



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

EIMY YOANNETH ALMENDARES BONILLA

IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS EM
PACIENTES COM EPILEPSIA GENÉTICA COM CRISES FEBRIS *PLUS* (*GEFS+*)

CAMPINAS

2020

EIMY YOANNETH ALMENDARES BONILLA

IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS EM
PACIENTES COM EPILEPSIA GENÉTICA COM CRISES FEBRIS *PLUS* (GEFS+)

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ÍSCIA TERESINHA LOPES CENDES.

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA EIMY
YOANNETH ALMENDARES BONILLA, E ORIENTADA
PELA PROFA. DRA. ÍSCIA TERESINHA LOPES CENDES.

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

AL65i Almendares Bonilla, Eimy Yoanneth, 1988-
Identificação de variantes potencialmente patogênicas em pacientes com Epilepsia Genética com Crises Febris *Plus* (GEFS+) / Eimy Yoanneth Almendares Bonilla. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Íscia Teresinha Lopes-Cendes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Epilepsia - Genética. 2. Crises febris. 3. Sequenciamento de nova geração. 4. Sequenciamento completo do exoma. I. Lopes-Cendes, Íscia Teresinha, 1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Identification of potentially pathogenic variants in patients with Genetic Epilepsy with Febrile Seizures *Plus* (GEFS+)

Palavras-chave em inglês:

Epilepsy, Genetics

Seizures, Febrile

Next generation sequencing

Whole exome sequencing

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Íscia Teresinha Lopes-Cendes [Orientador]

Clarissa Lin Yasuda

Laura Maria de Figueiredo Ferreira Guilhoto

Data de defesa: 07-10-2020

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-1065-1520>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5517759605496335>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

EIMY YOANNETH ALMENDARES BONILLA

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ÍSCIA TERESINHA LOPES CENDES

MEMBROS TITULARES :

1. PROFA. DRA. ÍSCIA TERESINHA LOPES CENDES

2. PROFA. DRA. CLARISSA LIN YASUDA

3. PROFA. DRA. LAURA MARIA DE FIGUEIREDO FERREIRA GUILHOTO

Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 07/10/2020

A Deus, por permitir que eu tenha alcançado esse momento importante na minha formação profissional. À minha filha Izel de Maria e ao meu esposo Hebel Urquia, que estiveram ao meu lado nesta etapa, e por me dar força e coragem para realizar esse sonho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proteger ao longo da minha jornada e por me dar forças para superar os obstáculos e as dificuldades ao longo da minha vida;

À professora Iscia, pela oportunidade e confiança, e por nos incentivar sempre. A senhora é um exemplo de pessoa, uma inspiração que sempre soube me motivar para aprender e crescer profissionalmente;

À minha filha Izel de Maria, quem me iluminou de maneira especial;

Ao meu esposo Hebel Urquia, que durante esses anos de carreira soube me apoiar e motivar para que eu continuasse e nunca desistisse, obrigada por sua paciência;

Aos meus pais Rene e Delmis (in memoriam), que me deram a vida, e os quais eu perdi muito cedo, mas sei que eles sempre cuidaram de mim e me guiaram do céu;

Aos meus avós Angelina, Jose Antônio, Victoria, Jose Manuel e ao meu tio Jose (in memoriam), os quais antes de partir, me ensinaram amor pela família;

À minha mãe Adalinda, por ser o pilar mais importante e por sempre me mostrar seu amor e apoio incondicional, que com sua ajuda, carinho e compreensão me acompanhou ao longo de minha vida e jornada de estudante;

Em especial, aos meus tios Nilsa e Maximiliano, os quais amo como meus pais, por ser parte fundamental da minha vida, por compartilhar momentos importantes comigo e por estar sempre dispostos a me ouvir e me ajudar a qualquer momento;

Ao meu irmão Wendell, por sempre estar disposto a me apoiar em qualquer dificuldade;

À minha sogra Lely, pelo carinho e por sua incrível maneira de nos apoiar em todas as decisões importantes;

Aos Funcionários do Laboratório de Genética Molecular: Marilza Lima, Luciana Bonadia, Patrícia Ribeiro e Fábio Torres, obrigada por sempre me ajudar em todas as dificuldades dentro do laboratório;

Em especial à Marilza, pelo acolhimento, pelo carinho, e por me ensinar com tanta paciência. Obrigada pelas conversas intermináveis do nosso Portunhol. Obrigada por tudo Má;

Ao nosso grupo de pesquisa, pelo companheirismo, e por sempre estarem dispostos a me ajudar.

À equipe do Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica, o Prof. Dr. Társis Paiva Vieira e a Ilária;

Em especial a Dra. Ilária Sgardioli, a Dra. Marina Golçalves e a Dra. Barbara Henning, vocês se tornaram as minhas melhores amigas. Obrigada por sempre estarem dispostas a me auxiliar em minhas dúvidas;

À equipe do Ambulatório de Neurologia infantil: Profa. Dra. Carolina Coan, Dra. Maria Augusta, Dra. Marilisa Mantovani Guerreiro e ao Dr. Charlinton Cavalcante;

À minha amiga Luana Gavioli, obrigada pela companhia nestes últimos anos;

Em especial, à todas as famílias que fizeram parte deste estudo, só posso dizer “obrigada” a todos vocês;

Aos coordenadores dos centros colaboradores nacionais (Dra. Marielza Veiga, da Universidade Federal da Bahia) e internacionais (Prof. Dr. Marco T. Medina da “Universidad Nacional Autonoma de Honduras -UNAH, Tegucigalpa, Honduras”, Prof. Dr. Roberto H. Caraballo do “Hospital de Pediatria Prof. DR. Juan P. Garahan, Buenos Aires, Argentina”, Dra. Milana Trubnikova e Dr. Johnny Montiel Blanco do “Instituto Nacional de Salud del Niño, Lima, Peru”), pela valiosa parceria em pesquisa;

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

En fim, a todos vocês o meu “muito obrigada” por todo apoio que, sem dúvida, enriqueceram este trabalho.

RESUMO

Introdução. A epilepsia genética com crises febris *plus* - *GEFS+* (do inglês: *genetic epilepsy with febrile seizures plus*) é uma síndrome epilética familiar, com um padrão de herança monogênico, com predomínio autossômico dominante, heterogeneidade fenotípica, penetrância incompleta, e prognóstico clínico variável. Tem como principal característica, mas não essencial, as crises tônico-clônicas generalizadas desencadeadas por febre. Cerca de 30% das famílias com *GEFS+* têm o diagnóstico molecular realizado, entretanto, a maioria dos pacientes com *GEFS+* permanece sem etiologia genética identificada. **Objetivo.** Investigar alterações moleculares e de número de cópias em pacientes com *GEFS+*. **Métodos.** Foram avaliados 19 pacientes com *GEFS+*. O sequenciamento completo do exoma (*Whole Exome Sequencing* – *WES*) foi realizado em todos os pacientes, e a análise cromossômica por microarranjos – (*Chromosomal Microarray Analysis* – *CMA*) em 17 pacientes. No *WES* foi realizada uma análise focada em potenciais genes candidatos para *GEFS+* e outras síndromes epiléticas relacionadas, por meio de painéis de bioinformática que abrangeram um total de 192 genes candidatos. Na *CMA* foram consideradas como relevantes todas as alterações observadas nos pacientes, e não observadas nos controles (339 indivíduos da população brasileira). A análise da patogenicidade das variantes foi conduzida segundo as diretrizes do Colégio Americano de Genética Médica e Genômica. **Resultados.** Os fenótipos identificados em nossa coorte de estudo foram: crises febris *plus* (*FS+*) com outros tipos de crises generalizadas (13/19 [68,4%]) e *FS+* (6/19 [31,6%]). Foram encontradas alterações genéticas patogênicas ou provavelmente patogênicas em 36,8% (n=7/19) dos casos. Destes, em 42,9% (n=3/7) foram encontradas alterações genéticas nos genes candidatos já estabelecidos com o fenótipo *GEFS+* (*SCN1A* e *SCN2A*); 42,9% (n=3/7) apresentaram alterações genéticas provavelmente patogênicas em genes que têm sido associados principalmente com outras formas de epilepsias genéticas generalizadas – EGG (*EFHC1*, *CLCN2* e *SLC2A1*); e 28,6% (n=2/7) dos casos tinham alterações genéticas provavelmente patogênicas em genes associados com fenótipos de encefalopatias epiléticas da infância (*SCN3A*, *CACNA1E* e *MTOR*). Um paciente com *FS+* e com outros tipos de crises generalizadas e afasia, apresentou duas alterações genéticas concomitantes não relacionadas, sendo uma variante no gene *SCN1A p.K1654R* de significância incerta (*VUS*), mas não descrita

na literatura; e a outra uma *CNV* (*Copy Number Variation*) patogênica (deleção “*de novo*” em 7q33q35) **Conclusão.** Utilizando o sequenciamento de exoma completo e uma análise focada em painéis de bioinformática abrangentes para múltiplos genes associados com o fenótipo *GEFS+* e outras epilepsias na infância, foi possível encontrar alterações genéticas patogênicas ou provavelmente patogênicas em 36,8% (n=7/19) dos pacientes, o que é ligeiramente superior ao relatado na literatura (30%). Nossos achados apoiam o sugerido por outros autores quanto ao compartilhamento de determinantes genéticas entre os dois grandes grupos de epilepsias generalizadas (*GEFS+* e EGG) e também das encefalopatias epiléticas da infância, e portanto, sugerimos a investigação de variantes, não apenas em genes associados ao fenótipo *GEFS+*, mas também que se estenda essa investigação, quando possível, para genes relacionados a outras epilepsias na infância, especialmente para síndromes de epilepsia genética generalizada e encefalopatias epiléticas.

Palavras-chave: Epilepsia Genética com Crises Febris Plus, Crises Febris, Sequenciamento de Nova Geração, Sequenciamento do Exoma Completo.

