**Figura 2** - Esquema ilustrativo da classificação das epilepsias conforme a ILAE, 2017 (traduzido para o português e cedido pela Liga Brasileira de Epilepsia - LBE)

Na nova classificação de 2017, diferente da que foi proposta por Berg et al. (Berg & Millichap, 2010, 2013), temos as epilepsias de início focal e generalizado combinado e a epilepsia de início desconhecido (Berg; Millichap, 2013; Fisher, 2017; Scheffer et al., 2017).

Entre 2009 e 2021, a Força Tarefa da ILAE reuniu vários epileptologistas do mundo para elaborar uma posição oficial de classificação e definição das síndromes

epilépticas. Nesse contexto, as síndromes epiléticas que iniciam no período neonatal e no lactente foram divididas em três grupos: (a) síndromes epiléticas autolimitadas (neonatal, neonatal/lactente, infância, síndrome epiléticas com espectro de crises febris plus ou GEFS+, *Generalized Epilepsy with Febrile Seizures plus*), (b) DEEs e, (c) síndromes com etiologias específicas (como o *KCNQ2*, *CDKL5*, *PCDH19*, *MECP2*, deficiência de piridoxina, síndrome da deficiência do transportador de glicose (GLUT-1) (Wirrel et al., 2022).

### 3.3 Encefalopatias epiléticas e do desenvolvimento (DEE)

A primeira descrição de EE ocorreu em 1857, com a descrição da Síndrome de West (SW). Posteriormente, outras síndromes foram englobadas com esse termo (apud Capovilla et al., 2013\*).

O termo EE foi definido por Engel et al. (2006), como sendo condições neurológicas, cujas evidências clínicas suportavam a noção de que havia um processo neurodegenerativo idade-dependente. A ILAE, em 2016, recomenda que os termos encefalopatia do desenvolvimento e EE possam ser utilizados independentemente, ou em conjunto, dando origem assim ao termo DEE (Howell et al., 2016) que, em 2017, foi incorporado à revisão formal de classificação. Tal mudança foi feita a partir do reconhecimento de grande número de variantes patogênicas responsáveis por EE que levavam a impacto negativo no desenvolvimento, independente do controle das crises epiléticas (Howell et al., 2016; Scheffer et al., 2017; Scheffer; Liao, 2020).

No contexto histórico das DEEs, vale a pena ressaltar que a plataforma OMIM (base de dados *online* de genes humanos e suas implicações clínicas) provém de informações sobre o papel biológico das proteínas codificadas pelo gene, um sumário das evidências clínicas responsáveis pelo papel do gene na doença e; quando disponível, uma lista de algumas variantes descritas na literatura responsáveis por aquele fenótipo. No caso das DEEs, estas foram catalogadas na plataforma de forma

---

\* apud Capovilla G et al. The history of the concept of epileptic encephalopathy. *Epilepsia*. 2013 Nov;54 Suppl 8:2-5.

cronológica. Em 2020, a plataforma OMIM, incorporou o fenótipo de EEIE (Encefalopatia Epiléptica de Início Precoce - *Epileptic Encephalopathy, Infantile Early*) no grupo das DEEs. Os métodos genéticos avançados permitiram uma delimitação mais específica dessas doenças clinicamente definidas em nível molecular, o que levou a sua classificação, como tipos de DEEs com base no defeito genético.

Estima-se que a incidência de DEE seja entre 0,1 e 4,3 em 10.000 nascidos vivos na faixa etária infantil até a faixa escolar, variando de acordo com cada síndrome epiléptica (Hino-Fukuyo et al., 2009; Wirrell et al., 2022; Zuberi et al., 2022).

Em sua maioria, as crises epilépticas nas DEEs são resistentes às FAC e representam um desafio na investigação e no tratamento. Mesmo com uma vasta investigação, existe uma significativa proporção de pacientes com DEEs que permanecem sem etiologia definida. O tratamento das DEEs é desafiador e consiste no uso de FAC, muitas vezes, em politerapia, com efeitos colaterais adicionados ao quadro de encefalopatia já instalada (Helbig; Tayoun, 2016).

As síndromes epilépticas que cursam com DEEs, até 2020, eram divididas em: (a) até o segundo ano de vida: Encefalopatia Mioclônica Precoce (EMP), Síndrome de Ohtahara (SO) e Epilepsia da Infância com Crises Focais Migratórias (EICFM), SW e a Síndrome de Dravet (SD); (b) após o segundo ano de vida: epilepsia com crises mioclônicas-atônicas (Síndrome de Doose), a síndrome de Lennox-Gastaut (SLG), epilepsias focais lesionais, Síndrome de Rasmussen e o SE com espícula-onda contínua durante o sono e a síndrome de Landau-Kleffner (SLK) (Berg; Millichap, 2013; Scheffer; Liao, 2020).

No ano de 2021, a Força Tarefa da ILAE classificou as DEEs de início até o segundo ano de vida em cinco grupos ou síndromes epilépticas, os critérios recomendados para os diagnósticos estão demonstrados nos apêndices (Wirrell et al., 2022):

- a) DEE de início precoce (DEEIP), que engloba as síndromes EMP e SO, visto que ambas têm considerável sobreposição, compartilham etiologias semelhantes e tem terapêutica, prognóstico e manejo similares. A DEEIP é caracterizada por início da epilepsia nos primeiros três meses de vida com crises epilépticas



frequentes e resistentes às FAC; alterações neurológicas (postura, tônus e movimentos anormais); atraso de DNPM (ADNPM); anormalidades do EEG interictal (padrão de surto-supressão, paroxismos epileptiformes multifocais ou alentecimento difuso). A neuroimagem e os exames metabólicos e genéticos permitem a classificação etiológica em aproximadamente 80% dos casos. A incidência estimada de DEEIP é 10/100.000 nascidos vivos. As crises epiléticas podem ser de vários tipos: tônicas, mioclonias, espasmos epiléticos, crises sequenciais, que podem incluir tônica clônica e/ou componentes autonômicos e também automatismos sem um tipo apenas de crise. Uma causa genética pode ser identificada em mais de 50% dos indivíduos (Zuberi et al., 2022).

- b) Epilepsia da Infância com Crises Focais Migratórias (EICFM), é caracterizada por crises focais no primeiro ano de vida, com ou sem associação com grave encefalopatia. As crises epiléticas são, obrigatoriamente, focais motoras clônicas ou tônicas, associadas ou não a fenômenos autonômicos. Podem ocorrer espasmos, porém estes são raros. As crises podem ter envolvimento independente e de múltiplas regiões corticais, sendo frequentes e prolongadas com episódios de SE. Inicialmente, as crises epiléticas são esporádicas e rapidamente aumentam sua frequência em semanas e meses após o início. A incidência foi 0,11 por 100.000 nascidos vivos. O EEG mostra atividade epileptiforme focal, de forma independente e em múltiplas regiões corticais (Khan; Al Baradie, 2012; Wong-Kisiel; Nickels, 2013; Zuberi et al., 2022).
- c) Síndrome com Espasmos Epiléticos Infantis (SEEI) - termo proposto para englobar tanto a SW como crianças com espasmos epiléticos que não preenchem os critérios para SW (espasmos epiléticos, hipsarritmia e regressão ou estagnação do DNPM). A SEEI é caracterizada por espasmos epiléticos (contrações abruptas, menos de 3 segundos, em flexão ou extensão, ocorrendo em agrupamentos, por período de minutos), podendo ser associadas às crises focais (sobretudo quando há lesão estrutural). Geralmente, inicia-se aos 3-12 meses, variando de 1-24 meses. O prognóstico está relacionado à precocidade do diagnóstico, e ao tratamento, obviamente, à doença de base. A incidência é 30/100.000 nascimentos. Classicamente, o EEG é constituído por um padrão denominado hipsarritmia, que é caracterizado por ondas lentas de elevada

amplitude (300  $\mu$ V), associadas a paroxismos epileptiformes irregulares com morfologias variadas, de ocorrência anárquica e com múltiplos campos. Durante o sono não-REM (*Rapid Eye Movement*), há acentuação do padrão irregular e elevada amplitude dos ritmos cerebrais. A associação com a etiologia genética pode ser até de 41% dos casos (Khan; Al Baradie, 2012; Wong-Kisiel; Nickels, 2013; Zuberi et al., 2022).

- d) Síndrome de Dravet (SD) - previamente denominada epilepsia mioclônica grave da infância, é caracterizada por crises epiléticas prolongadas, febris e afebris, do tipo focais (inicialmente, hemiclônicas e focais disperceptivas na evolução) e crises tônico clônicas generalizadas ou bilaterais (CTCG ou CTCB); e, posteriormente, crises de ausências, mioclônicas, atônicas), que começam sobretudo no primeiro ano, em geral entre 3 e 9 meses de vida, sendo raros os casos de início mais tardio, após os 20 meses de idade. Geralmente, as crises são refratárias aos FAC. No início, o EEG pode ser normal e, posteriormente, há atividade epileptiforme generalizada de complexo de espícula-onda, multiespícula-onda e, também, alterações focais. A incidência é de, aproximadamente 6,5 para cada 100.000 nascidos vivos. Além das crises epiléticas, nessa síndrome também pode ocorrer ataxia, ADNPM, alterações comportamentais, atraso de linguagem e, algumas vezes, é acompanhada de declínio cognitivo. A associação com *SCN1A* está presente em 80-85% dos casos (Berg et al., 2010; Khan; Al Baradie, 2012; Oguni et al., 2013; Zuberi et al., 2022).
- e) Síndromes com etiologia específicas – englobam as epilepsias que têm fenótipos eletroclínicos fortemente associados com etiologias específicas, como as epilepsias causadas por variantes patogênicas em *KCNQ2*, *CDKL5*, *PCDH19*, *SCL2A1*, *MECP2* e *STXBPI* e a presença de um cromossomo marcador InvDup 15 (Zuberi et al., 2022).

### 3.4 Epidemiologia

Em países desenvolvidos, a prevalência de epilepsia varia entre 4 e 10 por 1.000 indivíduos por ano, esta taxa é maior nos países de baixo ou médio índice de desenvolvimento (Noronha et al., 2007).

Estudos brasileiros demonstraram a prevalência de epilepsia entre 9,2 e 18,6 em 1.000 indivíduos, sendo a epilepsia ativa entre 5,4 (Noronha et al., 2007) e 8,2 em 1.000 indivíduos (Borges et al., 2004). Sampaio et al., 2010, identificaram uma prevalência de histórico de epilepsia em crianças em uma comunidade com privação de recursos de 9,2 em 1.000 indivíduos e de 8,7 em 1.000 indivíduos com epilepsia ativa.

Um declínio da incidência de epilepsia na infância tem sido observado, durante os últimos 30 anos, nos países em desenvolvimento, mas tem ocorrido um paralelo de aumento na incidência de epilepsia em idosos (Carpio; Hauser, 2009; Noronha et al., 2007).

As epilepsias têm distribuição etária bimodal com um pico na infância e outro, após os 60 anos. Aproximadamente, 70 a 75 % dos casos respondem satisfatoriamente ao tratamento com as drogas antiepilépticas; entretanto, casos refratários não são raros, especialmente, quando se considera a epilepsia na infância (Carpio; Hauser, 2009).

### 3.5 Aspectos genéticos na investigação das epilepsias

As epilepsias podem ter causas multifatoriais (determinadas por vários genes de susceptibilidade associados a fatores ambientais) ou monogênicas (mendelianas). Há uma série de variantes genômicas comuns e raras com efeitos diversos. Estima-se que 40% das epilepsias tenham etiologia genética, sendo 1% causada por formas monogênicas. Estas têm uma grande relevância clínica entre as DEEs (Beghi et al., 2014; Kwan; Brodie, 2000; Möller et al., 2015), o que será o foco desta tese.

Nos anos entre 2007 e 2013, ocorreram diversos estudos colaborativos das epilepsias, inclusive nas DEEs, tais como os projetos Epi4K Consortium e EPGP

(*The Epilepsy Phenome/Genome Project*), ambos patrocinados pelo NINDS (*National Institute of Neurological Disorders and Stroke*). O Epi4K Consortium consistiu no estudo de 4.000 indivíduos com SEEI e SLG (Epi4k Consortium, 2013, 2015; Kearney, 2014). O EPGP foi um estudo multi-institucional para estudar o fenótipo e o genótipo por meio da análise do DNA de 5.250 indivíduos com formas específicas de epilepsia (epilepsia generalizada ou epilepsia focal, SEEI e SLG). Em 2014, colaboradores de muitos centros criaram o Epi25 (*Epi25 Collaborative*) para sequenciar até 25.000 pacientes com epilepsia em todo o mundo. O objetivo do projeto é determinar até que ponto as epilepsias raras e comuns compartilham mecanismos genéticos e se o risco genético surge somente por mutações *de novo* ou também por variantes genéticas herdadas, mais frequentes na população. Esta abordagem poderá ajudar algumas questões fundamentais sobre a importância de variantes raras e comuns para formas específicas de epilepsia. Até o presente momento, os estudos colaborativos do Epi25 (*Epi25 Collaborative*, 2019, 2021; [www.epi-25.org](http://www.epi-25.org)) têm rendido muitas publicações.

O diagnóstico etiológico para os casos de DEEs possibilita o manejo e o planejamento terapêutico tanto de cuidados a longo prazo, tais como indicação mais precoce de gastrostomia como de acesso às informações, serviços e terapias precoces. Contribui também para o término da “odisseia do diagnóstico” ou excesso de exames complementares em busca de diagnóstico (McTague et al., 2016).

### 3.5.1 Aspectos básicos de genética

O genoma humano é constituído pelos 22 pares de cromossomos autossômicos, pelo par de cromossomos sexuais (XX ou XY) e pelo DNA mitocondrial. O DNA nuclear encontra-se associado às histonas e quanto maior a interação entre o DNA (de natureza ácida e negativa) com as histonas (de caráter básico e positivo), maior será o nível de compactação da cromatina e menos favorável será o ambiente para a transcrição.

Entende-se por gene uma sequência de DNA, que pode ser transcrita formando um RNA funcional. No contexto desta tese, consideramos os genes que codificam as proteínas a partir de um RNA mensageiro (RNAm).

Nem todo genoma humano é constituído por genes, a sua maior parte é formada por DNA repetitivo, como os transposons, regiões teloméricas e centroméricas. No entanto, a maioria das doenças humanas de origem genética são determinadas por variantes presentes nas regiões codificantes dos cerca de 20 mil genes que codificam proteínas (Strachan, 2013).

As variantes patogênicas relacionadas às doenças genéticas podem ocorrer tanto na região regulatória como na unidade de transcrição dos genes (segmento de DNA que servirá como molde para síntese de uma molécula de ácido ribonucleico - RNA). Essa unidade é constituída por regiões codificantes, ou éxons (correspondendo a apenas 2% do todo genoma humano). A porção traduzida do RNAm corresponde à sequência de aminoácidos de um polipeptídeo; e por regiões não codificantes, ou íntrons, que serão removidos no RNAm por um processo denominado *splicing* (Strachan, 2013).

As mutações são alterações estruturais do DNA, que não foram corrigidas pelo sistema de reparo, tornando-se, portanto, definitivas. A mutação pode ser gênica - alterando a estrutura do gene (p.ex., mutações de ponto) - ou cromossômica - alterando a estrutura do cromossomo (p.ex., deleções, duplicações, trissomias e monossomias). Se a mutação altera a função daquele gene que codifica a proteína e, como consequência há um prejuízo da função de seu produto, denomina-se variante patogênica (Strachan, 2013).

As mutações gênicas podem ser divididas conforme sua alteração estrutural e sua localização em:

- a) Se ocorrer troca de um nucleotídeo (mutação de ponto) em região exônica, que é traduzida, ela pode ser classificada como:
  - Mutação sinônima: substituição de um único nucleotídeo que não altera o aminoácido codificado e, habitualmente, não tem repercussão clínica. No entanto, ela, ocasionalmente, pode interferir com o processo normal de *splicing*;
  - Mutação não-sinônima ou *missense*: leva à substituição de um aminoácido por outro, alterando a sequência polipeptídica final;

- Mutações sem sentido, ou *nonsense* - a troca de um nucleotídeo resulta em um códon de parada (*stop codon*), resultando em uma sequência polipeptídica incompleta que, possivelmente, será degradada.
- b) Inserção e/ou deleção de nucleotídeos nos éxons, os chamados *indel*, que envolvem menos do que 50 pb (pares de base). Uma vez que cada três nucleotídeos presentes nos éxons codificam um aminoácido, variações que sejam múltiplas de três terão efeito diferente das que não são divisíveis por este número. Assim, nesta categoria estão incluídas alterações que levam à manutenção da matriz de leitura, denominada variante *inframe* e também as que promovem mudança desta matriz, ou *frameshift*;
- c) CNV (*copy number variation*, variação no número de cópias) - quando ocorre deleções ou duplicações de segmentos do genoma com mais de 50 pb;
- d) Mutações intrônicas próximas ao sítio de *splicing*, quer sejam mutações de ponto ou *indels*, podem comprometer a remoção correta desses íntrons e, conseqüentemente, levar à formação de RNAm anômalo, que irá codificar uma proteína defeituosa ou incompleta; e
- e) Mutações em regiões regulatórias, que não são identificáveis nos exames de sequenciamento dos éxons, podem comprometer a transcrição gênica e, até mesmo, levar a seu silenciamento.

As mutações gênicas também podem ser divididas quanto seu efeito fenotípico em:

- a) Ganho de função (GOF – *gain of function*): variante gênica que determina a produção de uma proteína alterada com aumento de sua atividade ou que adquire uma outra função;
- b) Perda de função (LOF – *loss of function*): variante gênica que determina uma diminuição ou perda da atividade da proteína. Neste grupo, observamos: haplossuficiência, que ocorre quando apenas uma cópia alterada, não afeta o fenótipo do heterozigoto, que é normal, uma vez que apenas 50 por cento do produto proteico é suficiente para manutenção da função celular; haploinsuficiência, quando basta haver uma cópia alterada, para que o heterozigoto apresente a doença, pois é necessário mais que 50 por cento do

produto proteico; e, por último, o efeito dominante negativo, que ocorre quando a cópia alterada codifica uma proteína que compromete a funcionalidade da proteína normal, levando a ocorrência de sintomas.

O conhecimento do padrão de herança, pode ser autossômico, ligado ao cromossomo X ou mitocondrial, que auxilia na caracterização da doença. Nas formas autossômicas dominantes, observam-se haploinsuficiência, efeito dominante negativo ou ganho de função, nas formas autossômicas recessivas, há haplossuficiência.

Nos casos em que as variantes patogênicas estão localizadas no cromossomo X, denomina-se padrão de herança ligado ao X, que no sexo feminino pode ser dominante ou recessivo e no sexo masculino, habitualmente, assume sua expressão máxima.

A penetrância incompleta pode ocorrer em doenças de herança autossômica dominante e faz com que parte dos indivíduos que possuem a variante patogênica não manifestem a doença. A redução da penetrância e a variabilidade na expressão da doença é, provavelmente, multifatorial, incluindo variações individuais, genes modificadores, fatores epigenéticos e interações ambientais (Smith; Walsh, 2020).

### 3.5.2 Tipos de testes genéticos

Existem várias tecnologias disponíveis para se identificar as doenças genéticas, cada qual com suas indicações e limitações (Gürsoy; Erçal, 2016; Helbig et al., 2016; Helbig; Koeleman, 2017; Lowenstein, 2013; Ng et al., 2010):

Os principais exames genéticos disponíveis são:

- a) Cariótipo, que permite reconhecer as alterações no número de cromossomos (aneuploidias) e identificar perdas e ganhos de grandes segmentos de DNA, com dimensões de, no mínimo, 4Mb (mega bases), assim como translocações cromossômicas envolvendo longos segmentos de DNA. É um exame que deve ser considerado frente à suspeita de aneuploidias, tais como as síndromes de Down e de Patau, e na investigação de malformações múltiplas ou de distúrbios do neurodesenvolvimento associados a dismorfias maiores.

Fora deste contexto, este exame tem uma contribuição muito limitada na investigação etiológica das epilepsias (Morrison-Levy, et al., 2021).

- b) Citogenética molecular, que inclui diversas técnicas cujo objetivo é identificar ganhos e perdas de segmentos cromossômicos, que podem ser dedicadas ou abrangentes. Entre as **técnicas dedicadas**, duas se destacam:
- FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*, ou hibridização fluorescente *in situ*), que procura, utilizando sondas com marcadores fluorescentes, identificar a localização e o número de regiões cromossômicas em um cariótipo. Atualmente seu uso está restrito a identificação de segmentos cromossômicos translocados (Pedroso et al., 2019);
  - MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*, ou ensaio multiplexado dependente de ligação de sonda), muito utilizado, atualmente, para a identificação de CNVs, envolvendo um ou múltiplos exons de genes específicos (Pedroso et al., 2019);

A principal e amplamente técnica utilizada de **avaliação abrangente da integridade do genoma** é o estudo por microarray cromossômico (*chromosomal microarray*). Esta técnica utiliza plataformas que passaram por muitas modificações ao longo dos anos, mas todas elas têm o objetivo de identificar CNVs ao longo de todo o genoma. Existem duas técnicas: CGH-Array (*Comparative Genomic Hybridization Array*) e SNP-Array (*Single Nucleotide Polymorphism Array*). A que é mais amplamente utilizada, atualmente, é a plataforma de arranjos de SNPs (SNP-array), que além de reconhecer CNVs, consegue identificar regiões de perda de heterozigose, decorrentes de dissomia uniparental ou de ancestralidade próxima, sugestiva de consanguinidade (Pedroso et al., 2019). Alguns estudos têm apontado o papel de CNVs na patogênese de vários tipos de epilepsia, sendo nas DEEs, a taxa de positividade pode chegar até 8% com o uso das de SNP-Arrays (Mefford, et al., 2011). Um estudo de metanálise mostrou que os testes de microarray cromossômicos tiveram uma contribuição no diagnóstico de epilepsia de 8% (intervalo de confiança de 95%: 6 e 12%) (Sánchez Fernández et al., 2019).



- c) Genética molecular tradicional, consiste na pesquisa de variantes por meio do sequenciamento individual de um gene, com o rastreamento de todos os seus éxons e sequências intrônicas que os flanqueiam. Quando se tem necessidade de investigar condições que podem ser causadas por alterações em um entre muitos genes, as técnicas de sequenciamento ortogonal, também, conhecidas como técnica de Sanger, são muito onerosas e trabalhosas. Desta forma, elas mostram-se pouco eficientes na investigação das DEEs, uma vez que há muitos genes que podem estar associados a esse quadro clínico, quase sempre com diferentes variantes patogênicas. Contudo, o sequenciamento por Sanger pode ser usado para o estudo de segregação da variante identificada em um indivíduo (genotipagem parental) ou no rastreamento de portadores em casos de doenças autossômicas dominantes ou de herança ligada ao X. Adicionalmente, pode ser empregada também para cobrir regiões que foram, incompletamente, analisadas ou tiveram baixa cobertura pelo sequenciamento de nova geração (NGS, *Next Generation Sequencing*). É útil também na confirmação de mosaïcismo somático (Pedroso et al., 2019).
- d) Genética molecular por NGS, que pode ser utilizada para sequenciar um único gene, um painel de genes, todos os éxons de todos os genes (ou sequenciamento completo do exoma, WES – *Whole Exome Sequencing*) ou todo o genoma (sequenciamento completo do genoma, WGS). Esta técnica surgiu em 2008 (Ng et al., 2008; Ng et al., 2010) e permite obter-se muitas informações sobre a sequência do DNA a um custo muito mais baixo que o sequenciamento dos mesmos éxons por técnica de Sanger (Helbig; Lowenstein, 2013; Gürsoy; Erçal, 2016; Helbig et al., 2016; Koeleman, 2017). Dependendo do tipo de sequenciador e das tecnologias de análise (NGS de leitura profunda e rastreio de alto rendimento), podem-se detectar mutações de ponto e *indels* nos éxons, identificar CNVs e sequenciar o genoma mitocondrial completo (Mefford et al., 2011; Oslon et al., 2014; Project Epi4K Consortium, 2015; Borlot et al., 2017; Morrison-Levy et al., 2021).

O WES é muito útil em casos em que o fenótipo não é bem estabelecido. Além disso, a aplicação dele em trios de pais e filhos vem sendo bem-sucedida na

identificação de mutações ocorridas, como um evento mutacional "de novo" em pacientes com DEEs. A outra vantagem é a possibilidade de se reanalisar os dados, graças ao avanço do conhecimento científico. A maioria dos estudos sugerem entre dois e três anos o intervalo para se fazer uma reanálise. A contribuição do WES no diagnóstico (taxa de positividade) das epilepsias é de 20-40% nos diversos estudos (Borlot, 2017; Jain et al., 2019; Borlot et al., 2021). O estudo de metanálise mostrou que a taxa de positividade do WES foi de 45% (intervalo de confiança de 95%; 33 a 57%). No entanto, nas DEEs, essa taxa de positividade pode chegar até 60% (Sánchez Fernández et al., 2019).

Usando a mesma plataforma do WES, é possível reduzir o número de genes investigados, por meio de painéis (grupo de genes candidatos mais adequados para determinado fenótipo) que variam, de acordo com o laboratório. O painel genético para epilepsia é utilizado desde 2012, surgiu na tentativa de reduzir os custos quando comparado ao WES. Entretanto, a possibilidade de diagnóstico depende, provavelmente, do número de genes incluídos no painel e dos fenótipos dos pacientes selecionados para a análise, variando entre 10 e 48,5% a taxa de positividade (Sánchez Fernández et al., 2019). Um número crescente de laboratórios optou por utilizar uma abordagem de painel genético bioinformático, no qual o exoma é sequenciado, mas são analisados apenas genes pré-definidos. Nesse caso, o painel pode ser reanalisado, expandindo o número de genes investigados (Möller et al., 2014).

O estudo de metanálise dos testes diagnósticos genéticos demonstrou que os painéis e o WES são testes com melhor custo efetividade para o diagnóstico das DEEs (Sánchez Fernández et al., 2019).

### **3.5.3 Ferramentas bioinformáticas de apoio ao diagnóstico**

Existem diversas ferramentas de predição de patogenicidade, alimentadas por diferentes bancos de dados, como por exemplo o CADD (*Combined Annotation Dependent Depletion*) (<https://cadd.gs.washington.edu/>) e Polyphen (*Polymorphism Phenotyping*) (<http://genetics.bwh.harvard.edu>) que são úteis para predizer o efeito funcional causado pelas variantes *missense*. Outras ferramentas importantes

utilizadas na prática clínica são: Mutation Taster (<https://www.mutationtaster.org>), Varsome (<https://varsome.com>) e Franklin (<https://franklin.genoox.com>).

Para o *SCN1A*, existe um modelo de predição de epilepsia baseada em uma coorte internacional bem caracterizada, de 1.018 pacientes *SCN1A* - SD positivo e GEFS+ com dados de cinco países e validado, utilizando duas coortes cegas independentes da Austrália e da Bélgica que podem ser úteis na prática clínica (<https://scn1a-prediction-model.broadinstitute.org>).

Outra ferramenta muito utilizada é o Uniprot (Universal Protein Resource - <https://www.uniprot.org>) que traz informações a respeito da estrutura da proteína e sua relação com a variante identificada.

O banco de dados GnomAD (*Genome Aggregation Database*) informa, entre outras funcionalidades, a probabilidade do organismo tolerar a perda de função por haploinsuficiência (pLI -*probability of being loss-of-function intolerant*) de um gene específico. Quanto mais próxima de 1.0 é o pLI, maior será a intolerância à perda de função por haploinsuficiência. O pLI é importante na avaliação de genes, cujo padrão de herança seja ligado ao X ou autossômico dominante (<https://gnomad.broadinstitute.org>), auxiliando na classificação da patogenicidade de variantes observadas em exames genéticos. Em doenças autossômicas recessivas, que classicamente são por genes haplossuficientes, o pLI não se aplica. Outra ferramenta muito utilizada é o repositório de variantes ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) que agrega a classificação proposta por diferentes laboratórios clínicos e busca ainda promover consensos a partir de uma reunião de painel de especialistas.

O Visualizador Integrador de Genômica (IGV – *Integrative Genomic Viewer* - <http://www.broadinstitute.org/igv>) é um visualizador de alto desempenho, capaz de lidar eficientemente com grandes conjuntos de dados heterogêneos ao mesmo tempo, gerando uma visualização didática de sequenciamento de nova geração. Uma característica-chave do IGV é seu foco na natureza integradora dos estudos genômicos, com apoio tanto para dados sequenciais baseados em matriz, como para dados sequenciais da próxima geração, e a integração de dados clínicos e fenotípicos (Thorvaldsdóttir et al., 2013).

A patogenicidade atribuída às variantes utiliza os critérios da ACMG (*American College of Medical Genetics and Genomics*), com base em dados populacionais, preditivos e computacionais, funcionais e herdabilidade. Dessa forma, as mesmas serão classificadas em cinco categorias: patogênica (P, *pathogenic*), provavelmente, patogênica (LP, *likely pathogenic*), variante de significado incerto (VUS, *variant of unknown significance*), provavelmente benigna (LB, *likely benign*) e benigna (B, *benign*) (Richards et al., 2015).

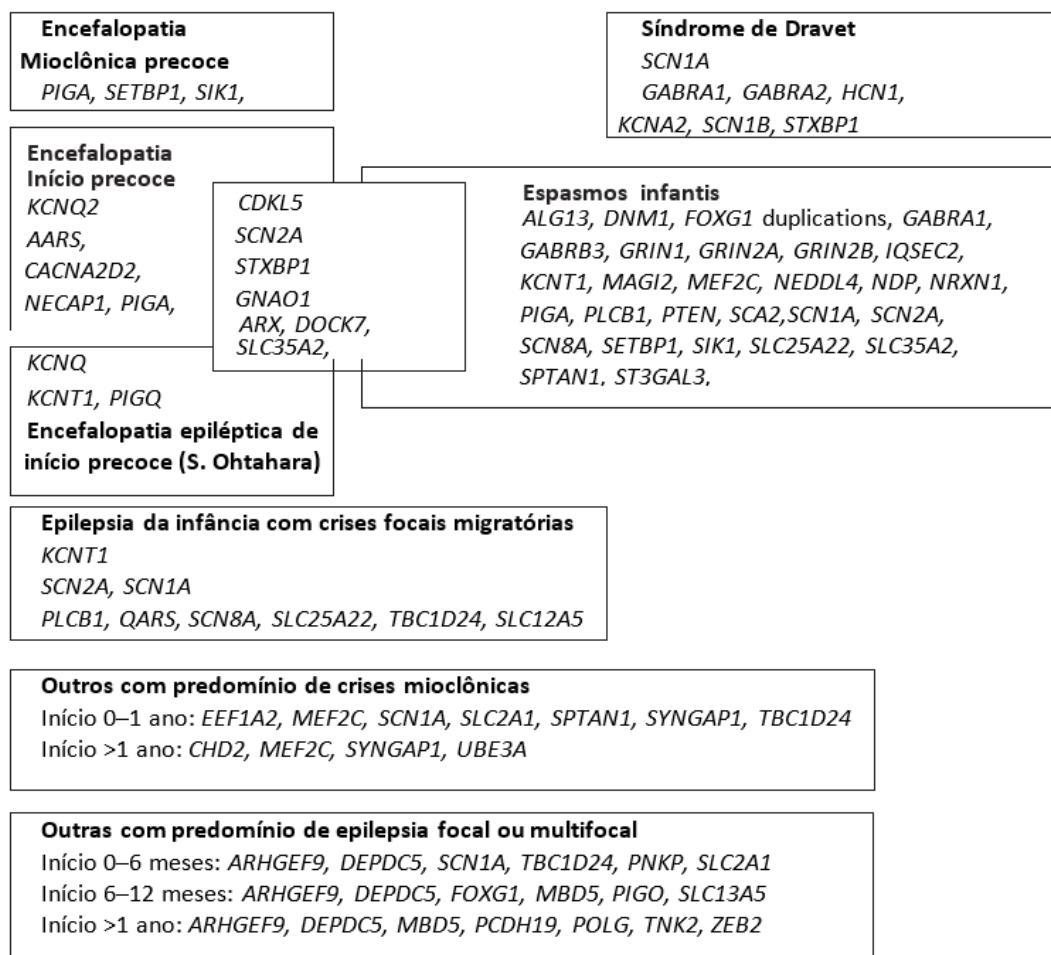
### 3.6 Aspectos clínicos e genéticos das DEEs

Uma das formas para analisar as DEEs é de acordo com a apresentação por síndromes epiléticas e padrão eletrográfico. No período neonatal e lactente, o padrão de surto-supressão, muito característico da SO, é mais frequentemente associado à *ARX*, *SCN8A*, *WWOX*, *STXBPI*, *KCNQ2*, *CDKL5*, *ALDH7A1*, *GNAO1*, *SCN2A*. O padrão eletrográfico de EICFM é, comumente, relacionado aos genes *KCNT1* e *BRAT1* (com taxa de positividade em até 69%). Em casos de espasmos e de hipsarritmia, a taxa de positividade foi 28% dos casos (Ko et al., 2018).

Variantes patogênicas em *PCDH19*, *UBE2A*, *ZEB2*, *CACNA1A*, *MECP2*, *SCN2As* estão associadas a padrões eletrográficos variáveis (Ko et al., 2018). Os achados eletrográficos em algumas DEEs também foram descritos na revisão por Wong-Kisiel e Nickels (2013), envolvendo *CDKL5*, *SCN1A* e *SCN2A*.

Outro estudo, com o objetivo de determinar se algumas características eletrográficas indicativas de epilepsias de causa genética, foi realizado por Hur et al (2017). Os autores analisaram 100 pacientes (50 com causa sabidamente genética e 50 com causa não-genética), e os achados eletrográficos com paroxismos epileptiformes multifocais ou focais pleomórficos e alentecimento difuso foram mais frequentemente encontrados no grupo com epilepsia de causa genética (Hur et al., 2017).

A Figura 3 a seguir ilustra os principais genes e síndromes epiléticas que cursam com DEE:



Fonte: adaptado a partir de Mc Tague et al (2016).

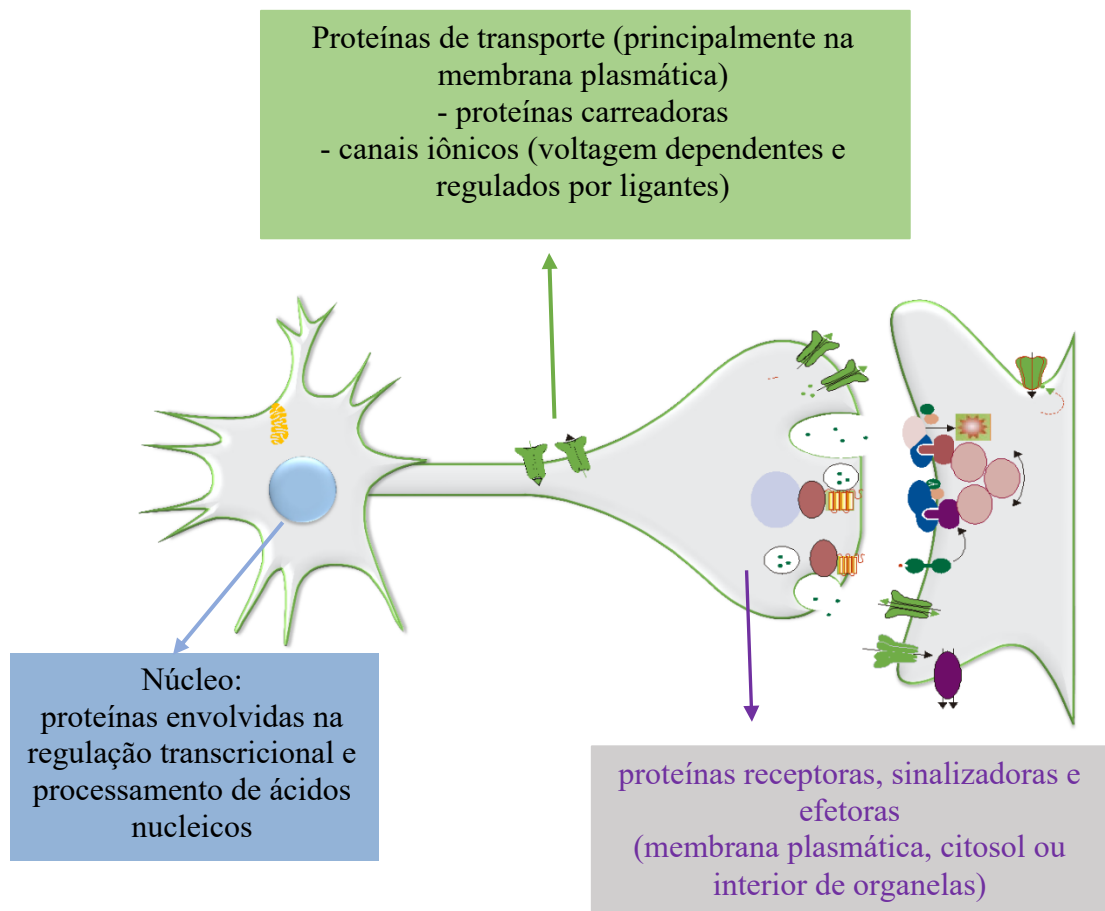
**Figura 3** - Esquema ilustrativo das síndromes epiléticas de causas genéticas monogênicas

### 3.7 Fisiopatologia das DEEs

Nesta revisão de literatura das DEEs, observamos que não há uma classificação funcional homogênea dos genes, variando nos diferentes estudos. Mc Tague et al., 2016, classificaram em sete categorias: canalopatias, disfunções sinápticas, defeitos no transportador, desregulação transcricional, reparo do DNA, remodelamento da cromatina e defeitos metabólicos. Peng et al., 2019, também classificaram em sete categorias, porém um pouco diferentes: transporte transmembrana de íons, metabolismo celular, interação célula-célula, regulação transcricional, modulação de proteínas cinases e transmissão sináptica. Por outro

lado, Symonds e McTague, 2020, classificaram os genes relacionados às DEEs em cinco categorias funcionais distintas: transporte de íons, diferenciação e crescimento celular, processos de regulação das sinapses, transporte e metabolismo de moléculas pequenas dentro e entre as células e regulação da tradução e transcrição do gene.

Os mecanismos fisiopatológicos aqui descritos são os dos genes importantes para as DEEs que encontramos em nossa casuística, sendo simplificados na Figura 4.



Fonte: adaptado a partir de Mc Tague et al., 2016.

**Figura 4** - Esquema ilustrativo de uma célula neuronal com as principais localizações do produto proteico relacionados aos mecanismos fisiopatológicos que levam à DEE

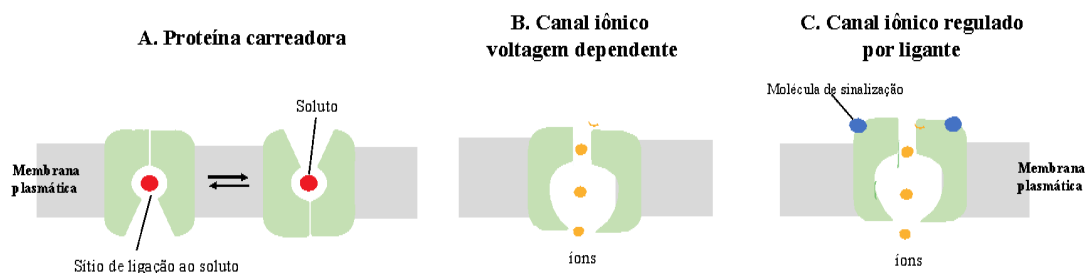
### 3.7.1 Proteínas de transporte transmembrana

As membranas biológicas são constituídas por uma bicamada fosfolipídica e proteínas a elas associadas. No entanto, a maioria das funções específicas da membrana são desempenhadas por suas proteínas. Os tipos de proteínas das membranas são altamente variáveis em quantidade e propriedades funcionais, conforme o tipo celular (Alberts, 2017).

As camadas lipídicas são altamente impermeáveis à maioria das moléculas polares, desta forma, são necessárias proteínas de transporte (transmembrana). A seguir, listamos os principais genes de DEEs encontrados em nossa casuística e suas respectivas funções.

As **proteínas carreadoras** são responsáveis pelas passagens de solutos, tais como íons, açúcares ou aminoácidos. Estas proteínas ligam os solutos a serem transportados e sofrem uma série de mudanças conformacionais para transferi-los por meio da membrana, contra ou a favor do gradiente de concentração (transporte ativo e passivo, respectivamente) (Alberts, 2017) (vide Figura 5). Situação observada nas proteínas codificadas por *ATP7A* (transportador de cobre), *SLC2A1* (glicose), *SLC9A6* (transportador seletivo de sódio-hidrogênio) e *ATPIA3* e *ATP6V1B2* (subunidades de ATPases – sódio/potássio).

Os **canais iônicos** são proteínas multiméricas, constituídas por subunidades, que controlam o influxo e o efluxo de íons (sódio, potássio, cálcio e cloreto) e, conseqüentemente, influenciam no potencial de membrana (Noh et al., 2012). A abertura dos canais ocorre em resposta a estímulos mecânicos, elétricos (canais dependentes de voltagem) ou químicos (canais mediados por ligantes e os receptores metabotrópicos). Dependendo do efeito no potencial de ação, podem ser também classificadas, como canais excitatórios (sódio e cálcio) ou inibitórios (potássio e cloreto). As variantes patogênicas nos genes que codificam esses canais podem resultar em várias doenças, por se expressarem afetando diferentes regiões, tais como o sistema nervoso, muscular e endócrino. No sistema nervoso central (SNC), a mudança no balanço normal iônico das células, em razão da alteração no funcionamento do canal, pode levar a várias alterações clínicas, como encefalopatia e crises epilépticas (Helbig; Tayoun, 2016; Noh et al., 2012;).



Fonte: adaptado a partir de Alberts, 2015.

**Figura 5** - Esquema ilustrativo das proteínas de transporte transmembrana: A. Proteína carreadora, B. Canal iônico voltagem dependente e C. Canal iônico regulado por ligante (receptor ionotrópico)

Os **canais de sódio voltagem dependentes (Nav)** contêm uma subunidade alfa e duas subunidades tipo beta. Variantes patogênicas presentes em genes que codificam estes canais podem levar, desde crises febris até quadros de DEE, como a SD. Esses canais estão presentes em diferentes fases da vida e localizados em distintas regiões do SNC, que nos auxiliam a compreender, em parte, as manifestações clínicas mais precoces, por exemplo. Os genes que codificam os canais de sódio voltagem dependentes das subunidades alfa e que têm relação com epilepsia são: *SCN1A* (Nav1.1), *SCN2A* (Nav1.2), *SCN3A* (Nav1.3) e *SCN8A* (Nav1.6), enquanto o gene *SCN1B* codifica a subunidade beta. As canalopatias por Nav, apresentam, tanto efeitos funcionais de GOF ou LOF sendo mais frequentes o GOF em *SCN2A*, *SCN3A* e *SCN8A* e, LOF em *SCN1A* e *SCN1B* (Bartolini et al., 2019).

Tendo em vista a alta prevalência, as DEEs relacionadas ao *SCN1A*, esta canalopatia será tratada de forma mais específica a seguir.

Nos **canais de potássio voltagem dependentes (Kv)**, temos quatro subunidades com seis segmentos cada. Variantes patogênicas nesses genes podem também levar a diversas condições, como crises neonatais familiares benignas (como o *KCNQ2* e *KCNQ3*), além de quadros de DEEs (Niday; Tzingounis, 2018; Noh et al., 2012). Entre os genes que estão associados à DEE, *KCNQ2*, *KCNB1*, *KCND3* (Niday; Tzingounis, 2018), além da família gênica de *KCNT1* e *KCNT2*, que codifica



subunidades de canais iônicos com papel importante na repolarização, bem como na pós-hiperpolarização lenta, regulando os padrões de disparo dos neurônios. O efeito funcional do tipo LOF está presente sobretudo em *KCNQ2*, *KCNQ3* e, GOF em *KCNT1* e *KCNT2* (Ambrosino et al., 2018; Bartolini et al., 2019; Gururaj et al., 2017).

As subunidades de **canal de cálcio voltagem dependente (Cav)** também estão implicadas em canalopatias causadas por alterações patogênicas nos genes *CACNA1A* e *CACNA1E* em DE e DEEs; *CACNA1C* na síndrome de Timothy, que inclui fenótipos de autismo (Smith; Walsh, 2020).

Alguns genes que codificam **canais de cloreto**, como *CLCN2*, foram identificados e relacionados com epilepsia idiopática e não serão objetos de estudo nesta tese.

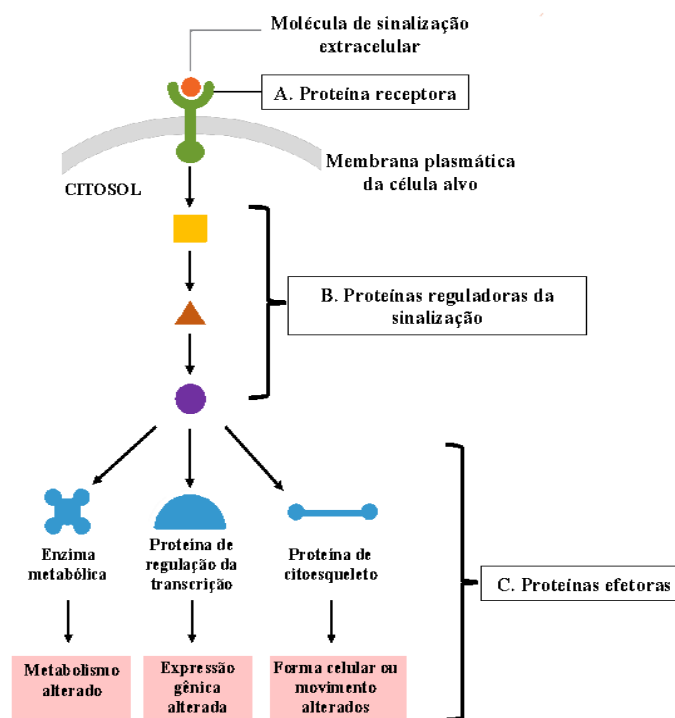
Os **canais iônicos regulados por ligantes** ou **receptores ionotrópicos** são proteínas que se abrem e permitem a passagem de íons em resposta a um mensageiro químico (ou ligante), como um neurotransmissor (vide **Figura 5**). O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante e mais importante no SNC, pois ativa quatro receptores ionotrópicos: AMPA (ácido alfa amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico), cainato, delta e NMDA (N-metil-D-aspartato). Este neurotransmissor também é importante na plasticidade cerebral (Smith and Walsh, 2020). O receptor NMDA é composto por duas subunidades NR1 de ligação à glicina e duas subunidades de ligação ao glutamato NR2. Variantes patogênicas que afetam as subunidades NR2, codificadas por *GRIN2A* e *GRIN2B* são prejudiciais ao neurodesenvolvimento. Variantes patogênicas em *GRIN2A* estão associadas a deficiência intelectual (DI) isolada, epilepsia focal autolimitada com paroxismos centrotemporais, SLK ou DEEs.

O GABA (Ácido gama amino-butírico) é o principal neurotransmissor inibitório do SNC e variantes patogênicas que afetam os receptores GABA, sobretudo o receptor GABA-A, codificado pelo gene *GABRA1A*, também estão associadas à DEE, incluindo a DEEIP e fenótipos semelhantes à SD e Síndrome de Doose (Bartolini et al., 2019).

### 3.7.2 Proteínas receptoras, reguladoras da sinalização e efetoras

Neste grupo selecionamos os genes que codificam proteínas localizadas sobretudo no citosol e organelas, sendo aqui agrupadas pela função. Neste grupo, também estão incluídas neste grupo proteínas receptoras transmembranas localizadas nos terminais pré e pós-sináptico.

A Figura 6, adaptada a partir de Alberts, 2017, demonstra simplificada as principais etapas dessa cascata, iniciando com as proteínas receptoras, seguidas de proteínas reguladoras da sinalização e, por último, as proteínas efetoras.



Fonte: adaptado a partir de Alberts, 2017.

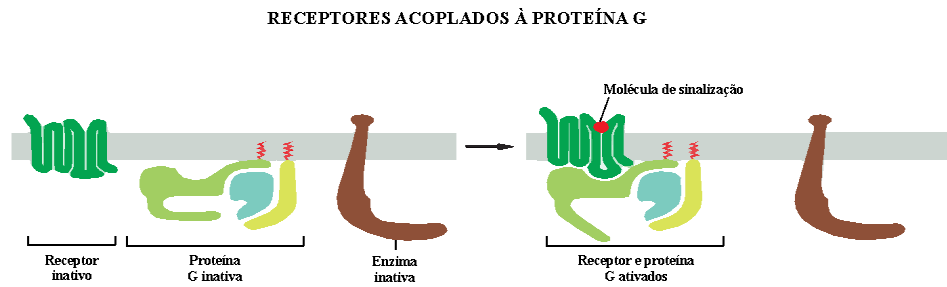
**Figura 6** - Esquema ilustrativo das vias de sinalização intracelular desencadeadas por uma molécula de sinalização extracelular

#### 3.7.2.1 Proteínas receptoras (proteínas relacionadas com a liberação de neurotransmissores e receptores metabotrópicos)

Os sinais neuronais são transmitidos de uma célula a outra em sítios especializados de contato conhecidos como sinapses. O mecanismo normal de

transmissão é indireto. As células são isoladas eletricamente uma da outra, sendo a célula pré-sináptica separada da célula pós-sináptica por uma estreita fenda sináptica. Quando um potencial de ação chega ao sítio pré-sináptico, a despolarização da membrana abre canais de  $\text{Ca}^{2+}$  controlados por voltagem que estão agrupadas na membrana pré-sináptica. O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  provoca a liberação na fenda, de pequenas moléculas de sinal, conhecidas como neurotransmissores, que são estocadas em vesículas sinápticas, delimitadas por membrana e liberadas por exocitose. A exocitose dos neurotransmissores depende de uma maquinaria complexa de proteínas (como o complexo SNARE, que é modulado pelo sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  sinaptotagmina e uma proteína adicional denominada complexina). Tanto a v-SNARE *sinaptobrevina* quanto a t-SNARE *syntaxina* são proteínas transmembranas. O processo permite que a maquinaria de fusão responda na escala de milissegundos, o que é essencial para a sinalização sináptica rápida e repetitiva (Alberts, 2017). *STXBPI* é um gene que codifica a proteína 1 ligada à syntaxina, um componente de maquinaria pré-sináptica que quando disfuncional, leva a DEE. Os demais genes como o *STX1B*, *SNAP25*, *SYN1*, *LGII* e *DNMI* também estão relacionados com a maquinaria sináptica, influenciando a liberação de neurotransmissores ([www.omim.org](http://www.omim.org); [www.genecards.org](http://www.genecards.org)).

Os receptores metabotrópicos, ou receptores acoplados à proteína G (Figura 7), são ativados pelos primeiros mensageiros como os neurotransmissores acetilcolina, glutamato e GABA que iniciam o processo de sinalização mediada pela proteína G. Estes receptores também são muito importantes na fisiopatologia das DEEs, visto que podem interferir na transmissão sináptica excitatória ou inibitória. Este tipo de sinalização costuma ser mais lenta e mais duradoura, se comparada aos receptores ionotrópicos. O *GABBR2* codifica uma proteína pertencente à família de receptores 3 acoplados à proteína-G e à subfamília de receptores GABA-B. Os receptores GABA-B inibem a atividade neuronal por meio de sistemas de segundo mensageiro acoplados à proteína G, que regulam a liberação de neurotransmissores, a atividade dos canais iônicos e da adenilciclase. Esta subunidade receptora forma um complexo heterodimérico ativo com a subunidade receptora GABA-B 1. Por este motivo desempenha um papel crítico na transmissão sináptica inibitória (Alberts, 2017).



Fonte: adaptado a partir de Alberts, 2017

**Figura 7** - Esquema ilustrativo de receptores acoplados à proteína G (metabotrópicos)

### 3.7.2.2 Proteínas reguladoras da sinalização

Deste grupo fazem parte genes que codificam proteínas envolvidas com sinalização intracelular ou segundo mensageiros, que transmitem sinais recebidos pelos receptores de superfície celular a partir de sua ativação por um neurotransmissor. A cadeia de eventos de sinalização intracelular resultante altera proteínas-alvo localizadas na porção final das vias de sinalização, denominadas proteínas efetoras, alterando o comportamento celular (Alberts, 2017). Algumas proteínas são ativadas transitoriamente por fosforilação (proteínas cinases) ou por ligação de GTP (Guanina-trifosfato), AMPc (AMP cíclico) e  $Ca^{2+}$ . Como há muitas vias de sinalização, destacamos as principais relacionadas aos genes desta casuística que são as que envolvem *PI3K*, *AKT*, *MTOR* e *MAP*.

Os genes que codificam as proteínas reguladoras de sinalização que envolvem várias famílias de cinases são:

- *BRAF* (*BRAF-Activated noncoding RNA*) codifica uma serina/treonina proteína quinase da família RAF, que tem papel na regulação da rede de sinalização MAP cinase/ERK, que afeta a divisão celular, diferenciação e secreção;
- *NTRK2* - codifica uma tirosina quinase (NTRK), que é um receptor de membrana que, ao ligar-se à neurotrofina, se fosforila ativando a via

MAPK (proteína-quinase mitógeno-ativada). A sinalização por meio desta quinase leva à diferenciação celular;

- *CDKL5 (Cyclin Dependent Kinase Like 5)*- codifica uma serina/treonina proteína quinase participando do controle do ciclo celular.
- *MTOR* - codifica uma família de cinases relacionadas com o fosfatidilinositol. Estas cinases intermediam as respostas celulares ao estresse causado por danos no DNA e privação de nutrientes. Esta quinase é um componente de dois complexos distintos, mTORC1, que controla a síntese proteica, o crescimento e a proliferação celular, e mTORC2, que é um regulador do citoesqueleto actínico, e promove a sobrevivência celular e a progressão do ciclo celular.
- *DYRK1A* - codifica um membro da família *Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase-DYRK*. Catalisa a sua autofosforilação em resíduos de serina/treonina e tirosina. Pode desempenhar um papel significativo em uma via de sinalização que regula a proliferação celular e pode estar envolvida no desenvolvimento cerebral).

Os genes que codificam as proteínas envolvidas com proteínas de ligação ao GTP são:

- *ARHGAP31* -codifica uma proteína ativadora de GTPase (GAP), regulada por GTPases Rho, envolvida no tráfico de proteínas e no crescimento celular;
- *CYFIP2 (Cytoplasmic FMR1 Interacting Protein 2)* - é um gene de codificação de proteínas relacionadas estão na sinalização por Rho GTPases e na sinalização RET;
- *NPRL2* - relacionados com as vias PI3K/AKT, atividade da proteína cinase e a atividade do ativador da GTPase;
- *IQSEC2* - codifica um fator de troca de nucleotídeos de guanina para a família ARF de pequenas proteínas de ligação GTP. A proteína codificada é um componente da densidade pós-sináptica em sinapses excitatórias, pode desempenhar um papel crítico na organização citoesquelética e

sináptica pela ativação de substratos ARF específicos, incluindo ARF1 e ARF6.

Os genes que codificam proteínas envolvidas na Proteína G:

- *GNAO1* - codifica uma subunidade alfa que liga à proteína G.

Os genes envolvidos com outras funções:

- *WDR45*, codifica um membro da família das proteínas que tem repetição do motivo WD, que são regiões de aproximadamente 40 aminoácidos tipicamente agrupados por glicina-histidina e triptofano-aspartato (GH-WD), o que pode facilitar a formação de complexos heterotriméricos ou multiproteicos. Os membros desta família estão envolvidos em uma variedade de processos celulares, incluindo a progressão do ciclo celular, transdução de sinal, apoptose e regulação genética;
- *WWOX*, codifica um membro da família de proteínas desidrogenases/reduzidas de cadeia curta (SDR). Este gene abrange o sítio frágil cromossômico comum da FRA16D e parece funcionar como um gene supressor do tumor. A expressão da proteína codificada é capaz de induzir a apoptose;
- *UBA5* - codifica um membro da família das enzimas ativadoras da ubiquitina do tipo E1. Esta proteína ativa o modificador da ubiquitina 1, uma proteína modificada pós-translacional do tipo ubiquitina, pela da formação de uma ligação tioéster de alta energia.

### 3.7.2.3 Proteínas consideradas efetoras

A seguir, os genes codificam as proteínas consideradas efetoras, que modificam o comportamento final da célula. Dependendo do sinal, do tipo e do estado da célula, estes efetores podem regular: transcrição, canais iônicos, componentes de uma via metabólica ou partes do citoesqueleto (Alberts, 2017).

Os genes que codificam as enzimas metabólicas em nossa casuística são:

- *ALG13* - codifica uma subunidade de uma UDP-N-acetilglucosamina transferase bipartida. Ela heterodimeriza com a glicosilação 14 homólogos

ligados à asparagina para formar uma glicosiltransferase UDP-GlcNAc funcional que catalisa a segunda adição de açúcar do precursor do oligossacarídeo altamente conservado em glicosilação ligada ao retículo endoplasmático);

- *AMT* - codifica um dos quatro componentes críticos do sistema de clivagem da glicina, a aminometiltransferase;
- *GPAAL1* - codifica a âncora 1 glicosilfosfatidilinositol (GPI) pós-traducional que serve como mecanismo geral de ligação de proteínas à membrana de superfície celular. A proteína codificada por este gene funciona presumivelmente na ancoragem GPI na etapa de transferência GPI);
- *IVD* - codifica a enzima Isovaleril-CoA desidrogenase (IVD) na matriz mitocondrial que catalisa a terceira etapa do catabolismo leucina);
- *NDUFS1* - codifica e tem relação com a atividade desidrogenase NADH e atividade oxidoreductase. Transfere elétrons de NADH para à cadeia respiratória;
- *PIGN* - codifica uma proteína que está envolvida na biossíntese da âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI), que é o glicolípídeo encontrado em muitas células sanguíneas e serve para ancorar proteínas à superfície da célula. Entre as suas vias relacionadas estão a modificação pós-tradicional - síntese de proteínas ancoradas em GPI e Metabolismo de proteínas;
- *RARS2* - codifica uma proteína a arginil-TRNA Sintetase 2, que se encontra nas mitocôndrias, onde catalisa a transferência de L-arginina para seu tRNA;

Os genes que codificam proteínas de citoesqueleto podem ser agrupados em três famílias de proteínas de filamento: filamento de actina, microtúbulos e filamentos intermediários. Os microtúbulos são estruturalmente mais complexos que os filamentos de actina, mas eles também são altamente dinâmicos e desempenham funções diversas e importantes à célula. Eles são polímeros da proteína tubulina. Os filamentos intermediários são diversos. As variantes patogênicas nos genes da tubulina são responsáveis por um espectro de malformações secundárias à migração,

à organização anormal neuronal. Os genes que codificam as proteínas da tubulina são: *TUBA1A*, *TUBB2B*, *TUBB3* (Romaniello et al., 2019).

Em nossa amostra, não obtivemos indivíduos com genes que codificam proteínas de regulação da transcrição.

### **3.7.3 Proteínas relacionadas com a regulação transcricional e o processamento de ácidos nucleicos**

Os reguladores transcricionais, fatores de transcrição e remodeladores de cromatina reconhecem pequenos trechos de DNA, podendo ligar-se a estes e determinar quais genes serão transcritos na célula (Alberts, 2017).

*CHD2*, *KDM5C*, *KMT2A*, *MECP2*, *MED23*, *SMC1A* são exemplos de genes que participam da regulação da transcrição, alterando a estrutura local da cromatina e, conseqüentemente, a associação dos fatores gerais de transcrição e de RNA polimerase na região promotora. Outras formas de regulação estão associadas à transporte de RNA, RNA de interferência e proteínas de repressão à transcrição, como observado nas proteínas traduzidas a partir de *HNRNPU*, *TNRC6B* e *ZEB2*, respectivamente (www.omim.org).

O processamento de ácidos nucleicos implica em clivagem e modificações químicas, tais como metilação e isomerização, provavelmente, auxiliando em mudanças conformacionais e constituindo-se na primeira linha de defesa da imunidade inata, que sinaliza a presença de RNA de dupla fita, característico da presença de material genético viral (Alberts, 2017), tais como observado nos produtos gênicos de *RNASEH2A*, *RNASEH2B* e *TREX1*, ou no processamento do RNA transportador, como ocorre com a endonuclease codificada por *TSEN54* (www.omim.org).

## **3.8 DEE associada ao gene *SCN1A***

Variantes patogênicas no *SCN1A* são responsáveis por, aproximadamente, 80-85% dos casos de SD, podendo ocorrer em quase todas as regiões da proteína (canal NaV1.1), resultando em GOF ou LOF.



Outros genes associados à SD são: *CHD2*, *SCN1B*, *HCN1A*, *KCNA2*, *GABRA1*, *GABRG2* e *STXBPI* (Mei et al., 2019).

Estudo realizado por Depienne et al., 2009 em uma coorte de 333 pacientes com SD, no *SCN1A* foram observadas mutações de ponto em 228 pacientes e CNVs em 14.

Segundo Menezes et al., 2020, das 52 variantes patogênicas com estudos funcionais em *SCN1A*, 35 (67,3%) apresentam exclusivamente características de LOF, seis (11,5%) apresentam características únicas para GOF e as demais 11 (21,2%) mostram características, tanto de GOF como de LOF.

Em outro estudo, realizado por Gertler et al., 2020 com 137 pacientes com SD, variando de um a 26 anos (média de 5,6 anos e mediana de 7 anos), 96% apresentaram variantes P ou LP (sendo 36% *missense*, 47% *nonsense*, 7% em sítios de *splicing*, 2% com outros mecanismos) e 4% com CNVs, incluindo, *SCN1A*. Quanto ao início das crises, não houve diferença entre pacientes com variantes *missense* ou variantes que levam a proteínas "truncadas". A percentagem de crianças com variantes *missense* que tiveram CTCG ou CTCB (100%), hemiclonias alternadas (78%), mioclonias (72%), ausência atípica (44%), e outros crises focais (52%) foi semelhante a crianças com variantes com truncamento. A presença de EME relatado como convulsivo, não convulsivo, ou ambos, não foi diferente entre o tipo de variante *SCN1A*. As comorbidades psiquiátrica cognitiva ou incapacidade motora também não foram diferentes. No estudo de Lindy et al. (2018) em que estudaram 8.565 indivíduos consecutivos com alterações do neurodesenvolvimento e epilepsia, o *SCN1A* foi a causa mais frequente (24,8%), correspondendo a 4% causados por CNVs e 10,5% de toda coorte. Quanto ao mecanismo de herança, 24% foram considerados casos herdados (Gertler et al., 2020).

Em relação à terapêutica na SD, o estudo não mostrou diferença entre os pacientes e o mecanismo (*missense* ou variantes com truncamento). Os tratamentos mais utilizados foram: clobazam, stiripentol, ácido valpróico, topiramato e canabidiol, clonazepam e dieta cetogênica (Gertler et al., 2020).

## **IV CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### **4.1 Desenho do estudo**

Estudo longitudinal retrospectivo e prospectivo de série de casos

### **4.2 Local**

#### **4.2.1 Avaliação clínica e neurofisiológica**

- Clínica privada em São Paulo;
- Serviço de Neurofisiologia do HSL - Hospital Sírio Libanês (Rua Adma Jafet, 91, Bela Vista, São Paulo-SP).
- Outros, conforme indicado.

#### **4.2.2 Avaliação de neuroimagem**

- Serviço de Neuroimagem - HSL (Rua Adma Jafet, 91, Bela Vista, São Paulo-SP);
- Outros, conforme indicado.

#### **4.2.3 Estudo genético**

- Mendelics Análise Genômica (Av. Braz Leme, 1631, Casa Verde, São Paulo,SP);
- Outros, conforme indicado.

### 4.3 Amostra

#### 4.3.1 Fluxo e seleção dos pacientes

Para este estudo, foram selecionados os pacientes com DEE atendidos nos serviços de neurofisiologia do HSL e clínica privada, que consentiram participar deste estudo entre janeiro de 2016 e janeiro de 2021.

A amostra foi dividida em dois grupos:

- Grupo A: sem investigação molecular e com hipótese diagnóstica de causa genética. Foi solicitado exame molecular e, quando inconclusivo, fizemos reanálise após pelo menos dois anos da primeira leitura;
- Grupo B: com investigação molecular prévia.

#### 4.3.2 Critérios de inclusão

Os pacientes que preencheram os critérios de seleção e aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice B).

Foram incluídos os pacientes com:

- crises epilépticas antes dos dois anos de vida;
- alteração do desenvolvimento neuropsicomotor e/ou do comportamento;
- Teste molecular por Sanger ou NGS.

#### 4.3.3 Critérios de exclusão

Não foram incluídos pacientes que apresentavam:

- Causas ambientais, tais como: encefalopatia hipóxico isquêmica, trauma ou infecção;
- Condições geneticamente compatível com fenótipo de Esclerose Tuberosa, Neurofibromatose, Síndrome de Angelman e Lipofuscinose ceróide;
- Condições geneticamente determinadas por mosaicismos somáticos (Sturge-Weber, Hemimegalencefalia, Hipomelanose de Ito); e
- Condições geneticamente determinadas por: anomalias cromossômicas detectadas por microarray cromossômico ou cariótipo.

#### **4.4 Cálculo amostral**

Todos os pacientes encaminhados aos serviços já citados e que preencheram os critérios de elegibilidade (considerando os critérios de inclusão e exclusão acima) foram incluídos no estudo. Desta forma, a amostra foi o universo (amostra de conveniência).

#### **4.5 Procedimentos**

##### **4.5.1 Avaliação clínica**

Foram coletadas informações clínicas e exames laboratoriais dos pacientes, seguindo protocolo específico (Anexo A).

Os pacientes foram avaliados clinicamente do ponto de vista global sendo descritas as anormalidades como dismorfias, movimentos involuntários, presença ou ausência de hipotonia e no DNPM.

As crises epiléticas e tipos de epilepsia foram classificados conforme a Classificação atual da ILAE. As crises epiléticas foram classificadas em: início focal, generalizado ou desconhecido. A frequência média de crises epiléticas na última visita médica, presença de EME, tipos de tratamento medicamentoso e/ou cirúrgico realizados. As epilepsias foram classificadas em: epilepsia focal, generalizada, focal e generalizada combinada e desconhecido (Fisher, 2017; Fisher, Cross, D'Souza et al., 2017; Scheffer et al., 2017) Quando possível, foi descrita a presença de alguma síndrome epilética (DEEIP, EICFM, SEEI, SD, Síndromes com etiologias específicas) (Wirrell et al., 2022; Zubery et al., 2022). (Apêndice E).

##### **4.5.2 Exames complementares**

Os resultados dos exames complementares foram obtidos pela revisão de prontuário.

Os resultados de ressonância magnética (RM) de crânio foram classificados em:

1. Normal
2. Malformações do SNC: do tipo displasia cortical focal (Heterotopia, heterotopia periventricular nodular, polimicrogiria, paquigiria, lisencefalia, displasia/agenesia do corpo caloso)
3. Não específicas (atrofias corticais, alterações de substância branca)

Os resultados de EEG e/ou vídeo-EEG foram considerados quando disponíveis o primeiro e último EEG, com intervalo de no mínimo 6 meses. Foram consideradas a atividade de base, anormalidades epileptiformes e não epileptiformes e a localização. Posteriormente, foram categorizados em cinco padrões, conforme proposto por Hur e col. (2017)

- Padrão I: atividade de base normal e sem paroxismos epileptiformes interictais;
- Padrão II: atividade de base normal e paroxismos epileptiformes interictais generalizados;
- Padrão III: atividade de base normal e paroxismos epileptiformes interictais focais e/ou multifocais;
- Padrão IV: alteração da atividade de base com alentecimento difuso e com paroxismos epileptiformes focais ou multifocais pleomórficos; e
- Padrão V: alteração da atividade de base com alentecimento difuso e paroxismos focais e/ou multifocais.

### **O sequenciamento por Sanger**

Esta técnica é dividida basicamente em três etapas:

- os produtos da sequência-alvo amplificada pela reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), são incorporados dideoxynucleotídeos (dNTP) marcados com um fluoróforo na extremidade 3', interrompendo o crescimento da cadeia, que está sendo sintetizada;
- os fragmentos de DNA, sintetizados na etapa anterior, serão separados de acordo com o tamanho, usando a eletroforese em gel capilar; e

- os sinais fluorescentes são lidos e interpretados, produzindo um eletroesferograma que corresponde a uma sequência de base linear.

-

### **O NGS realizado na Mendelics Análise Genômica**

O sequenciamento do exoma e painel genético utilizaram sequenciadores Illumina HiSeq 4000 ou Illumina NovaSeq (San Diego, CA, EUA). De forma sucinta, para a realização do exame foram seguidos os passos:

- a) Extração do DNA de amostra de sangue periférico;
- b) Fragmentação do DNA com o auxílio de enzimas de restrição;
- c) Captura de regiões exônicas do DNA, com o auxílio de, aproximadamente, 1.000 a 2.000 sondas em painéis clínicos com sequências complementares aos éxons, produzidas comercialmente. Por meio de hibridização e separação magnética, há um enriquecimento superior a 20 vezes de regiões exônicas no DNA que será sequenciado;
- d) Sequenciamento da amostra enriquecida em regiões exônicas em genotipador, capaz de gerar milhões de sequências curtas (entre 100 e 150 bp) independentes;
- e) Alinhamento da sequência obtida e busca de variações com relação ao genoma de referência, com o auxílio de protocolos de bioinformática. Neste passo, que se direciona à análise do exoma ou de um painel genético (Apêndice F), bem como análise de CNVs; e
- f) Análise da lista de variantes detectadas, buscando alterações em genes que estejam associados a quadros similares ao do paciente.

### **O NGS realizado por outros laboratórios**

Nos casos em que o NGS foi feito em outros laboratórios, não foi possível proceder a reanálise, pela falta de acesso aos dados brutos.

### **Análise da patogenicidade das variantes obtidas nos testes genéticos**

Neste estudo, foram consideradas, somente, as variantes classificadas como P, LP e VUS, em concordância com as recomendações do ACMG. No caso de condições transmitidas, como um caráter dominante, elas foram incluídas quando:

havia impossibilidade de se testar os genitores ou não alcançaram critérios para serem classificadas como, provavelmente, patogênicas ou, provavelmente, benignas (Richards et al., 2015). No caso de condições recessivas em que se identificou uma variante do tipo *missense* em homozigose e que não alcançava critério para ser considerada, provavelmente, patogênica ou, provavelmente, benigna, também permaneceu como VUS.

O resultado do exame genético foi considerado positivo, quando a alteração foi considerada responsável pelo quadro clínico e negativo, quando não foi possível identificar uma causa genética.

#### **4.6 Análise e Apresentação dos dados**

As medidas de tendência central (média/mediana) foram calculadas. Os dados categóricos foram apresentados em forma de proporção e porcentagens. Dados relevantes foram agrupados e apresentados em figuras e tabelas.

Trata-se de um estudo descritivo que não comporta análise estatística.

O banco de dados foi construído em planilha do programa Excel 2021 da Microsoft e a organização dos dados foi realizada por meio de tabelas.

#### **4.7 Aspectos éticos**

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética de Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital Sírio Libanês (número do Parecer LMI149 em 26 de novembro de 2013) e da Diretoria Clínica do HC-FMUSP (número do Parecer: 203/14 em 17 de setembro de 2014).

Todos os pacientes incluídos no estudo receberam informações sobre o que consistia o estudo, incluindo objetivos, metodologia, riscos e benefícios. Após as informações, todos os pacientes ou responsáveis leram e assinaram o TCLE (Apêndice B e C).

## **CAPÍTULO 2**

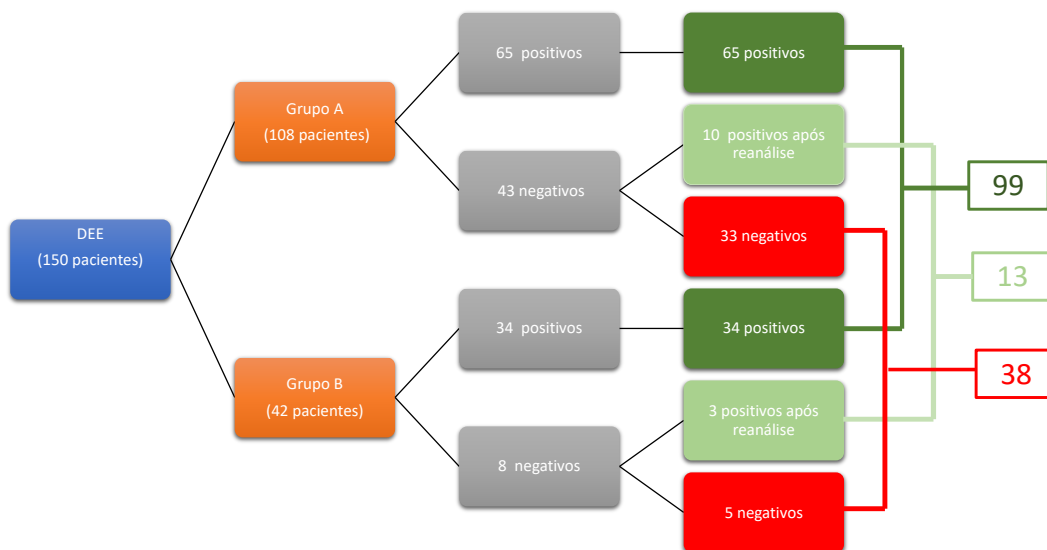
### **Resultados gerais**

---



## I DADOS GERAIS

Foram avaliados 150 pacientes com quadro de DEE, com crises iniciadas, antes dos dois anos de vida e que realizaram teste genético (Sanger ou NGS), sendo 108 pacientes sem teste genético prévio à avaliação (Grupo A) e 42 pacientes com teste genético prévio à avaliação (Grupo B). Ao final, 112 pacientes foram considerados positivos (90 foram exoma, 19 foram painéis genéticos e três com Sequenciamento Sanger) e 38 permaneceram negativos (31 foram exoma e sete painéis de epilepsia) (Figura 8).



**Retângulos laranjas:** grupo A: Pacientes sem exame molecular prévio à avaliação e grupo B: pacientes com exame molecular prévio à avaliação; **Retângulos cinzas:** pacientes positivos e negativos dos grupos A e B; **Retângulos verdes claros e escuros:** pacientes considerados positivos; **Retângulos vermelhos:** pacientes considerados negativos. DEE: Encefalopatia Epiléptica e do Desenvolvimento

**Figura 8** - Fluxograma dos 150 pacientes com DEE analisados

### 1.1 Amostra de indivíduos com teste molecular positivo

Obtivemos 112 indivíduos com teste molecular positivo correspondendo a 74,7% (112/150), sendo 19,6 (22/112) de variantes patogênicas do gene *SCN1A*.

Quanto ao sexo, tivemos 58 indivíduos do sexo feminino e 54 do masculino, idade média da última avaliação foi 8,3 anos (mediana de 3,5 anos), 11,6% (13/112) apresentaram hipotonia e distúrbios de movimentos variados (coreia, distonias, mioclonias). Seis de 112 pacientes apresentaram dismorfias. O óbito ocorreu em três de 112 pacientes. Todos os pacientes tiveram atraso de desenvolvimento motor entre leve e grave, que não foi mensurado de forma objetiva.

Quanto à idade de início das crises epiléticas, a média foi 4,8 meses (mediana de 3,2 meses). Os tipos de epilepsia mais encontrados foram: focal e generalizada combinada, com 55,4% (62/112), seguida de 22% indeterminada, 12,5% (14/112) focal e 10% (10/112) generalizada. A síndrome epilética inicial mais frequente foi a SEEI com 23,2% (26/112), seguida de 17,9% (20/112) de SD; 3,6% EICFM (4/112); EEIP 2,7% (3/112).

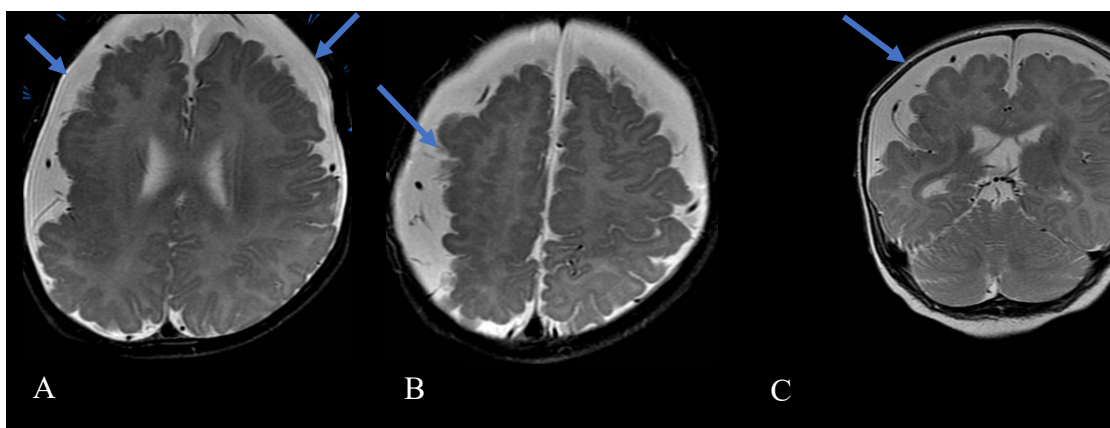
Os padrões eletroencefalográficos mais comuns foram os tipos IV e V (50,9%) (Figura 9 e 10), sendo o 13,3% (15/112) normal ou discretamente desorganizado. A malformação do desenvolvimento cortical mostrou-se presente em 6/112 pacientes, exemplificados nas Figuras 11 e 12.

**Tabela 1** - Características clínicas da amostra de 112 pacientes com teste molecular positivo

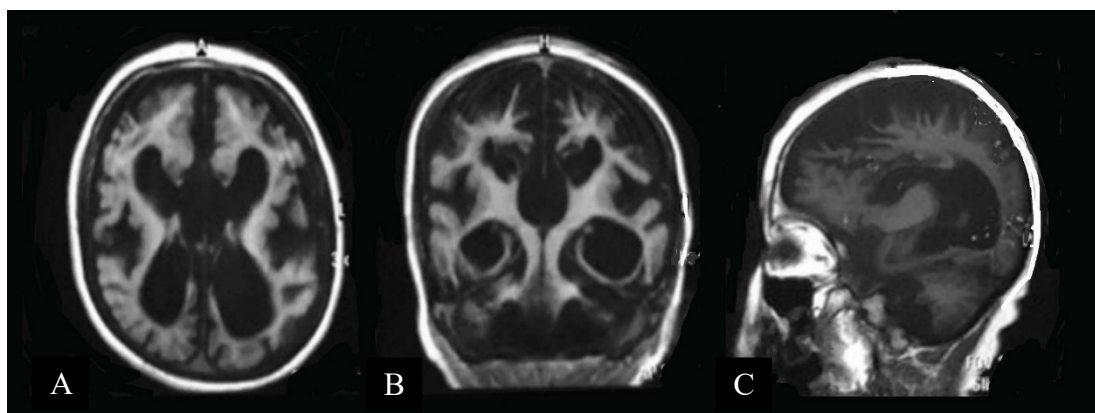
Variável	Valor
Sexo (F/M)	58/54
Idade última avaliação (anos)	
Média	8,3
Mediana	3,5
Idade de início das crises (meses)	
Média	4,8
Mediana	3,2
Tipos de Epilepsia	
Focal	14 (12,5%)
Generalizada	10 (9%)
Focal e generalizada combinada	62 (55,4%)
Indeterminada	26 (23%)
Tipo de DEE	
DEEIP	3 (2,7%)
EICFM	4 (3,6%)
SEEI	26 (23,2%)
SD	20 (17,9%)
Outros	59 (52,7%)
Distúrbio de movimento	
Sim	13 (11,6%)
Não	99 (88,4%)
Neuroimagem	
Normal	86 (76,8%)
Alterações inespecíficas ou alterações de substância branca	20 (17,9%)
Malformação do desenvolvimento cortical ou malformação do cerebelo	6 (5,3%)

Legenda: DEE: *Developmental and Epileptic Encephalopathy* – Encefalopatia Epiléptica e do Desenvolvimento; F:feminino; M: masculino; DEEIP – DEE de início precoce; EICFM – Epilepsia Infantil com crises focais migratórias; SEEI – síndrome com espasmos epilépticos infantis; SD – Síndrome de Dravet.





**Figura 11** - RM de crânio do caso 4 com variante patogênica no *ATPIA3* com um ano de idade. **A** e **B**. Cortes Axial T2 e **C**. Corte coronal T2, evidenciando extensa malformação do desenvolvimento cortical, de aspecto polimicrogírico, sobretudo frontotemporo-parietal direito (setas azuis)



**Figura 12** - RM de crânio do caso 57 com variante patogênica em *RHOBTB2* aos dois anos de idade. **A** e **B**. Cortes Axial e coronal em T1 evidenciando extensa malformação evidenciando acentuada redução volumétrica encefálica difusa, incluindo tronco e cerebelo e agenesia do vermis cerebelar, redução volumétrica córtico-subcortical cerebral e a dilatação ventricular supratentorial. **C**. Corte Sagital T1, polimicrogiria, agenesia do corpo caloso com colpocefalia e a acentuada hipoplasia pontocerebelar

## 1.2 Amostra de indivíduos com teste molecular negativo

Obtivemos 38 indivíduos com NGS negativo (38/150 – 25,3%). Os dados clínicos mais relevantes estão resumidos na Tabela 2.

Quanto ao sexo, tivemos 17 indivíduos do sexo feminino e 21 do masculino, idade média e mediana atual de 4,9 anos. Dos 38 pacientes, apenas um apresentou

distúrbios de movimentos variados (coreia, distonia e mioclonia) e dois com dismorfias. Nenhum paciente foi a óbito no período analisado. Todos os pacientes tiveram atraso global de desenvolvimento, de intensidade variável e não mensurado de forma objetiva.

**Tabela 2** - Características clínicas da amostra 38 pacientes com teste molecular negativo

Variável	Valor
Sexo (F/M)	17/21
Idade última avaliação (anos)	
Média	4,9
Mediana	4,9
Idade de início das crises (meses)	
Média	3,6
Mediana	3,2
Tipos de Epilepsia	
Focal	2 (5,3%)
Generalizada	3 (7,9%)
Focal e generalizada combinada	10 (26,3%)
Indeterminada	23 (60,5%)
Tipo de DEE	
DEEIP	1 (2,6%)
EICFM	0
SEEI	5 (13,2%)
SD	0
Outros	32 (84,2%)
Distúrbio de movimento	
Sim	1(2,6%)
Não	37 (97,4%)
Neuroimagem	
Normal	10 (26,3%)
Alterações inespecíficas ou alterações de substância branca	27 (71,1%)
Malformação do desenvolvimento cortical ou malformação do cerebelo	1 (2,6%)

Legenda: DEE: *Developmental and Epileptic Encephalopathy* – Encefalopatia Epiléptica e do Desenvolvimento; F:feminino; M: masculino; DEEIP – DEE de início precoce; EICFM – Epilepsia Infantil com crises focais migratórias; SEEI – síndrome com espasmos epiléticos infantis; SD – Síndrome de Dravet.

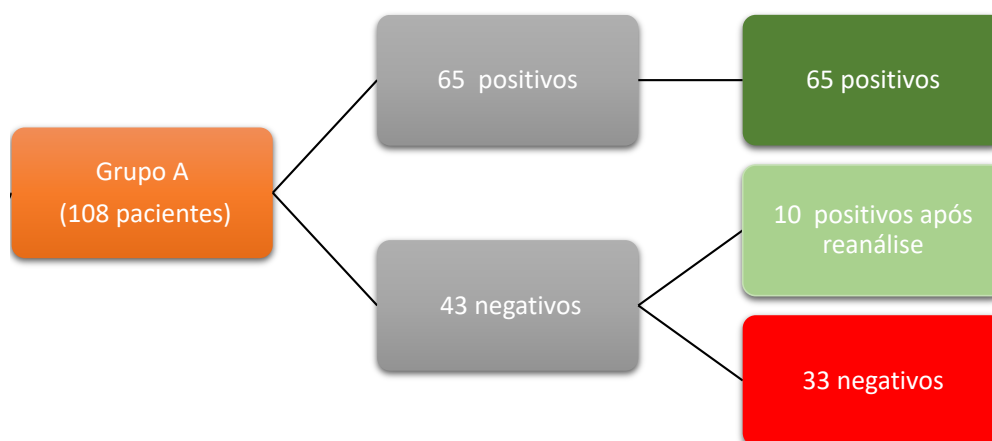
## II Resultados genéticos

### 2.1 Taxa de positividade e conversão

Dentre os pacientes do Grupo A (108 indivíduos), 75 tiveram NGS positivos (sendo 65 na primeira leitura e 10 na reanálise) e 33 tiveram NGS negativos (sendo 26 passíveis de reanálise).

Para cálculo da taxa de positividade na nossa amostra, consideramos somente o grupo A (sem o teste molecular prévio à avaliação). Obtivemos 60,2% de exames positivos (65/108) na primeira leitura. Se subtrairmos os casos de *SCN1A* do grupo A (15 pacientes), a taxa de positividade foi 53,8% (50/93).

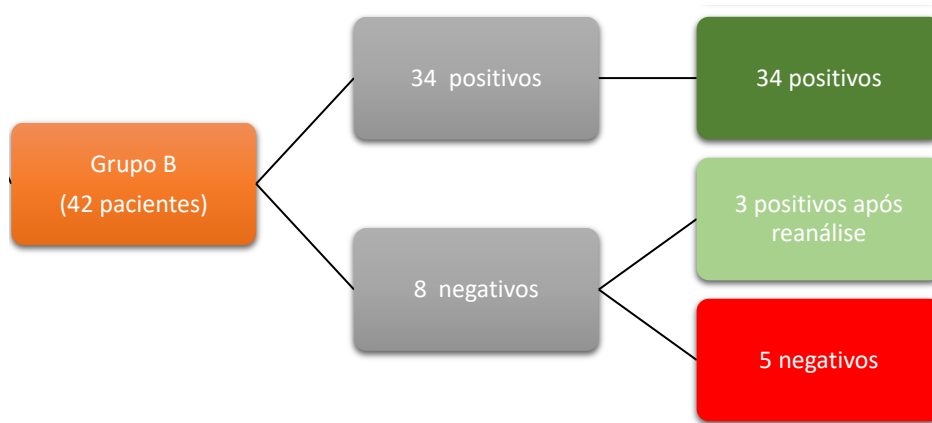
Para cálculo da taxa de conversão da reanálise de negativo para positivo, consideramos 43 indivíduos com NGS negativos na primeira leitura e 26 tinham NGS passíveis de reanálise. Desses, 10 indivíduos foram positivos, sendo a taxa de conversão de 38,5% (10/26).



**Figura 13** - Fluxograma dos 108 pacientes do grupo A

Entre os pacientes do Grupo B, 37 indivíduos tiveram NGS positivos, sendo três após a reanálise, restando cinco negativos (Figura 14). A taxa de positividade

neste grupo não teve relevância, já que os indivíduos, em sua maioria, (81% - 34/42) foram encaminhados com diagnóstico molecular prévio.



**Figura 14** - Fluxograma dos 42 pacientes do grupo B

Em nossa amostra, a reanálise permitiu concluir o diagnóstico em 13 pacientes a partir da identificação de variantes patogênicas em dez genes que, por ocasião da primeira análise, não eram associadas à DEE. A média de tempo transcorrida entre a primeira leitura e reanálise foi 4,2 anos (mediana de 5,8 anos - mínimo 1 ano e máximo 7 anos), com idade média e mediana de 8,3 anos (Tabela 3). Dos 13 novos diagnósticos, oito foram feitos a partir de busca ativa do Laboratório e cinco por iniciativa do médico assistente.

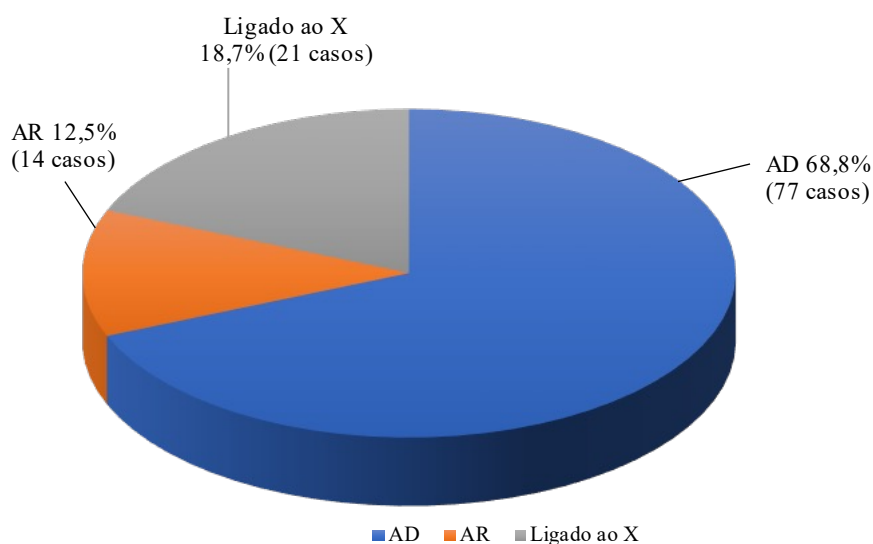


**Tabela 3** – Aspectos da reanálise do exoma de 13 casos positivos

Gene (paciente)	Tempo entre a primeira análise e reanálise (anos)	Ano de realização do exoma	Ano de reanálise	Referências em que foram publicadas (autor, ano)	Idade do Diagnóstico (anos)	Iniciativa da reanálise
<i>CYFIP2</i> (14)	4,5	2014	2018	Nakashima et al., 2018	11,4	Laboratório
<i>GPAAI</i> (20)	2,1	2015	2018	Nguyen et al., 2017	7,0	Laboratório
<i>HNRNPU</i> (23)	3,0	2013	2016	Epi 4K Consortium 2013	10,1	Laboratório
<i>HNRNPU</i> (24)	5,7	2014	2020	Epi4K Consortium 2013	18,7	Médica
<i>KCND3</i> (28)	3,9	2015	2019	Wang, et al., 2019 Clinvar, 2019	11,8	Médica
<i>KDM5C</i> (38)	6,3	2013	2020	Carmignac et al., 2020	10,9	Médica
<i>KMT2A</i> (40)	1,9	2016	2018	Liu et al., 2018	7,3	Médica
<i>RHOBT2</i> (57)	5,7	2014	2019	Straub et al., 2018	5,7	Laboratório
<i>SCN3A</i> (83)	1,0	2016	2017	Zaman et al., 2018	2,5	Laboratório
<i>SCN3A</i> (84)	4,1	2014	2017	Zaman et al., 2018	3,6	Laboratório
<i>SNAP25</i> (95)	5,7	2013	2018	Klößner et al., 2021	5,7	Laboratório
<i>SNAP25</i> (96)	7,0	2014	2021	Klößner et al., 2021	7,5	Médica
<i>SYT1</i> (100)	3,2	2017	2020	Harper et al., 2020	5,1	Laboratório

## 2.2 Tipos de padrão de herança

O padrão de herança mais observado foi autossômico dominante, decorrente de variantes presuntivamente *de novo* correspondendo a 77/112 (68,8%), entre os indivíduos com exames conclusivos (Figura 15). Dos 77 casos, 44 realizaram testagem dos genitores. Entre os 14 pacientes com DEE com padrão de herança recessivo, observamos sete com variantes em homozigose e os demais sete em heterozigose composta.



**Figura 15** – Gráfico do padrão de herança dos 112 casos conclusivos

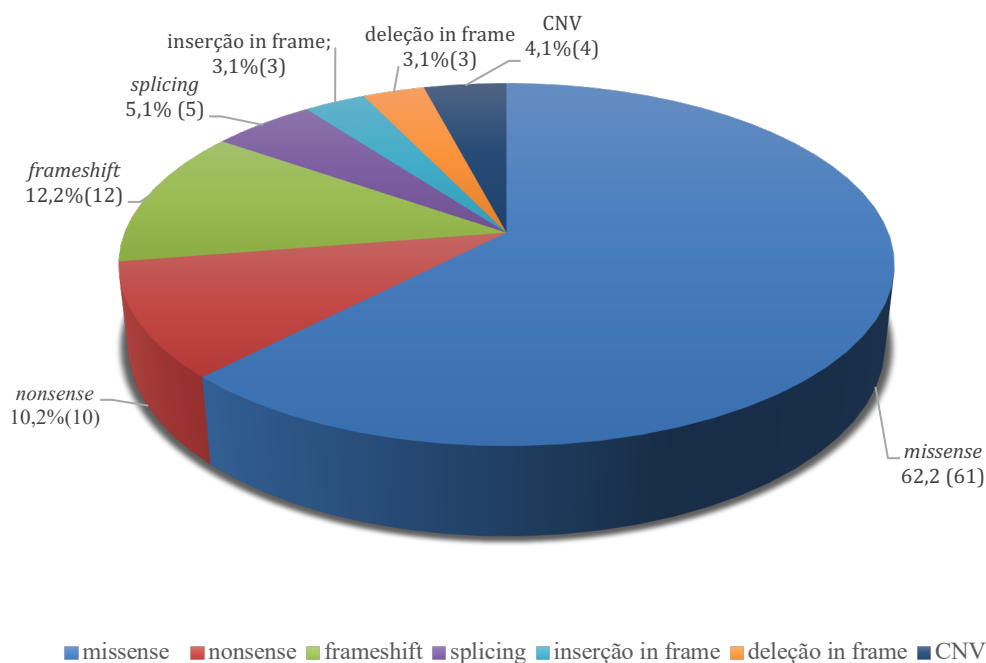
Entre os 21 pacientes portadores de variantes patogênicas ligadas ao cromossomo X (13 do sexo feminino e oito do masculino) foram identificados 11 genes distintos, sendo nove deles com caráter dominante e dois recessivo (Anexo B).