ABSTRACT

Introduction. Genetic epilepsy with febrile seizure plus (*GEFS+*) is a familial epileptic syndrome, with a monogenic inheritance pattern, predominantly autosomal dominant. It shows phenotypic heterogeneity, incomplete penetrance, and variable prognosis. *GEFS+* has the main characteristic, but not essential, the presence of generalized tonic-clonic seizures triggered by fever. Molecular diagnosis in *GEFS+* families occurs in around 30%, so most of the patients with *GEFS+* remain without identified genetic changes. **Objective.** To investigate molecular and copy number alterations in patients with *GEFS+*. **Methods.** We included nineteen patients with *GEFS+*. Whole-exome sequencing - WES was performed in all patients and chromosomal microarray analysis - CMA in seventeen patients. The WES approach focused on potential candidate genes for *GEFS+* and other related epileptic syndromes using a bioinformatics multi-gene panel containing 192 genes. In the CMA approach, all variants observed in patients but not observed in controls (339 individuals from the Brazilian population) were considered relevant. We characterized the putative pathogenicity of the variants of interest according to the American College of Medical Genetics and Genomics guidelines. **Results.** The clinical spectrum of the *GEFS+* phenotypes identified in our study were distributed as follows: febrile seizures plus (FS+) with other generalized seizure type (13/19 [68.4%]) and FS+ (6/19 [31.6%]). We found pathogenic and likely pathogenic genetic variants in 36.8% (n=7/19) of the patients. Of these variants, mutations in genes known to be associated with the *GEFS+* phenotypes (*SCN1A* and *SCN2A*) were found in 42.9% (n=3/7) of cases, 42.9% (n=3/7) in genes associated with genetic generalized epilepsies - GGEs (*EFHC1*, *CLCN2*, and *SLC2A1*), and 28.6%, (n=2/7) in genes associated with childhood epileptic encephalopathies - CEEs (*SCN3A*,

CACNA1E, and *MTOR*). We identified a patient with FS+ with other generalized seizure types and aphasia, who presented two concomitant, unrelated genetic alterations: a variant classified as a variant of unknown significance (VUS) in the *SCN1A* *p.K1654R*, not yet described in the literature, and a pathogenic “*de novo*” CNV (7q33q35 deletion). **Conclusion.** Using WES combined with a focused analysis based on a bioinformatics multi-gene panel approach, which includes genes previously associated with the *GEFS+* phenotype and other childhood epilepsies, we found pathogenic and likely pathogenic genetic variants in 36.8% of the patients tested. This is slightly higher than the 30% diagnostic yield reported in the literature. In addition, our findings support previous suggestions that genetic testing for *GEFS+* should also include genes related to other generalized epilepsies and epileptic encephalopathies. Therefore, we suggested that the search for genetic variants in patients with *GEFS+* should include genes related to other types of childhood epilepsies

Keywords: Genetic Epilepsy with Febrile Seizures Plus, Febrile Seizures, Next Generation Sequencing, Whole Exome Sequencing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Espectro fenotípico da Epilepsia Genética com Crises Febris <i>Plus</i> - <i>GEFS+</i>	20
Figura 2. Fluxograma para filtragem e procura de alterações genéticas de interesse em pacientes com <i>GEFS+</i> , a partir de dados derivados do sequenciamento completo de Exoma.	30
Figura 3. Fluxograma de nível de evidência de critérios para classificação de variantes.....	33
Figura 4. Fluxograma dos resultados gerais da análise de Exoma em pacientes com <i>GEFS+</i> . *Pipeline definido pela nossa equipe de pesquisa, Laboratório de genética molecular, Unicamp. <i>RD</i> = profundidade de leitura (do inglês <i>read depth</i>).....	44
Figura 5. Tipos de variantes genéticas de interesse encontradas na análise de exoma A. Total e tipos de variantes genéticas de interesse encontradas, na análise de Exoma completo, após aplicação do pipeline de filtragem de variantes - Laboratório de genética Molecular, Unicamp-SP. B. Distribuição cumulativa da profundidade de leitura (<i>RD-read depth</i>) nas regiões alvo para cada amostra de 19 pacientes com <i>GEFS+</i>	44
Figura 6. Alterações patogênicas (P) e provavelmente patogênicas (PP) nos pacientes com <i>GEFS+</i> . A. Total de variantes e número de genes afetados. B. Tipo de alterações. C. Número de pacientes com variantes P e PP.....	46
Figura 7. Alterações genéticas de interesse no gene <i>SCN1A</i> em pacientes com <i>GEFS+</i> . * Mesma alteração genética observada em dois indivíduos (gêmeas).	49
Figura 8. Densidade acumulada de <i>CNVs</i> (n=47) em todos os pacientes estudados (n=16) ao longo dos cromossomas -Método <i>CMA-BRAINN</i> . A altura é uma representação da densidade dos eventos <i>CNV</i> observados em cada região do cromossoma. Chama a atenção uma densidade mais alta no cromossoma 7.	51
Figura 9. Cariótipo de sangue periférico com banda G. A. Cariótipo do probando confirmando a deleção intersticial em 7q33-q35. B e C. Cariótipo materno (B) e paterno (C) à direita, com resultado normal em ambos.	52
Figura 10. Alteração genética no gene <i>SCN1A</i> (<i>VUS</i>) paciente III-5 da família número 7 de herança materna. A= paciente; B= mãe do paciente.	57
Figura 11. Heredogramas coorte de estudo de pacientes com <i>GEFS+</i> . A. Análises familiar. A - B. Alterações genéticas validadas por Sanger. C. Alterações genéticas com pendência de validação.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Categorização fenotípica do espectro <i>GEFS+</i>	26
Tabela 2. Genes pesquisados por painéis criados para chamada de variantes.	29
Tabela 3. Combinação de critérios para classificação de variantes “patogênicas” ou “provavelmente patogênicas”.	34
Tabela 4. Sequências dos primers para amplificação dos éxons do gene <i>SCN1A</i>	35
Tabela 5. Dados sociodemográficos e clínicos.....	42
Tabela 6. Classificação de patogenicidade das alterações splicing encontradas em pacientes com <i>GEFS+</i> . (<i>SCORES</i>)	47
Tabela 7. Classificação de patogenicidade das alterações missense encontradas em pacientes com <i>GEFS+</i> . (<i>SCORES</i>)	48
Tabela 8. Alteração patogênica no número de cópias. Resultado do <i>CMA</i> (Chromosomal microarray analysis) – Pipeline <i>CMA-BRAINN*</i>	53
Tabela 9. Alteração patogênica no número de cópias, como resultado do <i>CMA</i> (Chromosomal microarray analysis) – Método <i>ChAS*</i>	54
Tabela 10. Resumo das características clínicas dos pacientes com <i>GEFS+</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aDGV: Affymetrix® Database Genomic Variants

gnomAD: The Genome Aggregation Database

ABraOM: Brazilian genomic variants

ACMG: American College of Medical Genetics

array-CGH: array Comparative Genomic Hybridization

BCB: Laboratório de Biologia Computacional e Bioestatística

BERA: Brainstem Evoked Response Audiometry

BipMed: Brazilian Initiative on Precision Medicine

BRAINN: Brazilian Institute of Neuroscience and Neurotechnology

ChAS: Chromosome Analysis Suite

ClinGen: Clinical Genome Resource

CMA: Chromosomal microarray analysis

CNVs: Copy Number Variants

CNZ: Clonazepam

DECIPHER: DatabasE of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources

DGV: Database of Genomic Variants

DNA: Deoxyribonucleic Acid

dNTP: deoxyribonucleotide triphosphates (desoxirribonucleotídeos trifosfato)

Doose: Epilepsia mioclônica-atônica

EEG: eletroencefalograma

EEl: Encefalopatias epiléticas na infância

EGG: epilepsia genética generalizada

ELT: epilepsia do lobo temporal

ETX: Etosssuximida

FCM: Faculdade de Ciências Médicas

FS: febrile seizures

FS+: febrile seizure plus

GEFS+: genetic epilepsy with febrile seizures plus

ILAE: The International League Against Epilepsy

Kb: Kilobase

LOH: *Loss of heterozygosity*

LTG: lamotrigina

MAPD: *Median Absolute Pairwise Difference*

Mb: Megabase

NDDs: *Neurodevelopmental Disorders*

NGS: *Next-Generation Sequencing*

OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*

OXC: Oxcarbazepina

pb: pares de bases

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

RD: *Read Depth.*

SNP-array: *Single Nucleotide Polymorphism array*

SNPs: *Single Nucleotide Polymorphisms*

TCG: tônico-clônica generalizadas

TEA : Transtorno específico do aprendizado

UCSC: *University of California, Santa Cruz*

Unicamp: Universidade Estadual de Campinas

VOUS: *Variant of unknown significance*

VPA: Valproato

WavinessSD: *Waviness Standard Deviation*

WES: *Whole Exome Sequencing*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. ASPECTOS GERAIS DA EPILEPSIA GENÉTICA COM CRISES FEBRIS PLUS (GEFS+)	19
1.2. ESPECTRO FENOTÍPICO DO GEFS+.	19
1.3. ALTERAÇÕES GENÉTICAS NO GEFS+.	20
1.3.1. MUTAÇÕES DOS CANAIS DE SÓDIO	21
1.3.2. MUTAÇÕES DOS RECEPTORES GABAA	21
1.3.3. OUTRAS ALTERAÇÕES GENÉTICAS DE INTERESSE NO GEFS+.	22
2. OBJETIVO	24
2.1. OBJETIVO GERAL	24
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3. METODOLOGIA	25
3.1. ASPECTOS ÉTICOS	25
3.2. CASUÍSTICA	25
3.3. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	26
3.4. SEQUENCIAMENTO COMPLETO DE EXOMA (do inglês: WHOLE EXOME SEQUENCING – WES)	27
3.5. INVESTIGAÇÃO E ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES GENÉTICAS	27
3.6. ANÁLISE DOS DADOS DERIVADOS DO SEQUENCIAMENTO COMPLETO DE EXOMA	27
3.7. PREDIÇÃO DO POTENCIAL DELETÉRIO, CLASSIFICAÇÃO DE PATOGENICIDADE E VALIDAÇÃO DE ALTERAÇÕES	31
3.8. CONFIRMAÇÃO DAS ALTERAÇÕES GENÉTICAS POR SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO TRADICIONAL PELO MÉTODO DE SANGER	34
3.9. AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE INTERESSE	35
3.10. DETECÇÃO DE MUTAÇÕES	36
3.11. ANÁLISE CROMOSSÔMICA EM MICROARRANJOS (CHROMOSOMAL MICROARRAY ANALYSIS – CMA)	37
3.12. PROTOCOLO LOCAL (LOCAL PIPELINE – BRAINN, CARVALHO et al.)	37