Dos 14 casos em que as mães foram testadas, nove foram presuntivamente *de novo* e três foram herdadas. Finalmente, a recorrência da mesma variante em dois irmãos cuja genitora tinha um teste negativo, aponta um provável mosaicismo gonadal materno.

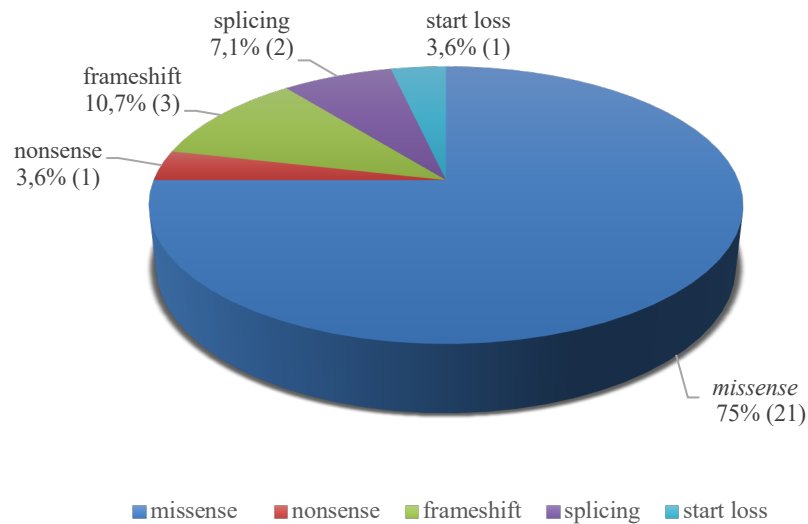
### 2.3 Mecanismos mutacionais e mosaicismos

O mecanismo mutacional mais frequente foi do tipo *missense* correspondendo a 62,2% dos casos monoalélicos (autossômico dominante, ligados ao X) e 75% dos casos bialélicos (autossômicos recessivos), cuja função no produto proteico final pode ser perda ou ganho de função (Figuras 16 e 17).

As variantes que levam à perda de função da proteína, tais como *frameshift*, *nonsense*, *start loss*, as CNVs e as deleções *inframe* e as que afetam sítios de *splicing*, correspondendo a 37,8% e 25% da amostra de indivíduos com mutação bialélicas e monoalélicas, respectivamente.

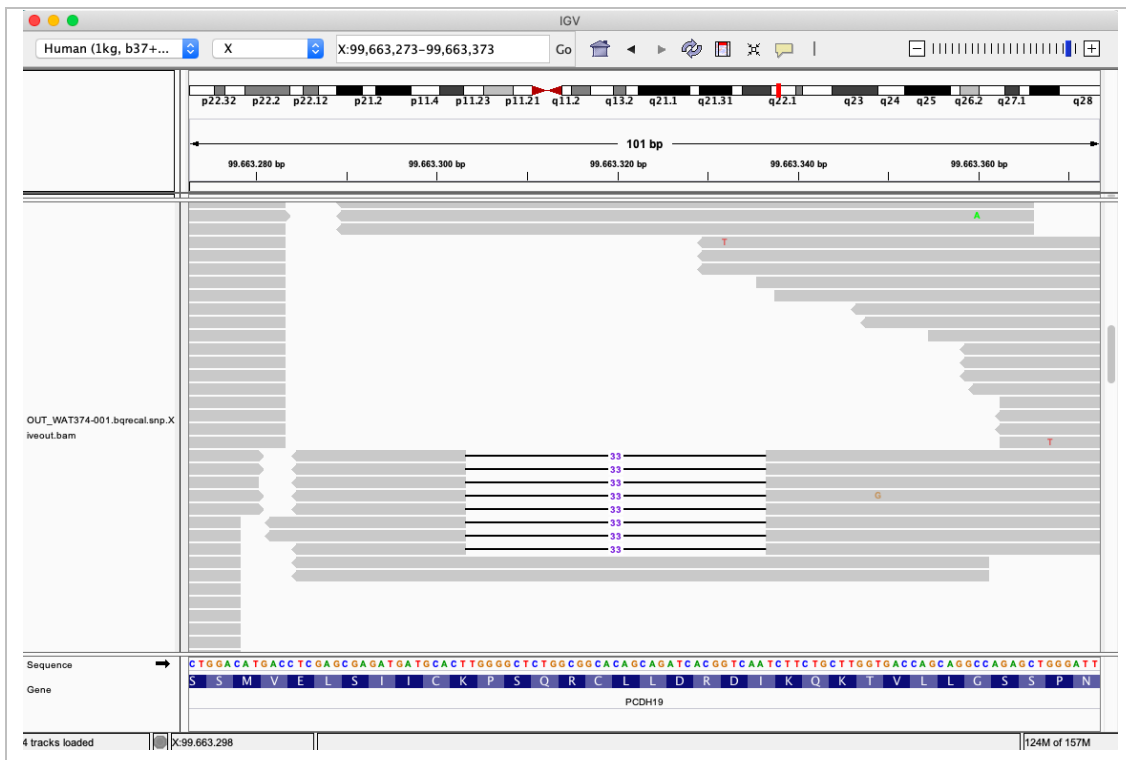


**Figura 16** - Gráfico com o mecanismo mutacional dos 98 casos monoalélicos

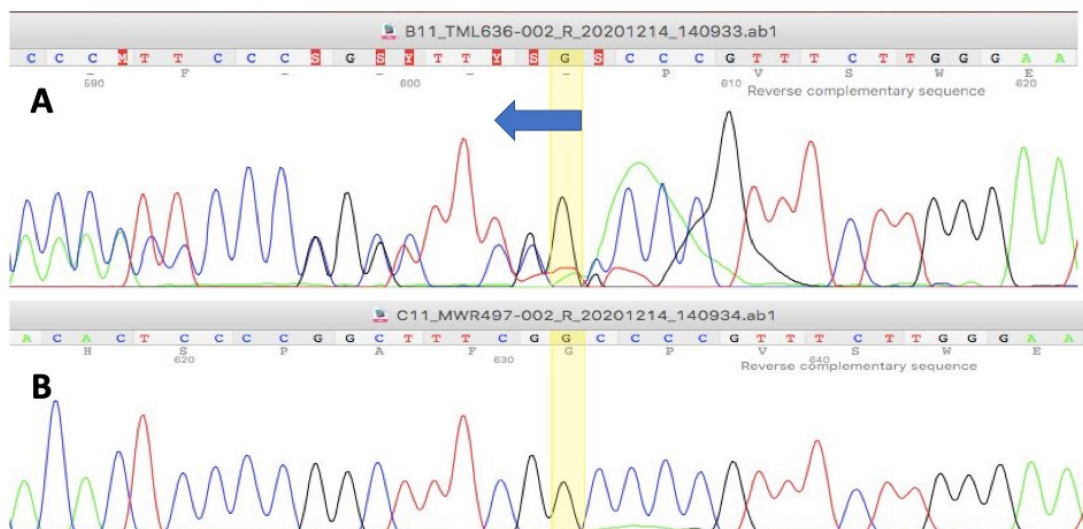


**Figura 17** - Gráfico com o mecanismo mutacional dos 14 casos bialélicos (28 mecanismos mutacionais)

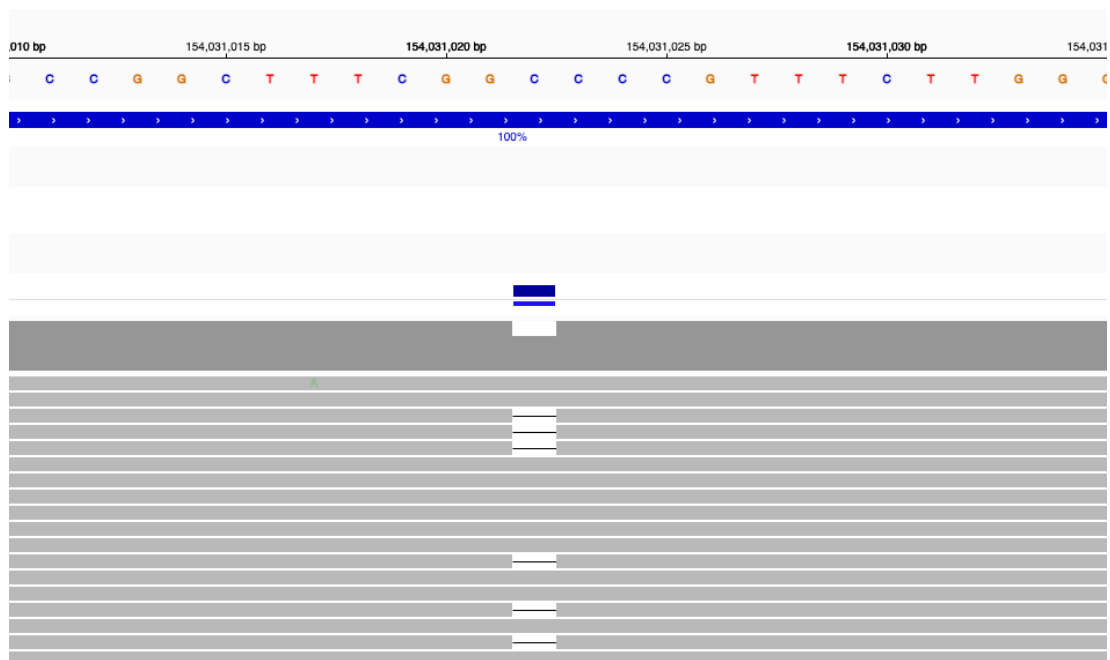
Em nossa casuística encontramos um caso de mosaïcismo somático no gene *PCDH19* demonstrado na Figura 18. Também foram encontrados três casos de DEE em decorrência de mosaïcismo germinativo. Uma família teve dois filhos com a mesma variante patogênica no gene *SCN3A* (reportado no capítulo 3), cujos pais foram testados com Sanger e NGS e não demonstravam a variante. A outra família teve um filho com DEE associado ao *MECP2* (paciente 44) e, posteriormente uma filha com fenótipo de Síndrome de Rett. A mãe já tinha resultado negativo para o sequenciamento por Sanger (Figura 19) e NGS. A Figura 20 mostra a visão geral do IGV por meio do NGS demonstrando a mesma variante em *MECP2*.



**Figura 18** - Visão geral do IGV do paciente do sexo masculino com a variante patogênica em *PCDH19* (localizado no cromossomo X) mostrando deleção in frame de 33 pbs em várias leituras



**Figura 19** - Eletroesferograma mostrando o Sequenciamento Sanger dos familiares do caso 44 com variante patogênica em *MECP2* A. irmã com a mesma variante patogênica em *MECP2* (c.806delG), *frameshift* do irmão. A seta azul indica a mudança na matriz de leitura a partir da deleção. B. genitora



**Figura 20** - Representação do IGV do NGS da irmã do paciente 44 (Síndrome de Rett), com a mesma variante patogênica em *MECP2*

Foram encontradas 112 variantes patogênicas, sendo duas microdeleções e 62 genes distintos, cujos mecanismos fisiopatológicos estão demonstrados nos dados das Tabelas 4 a 6 a seguir.

#### 2.4 Variantes patogênicas com CNVs

Foram encontrados quatro casos positivos decorrentes de CNVs, sendo dois no gene *SCN1A* (descrito em item à parte das variantes do *SCN1A*) e duas microdeleções encontradas foram: microdeleção 16p12.2 e monossomia parcial 4p.16.3-Del(4)(p.16.3).

## **2.5 Mecanismos fisiopatológicos dos genes encontrados neste estudo**

Os exames genéticos revelaram 62 genes diferentes e dois casos de microdeleções cromossômicas (Anexo B).

### **2.5.1 Genes que codificam proteínas de transporte**

O mecanismo fisiopatológico mais observado foi a disfunção em proteínas formadoras de canais iônicos (voltagem dependente e regulados por ligante), categoria na qual encontramos 44 pacientes (44/112), correspondendo a 39,3% dos casos conclusivos, sendo metade destes com variantes em *SCN1A*. Neste grupo observamos 12 genes que codificam proteínas envolvidas em canais iônicos, correspondendo a 19,4% (12/62).

**Tabela 4 -** Frequência geral de pacientes identificados com variantes patogênicas em genes que codificam proteínas de transporte

Gene	OMIM (*)	pLI	OMIM (#)	Fenótipo OMIM	Nº pacientes
<b>Canais iônicos voltagem-dependentes</b>					
<i>KCNB1</i>	600397	1	616056	DEE 26	1
<i>KCND3</i>	605411	0,99	607346	NR	1
<i>KCNQ2</i>	602235	1	613720	DEE 7	4
<i>KCNT1</i>	608167	0	614959	DEE 14	4
<i>KCNT2</i>	610044	0,04	617771	DEE 57	1
<i>SCN1A</i>	182389	1	607208	DEE 6	22
<i>SCN2A</i>	182390	1	613721	DEE 11	1
<i>SCN3A</i>	182391	1	617938	DEE 62	4
<i>SCN8A</i>	600702	1	614558	DEE 13	3
<b>Canais iônicos regulados por ligantes</b>					
<i>GABRB2</i>	600232	0,85	617829	DEE 82	1
<i>GRIN1</i>	138249	0,98	614254	ADNPM, AD com ou sem movimentos hiperclínicos e crises epiléticas	1
<i>GRIN2D</i>	602717	1	617162	DEE 46	1
<b>Proteínas carreadoras</b>					
<i>ATP1A3</i>	182350	1	619606	DEE 99	1
<i>ATP6V1B2</i>	606939	0,99	616455	Zimmerman Laband tipo 2	1
<i>ATP7A</i>	300011	1	309400	Síndrome de Menkes	1
<i>SLC2A1</i>	138140	0,99	614847	Deficiência de Glut-1 (Doença de De Vivo)	1
<i>SLC9A6</i>	300231	1	300243	Síndrome ligada ao X com DDI, tipo Christianson e epilepsia	1

Legenda: AD: Autossômica Dominante, ADNPM: Atraso de Desenvolvimento Neuropsicomotor; DEE: *Developmental Epileptic Encephalopathy* (Encefalopatia Epilética e do Desenvolvimento); DDI: Desordem do Desenvolvimento Intelectual; NR – não relacionado; NA: Não se aplica; OMIM (#): *Online Mendelian In Man* – número do fenótipo; OMIM (\*): *Online Mendelian Inheritance In Man* – número do gene); pLI: *probability of being loss-of-function intolerant* (probabilidade de que a célula tolere ou não a perda de função de um gene específico)



### **2.5.2 Genes que codificam proteínas receptoras, mediadoras da sinalização e efetoras**

Neste grupo, obtivemos 43 pacientes (43/112, correspondendo a 38,3% dos casos conclusivos). No entanto, observamos variantes patogênicas em 32 genes distintos (32/62, correspondendo a 51,6% dos genes estudados).

**Tabela 5 -** Frequência geral dos pacientes identificados com variantes patogênicas em genes que codificam proteínas receptoras, mediadoras da sinalização e efetoras

Gene	OMIM (*)	pLI	OMIM (#)	Fenótipo OMIM	Nº pacientes
<b>receptor metabotrópico, transporte de vesículas e liberação de neurotransmissores (proteínas receptoras)</b>					
<i>GABBR2</i>	607340	1	617904	DEE 59	1
<i>SNAP25</i>	600322	0,99	616330	NA	2
<i>STXBPI</i>	612164	1	612164	DEE 4	1
<i>SYT1</i>	185605	0,6	618218	Síndrome de Baker Gordon	1
<i>TRAPPC12</i>	614139	NA	215100	Encefalopatia progressiva de início precoce, atrofia cerebral e espasticidade – PEBAS	1
<b>regulação de vias celulares - cinases, controle de proliferação e apoptose (proteínas mediadoras da sinalização)</b>					
<i>ARHGAP31</i>	610911	1	100300	Síndrome de Adams Oliver	1
<i>BRAF</i>	164757	1	115150	Síndrome cardiofasciocutânea 1	1
<i>CDKL5</i>	300203	1	300672	DEE 2	4
<i>CYFIP2</i>	606323	1	618008	DEE 65	1
<i>DYRK1A</i>	159555	1	605130	Deficiência Intelectual AD, 6	1
<i>GNAO1</i>	139311	0,99	615473	DEE 17	2
<i>IQSEC2</i>	300522	1	309530	DDI ligado ao X, tipo 1	1
<i>MTOR</i>	601231	1	607341	Displasia cortical focal tipo II, somático	1
<i>NPRL2</i>	607072	0,39	617116	Epilepsia focal familiar com focos variáveis 2	1
<i>NTRK2</i>	600456	1	617830	DEE 58	1
<i>UBA5</i>	610552	NA	617132	DEE 44	1
<i>WDR45</i>	300526	0,99	300894	NBIA5	2
<i>WWOX</i>	605131	NA	616211	DEE 28	1
<b>adesão celular e citoesqueleto (proteínas efetoras)</b>					
<i>KIF1A</i>	601255	1	614255	Síndrome NESCAV	1
<i>LICAM</i>	308840	1	304100	Agenesia parcial de corpo caloso	2
<i>PCDH19</i>	300460	1	300088	DEE 9	3
<i>RHOBTB2</i>	607352	0,01	618004	DEE 64	1
<i>SPTAN1</i>	182810	1	613477	DEE 5	2
<i>TUBA1A</i>	602529	0,97	611603	Lisencefalia 3	1
<i>TUBB3</i>	602661	0	614039	Displasia cortical complexa e MFC	2
<b>organelas (mitocôndria, retículo endoplasmático/golgi) - efetoras</b>					
<i>ALG13</i>	300776	1	300884	DEE 36 (CDG 1S)	1
<i>AMT</i>	238310	NA	605899	Encefalopatia por glicina	1
<i>GPAAI</i>	603048	NA	617810	Defeito no glicosilfosfatidil inositol 15	1
<i>IVD</i>	607036	NA	243500	Acidemia isovalérica	1
<i>NDUFS1</i>	157655	NA	618226	Deficiência mitocondrial complexo I, tipo nuclear 5	1
<i>PIGN</i>	606097	NA	614080	Síndrome das anomalias congênicas múltiplas, hipotonia, crises epilépticas	1
<i>RARS2</i>	611524	NA	611523	Hipoplasia pontocerebelar tipo 6	1

Legenda: CDG: *congenital disorder of glycosylation* – Desordem congênita da glicosilação; DEE: *Developmental Epileptic Encephalopathy*; DDI: Desordem do Desenvolvimento Intelectual; NT – não tem; NA: Não se aplica; OMIM (\*): *Online Mendelian Inheritance In Man* – número do gene; OMIM (#): *Online Mendelian Inheritance In Man* – número do fenótipo; PEBAS: *Progressive, encephalopathy, brain, atrophy, spacy*; pLI: *probability of being loss-of-function intolerant* (probabilidade de que a célula tolere ou não a perda de função de um gene específico);

### 2.5.3 Genes que codificam proteínas relacionadas com a regulação transcricional e o processamento de ácidos nucleicos

No núcleo, encontram-se proteínas envolvidas na regulação transcricional e processamento de ácidos nucleicos (Tabela 6).

Neste grupo, identificamos 18/112 pacientes, obtivemos 16,1% dos casos conclusivos com variantes patogênicas em 13/62 genes distintos (21%).

**Tabela 6 -** Frequência geral dos pacientes identificados com variantes patogênicas em genes envolvidos com a regulação transcricional, estrutura da cromatina e processamento de ácidos nucleicos

Gene	OMIM (*)	pLI	OMIM (#)	Fenótipo OMIM	Nº pacientes
<b>Regulação transcricional e estrutura da cromatina</b>					
<i>CHD2</i>	602119	1	615369	DEE 94	2
<i>KDM5C</i>	314690	1	300354	DDI ligado ao X, 18 (tipo Claes Jensen)	1
<i>KMT2A</i>	159555	1	605130	Síndrome de Wiedemann-Steiner	1
<i>HNRNPU</i>	602869	1	617394	DEE 54	2
<i>MECP2</i>	300005	1	300673	Encefalopatia Precoce neonatal	2
<i>MED23</i>	605042	NA	614249	DDI AR 18	1
<i>SMC1A</i>	300040	1	301044	DEE 85	3
<i>TNRC6B</i>	610740	1	619243	ADNPM de fala e comportamento	1
<i>ZEB2</i>	605802	1	235730	Síndrome de Mowat-Wilson	1
<b>Processamento de ácidos nucleicos</b>					
<i>RNASEH2A</i>	610333	NA	610333	Síndrome de Aicardi Goutières 4	1
<i>RNASEH2B</i>	610181	NA	225750	Síndrome de Aicardi Goutières 2	1
<i>TREX1</i>	606609	NA	225750	Síndrome de Aicardi Goutières 1	1
<i>TSEN54</i>	608755	NA	277470	Hipoplasia pontocerebelar (PCH2A)	1

Legenda: ADNPM: Atraso de Desenvolvimento Neuropsicomotor; AR: Autossômico recessivo; DEE: *Developmental Epileptic Encephalopathy* (Encefalopatia Epiléptica e do Desenvolvimento); DDI: Desordem do Desenvolvimento Intelectual; pLI: *probability of being loss-of-function intolerant* (probabilidade de que a célula tolere ou não a perda de função de um gene específico); NA: Não se aplica; NT – não tem; OMIM (#): *Online Mendelian Inheritance In Man* – número do fenótipo); PCH: *Pontocerebellar hypoplasia with progressive cerebral atrophy* – Hipoplasia pontocerebelar com atrofia cerebral

### III DEE causada por variantes patogênicas em *SCN1A*

Registramos 22 indivíduos que apresentaram variantes patogênicas no gene *SCN1A* (incluindo grupos A e B). Destes, 12 exames foram provenientes de exoma, oito de painel de epilepsias por NGS e dois sequenciamentos por Sanger. Os dados genéticos deste grupo estão demonstrados na Tabela 7.

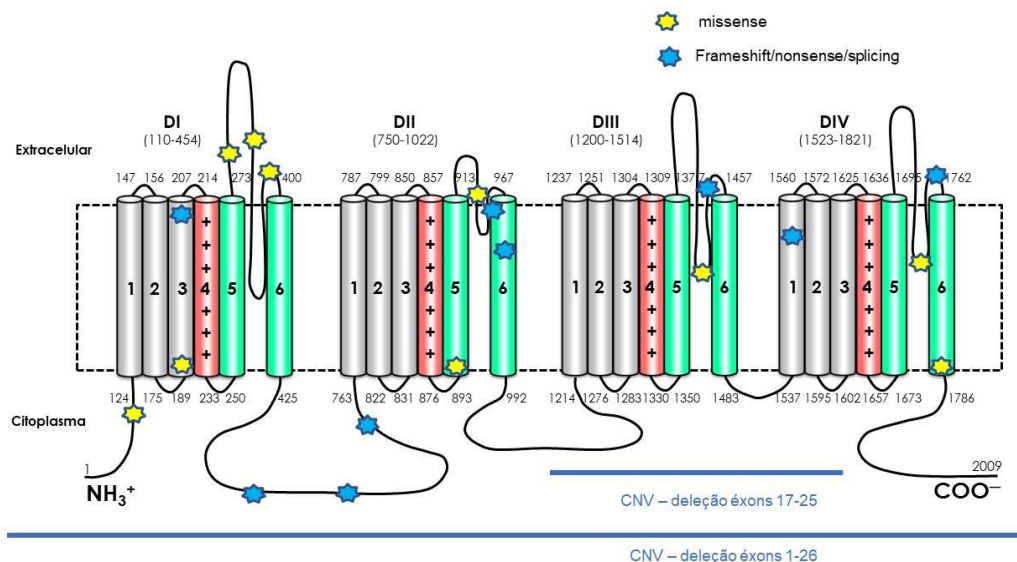
A herança da variante patogênica foi determinada, como *de novo*, somente em três casos, sendo o restante, como presumidamente não herdado (já que os genitores não tinham histórico de crises e, além disso, 11 desta série realizou painel genético ou sequenciamento Sanger, não sendo realizada a testagem dos genitores). O mecanismo mutacional mais observado foi a alteração do tipo *missense* (10/22 – 45,5%), com cinco casos, onde o domínio proteico mais envolvido foi o primeiro, apresentada na Figura 21. Houve 6/10 indivíduos em que o defeito na proteína encontrou-se na parte citoplasmática, na alça responsável pela inativação do canal. Nos casos de *missense*, é difícil prever se há ganho ou perda de função, sendo quatro considerados como LP, quatro P e duas VUS (Tabela 7). Nos dois casos de VUS, foram feitos os cálculos do CADD, que foi acima de 25. Além disso, para todos os casos *missense*, utilizamos o modelo de predição do *SCN1A* para SD do Broad Institute, sendo apenas um caso abaixo de 50% (paciente 64) (<https://scn1a-prediction-model.broadinstitute.org>).

Em nossa amostra, todas as variantes patogênicas no *SCN1A* que tiveram mecanismo do tipo *frameshift*, *nonsense*, canônicas de região de *splicing* ou CNVs foram consideradas como tendo perda de função e, conseqüentemente, patogênicas. Podem também ser chamadas de variantes patogênicas que levam a proteínas "truncadas" ou em "truncamento"(12/22 - 54,5%).

**Tabela 7** - Dados genéticos dos 22 pacientes com DEEs e variantes patogênicas no gene *SCN1A*

Número paciente	Posição cromossômica	Posição DNA codificante	Consequência proteína	Mecanismo mutacional	ACMG	Preditor <i>SCN1A</i> (%)
60	Chr2:166.856.258 A>G	c.4313 T>C	p.(Met1438Thr)	mis	VUS <sup>1</sup>	85,7
61	Chr2:166.908.363 C>T	c.830 G>T	p.(Cys277Tyr)	mis	LP	95
62	Chr2:166.898.827 GGCTA>A	c.2147_2150delTAGC	p.(Ile716Thrfs*4)	fs	P	-
63	Chr2:166.848.567 CG>C	c.5217delC	p.(Asp1740Thrfs*39)	fs	P	-
64	Chr2:166.848.615 C>G	c.5170G>C	p.(Ala1724Pro)	mis	LP	46,1
65	Chr2:166.893.028 AGA>A	c.2923_2924delCT	p.(Leu975Leufs*10)	fs	P	-
66	Chr2:166.897.804 GAA>G	c.2350_2351delTT	p.(Phe784Hisfs*14)	fs	P	-
67	Chr2:166.894.362 C>T	c.2870 G>A	p.(Trp957*)	ns	P	-
68	Chr2:166.848.437 G>A	c.5348C>T	p.(Ala1783Val)	mis	P	92,4
69	Chr2: 166.903.480 G>A	c.117 C>T	p.(Arg393Cys)	mis	LP	94
70	Chr2:166.894.541 C>A	c.2691G>T	p.(Leu897Phe)	mis	P	96,7
71	Chr2:166.894.440 C>T	c.2759G>A	p.(Arg920His)	mis	P	79,6
72	Chr2:166.430.823_167.760.438	CNV (deleção completa do <i>SCN1A</i> )	p.?	CNV	P	-
73	Chr2:166.850.928 T>C	c.4582-2A>C	p.?	sp	P	-
74	Chr2:166.905.417 C>T	c.1007G>A	p.(Cys336Tyr)	mis	P	84,2
75	Chr2:166.911.147 C>T	c.602+1G>A	p.?	sp	P	-
75	Chr2: 166.859.000 C>T	c.4266 T>A	p.(Tyr1422*)	non	P	-
77	Chr2:166.850.605_166.872.288	CNV (deleção éxons 17 a 25)	p.?	CNV	P	-
78	Chr2:166.911.177 G>C	c.573C>G	p.(Asn191Lys)	mis	LP	93,6
79	Chr2:166.900.385 G>A	c.1837C>T	p.(Arg613*)	non	P	-
80	Chr2: 166.900.484 G>A	c.1738 C>T	p.(Arg580*)	non	P	-
81	Chr2: 166.915.158 A>G	c.305T>C	p.(Phe102Ser)	mis	VUS <sup>2</sup>	97,9

Legenda fs: frameshift; CNV: copy number variation; LP: likely pathogenic; mis: missense; non: nonsense; P: variante patogênica; sp: splicing; VUS<sup>1</sup>-CADD score:25,5; VUS<sup>2</sup> - CADD score 25,3 HG19; ENST variou para cada variante – vide anexo B; Preditor para *SCN1A* (<https://scn1a-prediction-model.broadinstitute.org>).



**Figura 21** – Esquema ilustrativo da proteína SCN1A, sendo em estrelas amarelas a localização da consequência da proteína nos dez pacientes com variantes do tipo *missense* e em azul as dez variantes do tipo *frameshift*, *nonsense* e *sítios de splicing*. As linhas azuis correspondem a dois casos de CNVs. Adaptado a partir de Catterall et al., 2012.

O segundo mecanismo mais observado foi o *nonsense*, que somado ao *frameshift* levam à formação de um stop códon prematuro (8/22 – 36,4%) demonstrado nos dados da Tabela 7.

Dos 22 casos com variante patogênica no *SCN1A*, 20 tinham fenótipo típico da SD e dois, o mecanismo do tipo CNV e não apresentavam o fenótipo de SD.

Do grupo que teve fenótipo tipo SD, a idade média atual foi de 10,3 anos (mediana de 9,7 anos, variando de 3,9 a 40 anos). O início de crises foi, em média, 7,2 meses (mediana 7,2 meses). O tipo inicial de crises foi focal e generalizado na maioria dos casos, correspondendo a 65% (13/20). O SE esteve presente em 18/20 casos. Os padrões iniciais de EEG foram do tipo I e II em 15 pacientes e que permaneceu até o último EEG.

## **CAPÍTULO 3**

### **Artigos 1 e 2 *SCN3A***

---

Nos capítulos 3 a 6, apresentaremos os artigos publicados durante a conclusão desta tese, com permissão das revistas, para fins não comerciais (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions>)

## Artigo 1

### **Desordem de desenvolvimento neurológico associada ao *de novo SCN3A* variantes patogênicas: dois novos casos e revisão da literatura**

**Inuzuka LM**, Macedo-Souza LI, Della-Ripa B, Cabral K, Monteiro F, Kitajima JP, de Souza Godoy LF, de Souza Delgado D, Kok F, & Garzon E.

### **Neurodevelopmental disorder associated with *de novo SCN3A* pathogenic variants: two new cases and review of the literature**

**Inuzuka LM**, Macedo-Souza LI, Della-Ripa B, Cabral K, Monteiro F, Kitajima JP, de Souza Godoy LF, de Souza Delgado D, Kok F, & Garzon E.

*Brain & development*. 2020;42(2), 211–216.

## **Número de citações: 12**

### **Descrição do artigo:**

Recentemente o *SCN3A* foi reconhecido como um gene associado à alteração do desenvolvimento neurológico e da epilepsia. Apresentamos mais dois pacientes com uma nova variante patogênica no *SCN3A* e uma revisão de todos os casos publicados de variantes *de novo*. Em um de nossos casos, a ressonância magnética do cérebro (RM) dos pacientes revelou uma polimicrogiria grave e no outro era normal. A RM e o fenótipo foram caracterizados por um grave atraso de desenvolvimento e epilepsia refratária no paciente com polimicrogiria e epilepsia deficiência intelectual com características autísticas e epilepsia farmacorresponsiva no probando com RM normal. Polimicrogiria é uma desordem de proliferação e migração de células progenitoras, é um achado imprevisto para uma disfunção do canal iônico.





Brain &amp; Development 42 (2020) 211–216


**BRAIN & DEVELOPMENT**  
 Official Journal of  
 the Japanese Society  
 of Child Neurology

www.elsevier.com/locate/braindev

## Case Report

## Neurodevelopmental disorder associated with de novo SCN3A pathogenic variants: two new cases and review of the literature

Luciana Midori Inuzuka<sup>a,d,†</sup>, Lúcia Inês Macedo-Souza<sup>d</sup>, Bruno Della-Ripa<sup>d</sup>  
 Katiane S.S. Cabral<sup>d</sup>, Fabiola Monteiro<sup>c</sup>, João Paulo Kitajima<sup>c</sup>  
 Luis Filipe de Souza Godoy<sup>b</sup>, Daniel de Souza Delgado<sup>b</sup>, Fernando Kok<sup>c,d</sup>,  
 Eliana Garzon<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup> Epilepsy Clinic, Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, Brazil<sup>b</sup> Radiology Department, Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, Brazil<sup>c</sup> Mendelics Genetic Analysis, São Paulo, Brazil<sup>d</sup> Department of Neurology, University of São Paulo School of Medicine, Brazil

Received 2 May 2019; received in revised form 28 August 2019; accepted 10 September 2019

## Abstract

SCN3A was recently recognized as a gene associated with neurodevelopmental disorder and epilepsy. We present two additional patients with a novel de novo SCN3A pathogenic variant, and a review of all published cases of de novo variants. In one of our patients brain magnetic resonance imaging (MRI) disclosed a severe polymicrogyria and in the other it was normal. The clinical phenotype was characterized by a severe developmental delay and refractory epilepsy in the patient with polymicrogyria and intellectual disability with autistic features and pharmacoresponsive epilepsy in the subject with normal MRI. Polymicrogyria, a disorder of progenitor cells proliferation and migration, is an unanticipated finding for an ion channel dysfunction.  
 © 2019 The Japanese Society of Child Neurology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** SCN3A; Epilepsy; Epileptic encephalopathy; Polymicrogyria

## 1. Introduction

Ion channels are highly expressed in the brain, and pathogenic variants in voltage-gated sodium channels have been associated with epilepsies of variable severity. Deleterious pathogenic variants in SCN1A, SCN2A, and SCN8A coding genes for ion channels subunits are associated with a variety of epileptic syndromes including familial febrile seizures (FS), generalized epilepsy with FS, and West, Ohtahara, or Dravet syndromes. SCN2A and SCN8A are also associated with neurodevelopmental disorders without epilepsy. Only

<sup>†</sup> Corresponding author at: Department of Neurology, University of São Paulo School of Medicine, Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 255 - Cerqueira César, São Paulo - SP, 05403-000

E-mail addresses: [luciana.minakaharada@hsj.org.br](mailto:luciana.minakaharada@hsj.org.br) (L.M. Inuzuka), [inesgenetica@gmail.com](mailto:inesgenetica@gmail.com) (L.I. Macedo-Souza), [bruno.dellaripa@irisp.com.br](mailto:bruno.dellaripa@irisp.com.br) (B. Della-Ripa), [kate\\_souza@yahoo.com.br](mailto:kate_souza@yahoo.com.br) (K.S.S. Cabral), [fabidamonteiro@mendelics.com.br](mailto:fabidamonteiro@mendelics.com.br) (F. Monteiro), [joao.kitajima@mendelics.com.br](mailto:joao.kitajima@mendelics.com.br) (J.P. Kitajima), [filgodoy@gmail.com](mailto:filgodoy@gmail.com) (L.F. de Souza Godoy), [ds.delgado@gmail.com](mailto:ds.delgado@gmail.com) (D. de Souza Delgado), [fernandakok@mendelics.com.br](mailto:fernandakok@mendelics.com.br) (F. Kok), [eliana.garzon@irisp.com.br](mailto:eliana.garzon@irisp.com.br) (E. Garzon).

<https://doi.org/10.1016/j.braindev.2019.09.004>

0387-7604/© 2019 The Japanese Society of Child Neurology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

recently have *de novo* epilepsy-associated pathogenic variants in *SCN3A* (Sodium Channel, Voltage Gated, Type III, Alpha Subunit, OMIM \*182391) been reported. This gene codes for a sodium-selective, pore-forming subunit, also known as Nav1.3. Interestingly, polymicrogyria, a feature not previously reported in other channelopathies, was present in some patients with pathogenic variants in this gene [1,4,5]. As with other channelopathies, the severity of the epilepsy was also quite variable. In this study, we report two additional patients with novel variants of *SCN3A* (one missense and one in frame deletion of a single amino acid), which are not inherited from their parents, with epilepsy and developmental delay/intellectual disability. Including those two new variants, a total of only 7 apparent *de novo* pathogenic variants in *SCN3A* are currently known [1–5]. Inherited pathogenic variants of *SCN3A* have also been reported in two groups of patients: individuals initially assessed for epilepsy, with normal MRI; and in patients evaluated for polymicrogyria with oral dyspraxia and/or intellectual disability but without epilepsy [5–9].

## 2. Case report

We report two individuals with early-onset epilepsy that were evaluated at the Epilepsy Clinic, Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, Brazil. This report was approved by the local Ethical Committee, and those legally responsible for the patients consented to their participation in this study.

Patient 1 is a 5-year-old boy, who was born at term after an uneventful pregnancy and delivery, from non-consanguineous parents. Focal and generalized seizures, accompanied by myoclonus and epileptic spasms, have occurred since 5 weeks of age. He had hypotonia, severe developmental delays, and dystonic movements. He was totally dependent in self-care, did not make eye contact with others, and did not establish any type of communication. His epilepsy was refractory to therapeutic doses of different associations of phenobarbital, valproate, levetiracetam, topiramate, vigabatrin, valproate, carbamazepine, ketogenic diet, and vagus nerve stimulation. MRI revealed an abnormal cortical development, with areas of polymicrogyria (Figure 1). An initial electroencephalogram (EEG) presented multifocal and generalized epileptiform paroxysms and suppression of background activity (Figure 2a). Whole exome sequencing (WES) disclosed a heterozygous variant in *SCN3A* [c.5265G > A ENST00000360093, p.(Met1765Ile)], which was also confirmed by Sanger sequencing in the patient and was absent in his parents (*de novo* variant). Methionine at codon 1765 is highly conserved among biological species; its substitution for isoleucine is not found in population databases (1000 Genomes, ExAC, GnomAD and TopMed) and is predicted to be patho-

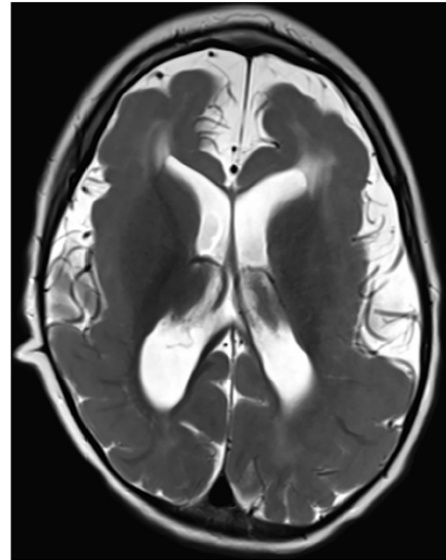


Fig. 1. Patient 1 (2 years old), axial T2 MRI image showing extensive, bilateral and symmetric polymicrogyria, predominantly frontoparietal with incomplete insula opercularization and slightly dysplastic Sylvian fissures. Additionally, the periventricular and deep white matter of frontal lobes show high-intensity signal.

genic by several computer programs (Provean, Mutation Taster, PolyPhen).

Patient 2 is a 3-year-old girl, also born at term after an uneventful pregnancy and delivery, from non-consanguineous parents. At 5 months of age, she presented with generalized seizures and epileptic spasms, which were controlled with vigabatrin. Later, she developed autistic behavior, ataxia, and severe insomnia. The brain MRI appeared normal. An initial EEG showed frequent multifocal and generalized epileptiform paroxysms, intermixed with hypersarrhythmia (Figure 2b). WES identified a heterozygous variant in *SCN3A* [c.2950\_2952delTTG ENST00000360093, p.(Leu984del)], which was also confirmed by Sanger sequencing in the patient and was not present in her parents (*de novo* event). Leucine at codon 984 is highly conserved among biological species; its deletion is not found in population databases (1,000 Genomes, ExAC, GnomAD and TopMed) and is predicted to be pathogenic by several computer programs (Provean, Mutation Taster).

## 3. Discussion

*SCN3A* encodes the type III voltage-gated Na<sup>+</sup> channel alpha subunit, also known as Nav1.3. This

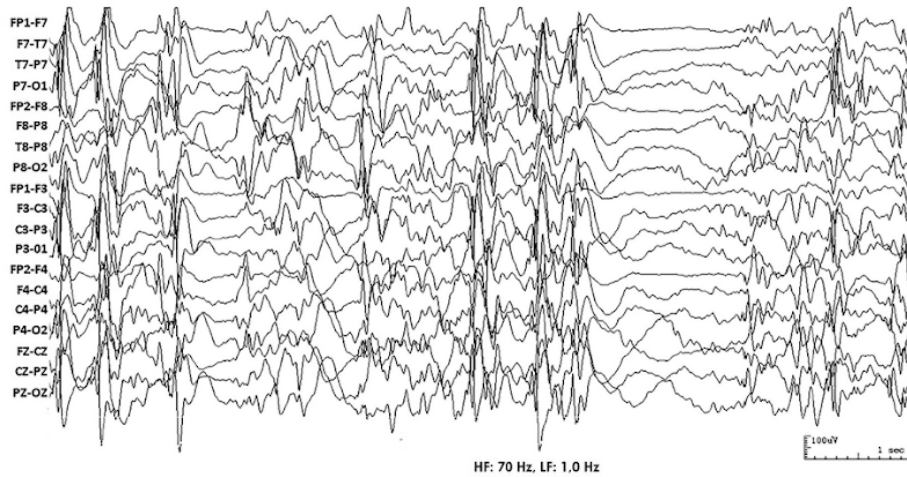


Fig. 2a. Patient 1 (3 years old), Electroencephalogram showing multifocal and generalized epileptiform paroxysms and suppression of background activity.

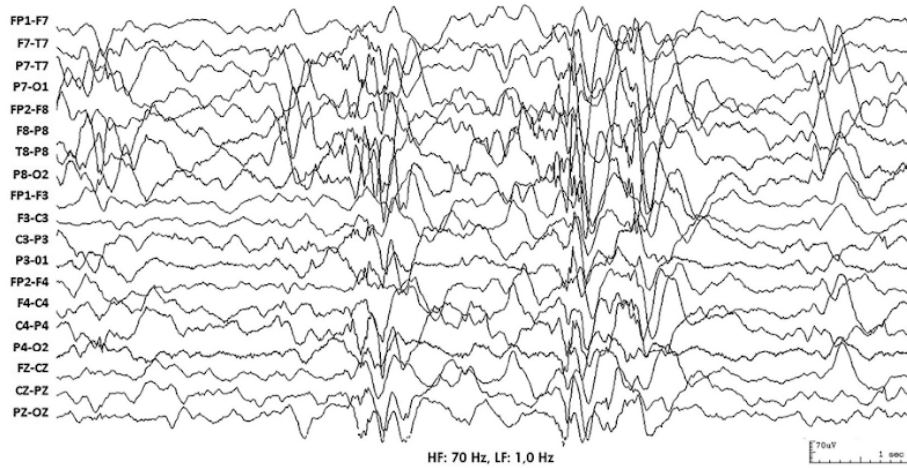


Fig. 2b. Patient 2 (7 months), Electroencephalogram showing multifocal and generalized epileptiform paroxysms, intermixed with hypsarrhythmia.

channel is formed by a single polypeptide with 1951 amino acids and contains 4 repeated domains (D1-D4), each of them being comprised of 6 transmembrane segments (S1-S6). *SCN3A* is highly intolerant to loss-of-function variants, as suggested by its elevated PLi of 1.0 (<http://gnomad.broadinstitute.org/gene/ENSG00000153253>). Nevertheless, the neurophysiological consequences of the reported deleterious variants in this gene are not clear, and both loss or gain of function might be involved in its pathogenesis. The most remark-

able aspect of this condition is the association of an ion channel dysfunction and cortical development disorder.

Only 11 patients with 5 different *de novo* variants in *SCN3A* have been reported to date: p.(Ile875Thr) was detected in 6 individuals, including a pair of siblings [1,4,5]; p.(Pro1333Leu) was reported in 2 patients [1,3]; p.(Val769Ala) [1], p.(Leu247Pro), and p.(Leu850Pro) were individually seen in 1 patient, [2,5]. We reported two additional variants: p.(Met1765Ile) and p.(Leu984-del). Those variants were present in any of the 4 protein

Table 1  
Epilepsy-associated SCN3A de novo pathogenic variants: present reports and review of the literature.

Author	Variant	Domain	Epilepsy Age of onset	Type of seizures	Other features	Initial EEG	MRI
Patient 1 This study	p.(Met1765Ile)	4, transmembrane	1 wk	Focal (clonic, tonic) and generalized seizures (tonic-clonic, myoclonic, spasms)	Microcephaly, severe global development delay, dyskinetic movements, cortical blindness, spastic tetraparesis.	Multifocal	Bilateral PMG, white matter thickening and thin corpus callosum
Patient 2 This study	p.(Leu984del)	2, cytoplasmatic	5 mo	Epileptic spasms and generalized seizures	Global developmental delay, insomnia, ataxia, autistic behavior	Hypsarrhythmia and multifocal, with elevated amplitude	Normal
Patient 3 Lamar et al	p.(Leu247Pro)	1, cytoplasmatic	1 wk	Focal seizures	Microcephaly, global developmental delay, hypotonia and mid-face hypoplasia, autonomic nervous system dysfunction.	Focal temporal	Normal
Patient 4 Zaman et al	p.(Val1769Ala)	4, transmembrane	>1 yr	NR	Developmental delay	Multifocal	NR
Patient 5 Trujillano et al	p.(Pro1333Leu)	3, cytoplasmatic	NR	Generalized tonic-clonic, febrile seizures	NR	NR	Delayed myelination
Patient 6 Zaman et al	p.(Pro1333Leu)	3, cytoplasmatic	1–3 days	Focal and generalized seizures	Severe global developmental delay, hypotonia, cortical blindness	Hypsarrhythmia and multifocal	Thin corpus callosum
Patient 7* Zaman et al	p.(Ile875Thr)	2, cytoplasmatic	2 wk	Tonic and myoclonic seizures	Nonverbal and non-ambulatory, dysphagia	NR	Frontoparietal PMG
Patient 8* Zaman et al	p.(Ile875Thr)	2, cytoplasmatic	2 wk	Generalized tonic	Severe global developmental delay, central hypotonia, spasticity, tetraparesis	NR	Diffuse bilateral PMG
Patient 9 Miyatake et al	p.(Ile875Thr)	2, cytoplasmatic	1 day	Tonic seizures, focal motor and nonmotor seizures	Microcephaly, severe growth and developmental delay, cortical blindness	Focal parieto-occipital	Bilateral cortical atrophy with PMG
Patient 10 Miyatake et al	p.(Ile875Thr)	2, cytoplasmatic	1,5 mo	Epileptic spasms, tonic seizures	Microcephaly, developmental delay.	Hypsarrhythmia	Bilateral frontal PMG



Patient 11 Smith et al	p.(Ile875Thr)	2, cytoplasmatic	2 wk	Focal seizures	Severe development delay, microcephaly, generalize hypotonia, spasticity, cortical blindness, dysphagia	NR	Frontoparietal PMG, subcortical calcifications and abnormal frontal white matter, thin corpus callosum
Patient 12 Smith et al	p.(Ile875Thr)	2, cytoplasmatic	NR	No seizures reported	Microcephaly, severe global development delay, stereotyped movements, generalized hypotonia, quadriplegia	Bilateral synchronous epileptiform discharges	Bilateral frontoparietal PMG
Patient 13 Smith et al	p.(Leu850Pro)	2, transmembrane	NR	No seizures reported	Motor development and speech delay, hypotonia, very mild left pyramidal signs, weak executive functions, good social skills	NR	Right-sided perisylvian PMG, thin corpus callosum, mildly enlarged right-side cerebral ventricle and slight diminished volume white matter

EEG = electroencephalogram; mo = month; MRI = magnetic resonance image; NR = not reported; PMG: polymicrogyria; wk = week; yr = year; \* = siblings.

domains (D1-D4). Four of those seven variants were located in the cytoplasmatic portion of the proposed model of the protein and three of them were placed in its transmembrane portion.