3.13.	MÉTODO <i>ChAS</i>	39
3.14.	MÉTODO COMPLEMENTAR PARA CONFIRMAÇÃO DE RESULTADOS CMA: CARIÓTIPO DE SANGUE PERIFÉRICO COM BANDAMENTO G	40
4.	RESULTADOS	42
4.1	CARATERIZAÇÃO SOCIO DEMOGRÁFICA E FENOTÍPICA.....	42
4.2.	INVESTIGAÇÃO E ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES GENÉTICAS.....	43
4.3.	RESULTADOS DA ANÁLISE DE EXOMA COMPLETO	43
4.3.1	RESULTADOS ESTATÍSTICOS GERAIS DOS DADOS SEQUENCIADOS E TRIAGEM BÁSICA DE MUTAÇÕES.....	43
4.3.2.	IDENTIFICAÇÃO DA PATOGENICIDADE DAS VARIANTES.....	45
4.4.	RESULTADOS DA ANÁLISE DE CMA.....	50
4.5.	ANÁLISE FAMILIAR DOS CASOS COM ALTERAÇÕES GENÉTICAS RELEVANTES	54
5.	DISCUSSÃO	60
5.1.	HETEROGENEIDADE CLÍNICA	60
5.2.	FREQUÊNCIA DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS	60
5.3.	ANÁLISES GENÉTICA POR SEQUENCIAMENTO DE EXOMA COMPLETO – WES.....	62
5.4.	ALTERAÇÕES POLIGÊNICAS EM PACIENTES COM GEFS+ MIMETIZANDO ENCEFALOPATIA EPILEPTICA	64
5.5.	RELEVÂNCIA CLÍNICA E LIMITAÇÕES	65
6.	CONCLUSÃO	67
7.	REFERÊNCIAS	68
8.	APÊNDICES	76
8.1	Apêndice 1. Predição do potencial deletério – missense.	76
8.2.	Apêndice 2. Banco de Dados de frequência populacional – missense.....	79
8.3.	Apêndice 3. Bancos de Dados de frequência populacional – “splincing”.....	86
8.4.	Apêndice 4. “Scores” Geral ACMG.	90
8.5.	Apêndice 5. CMA Geral – Pipeline CMA-BRAINN*	94
8.6.	Apêndice 6. CMA Geral – Método ChAS*	97

8.7.	Apêndice 7. Alterações Sinônimas.....	105
9.	ANEXOS	107
9.1.	Anexo I. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	107
9.2.	Anexo II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	110
9.3.	Anexo III – Protocolo de extração com fenol-clorofórmio	113
9.4.	Anexo IV Protocolo utilizado para análise de CMA.	115
9.5.	Anexo V Protocolo de análise e interpretação de CMA.....	127
9.6.	Anexo VI Protocolo de cariótipo de sangue periférico	133

1. INTRODUÇÃO

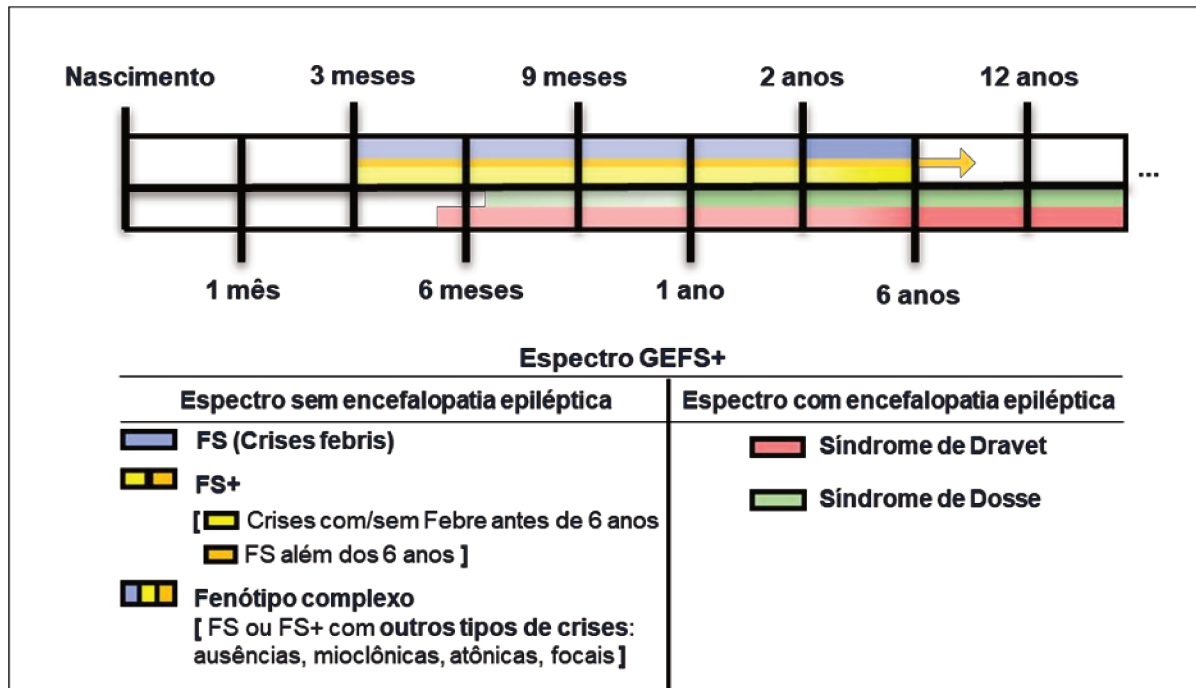
1.1. ASPECTOS GERAIS DA EPILEPSIA GENÉTICA COM CRISES FEBRIS PLUS (*GEFS+*)

GEFS+ é uma síndrome epilética familiar, nomeada inicialmente por Scheffer e Berkovic no ano 1997 (1), como “Epilepsia Generalizada com Crises Febris *Plus*” (*GEFS+*, do inglês: *Generalized Epilepsy with Febrile Seizures Plus*), decorrente do estudo de uma extensa família australiana com um padrão clínico característico de convulsões generalizadas geralmente desencadeadas por febre, com uma herança típica autossômica dominante e alta heterogeneidade fenotípica. Desde a descrição inicial da síndrome, até hoje, tem ocorrido avanços significativos, como a descoberta de mutações genéticas relacionados diretamente com a fisiopatologia da doença (2). Entretanto, o espectro fenotípico foi ampliado, incluindo além das crises generalizadas com febre, as crises sem febre e crises focais, razão pela qual o conceito de epilepsia “generalizada” foi trocado por “genética”, sendo nomeada atualmente: “Epilepsia Genética com Crises Febris *Plus*”, porém, sempre com a sigla de *GEFS+* (agora do inglês: *Genetic Epilepsy with Febrile Seizures Plus*) (3).

1.2. ESPECTRO FENOTÍPICO DO *GEFS+*.

O espectro fenotípico do *GEFS+* é muito mais amplo do que o inicialmente descrito. Possui dois grandes grupos bem diferenciados em relação a sua gravidade, e o desenvolvimento de encefalopatia ou não (Figura 1). Assim, o espectro benigno inclui crises febris, crises febris *plus* e crises febris/crises febris *plus* com crises generalizadas ou focais; enquanto o espectro mais grave apresenta o desenvolvimento de encefalopatias: a Síndrome de *Doose* e Síndrome de *Dravet* (1,2,4-6). As crises febris (*FS*, do inglês: *febrile seizures*) são o fenótipo mais comum do *GEFS+*, caracterizadas por crises tônico-clônicas generalizadas associadas com febre e com a manifestação da doença numa faixa de idade restrita entre os três meses e os seis anos (6). As crises febris *plus* (*FS+*, do inglês: *febrile seizure plus*) é o segundo fenótipo mais frequente, onde as crises com febre acontecem além dos seis anos de idade, ou aparecem crises tônico-clônicas generalizadas sem associação com febre antes dos 6 anos de idade. As crises *FS/FS+* com a presença de outros tipos de crises, sejam generalizadas ou focais (ausências, mioclônicas, atônicas, ou crises focais) são um fenótipo menos comum, mas, reportes deste

subgrupo são cada vez mais frequentes e por tanto o clínico ou pesquisador deve considerá-los dentro das possibilidades diagnósticas (1,7-10). No espectro fenotípico mais grave com encefalopatia epilética estão a Síndrome de *Doose* (epilepsia



mioclônica-atônica) e a Síndrome de *Dravet* (1,4,5,11).

Figura 1. Espectro fenotípico da Epilepsia Genética com Crises Febris Plus - GEFS+.

1.3. ALTERAÇÕES GENÉTICAS NO GEFS+.

O padrão típico de herança autossômica dominante (AD) já tem sido bem estabelecido em estudos de famílias extensas com GEFS+ (1,3), assim como mutações em canais iônicos de sódio (12-15) e em receptores gabaérgicos (16). Entretanto, nos últimos anos, novas descobertas têm ocorrido, sendo descrito o padrão de herança recessiva em famílias pequenas (17), além da identificação de novas mutações em genes candidatos e alelos suscetíveis. Em consequência desses achados, novos mecanismos fisiopatológicos foram propostos, como alterações que mostram um papel importante dos genes: *STX1* em exocitoses das vesículas sinápticas (18), *CACNA1H* nos canais de cálcio (19), *HCN2* nos subgrupos de canais iônicos regulados por nucleotídeos cíclicos (20), e mais recentemente, o *FHF2* (*FGF13*) mostrou que há prováveis alterações em proteínas auxiliares que interagem com os canais de sódio voltagem dependentes (21).