All 6 patients with the p.(Ile875Thr) pathogenic variant (Table 1, patients 7–12) exhibited an abnormal cortical development, with areas of polymicrogyria (Fig. 1). Our patient 1, who had the p.(Met1765Ile) variant, also showed similar imaging features. Patients 5 and 6, with the p.(Pro1333Leu) variant, had delayed myelination or a thin corpus callosum. Finally, two patients had normal MRIs (Table 1, patients 2 and 3).

*SCN3A*-related neurodevelopmental disorder has a phenotypic spectrum that ranges from severe developmental delay with polymicrogyria to a milder intellectual disability with normal MRI.

Epilepsy was present in 11 out of the 13 known patients (ours included) with *de novo SCN3A* pathogenic variants. The age of the onset of epilepsy varied from 1 day to less than 1 year, and multiple types of seizures were reported, including infantile spasms, tonic, and myoclonic, focal and generalized motor seizures. The EEG pattern was highly variable and changed over time. During the first year of life, hypersarrhythmia and multifocal discharges were commonly reported.

This study has some limitations: patient's recruitment was based primarily on the presence of epilepsy, but not polymicrogyria; and we did not perform functional studies to access the consequences of the identified variants.

Despite the advances in neuroimaging techniques and neurophysiological monitoring, there is still a considerable proportion of patients who have not received an etiological diagnosis to date. In this situation, NGS based epilepsy panel or WES were considered useful ways to improve diagnoses. It is also noteworthy that most cases of genetically determined epilepsies are secondary to *de novo* variants, and this should be confirmed by parental genotyping to support its pathogenicity, as it was done with our patients. The determination of the genetic basis of a disease enables appropriate genetic counseling and avoids additional unnecessary investigation.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank the Genome Aggregation Database (gnomAD) and the groups that provided exome and genome variant data to this resource. A full list of contributing groups can be found at <http://gnomad.broadinstitute.org/about>.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2019.09.004>.

**References**

- [1] Zaman T, Helbig I, Božović IB, DeBrosse SD, Bergqvist AC, Wallis K, et al. Mutations in cause early infantile epileptic encephalopathy. *Ann Neurol* 2018;83:703–17.
- [2] Lamar T, Vanoye CG, Calhoun J, Wong JC, Dutton SBB, Jorge BS, et al. *SCN3A* deficiency associated with increased seizure susceptibility. *Neurobiol Dis* 2017;102:38–48.
- [3] Trujillano D, Bertoli-Avella AM, Kumar Kandaswamy K, Weiss ME, Köster J, Marais A, et al. Clinical exome sequencing: results from 2819 samples reflecting 1000 families. *Eur J Hum Genet* 2017;25:176–82.
- [4] Miyatake S, Kato M, Sawaiishi Y, Saito T, Nakashima M, Mizuguchi T, et al. Recurrent *SCN3A* p.Ile875Thr variant in patients with polymicrogyria. *Ann Neurol* 2018;84:159–61.
- [5] Smith RS, Kenny CJ, Ganesh V, Jang A, Borges-Monroy R, Partlow JN, et al. Sodium channel *SCN3A* (Na(V)1.3) regulation of human cerebral cortical folding and oral motor development. *Neuron* 2018;99:905–13.
- [6] Holland KD, Kearney JA, Glauser TA, Buck G, Keddache M, Blankston JR, et al. Mutation of sodium channel *SCN3A* in a patient with cryptogenic pediatric partial epilepsy. *Neurosci Lett* 2008;433:65–70.
- [7] Vanoye CG, Gurnett CA, Holland KD, George Jr AL, Kearney JA. Novel *SCN3A* variants associated with focal epilepsy in children. *Neurobiol Dis* 2014;62:313–22.
- [8] Chen YJ, Shi YW, Xu HQ, Chen ML, Gao MM, Sun WW, et al. Electrophysiological differences between the same pore region mutation in *SCN1A* and *SCN3A*. *Mol Neurobiol* 2015;51:1263–70.
- [9] Wang Y, Du X, Bin R, Yu S, Xia Z, Zheng G, et al. Genetic variants identified from epilepsy of unknown etiology in chinese children by targeted exome sequencing. *Sci Rep* 2017;7:40319.

**Artigo 2****Mosaicismo da linha germinativa em *SCN3A* relacionada com grave desordem de desenvolvimento**

Inuzuka LM, Macedo-Souza LI, Guerra-Peixe M, Pedreira CC; Della-Ripa B; de Souza Delgado D; Monteiro F; Kitajima JP; Garzon E & Kok F.

**Parental germline mosaicism in *SCN3A*-related severe developmental disorder**

Inuzuka LM, Macedo-Souza LI, Guerra-Peixe M, Pedreira CC; Della-Ripa B; de Souza Delgado D; Monteiro F; Kitajima JP; Garzon E & Kok F.

*Brain & Development.* 2021;43:669–670

Sem citação

**Descrição do artigo:**

Destacamos o risco imprevisível de recidiva causado pelo mosaicismo da linha germinativa parental em variantes patogênicas no *SCN3A*. Gostaríamos de fornecer mais dados sobre a família do paciente 1 de nosso artigo “Desordem do desenvolvimento neurológico associado ao *de novo* variantes patogênicas em *SCN3A*: dois novos casos e revisão de literatura”, publicado em 2019 em *Brain & Development* [1]. Esta família não consanguínea tinha três filhos: a criança mais velha, atualmente, com 7 anos de idade, tinha um bebê com epilepsia refratária e grave atraso no desenvolvimento causado pela variante patogênica no *SCN3A* [c.5295G > A ENST00000360093, p.(Met1765Ile)], anteriormente relatado por Inuzuka et al (2021) e Zaman et al (2020) . Isto foi assumido, como sendo uma variante *de novo*, pois os pais foram avaliados pelo sequenciamento Sanger e não mostravam a substituição (Material suplementar - Fig. 1). A família tem um menino com desenvolvimento normal, de 4 anos; no início de 2020, nasceu outro bebê, que é um menino, 5 meses de idade, com o mesmo fenótipo clínico e variante patogênica no *SCN3A*, presente no irmão mais velho. Apesar da diferença de idade dos pacientes e do tempo de Ressonância Magnética, ambas as crianças mostram alargamento da fissura sylviana, carência de substância branca, paquigiria e áreas de espessamento cortical, como um padrão de polimicrogria, afetando quase todos os dois

hemisférios, poupando relativamente os lobos occipitais (Material suplementar Fig. 2). Preocupado com a possível existência de mosaicismos somáticos de baixo grau, que não é detectável pelo Sequenciamento Sanger, realizamos genotipagem parental por sequenciamento de trio por exoma, utilizando DNA extraído de esfregaço bucal. Depois que a paternidade foi confirmada, demonstramos que a variante estava de fato ausente nos pais. Uma cobertura muito elevada foi alcançada para esta variante no sequenciamento de nova geração, com 118 leituras para o doente [67 wild tipo (57%) e 51 mutantes (43%)]. Além disso, todos os 235 lê-se na mãe e 237 lê-se no pai eram selvagens tipo (Material suplementar - Fig. 3). Portanto, concluímos que a recorrência da mutação era, provavelmente, muito secundária ao mosaicismos germinativo (ou gonadal). O mosaicismos germinativo pode ser observado com qualquer herança padrão, mas é mais comumente visto com doenças autossômicas dominantes e ligadas ao X. Rahbari et al., 2016, relataram um risco global de 1-2% de mutações de ponto e até 4% para rearranjos cromossômicos. Embora o mosaicismos somático dos pais tenha sido relatado, o mosaicismos, exclusivamente, germinativo é raro em epilepsia genética determinada. O presente caso ilustra que o aconselhamento às famílias com uma presumível herança *de novo* no *SCN3A* deve incluir a possibilidade de mosaicismos germinativo, bem como a opção de diagnóstico pré-natal, ainda que sua taxa precisa seja desconhecida. Este é o primeiro caso de provável mosaicismos relacionado ao gene *SCN3A*.





Brain &amp; Development 43 (2021) 669–670



**BRAIN & DEVELOPMENT**  
Official Journal of  
the Japanese Society  
of Child Neurology

www.elsevier.com/locate/braindev

## Letter to the Editor

**Parental germline mosaicism in *SCN3A*-related severe developmental disorder**

We highlight the unpredictable risk of recurrence caused by parental germline mosaicism in pathogenic variants in *SCN3A*. We would like to provide additional data on the family of patient 1 from our article “Neurological development disorder associated with new *SCN3A* pathogenic variants: two new cases and literature review” published in 2019 in Brain of Development [1].

This non-consanguineous family had three boys: the oldest child, who currently is 7 years old, had untreatable epilepsy and severe developmental delay caused by the pathogenic variant in *SCN3A* [c.5295G > A ENST00000360093, p.(Met1765Ile)], previously reported by Inuzuka et al [1] and Zaman et al [2]. This was assumed to be a *de novo* variant, as the parents were evaluated by Sanger sequencing and they did not carry the substitution (Supplementary material – Fig. 1). Another boy is a 4-year-old normal child, and at the beginning of 2020, another baby was born, who is a boy, 5-months of age, with the same clinical phenotype and pathogenic variant in *SCN3A* present in the oldest sibling. Despite the age difference of the patients at the time of Magnetic Resonance Imaging, both children show large Sylvian fissures, a paucity of cerebral white matter, pachygyria, and areas of cortical thickening, like a polymicrogyria pattern, affecting almost entire cerebral hemispheres, sparing relatively the occipital lobes. (Supplementary material Fig. 2). Concerned with the possible existence of low-grade somatic mosaicism, which is not detectable by Sanger sequencing, we performed parental genotyping by trio exome sequencing using DNA extracted from buccal swab; then, the parenthood was confirmed, and we demonstrated that the variant was indeed absent in the parents. A very high coverage was achieved for this variant in New Generation Sequencing, with 118 reads for the patient [67 wild type (57%) and 51 mutants (43%)]. Additionally, all 235 reads in the mother and 237 read in the father were wild type (Supplementary material – Fig. 3). Therefore, we concluded that mutation recurrence was most likely secondary to germline (or gonadal) mosaicism.

Germline mosaicism can be observed with any inheritance pattern, but it is most commonly seen with auto-

somal dominant and X-linked disorders. Rahbari et al. [3], reported a 1–2% overall risk of point mutations and up to 4% for chromosomal rearrangements. Although parental somatic mosaicism has been reported, exclusively germline mosaicism is rare in genetic determined epilepsy [4,5].

The present case illustrates that counseling the families with a presumed *de novo* inheritance in *SCN3A* should include the possibility of germline mosaicism, as well as the option of prenatal diagnosis, even though its precise rate is unknown. This is the first report of putative germline mosaicism in *SCN3A*.

**Declaration of Competing Interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

**Appendix A. Supplementary data**

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2020.12.013>.

**References**

- [1] Inuzuka LM, Macedo-Souza LI, Della-Ripa B, Cabral KSS, Monteiro F, Kitajima JP, de Souza Godoy LF, de Souza Delgado D, Kok F, Garzon E. Neurodevelopmental disorder associated with *de novo* *SCN3A* pathogenic variants: two new cases and review of the literature. *Brain Dev* 2020;42(2):211–6. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2019.09.004>.
- [2] Zaman T, Helbig KL, Clatot J, Thompson CH, Kang SK, Stouffs K, et al. *SCN3A*-related neurodevelopmental disorder: A spectrum of epilepsy and brain malformation. *Ann Neurol* 2020. <https://doi.org/10.1002/ana.25809>.
- [3] Rahbari R, Wuster A, Lindsay SJ, Hardwick RJ, Alexandrov LB, Al Turki S, et al. Timing, rates and spectra of human germline mutation. *Nat Genet* 2016;48(2):126–33. <https://doi.org/10.1038/ng.3469>.
- [4] Zarem A, Lev D, Blumkin L, Goldberg-Stern H, Michaeli-Yossef Y, Halevy A, et al. Paternal germline mosaicism of a *SCN2A* mutation results in Ohtahara syndrome in half siblings. *Eur J Paediatr Neurol* 2014;18(5):567–71. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2014.04.008>.

<https://doi.org/10.1016/j.braindev.2020.12.013>

0387-7604/© 2020 The Japanese Society of Child Neurology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

670

L. M. Inuzuka et al. / Brain & Development 43 (2021) 669–670

[5] Shi YW, Yu MJ, Long YS, Qin B, He N, Meng H, et al. Mosaic SCN1A mutations in familial partial epilepsy with antecedent febrile seizures. *Genes Brain Behav* 2012;11:170–6.

Luciana Midori Inuzuka\*  
*Epilepsy Clinic, Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, Brazil*  
*Department of Neurology, University of São Paulo School of Medicine, Brazil*

\* Corresponding author at: Rua Haddock Lobo, 131 cj 1309, São Paulo 01414-001, Brazil.  
 E-mail address: [lminezuka@gmail.com](mailto:lminezuka@gmail.com)

Lucia Inês Macedo-Souza  
 Matheus Guerra-Peixe  
*Department of Neurology, University of São Paulo School of Medicine, Brazil*

Christiane Cobas Pedreira  
*Epilepsy Clinic, Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, Brazil*  
*Department of Neurology, University of São Paulo School of Medicine, Brazil*

Bruno Della-Ripa  
*Department of Neurology, University of São Paulo School of Medicine, Brazil*

Daniel Souza Delgado  
*Radiology Department, Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, Brazil*

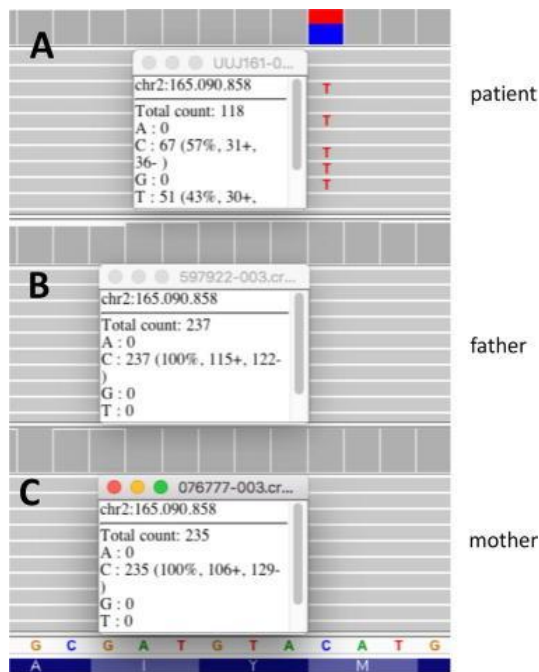
Fabiola Monteiro  
 João Paulo Kitajima  
*Mendelics Genomic Analysis, São Paulo, Brazil*

Eliana Garzon  
*Epilepsy Clinic, Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, Brazil*  
*Department of Neurology, University of São Paulo School of Medicine, Brazil*

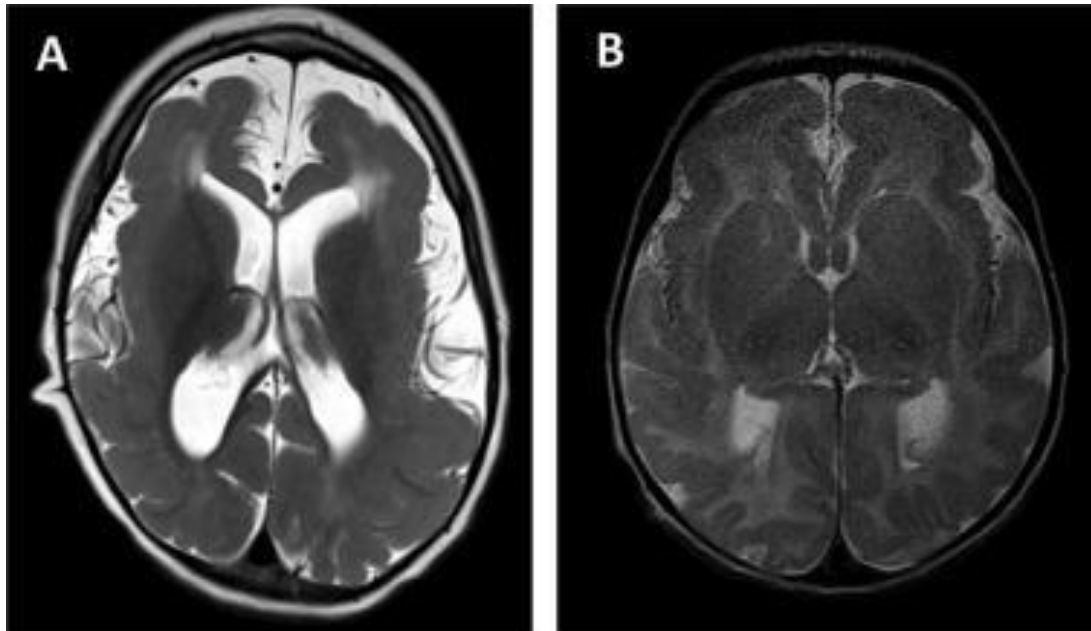
Fernando Kok  
*Department of Neurology, University of São Paulo School of Medicine, Brazil*  
*Mendelics Genomic Analysis, São Paulo, Brazil*

Received 20 September 2020; received in revised form 16 December 2020; accepted 17 December 2020

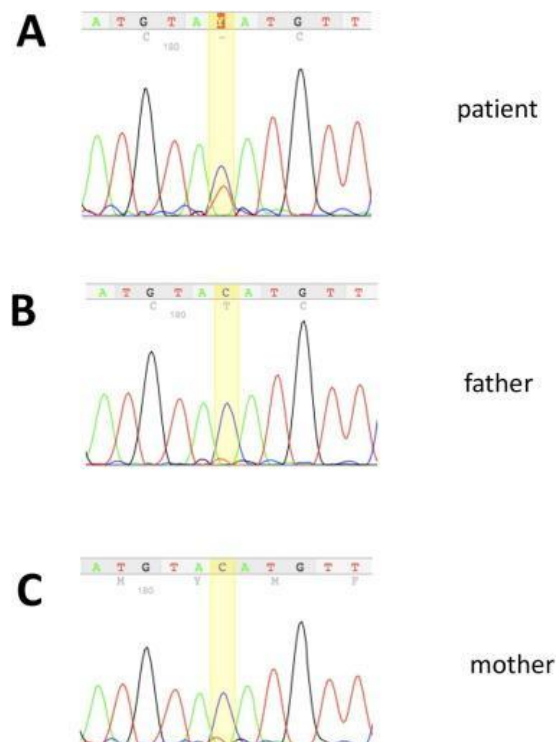
### Supplemental Material



Supplementary figure 1. Illustrating the Integrative Genomic Viewer (IGV) data of the identified variant in the second affected sibling (A) and his parents (B and C), with the respective number of reads.



Supplementary figure 2. MRI of the siblings. Despite age difference of the patients at the time of MRI scans the both children show large sylvian, pachygyria, and areas of cortical thickening, like a polymicrogyria pattern, affecting almost entire cerebral hemispheres, sparing relatively the occipital lobes. A. MRI of the first affect sibling with 3.5 years of age B. MRI of the second sibling with 12 days of age.



Supplementary figure 3. Sequencing analysis of second affected sibling showing the substitution c.5295G>A leading to change p.(Met1765Ile) confirming that the variant occurred de novo. B and C - Sequencing analysis of his parents.

## **CAPÍTULO 4**

### **Artigo *ATP6V1B2***

---

**Artigo ATP6V1B2****ATP6V1B2 relacionado à Encefalopatia Epiléptica**

**Inuzuka LM**; Macedo-Souza LI, Della-Ripa B, de Souza Delgado D; Godoy LF; Ramos L; Costa LSA; Monteiro F, Kitajima JP, Garzon E & Kok F.  
*Epileptic Disord* 2020; 22 (3): 317-22

**ATP6V1B2-related Epileptic Encephalopathy**

**Inuzuka LM**; Macedo-Souza LI, Della-Ripa B, de Souza Delgado D; Godoy LF; Ramos L; Costa LSA; Monteiro F, Kitajima JP, Garzon E & Kok F.  
*Epileptic Disord* 2020; 22 (3): 317-22

Número de citações: 1

**Descrição:**

*ATP6V1B2* codifica uma subunidade de uma bomba de prótons transmembrana lisossomal necessária para o funcionamento adequado de várias hidrolases ácidas. Variantes monoalélicas *de novo* deste gene foram associadas a dois fenótipos distintos: Síndrome de Zimmermann-Laband 2 (ZLS2), uma deficiência intelectual/síndrome de malformação múltipla, surdez dominante e oncodistrofia (DDOD), síndrome de múltipla malformação sem envolvimento cognitivo. A epilepsia não é observada no DDOD, mas está presente de forma variável em ZLS2, mas é uma característica comum na síndrome de Zimmermann-Laband 1 (ZLS1) (causada por variantes patogênicas monoalélicas em *KCNH1*) e síndrome de Zimmermann-Laband (ZLSL) (associada às variantes *KCNK4*). Aqui, relatamos um caso de uma criança com encefalopatia epiléptica grave com microcefalia e importante atraso de desenvolvimento, associado com uma nova variante de nova perda de funções em *ATP6V1B2*, diagnosticada por sequenciamento completo do exoma. Esta descoberta expande o espectro do *ATP6V1B2*-doenças associadas e acrescenta *ATP6V1B2* como um novo gene à crescente lista de genes da encefalopatia epiléptica precoce.

## Clinical commentary

*Epileptic Disord* 2020; 22 (3): 317-22**ATP6V1B2-related epileptic encephalopathy**

Luciana Midori Inuzuka<sup>1,2</sup>, Lúcia Inês Macedo-Souza<sup>2</sup>,  
 Bruno Della-Rippa<sup>2</sup>, Fabiola Paoli Monteiro<sup>3</sup>,  
 Daniel de Souza Delgado<sup>4</sup>, Luis Filipe Godoy<sup>4</sup>, Luiza Ramos<sup>3</sup>,  
 Larissa Sampaio de Athayde Costa<sup>3</sup>, Eliana Garzon<sup>1,2</sup>,  
 Fernando Kok<sup>3,2</sup>

<sup>1</sup> Epilepsy Clinic, Hospital Sírio-Libanês,<sup>2</sup> Department of Neurology, University of São Paulo School of Medicine,<sup>3</sup> Mendelics Genomic Analysis,<sup>4</sup> Radiology Department, Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, Brazil

Received August 22, 2019; Accepted February 24, 2020

**ABSTRACT** – *ATP6V1B2* encodes a subunit of the lysosomal transmembrane proton pump necessary for adequate functioning of several acid hydrolases. *De novo* monoallelic variants of this gene have been associated with two distinct phenotypes: Zimmermann-Laband syndrome 2 (ZLS2), an intellectual deficiency/multiple malformation syndrome, and dominant deafness onychodystrophy (DDOD), a multiple malformation syndrome without cognitive involvement. Epilepsy is not observed in DDOD, is variably present in ZLS2, but is a common feature in Zimmermann-Laband syndrome 1 (ZLS1) (caused by monoallelic pathogenic variants in *KCNH1*) and Zimmermann-Laband syndrome-like (ZLSL) (associated with *KCNK4* variants). Herein, we report a case of an infant with severe epileptic encephalopathy with microcephaly and profound developmental delay, associated with a novel *de novo* loss-of-function variant in *ATP6V1B2*, diagnosed by whole-exome sequencing. This finding expands the spectrum of *ATP6V1B2*-associated disorders and adds *ATP6V1B2* as a new member for the growing list of early-onset epileptic encephalopathy genes. [Published with video sequence].

**Key words:** *ATP6V1B2*, Zimmermann-Laband syndrome 1, Zimmermann-Laband syndrome 2, epileptic encephalopathy, dominant deafness onychodystrophy, epilepsy



VIDEO ONLINE

**Correspondence:**

Luciana Midori Inuzuka  
 Department of Neurology,  
 University of São Paulo School of  
 Medicine,  
 Rua Haddock Lobo, 131,  
 cj 1309, São Paulo, 01414-001, Brazil  
 <lminuzuka@gmail.com>

*ATP6V1B2* (ATPase, H<sup>+</sup> transporting, lysosomal VI subunit B, isoform 2), that encodes for one of the subunits of the cross-membrane proton pump, is responsible for keeping the lysosomal pH acidic (Marshansky *et al.*, 2014). This activity is necessary for adequate functioning of several lysosomal hydrolases. Two *de novo* variants of this gene have been associated

with Zimmermann-Laband 2 (ZLS2, OMIM # 616455): a missense variant, p.(Arg485Pro) (Kortüm *et al.*, 2015), clinically characterized by intellectual disability, a dysmorphic face, gingival hyperplasia, hypertrichosis, and nail aplasia or hypoplasia; and the p.(Glu374Gln) variant, reported by Popp *et al.* (2017), in a patient with microcephaly and intellectual disability, who had three seizures.

doi:10.1084/ejpd.2020.1166



L.M. Inuzuka, et al.

A third *de novo* variant in *ATP6V1B2* was associated with dominant deafness onychodystrophy (DDOD, OMIM # 124480): nonsense p.(Arg506\*) (Yuan *et al.*, 2014; Menendez *et al.*, 2017), leading to congenital deafness and hypoplastic nails, associated with malformation of fingers and toes. The morphological changes similar to those seen in human DDOD have been reproduced in a murine model of this variant (Zhao *et al.*, 2019). Recently, Shaw *et al.* (2019) reported the variant, p.(Leu398Val), in *ATP6V1B2* in a multigenerational family with six evaluated individuals showing epilepsy of variable severity, intellectual disability (present in three individuals), dystrophic nails (in two individuals), and gingival hyperplasia (found in three individuals). Epileptic encephalopathy, as seen in our patient, has not been reported in any *ATP6V1B2*-related phenotypes. Another unrelated gene, *KCNH1*, has been associated with two conditions associated with epilepsy as one of the symptoms: Temple-Baraitser syndrome (OMIM # 6118216) and Zimmermann-Laband 1 syndrome (ZLS1, OMIM # 135500). Both of these conditions are phenotypically similar to ZLS2, except for epilepsy and, occasionally, microcephaly, seen only in *KCNH1*-related syndromes (Bramswig *et al.*, 2015; Mastrangelo *et al.*, 2016; Mégarbané *et al.*, 2016). A similar phenotype was recently reported with monoallelic *de novo* variants of *KCNN3* (Potassium Channel, Calcium-Activated, Intermediate/Small Conductance, Subfamily N, Member 3, OMIM \* 602983) (Bauer *et al.*, 2019) and *KCNK4* (Potassium Channel, Subfamily K, Member 4, OMIM \* 605720) (Bauer *et al.*, 2018), expanding the genetic heterogeneity of ZLS. Epilepsy was seen in only two of three reported cases with *KCNN3* variants (table 1). Herein, we report a patient with a novel *de novo* nonsense variant of *ATP6V1B2* associated with severe epileptic encephalopathy and microcephaly, accompanied by all of the other expected clinical features associated with ZLS2. This study was approved by the institutional review board, and the patient's family consented to this publication.

**Case study**

A two-year-old female was born at term via Caesarean section after an uncomplicated pregnancy, in good general health condition (birth weight: 3.570 g, percentile 25-50, z score:-0.4; OFC = 35 cm, percentile 25, z score:-0.7). She was the first child of non-consanguineous parents. Infantile spasms began at four months and tended to occur mostly in clusters upon awakening. The patient was treated with several antiepileptic drugs, including vigabatrin, levetiracetam, oxcarbazepine, clonazepam, topiramate, valproic acid, and phenobarbital, which failed to control her seizures. She currently has two or three isolated tonic seizures per day, usually upon awakening. She has microcephaly (OFC = 43.5 cm, z score <-2), with a metopic suture of neural crest origin, and frontal narrowing; she has small and wide-spaced teeth, with remarkable gingival hypertrophy. Hypertrichosis (mostly frontal and affecting the upper and lower limbs), hypoplastic distal phalanges of fingers and toes, and small toenails are also present (figure 1). She has profound developmental delay and became unable to support her head, sit alone, roll over onto her back, or grasp objects. Her vision and hearing are apparently normal. Brain magnetic resonance imaging (MRI) showed encephalic volume reduction. Karyotyping, chromosomal microarray analysis, metabolic work-up, hand X-ray, and brainstem evoked potential were all normal. At 22 months of age, a video electroencephalogram (video-EEG) showed disorganized background activity (excessive delta and theta waves during wakefulness and sleep) and epileptiform discharges characterized by bilateral anterior multispikes. (figures 2, 3). Four asymmetric tonic seizures were recorded during sleep. The seizures were electrographically characterized by suppression of background activity, lasting for three seconds, followed by rhythmic delta activity over the bilateral anterior regions mixed with sharp waves (figure 4). Whole-exome sequencing (WES) detected a nonsense variant [(Chr8:20,077,842A>T; c.1465A>T

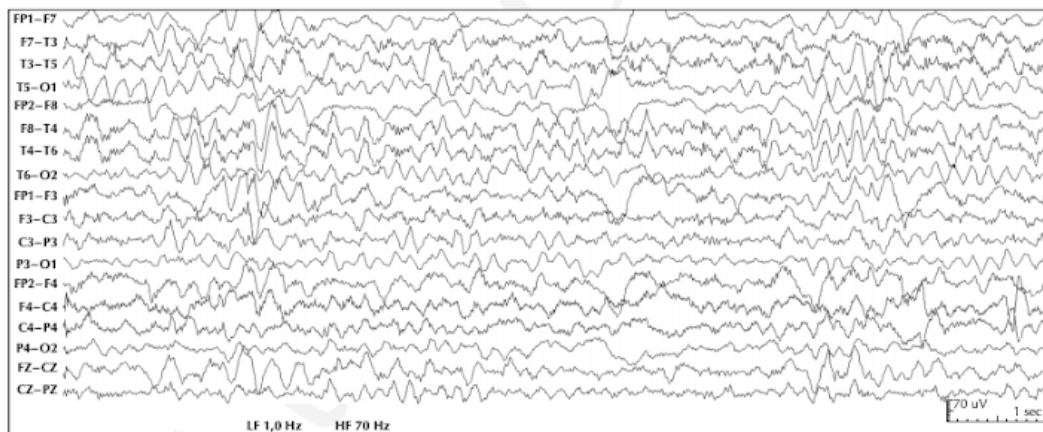
**Table 1.** Zimmermann-Laband related genes and associated clinical findings.

Condition	Gene	Gingival	Hypertrichosis	Onychodystrophy	DD/ID	Facial	Epilepsy	Hyperplasia	Dysmorphism
ZLS1	<i>KCN1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
ZLS2	<i>ATP6V1B2</i>	+	+	+	+	+	-/+	+	+
ZLS2-associated	<i>KCNN3</i>	+	+	+	+	+	+	+	-
ZLS-like	<i>KCNK4</i>	+	+	+	+	+	+	+	+

ZLS: Zimmermann-Laband Syndrome; DD/ID: development delay/ intellectual deficiency; +: present; -: absent; +/-: absent or present.



**Figure 1.** (A, B) Front and profile facial features; (C) gingival hyperplasia; (D) onychodystrophy of the toes; and (E) hypertrichosis.



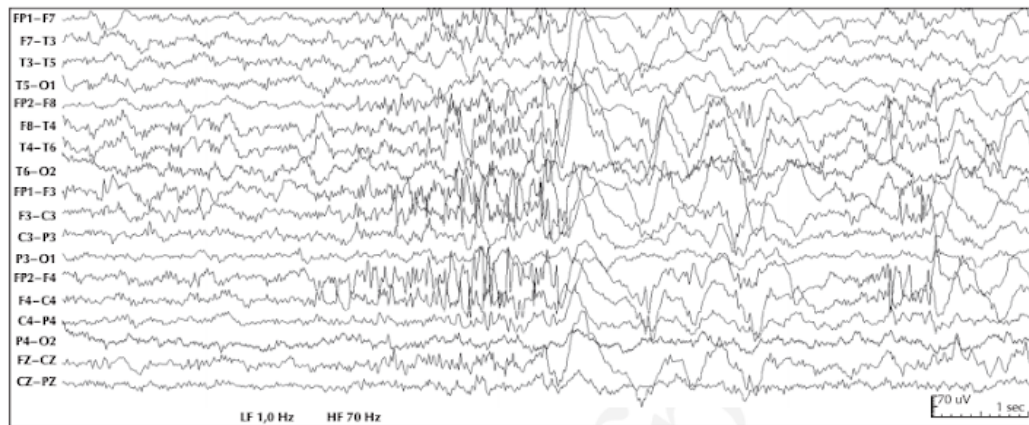
**Figure 2.** Video-EEG of the patient at 22 months of age showing disorganized background activity (excessive theta and delta waves) during wakefulness.

ENST0000027390 p.(Lys489\*)] in *ATP6V1B2*. This variant, which leads to a premature protein truncation, is not found in population databases (1000 Genomes, GnomAD) and has not been reported in the literature or other databases (ClinVar, HGMD). The presence of this variant was confirmed by Sanger sequencing in the patient (but not in the parents), occurring as a *de novo* event. According to the American College of Medical Genetics (ACMG) criteria, this variant is classified

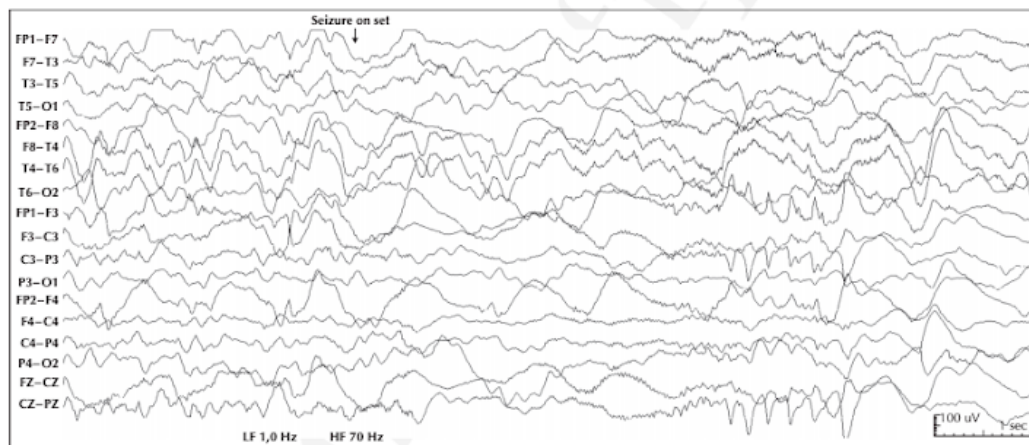
as pathogenic (PVS1, PM2 and PM6) (Richards *et al.*, 2015). Consistent with GnomAD, *ATP6V1B2* is highly intolerant to loss-of-function (pLI=0.99), a finding that supports the pathogenicity of the p.(Lys489\*) variant detected in our patient. Additionally, it is located in exon 14, the last exon of *ATP6V1B2*, and might escape mRNA nonsense-mediated decay, leading to translation of an abnormal truncated protein, shortened by 23 amino acids. No other potentially pathogenic



L.M. Inuzuka, et al.



**Figure 3.** Video-EEG of the patient at 22 months of age showing epileptiform discharges characterized by bilateral anterior multispikes.



**Figure 4.** Video-EEG at 22 months of age showing a tonic seizure with suppression of background activity, followed by rhythmic delta activity over the bilateral anterior regions mixed with sharp waves.

variants in genes known to be associated with epileptic encephalopathy were identified by WES.

### Discussion

Only three *de novo* pathogenic variants have been reported in *ATP6V1B2*: the two missense variants, c.1454G>C p.(Arg485Pro) (Körtum *et al.*, 2015) and p.(Glu374Gln) (Popp *et al.*, 2017), leading to ZLS2, and the recurrent nonsense variant c.1516C>T p.(Arg506\*), reported in four patients with DDOD (Menendez *et al.*, 2017; Yuan *et al.*, 2014). The nonsense p.(Lys489\*)

variant reported in our patient is the fourth known pathogenic *de novo* change detected in *ATP6V1B2*, leading to a more complex phenotype, which combines developmental and physical features of ZLS2 with infantile-onset epileptic encephalopathy and microcephaly, a characteristic that might be seen in *KCNH1*-associated epilepsy. A summary of the clinical presentation of all *ATP6V1B2* patients reported is presented in table 2. The nonsense variants p.(Lys489\*) and p.(Arg506\*) might escape nonsense-mediated decay, as they are located in exon 14, the last exon of the gene. Nevertheless, they are associated with significantly different phenotypes, with a much more severe presentation for the p.(Lys489\*) vari-

**ATP6V1B2-related epileptic encephalopathy**

**Table 2.** Clinical and genetic characteristics in *ATP6V1B2* de novo mutation.

Clinical findings	Our patient	Kortüm, 2015 (family 7)	Kortüm, 2015 (family 8)	Menendez, 2017	Yuan, 2014 (patient 1)	Yuan, 2014 (patient 2)	Yuan, 2014 (patient 3)	Popp, 2017
Diagnosis	<i>ATP6V1B2</i> -related epileptic encephalopathy	ZL2	ZL2	DDOD	DDOD	DDOD	DDOD	<i>ATP6V1B2</i> -related epileptic encephalopathy?
Variant	p.Lys489* (c.1465A>T)	p.Arg485Pro (c.1454C>G)	p.Arg485Pro (c.1454C>G)	p.Arg506* (c.156C>T)	p.Arg506* (c.156C>T)	p.Arg506* (c.156C>T)	p.Arg506* (c.156C>T)	p.Glu374Gln (c.1120G>C)
Age at last evaluation (y)	2	22	5	12	2.5	2	18	NR
Sex	F	M	F	M	F	M	F	NR
Epilepsy	+	-	-	-	-	-	-	+
Microcephaly	+	-	-	-	NR	NR	NR	+
Hypertrichosis	+	+	+	-	NR	NR	NR	NR
Scoliosis	-	+	NR	-	NR	NR	NR	NR
Gingival enlargement	+	+	+	-	NR	NR	NR	NR
Craniofacial dysmorphism	+	+	+	-	-	-	-	NR
Deafness	-	Unilateral	-	Bilateral	Bilateral	Bilateral	Bilateral	NR
Omychodystrophy	+	+	+	+	+	+	+	NR
Osteodystrophy	-	+	+	+	+	+	+	NR
Developmental delay	Global	Global	Global	-	-	-	-	+
Intellectual disability	+	+	+	-	-	-	-	+
Hypotonia	+	+	+	-	NR	NR	NR	+
Brain MRI	Reduced brain volume	Normal	NR	Normal	NR	NR	NR	NR
EEG	Multifocal paroxysms	Encephalopathy Normal	Normal	Normal	NR	NR	NR	NR

DDOD: dominant deafness-omychodystrophy; ZL2: Zimmermann-Laband 2; NR: not reported; -: absent; +: present; EEG: electroencephalogram; MRI: magnetic resonance image.

L.M. Inuzuka, et al.

ant. One might speculate that protein function is more severely affected by the loss of the last 23 amino acids for p.(Lys489\*) compared to the loss of six amino acids for p.(Arg506\*). Epilepsy was unusually severe in our patient, with onset at infancy and refractoriness to several antiepileptic drugs. Profound developmental delay associated with post-natal microcephaly was also part of the clinical presentation, as well as characteristic dysmorphic features, including gingival hypertrophy, hirsutism, and onychodystrophy. *ATP6V1B2* should be included in the expanding list of genes associated with early-infantile epileptic encephalopathy. □

### Legend for video sequence

Video-EEG at 22 months of age showing an asymmetric tonic seizure.

**Key words for video research on**  
**www.epilepticdisorders.com**

*Phenomenology:* tonic seizure

*Localisation:* unknown

*Syndrome:* epileptic encephalopathy not otherwise classified

*Aetiology:* *ATP6V1B2*-related epileptic encephalopathy

### Acknowledgements and disclosures.

We are grateful to the unrestricted collaboration of the patient's family.

None of the authors have any conflict of interest to declare.

### References

- Bauer CK, Calligari P, Radio FC, et al. Mutations in *KCNK4* that affect gating cause a recognizable neurodevelopmental syndrome. *Am J Hum Genet* 2018; 103: 621-30.
- Bauer CK, Schneeberger PE, Kortüm F, et al. Gain-of-function mutations in *KCNN3* encoding the small conductance Ca(2+)-activated K(+) channel SK3 cause Zimmermann-Laband syndrome. *Am J Hum Genet* 2019; 104: 1139-57.
- Bramswig NC, Ockeloen CW, Czeschik JC, et al. 'Splitting versus lumping': Temple-Baraitser and Zimmermann-Laband syndromes. *Hum Genet* 2015; 134: 1089-97.
- Kortüm F, Caputo V, Bauer CK, et al. Mutations in *KCNH1* and *ATP6V1B2* cause Zimmermann-Laband syndrome. *Nat Genet* 2015; 47: 661-7.
- Marshansky V, Rubinstein JL, Grüber G. Eukaryotic V-ATPase: novel structural findings and functional insights. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1837: 857-79.
- Mastrangelo M, Scheffer IE, Bramswig NC, et al. Epilepsy in *KCNH1*-related syndromes. *Epileptic Disord* 2016; 1(18): 123-36.
- Mégarbané A, Al-Ali R, Choucair N, et al. Temple-Baraitser syndrome and Zimmermann-Laband syndrome: one clinical entity? *BMC Med Genet* 2016; 10(17): 42.
- Menendez I, Carranza C, Herrera M, et al. Dominant deafness-onychodystrophy syndrome caused by an *ATP6V1B2* mutation. *Clin Case Rep* 2017; 5: 376-9.
- Popp B, Ekici AB, Thiel CT, et al. Exome Pool-Seq in neurodevelopmental disorders. *Eur J Hum Genet* 2017; 25: 1364-76.
- Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association of Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17: 405-24.
- Shaw M, Winczewska-Wiktor A, Badura-Stronka M, et al. EXOME REPORT: novel mutation in *ATP6V1B2* segregating with autosomal dominant epilepsy, intellectual disability and mild gingival and nail abnormalities. *Eur J Med Genet* 2019; 23: 103799.
- Yuan Y, Zhang J, Chang Q, et al. *De novo* mutation in *ATP6V1B2* impairs lysosome acidification and causes dominant deafness-onychodystrophy syndrome. *Cell Res* 2014; 24: 1370-3.
- Zhao W, Gao X, Qiu S, et al. A subunit of V-ATPases, *ATP6V1B2*, underlies the pathology of intellectual disability. *EBioMedicine* 2019; 45: 408-21.

### TEST YOURSELF



- (1) What are the main clinical characteristics of *ATP6V1B2*-related phenotypes?
- (2) Mutations in which other gene determine an *ATP6V1B2*-like phenotype?
- (3) What is the known function of *ATP6V1B2*?

*Note: Reading the manuscript provides an answer to all questions. Correct answers may be accessed on the website, [www.epilepticdisorders.com](http://www.epilepticdisorders.com), under the section "The EpiCentre".*

## **CAPÍTULO 5**

### **Artigo *KCNT2***

---

**Observação adicional de uma variante patogênica *de novo* no *KCNT2* associada a encefalopatia epiléptica com características clínicas de epilepsia do lobo frontal.**

**Inuzuka LM;** Macedo-Souza LI; Della-Ripa B; Monteiro FP; Ramos L; Kitajima JP; Garzon E; & Kok F.

*Brain & Development*, 2020 42(9), 691–695.

**Additional observation of a *de novo* pathogenic variant in *KCNT2* leading to epileptic encephalopathy with clinical features of frontal lobe epilepsy**

**Inuzuka LM;** Macedo-Souza LI; Della-Ripa B; Monteiro FP; Ramos L; Kitajima JP; Garzon E; & Kok F.

*Brain & Development*. 2020 42(9), 691–695.

Número de citações: 4

Introdução: Recentemente, o *KCNT2* foi reconhecido como um gene associado ao distúrbio de desenvolvimento neurológico e à epilepsia.

Relato de caso: Apresentamos uma observação adicional de um paciente masculino de 16 anos de idade com uma nova variante patogênica *de novo KCNT2* e revimos os cinco casos anteriormente notificados de variantes novas neste gene.

Discussão: O sequenciamento completo do exoma identificou a variante *missense* c.725C > A p.(Thr242Asn), o que foi confirmado pelo sequenciamento Sanger. Nosso paciente tem epilepsia refratária e crises epiléticas focais motoras hiperclônicas, semelhantes à que é vista na epilepsia do lobo frontal, ocorrendo apenas durante o sono. Este tipo de crise epilética não é normalmente visto nas encefalopatias epiléticas.



Brain &amp; Development 42 (2020) 691–695

**BRAIN & DEVELOPMENT**  
Official Journal of  
the Japanese Society  
of Child Neurology

www.elsevier.com/locate/braindev

## Case Report

## Additional observation of a *de novo* pathogenic variant in *KCNT2* leading to epileptic encephalopathy with clinical features of frontal lobe epilepsy

Luciana Midori Inuzuka<sup>a,c,\*</sup>, Lucia Inês Macedo-Souza<sup>c</sup>, Bruno Della-Ripa<sup>c</sup>  
Fabiola Paoli Monteiro<sup>b</sup>, Luiza Ramos<sup>b</sup>, João Paulo Kitajima<sup>b</sup>, Eliana Garzon<sup>a,c</sup>  
Fernando Kok<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> *Epilepsy Clinic, Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, Brazil*<sup>b</sup> *Mendelics Genomic Analysis, São Paulo, Brazil*<sup>c</sup> *Department of Neurology, University of São Paulo School of Medicine, Brazil*

Received 25 February 2020; received in revised form 7 May 2020; accepted 8 May 2020

**Abstract**

**Introduction:** *KCNT2* was recently recognized as a gene associated with neurodevelopmental disorder and epilepsy.

**Case report:** We present an additional observation of a 16-year-old male patient with a novel *de novo* *KCNT2* likely pathogenic variant and review the five previously reported cases of *de novo* variants in this gene.