1.3.1. MUTAÇÕES DOS CANAIS DE SÓDIO

No ano 1996 Lopes-Cendes et al. (22), identificaram um locus no cromossomo 2 numa análise de uma extensa família australiana de 58 indivíduos vivos com 23 afetados com uma ampla gama de variabilidade clínica que ia desde convulsões febris isoladamente até um grave distúrbio convulsivo com atraso intelectual, entidade clínica “familiar” que após uma análise fenotípica detalhada e padrão de herança Schefer e Berkovic denominariam como *GEFS+* em 1997 (1). Logo, no ano 1998, Wallance et al (12), publicaram a primeira mutação genética associada com *GEFS+* no gene *SCN1B*, sendo ao mesmo tempo a primeira descrição de mutação num canal de sódio no sistema nervoso central humano. Porém, a maioria das famílias com *GEFS+*, não pareciam ter mutações no gene *SCN1B* (locus no cromossomo 19q) (23), publicando-se quatro trabalhos de famílias no relacionadas com fenótipo *GEFS+* entre o ano 1999 e, o início do ano 2000 com alteração genética num único locus, no cromossoma 2q (23-26), locus onde meses mais tarde (ano 2000) Escayg et al (13)., publicariam os resultados da sua pesquisa sobre a identificação da mutação no gene *SCN1A*. A mais frequente mutação em pacientes com o espectro *GEFS+* (6) e em pacientes com a Síndrome de *Dravet* (27). Descobertas que marcaram o início da compressão da biologia básica das epilepsias genéticas, na primeira década do século XXI (27). Posteriormente, foram identificadas mutações nos genes *SCN2A* (14, 29, 30) e *SCN9A*, sendo sugerido por vários autores que este último provavelmente atue como gene modificador para a evolução do espectro benigno do *GEFS+* para a Síndrome de *Dravet* em pacientes com mutação do gene *SCN1A* (15,31-33). Da mesma forma, estudos experimentais fizeram a mesma sugestão, agora no papel da mutação do gene *SCN8A*, como gene modificador do fenótipo da doença (34,35), sendo recentemente identificada esta mutação pela primeira vez em humanos, em uma família com *GEFS+* (6), entretanto, esse dado precisa ser confirmado.

1.3.2. MUTAÇÕES DOS RECEPTORES GABAA

Em 2001, posterior à descoberta do gene *SCN1A* foi descrita a primeira evidência genética da relação entre epilepsia e disfunção dos receptores *GABAA* (mutação do gene *GABRG2*) no estudo de uma extensa família francesa com fenótipo compatível com *GEFS+* (16), achados confirmados por Audenaert et al. (36), na China (ano 2006), Sun et al. (37), na Bélgica (ano 2008), e Billot et al. (38),

novamente na Franca (ano 2015). Em 2004 foi informada outra mutação no receptor *GABAA*, desta vez na subunidade delta. Os receptores *GABAA* são importantes mediadores da inibição neuronal, por tanto as mutações em ambas as variantes podem estar associadas com o aumento da excitabilidade neuronal (39).

1.3.3. OUTRAS ALTERAÇÕES GENÉTICAS DE INTERESSE NO *GEFS+*

Por volta de uma década mais tarde da descrição do primeiro gene associado no *GEFS+*, o gene *SCN1B* (12), e as descrições iniciais de mutações nos receptores *GABAA* (16); foram descritas novas alterações que aumentam a suscetibilidade das crises epiléticas como o *HCN2* (20) e *CACNA1H* (19). A primeira (*HCN2*) representa a associação inicial entre a mutação de canais iônicos regulados por nucleotídeos cíclicos como um potencial colaborador da epilepsia poligênica, além de observar que a variante “*del PPP*” em *HCN2* ocorre com maior frequência em pacientes com *GEFS+* e *FS*. A segunda, uma mutação de ganho da função dos canais de cálcio (*CACNA1H*) sugere o aumento da suscetibilidade das convulsões alterando diretamente as propriedades elétricas neuronais, e indiretamente alterando a expressão gênica. Em 2014, Schubert et al (18), fazendo uso de tecnologia de última geração (*whole-exome sequencing* – *WES*) identificou uma mutação no gene *STX1* que possui importante papel na exocitose das vesículas sinápticas, sinalizando que o *STX1* é responsável por uma maquinaria de liberação pré-sináptica em síndromes de epilepsia associada a febre. Mais recentemente, em 2015, Puranam et al. (21), identificaram uma forma rara, provável causa de epilepsia generalizada em pacientes com *GEFS+*, a mutação de uma proteína auxiliar que interagem com os canais de sódio voltagem dependentes (o gene *FHF2* ou *FGF13*), sugerindo que a redução da expressão do gene *FGF13* prejudica a excitabilidade dos interneurônios inibitórios, resultando em maior excitabilidade dentro dos circuitos locais do hipocampo e do fenótipo clínico da epilepsia.

Um estudo publicado na revista “*American Academy of Neurology*”, com participação dos autores que fizeram a descrição familiar fenotípica inicialmente do *GEFS+* (6), revisaram a informação de mais de 160 famílias com *GEFS+* investigadas ao redor do mundo, mostrando que 31% delas tem mutações em genes que codificam para canais iônicos de sódio (*SCN1A*, *SCN2A*, *SCN1B*, *SCN9A*), em

receptores gabaérgicos (*GABRG2*) e naqueles que desempenham importante papel na exocitose das vesículas sinápticas (*STX1B*). Além disso, 18% das famílias analisadas evidenciaram alelos de suscetibilidade em *GABRD*, *CACNAIH* e *HCN2* em 719-721 *del PPP*. Por outro lado, as mutações mais frequentemente identificadas foram nos genes *SCN1A* em 19% das famílias (28/147), *SCN1B* in 8% (8/101), e *GABRG2* em 9% (10/113).

Ainda assim, a maioria das famílias com *GEFS+* não tem uma mutação genética identificada (3), entretanto, a proporção exata de famílias sem mutação conhecida não tem sido estudada com precisão, particularmente porque o diagnóstico de *GEFS+* em famílias pequenas é muito difícil. Desta forma, a maioria dos pacientes permanecem sem alterações genéticas identificadas, sendo também desconhecido no nível molecular as alterações que justifiquem a heterogeneidade fenotípica (6).

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

- Investigar alterações moleculares e de número de cópias em paciente com *GEFS+*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a presença de mutações em pacientes com *GEFS+*, por meio de Sequenciamento do Exoma (*Whole Exome Sequence -WES*) combinado a uma análise por painel de bioinformática;
- Avaliar alterações de número de cópias através de análise cromossômica em microarranjos (*Chromosomal Microarray Analysis – CMA*);
- Avaliar a possível patogenicidade das mutações encontradas utilizando os critérios recomendados pelo Colégio Americano de Genética Médica e Genômica.

3. METODOLOGIA

3.1. ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas, conforme número de parecer 3.203.311 e CAAE 12112913.3.0000.5404 (Anexo I). Após orientação e esclarecimentos, todos os participantes e/ou seus responsáveis legais, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo II).

3.2. CASUÍSTICA

Foram incluídos no estudo 19 pacientes, provindos do Ambulatório de Neurologia Infantil do Departamento de Neurologia da FCM/Unicamp (n=4) e de centros colaboradores nacionais (Bahia, n=10) e internacionais (Honduras, n=2; Peru, n=2; e Argentina, n=1), com critérios clínicos de epilepsia genética com crises febris *plus* – *GEFS+* (do inglês: *genetic epilepsy with febrile seizures plus*). A informação clínica coletada incluiu: exame neurológico, análises do histórico de crises epiléticas, registro de eletroencefalografia, neuroimagem e análise histórico familiar de crises epiléticas, sendo revisada por médicos especialistas em neurologia/epilepsia pediátrica e genética. Todos os pacientes foram diagnosticados e classificados fenotipicamente segundo as diretrizes da Liga Internacional contra a Epilepsia – *ILAE* (do inglês: *the International League Against Epilepsy*) (40). Pacientes com encefalopatia epilética por síndrome de *Dravet* e *Dooze*, não foram incluídos no estudo.

Os indivíduos afetados, dentro do espectro *GEFS+*, foram categorizados fenotipicamente em: (a) CF -crises febris (em inglês: *febrile seizure -FS*), (b) CF+ -crises febris *plus* (em inglês: *febrile seizure plus -FS+*), e (c) fenótipo complexo (em inglês: *complex phenotype*), conforme descrito na tabela 1 (6,40). Para inclusão no estudo, os probandos deviam pertencer as categorias b ou c. Pacientes com outras condições neurológicas associadas, foram identificados inicialmente com uma das três categorias fenotípicas em menção previa, seguido da condição neurológica associada, por exemplo: CF+ e TEA (crises febris *plus* e transtorno específico do aprendizado).

Tabela 1. Categorização fenotípica do espectro *GEFS+*.

(a) CF -crises febris (em inglês: <i>febrile seizure -FS</i>)
Pacientes com crises epilépticas em presença de febre, tipicamente do tipo tônico-clônica generalizadas (TCG), sem progressão das crises além dos 6 anos de idade.
(b) CF+ -crises febris <i>plus</i> (em inglês: <i>febrile seizure plus -FS+</i>)
Pacientes que tem crises TCG afebris além das crises TCG febris antes dos 6 anos de idade, assim como pacientes onde as crises febris progridem além dos 6 anos de idade.
(c) Fenótipo complexo (em inglês: <i>complex phenotype</i>).
Pacientes com CF ou CF+ em presença de outros tipos de crises epilépticas além das TCG: ausências, mioclônicas, atônicas, focais.

*Critérios para categorização fenotípica: Zhang et al., 2017 (6) e Myers et al., 2018 (40).

3.3. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de amostras de sangue periférico coletadas dos pacientes (e familiares, quando foi possível), utilizando o protocolo de extração com fenol-clorofórmio descrito no (Anexo III). Em seguida, foram conferidos os parâmetros de qualidade das amostras obtidas, avaliando:

- (a) Qualidade: segundo a integridade do DNA observada em gel de agarose
- (a) Pureza: relação de absorbância 260/280 com um valor entre 1,8 e 2,0
- (b) Quantidade: quantidade ideal entre 150-200 ug, mínimo de 5ug/UL
- (c) Concentração: mínimo de 50ug/UL

A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% e os padrões de pureza, quantidade e concentração foram medidos fazendo uso de um espectrofotômetro modelo *Epoch*. As amostras com os parâmetros de qualidade adequados foram diluídas de forma padronizada para uma concentração de 50ug/UL em 70uL, para serem submetidas ao sequenciamento completo de exoma.

3.4. SEQUENCIAMENTO COMPLETO DE EXOMA (do inglês: WHOLE EXOME SEQUENCING – WES)

A preparação das bibliotecas de DNA e sequenciamento completo de Exoma foram realizadas utilizando o kit *SureSelectXT Human All Exons V6 -Agilent Technologies*, e a plataforma *Illumina Hiseq 4000*, respectivamente. Em seguida, a os dados brutos (arquivos FASTQ) dos resultados de cada caso sequenciado foram processados segundo um workflow robusto para análise de dados de sequenciamento de alto desempenho, desenvolvido pela nossa equipe de bioinformática no Laboratório de Biologia Computacional e Bioestatística (BCB), Unicamp (41,42) cujas etapas são listadas a continuação: (a) controle de qualidade pré-alinhamento (Rqc e FastQC), (b) alinhamento das sequencias contra o genoma de referência *GRCh37* por meio do alinhador BWA, (c) processamento do arquivo de alinhamento (Picard), (d) realinhamento de inserções e deleções (GATK), (e) recalibração da qualidade (GATK), (f) controle de qualidade pós-alinhamento (Picard), (g) descoberta de variantes (GATK), (h) anotações das variantes identificadas no formato VEP. Posteriormente foram disponibilizados os arquivos com as variantes no formato VCF para proceder com a investigação e análise das alterações genéticas na nossa coorte de estudo.

3.5. INVESTIGAÇÃO E ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES GENÉTICAS

A investigação das alterações genéticas na nossa coorte de pacientes com *GEFS+* foi conduzida utilizando duas metodologias principais:

- a) Análise do exoma completo, para avaliação da sequência das regiões codificantes do genoma, e
- b) A análise cromossômica em microarranjos (*Chromosomal Microarray Analysis – CMA*) para identificar alterações no número de cópias.

3.6. ANÁLISE DOS DADOS DERIVADOS DO SEQUENCIAMENTO COMPLETO DE EXOMA

A análise dos dados de *WES* foi realizada através da plataforma em nuvem: *VarStation* (<https://varstation.com>), desenvolvida por pesquisadores do Hospital Israelita Albert Einstein de São Paulo, Brasil para processamento e análise genética

focada em dados de sequenciamento de nova geração (*NGS - Next-Generation Sequencing*). Esta plataforma, está personalizada parcialmente de acordo com as diretrizes sugeridas pela *American College of Medical Genetics (ACMG)* (43), que permite a pré-classificação de patogenicidade ou não das variantes. A customização de um pipeline específico para uso por nossa equipe de pesquisa para os fins do presente trabalho foi necessário, com criação de filtros e painéis de multiplex genes de acordo com as alterações genéticas descritas na literatura até finais de 2019, e associadas ao espectro *GEFS+* e outras epilepsias na infância potencialmente relacionadas (convulsões febris e encefalopatias epiléticas na infância – EEI), isto com o objetivo de ampliar nossa procura de potenciais alterações na nossa casuística. (Tabela 2).

Tabela 2. Genes pesquisados por painéis criados para chamada de variantes.

1. Espectro GEFS+ (14 genes)

CACNA1H, FGF13, FKBP4P6, GABRD, GABRG2, HCN2, SCN1A, SCN1B, SCN2A, SCN8A, SCN9A, STX1A, STX1B e TMEM121

2. Convulsões febris (44 genes)

ADGRV1, AP4S1, APP, AUH, CACNA1H, CACNB4, CHD2, CLCN2, COG4, CPA6, CPLX1, DYRK1A, EFHC1, GABRA1, GABRB3, GABRD, GABRG2, GPT2, HCN1, HERC2, ICK, JRK, KCNJ6, KCNQ2, KCNQ3, KCTD7, KMT5B, MBD5, MBOAT7, MT-TK, NCAM2, PCDH19, RNU12, SCN1A, SCN1B, SCN2A, SCN9A, SLC2A1, SLC35C1, SLC6A1, STX1B, STXBP1, TBC1D24 e VPS11

3. Encefalopatias epiléticas na infância (134 genes)

AARS1, ADORA2A, ALG13, AP3B2, ARFGEF2, ARHGEF9, ARHGEF15, AARS(AARS1), ARX, ASAH1, ATP1A2, ATP6V1A, BRAT1, CACNA1A, CACNA1E, CACNA2D2, CASK, CDKL5 (STK9), CHD2, CHRNA7, CLCN4, CNPY3, CNTNAP2, CPA6, CSNK1E, CYFIP2, CYP2A6, CYP2C64P, DCX, DOCK7, EEF1A2, ENG, ERBB4, FAN1, FARS2, FGF12, FHF1(FGF12), FLNA, FOLR1, FOXG1, GABRA1, GABRB3, GABRG2, GNAO1, GPRIN1, GRIA3, GRIN1, GRIN2A, GRIN2B, GRIN2D, GRK5-IT1, HADHB, HAGLR, HCN1, HDAC4, HNRNPU, HOXD(HAGLR), HPD, IQSEC2, IRF2BPL, JNK3(MAPK10), KCNA2, KCNH5, KCNQ2, KCNQ3, KCNQ5, KCNT1, KCNT2, KCTD3, KCTD7, KIAA1456(TRMT9B), TRMT9B, KLF13, MAGI2, MAPK10, MBD5, MECP2, MEF2C, MTMR10, MTMR15, MTOR, NECAP1, NEDD4L, NRG2, OR10H2, PACS2, PCDH19, PCDHG@, PCDHGC3, PIGA, PIGQ, PLCB1, PNKP, PNPO, POLG, POLG1(POLG), PRRT2, PTPN23, QARS(QARS1), QARS1, RARS2, RB1, RHOTB2, SCN1A, SCN1B, SCN2A, SCN3A, SCN8A, SEPSECS, SERPINI1, SIK1, SLC19A3, SLC25A22, SLC1A2, SLC2A1, SLC35A2, SLC35A3, SLC9A6, SNAP25, SPTAN1, SRGAP2, SRPX2, STXBP1, SYNGAP1, SYNJ1, SZT2, TBC1D24, TCF4, TOR1A, TRPM1, UBA5, VRK2, WDR45, YWHAG, ZEB2, DEPDC5, PRICKLE2 e C10orf2(TWINK).

Por fim, a análise foi conduzida, inicialmente, com a chamada de variantes de forma geral com filtro customizado contendo informações para frequência da populacional menor que 1%, alterações de *splicing*, alterações exônicas e profundidade de leitura (*read depth*) igual ou maior que 10, e posteriormente

filtragem de variantes contidas nos três painéis de genes multiplex predefinidos, segundo o pipeline, apresentado na figura 2.