**Discussion:** Whole exome sequencing identified the missense variant c.725C > A p.(Thr242Asn), which was confirmed by Sanger sequencing. Our patient has a refractory stereotyped and monomorphic type of hyperkinetic focal motor seizure, similar to what is seen in frontal lobe epilepsy, occurring only during sleep. This type of seizure is not usually seen in epileptic encephalopathies.

© 2020 The Japanese Society of Child Neurology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** *KCNT2*; Epilepsy; Epileptic Encephalopathy

**1. Introduction**

Ion channels are highly expressed in the brain, and pathogenic variants in voltage-gated potassium channels have been associated with epilepsies of variable severity. Variants of *KCNT2* (Potassium Channel, Subfamily T, Member 2, OMIM # 610044), have recently been associated with Early Infantile Epileptic Encephalopathy 57 (EIEE57, OMIM # 617771) [1,2].

*KCNT1* and *KCNT2* code for ion channels subunits that have an important role in repolarization after action potential, as well as in slow afterhyperpolarization, regulating the firing patterns of the neurons. They belong to the sodium-dependent potassium channels gene family, encoding for a pore-forming heteromeric protein complex that is gated by changes in voltage and/or in the concentration of intracellular ions or second messengers [3].

Herein, we report the fourth individual with a novel *de novo* missense variant in *KCNT2*, leading to epileptic encephalopathy.

\* Corresponding author at: Department of Neurology, University of São Paulo School of Medicine, Rua: Haddock Lobo, 131, cj 1309, São Paulo, SP, Brazil.

E-mail address: lminuzuka@gmail.com (L.M. Inuzuka).

<https://doi.org/10.1016/j.braindev.2020.05.003>

0387-7604/© 2020 The Japanese Society of Child Neurology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

*L. M. Inuzuka et al. / Brain & Development 42 (2020) 691–695*

Table 1  
Molecular, clinical, neurophysiological, and neuroimaging data of patients with *KCNT2 de novo* pathogenic variants.

Author	Variant	Domain	Gender	Age at last evaluation	Epilepsy age of onset	Type of seizures	Developmental and neurologic Features	EEG	MRI
Patient 1 This study	p.(Thr242Asn)	Transmembrane pore-forming domain	M	17 y	5 mo	Tonic motor seizures, hyperkinetic focal motor seizures	Severe intellectual disability, autistic features, mild spasticity, ataxic gait, and lack of language	Disorganized background, multifocal epileptiform discharges (predominantly frontocentral)	Normal
Patient 2 Gururaj <i>et al</i>	p.(Phe240Leu)	Transmembrane, pore-forming domain	M	4 y	3 mo	Focal motor seizures, epileptic spasms, generalized seizures (tonic, myoclonic, atypical absences)	Severe developmental delay with lack of language	Disorganized background, multifocal paroxysms and, hypsarrhythmia	Subcortical atrophy with thin corpus callosum
Patient 3 Ambrosino <i>et al</i>	p.(Arg190His)	Cytoplasmatic, between S4 and S5 transmembrane domain	F	9 y	8 mo	Epileptic spasms, generalized seizures (tonic, tonic-clonic), non-convulsive status	Severe intellectual disability with lack of language	Focal temporal	Mild cerebral atrophy and delayed myelination
Patient 4 Ambrosino <i>et al</i>	p.(Arg190Pro)	Cytoplasmatic, between S4 and S5 transmembrane domain	F	13 y	1st day	Generalized seizures (tonic-clonic, absences)	Severe intellectual disability, disruptive behavior	Multifocal	Normal
Patient 5 Mao <i>et al</i>	p.(Lys564*)	Cytoplasmatic (C-terminal) domain	F	NA	2 mo	Focal and generalized seizures	Severe neurologic/visual impairment, hypotonia	Multifocal	Normal
Patient 6 Mao <i>et al</i>	p.(Leu48Glnfs43*)	Cytoplasmatic (N-terminal) domain	F	29y	4 mo	Focal motor seizures	Mild intellectual disability	NA	NA

Abbreviations: M: male; F: female; y: year; mo: months; EEG: electroencephalogram; MRI: magnetic resonance imaging.



The study was approved from the institutional review board and informed consent was taken from the parents of the patient.

## 2. Case report

Our patient, a 16-year-old boy, was the first child of nonconsanguineous healthy parents, born in good general conditions after uneventful pregnancy and labor, weighing 3,400 g (Z score:  $-1,0$ ) and with an occipitofrontal circumference of 35 cm (Z score:  $-0,7$ ). He showed developmental delay, started to sit without support by 20 months, and began to walk at 3 years of age. At 5 months of age, he presented bilateral tonic seizures with cervical hyperextension and bilateral upward gaze, which were partially controlled with carbamazepine for a short period of time. During his first year of age, he developed startles triggered by an auditory stimulus, without electroencephalogram (EEG) correlation and unresponsive to several antiepileptic drugs (AED). Interictal multifocal discharges, mainly frontocentral bilateral, were recorded. The brain magnetic resonance imaging (MRI) was normal. In addition, after 1 year of age, he started to present hyperkinetic focal motor seizures during sleep, simultaneously alternating movements of upper and lower limbs, clapping his hands, and rolling over his body for less than 1 min, several times, showing absolute unresponsiveness to AED (Supplementary video). This seizure pattern was confirmed by a video-EEG performed at 9 years of age, which disclosed an interictal disorganized background activity, with multifocal spikes and sharp waves, mainly frontocentral bilateral (Fig. 1A and 1B). Ictal EEG showed rhythmic alpha activity at anterior bilateral regions, followed by generalized theta and delta activity intermixed with movement artifacts (Fig. 1C).

His neurological condition deteriorated and, at the age of 16, he displayed severe intellectual disability with autistic features, mild spasticity, ataxic gait, and he was partially dependent for daily life activities. Vineland Adaptive Behaviour Scale – Second edition resulted scores below 1 year and 9 months in all domains.

Currently, he remained with hyperkinetic focal motor seizures twice a month, and he is receiving levetiracetam and oxcarbazepine. The current EEG is still unaltered.

Whole exome sequencing (WES) identified in *KCNT2* the variant [Chr1:196,398,801G > T, c.725C > A, ENST00000294725, p.(Thr242Asn)], which was not present in populational databanks (1,000 Genomes, GnomAD, TopMed) and has never been reported before. This variant, a non-conservative substitution located in the pore-forming portion of the protein (Fig. 2A), was confirmed by bidirectional Sanger sequencing. It was not found in the parents, therefore occurring as a *de novo* variant (Fig. 2B). *In silico* predictors of pathogenicity as Polyphen-2 (1.0), Mutation Taster

(0.99) and SIFT (100%) have a high score, indicating that the variant p.(Thr242Asn) is damaging. Following recommendations of the American Society of Medical Genetics and Genomics (ACMG), it was classified as likely pathogenic [4].

## 3. Discussion

A growing list of genes encoding potassium channels is currently recognized as associated with epileptic encephalopathy (EE), including *KCNA1*, *KCNA2*, *KCNB1*, *KCNCL1*, *KCND2*, *KCND3*, *KCNQ2*, *KCNQ3*, *KCNQ5*, *KCNV2*, *KCHN1*, *KCNH5*, and *KCNT1* [5,6]. Recently, *KCNT2* was recognized as a cause of EIEE57.

Only five patients with this condition have been reported so far [1,2,7] (See Table 1). Gururaj *et al.* reported a 4-year-old boy with severe developmental delay and focal seizures, which started at 3 months of age, followed by infantile spasms, refractory to antiepileptic drugs. Later, this patient developed multiple seizures, including atypical absence, tonic seizures, and myoclonic jerks. WES analysis disclosed the variant p.(Phe240Leu), located in the channel forming pore helix of the protein, between transmembrane domains S5 and S6, which was demonstrated to alter channel ion selectivity [2]. Ambrosino *et al.* reported the two other patients with either infantile spasms followed by Lennox-Gastaut syndrome or infantile migratory seizures. In both, severe developmental delay and refractory epilepsy occurred. WES identified novel *de novo* variants in the same codon, p.(Arg190His) and p.(Arg190Pro), located in the cytoplasmatic domain between transmembrane S4 and S5. It was shown that those variants destabilize the channel closed state, and also promote constitutive channel opening [1].

Recently, Mao *et al.* reported two patients with intellectual deficiency and early-onset generalized and/or focal epilepsy with loss of function *de novo* pathogenic variants either in the N- or the C-terminal portion of the protein [p.(Lys564\*) and p.(Leu48Glnfs43\*)], leading to nonsense-mediated mRNA decay. Even though *KCNT2* does not appear to be intolerant to loss of function variants, as can be inferred from its low pLi of 0.04 (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), this finding, according to the authors, cannot be taken as a rule [7].

The variant detected in our patient, p.(Thr242Asn), is located in the putative pore-forming domain of the protein, between transmembrane domains S5 and S6, very close to the p.(Phe240Leu) variant reported by Gururaj *et al.* Previously reported patients had severe refractory epilepsy, starting before 8 months of age, with focal epilepsy evolving to infantile spasms or infantile migratory focal epilepsy. On the other hand, our patient has a much more stereotyped and monomorphic type of hyperkinetic focal motor seizure, similar to what is seen in frontal lobe epilepsy, occurring only during sleep and



694

L.M. Inuzuka et al. / Brain & Development 42 (2020) 691–695

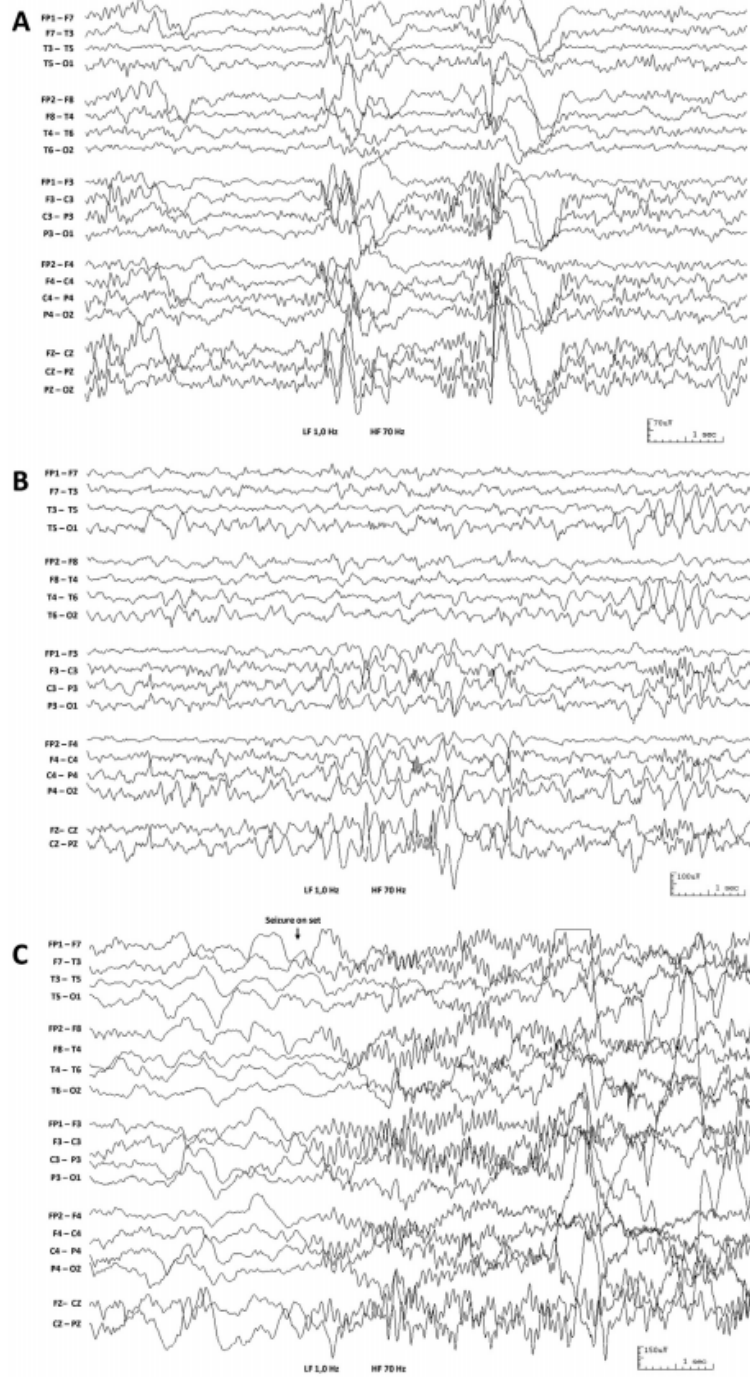


Fig. 1. Video-EEG at 10 years of age. A and B - Interictal EEG showing disorganized background activity and multifocal spikes and sharp waves, mainly frontocentral bilateral. C - Ictal EEG showing rhythmic alpha activity mainly at anterior bilateral regions, generalized theta and delta intermixed with movements artifacts.

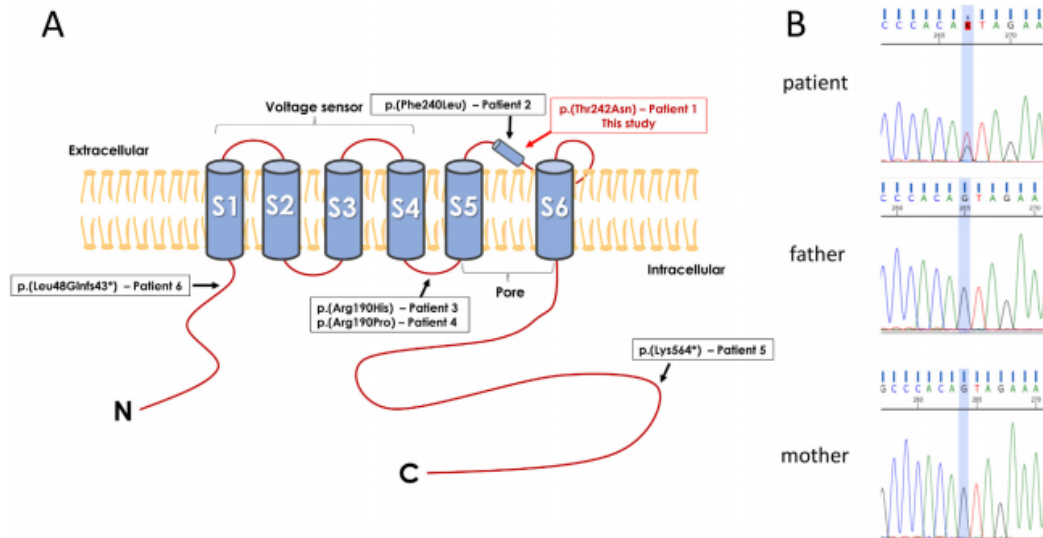


Fig. 2. A. Schematic representative of Sodium-activated potassium (KNa) channel with all published pathogenic variants in *KCNT2*. B: Electropherogram showing the substitution c.725C > A, leading to change p.(Thr242Asn) c.725 > A in patient and normal results in his parents.

with declining frequency over time. This feature is not usually seen in epileptic encephalopathies.

**Declaration of Competing Interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

**Appendix A. Supplementary data**

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2020.05.003>.

**References**

[1] Ambrosino P, Soldovieri MV, Bast T, Turnpenny PD, Uhrig S, Biskup S, et al. *De novo* gain-of-function variants in *KCNT2* as a novel cause of developmental and epileptic encephalopathy. *Ann Neurol* 2018;83:1198–204.

[2] Gururaj S, Palmer EE, Sheehan GD, Kandula T, Macintosh R, Ying K, et al. A *De Novo* Mutation in the Sodium-Activated Potassium Channel *KCNT2* Alters Ion Selectivity and Causes Epileptic Encephalopathy. *Cell Rep* 2017;21:926–33.

[3] Chen H, Kronengold J, Yan Y, Gazula VR, Brown MR, Ma L, et al. The N-terminal domain of Slack determines the formation and trafficking of Slick/Slack heteromeric sodium-activated potassium channels. *J Neurosci* 2009;29:5654–65.

[4] Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association of Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405–24.

[5] Allen NM, Weckhuysen S, Gorman K, King MD, Lerche H. Genetic potassium channel-associated epilepsies: Clinical review of the K(v) family. *Eur J Paediatr Neurol*. 2019 Dec 14, 2019, in press. doi: 10.1016/j.ejpn.2019.12.002.

[6] Bartolini E, Camprostrini R, Kiferle L, Pradella S, Rosati E, Chinthapalli K, et al. Epilepsy and brain channelopathies from infancy to adulthood. *Neurol Sci*. 2019, in press. doi:10.1007/s10072-019-04190-x.

[7] Mao X, Bruneau N, Gao Q, Becq H, Jia Z, Xi H, et al. The Epilepsy of Infancy With Migrating Focal Seizures: Identification of *de novo* Mutations of the *KCNT2* Gene That Exert Inhibitory Effects on the Corresponding Heteromeric K(Na)1.1/K(Na)1.2 Potassium Channel. *Front Cell Neurosci*. 2020;24:1–12.

## **CAPÍTULO 6**

### **Artigo *MECP2***

---

**Capítulo VI – Artigo *MECP2******MECP2*-condições relacionadas aos indivíduos do sexo masculino: uma revisão sistemática da literature e oito casos adicionais**

**Luciana Midori Inuzuka**, Matheus Guerra-Peixe, Lúcia Inês Macedo-Souza, Christiane Cobas Pedreira, Juliana Gurgel-Giannetti, Fabiola Paoli Monteiro, Luiza Ramos, Larissa Athayde Costa, Ana Chrystina de Souza Crippa, Charles Marques Lourenco, Daniela Viana Pachito, Lucia Sukys-Claudino, Leonardo Salvador Gaspar, Sergio Antonio Antoniuk; Luis Paulo de Souza Dutra, Sabrina Stephanie Lana Diniz, Rafaelle Batistella Pires, Eliana Garzon, Fernando Kok.

*European Journal of Paediatric Neurology*. 2021;24(2021) 7-13

***MECP2*-related conditions in males: a systematic literature review and 8 additional cases.**

**Luciana Midori Inuzuka**, Matheus Guerra-Peixe, Lúcia Inês Macedo-Souza, Christiane Cobas Pedreira, Juliana Gurgel-Giannetti, Fabiola Paoli Monteiro, Luiza Ramos, Larissa Athayde Costa, Ana Chrystina de Souza Crippa, Charles Marques Lourenco, Daniela Viana Pachito, Lucia Sukys-Claudino, Leonardo Salvador Gaspar, Sergio Antonio Antoniuk; Luis Paulo de Souza Dutra, Sabrina Stephanie Lana Diniz, Rafaelle Batistella Pires, Eliana Garzon, Fernando Kok.

*European Journal of Paediatric Neurology*. 2021;24 (2021) 7-13

Sem citações

Objetivo: Apresentar uma coorte de oito homens e realizar uma revisão sistemática de todos os casos publicados com uma única cópia de uma variante patogênica do *MECP2*.

Métodos: Revisamos os prontuários médicos de indivíduos do sexo masculino com uma variante patogênica de única cópia do *MECP2*. A procura dos artigos ocorreu no Medline (Pubmed) e Embase para recolher todos os artigos que incluíam indivíduos do sexo masculino bem caracterizados e portadores de uma única cópia de variante

patogênica do *MECP2* de uma ou provavelmente patogênica no *MECP2* (no período de 1999-2020).

Resultados: A pesquisa bibliográfica mostrou um total de 3.185 publicações, das quais 58 foram incluídas em nossa revisão sistemática. Coletamos informações sobre 27 pacientes publicados com encefalopatia neonatal grave, 47 indivíduos com deficiência intelectual isolada ou familiar ligada ao cromossomo X-13 (XLMR13), bem como 24 indivíduos com sinais piramidais isolados ou familiares, parkinsonismo e macroorquidismo (PPM-X).

Em nossa coorte, vimos oito indivíduos com idades entre os 4 e 19 anos na última avaliação. Três fenótipos associados ao *MECP2* foram vistos em portadores masculinos de uma única cópia do gene: encefalopatia neonatal grave (n = 5); deficiência intelectual ligada ao X 13 (n = 2); e sinais piramidais, parkinson e macroorquidismo (PPM-X) (n = 1). Foram detectadas duas variantes inovadoras de novo [p.(Gly252Argfs\*7) e p.(Tyr132Cys)].

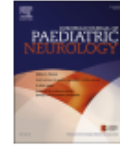
Conclusão: Nos homens, as variantes patogênicas do *MECP2* podem ser associadas a diferentes fenótipos, incluindo encefalopatia grave neonatal, deficiência intelectual, ou parkinsonismo e espasticidade tardia. O fenótipo típico da Síndrome de Rett não é esperado nos homens, exceto naqueles com síndrome de Klinefelter ou mosaicismos somáticos para o *MECP2*.

Palavras-chave: *MECP2*; Encefalopatia Epiléptica; homens; PPM-X; Síndrome de Rett



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Paediatric Neurology



## MECP2-related conditions in males: A systematic literature review and 8 additional cases



Luciana Midori Inuzuka <sup>a, b, \*</sup>, Matheus Guerra-Peixe <sup>b</sup>, Lúcia Inês Macedo-Souza <sup>b</sup>,  
 Christiane Cobas Pedreira <sup>a</sup>, Juliana Gurgel-Gianetti <sup>c</sup>, Fabiola Paoli Monteiro <sup>d</sup>,  
 Luiza Ramos <sup>d</sup>, Larissa Athayde Costa <sup>d</sup>, Ana Chrystina de Souza Crippa <sup>e</sup>,  
 Charles Marques Lourenco <sup>f</sup>, Daniela Viana Pachito <sup>a</sup>, Lucia Sukys-Claudino <sup>g</sup>,  
 Leonardo Salvador Gaspar <sup>g</sup>, Sergio Antonio Antoniuk <sup>e</sup>, Luis Paulo de Souza Dutra <sup>e</sup>,  
 Sabrina Stephanie Lana Diniz <sup>c</sup>, Rafaele Batistella Pires <sup>h</sup>, Eliana Garzon <sup>a, b</sup>,  
 Fernando Kok <sup>b, d</sup>

<sup>a</sup> Epilepsy Clinic, Sírio-Libanês Hospital, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Department of Neurology, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> Department of Pediatrics, Federal University of Minas Gerais School of Medicine, Belo Horizonte, Brazil

<sup>d</sup> Mendelics Genomic Analysis, São Paulo, Brazil

<sup>e</sup> Department of Neurology, Federal University of Paraná School of Medicine, Curitiba, Brazil

<sup>f</sup> Neurogenetics, School of Medicine - Centro Universitário Estácio, Ribeirão Preto, Brazil

<sup>g</sup> Department of Neurology and Psychiatry, Federal University of Santa Catarina School of Medicine, Florianópolis, Brazil

<sup>h</sup> Department of Medical Sciences, Nove de Julho University, Bauru, Brazil

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
 Received 28 September 2020  
 Received in revised form  
 25 February 2021  
 Accepted 25 May 2021

**Keywords:**  
 MECP2  
 Males  
 PPM-X  
 Rett syndrome  
 Developmental and epileptic  
 encephalopathy

### ABSTRACT

**Objective:** To present a cohort of 8 males and perform a systematic review of all published cases with a single copy of MECP2 carrying a pathogenic variant.

**Methods:** We reviewed medical records of males with a single copy of MECP2 carrying a pathogenic variant. We searched in Medline (Pubmed) and Embase to collect all articles which included well-characterized males with a single copy of MECP2 carrying a pathogenic or likely pathogenic variant in MECP2 (1999–2020).

**Results:** The literature search yielded a total of 3,185 publications, of which 58 were included in our systematic review. We were able to collect information on 27 published patients with severe neonatal encephalopathy, 47 individuals with isolated or familial mental retardation X-linked 13 (XLMR13), as well as 24 individuals with isolated or familial Pyramidal signs, parkinsonism, and macroorchidism (PPM-X).

In our cohort, we met eight individuals aged 4 to 19-year-old at the last evaluation. Three MECP2-associated phenotypes were seen in male carriers of a single copy of the gene: severe neonatal encephalopathy (n = 5); X-linked intellectual deficiency 13 (n = 2); and pyramidal signs, parkinsonism, and macroorchidism (PPM-X) (n = 1). Two novel *de novo* variants [p.(Gly252Argfs\*7) and p.(Tyr132Cys)] were detected.

**Conclusion:** In males, the MECP2 pathogenic variants can be associated with different phenotypes, including neonatal severe encephalopathy, intellectual deficiency, or late-onset parkinsonism and spasticity. The typical RS phenotype is not expected in males, except in those with Klinefelter syndrome or somatic mosaicism for MECP2.

© 2021 European Paediatric Neurology Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

\* Corresponding author. Rua Haddock Lobo, 131 cj 1309 - Cerqueira Cesar, CEP 01414-001 - São Paulo, Brazil.  
 E-mail addresses: lminuzuka@gmail.com, luciana.midori@nisip.com.br (L.M. Inuzuka).

<https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2021.05.013>

1090-3798/© 2021 European Paediatric Neurology Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Rett syndrome (RS) is a neurodevelopmental disorder clinically characterized by regression of acquired verbal communication, and hand skills, ataxic/aprasic gait, and hand stereotypic movements. Other features as developmental delay, autistic disorder, acquired microcephaly, respiratory irregularities, and epilepsy have also been reported [1,2]. It was first reported in 1966 [1], but it was only after 1983 that RS was widely recognized as an important cause of intellectual impairment [2]. Initial diagnostic criteria stated that RS was a condition restricted to females, even though males with RS phenotype were sporadically reported [2]. In 1999, Amir et al. [3] identified *MECP2* (Methyl-CpG-Binding Protein, OMIM # 300005) as the causative gene for RS. Wan et al. [4] (1999) were the first to report boys with *MECP2* pathogenic variants and a more severe phenotype, characterized by microcephaly, developmental delay, hypotonia, seizures, respiratory irregularities, constipation, and growth retardation. RS was initially thought to be a lethal condition in males, but the observed gender unbalances, with many more females affected, is probably caused by the increased point mutation rate during paternal meiosis [5,6].

*MECP2*, which is located in the X chromosome, codes the *MECP2* protein that is highly expressed in the brain, binds to methylated CpG island, and is involved in transcription regulation and chromatin remodeling. In resting neurons, *MECP2* controls gene expression and acts as a transcription activator for some genes, which is required for developmental regulated neuronal maturation [3–5].

Five classes of *MECP2*-related phenotypes have been recognized in males [7]:

1. **Severe neonatal encephalopathy** (OMIM # 300673), usually caused by the same variants that lead to classical RS in females.
2. **X-linked mental retardation 13 (XLMR13)** (OMIM # 300055), caused by variants leading to intellectual deficiency in males and only very mild or no symptoms in females.
3. **Pyramidal signs, parkinsonism, and macroorchidism (PPM-X)** (OMIM # 300055) is a specific phenotype seen in males and rarely in females with the pathogenic variant p.(Ala140Val). It is characterized by developmental delay, with juvenile loss of previously acquired skills, as well as motor deterioration, parkinsonism, and pyramidal signs. Macroorchidism is seen in some patients, and psychiatric manifestations as psychosis can occur.
4. **RS classical phenotype** (OMIM # 312750), seen in males with Klinefelter syndrome (47, XXY) and a pathogenic variant in *MECP2*, or males with a pathogenic variant in *MECP2* in mosaic.
5. ***MECP2* duplication syndrome** (OMIM # 300260, or Lubs syndrome), a condition caused by segmental duplication of variable size within Xq28 and involving *MECP2*, leading to a severe form of intellectual deficiency, often with recurrent respiratory infections.

RS-like phenotype is not exclusively associated with *MECP2*, and pathogenic monoallelic variants in at least two other genes are frequently associated with an RS-like condition: *CDKL5*, also X-linked and leading to early-onset epileptic encephalopathy with microcephaly and stereotyped hand movements; and *FOXG1*, located in chromosome 14, cause severe cognitive impairment, early-onset epilepsy, and often dyskinetic movement disorders [8].

We conducted a systematic review of all published cases of hemizygous males carrying a single copy of *MECP2* with a germinative pathogenic variant (See Supplementary Material – Table 1, 2, and 3), belonging to classes 1, 2, and 3 of *MECP2*-related

phenotypes. Males with 2 copies of *MECP2* or a single copy with a pathogenic variant in mosaic (classes 4 and 5) were not included in this review. We aimed to investigate the clinical variability of this condition in males, which makes the clinical diagnosis very challenging, and to review all published cases that fulfilled our inclusion criteria. Eight additional cases were also evaluated in this collaborative, multi-center study.

## 2. Casuistic and methods

### 2.1. Patient selection

This was a retrospective study of a Brazilian cohort of 8 male carriers of *MECP2* with pathogenic variants diagnosed either by whole exome sequencing (WES) or epilepsy gene panel in 6 different centers in Brazil (See Table 1).

Their medical records were reviewed, and legal guardians formally consented to participate in this investigation, which was approved by the Institutional Ethics Committee.

### 2.2. Genetic analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes or buccal swab using standard protocols. WES or epilepsy genes panel sequencing, assembly, genotyping, and annotation were performed at Mendelics Genomic Analysis (São Paulo, SP, Brazil). Exome capture was performed using Illumina Nextera Rapid Capture Exome kit (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) or a Twist-Flex kit (TwistBiosciences, San Francisco, CA, USA). Sequencing was done on an Illumina platform (HiSeq 2500, HiSeq 4000, or NovaSeq 6000). Sequence reads were aligned to the reference human genome (UCSC Genome Browser GrCh37/hg19) with the BWA (Burrows-Weeler Aligner) software. Genotyping was performed using the Genome Analysis Toolkit (GATK). Annotation, filtering, and variant prioritization were performed using Mendelics proprietary software. The identified *MECP2* variants were also tested by Sanger sequencing in all patients and their mothers. The genomic reference used was GRCh37/Hg19, and the reference transcript was ENST00000303391, which is more significantly expressed in the central nervous system, even though it is not the longest transcript.

### 2.3. Literature search strategy

A systematic search was conducted by two reviewers working independently (LMI, MGP), according to the PRISMA guidelines [9]. Medline (Pubmed) and Embase were searched for articles published from January 1999 to May 2020 and reviewed in July 2020, using the following keywords: *MECP2*, Methyl-CpG-Binding Protein, Rett Syndrome. We selected publications containing clinical and molecular information on male carriers of a single copy of *MECP2* with hemizygous pathogenic variants (therefore, XXY individuals and males with mosaic *MECP2* mutation were not included). We included only publications written in English. Abstracts in annals of congress, duplicated reports, and published variants currently known to be benign or likely benign were excluded. We adjusted the amino acid position of all published variants to the reference transcript ENST00000303391.

The selection process was performed with Rayyan software [10] and presented in Fig. 1. Two blinded reviewers (LMI, MGP) extracted the clinical information (Supplementary material - Tables 1, 2, and 3) and any eventual disagreement was solved by the other two additional reviewers (LIMS, FK).



**Table 1**  
Molecular, clinical features, neurophysiological and imaging data of those 8 male patients with MECP2 pathogenic variants.

Patient number Phenotype (#OMIM)	Molecular analysis (GRCh37/Hg19) Reference transcript: ENST00000303391	Last evaluation or age of death (†)	Epilepsy		Clinical features			Complementary exams							
			Age onset	Seizures	Microcephaly (*)	Apneic spells	DD	G/ T	Hypotonia (**)	Spasticity	Other features	EEG	Brain MRI		
<b>1</b> Neonatal Severe Encephalopathy (300673)	ChrX:153,296,881C>T c.398G>A p.(Arg133His) Exon 3 De novo	5y †	15d	GM, FM, DF/ Refractory	–	+	Global, severe	+	+	+	–	–	Non-epileptic, myoclonus, chorea, ballism	Multifocal Cortical atrophy	
<b>2</b> Neonatal Severe Encephalopathy (300673)	ChrX:153,296,473delC c.806delG p.(Gly269Alafs*20) Exon 4 De novo	4y †	2m	FM, GM/ Refractory	–	+	Global, severe	+	+	+	–	–	Non-epileptic, myoclonus, chorea, ballism	Multifocal Normal	
<b>3</b> Neonatal Severe Encephalopathy (300673)	ChrX:153,296,882G>A c.397C>T p.(Arg133Cys) Exon 3 De novo	5y †	6m	GM, FM, FD/ Refractory	+	–	Global, severe	+	–	+	–	–	Dystonia	Multifocal Cortical atrophy	
<b>4</b> Neonatal Severe Encephalopathy (300673)	ChrX:153,296,363G>A c.916C>T p.(Arg306Cys) Exon 4 De novo	4y	2y	FC, GM	–	–	Global, severe	+	+	+	–	–	Non-epileptic, myoclonus	Multifocal Normal	
<b>5</b> Severe Neonatal Encephalopathy (300673)	ChrX:153,296,523 –153,296,524insC c.755dupG p.(Gly252Argfs*7) Exon 4 De novo	5y	10m	GM/ Refractory	–	+	Global, severe	+	+	+	–	–	–	Multifocal Normal	
<b>6</b> Mental Retardation, X-linked, syndromic 13 (300655)	ChrX:153,296,780G>A c.535C>T p.(Arg179Trp) Exon 4 Inherited	5y	1y	GM/ Refractory	–	–	Language, mild	–	–	–	–	–	–	Multifocal Normal	
<b>7</b> Mental Retardation, X-linked, syndromic 13 (300655)	ChrX:153,297,676T>C c.395A>G p.(Trp132Cys) Exon 3 De novo	16y	4y	FD, GM	–	–	Global, moderate	–	+	–	–	–	–	Multifocal Normal	
<b>8</b> Mental Retardation with Psychosis, Pyramidal signs, and Macroorchidism PPM-X (300655)	Chr:153,296,860C>A c.419C>T p.(Ala140Val) Exon 3 Inherited	19y	NA	NA	–	–	Global, moderate	–	–	–	–	–	Tremor, ataxia, psychosis parkinsonism, pyramidal signs	Cortical atrophy	Focal slowing

absent; †: death; +: present; (\*): (<2 Z score); (\*\*): early onset of hypotonia; d: day; DD: developmental delay; DF: dyscognitive focal seizure; EEG: electroencephalogram; FM: focal motor seizure; FMC: focal motor clonic seizure; GM: generalized or bilateral motor seizure; G/T: gastrostomy/tracheostomy; m: month; MRI: magnetic resonance image; NA: not applicable; y: year.



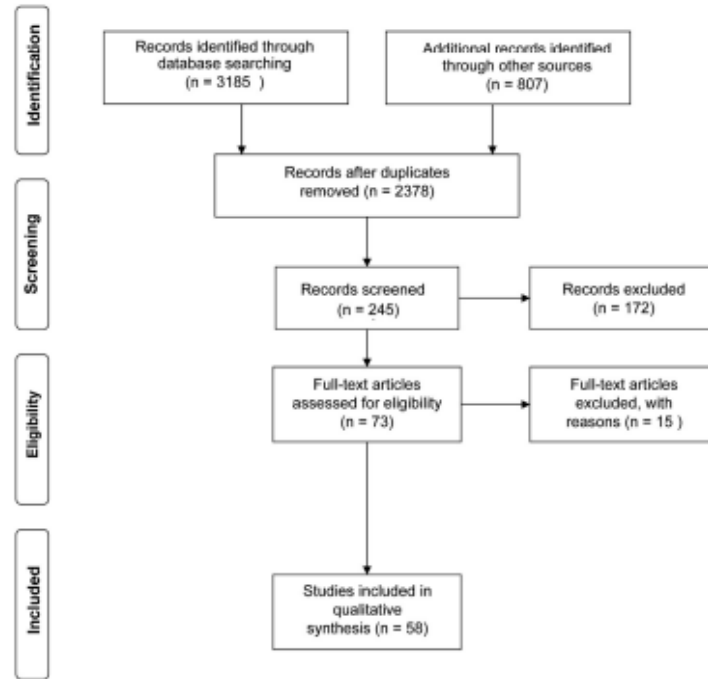


Fig. 1. Flow diagram (modified from The PRISMA Flow Diagram) and results of literature review, including the number and reason of exclusion.

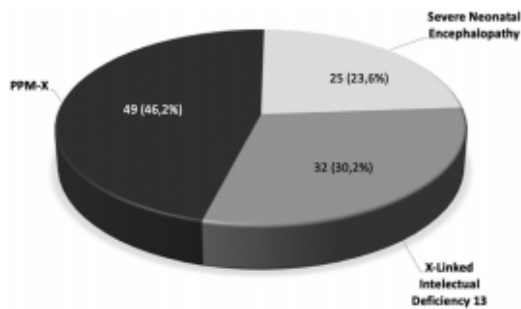


Fig. 2. Phenotype distribution of *MECP2* pathogenic variants in 106 males.

### 3. Results

#### 3.1. Case series

The clinical features, as well as the neurophysiological and molecular data from those 8 male patients, are summarized in Table 1.

Of the 8 patients, 5 had severe neonatal encephalopathy, 2 X-linked mental retardation 13 and 1 pyramidal signs, parkinsonism, and macroorchidism (PPM-X). All variants detected by NGS in patients were confirmed by Sanger sequencing and maternal

genotyping using DNA extracted from oral swab did not detect the variant in 7 and identified the pathogenic variant in 1. In one of the mothers that tested negative (case 2), a girl with Rett syndrome was born seven years later, with the same variant previously detected in her brother. Additional NGS analysis of this mother did not disclose any evidence of somatic mosaicism and we concluded that this occurrence was likely due to gonadal mosaicism.

A total of 5 patients showed profound developmental delay, whereas the other 3 showed moderated intellectual deficiency. Epilepsy was present in 7 individuals, and the seizures were refractory in 4 of them. Movement disorders and apneic spells were present in 4 patients and only 1 patient developed parkinsonism, spasticity, and psychosis.

A typical case of each one of those classes was included in Supplemental Material).

#### 3.2. Systematic review

**Literature search:** From the total 3,185 publications found through the search, 58 reported data on male carriers of a single copy of *MECP2* with a pathogenic variant, corresponding to a total of 98 individuals (details in Fig. 1).

After a systematic review, we were able to collect information on:

1. **Severe neonatal encephalopathy**, reported on 27 individuals belonging to 25 families (supplemental material - Table 1) [3,11–28]. Among the 25 families, 18 distinct genetic variants were identified: 11 previously reported in female patients with

classical RS (RettBASE:<http://mecp2.chw.edu.au/>) [29] and 7 novel, 4 of them leading to a premature stop codon. The phenotype was very similar among those patients: 10 had a profound developmental delay and hypotonia was reported by 21. Among the 14 epileptic patients, 5 showed refractoriness to antiepileptic drugs. Placement of the gastrointestinal (GI) tube and/or tracheostomy was seen in 16 patients. Premature death, occurring before 4 years of age was reported in 13 patients. Movement disorders (e.g., dystonia and choreoathetosis) were seen in 13 individuals, whereas 22 showed apneic spells. Brain MRI was performed on 15 patients, and either resulted in a normal result ( $n = 6$ ) or demonstrated mild cerebral atrophy ( $n = 7$ ). EEG was non-specific, showing background slowing of activity and/or multifocal or focal discharges.

- X-linked intellectual deficiency 13**, reported in 25 families with 47 individuals, carrying 21 different pathogenic variants (see supplemental material - Table 2, Supplementary Material)<sup>26,30–49</sup>. Those variants were usually located in the final 3' end of *MECP2* gene and can lead to either premature stop or in-frame deletion. Additionally, some missense variants are not able to confer a typical phenotype of RS in females but can lead to a non-syndromic intellectual deficiency in males. Additionally, mild to severe developmental delay or intellectual deficiency and epilepsy was reported in 16 of 46 individuals. Psychiatric disorders such as mood and behavioral problems were commonly seen [26,30–49].

Throughout our review of articles, we found reports of some variants that are currently identifiable in populational database controls ([www.gnomad.broadinstitute.org](http://www.gnomad.broadinstitute.org)) in males. As it is a recent tool, some studies have been excluded because of those variants [p.(Asp147Glu) [46], p.(Pro152Ala) [26,53], p.(Ala201Val) [50], p.(Pro399Leu) [51], p.(Pro405Leu) [52], p.(Arg453Gln) [51], p.(Arg458His) [46]], would now be reclassified as likely benign. We also excluded the more recent publication of a duplicated report.

Additionally, the classical variants p.(Arg133Hys) and p.(Arg133Cys), recurrently reported in females with RS, have been published in males with classical presentation of RS [31] or X-linked mental retardation [46]. Nevertheless, somatic mosaicism could not be ruled out in those patients.

- PPM-X** was identified in 8 unique families, with 24 affected male patients aged from 11 to 67 years old (see supplemental material - Table 3) [41,54–60]. The intellectual deficiency was seen in all patients, whereas motor signs (e.g., spasticity and/or parkinsonism) were reported in 23 patients. The occurrence of macroorchidism was reported in 9 cases, whereas psychiatric manifestations (e.g., psychosis) occurred in 5 patients. No patient presented epilepsy.

Our study (our serial cases and systematic review) has revealed 106 individuals with *MECP2* pathogenic variants distributed as follows: 49 (46.2%) X-linked intellectual deficiency 13, 32 (30.2%) severe neonatal encephalopathy, and 25 (23.6%) PPM-X (Fig. 2).

#### 4. Discussion

In this study, which included 8 males carrying a single copy of *MECP2* with a pathogenic variant, we were able to recognize all three phenotypes seen in hemizygous males with pathogenic variants: severe neonatal encephalopathy ( $n = 5$ ); X-linked intellectual deficiency 13 ( $n = 2$ ); and parkinsonism, pyramidal signs and macroorchidism (PPM-X) ( $n = 1$ ).

- Severe Neonatal Encephalopathy** (OMIM # 300673) was accompanied by seizures, starting before the age of 10 months, seen in all 5 individuals. Epilepsy was refractory to AED in 4 of our patients. All of them were profoundly hypotonic after birth, and 4 presented apneic spells. Movement disorders, characterized by ballistic, myoclonic, or choreiform movements, unrelated to seizures, were present in 4 individuals. They had early-stage development arrest and none of them could achieve head support nor be able to interact. All patients were fed by gastrostomy and need ventilatory intermittent support and tracheostomy. Our clinical findings overlapped with the 27 reported individuals with severe neonatal encephalopathy and similar outcomes. Molecular analysis disclosed three missense pathogenic variants: two variants [p.(Arg133His) and p.(Arg133Cys)] previously reported in males with severe neonatal encephalopathy [17,26,28] and also described in several cases of female patients with classical RS [29]; and the missense variant p.(Arg306Cys), not previously reported in males, but seen many times in female patients with classical RS [29]. Two frameshift pathogenic variants were identified: p.(Gly269Alafs\*20), previously reported in 3 males with epileptic encephalopathy [16,18,24] and p.(Gly252Argfs\*7), which is a novel variant. Among 31 individuals with severe neonatal encephalopathy in which the mother was tested (including our data), a variant was present in 9 of them, suggesting skewed X-inactivation. In the remaining 22 cases, pathogenic variant was not detected; nevertheless, in 4 of those mutation-negative mothers, a second sibling carrying the same *MECP2* variant was present, indicating a likely gonadal mosaicism. We speculate that there is an over-representation of published cases of maternal gonadal mosaicism and X-chromosome skewed inactivation for *MECP2* [3,11–28].

- X-linked intellectual deficiency 13** (OMIM # 300055) was seen in 2 patients, both with mild or moderate intellectual deficiency, whose epilepsy begins at 1 and 4 years of age, being refractory in one of them. The variant p.(Arg179Trp) was previously reported in a family with several affected individuals [29], whereas the novel variant p.(Tyr132Cys) occurred as a *de novo* pathogenic variant and was not previously reported. Table 2 (Supplementary Material) [26,30–49] summarizes the published cases of X-linked intellectual deficiency 13.

The reported variants of X-linked intellectual deficiency 13 are usually located at the 3' end of *MECP2*, leading to either premature stop or a frame deletion. Additionally, missense variants located in other positions, as occurred with our patients, can lead to this phenotype in males (Table 2, Supplementary Material) [26,30–49]. The clinical phenotype of our patients did not differ from the 47 previously reported cases belonging to 25 families (17 inherited, 1 putative inherited, and 7 sporadic) [26,30–49].

- PPM-X** (OMIM #300055) a unique combination of parkinsonism, pyramidal signs, and occasionally macroorchidism, caused by the same pathogenic p.(Ala140Val) variant. It might be inherited from a normal or minimally affected mother or occur as a *de novo* variant [51,53–61]. It usually leads to a developmental delay and intellectual deficiency, as well as other neurological manifestations detected after the first decade of life, possibly accompanied by behavioral abnormalities or psychosis [51,53–61]. One patient in our series carrying the variant p.(Ala140Val) shows the typical clinical features of PPM-X without macroorchidism. In total, 24 individuals with this variant have been reported [51,53–61].

**4. All phenotypes**, male carriers of a single copy of *MECP2* with a pathogenic variant are uncommon, and their phenotype usually has no similarity with the RS classical presentation seen in



females [62–66]. Even though some publications reported an RS-like phenotype in male carriers of the same *MECP2* pathogenic variants seen in females with classical RS, it is not clear if they can represent somatic mosaicism. Generally, the diagnosis is established using comprehensive molecular tools, including WES or epilepsy genes panels. The phenotype is quite variable, as epilepsy patterns, dysmorphic features, or behavioral characteristics have no diagnostic utility.

We believe that variants known to be pathogenic in females cause severe neonatal encephalopathy, while variants leading to intellectual deficiency in males are milder and affect protein function less seriously.

Genetic counseling is an important feature of *MECP2*-related conditions in males since all reported cases of epileptic encephalopathy occurred as a *de novo* mutation or, more rarely, as a result of maternal mosaicism, as occurred with one of our subjects. On the other hand, both XLMR13 and PPM-X can occur as *de novo* variants or inherited from a normal or mildly affected mother.

With the increased accessibility of genetic tests employing NGS-based technology, either as whole exome sequencing or as a panel for selected genes, the diagnosis of *MECP2*-related conditions shall become more frequent.

Our study revealed two novel *de novo* pathogenic variants in *MECP2*: p.(Gly252Argfs\*7) and p.(Tyr132Cys). One additional case of presumed gonadal mosaicism was found (patient 2).

In our experience, the current classification was both appropriate and useful in our study involving eight males with *MECP2* pathogenic variants, and there was no phenotypic overlap. Nevertheless, PPM-X requires a longer follow-up to be distinguished from XLMR13.

#### Declaration of competing interest

All authors declare no conflict of interests.

#### Acknowledgments

The authors thank the patients' families for their cooperation, the Genome Aggregation Database (gnomAD - <http://gnomad.broadinstitute.org>) and, RettBASE (<http://mecp2.chw.edu.au>).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2021.05.013>.

#### References

- [1] A. Rett, Die Pflege des hirngeschädigten Kindes. The care of mentally defective children, *Krankenschwester* 19 (1966) 33–35.
- [2] B. Hagberg, J. Alcardi, K. Dias, O. Ramos, A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: rett's syndrome: report of 35 cases, *Ann. Neurol.* 14 (1983) 471–479.
- [3] R.E. Amir, L.B. Van den Veyver, M. Wan, et al., Rett syndrome is caused by mutations in X-linked *MECP2*, encoding methyl-CpG-binding protein 2, *Nat. Genet.* 23 (1999) 185–188, <https://doi.org/10.1038/13810>.
- [4] M. Wan, S.S. Lee, X. Zhang, et al., Rett syndrome and beyond: recurrent spontaneous and familial *MECP2* mutations at CpG hotspots, *Am. J. Hum. Genet.* 65 (1999) 1520–1529, <https://doi.org/10.1086/302690>.
- [5] L. Villard, A. Kpebe, C. Cardoso, et al., Two affected boys in a Rett syndrome family: clinical and molecular findings, *Neurology* 55 (2000) 1188–1193, <https://doi.org/10.1212/wnl.55.8.1188>.
- [6] J.L. Neul, T.A. Benke, E.D. Marsh, et al., The array of clinical phenotypes of males with mutations in Methyl-CpG binding protein 2, *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 180 (2019) 55–67, <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32707>.
- [7] Kaur S, Christodoulou J. *MECP2* disorders. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews*®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; October 3, 2001.
- [8] R. Guerrini, E. Parrini, Epilepsy in Rett syndrome, and CDKL5- and FOXP1-gene-related encephalopathies, *Epilepsia* 53 (2012) 2067–2078.
- [9] D. Moher, A. Liberati, J. Tetzlaff, D.G. Altman, Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement, *BMJ* 339 (2009) 332–336, <https://doi.org/10.1136/bmj.b2535>.
- [10] M. Ouzzani, H. Hammady, Z. Fedorowicz, A. Elmagarmid, Rayyan-a web and mobile app for systematic reviews, *Syst. Rev.* 5 (2016) 210, <https://doi.org/10.1186/s13643-016-0384-4>.
- [11] J.M. Milunsky, R.V. Lebo, T. Ikuta, et al., Mutation analysis in Rett syndrome, *Genet. Test.* 5 (2001) 321–325, <https://doi.org/10.1089/109065701753617462>.
- [12] K. Hoffbuhr, J.M. Devaney, B. LaFleur, et al., *MECP2* mutations in children with and without the phenotype of Rett syndrome, *Neurology* 56 (2001) 1486–1495, <https://doi.org/10.1212/wnl.56.11.1486>.
- [13] B.B. Zeev, Y. Yaron, N.C. Schanen, et al., Rett syndrome: clinical manifestations in males with *MECP2* mutations, *J. Child Neurol.* 17 (2002) 20–24, <https://doi.org/10.1177/088307380201700105>.
- [14] S.A. Lynch, S.D. Whately, V. Ramesh, S. Sinha, D. Ravine, Sporadic case of fatal encephalopathy with neonatal onset associated with a T158M missense mutation in *MECP2*, *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 88 (2003) 250–252, <https://doi.org/10.1136/fn.88.3.f250>.
- [15] K. Ravn, J.B. Nielsen, P. Uldall, F.J. Hansen, M. Schwartz, No correlation between phenotype and genotype in boys with a truncating *MECP2* mutation, *J. Med. Genet.* 40 (2003) e5, <https://doi.org/10.1136/jmg.40.1.e5>.
- [16] V. Leuzzi, M.L. Di Sabato, M. Zollino, M.L. Montanaro, S. Seri, Early-onset encephalopathy and cortical myoclonus in a boy with *MECP2* gene mutation, *Neurology* 63 (2004) 1968–1970.
- [17] T. Masuyama, M. Matsuo, J.J. Jing, et al., Classic Rett syndrome in a boy with R133C mutation of *MECP2*, *Brain Dev.* 27 (2005) 439–442, <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2004.10.002>.
- [18] P. Kankirawatana, H. Leonard, C. Elway, et al., Early progressive encephalopathy in boys and *MECP2* mutations, *Neurology* 67 (2006) 164–166, <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000223318.28938.45>.
- [19] M. Lundvall, L. Samuelsson, M. Kyllerman, Male Rett phenotypes in T158M and R294X *MECP2*-mutations, *Neuropediatrics* 37 (2006) 296–301, <https://doi.org/10.1055/s-2006-924613>.
- [20] M. Venancio, M. Santos, S.A. Pereira, P. Maciel, J.M. Saravá, An explanation for another familial case of Rett syndrome: maternal germline mosaicism, *Eur. J. Hum. Genet.* 15 (2007) 902–904, <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201835>.
- [21] B. Schüle, D.D. Armstrong, H. Vogel, A. Oviedo, U. Francke, Severe congenital encephalopathy caused by *MECP2* null mutations in males: central hypoxia and reduced neuronal dendritic structure, *Clin. Genet.* 74 (2008) 116–126, <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2008.01005.x>.
- [22] K. Jülich, D. Horn, P. Burfeind, T. Erler, B. Auber, A novel *MECP2* mutation in a boy with neonatal encephalopathy and facial dysmorphism, *J. Pediatr.* 155 (2009) 140–143, <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.01.035>.
- [23] J. Condie, J. Goldstein, M.S. Wainwright, Acquired microcephaly, regression of milestones, mitochondrial dysfunction, and episodic rigidity in a 46,XY male with a *de novo* *MECP2* gene mutation, *J. Child Neurol.* 25 (2010) 633–636, <https://doi.org/10.1177/0883073809342004>.
- [24] R. Falsaperla, L. Pavone, M. Fichera, P. Striano, P. Pavone, Apneic crises: a clue for *MECP2* testing in severe neonatal hypotonia-respiratory failure, *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 16 (2012) 744–748, <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2012.03.001>.
- [25] O.D. Soffer, R. Sidlow, A rare *MECP2* e1 mutation first described in a male patient with severe neonatal encephalopathy, *Am. J. Med. Genet.* 170 (2016) 1881–1883, <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37665>.
- [26] T.I. Sheikh, J. Aüsü, H. Faghfoory, et al., From function to phenotype: impaired DNA binding and clustering correlates with clinical severity in males with missense mutations in *MECP2*, *Sci. Rep.* 6 (2016) 38590, <https://doi.org/10.1038/srep38590>.
- [27] T. Shioda, S. Takahashi, T. Kaname, T. Yamauchi, T. Fukuoka, *MECP2* mutation in a boy with severe apnea and sick sinus syndrome, *Brain Dev.* 40 (2018) 714–718, <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2018.03.008>.
- [28] J.A. Yoon, Y. Yoo, J.S. Lee, Y.M. Kim, Y.B. Shin, An early seizure variant type of a male Rett syndrome patient with a *MECP2* p.Arg133His missense mutation, *Mol. Genet. Genom. Med.* 7 (2019) e532, <https://doi.org/10.1002/mgg3.532>.
- [29] J. Christodoulou, A. Grimm, T. Maher, B. Bennetts, RettBASE: the IRSA *MECP2* variation database—a new mutation database in evolution, *Hum. Mutat.* 21 (2003) 466–472, <https://doi.org/10.1002/humu.10194>.
- [30] I. Meloni, M. Bruttini, I. Longo, et al., A mutation in the Rett syndrome gene, *MECP2*, causes X-linked mental retardation and progressive spasticity in males, *Am. J. Hum. Genet.* 67 (2000) 982–985, <https://doi.org/10.1086/303078>.
- [31] E. Monrós, J. Armstrong, E. Albar, et al., Rett syndrome in Spain: mutation analysis and clinical correlations, *Brain Dev.* 23 (Suppl 1) (2001) S251–S253, [https://doi.org/10.1016/s0387-7604\(01\)00374-6](https://doi.org/10.1016/s0387-7604(01)00374-6).
- [32] T. Kleefstra, H.G. Yntema, A.R. Oudakker, et al., De novo *MECP2* frameshift mutation in a boy with moderate mental retardation, obesity and gynecomastia, *Clin. Genet.* 61 (2002) 359–362, <https://doi.org/10.1034/j.1399-0004.2002.610507.x>.
- [33] H.G. Yntema, A.R. Oudakker, T. Kleefstra, et al., In-frame deletion in *MECP2* causes mild nonspecific mental retardation, *Am. J. Med. Genet.* 107 (2002) 81–83, <https://doi.org/10.1002/ajmg.10085>.
- [34] U. Moog, E.E.J. Smeets, K.E.P. Van Rozenendaal, et al., Neurodevelopmental

- disorders in males related to the gene causing Rett syndrome in females (*MECP2*). *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 7 (2003) 5–12, [https://doi.org/10.1016/S1090-3798\(02\)00134-4](https://doi.org/10.1016/S1090-3798(02)00134-4).
- [35] M. Gomot, C. Gendrot, A. Verloes, et al., *MECP2* gene mutations in non-syndromic X-linked mental retardation: phenotype-genotype correlation, *Am. J. Med. Genet.* 123 (2003) 129–139, <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.20247>.
- [36] S.S. Budden, H.C. Dorsey, R.D. Steiner, Clinical profile of a male with Rett syndrome, *Brain Dev.* 27 (Suppl 1) (2005) S69–S71, <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2005.03.018>.
- [37] P. Ventura, R. Galluzzi, S.M. Bacca, R. Giorda, A. Massagli, A novel familial *MECP2* mutation in a young boy: clinical and molecular findings, *Neurology* 67 (2006) 867–868, <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000233990.87889.15>.
- [38] M. Campos Jr., C.B. Abdalla, C.B. Santos-Rebouças, et al., Low significance of *MECP2* mutations as a cause of mental retardation in Brazilian males, *Brain Dev.* 29 (2007) 293–297, <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2006.09.012>.
- [39] A.G. Dayer, A. Bottani, I. Bouchardy, et al., *MECP2* mutant allele in a boy with Rett syndrome and his unaffected heterozygous mother, *Brain Dev.* 29 (2007) 47–50, <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2006.06.001>.
- [40] K. Augenstein, J.B. Lane, A. Horton, C. Schanen, A.K. Percy, Variable phenotypic expression of a *MECP2* mutation in a family, *J. Neurodev. Disord.* 1 (2009) 313–317, <https://doi.org/10.1007/s11689-009-9034-7>.
- [41] S. Pisoni, C. Sofocleous, J. Traeger-Synodinos, et al., Phenotypic and genotypic variability in four males with *MECP2* gene sequence aberrations including a novel deletion, *Pediatr. Res.* 67 (2010) 551–556, <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181d4ecf7>.
- [42] K. Ravn, G. Roende, M. Duno, et al., Two new Rett syndrome families and review of the literature: expanding the knowledge of *MECP2* frameshift mutations, *Orphanet J. Rare Dis.* 6 (2011) 58, <https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-58>.
- [43] B. Schönewolf-Greulich, M.I. Tejada, K. Stephens, et al., The *MECP2* variant c.925C>T (p.Arg309Trp) causes intellectual disability in both males and females without classic features of Rett syndrome, *Clin. Genet.* 89 (2016) 733–738, <https://doi.org/10.1111/cge.12769>.
- [44] L. Bianciardi, M. Fichera, P. Falla, et al., *MECP2* missense mutations outside the canonical MBD and TRD domains in males with intellectual disability, *J. Hum. Genet.* 61 (2016) 95–101, <https://doi.org/10.1038/hjg.2015.118>.
- [45] A. Curie, G. Lesca, G. Bussy, et al., Asperger syndrome and early-onset schizophrenia associated with a novel *MECP2* deleterious missense variant, *Psychiatr. Genet.* 27 (2017) 105–109, <https://doi.org/10.1097/YPG.0000000000000165>.
- [46] Q. Zhang, Y. Zhao, X. Bao, et al., Familial cases and male cases with *MECP2* mutations, *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr Genet* 174 (2017) 451–457, <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32534>.
- [47] B. Muthusamy, L.D.N. Selvan, T.T. Nguyen, et al., Next-Generation sequencing reveals novel mutations in X-linked intellectual disability, *OMICS A J. Integr. Biol.* 21 (2017) 295–303, <https://doi.org/10.1089/omi.2017.0009>.
- [48] G.M. Ronen, L.I. Brady, M.A. Tarnopolsky, Males with *MECP2* C-terminal-Related atypical Rett syndromes and their carrier mothers, *Pediatr. Neurol.* 67 (2017) 98–101, <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2016.10.012>.
- [49] L. Pollini, S. Galosi, F. Nardecchia, et al., Parkinsonism, intellectual disability, and catatonia in a young male with *MECP2* variant, *Mov Disord Clin Pract* 7 (2020) 118–119, <https://doi.org/10.1002/mdc3.12865>.
- [50] K. Inui, M. Akagi, J. Ono, et al., Mutational analysis of *MECP2* in Japanese patients with atypical Rett syndrome, *Brain Dev.* 23 (2001) 212–215, doi: 10.1016/S0387-7604(01)00197-8.
- [51] P. Couvert, T. Bienvenu, C. Aquaviva, et al., *MECP2* is highly mutated in X-linked mental retardation, *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001) 941–946, <https://doi.org/10.1093/hmg/10.9.941>.
- [52] U. Moog, K. Van Roozendaal, E. Smeets, et al., *MECP2* mutations are an infrequent cause of mental retardation associated with neurological problems in male patients, *Brain Dev.* 28 (2006) 305–310, <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2005.10.007>.
- [53] A.A. Adegbola, M.L. Gonzales, A. Chess, J.M. LaSalle, G.F. Cox, A novel hypomorphic *MECP2* point mutation is associated with a neuropsychiatric phenotype, *Hum. Genet.* 124 (2009) 615–623, <https://doi.org/10.1007/s00439-008-0585-6>.
- [54] S. Lindsay, M. Splitt, S. Edney, et al., PPM-X: a new X-linked mental retardation syndrome with psychosis, pyramidal signs, and macroorchidism maps to Xq28, *Am. J. Hum. Genet.* 58 (1996) 1120–1126.
- [55] M.T. Dotti, A. Orrico, N. De Stefano, et al., A Rett syndrome *MECP2* mutation that causes mental retardation in men, *Neurology* 58 (2002) 226–230, <https://doi.org/10.1212/wnl.58.2.226>.
- [56] D. Cohen, G. Lazar, P. Couvert, et al., *MECP2* mutation in a boy with language disorder and schizophrenia, *Am. J. Psychiatr.* 159 (2002) 148–149, <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.159.1.148-a>.
- [57] A. Orrico, C. Lam, L. Galli, et al., *MECP2* mutation in male patients with non-specific X-linked mental retardation, *FEBS Lett.* 481 (2000) 285–288, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01994-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01994-3).
- [58] B. Winnepeninckx, V. Errigiers, F. Hayez-Delatte, E. Reyniers, R. Frank Kooy, Identification of a family with nonspecific mental retardation (MRX79) with the A140V mutation in the *MECP2* gene: is there a need for routine screening? *Hum. Mutat.* 20 (2002) 249–252, <https://doi.org/10.1002/humu.10130>.
- [59] S. Lambert, I. Maystadt, S. Boulanger, et al., Expanding phenotype of p.Ala140Val mutation in *MECP2* in a 4 generation family with X-linked intellectual disability and spasticity, *Eur. J. Med. Genet.* 59 (2016) 522–525, <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2016.07.003>.
- [60] G. Chahil, A. Yelam, P.C. Bollu, Rett syndrome in males: a case report and review of literature, *Cureus* 10 (2018), <https://doi.org/10.7759/cureus.3414-e3414>.
- [61] S.M. Klauk, S. Lindsay, K.S. Beyer, et al., A mutation hot spot for nonspecific X-linked mental retardation in the *MECP2* gene causes the PPM-X syndrome, *Am. J. Hum. Genet.* 70 (2002) 1034–1037, <https://doi.org/10.1086/339553>.
- [62] K. Hadzisev, N. Polgar, J. Bene, et al., Analysis of Hungarian patients with Rett syndrome phenotype for *MECP2*, *CDKL5* and *FOXG1* gene mutations, *J. Hum. Genet.* 56 (2011) 183–187, <https://doi.org/10.1038/hjg.2010.156>.
- [63] M.R. Li, H. Pan, X.H. Bao, Y.Z. Zhang, X.R. Wu, *MECP2* and *CDKL5* gene mutation analysis in Chinese patients with Rett syndrome, *J. Hum. Genet.* 52 (2007) 38–47, <https://doi.org/10.1007/s10038-006-0079-0>.
- [64] C. Schanen, E.J. Houwink, N. Dorrani, et al., Phenotypic manifestations of *MECP2* mutations in classical and atypical Rett syndrome, *Am. J. Med. Genet.* 126 (2004) 129–140, <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.20571>.
- [65] L. Villard, *MECP2* mutations in males, *J. Med. Genet.* 44 (2007) 417–423, <https://doi.org/10.1136/jmg.2007.049452>.
- [66] B. Reichow, A. George-Puskas, T. Lutz, I.C. Smith, F.R. Volkmar, Brief report: systematic review of Rett syndrome in males, *J. Autism Dev. Disord.* 45 (2015) 3377–3383, <https://doi.org/10.1007/s10803-015-2519-1>.

Table 1: Molecular, clinical features, neurophysiological and imaging data of those 8 male patients with MECP2 pathogenic variants

Patient number Phenotype (#OMIM)	Molecular analysis (GRCh37/Hg19) Reference transcript: ENST00000303391	Last evaluati on or age of death (†)	Epilepsy		Clinical features						Complementary exams		
			Age onset	Seizures	Microcephaly (*)	Abscic spells	DD	GI/T	Hypotonia (**)	Spoasticity	Other features	EEG	Brain MRI
1 Neonatal Severe Encephalopathy (300673)	ChrX:153,298,881C>T c.388G>A p.(Arg133His) Exon 3 De novo	5y †	15 d	GM, FM, DF / Refractory	-	+	+	-	-	+	+	Multifocal	Cortical atrophy
2 Neonatal Severe Encephalopathy (300673)	ChrX:153,298,473delC c.806delG p.(Gly289Ala)*20 Exon 4 De novo	4y †	2 m	FM, GM / Refractory	-	+	+	+	+	+	+	Multifocal	Normal
3 Neonatal Severe Encephalopathy (300673)	ChrX:153,298,882G>A c.387C>T p.(Arg133Cys) Exon 3 De novo	5y †	6 m	GM, FM, FD/ Refractory	+	+	+	-	+	+	+	Multifocal	Cortical atrophy
4 Neonatal Severe Encephalopathy (300673)	ChrX:153,298,383G>A c.916C>T p.(Arg306Cys) Exon 4 De novo	4y	2y	FC, GM	-	-	-	+	+	+	+	Multifocal	Normal
5 Severe Neonatal Encephalopathy (300673)	ChrX:153,298,523- 153,298,524insC c.755dupG p.(Gly252Arg)*7 Exon 4 De novo	5y	10 m	GM / Refractory	-	-	+	+	+	+	+	Multifocal	Normal
6 Mental Retardation, X-linked, syndromic 13 (300055)	ChrX:153,298,780G>A c.836C>T p.(Arg178Trp) Exon 4 Inherited	5y	1y	GM / Refractory	-	-	-	-	-	-	-	Multifocal	Normal
7 Mental Retardation, X-linked, syndromic 13 (300055)	ChrX:153,287,676T>C c.395A>G p.(Tyr132Cys) Exon 3 De novo	16y	4y	FD, GM	-	-	-	-	-	-	-	Multifocal	Normal
8 Mental Retardation with Psychosis, Pyramidal signs, and Macroorchidism, PPM-X (300055)	Chr:153,298,860G>A c.419C>T p.(Ala140Val) Exon 3 Inherited	19y	NA	NA	-	-	-	-	-	-	-	Focal slowing	Cortical atrophy

Legend: -; absent; †; death; +; present; (\*): (<2 Z score); (\*\*): early onset of hypotonia; d; day; DD; developmental delay; DF; dyscognitive focal seizure; EEG; electroencephalogram; FM; focal motor seizure;

FGM; focal motor clonic seizure; GM; generalized or bilateral motor seizure; GI/T; gastrostomy/tracheostomy; m; month; MRI; magnetic resonance image; NA; not applicable; y; year

## **CAPÍTULO 7**

### **Discussão e Conclusões**

---

## I DISCUSSÃO

### 1. Caracterização da casuística

No grupo de 112 casos positivos, 26 tinham SEI (23,2%), 21 tinham SD (17,9%). Entre estes, havia uma grande diversidade de fenótipos, sendo SEI, SD e epilepsia combinada os mais comuns. Na amostra, a taxa de positividade na SEI foi de 23,2%, semelhante ao que Peng et al. (2019) encontrou (22,1% -19/86), seguido de SD (17,9%). Os distúrbios de movimento (11,6%) e distúrbios de migração neuronal foram pouco frequentes (6 pacientes) e, também pouco relatados na literatura (Lindy et al., 2016; Peng et al., 2019 e Yang et al., 2019). Os padrões do eletroencefalograma mais comuns foram os tipos IV e V (50,9%), que incluem a hipsarritmia, surto-supressão e multifocal, semelhante ao encontrado por Hur et al., (2019).

Consideramos que o grupo A melhor representa a taxa de positividade do NGS no diagnóstico das DEEs, i.e. os 108 indivíduos que foram incluídos no estudo sem investigação genética prévia. O grupo B, que possui 42 indivíduos incluídos no estudo após a finalização do estudo genético, tem um viés de seleção e pode ter levado uma sobre-representação de casos positivos. A taxa de positividade no grupo A foi de 60,2% (64/108) na primeira leitura. Esta taxa é muito superior ao observado na literatura (23,8%, 31,5% e 42%, nas coortes de Lindy et al., 2016; Peng et al., 2019 e Yang et al., 2019 respectivamente). Esta discrepância, pode ser explicada por:

1. A inclusão apenas de casos de DEE com início antes de dois anos é bastante restritiva e pode ter contribuído para a alta taxa de positividade;
2. Alta incidência de SD associada ao *SCN1A*, que tem taxa de positividade de 13,9% (15/108). Se deixássemos de incluir SD, a taxa de positividade cairia para 53,8%.
3. Local de triagem é um centro de referência de epilepsias graves, o que já cria um viés de seleção

4. A maior parte dos pacientes realizaram completo de exoma (80,3%) o que possibilita a realização de releitura e desta forma aumenta a possibilidade de se ter um resultado conclusivo;
5. A motivação das famílias em realizar o sequenciamento do exoma pode ter levado a um viés de inclusão no grupo A, com a adesão de casos mais graves de DEE, em detrimento dos mais leves, o que pode ter aumentado a taxa de positividade deste grupo.
6. Tamanho da coorte e a seleção dos pacientes não foram de forma consecutiva.

A taxa de positividade variou de acordo com cada estudo. No estudo de Lindy et al., 2016 a amostra foi de 8.565 casos consecutivos de distúrbios do neurodesenvolvimento e epilepsia, investigados por um painel de 70 genes de epilepsia e CGH-array. Nessa coorte, obtiveram 15,4% de positividade de casos em geral e 23,2% em casos de epilepsia de início precoce. A taxa de positividade mais baixa comparada como o nosso estudo pode ser explicada por vários fatores: o primeiro, de janeiro de 2016 até janeiro de 2021, 43 novos fenótipos clássicos (DEE 46 a DEE 89) já haviam sido catalogados e, a cada ano, novos genes estão sendo associados com DEEs. O segundo é que o painel realizado, mesmo que mais amplo que os 46 genes descritos na plataforma OMIM, não contemplava muitos genes associados à DEE no período que fizemos nosso estudo, além de que na amostra de Lindy et al., 2017 os indivíduos não foram submetidos à reanálise.

Em outro estudo feito por Yang et al., 2019 com 733 crianças que realizaram NGS e com epilepsia de início no primeiro ano de vida. A taxa de positividade foi 26,7% para painel com 2.742 genes e 42% para o exoma. Quando foi subdividido em subgrupos, como o de neonato, a taxa foi 28,2% e menos de um ano 34,8%.

No estudo de Peng et al., 2019 com 273 pacientes pediátricos com epilepsia de difícil controle em que foram realizados NGS (painéis genéticos e exoma), obtiveram 31,5% de todos os casos de positividade, com variantes patogênicos em 33 genes, com menor taxa de hospitalizações nos casos positivos comparados com os negativos.



Em nossa casuística, observamos que muitos genes ainda não foram associados à DEE na plataforma OMIM. Entretanto, incluímos, tanto casos clássicos de DEE como outros, que contemplavam nossos critérios de inclusão. Por esta razão, nosso grupo propôs a inclusão do *ATP6V1B2* na ampliação do fenótipo DEE no OMIM, o que, provavelmente, ocorrerá com os demais genes, de acordo com novos estudos.

Em nossa amostra, a reanálise do exoma nos casos previamente negativos do grupo A foi importante na definição do diagnóstico de DEE, evidenciando uma taxa elevada de conversão de 38,5% neste grupo, enquanto outros autores obtiveram 10% (Costain et al., 2019) e 10,9% (Wenger et al., 2017), após um a três anos de releitura. A taxa maior de positividade após a releitura na nossa casuística comparada com outras séries pode ser explicada pelos seguintes motivos: a reanálise foi feita tanto por iniciativa do laboratório, quanto do médico assistente e, ainda a elevada taxa de exomas na nossa amostra. Considerando os grupos A e B, obtivemos 13 casos positivos após a reanálise, variando de um a sete anos de intervalo.

Mesmo com a extensa investigação, ainda temos 25,3% dos casos (38/150) que ainda permanecem negativos, apesar de serem sugestivos de origem genética. Nestes casos, seria importante as reavaliações futuras ou sequenciamento completo do genoma poderão ajudar a elucidar estes casos. Os casos de falso-negativos são conhecidos e, conforme Li et al., 2019 as razões podem ser atribuídas em quatro categorias: as associações de doenças genéticas específicas não tinham sido estabelecidas na altura do relatório inicial; a base de dados de doenças do centro de testes genéticos não tinha sido atualizada; o fenótipo clínico do paciente não tinha sido cuidadoso ou corretamente recolhido, submetido e revisto quando da aplicação do teste genético e análise das variantes; a primeira análise de dados mostrou uma variante sinônima que afetou o reconhecimento de um sítio *splicing*.

Outras possibilidades para a investigação genética ser negativa em casos de DEEs podem ser explicadas por:

- Limitações do genotipador que pode não identificar deleções ou duplicações de cerca 50 a 100 pb;
- Limitações relacionadas ao WES que não tem como alvo o sequenciamento de regiões regulatórias e intrônicas profundas;

- Herança poligênica ou oligogênica;
- Causas ambientais, não genéticas.

Estudos prévios recomendam reanálise após um a dois anos ou dois a três anos de sua primeira análise (Wenger et al., 2017; Costain et al., 2019). No contexto atual a reanálise tem um papel de maior relevância, visto que nem todos os fenótipos dos diversos genes são reconhecidos, sendo esta taxa menor futuramente pela ampliação dos casos reportados.

A nossa amostra também foi importante para inserção no repositório de variantes Clinvar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) dos achados desta tese, o que contribui para a expansão do conhecimento das DEEs.

Em nossa casuística, o padrão de herança AD ocorreu em 69% dos casos, 21% ligado ao X e 10% AR semelhantes ao estudo de Lindy et al., 2018 com 74,8%, 18,2% e 7%, (sendo 5,4% com mais de um gene) ao estudar epilepsia e distúrbios do neurodesenvolvimento. Em nossa casuística, o tipo de herança ligada ao X foi encontrada em ambos os sexos, sendo 62% em meninas, incomum em outras doenças ligadas ao X de um modo geral (Dobyns et al., 2004). Isso pode ser explicado pelo fato das DEEs de causa genética estarem mais relacionadas às variantes patogênicas em genes que não toleram perda ou ganho de função, bastando haver uma única cópia alterada para manifestação do fenótipo. Esta hipótese explica a presença de variantes dominantes em todas as meninas, diferentemente dos meninos que apresentaram tanto variantes de padrão dominante (4/8) como recessivo (4/8). Dos 14 casos em que as mães foram testadas, nove foram consideradas como *de novo*. Esta elevada taxa pode ser explicada pela alta penetrância em meninas, difícil análise de casos com desbalanço ou inativação do cromossomo X, além da possibilidade de mosaicismos somático ou germinativo materno. A alta taxa de variantes patogênicas *de novo* no sexo feminino pode ser explicada em função da meiose paterna, mais sujeita a eventos mutacionais novos (Dobyns et al., 2004, Neul et al., 2019). Nos casos de DEEs de herança AD, encontramos a maioria sendo *de novo* (44/105) ou, presuntivamente, *de novo* (47/105), totalizando 86,7% dos casos, que é concordante com os dados da literatura (Li et al., 2019; Lindy et al., 2018).

Observamos mosaicismos somáticos em um menino, portador de variante patogênica no gene *PCDH19* e dois casos de mosaicismos, presumivelmente, de

mosaicismo gonadal nos genes *MECP2* e *SCN3A*. O mosaicismo somático em meninos portadores de variante patogênica no gene *PCDH19* é conhecido e a gravidade do caso provavelmente seja a proporção de células saudáveis, bem como o tecido envolvido na patologia. Estes casos podem comprometer a interpretação dos exames genéticos, porque o material biológico coletado pode não conter a mutação.

No estudo realizado por Myers et al, 2018, em 120 trios consecutivos de pacientes com DEE de doenças AD, que foram testados com WES em saliva e sangue, dez apresentaram mosaicismo somático, correspondendo a 8,3% da amostra. Além disso, o histórico de crises epiléticas em um dos pais aumentou a probabilidade de mosaicismo. As variantes patogênicas com mosaicismo somático ocorreram em oito genes: *SCN1A* (3/40), *SCN8A*, *GNBI*, *SLC6A1*, *DNMI*, *KCNT1*, *CACNA1* e *DNMI* (Myers et al., 2018).

Em nossa casuística a taxa de mosaicismo somático pode ter sido baixa (um caso apenas), em razão ao tamanho menor da amostra e por não terem sido testados os genitores em 43% dos casos (33/77) de DEE com herança AD.

Já o mosaicismo germinativo só é observado quando nasce uma criança com o mesmo quadro clínico de um irmão afetado, cujos pais testados não são portadores. Esse tipo de mosaicismo é um evento muito raro (1-2% de mutações de ponto e até 4% para rearranjos cromossômicos), qualquer herança-padrão, mas é mais comumente visto com doenças AD e ligadas ao X. Embora o mosaicismo exclusivamente germinativo seja raro em epilepsia geneticamente determinada, esta possibilidade deve ser sempre considerada no aconselhamento genético (Rhabari et al, 2016).

Dos 46 genes com padrão AD/LXD, 40 apresentaram **pLI** (<https://gnomad.broadinstitute.org>) igual ou próximo a 1 (pLI considerado alto). Os dois genes com padrão LXR (*LICAM* e *ATP7A*) também apresentaram pLI alto, podendo ser explicado por seleção contrária no sexo masculino. Um pLI elevado também pode ser explicado em função da localização da mutação, que resulta em um RNAm, que será degradado (NMDecay) e conseqüentemente não será traduzido.

Foram encontrados cinco genes na amostra de pacientes com padrão AD e variantes *missense* e com pLI baixo (< 0,5) em *KCNT1* e *KCNT2*, *NPRL2*, *RHOBT2* e *TUBB3*. Isso pode ser explicado, porque esses genes toleram variantes que levam

ao *stop codon* prematuro, mas não toleram mutações *missense* (o que é indicado pelo Z score alto), provavelmente, por promoverem ganho de função.

Niday e Tzingounis, 2018 discutem a possibilidade de como a abertura anormal dos canais de potássio voltagem dependentes causarem hiperexcitabilidade do SNC, já que o efluxo de potássio leva a potenciais inibitórios. Diferentes hipóteses foram propostas para explicar como GOF ou LOF de um determinado canal iônico pode ter consequências semelhantes. Uma das hipóteses seria a sensibilidade diferente de um canal mutante em células piramidais e em interneurônios, criando um desequilíbrio entre excitação e inibição ou favorecendo a sincronização neuronal (Mao et al., 2018).

Nessa amostra, a maioria dos genes que codificam canais iônicos são intolerantes à perda de função (10/12) e, somente 2/12 tinham o pLI baixo (*KCNT1* e *KCNT2* - 0 e 0,04, respectivamente), explicados pelas variantes patogênicas conhecidas até o momento promoverem apenas GOF (Mao et al., 2020).

Em nossa amostra observamos 14 genes com variantes patogênicas com padrão AR e, dessa forma, não se aplica o uso do pLI.

Em nossa casuística, quatro indivíduos (3,6% - 4/112) apresentaram variações do número de cópias (CNVs), sendo duas em regiões que codificam *SCN1A* (será discutido a seguir) e duas em regiões distintas, que serão discutidas abaixo. Lindy et al., 2019, encontraram uma taxa de 9,3% de CNVs.

A primeira variante patogênica foi considerada uma monossomia parcial 4p16.3-del(4)(p16.3). Foi detectada a deleção terminal que se estende por 1,7 Mb no braço curto do cromossomo 4, englobando, aproximadamente, a região Chr4:85.585-1813.246. O exoma não permite a identificação precisa do ponto de quebra, já que analisa apenas as regiões codificantes. Esta região contém 53 genes e 157 transcritos. Deleções na região 4p16.3 que envolvem a região crítica *WHSCR2* causam fenótipo clássico de síndrome de Wolf-Hirschhorn, uma síndrome de microdeleção de genes contíguos. Contudo, a deleção observada na análise de exoma não envolve a região *WHSCR2*, que contém os genes *LEMT1* e *WHSC1*. A deleção terminal observada envolve regiões previamente, consideradas como sendo candidatas ao desenvolvimento de epilepsia.

A segunda variante patogênica observada foi novamente uma microdeleção: 16p12.2. Trata-se de deleção intersticial de, aproximadamente, 599kb no braço curto do cromossomo 16, com pontos de quebra proximal e distal localizados, englobando, aproximadamente, a região Chr16:21.881.859 - 22.481.101, conhecida como síndrome de deleção 16p12.2 (por conta de diferenças em versões do genoma de referências utilizadas). Esta microdeleção é identificada em múltiplos indivíduos em bancos de dados de pessoas com fenótipo (DECIPHER, Deciphering Developmental Delay - Cases, ClinGen), porém também é observada em baixa frequência em bancos de indivíduos da população geral. A síndrome de microdeleção 16p12.2 é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de diferentes distúrbios neurocomportamentais, como atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, atraso de linguagem, dificuldades de aprendizagem, deficiência intelectual de grau bastante variável (leve a grave), distúrbios comportamentais e psiquiátricos, notadamente, transtorno do espectro autista. Ainda, déficit de crescimento somático, cardiopatia, alterações genito-urinárias e renais, e deficiência auditiva podem ocorrer em parte dos indivíduos. Epilepsia pode ser observada em cerca de 38% dos pacientes, mas, habitualmente, responde às terapias convencionais. Os tipos de epilepsia incluem SW e SLG, crises disperceptivas, mioclonias e crises febris, compatíveis com nosso caso. Na maioria dos casos, a variante patogênica herdada de um genitor, muitas vezes, assintomático ou minimamente afetado, apresentando, portanto, penetrância incompleta e expressividade extremamente variável (Girirajan et al., 2018). A síndrome de deleção recorrente 16p12.2 é definida como a presença de uma deleção recorrente de, aproximadamente, 520 Kb na posição aproximada de 21.948.445-22.430.805 in the reference genome (GRCh37/hg19). Embora sete genes de interesse (*UQCRC2*, *PDZD9*, *MOSMO*, *VWA3A*, *EEF2K*, *POLR3E*, and *CDR2*) estejam dentro da deleção recorrente de 520 Kb, nenhum gene único das variantes patogênicas foi responsável pela causa. No caso em questão foi realizado exoma de trio e na mesma microdeleção 16p12.2 também foram observadas variações do número de cópias por NGS paterna, sendo, portanto, herdadas do mesmo. Esta informação é de grande relevância para aconselhamento genético.

As canalopatias (disfunções canais iônicos) foram as causas mais frequentes em nossa casuística, correspondendo a 39,3% do total de pacientes positivos

(46/112). Em outras coortes, encontraram 50% (Peng et al., 2019) e 55% (Rochtus et al., 2020). Dentre as canalopatias, o *SCN1A* correspondeu a 19,6% (22/112). Tal achado está em consonância com a literatura (24,8% e 24,4% na coorte de Yang et al., 2019 e Peng et al., 2019, respectivamente) sendo a canalopatia mais frequente mundialmente. Na amostra de pacientes de Lindy et al., 2018, se considerarmos somente os casos de epilepsia de início precoce, a taxa de casos positivos em *SCN1A* seria muito maior (62,3% - 322/517). Os canais iônicos são muito importantes na fisiopatologia das crises epiléticas, sendo expressos em diferentes neurônios, sobretudo nos primeiros meses de vida. Em nossa amostra, encontramos 10,7% (12/112) de quatro canalopatias muito frequentes nas coortes de DEEs (*KCNQ2*, *SCN2A*, *SCN8A* e *KCNT1*), comparadas com 12,8% na coorte de Peng et al., 2019. Diferentemente, na coorte de Lindy et al., 2018, os genes *KCNQ2*, *SCN2A*, *SCN8A* corresponderam a 55,1%, podendo ter sido maior, já que o *KCNT1* não tinha sido incluído no painel genético de epilepsias neste estudo. A menor frequência de pacientes com as canalopatias *KCNQ2*, *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN8A* e *KCNT1* nas diferentes coortes (Peng et al., 2019; Yang et al, 2019), comparadas com a maior frequência encontrada por Lindy et al., 2018, podem ser explicadas por: tamanho maior da amostra, testagem com casos consecutivos e, portanto, com menos vieses de seleção.

Em nosso estudo, observamos que houve uma limitação ao caracterizar os casos de perda ou ganho de função, nos quais o mecanismo mutacional foi do tipo *missense* (50%), já que nem todas apresentavam-se funcionais. Os casos de *missense* de nossa amostra também apresentavam defeito na parte citoplasmática da proteína (porção transmembrana e na face extracelular) na formação da alça que está envolvida na inativação do canal. Associados ao quadro clínico, também já tinham sido reportados como locais que sejam responsáveis por fenótipo de SD (Gertler et al., 2020). Em nossa casuística, também houve limitação ao caracterizar os casos se foram *de novo*, já que a maioria tinha sido feita em painéis ou Sanger e somente três genitores haviam sido testados.

Nos dois casos de VUS [p.(Met1438Thr) e p.(Phe102Ser)], estes nunca foram reportados e estavam ausentes nos bancos de dados populacionais de indivíduos saudáveis. As mesmas variantes estavam presentes em regiões muito conservadas e

pontuadas pela ferramenta CADD acima de 25 (considerada elevada e, possivelmente, patogênica). Além disso, próximo à variante patogênica no p.(Phe102Ser) encontramos a variante p.(Ser103Asn) reportada como patogênica. Em função destas evidências, estas VUS não podem ser consideradas como benignas, porém para serem reclassificadas como LP seria necessário a genotipagem dos pais e/ou estudo funcional das mesmas.

Nos dois casos que não apresentavam fenótipo típico de SD, podem ser explicados em razão do mecanismo mutacional observado que foi CNV, sendo um deles a perda dos éxons 17 a 25 e no outro com perda total dos genes *SCN1A*, *SCN7A* e *SCN9A*.

Neste estudo a outra limitação encontrada foi que a herança da variante patogênica foi determinada como, presumivelmente, *de novo* em 19 casos, sendo consideradas *de novo* em três casos, que realizaram testagem dos genitores, já que a maioria realizou o teste de painel genético e não o teste completo do exoma.

A canalopatia ligada ao gene *SCN3A* embora pouco frequente no mundo, tivemos quatro casos, sendo dois de uma mesma família. Variantes patogênicas no *SCN3A* podem ou não ser associadas a um tipo de malformação cortical (polimicrogiria difusa), que foi o encontrado em nossa casuística em três pacientes. Na coorte de Lindy et al., 2018, indivíduos podem ter tido resultados negativos pelo fato de que o painel escolhido não tinha o *SCN3A* e o fenótipo de DEE ter sido atribuído somente em 2019 (Miyatake et al., 2018; Zaman et al., 2018; Inuzuka et al., 2020).

Na coorte de Lindy et al., 2018, com 8.565 indivíduos com epilepsia e alterações do neurodesenvolvimento, encontraram 24,8% e 13,2% de casos com variantes patogênicas no *SCN1A* e *KCNQ2* respectivamente. Nessa amostra, variantes patogênicas em canais iônicos mais frequentes foram: *SCN2A* (7,4%), *GABRG2* (3,6%), *SCN8A* (3,6%), *GABRA1* (1,5%).

Os casos de canalopatias ligadas ao gene *KCNT2* também são muito raras, tendo sido relatados apenas seis indivíduos até o momento de nossa publicação. Nos casos relatados, a maioria apresentava fenótipo de EFMI, diferente do que encontramos em nosso paciente (Gurujaj et al., 2017; Ambrosino et al., 2018; Mao et

al., 2020), sendo mais 13 até o momento (Alagoz et al., 2020; Gong et al., 2021; Jackson et al., 2021).

As canalopatias associadas ao *KCND3* foram associadas a diferentes quadros clínicos como ataxia espinocerebelar AD 19 (OMIM#607346) e síndrome de Brugada 9 (OMIM#616399). Entretanto, em nossa série, um paciente apresentou variante patogênica associada ao *KCND3* [p.(Pro400Ser), Chr1: 112.329.637 G>A ou c.1198 C>T]. Após a reanálise do exoma em 2019, a associação desta variante patogênica com DEE somente foi possível, após a publicação de uma variante patogênica em códon vizinho [p.(Val399Leu)] no banco de dados do Clinvar ([www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/372829](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/372829)).

Encontramos 5/112 (4,5%) variantes patogênicas em genes que codificam proteínas carreadoras, foram demonstradas nos dados da Tabela 4. As proteínas carreadoras participam do transporte de íons (tais como sódio, potássio, cobre) e nutrientes (como glicose e aminoácidos). A família mais relevante para o SNC é a SLC (*solute carrier*), com 71 genes dos quais 22% estão relacionados à epilepsia e às encefalopatias epilépticas (Hu et al., 2020). Na amostra de Lindy et al., 2018, as mais frequentes desta classe foram a *SLC2A1* (3,6%) e *SLC9A6* (0,8%).

Os mecanismos de adesão celular e citoesqueleto (10/112) e estrutura sináptica (5/112) são produtos proteicos de extrema importância para o funcionamento do SNC.

Neste grupo, temos muitos casos de malformação no SNC e dismorfismos e também alguns casos de DEE, mas não é a maioria.

No trabalho de Palmer et al. (2018) em análise de custo-efetividade também puderam concluir que o NGS foi superior ao método tradicional de investigação nas DEEs.

Embora não tenha sido o foco da tese, em nossa casuística também pudemos notar o direcionamento do tratamento para algumas variantes patogênicas por terem tratamentos específicos, direcionados pelos mecanismos fisiopatológicos, como o caso do *KCNT1* (cujos pacientes fizeram ou fazem uso de quinidina - bloqueador de canais de potássio – pacientes 33 a 36), *GRIN2D* (em casos de ganho de função é indicado tratamento com memantina, paciente 22), além dos casos com variantes patogênicas no *SCN8A* (pacientes 87,88 e 89) e *KCNQ2* (pacientes 29 a 32). Em



todos estes últimos casos foram indicados a utilização de bloqueadores de canal de sódio), *SCN1A* (todos os casos com fenótipo de SD, sempre que diagnosticado, foi recomendado evitar os bloqueadores de canal de sódio). Apesar da fenfluramina estar sendo indicada nestes casos, nenhum fez uso (por ser medicação não disponível no Brasil). No caso de Síndrome de Menkes, Acidúria isovalérica e a Deficiência de Glut-1 foram realizados tratamentos específicos para cada síndrome. Os detalhes de cada tipo de tratamento estão mais bem detalhados no Apêndice G.

Outro tratamento realizado foi a colocação de DBS (*Deep Brain Stimulation* - Estimulação cerebral profunda) em um caso (paciente 19) que apresentava variante patogênica em *GNAO1*.

### 3 Considerações finais

Cada vez mais, temos visto estudos colaborativos para investigação das DEEs e de outros casos de epilepsia, uma das iniciativas é da *Epi25 Collaborative*, na qual participamos com quatro casos nesse período (não relacionados à tese). Entretanto, nestes estudos, os dados genéticos são fornecidos de forma “bruta”, sem interpretação de bioinformatas e de geneticista, o que limita nossa análise.

Além de muitos benefícios terapêuticos, o diagnóstico etiológico das DEEs, possibilita a formação de grupos de suporte específicos de cada doença, levando a vários benefícios adicionais: conhecimento da doença, efeitos na qualidade de vida dos familiares, promover conscientização da doença, promover registro de banco de dados de fenótipos e genótipos, auxiliar os cientistas sobre as respostas às terapias, comorbidades e prognóstico (McTague et al., 2015). Nesta tese, pudemos observar a formação de várias redes de apoio, como a Fundação Dravet Brasil, Fundação SCN8A, Família Glut-1 do Brasil, Fundação WWOX, dentre outros.

Em razão da complexidade dos casos de DEE de início antes, dos dois anos de idade, apresentamos uma sugestão de investigação diagnóstica de casos suspeitos, além dos testes genéticos, baseada na experiência adquirida nesta tese e na revisão de literatura. Acreditamos que pode ser adaptado à realidade de cada serviço e dos recursos disponíveis.

**a. Sempre suspeitar de DEE quando:**

- crises epiléticas com início precoce sem causa definida;
- presença de distúrbios de movimento;
- múltiplos tipos de crises;
- crises epiléticas prolongadas e SE;
- crises prolongadas desencadeadas por febre;
- crises epiléticas de difícil controle medicamentoso;
- piora de crises epiléticas com uso de bloqueadores de canal de sódio (carbamazepina, lamotrigina, fenitoína, vigabatrina, lacosamida);
- quando a epilepsia é associada com sinais clínicos de doença neurodegenerativa;
- quando a epilepsia é associada com sinais clínicos de doenças metabólicas; e
- quando a epilepsia é associada com padrões distintos de malformações do desenvolvimento cortical

**b. Tentar excluir doenças adquiridas**

Pela história clínica:

- Gestação de risco: história de doença infecciosa materna (Zica vírus, rubéola, HIV, toxoplasmose, herpes vírus, sarampo, citomegalovírus);
- Gestação com parto prematuro;
- História de hipoxia e/ou anoxia;
- História de sepse neonatal e meningites.

**c. Sempre que suspeitar de doença genética tentar classificar o padrão de herança:**

- Padrão sugestivo de herança AD;
- Padrão sugestivo de herança ligada ao X;
- Padrão sugestivo de herança AR ou consanguinidade explícita ou oculta; e
- Caso esporádico: manter todas as possibilidades em aberto.

#### **d. Exames complementares**

Nem todos os exames complementares precisam ser realizados, devem ser avaliados, caso a caso. Elegemos os principais: EEG, Vídeo-EEG, neuroimagem (preferencialmente, RM de crânio), líquido (em casos suspeitos de doenças autoimunes e Deficiência de Glut-1), exames laboratoriais gerais\*, exames de triagem: teste do pezinho (se possível o ampliado) e TANDEM. Cada vez menos, os testes de triagem de erros inatos de metabolismo vêm sendo recomendados em casos de DEEs, visto que são demorados e, muitas vezes com resultados contraditórios, que precisam ser confirmados pelo teste molecular.