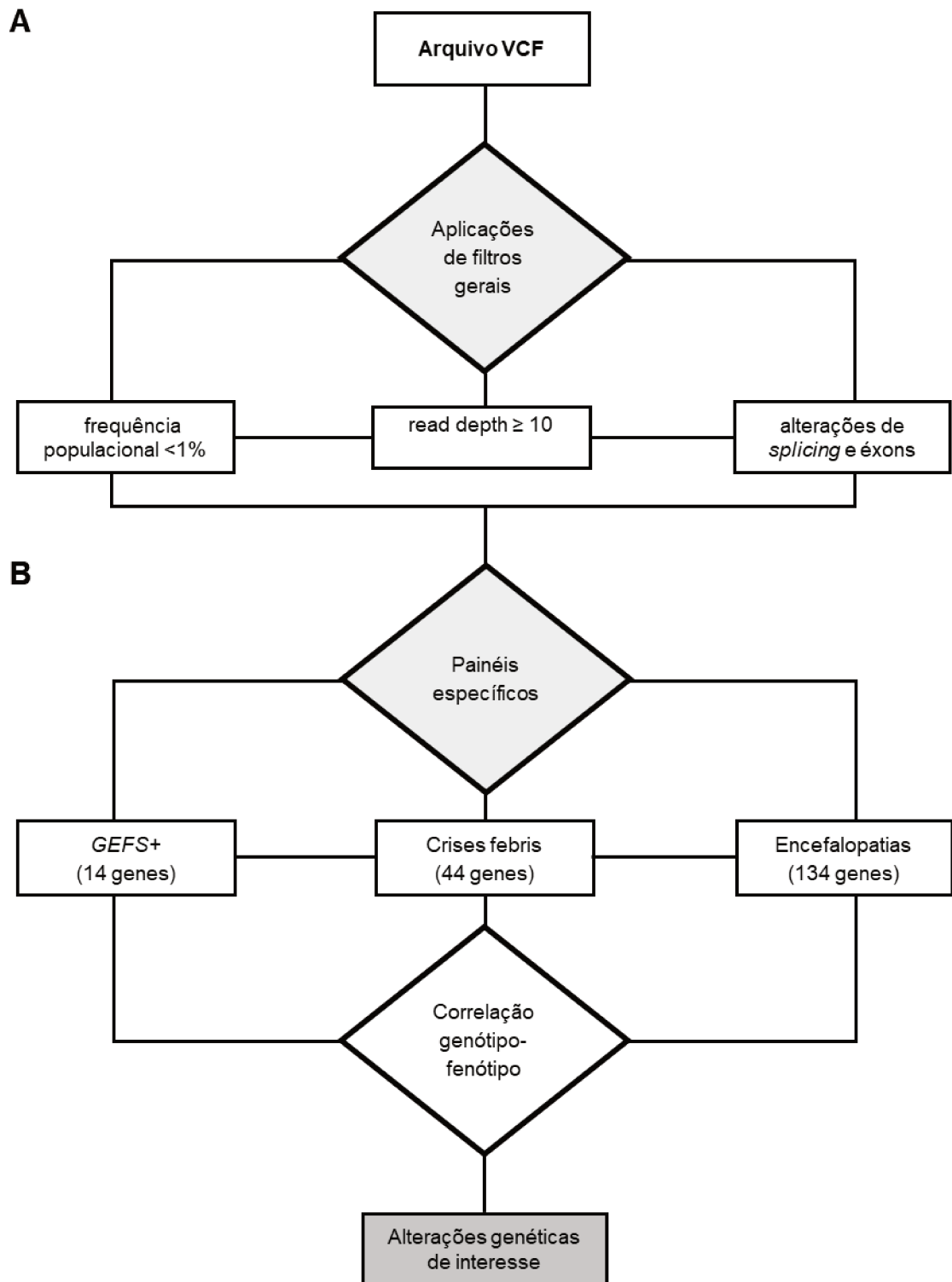


Figura 2. Fluxograma para filtragem e procura de alterações genéticas de interesse em pacientes com *GEFS+*, a partir de dados derivados do sequenciamento completo de Exoma.

3.7. PREDIÇÃO DO POTENCIAL DELETÉRIO, CLASSIFICAÇÃO DE PATOGENICIDADE E VALIDAÇÃO DE ALTERAÇÕES

A análise das alterações genéticas obtidas no WES foi realizada de acordo com o pipeline a seguir, segundo as recomendações da *American College of Medical Genetics (ACMG)* (43), e adaptações sugeridas pela nossa equipe de investigação no Laboratório de Genética Molecular da Unicamp para melhorar a detecção variantes “patogênicas” e “provavelmente patogênicas” no gene *SCN1A* (44). Critérios replicados e acoplados para variantes de interesse nos outros genes estudados na presente investigação. O procedimento de sequenciamento é explicado a seguir:

ETAPA 1

Para cada variante de interesse encontrada foi preciso investigar os seguintes critérios:

1. Tipo de variante:

Determinar se a variante é:

- *Nonsense, frameshift*, em sítio de *splice* nas posições ± 1 ou 2, em códon de iniciação, ou deleção de um ou mais éxons (variante nula);
- Deleções ou inserções *in-frame* e perdas de *stop códon* (muda o comprimento da proteína, sem ser nula);
- *Missense* (troca do resíduo de aminoácido);
- Sinônima/silenciosa (sem troca de resíduo de aminoácido).

2. Revisão da literatura:

Procurar outros artigos descrevendo a variante em questão, ou variantes envolvendo o mesmo resíduo de aminoácido na proteína, e estudos funcionais.

3. Herança e estudos familiares:

Verificar se a variante está presente nos pais ou não (de novo), e em caso de membros da família afetados, se a variante co-segrega com a doença/fenótipo estudado.

4. Frequência da variante em controles/população:

Investigar a variante em um grupo de indivíduos sem a doença investigada (controles) e/ou verificar a frequência alélica da variante em bancos de dados de populações. Os bancos de dados que utilizo são:

- *BipMed*: <http://bipmed.org/>
- *ABraOM*: <http://abraom.ib.usp.br/>
- *NHLBI Exome Sequencing Project (ESP)*: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>
- *gnomAD*: <http://gnomad.broadinstitute.org/>
- *1000 Genomes*: <http://www.internationalgenome.org/>

5. Localização (hot spots)

Para o gene *SCN1A*, considerar “hot spots” os segmentos *S4* (sensor de voltagem), *S5-S6* (poro), e *S6*. Para ver a posição da substituição na proteína, utilizo o site <https://www.uniprot.org/uniprot/P35498>.

6. Predição de efeito deletério usando algoritmos:

Utilizar predição “*in silico*” com os seguintes programas:

- *PANTHER*: <http://www.pantherdb.org/tools/csnpscoreForm.jsp>
- *MutationAssessor*: <http://mutationassessor.org/r3>
- *MutationTaster*: <http://www.mutationtaster.org>
- *Condel*: <http://bbglab.irbbarcelona.org/fannsdb/>
- *PROVEAN*: http://provean.jcvi.org/protein_batch_submit.php?species=human
- *PolyPhen2*: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/bgi.shtml>
- *SIFT*: <https://sift.bii.a-star.edu.sg/>
- *Align GVG*: http://agvgd.hci.utah.edu/agvgd_input.php
- *CADD*: <https://cadd.gs.washington.edu/score>
- *PhD-SNP*: <http://snps.biofold.org/phd-snp/phd-snp.html>
- *FATHMM*: <http://fathmm.biocompute.org.uk/inherited.html>
- *SNPs&GO*: <http://snps.biofold.org/snps-and-go/snps-and-go.html>
- *MutPred2*: <http://mutpred.mutdb.org/#qform>

ETAPA 2

Em seguida, com base nas informações obtidas sobre a variante, foi respondido cada uma das questões na figura 3:

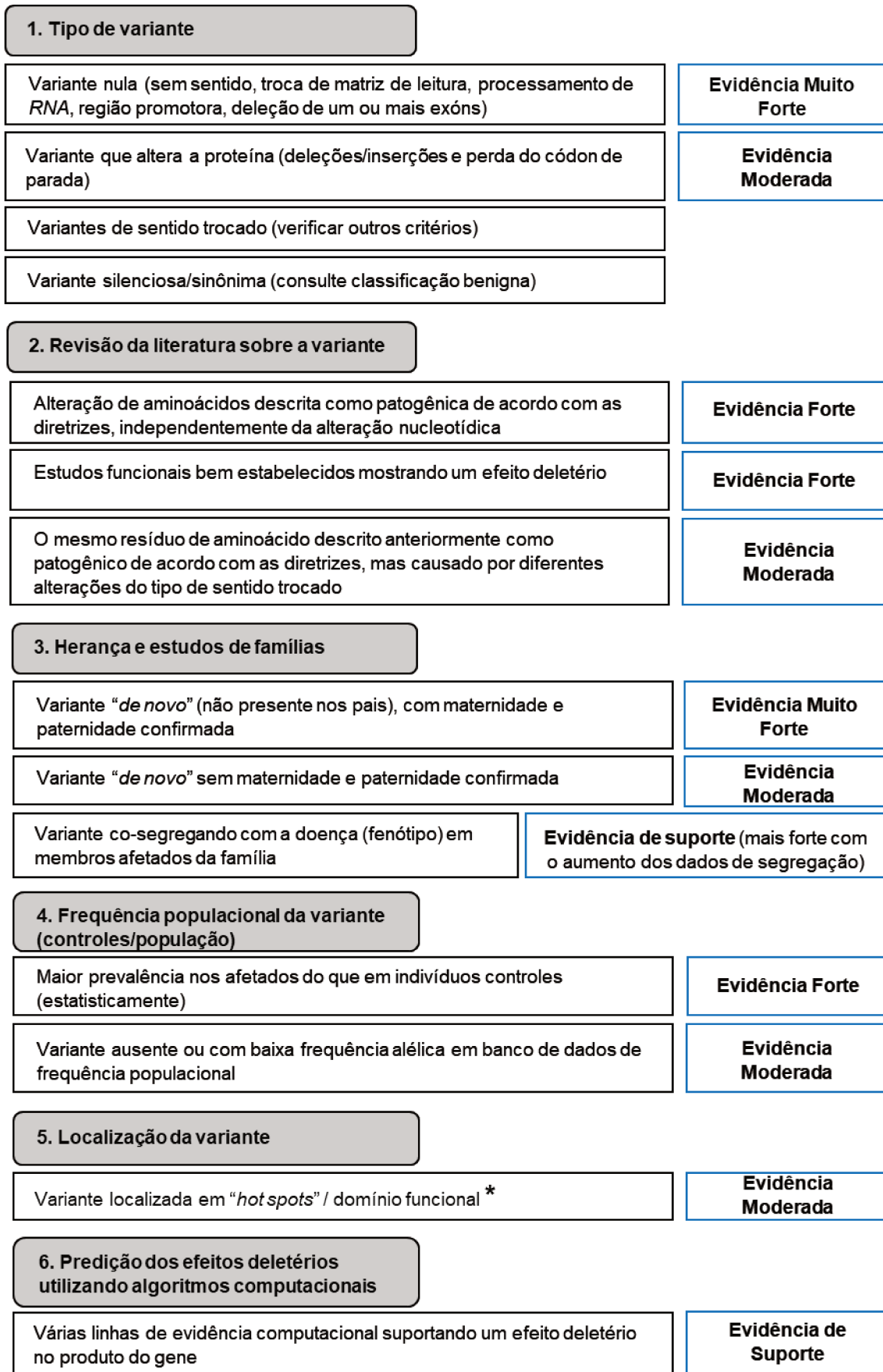


Figura 3. Fluxograma de nível de evidência de critérios para classificação de variantes.

ETAPA 3

Por fim como mostrado na tabela 3, a seguir foram classificadas as variantes obtidas como “*patogênicas*” ou “*provavelmente patogênicas*”, segundo a combinação de critérios para classificação de variantes mostrados na figura 3, acima.

Tabela 3. Combinação de critérios para classificação de variantes “patogênicas” ou “provavelmente patogênicas”.