Exames gerais recomendados, de acordo com a clínica do paciente:

- Hemograma;
- função renal;
- eletrólitos;
- perfil hepático;
- perfil tireoidiano;
- perfil lipídico;
- homocisteína;
- ácido metilmalônico;
- cobre, ceruloplasmina (investigação de Síndrome de Menkes);
- amônia (quando for feita em local apropriado, caso contrário, recomendamos não solicitar);
- lactato;
- vitamina E, ácido fólico, vitamina B-12;
- sorologias virais; e
- Imunoeletroforese de proteínas plasmáticas e urinárias.

## II CONCLUSÕES

O presente estudo de caracterização clínica e molecular de 150 pacientes com DEE de início precoce permitiu concluir que:

1. A taxa de positividade (diagnóstico de DEE com crises no início até dois anos de vida) em nossa amostra foi 60,2% (65/108), considerando apenas os pacientes que foram incluídos na amostra, previamente, à realização da investigação genética,
2. A taxa de conversão de exomas negativos para positivos foi 38,5% (10/26) após um intervalo médio de 4,2 anos (mediana de 5,8 anos), demonstrando que o exoma negativo não exclui a possibilidade de DEE de causa genética. Recomenda-se a reanálise periódica do exoma de pacientes com DEE e resultado negativo.
3. O quadro clínico das DEEs é heterogêneo, sendo as canalopatias as mais frequentes (39,3%), dentre elas a DEE relacionado ao *SCN1A* correspondeu a 19,1% dos 112 casos conclusivos.
4. A epilepsia focal e generalizada combinada foi a mais frequente com 55,4% e com padrões eletrográficos mais encontrados foram aqueles com atividade de base desorganizada e paroxismos multifocais e generalizados (50,9%) dos 112 casos conclusivos.
5. A presença de malformação do SNC não exclui a possibilidade de DEE;
6. A possibilidade de mosaicismo gonadal deve ser considerada no aconselhamento genético de casos de DEE.
7. O NGS, preferencialmente, o sequenciamento completo do exoma deve ser considerado, como exame complementar precoce nas DEEs.

**Anexos**

---

**ANEXO A**

**PROTOCOLO DE ANÁLISE CLÍNICA**

**1. DADOS PESSOAIS**

NOME COMPLETO: \_\_\_\_\_

NÚMERO DO PRONTUÁRIO DO SERVIÇO (CITAR QUAL)

\_\_\_\_\_

SEXO: ( ) feminino ( ) masculino

DN: \_\_\_\_\_

IDADE ATUAL: \_\_\_\_\_

IDADE DE INÍCIO DAS CRISES (anos): \_\_\_\_\_

ETNIA: \_\_\_\_\_

PAIS: \_\_\_\_\_

Nome mãe: \_\_\_\_\_

Nome pai: \_\_\_\_\_

CONSANGUÍNEOS? ( ) sim ( ) não

**2. HISTÓRIA CLÍNICA DA EPILEPSIA OU DA DOENÇA EM QUESTÃO**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**3. FREQUÊNCIA MÉDIA DE CRISES EPILÉPTICAS ATUALMENTE:**

( ) controlado

( ) não controlado

Frequência

- diária  
 semanal  
 quinzenal  
 mensal  
 outro  
 controlado. Especificar. Quanto tempo?

#### 4. HISTÓRIA DE STATUS EPILEPTICUS

- sim  
 não  
Quando? \_\_\_\_\_  
Quanto tempo? \_\_\_\_\_  
Quantos episódios? \_\_\_\_\_

#### 5. ANTECEDENTES PESSOAIS

##### 5.1 GESTAÇÃO

- sem intercorrência  
 Intercorrências. Quais?  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

##### 5.2 PARTO / PERÍODO PERINATAL

Tipo de parto:

- A TERMO  PREMATURO. Semanas de gestação? \_\_\_\_\_  
História de sofrimento fetal? Sim  Não   
Hipóxia neonatal? Sim  Não  Apgar: \_\_\_\_\_  
Perímetro cefálico ao nascer (se disponível) \_\_\_\_\_  
Peso ao nascimento: \_\_\_\_\_  
Trauma de cabeça como fraturas ou sangramento intracraniano:  
 sim  não  desconheço  
Infecção do SNC  sim  não  desconheço  
Crises epilépticas neonatais  sim  não  desconheço  
Dismorfias:  não  sim. Quais:  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Comentários do período neonatal:  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**6. ANTECEDENTES FAMILIARES:**

Epilepsia. Quais?

Se necessário, heredograma.

Convulsão febril. Quem? Quais?

Outras doenças

Se necessário, fazer heredograma

**7. FARMÁCOS ANTICRISES E DOSES MÁXIMAS JÁ UTILIZADAS:**

fenobarbital

ácido valpróico/valproato/divalproato de sódio

fenitoína

carbamazepina

oxcarbazepina

lamotrigina

topiramato

levetiracetam

lacosamida

clobazam

nitrazepam

clonazepam

canabidiol

zonisamida

vigabatrina

rufinamida

eslicarbazepina

brivaracetam

outro. Qual?

**8. OUTROS TRATAMENTOS:**

dieta cetogênica

VNS

DBS

cirurgia de epilepsia. Qual? Quando?

**9. FARMACORRESISTÊNCIA E EFEITOS COLATERAIS**

FAC de primeira linha:

Drogas de nova geração:



**10. MEDICAÇÕES EM USO ATUALMENTE (mg/kg/dia)**

- fenobarbital
- ácido valpróico/valproato/divalproato de sódio
- fenitoína
- carbamazepina
- oxcarbazepina
- lamotrigina
- topiramato
- levetiracetam
- lacosamida
- clobazam
- nitrazepam
- clonazepam
- canabidiol
- zonisamida
- vigabatrina
- rufinamida
- eslicarbazepina
- brivaracetam

**11. DIAGNÓSTICO DA EPILEPSIA****11.1 Tipos de crises epiléticas (iniciais e na evolução)**

- focal. Quais?

---

---

- generalizado. Quais?

---

---

- não determinado

**11.2 Tipo de epilepsia/Síndrome (inicial e na evolução)**

---

---

---

**12. EXAME FÍSICO GERAL E NEUROLÓGICO (descrever se tem movimentos involuntários, PC, peso, dismorfias, dados positivos do EF geral)**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**13. VINELAND (ou outro teste)**

---

---

---

---

**14. DESENVOLVIMENTO NEUROPSICOMOTOR:**

- ( ) não teve regressão
- ( ) teve regressão. Qual idade? Especificar:

**Atualmente:**

- ( ) normal
- ( ) anormal. Quais esferas?

- ( ) motor

---

---

- ( ) linguagem

---

---

- ( ) global

---

---

Tentar classificar entre leve, moderado ou grave

**15. DEFICIÊNCIA INTELECTUAL (aplica a pacientes após 5 anos de idade)**

- leve
- moderado
- grave
- não é possível classificar

**16. EXAMES IMPORTANTES REALIZADOS:**

---

---

---

---

---

**17. EXAMES DE IMAGEM – idade realizada**

CT (Crânio)

---

---

---

RNM (Crânio)

---

---

---

---

---

---

**18. Resultado imagem:**

- normal
- anormal. Qual?
  - distúrbio de migração neuronal
  - atrofia cortical
  - alterações em núcleos da base
  - alterações cerebelares

**19. EXAMES GENÉTICOS (CARIÓTIPO,ARRAY, PAINEL, EXOMA) - data**

---

---

---

**20. ELETROENCEFALOGRAMAS (se tiver mais que 3, descrever o primeiro, algum significativo e o último)****EEG 1: data:** \_\_\_\_\_ ; **dade** \_\_\_\_\_

Atividade de base:

- normal
- anormal. Descrever:

Atividade epileptiforme/Anormalidades:

- Ausente
- Surto-supressão
- Hipsarritmia clássica
- Generalizado com espícula-onda, polispícula onda
- Generalizado com paroxismos de atividade rápida
- Paroxismos generalizados contínuos de ponta-onda (POCS)
- Paroxismos generalizados não especificado
- Paroxismos Focais ou multifocais
- Alentecimento focal
- Alentecimento generalizado
- Resposta foto-paroxística (qual frequência? \_\_\_\_\_)

EEG 2: data: \_\_\_\_\_; idade: \_\_\_\_\_

Atividade de base:

normal

anormal. Descrever:

Atividade epileptiforme

Ausente

Surto-supressão

Hipsarritmia

Generalizado com espícula-onda, polispícula onda

Generalizado com paroxismos de atividade rápida

Paroxismos generalizados contínuos de ponta-onda (POCS)

Paroxismos generalizados não especificado

Paroxismos Focais ou multifocais: Quais locais?

Outras anormalidades:

Alentecimento focal. Qual(is) local (is)?

Alentecimento generalizado

Resposta foto-paroxística (qual frequência? \_\_\_\_\_)

EEG 3: data \_\_\_\_\_; idade \_\_\_\_\_

Atividade de base:

- normal  
 anormal. Descrever:

Atividade epileptiforme/Anormalidades:

- Ausente  
 Surto-supressão  
 Hipsarritmia  
 Generalizado com espícula-onda, polispícula onda  
 Generalizado com paroxismos de atividade rápida  
 Paroxismos generalizados contínuos de ponta-onda (POCS)  
 Paroxismos generalizados não especificado  
 Paroxismos Focais ou multifocais. Quais locais?

Outras anormalidades

- Alentecimento focal. Qual (is) local (is)?  
 Alentecimento generalizado  
 Resposta foto-paroxística (qual frequência? \_\_\_\_\_)

**21. VÍDEO-EEG (se houver):**

---

---

---

---

**22. OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES NÃO CITADAS ACIMA:**

---

---

---

**23. NOME DA PESSOA QUE PREENCHE O FORMULÁRIO:**

---

---

## ANEXO B

## Caracterização genética dos 112 pacientes com DEE e teste molecular genético positivo

Número paciente	Gene	ENST	Posição cromossômica (alelo 1 e 2)	posição DNA (alelo 1 e 2)	Consequência na Proteína (alelo 1 e 2)	Mecanismo mutacional (alelo 1 e 2)	Herdado	Alelo	Herança
1	<i>ALG13</i>	00000394780	ChrX:110.928.268 A>G	c.320 A>G	p.(Asp107Ser)	<i>Missense</i>	NT	Heterozigose	LX
2	<i>AMT</i>	00000273588	Chr3:49.457.765 G>A Chr3: 49.459.578 G>A	c.350C>T c.217C>T	p.(Ser117Leu) p.(Arg73Cys)	<i>Missense</i> <i>Missense</i>	Sim (M e P)	Heterozigose composta	AR
3	<i>ARHGAP31</i>	00000264245	Chr3:119.415.515 C>T	c.3586C>T	p.(Gln1196*)	<i>Nonsense</i>	Sim (P)	Heterozigose	AD
4	<i>ATPIA3</i>	00000545399	Chr19:42.472.985 A>G	c.2810T>C	p.(Leu937Pro)	<i>Missense</i>	Não	Heterozigose	AD
5	<i>ATP6V1B2</i>	00000276390	Chr8:20.077.842 A>T	c.1465 A>T	p.(Lys489*)	<i>Nonsense</i>	Não	Heterozigose	AD
6	<i>ATP7A</i>	00000341514	chrX:78.011.673 A > T	c.2171A>T	p.(Gln724Leu)	<i>Missense</i>	Sim (M)	Hemizigose	LX
7	<i>BRAF</i>	00000288602	Chr7: 140.477.848 A>C	c.1460 T>G	p.(Val487Gly)	<i>Missense</i>	NT	Heterozigose	AD
8	<i>CDKL5</i>	00000623535	ChrX:18.613.550 T>A	c.825+2T>A	p.?	<i>Splicing</i>	Não	Heterozigose	LX
9	<i>CDKL5</i>	00000379989	ChrX:18.613.547 A>AG	c.824_825 insG	p.(Asn276Glufs*9)	<i>Frameshift</i>	NT	Heterozigose	LX
10	<i>CDKL5</i>	00000379996	ChrX:18.593.541 C>G	c.213C>G	p.(Asn71Lys)	<i>Missense</i>	NT	Heterozigose	LX
11	<i>CDKL5</i>	00000379996	ChrX:18.622.860 C>T	c.1816 C>T	p.(Gln606*)	<i>Nonsense</i>	NT	Heterozigose	LX
12	<i>CHD2</i>	00000394196	Chr15:93.521.561A>G	c.2675A>G	p.(Gln892Arg)	<i>Missense</i>	Não	Heterozigose	AD
13	<i>CHD2</i>	00000394196	Chr15:93.527.707 C>T	c.3214 C>T	p.(Arg1072*)	<i>Nonsense</i>	NT	Heterozigose	AD
14	<i>CYFIP2</i>	00000347377	Chr5: 156.721.843 C>T	c.259 C>T	p.(Arg87Cys)	<i>Missense</i>	Não	Heterozigose	AD
15	<i>DYRK1A</i>	00000643624	Chr21:38.884.325 C>T	c.1756C>T	p.(Gln586*)	<i>Nonsense</i>	Não	Heterozigose	AD
16	<i>GABBR2</i>	00000259455	Chr9: 103.896.099 C>T	c.1699G>A	p.(Ala567Thr)	<i>Missense</i>	NT	Heterozigose	AD
17	<i>GABRB2</i>	00000274547	Chr5:160.838.037 A>G	c.485 T>C	p.(Met162Thr)	<i>Missense</i>	NT	Heterozigose	AD
18	<i>GNAO1</i>	00000262493	Chr16:56.226.510 C>A	c.143 C>A	p.(Thr48Asn)	<i>Missense</i>	Não	Heterozigose	AD
19	<i>GNAO1</i>	00000262493	Chr16:56.370.674 C>T	c.625 C>T	p.(Arg209Cys)	<i>Missense</i>	NT	Heterozigose	AD
20	<i>GPAAL</i>	00000355091	Chr8:145.140.500-145.140.502 CAG>C Chr8:145.139.139 A>G	c.1477_1478 delAG c.719A>G	p.(Arg493Glyfs*152) p.(Glu240Gly)	<i>Frameshift</i> <i>Missense</i>	Sim (M e P)	Heterozigose composta	AR
21	<i>GRIN1</i>	00000371561	Chr9:140.058.120 G>A	C.2443G>A	P.(Gly815Arg)	<i>Missense</i>	NT	Heterozigose	AD
22	<i>GRIN2D</i>	00000263269	Chr19:48.419.720C>T	c.1997C>T	p.(Ala666Val)	<i>Missense</i>	Não	Heterozigose	AD
23	<i>HNRNPU</i>	00000444376	Chr1:245.027.195 G>A	c.415C>T	p.(Gln139*)	<i>Nonsense</i>	Não	Heterozigose	AD
24	<i>HNRNPU</i>	00000444376	Chr1:244.856.851 T>TG	c.1562_156insC	p.(Gly522Argfs*3)	<i>Frameshift</i>	NT	Heterozigose	AD
25	<i>IQSEC2</i>	00000375365	ChrX:53.268.464 A>T	c.2413 T>A	p.(Phe805Ile)	<i>Missense</i>	Sim (M)	Hemizigose	LXR



## Caracterização genética dos 112 pacientes da série de DEE com teste molecular positivo (continuação)

Número paciente	Gene	ENST	Posição cromossômica (alelo 1 e 2)	posição DNA (alelo 1 e 2)	Consequência na Proteína (alelo 1 e 2)	Mecanismo mutacional (alelo 1 e 2)	Herdado	Alelo	Herança
26	<i>IVD</i>	00000249760	Chr15:40.708.325 C>G	c.1009 C>G	p.(Arg337Gly)	<i>Missense</i>	Sim	Homozigose	AR
27	<i>KCNB1</i>	00000371741	Chr20:4.809.848 A>G	c.536T>C	p.(Leu179Pro)	<i>Missense</i>	Não	Heterozigose	AD
28	<i>KCND3</i>	00000369697	Chr1:112.329.637 G>A	c.1198 C>T	p.(Pro400Ser)	<i>Missense</i>	Não	Heterozigose	AD
29	<i>KCNQ2</i>	00000360480	Chr20:62.076.169 G>A	c.533 C>T	p.(Ala178Val)	<i>Missense</i>	Não	Heterozigose	AD
30	<i>KCNQ2</i>	00000360480	Chr20:62.065.230 G>T	c.1050 C>A	p.(Asn350Lys)	<i>Missense</i>	NT	Heterozigose	AD
31	<i>KCNQ2</i>	00000360480	Chr20:62.076.085 A>G	c.617 T>C	p.(Leu206Pro)	<i>Missense</i>	NT	Heterozigose	AD
32	<i>KCNQ2</i>	00000360480	Chr20:62.073.876 G>GACC	c.699_700insGGT	p.(Val233_Thr234insVal)	<i>Inserção in frame</i>	Não	Heterozigose	AD
33	<i>KCNT1</i>	00000490355	Chr9:138.651.532 G>A	c.805 G>A	p.(Gly269Ser)	<i>Missense</i>	NT	Heterozigose	AD
34	<i>KCNT1</i>	00000490355	Chr9:138.657.552 G>A	c.1283 G>A	p.(Arg428Gln)	<i>Missense</i>	Não	Heterozigose	AD
35	<i>KCNT1</i>	00000490355	Chr9:138.660.94G>A	c.1364G>A	p.(Arg455His)	<i>Missense</i>	NT	Heterozigose	AD
36	<i>KCNT1</i>	00000490355	Chr9:138.675.877 G>A	c.2786G>A	p.(Arg929Gln)	<i>Missense</i>	Não	Heterozigose	AD
37	<i>KCNT2</i>	00000294725	Chr1:196.398.801 G>T	c.725C>A	p.(Thr242Asn)	<i>Missense</i>	Não	Heterozigose	AD
38	<i>KDM5C</i>	00000375401	ChrX:53.224.810 G>A	c.80C>T	p.(Pro27Leu)	<i>Missense</i>	Não	Heterozigose	LXD
39	<i>KIF1A</i>	00000498729	Chr2:241.724.483 T>C	c.643A>C	p.(Ser215Arg)	<i>Missense</i>	NT	Heterozigose	AD
40	<i>KMT2A</i>	00000389506	Chr11:118.392.753 A>C	c.11776 A>C	p.(Ile3926Leu)	<i>Missense</i>	Não	Heterozigose	AD
41	<i>LICAM</i>	00000370060	ChrX:153.134.017 T>G	c.1545A>C	p.(Lys515Asn)	<i>Missense</i>	Sim (M)	Hemizigose	LXR
42	<i>LICAM</i>	00000370060	ChrX: 153.141.264 GC>C	c.29delC	p.(Pro10Leufs*22)	<i>Frameshift</i>	Sim (M)	Hemizigose	LXR
43	<i>MECP2</i>	00000303391	ChrX:153.296.881 C>T	c.398 G>A	p.(Arg133His)	<i>Missense</i>	Não	Hemizigose	LXD
44	<i>MECP2</i>	00000303391	ChrX:153.296.473 GC>G	c.806delG	p.(Gly269Alafs20*)	<i>Frameshift</i>	Mosaicismo	Hemizigose	LXD
45	<i>MED23</i>	0000035457	Chr6:131.908.944 G>A	c.4000 C>T	p.(Arg1334Cys)	<i>Missense</i>	Sim	Homozigose	AR
46	<i>Microdeleção 16p1.21</i>	NA	<i>Chr16:21.881.859_22.481.101</i>	CNV	NA	<i>Na</i>	NT	Heterozigose	AD
47	<i>nonossomia parcial 4p.16.3.</i>	NA	<i>16.3-Del(4)(p.16.3)</i>	CNV	NA	<i>Cnv</i>	Sim (P)	Heterozigose	AD
48	<i>MTOR</i>	00000361445	Chr1:11.217.230 C>T	c.4448 G>A	p.(Cys1483Tyr)	<i>Missense</i>	NT	Heterozigose	AD
49	<i>NDUFS1</i>	00000233190	Chr2:207.006.671 C>T Chr2: 206.997.831 TATTTA>T	c.1256G>A c.1393 delTAAAT	p.(Arg419Gln) p.?	<i>Missense</i> <i>Splicing</i>	Sim (M e P)	Heterozigose composta	AR
50	<i>NPRL2</i>	00000232501	Chr3:50.348.123C>T	c.932+1G>A	p.?	<i>Splicing</i>	NT	Heterozigose	AD (PI)

continua

## Caracterização genética dos 112 pacientes da série de DEE com teste molecular positivo (continuação)

Número paciente	Gene	ENST	Posição cromossômica (alelo 1 e 2)	posição DNA (alelo 1 e )	Consequência na Proteína (alelo 1 e 2)	Mecanismo mutacional (alelo 1 e 2)	Herdado	Alelo	Herança
51	<i>NTRK2</i>	00000277120	Chr9:84.751.990 A>G	c.1301A>G	p.(Tyr434Cys)	<i>Missense</i>	NT	Heterozigose	AD
52	<i>PCDH19</i>	00000373034	ChrX: 99.662.457 GA>G	c.1134delA	p.(Gly379Alafs190*)	<i>Frameshift</i>	Não	Heterozigose	LXD
53	<i>PCDH19</i>	00000255531	ChrX:99.663.330C>T	c.266G>C	p.(Arg89Pro)	<i>Missense</i>	NT	Heterozigose	LXD
54	<i>PCDH19</i>	00000255531	ChrX:99.663.302 C...(+33pb)>C	c.261_293del	p.(Ile87_Pro97del)	<i>Deleção in frame</i>	NT	Mosaicismo somático	LXD
55	<i>PIGN</i>	00000590948	Chr18:59.777.066 C>T Chr18:59.768.377 T>A	c.1574+1G>A c.2008 A>T	p.? p.(Thr670Ser)	<i>Splicing</i> <i>Missense</i>	Sim (M e P)	Heterozigose composta	AR
56	<i>RARS2</i>	00000369536	Chr6:88.228.436 A>G Chr6:88.258.338 T>C	c.1327 T>C c.4222 A>G	p.(Ser443Pro) p.(His141Arg)	<i>Missense</i> <i>Missense</i>	Sim (M e P)	Heterozigose composta	AR
57	<i>RHOBTB2</i>	00000251822	Chr8:22.864.477C>T	c.719C>T	p.(Pro240Leu)	<i>Missense</i>	NT	Heterozigose	AD
58	<i>RNASEH2A</i>	00000221486	Chr19:12.924.005 C>T	c.746C>T	p.(Ala249Val)	<i>Missense</i>	Sim	Homozigose	AR
59	<i>RNASEH2B</i>	00000336617	Chr19:51.519.581 G>A	c.5295G>A	p.(Ala177Thr)	<i>Missense</i>	Sim	Homozigose	AR
60	<i>SCN1A</i>	00000423058	Chr2:166.856.258 A>G	c.4313 T>C	p.(Met1438Thr)	<i>Missense</i>	Não	Heterozigose	AD
61	<i>SCN1A</i>	00000423058	Chr2:166.908.363 C>T	c.830 G>T	p.(Cys277Tyr)	<i>Missense</i>	Não	Heterozigose	AD
62	<i>SCN1A</i>	00000423058	Chr2:166.898.827 GGCTA>A	c.2147_2150delTAGC	p.(Ile716Thrfs*4)	<i>Frameshift</i>	NT	Heterozigose	AD
63	<i>SCN1A</i>	00000423058	Chr2:166.848.567 CG>C	c.5217delC	p.(Asp1740Thrfs*39)	<i>Frameshift</i>	NT	Heterozigose	AD
64	<i>SCN1A</i>	00000423058	Chr2:166.848.615 C>G	c.5170G>C	p.(Ala1724Pro)	<i>Missense</i>	NT	Heterozigose	AD
65	<i>SCN1A</i>	00000375405	Chr2:166.893.028 AGA>A	c.2923_2924delCT	p.(Leu975Leufs*10)	<i>Frameshift</i>	NT	Heterozigose	AD
66	<i>SCN1A</i>	00000303395	Chr2:166.897.804 GAA>G	c.2350_2351delTT	p.(Phe784Hisfs*14)	<i>Frameshift</i>	NT	Heterozigose	AD
67	<i>SCN1A</i>	00000423058	Chr2:166.894.362 C>T	c.2870 G>A	p.(Trp957Ter)	<i>Missense</i>	NT	Heterozigose	AD
68	<i>SCN1A</i>	00000473295	Chr2:166.848.437 G>A	c.5348C>T	p.(Ala1783Val)	<i>Missense</i>	NT	Heterozigose	AD
69	<i>SCN1A</i>	00000375405	Chr2: 166.903.480 G>A	c.117 C>T	p.(Arg393Cys)	<i>Missense</i>	NT	Heterozigose	AD
70	<i>SCN1A</i>	00000423058	Chr2:166.894.541 C>A	c.2691G>T	p.(Leu897Phe)	<i>Missense</i>	Não	Heterozigose	AD
71	<i>SCN1A</i>	00000375405	Chr2:166.894.440 C>T	c.2759G>A	p.(Arg920His)	<i>Missense</i>	NT	Heterozigose	AD
72	<i>SCN1A</i>	00000423058	Chr2:166.430.323_167.760.438	CNV (deleção éxons 1 a 26)	p.?	<i>Cnv</i>	NT	Heterozigose	AD
73	<i>SCN1A</i>	00000303395	Chr2:166.850.928 T>C	c.4582-2A>C	p.?	<i>Splicing</i>	NT	Heterozigose	AD
74	<i>SCN1A</i>	00000674923	Chr2:166.905.417 C>T	c.1007G>A	p.(Cys336Tyr)	<i>Missense</i>	NT	Heterozigose	AD
75	<i>SCN1A</i>	00000423058	Chr2:166.911.147 C>T	c.602+1G>A	p.?	<i>Splicing</i>	AD	Heterozigose	AD

continua

## Caracterização genética dos 112 pacientes da série de DEE com teste molecular positivo (continuação)

Número paciente	Gene	ENST	Posição cromossômica (alelo 1 e 2)	posição DNA (alelo 1 e 2)	Consequência na Proteína (alelo 1 e 2)	Mecanismo mutacional (alelo 1 e 2)	Herdado	Alelo	Herança
76	SCN1A	00000423058	Chr2: 166.859.000 C>T	c.4266 T>A	p.(Tyr1422*)	Nonsense	NT	Heterozigose	AD
77	SCN1A	00000423058	Chr2:166.850.605_166.872.288	CNV (deleção éxons 17 a 25)	p.?	Cnv	NT	Heterozigose	AD
78	SCN1A	00000473295	Chr2:166.911.177 G>C	c.573C>G	p.(Asn191Lys)	Missense	NT	Heterozigose	AD
79	SCN1A	00000423058	Chr2:166.900.385 G>A	c.1837C>T	p.(Arg613*)	Nonsense	NT	Heterozigose	AD
80	SCN1A	00000303540	Chr2: 166.900.484 G>A	c.1738 C>T	p.(Arg580*)	Nonsense	NT	Heterozigose	AD
81	SCN1A	00000423058	Chr2: 166.915.158 A>G	c.305T>C	p.(Phe102Ser)	Missense	NT	Heterozigose	AD
82	SCN2A	00000375437	Chr2:166.231.465 C>A	c.4243 C>A	p.(Leu1415Ile)	Missense	Não	Heterozigose	AD
83	SCN3A	00000283254	chr2:165.986.748 A>G	c.2624T>C	p.(Ile875Thr)	Missense	Não	Heterozigose	AD
84	SCN3A	00000360093	Chr2:165.947.368 C>T	c.5295G>A	p.(Met1765Ile)	Missense	Sim*	Heterozigose	AD
85	SCN3A	00000360093	Chr2:165.947.368 C>T	c.5295G>A	p.(Met1765Ile)	Missense	Sim*	Heterozigose	AD
86	SCN3A	00000360093	Chr2: 165.984.581 TCAA>T	c.2950_2952delTTG	p.(Leu984del)	Deleção in frame	Não	Heterozigose	AD
87	SCN8A	00000545061	Chr12: 52.159.459 G>A	c.2549G>A	p.(Arg850Gln)	Missense	NT	Heterozigose	AD
88	SCN8A	00000354534	Chr12:52.159.551 G>C	c.2.641G>C	p.(Val881Leu)	Missense	Não	Heterozigose	AD
89	SCN8A	00000354534	Chr12:51765.675 G>A	c.2549G>A	p.(Arg850Gln)	Missense	Não	Heterozigose	AD
90	SLC2A1	00000426263	Chr1:42.930.028 C>A	c.524G>T	p.(Gly175Val)	Missense	Não	Heterozigose	AD
91	SLC9A6	00000370695	ChrX:135.084.319 ACTT>A	c.847_849delCTT	p.(Leu283del)	Deleção in frame	Não	Hemizigose	LXD
92	SMC1A	00000375340	ChrX: 53.442.101 C>T	c.61 G>A	p.(Asp21Asn)	Missense	Não	Hemizigose	LXD
93	SMC1A	00000322213	ChrX:53.432.271 C>T	c.1964 G>A	p.(Gly655Glu)	Missense	Não	Heterozigose	LXD
94	SMC1A	00000322213	ChrX:53.423.194 T>TA	c.2814_2815insT	p.(Lys939*)	Nonsense	Não	Heterozigose	LXD
95	SNAP25	00000254976	chr20:10.293.167 T>C	c.170T>C	p.(Leu57Pro)	Missense	Não	Heterozigose	AD
96	SNAP25	00000254976	Chr20:10.286.777 G>C	c.553G>C	p.(Ala185Pro)	Missense	Não	Heterozigose	AD
97	SPTAN1	00000372739	Chr9:128.632.260 G>G...(+9pb)	c.6916_6917insACCAGCTGG	p.(Leu2305_Gly2306insAspGlnLeu)	Inserção inframe	Não	Heterozigose	AD
98	SPTAN1	00000372739	Chr9:128.632.264 C>C...(+42pb)	c.6943_69ins42)	p.(Gln2315_Gln2316ins14)	Inserção inframe	NT	Heterozigose	AD
99	STXBP1	00000373302	Chr9:130.428.463 C>CC	c.685dupC	p.(Gln229Profs*10)	Frameshift	Não	Heterozigose	AD
100	SYT1	00000261205	Chr12:79.353.61 C>T	c.926C>T	p.Ser309Phe	Missense	Não	Heterozigose	AD

continua

## Caracterização genética dos 112 pacientes da série de DEE com teste molecular positivo (conclusão)

Número paciente	Gene	ENST	Posição cromossômica (alelo 1 e 2)	posição DNA (alelo 1 e )	Consequência na Proteína (alelo 1 e 2)	Mecanismo mutacional (alelo 1 e 2)	Herdado	Alelo	Herança
101	<i>TNRC6B</i>	00000335727	Chr22:40.662.193 GGA>G	c.1961_1962delAG	p.(Ser655Argfs*45)	<i>Frameshift</i>	Não	Heterozigose	AD
102	<i>TRAPPC12</i>	00000324266	Chr2:3.424.654 G>A	c.1408 G>A	p.(Gly470Arg)	<i>Missense</i>	Sim	Homozigose	AR
103	<i>TREX1</i>	00000296443	Chr3:48.508.544 C>T Chr3:48.508.395 G>A	c.490C>T c.341G>A	p.(Arg164*) p.(Arg114His)	<i>Nonsense</i> <i>Missense</i>	Sim (M e P)	Heterozigose composta	AR
104	<i>TSEN54</i>	00000333213	Chr17:73.518.081 G>T	c.919G>T	p.(Ala307Ser)	<i>Missense</i>	Sim	Homozigose	AR
105	<i>TUBA1A</i>	00000301071	Chr12: 49.578.888 C>T	c.1242 G>A	p.(Ala421Thr)	<i>Missense</i>	Não	Heterozigose	AD
106	<i>TUBB3</i>	00000315491	Chr16:90.002.031 G>T	c.1172 G>T	p.(Arg391Leu)	<i>Missense</i>	Não	Heterozigose	AD
107	<i>TUBB3</i>	00000315491	Chr16:90.001.665 G>C	c.806 G>C	p.(Gly269Ala)	<i>Missense</i>	Não	Heterozigose	AD
108	<i>UBA5</i>	00000356232	Chr3:132.672.057 C>T Chr3:132.660.538 A>G	c.692C>T c.1A>G	p.(Pro231Leu) p.(Met1?)	<i>Missense</i> <i>Start loss</i>	Sim (M e P)	Heterozigose composta	AR
109	<i>WDR45</i>	00000376372	ChrX:48.933.022 C>T	c.830+1G>A	p.?	<i>Splicing</i>	NT	Heterozigose	LXD
110	<i>WDR45</i>	00000376372	ChrX:48.935.367 A>G	c.170T>C	p.(Leu57Pro)	<i>Missense</i>	Não	Heterozigose	LXD
111	<i>WWOX</i>	00000566780	Chr16:78.458.862 T>TG	c.705dupG	p.(His236Alafs*34)	<i>Frameshift</i>	Sim	Homozigose	AR
112	<i>ZEB2</i>	00000558170	Chr2:145.187.377 CA>C	c.289delT	p.(Trp97Glyfs*11)	<i>Frameshift</i>	NT	Heterozigose	AD

(\*) mosaïcismo gonadal; AD: Autossômica Dominante; AR: Autossômica Recessiva; LX: Ligado ao X; (M): materna; NA: Não avaliado; NT: Não Testado; PI: Penetrância Incompleta

## **9 Referências**

---

## REFERÊNCIAS

Alagoz M, Kherad N, Bozkurt S, Yuksel A. New mutations in KCNT2 gene causing early infantile epileptic encephalopathy type 57: Case study and literature review. *Acta Biochim Pol.* 2020;67(3):431-34.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberths K, Walter P. *Biologia molecular da célula.* 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

Ambrosino P, Soldovieri MV, Bast T, Turnpenny PD, Uhrig S, Biskup S, Döcker M, Fleck T, Mosca I, Manocchio L, Iraci N, Tagliatela M, Lemke JR. De novo gain-of-function variants in KCNT2 as a novel cause of developmental and epileptic encephalopathy. *Ann Neurol.* 2018;83(6):1198-204.

Bartolini E, Campostrini R, Kiferle L, Pradella S, Rosati E, Chinthapalli K, Palumbo P. Epilepsy and brain channelopathies from infancy to adulthood. *Neurol Sci.* 2020;41(4):749-61.

Beghi E, Camfield PR, Camfield CS. Epidemiologic aspects: lost in transition. *Epilepsia.* 2014; Suppl 3:3-7.

Berg AT. Risk of recurrence after a first unprovoked seizure. *Epilepsia.* 2008;49 Suppl 1:13-8.

Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia.* 2010;51:676-85.

Berg AT, Millichap JJ. The 2010 revised classification of seizures and epilepsy. *Continuum (Minneapolis).* 2013 Jun;19 (3 Epilepsy).

Borges MA, Min LL, Guerreiro CAM, Yacubian EMT, Cordeiro JA, Tognola WA, et al. Urban prevalence of epilepsy: Populational study in São José do Rio Preto, a medium-sized city in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.* 2004;62:199-205.

Borlot F, Regan BM, Bassett AS, Stavropoulos DJ, Andrade DM. Prevalence of pathogenic copy number variation in adults with pediatric-onset epilepsy and intellectual disability. *JAMA Neurol.* 2017;74(11):1301-11.

Capovilla G, Wolf P, Beccaria F, Avanzini G. The history of the concept of epileptic encephalopathy. *Epilepsia.* 2013;54:2-5.

Carmignac V, Nambot S, Lehalle D, Callier P, Moortgat S, Benoit V, Ghoumid J, Delobel B, Smol T, Thuillier C, Zordan C, Naudion S, Bienvenu T, Touraine R, Ramond F, Zweier C, Reis A, Kraus C, Nizon M, Cogné B, Verloes A, Tran Mau-Them F, Sorlin A, Jouan T, Duffourd Y, Tisserant E, Philippe C, Vitobello A,

Thevenon J, Faivre L, Thauvin-Robinet C. Further delineation of the female phenotype with KDM5C disease causing variants: 19 new individuals and review of the literature. *Clin Genet*. 2020;98(1):43-55.

Carpio A, Hauser WA. Epilepsy in the developing world. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2009;(4):319-26.

Catterall WA. Sodium channel mutations and epilepsy. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, editors. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* [Internet]. 4th ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012.

Costain G, Cordeiro D, Matviychuk D, Mercimek-Andrews S. Clinical application of targeted next-generation sequencing panels and whole exome sequencing in childhood epilepsy. *Neuroscience*. 2019;418:291-310.

Cowan LD, Hudson LS. The epidemiology and natural history of infantile spasms. *J Child Neurol*. 1991;6(4):355-64.

Depienne C, Trouillard O, Saint-Martin C, Gourfinkel-An I, Bouteiller D, Carpentier W, Keren B, Abert B, Gautier A, Baulac S, Arzimanoglou A, Cazeneuve C, Nabbout R, LeGuern E. Spectrum of SCN1A gene mutations associated with Dravet syndrome: analysis of 333 patients. *J Med Genet*. 2009;46(3):183-91.

Engel J Jr. ILAE classification of epilepsy syndromes. *Epilepsy Res*. 2006;70 Suppl 1:S5-10.

Epi25 Collaborative. Ultra-rare genetic variation in the epilepsies: a whole-exome sequencing study of 17,606 individuals. *Am J Hum Genet*. 2019;105(2):267-82.

Epi25 Collaborative. Sub-genic intolerance, ClinVar, and the epilepsies: A whole-exome sequencing study of 29,165 individuals. *Am J Hum Genet*. 2021;108(6):965-82.

Epi4K Consortium. Epi4K: gene discovery in 4,000 genomes. *Epilepsia*. 2012;53(8):1457-67.

Epi4K Consortium; Epilepsy Phenome/Genome Project, Allen AS, Berkovic SF, Cossette P, Delanty N, Dlugos D, Eichler EE, Epstein MP, Glauser T, Goldstein DB, Han Y, Heinzen EL, Hitomi Y, Howell KB, Johnson MR, Kuzniecky R, Lowenstein DH, Lu YF, Madou MR, Marson AG, Mefford HC, Esmaeeli Nieh S, O'Brien TJ, Ottman R, Petrovski S, Poduri A, Ruzzo EK, Scheffer IE, Sherr EH, Yuskaitis CJ, Abou-Khalil B, Alldredge BK, Bautista JF, Berkovic SF, Boro A, Cascino GD, Consalvo D, Crumrine P, Devinsky O, Dlugos D, Epstein MP, Fiol M, Fountain NB, French J, Friedman D, Geller EB, Glauser T, Glynn S, Haut SR, Hayward J, Helmers SL, Joshi S, Kanner A, Kirsch HE, Knowlton RC, Kossoff EH, Kuperman R, Kuzniecky R, Lowenstein DH, McGuire SM, Motika PV, Novotny EJ, Ottman R, Paolicchi JM, Parent JM, Park K, Poduri A, Scheffer IE, Shellhaas RA, Sherr EH, Shih JJ, Singh R, Sirven J, Smith MC, Sullivan J, Lin Thio L, Venkat A, Vining EP,

Von Allmen GK, Weisenberg JL, Widdess-Walsh P, Winawer MR. De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature*. 2013;501(7466):217-21.

Epilepsy Genetics Initiative. The Epilepsy Genetics Initiative: Systematic reanalysis of diagnostic exomes increases yield. *Epilepsia*. 2019;60(5):797-806.

Epilepsy Phenome/Genome Project Epi4K Consortium. Copy number variant analysis from exome data in 349 patients with epileptic encephalopathy. *Ann Neurol*. 2015;78(2):323-8.

Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Engel J Jr, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshé SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S. ILAE official report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014;55(4):475-82.

Fisher RS, Cross JH, D'Souza C, French JA, Haut SR, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, Lagae L, Moshé SL, Peltola J, Roulet Perez E, Scheffer IE, Schulze-Bonhage A, Somerville E, Sperling M, Yacubian EM, Zuberi SM. Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia*. 2017;58(4):531-42.

Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, Lagae L, Moshé SL, Peltola J, Roulet Perez E, Scheffer IE, Zuberi SM. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017;58(4):522-30.

Gertler TS, Calhoun J, Laux L. A single-center, retrospective analysis of genotype-phenotype correlations in children with Dravet syndrome. *Seizure*. 2020;75:1-6.

Girirajan S, Pizzo L, Moeschler J, Rosenfeld J. 16p12.2 Recurrent Deletion. 2015 Feb 26 In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Mirzaa GM, Amemiya A, editors. *GeneReviews® [Internet]*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022.

Gong P, Jiao X, Yu D, Yang Z. Case Report: Causative De novo Variants of KCNT2 for Developmental and Epileptic Encephalopathy. *Front Genet*. 2021;12:649556.

Gürsoy S, Erçal D. Diagnostic approach to genetic causes of early-onset epileptic encephalopathy. *J Child Neurol*. 2016;31(4):523-32.

Gururaj S, Palmer EE, Sheehan GD, Kandula T, Macintosh R, Ying K, Morris P, Tao J, Dias KR, Zhu Y, Dinger ME, Cowley MJ, Kirk EP, Roscioli T, Sachdev R, Duffey ME, Bye A, Bhattacharjee A. A De novo mutation in the sodium-activated potassium channel KCNT2 alters ion selectivity and causes epileptic encephalopathy. *Cell Rep* 2017;21(4):926-33.

Harper CB, Small C, Davenport EC, Low DW, Smillie KJ, Martínez-Mármol R, Meunier FA, Cousin MA. An epilepsy-associated SV2A mutation disrupts synaptotagmin-1 expression and activity-dependent trafficking. *J Neurosci*. 2020;40(23):4586-95.



Helbig I, Tayoun AA. Understanding genotypes and phenotypes in epileptic encephalopathies. *Mol Syndromol*. 2016;7(4):172-81.

Helbig I, Lowenstein DH. Genetics of the epilepsies: where are we and where are we going? *Curr Opin Neurol*. 2013;26(2):179-85.

Helbig KL, Farwell Hagman KD, Shinde DN, Mroske C, Powis Z, Li S, Tang S, Helbig I. Diagnostic exome sequencing provides a molecular diagnosis for a significant proportion of patients with epilepsy. *Genet Med*. 2016;18(9):898-905.

Hino-Fukuyo N, Haginoya K, Inuma K, Uematsu M, Tsuchiya S. Neuroepidemiology of West syndrome and early infantile epileptic encephalopathy in Miyagi Prefecture, Japan. *Epilepsy Res*. 2009 87(2-3):299-301.

Howell KB, Harvey AS, Archer JS. Epileptic encephalopathy: Use and misuse of a clinically and conceptually important concept. *Epilepsia*. 2016;57(3):343-7.

Howell KB, Freeman JL, Mackay MT, Fahey MC, Archer J, Berkovic SF, Chan E, Dabscheck G, Eggers S, Hayman M, Holberton J, Hunt RW, Jacobs SE, Kornberg AJ, Leventer RJ, Mandelstam S, McMahon JM, Mefford HC, Panetta J, Riseley J, Rodriguez-Casero V, Ryan MM, Schneider AL, Smith LJ, Stark Z, Wong F, Yiu EM, Scheffer IE, Harvey AS. The severe epilepsy syndromes of infancy: A population-based study. *Epilepsia*. 2021;62(2):358-70.

Hur YJ, Koh S, Millichap J, Nangia S, Jennings LJ, Nordli DR. Clinical and Electroencephalographic Characteristics of Infantile-Onset Epilepsies Caused by Genetic Mutations. *J Pediatr*. 2017;184:172-7.

Inuzuka LM, Macedo-Souza LI, Della-Ripa B, Cabral KSS, Monteiro F, Kitajima JP, de Souza Godoy LF, de Souza Delgado D, Kok F, Garzon E. Neurodevelopmental disorder associated with de novo SCN3A pathogenic variants: two new cases and review of the literature. *Brain Dev*. 2020;42(2):211-6.

Inuzuka LM, Macedo-Souza LI, Della-Rippa B, Monteiro FP, Delgado DS, Godoy LF, Ramos L, de Athayde Costa LS, Garzon E, Kok F. ATP6V1B2-related epileptic encephalopathy. *Epileptic Disord*. 2020;22(3):317-22.

Inuzuka LM, Macedo-Souza LI, Della-Ripa B, Monteiro FP, Ramos L, Kitajima JP, Garzon E, Kok F. Additional observation of a de novo pathogenic variant in KCNT2 leading to epileptic encephalopathy with clinical features of frontal lobe epilepsy. *Brain Dev*. 2020;42(9):691-5.

Inuzuka LM, Macedo-Souza LI, Guerra-Peixe M, Cobas Pedreira C, Della-Ripa B, Souza Delgado D, Monteiro F, Kitajima JP, Garzon E, Kok F. Parental germline mosaicism in SCN3A-related severe developmental disorder. *Brain Dev*. 2021;43(5):669-70.

Inuzuka LM, Guerra-Peixe M, Macedo-Souza LI, Pedreira CC, Gurgel-Giannetti J, Monteiro FP, Ramos L, Costa LA, Crippa ACS, Lourenco CM, Pachito DV, Sukys-Claudino L, Gaspar LS, Antoniuk SA, Dutra LPS, Diniz SSL, Pires RB, Garzon E,

Kok F. MECP2-related conditions in males: A systematic literature review and 8 additional cases. *Eur J Paediatr Neurol*. 2021;34:7-13.

Jackson A, Banka S, Stewart H; Genomics England Research Consortium, Robinson H, Lovell S, Clayton-Smith J. Recurrent KCNT2 missense variants affecting p.Arg190 result in a recognizable phenotype. *Am J Med Genet A*. 2021;185(10):3083-91.

Jain P, Andrade D, Donner E, Dymant D, Prasad AN, Goobie S, Boycott K, Lines M, Snead OC. Development of criteria for epilepsy genetic testing in Ontario, Canada. *Can J Neurol Sci*. 2019;46(1):7-13.

Johannessen Landmark C, Potschka H, Auvin S, Wilmshurst JM, Johannessen SI, Kasteleijn-Nolst Trenité D, Wirrell EC. The role of new medical treatments for the management of developmental and epileptic encephalopathies: Novel concepts and results. *Epilepsia*. 2021;62(4):857-73.

Kearney JA. Epi4K Phase I: gene discovery in epileptic encephalopathies by exome sequencing. *Epilepsy Curr*. 2014;14(4):208-10.

Khan S, Al Baradie R. Epileptic encephalopathies: an overview. *Epilepsy Res Treat*. 2012;2012:403592.