Classificação	Evidências de patogenicidade ou impacto benigno
Patogênica	1 Muito Forte + 1 a 4 Fortes
	1 Muito Forte + 2 a 5 Moderado
	1 Muito Forte + 1 Moderado + 1 Suporte
	1 Muito Forte + 2 Suporte
	2 a 4 Forte
	1 Forte + 3 a 5 Moderado
	1 Forte + 2 Moderado + 2 Suporte
Provavelmente patogênica	1 Muito Forte + 1 Moderado
	1 Forte + 1 ou 2 Moderado
	1 Forte + 2 Suporte
	3 a 5 Moderado
	2 Moderado + 2 Suporte

*Critérios de acordo com as recomendações do Colégio Americano de Genética Médica (do inglês: *American College of Medical Genetics – ACMG*).

3.8. CONFIRMAÇÃO DAS ALTERAÇÕES GENÉTICAS POR SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO TRADICIONAL PELO MÉTODO DE SANGER

As variantes de interesse identificadas como resultantes do sequenciamento de nova geração e pós predição do potencial deletério e classificação de patogenicidade foram confirmadas pela técnica de sequenciamento automático tradicional pelo método de *Sanger*. Até o momento, foram confirmadas as variantes genéticas de interesse achadas no gene *SCN1A*, pela disponibilidade de *primers* no Laboratório de Genética Molecular - FCM da Unicamp. Para a amplificação e sequenciamento dos fragmentos de interesse foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), para as regiões que flanqueiam os éxons codificantes e as

junções éxon-íntron. Foram utilizados ao total 6 pares de *primers*. As sequências nucleotídicas dos *primers* estão apresentadas na tabela 4.

Tabela 4. Sequências dos *primers* para amplificação dos éxons do gene *SCN1A*.

Éxon	Sequência Direta (5' – 3')	Sequência Reversa (5' – 3')
2	ATTGTGATTGTGCTGGTTTCTC	TGAGGCTAATATGACAAAGATGC
9	TTGAAAGTTGAAGCCACCAC	CCTCATACAACCACCTGCTC
15	GACGGTTAGGGCAGATCAGA	GCCATGCTGGTGTATTTCC
26 ^a	ACGCATGATTTCTTCACTGG	CAGGATGACCGCGATGTA
26b	TAAGGGAGACTGTGGGAACC	AAGGTGGCGTCTGTAAGCA
26c	GGTCTCCTATCAGCCAATCAC	CAGTTTGGCATTGACCTCCT

3.9. AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE INTERESSE

A amplificação foi feita por meio da reação em cadeia da polimerase (*PCR*, do inglês *polymerase chain reaction*). As reações foram realizadas para um volume final de 10 μ L, contendo: 1,0 μ L de tampão; 0,4 μ L de mistura de *dNTP* contendo os quatro nucleotídeos em quantidades equimolares; 0,4 μ L de *MgCl*₂; 0,2 μ L de iniciador (*primer forward*); 0,2 μ L de iniciador (*primer reverse*); 0,06 μ L de enzima polimerase (*Taq Polymerase*); 7,24 μ L de água e 0,5 μ L de DNA.

Devido a dificuldades de amplificação dos fragmentos, foi necessário utilizar a técnica de *Touchdown PCR* para todos os iniciadores (*primers*) da tabela 4, a fim de otimizar o processo de amplificação dos fragmentos para minimizar a ocorrência de bandas inespecíficas. Essa técnica consiste em iniciar a amplificação com a temperatura de anelamento no primeiro ciclo programada para 10°C acima da temperatura de anelamento específica dos pares de iniciadores (*primers*). Em cada ciclo, a temperatura diminui 0,5°C e, após 20 ciclos, atinge a temperatura de anelamento ideal. Os ciclos seguintes seguem a temperatura específica dos *primers*, que foram: desnaturação inicial à 94°C por 5 minutos, seguida por 17 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos à temperatura de anelamento específica dos pares de iniciadores (*primers*) e 1 minuto à 72°C; e, depois dos ciclos, extensão final à

72°C por 10 minutos. A temperatura de anelamento ideal dos pares de *primers* para amplificação dos fragmentos do gene *SCN1A* foi de 55°C.

3.10. DETECÇÃO DE MUTAÇÕES

A detecção de mutações foi feita por meio da técnica de sequenciamento automático tradicional pelo método de *Sanger*. Antes das reações de sequenciamento, os produtos da *PCR* foram purificados com *Exo-SAP* para remover excesso de reagentes utilizados para a amplificação. Adicionou-se 0,5µl de *Exo-SAP* a 2µl de produto da *PCR*. As amostras foram incubadas em termociclador a 37°C por 15 minutos e depois aquecidas a 80°C por mais 15 minutos.

Após a purificação, a reação de sequenciamento foi feita para um volume final de 10µl, sendo: 0,5µl de iniciadores (*primers*), sendo os mesmos usados para a *PCR*, no entanto, dessa vez foram utilizados separadamente (*forward* ou *reverse*) em cada reação; 2µl do produto da *PCR* purificada; 5,5 µl de água e 2,0 µl de tampão do *BigDye terminator* (*Applied Biosystems*™), utilizado para marcar os fragmentos de *DNA*. As condições para a realização do sequenciamento foram: 95°C por um minuto, 25 ciclos de 96°C por 10 segundos; 55°C por 05 segundos; 60°C por 04 minutos e 4°C *hold*. Em seguida, iniciou-se a purificação da reação de sequenciamento, onde foi realizada a transferência de todo o conteúdo das reações de sequenciamento para uma placa polipropileno no formato de 96 poços, utilizando cada poço para um fragmento de um indivíduo. Após, a placa foi centrifugada para baixar todos os conteúdos, e posteriormente adicionou-se 2,5µl de *EDTA* e 25µl de etanol absoluto 100% (*Merck* ou *Sigma*) em cada poço, a placa foi fechada, invertida por 10 vezes e armazenada em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, centrifugou-se a placa por 30 minutos à 4.000 rpm, descartou-se o sobrenadante e centrifugou-se a placa invertida até atingir 1.000 rpm. Após, adicionou-se 30µl de etanol 70% (*Merck* ou *Sigma*) em cada poço, centrifugou-se a placa em 1.650 rcf por 15 minutos em centrifuga refrigerada à 4°C, descartou-se o sobrenadante e centrifugou-se a placa invertida a 185 rcf por um minuto. Em seguida, a placa foi colocada em termociclador por 3 minutos e meio para secagem, e após cada amostra foi ressuspensa em 10 µl de formamida *Hi-Di* (*Applied Biosystems*™). Posteriormente, as sequências foram submetidas a eletroforese capilar automatizada, utilizando o equipamento *ABI 3500xL Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*™), e logo alinhadas a sequências de nucleotídeos presentes nos

bancos de dados (*Ensembl Genomes* e *NCBI - The National Center for Biotechnology Information*), através do programa *CodonCode Aligner v.8.0.2 DEMO* (Copyright® 2017, *CodonCode Corporation*) disponível eletronicamente em <https://www.codoncode.com/aligner/new.htm>.

3.11. ANÁLISE CROMOSSÔMICA EM MICROARRANJOS (CHROMOSOMAL MICROARRAY ANALISYS – CMA)

Como mencionado previamente no numeral 3.5, além da análise do Exoma completo, para avaliação das regiões codificantes do genoma, foi também realizada uma análise cromossômica em microarranjos (*Chromosomal Microarray Analysis – CMA*), para identificar possíveis alterações no número de cópias (do inglês *Copy Number Variation – CNV*).

Do total da casuística, em dois (02) casos, não foi possível a realização desta metodologia devido a falta de material biológico (DNA). Os demais, que totalizam 17 pacientes, foram investigados por análise cromossômica por microarranjos (*CMA – Chromosomal Microarray Analysis*) com o *chip Genome-Wide Human SNP Array 6.0™* (*Affymetrix®, Santa Clara, CA, USA*). Estes, contêm oligonucleotídeos para a análise de *SNPs* e *CNVs*, permitindo a análise de desequilíbrios genômicos, bem como de genotipagem em larga escala.

Para a identificação de *CNVs* na nossa coorte de pacientes, foram utilizados dois métodos de análise cromossômica em microarranjos (*Chromosomal Microarray Analysis – CMA*):

- a) Local pipeline – BRAINN, Carvalho et al. (BRAINN: do inglês *Brazilian Institute of Neuroscience and Neurotechnology*).
- b) Método *ChAS* (do inglês *Chromosome Analysis Suite*)

3.12. PROTOCOLO LOCAL (LOCAL PIPELINE – BRAINN, CARVALHO et al.)

A análise de dados gerados por *CMA* foi realizado pela pós-doutoranda Bárbara Henning, de acordo com as instruções previamente estabelecidas pela equipe do BCB, que utiliza um pipeline desenvolvido pelo Prof. Benilton com três (03) métodos para chamadas *CNV*. Assim, foi realizado um pré-processamento de dados, conforme descrito a seguir:

Pacientes (identificação de alterações)

- a) Normalização de todos os *arrays* pelo *rawcopy* (45)
- b) Identificação de alterações no número de cópias por *PSCBS* (46)
- c) Identificação de alterações no número de cópias pelo *copynumber* (47)
- d) Identificação de alterações no número de cópias pelo *GADA* (48)
- e) Para todos os itens acima, selecionou-se apenas alterações que:
 - e.1) Apresentaram pelo menos 25 marcadores (ou sondas) para deleção; ou pelo menos 50 marcadores (ou sondas) para duplicação;
 - e.2) Apresentaram tamanhos maiores que 100kb
 - e.3) Denominou-se deleção as alterações que apresentaram $LRR \leq -0,3$; e denominou-se duplicação as alterações que apresentaram $LRR \geq 0,3$
- f) Em seguida, foi realizada interseção entre os achados de cada um dos métodos e manteve-se apenas as regiões que foram determinadas como alteradas nos três métodos utilizados para a chamada de *CNVs*.

Ao final de executar os incisos do “a” até o “f” cada indivíduo (caso) tem um conjunto de alterações combinados e consistentes nos 3 métodos de chamada de variantes (b-d).

Controles (identificação de alterações)

- g) Para os controles, uniu-se todas as alterações encontradas entre os 339 indivíduos controles da população brasileira. Isso gerou o conjunto de alterações encontradas em pessoas saudáveis (alterações que não devem ser relevantes para pacientes).