Klößner C, Sticht H, Zacher P, Popp B, Babcock HE, Bakker DP, Barwick K, Bonfert MV, Bönnemann CG, Brilstra EH; Care4Rare Canada Consortium, Chung WK, Clarke AJ, Devine P, Donkervoort S, Fraser JL, Friedman J, Gates A, Ghoumid J, Hobson E, Horvath G, Keller-Ramey J, Keren B, Kurian MA, Lee V, Leppig KA, Lundgren J, McDonald MT, McLaughlin HM, McTague A, Mefford HC, Mignot C, Mikati MA, Nava C, Raymond FL, Sampson JR, Sanchis-Juan A, Shashi V, Shieh JTC, Shinawi M, Slavotinek A, Stöberg T, Stong N, Sullivan JA, Taylor AC, Toler TL, van den Boogaard MJ, van der Crabben SN, van Gassen KLI, van Jaarsveld RH, Van Ziffle J, Wadley AF, Wagner M, Wigby K, Wortmann SB, Zarate YA, Møller RS, Lemke JR, Platzer K. De novo variants in SNAP25 cause an early-onset developmental and epileptic encephalopathy. *Genet Med*. 2021;23(4):653-60.

Ko A, Youn SE, Kim SH, Lee JS, Kim S, Choi JR, Kim HD, Lee ST, Kang HC. Targeted gene panel and genotype-phenotype correlation in children with developmental and epileptic encephalopathy. *Epilepsy Res*. 2018;141(1):48-55.

Koeleman BPC. Genetics of common forms of epilepsy. *Lancet Neurol*. 2017;16(2):101-2.

Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med*. 2000;342(5):314-9.

Lindy AS, Stosser MB, Butler E, Downtain-Pickersgill C, Shanmugham A, Retterer K, Brandt T, Richard G, McKnight DA. Diagnostic outcomes for genetic testing of 70 genes in 8565 patients with epilepsy and neurodevelopmental disorders. *Epilepsia*. 2018;59(5):1062-71.

- Liu Z, Li Z, Zhi X, Du Y, Lin Z, Wu J. Identification of De Novo DNMT3A mutations that cause west syndrome by using whole-exome sequencing. *Mol Neurobiol*. 2018;55(3):2483-93.
- Lindy AS, Stosser MB, Butler E, Downtain-Pickersgill C, Shanmugham A, Retterer K, et al. Diagnostic outcomes for genetic testing of 70 genes in 8565 patients with epilepsy and neurodevelopmental disorders. *Epilepsia*. 2018;59(5):1062–71.
- Liu Z, Li Z, Zhi X, Du Y, Lin Z, Wu J. Identification of De Novo DNMT3A Mutations That Cause West Syndrome by Using Whole-Exome Sequencing. *Mol Neurobiol*. 2018;55(3):2483-93.
- Mao X, Bruneau N, Gao Q, Becq H, Jia Z, Xi H, Shu L, Wang H, Szepetowski P, Aniksztejn L. The Epilepsy of Infancy With Migrating Focal Seizures: Identification of de novo Mutations of the KCNT2 Gene That Exert Inhibitory Effects on the Corresponding Heteromeric KNa1.1/KNa1.2 Potassium Channel. *Front Cell Neurosci*. 2020;24;14:1.
- McTague A, Howell KB, Cross JH, Kurian MA, Scheffer IE. The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *Lancet Neurol*. 2016;15(3):304–16.
- Mefford HC, Yendle SC, Hsu C, Cook J, Geraghty E, McMahon JM, Eeg-Olofsson O, Sadleir LG, Gill D, Ben-Zeev B, Lerman-Sagie T, Mackay M, Freeman JL, Andermann E, Pelakanos JT, Andrews I, Wallace G, Eichler EE, Berkovic SF, Scheffer IE. Rare copy number variants are an important cause of epileptic encephalopathies. *Ann Neurol*. 2011;70(6):974-85.
- Mei D, Cetica V, Marini C, Guerrini R. Dravet syndrome as part of the clinical and genetic spectrum of sodium channel epilepsies and encephalopathies. *Epilepsia*. 2019;60 Suppl 3:S2-S7.
- Menezes LFS, Sabiá Júnior EF, Tibery DV, Carneiro LDA, Schwartz EF. Epilepsy-Related Voltage-Gated Sodium Channelopathies: A Review. *Front Pharmacol*. 2020; 18;11:1276.
- Miyatake S, Kato M, Sawaishi Y, Saito T, Nakashima M, Mizuguchi T, et al. Recurrent SCN3A p.Ile875Thr variant in patients with polymicrogyria. *Ann Neurol*. 2018;84(1):159–61.
- Møller RS, Hammer TB, Rubboli G, Lemke JR, Johannesen KM. From next-generation sequencing to targeted treatment of non-acquired epilepsies. *Expert Rev Mol Diagn*. 2019;19(3):217-28.
- Morrison-Levy N, Borlot F, Jain P, Whitney R. Early-onset developmental and epileptic encephalopathies of infancy: an overview of the genetic basis and clinical features. *Pediatr Neurol*. 2021;116:85–94.
- Myers KA, Johnstone DL, Dyment DA. Epilepsy genetics: Current knowledge, applications, and future directions. *Clin Genet*. 2019;95(1):95-111

Myers CT, Hollingsworth G, Muir AM, Schneider AL, Thuesmann Z, Knupp A, King C, Lacroix A, Mehaffey MG, Berkovic SF, Carvill GL, Sadleir LG, Scheffer IE, Mefford HC. Parental mosaicism in "De Novo" epileptic encephalopathies. *N Engl J Med*. 2018;378(17):1646-8.

Nakashima M, Kato M, Aoto K, Shiina M, Belal H, Mukaida S, Kumada S, Sato A, Zerem A, Lerman-Sagie T, Lev D, Leong HY, Tsurusaki Y, Mizuguchi T, Miyatake S, Miyake N, Ogata K, Saitsu H, Matsumoto N. De novo hotspot variants in CYFIP2 cause early-onset epileptic encephalopathy. *Ann Neurol*. 2018;83(4):794-806.

Neul JL, Benke TA, Marsh ED, Skinner SA, Merritt J, Lieberman DN, Standridge S, Feyma T, Heydemann P, Peters S, Ryther R, Jones M, Suter B, Kaufmann WE, Glaze DG, Percy AK. The array of clinical phenotypes of males with mutations in Methyl-CpG binding protein 2. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet*. 2019;180(1):55-67.

Niday Z, Tzingounis AV. Potassium Channel Gain of Function in Epilepsy: An Unresolved Paradox. *Neuroscientist*. 2018;24(4):368-380

Ng PC, Levy S, Huang J, Stockwell TB, Walenz BP, Li K, Axelrod N, Busam DA, Strausberg RL, Venter JC. Genetic variation in an individual human exome. *PLoS Genet*. 2008;15;4(8):e1000160

Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigham AW, Tabor HK, Dent KM, Huff CD, Shannon PT, Jabs EW, Nickerson DA, Shendure J, Bamshad MJ. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet*. 2010;42(1):30-5.

Nguyen TTM, Murakami Y, Sheridan E, Ehresmann S, Rousseau J, St-Denis A, Chai G, Ajeawung NF, Fairbrother L, Reimschisel T, Bateman A, Berry-Kravis E, Xia F, Tardif J, Parry DA, Logan CV, Diggle C, Bennett CP, Hattingh L, Rosenfeld JA, Perry MS, Parker MJ, Le Deist F, Zaki MS, Ignatius E, Isohanni P, Lönnqvist T, Carroll CJ, Johnson CA, Gleeson JG, Kinoshita T, Campeau PM. Mutations in GPAA1, encoding a GPI transamidase complex protein, cause developmental delay, epilepsy, cerebellar atrophy, and osteopenia. *Am J Hum Genet*. 2017;101(5):856-65.

Noh GJ, Jane Tavyev Asher Y, Graham JM Jr. Clinical review of genetic epileptic encephalopathies. *Eur J Med Genet*. 2012;55(5):281-98

Noronha ALA, Borges MA, Marques LHN, Zanetta DMT, Fernandes PT, de Boer H, Espíndola J, Miranda CT, Prilipko L, Bell GS, Sander JW, Li LM. Prevalence and pattern of epilepsy treatment in different socioeconomic classes in Brazil. *Epilepsia*. 2007;48(5):880-5.

Oguni H, Otsuki T, Kobayashi K, Inoue Y, Watanabe E, Sugai K, Takahashi A, Hirose S, Kameyama S, Yamamoto H, Hamano S, Baba K, Baba H, Hong SC, Kim HD, Kang HC, Luan G, Wong TT. Clinical analysis of catastrophic epilepsy in infancy and early childhood: Results of the Far-East Asia Catastrophic Epilepsy (FACE) study group. *Brain Dev*. 2013;35(8):786-92.

Olson H, Shen Y, Avallone J, Sheidley BR, Pinsky R, Bergin AM, Berry GT, Duffy FH, Eksioglu Y, Harris DJ, Hisama FM, Ho E, Irons M, Jacobsen CM, James P, Kothare S, Khwaja O, Lipton J, Loddenkemper T, Markowitz J, Maski K, Megerian JT, Neilan E, Raffalli PC, Robbins M, Roberts A, Roe E, Rollins C, Sahin M, Sarco D, Schonwald A, Smith SE, Soul J, Stoler JM, Takeoka M, Tan WH, Torres AR, Tsai P, Urion DK, Weissman L, Wolff R, Wu BL, Miller DT, Poduri A. Copy number variation plays an important role in clinical epilepsy. *Ann Neurol*. 2014;75(6):943-58.

Palmer EE, Schofield D, Shrestha R, Kandula T, Macintosh R, Lawson JA, Andrews I, Sampaio H, Johnson AM, Farrar MA, Cardamone M, Mowat D, Elakis G, Lo W, Zhu Y, Ying K, Morris P, Tao J, Dias KR, Buckley M, Dinger ME, Cowley MJ, Roscioli T, Kirk EP, Bye A, Sachdev RK. Integrating exome sequencing into a diagnostic pathway for epileptic encephalopathy: Evidence of clinical utility and cost effectiveness. *Mol Genet Genomic Med*. 2018;6(2):186-199.

Pedroso JL, França Jr. MC, Camargos ST, Barsottini OGP, Kok D. Neurogenética na Prática Clínica. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2019.

Reif PS, Tsai MH, Helbig I, Rosenow F, Klein KM. Precision medicine in genetic epilepsies: break of dawn? *Expert Rev Neurother*. 2017;17(4):381-92.

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-24.

Rochtus A, Olson HE, Smith L, Keith LG, El Achkar C, Taylor A, Mahida S, Park M, Kelly M, Shain C, Rockowitz S, Rosen Sheidley B, Poduri A. Genetic diagnoses in epilepsy: The impact of dynamic exome analysis in a pediatric cohort. *Epilepsia*. 2020;61(2):249-58.

Sampaio LPB, Caboclo LOSF, Kuramoto K, Reche Â, Yacubian EMT, Manreza MLG. Prevalence of epilepsy in children from a brazilian area of high deprivation. *Pediatr Neurol*. 2010;42(2):111-7.

Sánchez Fernández I, Loddenkemper T, Gáinza-Lein M, Sheidley BR, Poduri A. Diagnostic yield of genetic tests in epilepsy: A meta-analysis and cost-effectiveness study. *Neurology*. 2019;92(5):e418-28.

Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, Hirsch E, Jain S, Mathern GW, Moshé SL, Nordli DR, Perucca E, Tomson T, Wiebe S, Zhang YH, Zuberi SM. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017;58(4):512-21.

Scheffer IE, Liao J. Deciphering the concepts behind “Epileptic encephalopathy” and “Developmental and epileptic encephalopathy.” *Eur J Paediatr Neurol.* 2020;24:11–4.

Smith RS, Walsh CA. Ion Channel functions in early brain development. *Trends Neurosci.* 2020;43(2):103–14.

Snoeijen-Schouwenaars FM, van Ool JS, Verhoeven JS, van Mierlo P, Braakman HMH, Smeets EE, Nicolai J, Schoots J, Teunissen MWA, Rouhl RPW, Tan IY, Yntema HG, Brunner HG, Pfundt R, Stegmann AP, Kamsteeg EJ, Schelhaas HJ, Willemsen MH. Diagnostic exome sequencing in 100 consecutive patients with both epilepsy and intellectual disability. *Epilepsia.* 2019;60(1):155-64

Strachan, T.; Read, A. P. *Genética molecular humana*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013

Straub J, Konrad EDH, Grüner J, Toutain A, Bok LA, Cho MT, Crawford HP, Dubbs H, Douglas G, Jobling R, Johnson D, Krock B, Mikati MA, Nesbitt A, Nicolai J, Phillips M, Poduri A, Ortiz-Gonzalez XR, Powis Z, Santani A, Smith L, Stegmann APA, Stumpel C, Vreeburg M; Deciphering Developmental Disorders Study, Fliedner A, Gregor A, Sticht H, Zweier C. Missense variants in RHOBTB2 cause a developmental and epileptic encephalopathy in humans, and altered levels cause neurological defects in drosophila. *Am J Hum Genet.* 2018;102(1):44-57.

Striano P, Minassian BA. From Genetic Testing to Precision Medicine in Epilepsy. *Neurotherapeutics.* 2020;17(2):609-15

Symonds JD, McTague A. Epilepsy and developmental disorders: Next generation sequencing in the clinic. *Eur J Paediatr Neurol.* 2020;24:15–23.

Thorvaldssdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform.* 2013;14(2):178–92.

Wang J, Wen Y, Zhang Q, Yu S, Chen Y, Wu X, Zhang Y, Bao X. Gene mutational analysis in a cohort of Chinese children with unexplained epilepsy: Identification of a new KCND3 phenotype and novel genes causing Dravet syndrome. *Seizure.* 2019 Mar;66:26-30.

Wirrell EC, Nabbout R, Scheffer IE, Alsaadi T, Bogacz A, French JA, Hirsch E, Jain S, Kaneko S, Riney K, Samia P, Snead OC, Somerville E, Specchio N, Trinkka E, Zuberi SM, Balestrini S, Wiebe S, Cross JH, Perucca E, Moshé SL, Tinuper P. Methodology for classification and definition of epilepsy syndromes with list of syndromes: Report of the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia.* 2022 Jun;63(6):1333-1348.

Wong-Kisiel LC, Nickels K. Electroencephalogram of age-dependent epileptic encephalopathies in infancy and early childhood. *Epilepsy Res Treat.* 2013;2013:1–18.

Wohler E, Martin R, Griffith S, Rodrigues EDS, Antonescu C, Posey JE, Coban-Akdemir Z, Jhangiani SN, Doheny KF, Lupski JR, Valle D, Hamosh A, Sobreira N. PhenoDB, GeneMatcher and VariantMatcher, tools for analysis and sharing of sequence data. *Orphanet J Rare Dis.* 2021;18;16(1):365.

Zaman T, Helbig I, Božović IB, DeBrosse SD, Bergqvist AC, Wallis K, Medne L, Maver A, Peterlin B, Helbig KL, Zhang X, Goldberg EM. Mutations in SCN3A cause early infantile epileptic encephalopathy. *Ann Neurol.* 2018;83(4):703-17. Erratum in: *Ann Neurol.* 2019;85(6):948.

Zuberi SM, Wirrell E, Yozawitz E, Wilmshurst JM, Specchio N, Riney K, Pressler R, Auvin S, Samia P, Hirsch E, Galicchio S, Triki C, Snead OC, Wiebe S, Cross JH, Tinuper P, Scheffer IE, Perucca E, Moshé SL, Nabbout R. ILAE classification and definition of epilepsy syndromes with onset in neonates and infants: Position statement by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia.* 2022;63(6):1349-1397.

Yang L, Kong Y, Dong X, Hu L, Lin Y, Chen X, Ni Q, Lu Y, Wu B, Wang H, Lu QR, Zhou W. Clinical and genetic spectrum of a large cohort of children with epilepsy in China. *Genet Med.* 2019;21(3):564-71.

## **Apêndices**

---



**Apêndice A – Aprovação da Comissão de Ética para Análise de  
Projetos de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de  
São Paulo**



**APROVAÇÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **17/09/2014**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **203/14** intitulado: “ANÁLISE CLÍNICA, NEUROFISIOLOGICA E GENÉTICA DAS ENCEFALOPATIAS EPILEPTICAS DE INICIO PRECOCE” apresentado pelo **Departamento de NEUROLOGIA**

**Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12).**

**Pesquisador (a) Responsável: Prof.Dr. Fernando Kok**

**Pesquisador (a) Executante: Luciana Midori Inuzuka Nakaharada**

**CEP-FMUSP, 17 de Setembro de 2014.**

**Prof. Dr. Roger Chammas  
Coordenador  
Comitê de Ética em Pesquisa**

## Apêndice B – Aprovação do Comitê de Ética de Pesquisa da Sociedade Beneficente de Senhoras do Hospital Sírio Libanês



**INSTITUTO SÍRIO-LIBANÊS  
DE ENSINO E PESQUISA**

DIRETORIA DE PESQUISA  
HOSPITAL SÍRIO-LIBANÊS

Registro AVAP: **LMIN149**

Pesquisador Principal: **Fernando Kok**

Ref: **"ANÁLISE CLÍNICA, NEUROFISIOLÓGICA E GENÉTICA DAS  
ENCEFALOPATIAS EPILEPTICAS DE INICIO PRECOCE."**

Prezado pesquisador,

A Diretoria de Pesquisa da Sociedade Beneficente de Senhoras do Hospital Sírio-Libanês analisou e **APROVOU** os documentos citados abaixo, bem como as declarações referentes ao protocolo de pesquisa supracitado em 26 de Novembro de 2013:

- Protocolo de pesquisa;
- Orçamento detalhado do projeto;
- Equipe envolvida.

São Paulo, 26 de Novembro de 2013.

Central de Apoio ao Pesquisador  
Hospital Sírio-Libanês



**Apêndice C – Termo de consentimento livre e esclarecido****HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO E HOSPITAL SÍRIO LIBANÊS****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL****1. NOME DO PACIENTE:**.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : .....

SEXO : M F DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO .....

BAIRRO: .....CIDADE .....CEP:.....

TELEFONE: (.....) .....

**2. RESPONSÁVEL LEGAL** .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : .....

SEXO: M F DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO .....

BAIRRO: .....CIDADE .....CEP:..... TELEFONE: (.....) .....

**ANÁLISE CLÍNICA, NEUROFISIOLÓGICA E GENÉTICA DE PACIENTES COM  
ENCEFALOPATIA EPILÉPTICA DE INÍCIO PRECOCE**

PESQUISADOR: Luciana Midori Inuzuka Nakaharada

CARGO/FUNÇÃO: Médica INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº: CRM 90419

AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO X RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

DURAÇÃO DA PESQUISA: 4 anos.

O objetivo desta pesquisa é avaliar retrospectivamente os dados clínicos, neurofisiológicos, genéticos e de neuroimagem de pacientes com encefalopatia epiléptica, que realizaram o teste do exoma ou painel genético das epilepsias.

O voluntário tem liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. Os dados deste estudo

são confidenciais, sigilosos e privados; e serão utilizados apenas para a pesquisa. Em caso de intercorrências, entre em contato com a Dra. Luciana Midori Inuzuka Nakaharada, na Rua Adma Jafet, 91 Bela Vista. Telefone: 3394-1404 e 98101-3063

Acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações que li ou foram lidas para mim. Discuti com os pesquisadores sobre a decisão de participação do (a) menor neste estudo e, ficaram claros os propósitos do mesmo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimento permanente. Ficou claro também que a participação é isenta de despesas e que também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Caso haja qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Concordo voluntariamente que o (a) menor participe deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Declaro que obtive de forma apropriada, livre e voluntária as informações necessárias e concordo com a participação do (a) menor assinando o presente termo de consentimento livre e esclarecido.

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ .

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Sujeito da Pesquisa ou Responsável Legal



Assinatura do Pesquisador – Luciana Midori Inuzuka Nakaharada – CRM 90419

## Apêndice D – Termo de consentimento livre e esclarecido



Termo de consentimento livre e esclarecido

ESTE TESTE É DE RESPONSABILIDADE DA MENDELICS ANÁLISE GENÔMICA S.A., CNPJ 15.519.353/0001-70, REGISTRO DO CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA DO ESTADO DE SÃO PAULO NÚMERO 955.471. MÉDICO RESPONSÁVEL: PROF. DR. FERNANDO KOK, CRM-SP 32.255.

- 1. Qual a finalidade do exame?** O exame tem como objetivo responder a uma pergunta clínica e atenderá à requisição do médico solicitante. As informações contidas no laudo serão necessariamente combinadas com a história clínica, exame físico e/ou outros exames diagnósticos na definição do diagnóstico e conduta médica.
- 2. Todas as variantes genéticas identificadas serão relatadas?** O genoma de cada pessoa possui milhões de variantes genéticas. Contudo, a maioria destas variantes não é relacionada a uma doença, não tem até o momento relevância definida ou está associada a uma doença sem relação com a pergunta médica. A critério da equipe médica da Mendelics variantes de significado incerto poderão ser incluídas no laudo. O paciente e/ou o médico também poderão receber, caso solicitem, uma cópia do arquivo contendo a lista de todas as variantes reveladas pelo sequenciamento. Este arquivo não conterá informações sobre a interpretação das variantes identificadas, porém poderá ser usado para tal fim no futuro. A critério da equipe médica da Mendelics a análise poderá ser expandida para genes potencialmente pertinentes à requisição do médico solicitante sempre que isso implique em custo adicional.
- 3. Quais são as limitações deste exame?** As técnicas de análise genômica são recentes e estão sujeitas a ajustes periódicos para aumentar a acurácia do exame. Além disso, o significado clínico das variantes é constantemente atualizado acompanhando o avanço do conhecimento científico. Todos os anos são publicadas centenas de novas descobertas sobre a relação dos genes com a saúde e a doença. Em alguns casos, interpretações podem mudar com novas descobertas científicas e portanto os resultados não devem ser tratados como imutáveis. As técnicas atuais de análise genômica cobrem entre 95 e 99% das sequências de interesse. É possível que uma análise não identifique a causa da doença investigada. Mediante solicitação médica, uma nova análise pode ser realizada pela Mendelics. A Mendelics poderá cobrar, a seu critério, por esta reanálise ou outra análise não relacionada à pergunta inicial. Outra informação possivelmente indesejada é a rara identificação de não-paternidade. Não relatamos este achado, exceto quando diretamente pertinente à solicitação médica. Os parentes mais próximos do paciente compartilham informações genéticas e esta análise poderá revelá-las.
- 4. Quem receberá o resultado dos exames?** O médico solicitante e o paciente receberão o laudo em forma digital. O médico solicitante será responsável por apresentar o resultado ao paciente ou seu responsável legal. O seguimento e conduta do caso são de exclusiva responsabilidade do médico solicitante e não poderão ser feitos pela equipe médica da Mendelics.
- 5. Como o DNA será guardado e usado?** As amostras de DNA que serão utilizadas não contêm identificadores pessoais, somente um código alfanumérico. A amostra biológica será utilizada somente para o teste solicitado e/ou testes confirmatórios. Para a realização de novos testes, é obrigatória a obtenção de novo consentimento escrito do paciente ou responsável legal. O laboratório não é um serviço de armazenamento de material biológico e a amostra de DNA pode não estar disponível ou não preencher critérios de qualidade para novos estudos no futuro.
- 6. Como minha informação genética será guardada e usada?** Os arquivos digitais não contêm identificadores pessoais. Os dados genéticos podem ser ligados ao paciente somente pela equipe médica responsável por sua execução. Os resultados deste exame são confidenciais. Eles poderão ser liberados para terceiros apenas mediante o consentimento escrito do paciente ou de seu responsável legal. Nos comprometemos a armazenar o arquivo digital de variantes (VCF) por no mínimo 2 (dois) anos a partir da data do exame. Novas análises genéticas poderão ser eventualmente feitas usando este arquivo digital levando-se em conta os limites das técnicas atuais. O resultado poderá continuar a ser estudado de forma completamente anônima (isto é, com remoção irreversível de todos os identificadores pessoais) em pesquisas genéticas ou de bioinformática, para melhoria de processos e produtos, tanto pela Mendelics como por instituições colaboradoras. Não haverá possibilidade das informações geradas por estas análises serem disponibilizadas ao paciente, uma vez que os identificadores pessoais da amostra serão apagados. Da mesma forma, o paciente não poderá ser recompensado financeiramente pelo uso de sua sequência nestas pesquisas e não tem direito a quaisquer produtos gerados por estas análises. Os resultados destas análises poderão ser publicados em revistas médicas e científicas e depositados em bancos públicos de variantes genéticas, para contribuir com o avanço do conhecimento médico e da ciência e beneficiar outras pessoas com a mesma doença.

DATA:	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	PREENCHIMENTO OBRIGATÓRIO
NOME DO PACIENTE:	<input type="text"/>	PREENCHIMENTO OBRIGATÓRIO
ASSINATURA DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL:	<input type="text"/>	PREENCHIMENTO OBRIGATÓRIO
E-MAIL DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL:	<input type="text"/>	

**Apêndice E – Endereços eletrônicos dos artigos científicos relacionados a esta tese publicados em revistas indexadas**

ATP6V1B2-related epileptic encephalopathy.

**Inuzuka LM**, Macedo-Souza LI, Della-Rippa B, Monteiro FP, Delgado DS, Godoy LF, Ramos L, de Athayde Costa LS, Garzon E, Kok F. *Epileptic Disord.* 2020 Jun 1;22(3):317-322. doi: 10.1684/epd.2020.1166.PMID: 32597767

Parental germline mosaicism in SCN3A-related severe developmental disorder.

**Inuzuka LM**, Macedo-Souza LI, Guerra-Peixe M, Cobas Pedreira C, Della-Ripa B, Souza Delgado D, Monteiro F, Kitajima JP, Garzon E, Kok F. *Brain Dev.* 2021 May;43(5):669-670. doi: 10.1016/j.braindev.2020.12.013. Epub 2021 Jan 22.PMID: 33494954 No abstract available.

MECP2-related conditions in males: A systematic literature review and 8 additional cases.

**Inuzuka LM**, Guerra-Peixe M, Macedo-Souza LI, Pedreira CC, Gurgel-Giannetti J, Monteiro FP, Ramos L, Costa LA, Crippa ACS, Lourenco CM, Pachito DV, Sukys-Claudino L, Gaspar LS, Antoniuk SA, Dutra LPS, Diniz SSL, Pires RB, Garzon E, Kok F. *Eur J Paediatr Neurol.* 2021 Sep;34:7-13. doi: 10.1016/j.ejpn.2021.05.013. Epub 2021 Jun 21.PMID: 34271245

Corrigendum to "Neurodevelopmental disorder associated with de novo SCN3A pathogenic variants: Two new cases and review of the literature" [*Brain Dev.* 42(2) (2020) 211-216].

**Inuzuka LM**, Macedo-Souza LI, Della-Ripa B, Cabral KSS, Monteiro F, Kitajima JP, de Souza Godoy LF, de Souza Delgado D, Kok F, Garzon E. *Brain Dev.* 2021 May;43(5):671. doi: 10.1016/j.braindev.2021.01.005. Epub 2021 Feb 16.PMID: 33608194 No abstract available.

Additional observation of a de novo pathogenic variant in KCNT2 leading to epileptic encephalopathy with clinical features of frontal lobe epilepsy.

**Inuzuka LM**, Macedo-Souza LI, Della-Ripa B, Monteiro FP, Ramos L, Kitajima JP, Garzon E, Kok F. *Brain Dev.* 2020 Oct;42(9):691-695. doi: 10.1016/j.braindev.2020.05.003. Epub 2020 Aug 7.PMID: 32773162

Neurodevelopmental disorder associated with de novo SCN3A pathogenic variants: two new cases and review of the literature.

**Inuzuka LM**, Macedo-Souza LI, Della-Ripa B, Cabral KSS, Monteiro F, Kitajima JP, de Souza Godoy LF, de Souza Delgado D, Kok F, Garzon E. *Brain Dev.* 2020 Feb;42(2):211-216. doi: 10.1016/j.braindev.2019.09.004. Epub 2019 Oct 31.PMID: 31677917 Review.

## Apêndice F – Critérios diagnósticos para DEE segundo ILAE(2022)

Critérios diagnósticos para DEE início precoce (DEEIP) segundo ILAE (2022) e adaptado a partir de Zuberi, et al., 2022

	Mandatário	Alertas	Exclusão
Crises epiléticas	Tônicas e/ou mioclônicas		
EEG	Surto supressão ou descargas multifocais alentecimento difuso		
Idade de Início	Nascimento até 3 meses (ajustado para prematuridade)		
DNPM no início		DNPM normal no início, embora o conhecimento que pode mudar com uma boa acurácia na história	
EN no início		EN normal, embora sabe-se que pode ser desafiador acessar historicamente em criança que teve crises muitos FAC	
Comorbidades precoces	ADNPM é presente antes ou logo após o início das crises		
Curso da doença	ADNPM incluindo DI		

### RM ou EEG ictal são importantes para o diagnóstico?

A RM não é fundamental para o diagnóstico, mas é extremamente recomendada para excluir causas estruturais. O EEG ictal não é fundamental, visto que as características clínicas e do EEG são de surto-supressão, descargas multifocais, alentecimento difuso.

**Síndromes sem confirmação laboratorial:** Em locais com poucos recursos, esta síndrome não pode ser diagnosticada sem um EEG interictal.

Legenda: ADNPM: Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor; DI: deficiência intelectual; DEEIP: Encefalopatia epilética e do desenvolvimento de início precoce; DNPM: desenvolvimento neuropsicomotor; EN: exame neurológico; EEG: eletroencefalograma; FAC: fármaco anti- crise; RM: ressonância magnética

Critérios diagnósticos para epilepsia da infância com crises focais migratórias (EICFM) segundo ILAE (2022) e adaptado a partir de Zuberi, et al., 2022

	<b>Mandatário</b>	<b>Alertas</b>	<b>Exclusão</b>
Crises epilépticas	Crises focais/multifocais ou crises clônicas sem ou com parada comportamental e sintomas autonômicos Crises migrando de um hemisfério ou outro para outra clínica Frequência de crise rapidamente aumenta nas primeiras uma ou meses, frequentemente para SE		Crises mioclônicas
Idade de Início	< 12 meses	Início de 6-12 meses	
EEG	EEG ictal mostra um padrão migrando de um lado para outro (por isso que EEG ictal registra um padrão migratório (pode ser dispensado se oVEEG não é feito). Interictal: descargas multifocais	Interictal: padrão de surto-supressão anterior a medicação Foco epileptiformes único no EEG Hipsarritmia	
Neuroimagem			RM anormal com lesão estrutural como causa
Comorbidades	Alentecimento do desenvolvimento após o início dos espasmos epilépticos		
Curso da doença	Atraso de desenvolvimento	Livre de crises Atrofia cortical	

**RM ou EEG ictal são importantes para o diagnóstico?**

A RM não é fundamental para o diagnóstico, mas é extremamente recomendada para excluir causas estruturais. O EEG ictal não é fundamental, visto que as características clínicas e do EEG são de surto-supressão, descargas multifocais, alentecimento difuso.

Síndrome sem confirmação laboratorial: somente se regiões de recursos limitado a EICFM pode ser diagnosticada ou crises migratórias sem EEG ou RM, associado com outros critérios clínicos mandatórios ou sem os critérios de exclusão.

Legenda: ADNPM: Atraso no DNPM; DI: deficiência intelectual; EICFM: Epilepsia infantil com crises focais migratórias; EN: exame neurológico; EEG: eletroencefalograma; RM: ressonância magnética



Critérios diagnósticos para Síndrome com Espasmos Epilépticos Infantís (SEEI), segundo ILAE (2022) e adaptado a partir de Zuberi, et al., 2022

	<b>Mandatório</b>	<b>Alertas</b>	<b>Exclusão</b>
Crises epilépticas	Agrupamento de espasmos epilépticos de flexão, extensão ou misto		
EEG	Tanto híparrítmia, descargas multifocais ou focais	EEG interictal normal Padrão de surto-supressão no EEG	EEG normal durante o registro clínico de suspeita de espasmos
Idade de Início	1-24 meses (tanto espasmos epilépticos podem iniciar mais tarde)		
Comorbidades	Desenvolvimento anormal durante o início dos espasmos		

**RM ou EEG ictal são importantes para o diagnóstico?**

A RM não é fundamental para o diagnóstico, mas é extremamente recomendada para excluir causas estruturais. O EEG ictal não é fundamental, visto que as características clínicas e do EEG são de surto-supressão, descargas multifocais, alentecimento difuso.

**Síndromes sem confirmação laboratorial:** Em locais como poucos recursos, esta síndrome não pode ser bem diagnosticada sem um EEG interictal.

Legenda: ADNPM: Atraso no DNPM; desenvolvimento neuropsicomotor; DI: deficiência intelectual; EN: exame neurológico; EEG - eletroencefalograma RM – ressonância magnética; SEEI: Síndrome com Espasmos Epilépticos Infantís

Critérios diagnósticos para Síndrome de Dravet (SD) segundo ILAE e adaptado a partir de Zuberi, et al., 2022

	Mandatário	Alertas	Exclusão
Crises epilépticas	- Crises focais clônicas (hemiclônicas recorrentes), febris e afebris, frequentemente (que alternam de lado a cada crise), crises focais para CTCB ou crises clônicas generalizadas	- Nenhuma história de crises prolongadas (> 10 min) - Falta de sensibilidade à febre como um fator desencadeante de crises	- Espasmos epilépticos - DEEIP pelo <i>SCN1A</i>
Idade de início crises epilépticas	1 a 20 meses	1 a 2 meses ou 15 a 20 meses	
Comorbidades	ADNPM após o início dos espasmos		
Neuroimagem			RM mostrando uma lesão focal
Outros testes genéticos		Ausência de <i>SCN1A</i> ou outra variante patogênica como causa	
Curso da doença	Epilepsia FR; ADNPM	Boa eficácia com FAC bloqueadores de canal de sódio, incluindo carbamazepina, oxcarbazepina e fenitoína	

**RM ou EEG ictal são importantes para o diagnóstico?**

A RM não é fundamental para o diagnóstico, mas é extremamente recomendada para excluir causas estruturais. O EEG ictal não é fundamental

Possível síndrome evolutiva: Em uma criança <12 meses que se apresenta com uma hemiclônica prolongada ou tônico-clônica bilateral, crise febris, e nenhuma outra causa subjacente, a possibilidade da SD deve ser considerada. Outras crises, muitas vezes com febre, e se prolongadas ou hemiclônicas permitiria um diagnóstico mais definitivo da SD. O diagnóstico seria ainda mais provável pela presença de uma variante patogênica do *SCN1A*

SD sem confirmação laboratorial: somente em regiões com recursos limitados, SD pode ser diagnosticado em crianças sem sinais de alerta que preencheu todos os outros critérios clínicos mandatórios ou de exclusão, sem EEG, RM e teste genético.

Legenda: ADNPM: Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor; CTCB: crise tônico-clônica bilateral; DEEIP: Encefalopatia Epiléptica e do Desenvolvimento de Início Precoce; DI: deficiência intelectual; EEG: eletroencefalograma EN: exame neurológico; FAC: fármaco anticrise; RM: ressonância magnética; SD: Síndrome de Dravet

Critérios diagnósticos de DEE-*KCNQ2* segundo ILAE, 2021 e adaptado a partir de Zuberi et al., 2022

	<b>Mandatário</b>	<b>Alertas</b>	<b>Exclusão</b>
Crises epiléticas	Tônicas, mioclônicas e/ou crises focais		
EEG	Surto-supressão ou descargas multifocais; alentecimento difuso.		
Idade de início	< 3 meses	Início entre a primeira semana de vida (corrigir pela idade gestacional).	
Exame neurológico		Exame neurológico normal	
Comorbidades	Encefalopatia e ADNPM é aparente no início das crises		
Outros testes	Variante patogênica no <i>KCNQ2</i>		
Curso da doença	ADNPM moderado a grave		

**RM ou EEG são importantes para o diagnóstico?**

A RM não é critério para o diagnóstico porém é extremamente recomendada para excluir outras causas. O EEG interictal não é critério para o diagnóstico.

**Síndromes sem confirmação laboratorial:**

Em regiões com recursos limitados, *KCNQ2*-DEE não pode ser diagnosticada sem o teste genético

Legenda: ADNPM: Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor; EEG: eletroencefalograma; RM:ressonância magnética

Critérios diagnósticos para *PCDH19* - Epilepsia em agrupamentos e adaptado a partir de Zuberi et.al, 2022

	Mandatório	Alertas	Exclusão
Crises epilépticas	Crises focais (com gritos) e CTCG ou CTCB, tipicamente agrupadas; podem ser desencadeadas por febre	Crises prolongadas na infância (considerar SD), sem agrupamento	
EEG		Ausência de paroxismos epileptiformes (que é usualmente focal, mas raramente generalizada)	
Idade de início das crises	1,5-60 meses em meninas, 5-96 meses em meninos		
Outros testes	Variante patogênica no <i>PCDH19</i>		

**RM ou EEG são importantes para o diagnóstico?**

A RM não é critério para o diagnóstico porém é extremamente recomendada para excluir outras causas. O EEG ictal não é critério para o diagnóstico.

**Síndromes envolvidas possíveis:** Esta síndrome deve ser considerada em uma criança sexo feminino que apresenta com primeira crise com crises febris em agrupamentos.

**Síndromes sem confirmação laboratorial:** em locais com recursos limitados, *PCDH19*-epilepsia em agrupamento poderia ser diagnosticada provisoriamente sem a confirmação do teste genético, especialmente se tratar de história familiar sugestiva de padrão de herança ligado ao X, poupando meninos.

Legenda: ADNPM: Atraso no DNPM; desenvolvimento neuropsicomotor; CTCB e CTCG: crise tônico-clônica bilateral ou generalizada; EEG – eletroencefalograma; EN: exame neurológico; RM – ressonância magnética

Critérios diagnósticos para DEE relacionada ao Glut-1 e adaptado a partir de Zuberi et al., 2022

	Mandatório	Alertas	Exclusão
Crises epilépticas	Crises epilépticas podem ser focais ou generalizadas, incluindo crises de ausência (começando antes de 3 anos de idade)		
Exame Neurológico		Alterações neurológicas focais (outros além de paresia de Todd).	
Outros testes	Variante patogênica em <i>SLC2A1</i> ou taxa baixa de glicose plasma/LCR glicose de jejum baixa (jejum)		Outras etiologias documentadas para hipoglicorraquia
Curso da doença	Deficiência intelectual	Crises que são controladas com medicamentos Falta de melhorias das crises com DC; Falta de distúrbios de movimento, tais como ataxia, discinesia induzida por exercício paroxístico, distonia	

#### RM ou EEG são importantes para o diagnóstico?

A RM não é critério para o diagnóstico porém é extremamente recomendada para excluir outras causas. O EEG ictal não é critério para o diagnóstico.

**Síndromes sem confirmação laboratorial:** Em regiões com recursos limitados, DEE pelo GLUT1 pode ser diagnosticado sem EEG, RM ou estudos genéticos em crianças sem alertas que satisfaçam todos os outros critérios clínicos obrigatórios e de exclusão. Os estudos do LCR são necessários para o diagnóstico.

Legenda: ADNPM: Atraso no DNPM: desenvolvimento neuropsicomotor; DC: dieta cetogênica; EEG – eletroencefalograma; EN: exame neurológico; LCR: líquido cefalo-raquidiano; RM – ressonância magnética. \*A glicose no líquido pode não ser tão baixa nas epilepsias de início mais tardio, associado com a deficiência do Glut-1

## Apêndice G – Genes testados nos painéis genéticos em 2017 e 2021

Genes testados no painel genético de epilepsias do Laboratório Mendelics em 2017 e 2021

### Painel de epilepsia – Laboratório Mendelics - 2017 (102 genes)

*ADSL, ALDH7A, ALG13, AMT, ARHGEF9, ARV1, ARX, ATP1A2, BRAF, BRAT1, CDKL5, CHD2, CHRNA2, CHRNA4, CHRNB2, CLN3, CLN5, CLN6, CLN8, CNTNAP2, CSTB, DNAJC5, DNMI, DYNC1H1, EFHC1, EPM2, FOLR1, FOXG1, GABRA1, GABRA3, GABRG2, GATM, GATM, GLDC, GOSR2, GRIN1, GRIN2A, GRIN2B, GRN, HACE1, HCNI, HNRNPU, KANSL1, KCNJ10, KCNQ2, KCNQ3, KCNT1, KCNT2, KCTD7, LAMB1, LGI1, LIAS, MBD5, MECP2, MEF2C, MFSD8, MOCS1, MOCS2, NHLRC1, NRXN1, PCDH19, PLCB1, PNKP, PNPO, POLG, PPT1, PRICKLE1, PRRT2, RFX1, ROGDI, SARS1, SCARB2, SCN1A, SCN1B, SCN2A, SCN3A, SCN8A, SCN9A, SLC25A22, SLC2A1, SLC45A1, SLC6A1, SLC6A8, SLC6A9, SLC9A6, SMC1A, SMS, SPTAN1, STX1B, STXBP1, SUOX, SYNI, SYNGAP1, TBC1D24, TBCD, TCF4, TMTC3, TPP1, UBE3A, WWOX, ZEB2*

### Painel de Epilepsia – Laboratório Mendelics - 2021 (243 genes)

*AARS1, ACER3, ADAM22, ADGRV1, ADRA2B, ADSL, AIMP2, ALDH7A1, ALG13, AMT, AP3B2, ARHGEF9, ARV1, ARX, ASAHI, ATP13A2, ATP1A2, ATP6V1A, ATP7A, ATP8A2, BRAF, BRAT1, BSCL2, CACNA1A, CACNA1D, CACNA1E, CACNB4, CAMK2A, CASK, CASR, CCDC88A, CDK5, CDKL5, CERS1, CHD2, CHRNA2, CHRNA4, CHRNB2, CILK1, CLCN2, CLDN5, CLN3, CLN5, CLN6, CLN8, CLTC, CNNM2, CNPY3, CNTN2, CNTNAP2, CPA6, CPLX1, CSTB, CTSD, CYFIP2, DCX, DDC, DEAF1, DENND5A, DEPDC5, DHDDS, DIAPH1, DIP2A, DLAT, DNAJC5, DNMI, DOCK7, EEF1A2, EIF2S3, EMX2, EPM2A, EXT2, FOLR1, FOXG1, FRRS1L, GABBR2, GABRA1, GABRA2, GABRA3, GABRA5, GABRB1, GABRB2, GABRB3, GABRG2, GATM, GATM, GBA, GCSH, GLDC, GNAO1, GOSR2, GPAA1, GRIA4, GRIN1, GRIN2A, GRIN2B, GRIN2D, GRN, HACE1, HCNI, HECW2, HEXA, HEXB, HNRNPU, IER3IP1, IQSEC2, ITPA, KANSL1, KATNB1, KCNA1, KCNA2, KCNB1, KCNC1, KCNJ10, KCNMA1, KCNQ2, KCNQ3, KCNT1, KCNT2, KCTD17, KCTD3, KCTD7, LAMB1, LGI1, LIAS, LMNB2, MBD5, MDH2, MECP2, MED17, MEF2C, MFSD8, MOCS1, MOCS2, NACCI, NDE1, NECAP1, NHLRC1, NPC1, NPC2, NPRL2, NPRL3, NR4A2, NRXN1, NTRK2, NUS1, OTUD6B, PACS2, PAFAH1B1, PCDH12, PCDH19, PDHA1, PDHX, PDP1, PIGA, PIGC, PIGN, PIGP, PIGT, PLAA, PLCB1, PLPBP, PNKP, PNPO, POLG, POLG2, PPP3CA, PPT1, PRDM8, PRICKLE1, PRICKLE2, PRRT2, PTPN23, QARS1, RAB11A, RFX1, RELN, RHOTB2, ROGDI, RORB, RPH3A, RTN4IP1, RTTN, SARS1, SCARB2, SCN1A, SCN1B, SCN2A, SCN3A, SCN8A, SCN9A, SGCE, SHH, SIK1, SIX3, SLC12A5, SLC13A5, SLC25A22, SLC2A1, SLC35A3, SLC45A1, SLC6A1, SLC6A8, SLC6A9, SLC9A6, SMC1A, SMS, SNAP25, SNIP1, SPATA5, SPTAN1, SRPX2, ST3GAL3, ST3GAL5, STRADA, STX1B, STXBP1, SUOX, SYNI, SYNGAP1, SYNJI, SZT2, TBC1D24, TBCD, TCF4, TMTC3, TPP1, TRIO, TSCI, TSC2, TUBA1A, UBA5, UBE3A, UFC1, UFM1, VARS1, VRK2, WASF1, WDR45B, WWOX, YWHAG, ZEB2*

## Apêndice H –Tipos de tratamento estabelecidos, potencial ou hipotético e perspectivas futuras com relação às variantes patogênicas de vários genes relacionados às DEEs

Tipos de tratamento estabelecidos, potencial ou hipotético e perspectivas futuras com relação às variantes patogênicas de vários genes relacionados às DEEs

Gene	Estabelecido/ Recomendado	Potencial / hipotético	Perspectivas futuras	Referências
<b>Efeitos nos canais iônicos</b>				
<i>GRIN2A/2B</i>			Memantadina (casos de GOF)	Reif et al., 2017
<i>KCNA2</i>			4-aminopiridina	Reif et al., 2017
<i>KCNQ2</i>	Tentar bloqueadores de canal de sódio	Retigabina		Jain et al., 2018
<i>KCNT1 e KCNT2</i>		Quinidina, DC		Gururaj et al., 2017; Ambrosino et al., 2018
<i>SCN1A</i>	Evitar bloqueadores de canal de sódio	Canabidiol, stiripentol, fenfluramina	Terapia gênica ASO	Reif et al., 2017; Myers, 2019
<i>SCN2A</i>	Tentar bloqueadores de canal de sódio (casos de GOF)			Reif et al., 2017
<i>SCN8A</i>	Tentar bloqueadores de canal de sódio (casos de GOF)	DC		Reif et al., 2017

Continua

Tipos de tratamento estabelecidos, potencial ou hipotético e perspectivas futuras com relação às variantes patogênicas de vários genes relacionados às DEEs

Gene	Estabelecido/ Recomendado	Potencial / hipotético	Perspectivas futuras	Referências
<b>Fonte de energia alternativa</b>				
<i>SLC2A1</i> (Glut-1)	Dieta cetogênica			Reif et al., 2017; Striano; Minassian, 2020
<i>SLC35A2</i>	Suplementos de galactose			Striano; Minassian, 2020
<i>SLC6A8</i>	Suplementos de creatina			Striano; Minassian, 2020
<b>Modulação da epileptogênese</b>				
complexo de <i>GATOR1</i> , <i>DEPDC5</i> , <i>NPRL2</i> , <i>NPRL3</i> , <i>TSC1/2</i>			inibidores de mTOR	Reif et al., 2017
<b>Modulação das vias bioquímicas</b>				
<i>ALDH7A</i>	Vitamina B6			Striano; Minassian, 2020
<i>AMT</i>	Benzoato de sódio*			
<i>BTD</i>	Biotina			
<i>FOLR1</i>	Ácido folínico			
<i>GAMT</i>	Suplementação de creatina			
<i>ATP7A</i>	Suplementação de histidinato de cobre			
<i>PNPO</i>	Piridoxal fosfato			

Legenda: \*primeiros anos de vida; ASO: *Antisense oligonucleotides* – oligonucleotídeos antisense. DC: dieta cetogênica; GOF: ganho de função