Remoção nos pacientes das alterações achadas nos controles

- h) Finalmente em TODOS os indivíduos (casos) são removidas as alterações encontradas no grupo controle. Assim, toda alteração que fica finalmente em cada indivíduo é uma alteração que não foi observada nos controles.

Os incisos desde o “a” até o “h”, se correspondem com o pré-processamento dos dados, uma vez feita esta etapa. Assim, uma CNV é chamada de *duplicação* se o $tg \geq 2$ e *deleção* se o $td \geq 2$. (tg = número de métodos “b,c,d” que chamou a duplicação; td = número de métodos “b,c,d” que chamou a deleção).

3.13. MÉTODO ChAS

Nessa etapa, foi utilizado o programa *Chromosome Analysis Suite (ChAS - versão 3.1.0.15 (r9069) – Affymetrix®*) (hg19) que foi desenvolvido e disponibilizado gratuitamente pelo fabricante dos chips (Anexo IV). A análise e interpretação foi realizada em colaboração com o Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, que utiliza um “*Guia Prático para interpretação de desequilíbrios genômicos identificados pelas técnicas de Hibridação Genômica em arrays (a-GH)*” que é um protocolo adaptado a partir de revisão da literatura, e que neste trabalho foi utilizado com pequenas modificações. (Anexo V).

Assim, para as análises de CNVs, foram utilizadas quantidades mínimas de marcadores (oligonucleotídeos), sendo 25 oligonucleotídeos consecutivos para deleções e 50 para duplicações, de acordo com as instruções do fabricante. Além disso, foi utilizado filtro de tamanho de 100kb para a chamada de CNV para os chips com os parâmetros de qualidade acima do indicado pelo fabricante, e filtro de tamanho de 300kb para os chips que não obtiveram os parâmetros de qualidade acima do indicado. Para as análises de regiões de homozigose (*ROH – Regions of Homozygosity*), foi utilizada a quantidade mínima de 500 oligonucleotídeos consecutivos e filtro de tamanho de 1.500kb.

A análise e interpretação dos dados de CMA foram realizadas através da comparação de cada alteração com um banco de dados composto por 290 indivíduos (121 masculino; 169 feminino) da população geral brasileira, utilizado como grupo controle. Além disso, todas as alterações foram comparadas em bases de dados como: Banco de Dados de Variantes Genômicas (*DGV*), Banco de Dados de Variantes Genômicas da *Affymetrix®* (*aDGV*), *DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources)*, o *ClinGen (Clinical Genome Resource)* e *OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)*.

As interpretações de *ROH* e CNVs foram realizadas de acordo com o protocolo (Anexo V). Assim, CNVs encontradas foram classificadas em cinco classes:

- **Classe I – Benignas:** variantes comuns encontradas em mais de 1% da população geral.

- **Classe II – Provavelmente benignas:** variantes não comuns, que não possuem genes em sua extensão, ou ainda que compreendem apenas regiões íntrônicas.
- **Classe III – Variante de relevância clínica incerta (VOUS):** variantes não comuns, “*de novo*” ou herdadas, e que incluem exóns de genes sem função definida, não relacionados a doenças ou não sensíveis a dosagem, e que não têm significado clínico conhecido.
- **Classe IV – Provavelmente patogênicas:** variantes não comuns: com pontos de quebra que se sobrepõe parcialmente aos de outros indivíduos portadores do mesmo desequilíbrio, porém o gene ou região crítica ainda não foram identificados; variantes descritas previamente em apenas um indivíduo com fenótipo similar; variantes que incluem exóns de genes comprovadamente relacionados a doenças e aos sinais clínicos do indivíduo em avaliação, e possuem padrão de herança compatível com o número de cópias e consequências patogênicas da mutação – ganho ou perda de função.
- **Classe V – Patogênicas:** variantes documentadas e bem estabelecidas na literatura, como as síndromes de deleção e duplicação; descritas em dois ou mais casos registrados nos bancos de dados de indivíduos com descrições fenotípicas similares, correlação evidente entre o desequilíbrio genômico e o fenótipo do indivíduo em investigação.

3.14. MÉTODO COMPLEMENTAR PARA CONFIRMAÇÃO DE RESULTADOS CMA: CARIÓTIPO DE SANGUE PERIFÉRICO COM BANDAMENTO G

Para a confirmação de uma alteração cromossômica de 9,8 Mb encontrada por CMA em um paciente, análise cromossômica com bandamento G do paciente e seus genitores foram realizados em colaboração com o Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica do Departamento de Genética Médica e Medicina Genômica da Faculdade de Ciências Médicas. Assim, os cariótipos foram realizados por meio de cultura de linfócitos obtida pela técnica descrita por Moorhead et al em 1960 (49), com modificações, e o bandamento G foi realizado de acordo com a técnica descrita por Sanchez et al em 1973 (50), com pequenas modificações. O

protocolo detalhado encontra-se no anexo VI. Foram analisadas 20 metáfases de cada indivíduo em microscópio óptico comum da *Olympus*[®] e as imagens foram capturadas utilizando o programa *FISHView* da *Applied Spectral Imaging*[®]. A resolução obtida foi de 400 a 550 bandas.

4. RESULTADOS

4.1 CARATERIZAÇÃO SOCIO DEMOGRÁFICA E FENOTÍPICA

Um total de 19 pacientes com *GEFS+* foram avaliados neste estudo. A idade média de início das crises foi de 17,1 meses $\pm$ 14,8, todos os pacientes apresentaram crises febris, dos quais o 63,2% apresentou a combinação de crises febris e afebris, outros tipos de crises epiléticas além das tônico-clônico generalizadas (TCG) estiveram presentes no 84,2%. O 78,9% dos casos tinha um histórico familiar de epilepsia. Em 63,2% dos pacientes houve presença de transtorno específico do aprendizado (TEA) e/ou atraso da linguagem, e os exames de neuroimagem foram normais no 73,7% dos casos. O fenótipo complexo (*FS* ou *FS+* com outros tipos de crises epiléticas além das TCG) foi o mais frequente, representando o 68,4 dos casos (tabela 5).

Tabela 5. Dados sociodemográficos e clínicos.

Característica		Resultado
Número de pacientes (n)		19
Gênero (M; F)		11/19 (57,9%); 8/19 (42,11%)
Idade média de inclusão no estudo $\pm$ DP (anos)		9,8 $\pm$ 5,5 (rango 3 – 20)
Idade média do início das crises $\pm$ DP (meses)		17,1 $\pm$ 14,8 (rango 3 – 60)
Crise febril e febril-afebril (CF: CF/AF)		19 (100%) / 12 (63,2%)
Tipo de crise epilética		TCG (16/19; 84,2%); Focal (7/19; 36,8%); M (6/19; 31,6%); Ausência (6/19; 31,6%); T (2/19; 10,5%); C (2/19; 10,5%); CQ (1/19; 5,3%);
Histórico familiar de epilepsia (sim; não; SD)		15/19 (78,9%); 2/19 (21,1%); 1/19 (5,3%)
Neuroimagem (normal; anormal*; SD)		14/19 (73,7%); 3/19 (15,8%); 2/19 (10,5%)
Comorbidades †		3/19 (15,8%)
Desenvolvimento	Normal	7/19 (36,8%)
	TEA	4/19 (21,1%)
	Alteração da linguagem	1/19 (5,3%)
	TEA + alteração da linguagem	3/19 (15,8%)
	TEA + ataxia	4/19 (21,1%)
Fenótipo /subtipo <i>GEFS+</i>	<i>FS+</i> (crises febris plus)	6/19 (31,6%)
	Fenótipo complexo	13/19 (68,4%)

*TCG= tônico-clônico generalizadas; M= mioclônica; A= ausência; T= tônica; C= clônica; CQ= crises de queda; SD= sem dados; TEA= transtorno específico do aprendizado. * discreta atrofia de hipocampo esquerdo, hipersinal na porção anterior do corno ventricular. † Glaucoma, fibrose e hipotireoidismo. Caracterização

4.2. INVESTIGAÇÃO E ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES GENÉTICAS

A investigação das alterações genéticas na nossa coorte de pacientes com *GEFS+* foi conduzida utilizando duas metodologias principais:

- a) O sequenciamento total de exoma (*Whole Exome Sequence – WES*) para a análise da sequência das regiões codificantes do genoma, e
- b) A análise cromossômica em microarranjos (*Chromosomal Microarray Analysis – CMA*) para identificar alterações no número de cópias.

4.3. RESULTADOS DA ANÁLISE DE EXOMA COMPLETO

4.3.1 RESULTADOS ESTATÍSTICOS GERAIS DOS DADOS SEQUENCIADOS E TRIAGEM BÁSICA DE MUTAÇÕES

A média do número de variantes genéticas por pacientes nos dados brutos do exoma (sem filtros) foi de $303.489,16 \pm 120.188,66$ (rango 478.654 – 135.368), após o pipeline para filtragem de alterações genéticas de interesse definido por nossa equipe de pesquisa, o número de alterações caiu para $2.245,11 \pm 345,02$ (rango 1.727 – 2.889) logo do primeiro filtro geral (frequência populacional $<1\%$, alterações de splicing e éxons, e, profundidade de leitura (*read depth*) ≥ 10). Após o segundo filtro com um painel múltiplos de 192 genes descritos na literatura e associados com o fenótipo de *GEFS+* (14 genes), crises febris na infância (44 genes) e encefalopatia epiléptica na infância (134 genes) a média de variantes genéticas alvos por paciente diminuiu para 1,35 (rango 2-6). Como resultado desde análise, na coorte total de pacientes, foram encontradas 53 variantes genéticas raras de interesse, em 22 genes em 18 dos 19 participantes do estudo, para sua posterior avaliação e análise detalhadas da sua repercussão funcional (Figura 4).

Das 53 variantes genéticas de interesse encontradas: 40 *minsense* (não sinônima), 11 *Indels* (inserções ou deleções) – alteração de matriz leitura (Frameshift), 2 *SNV* ou *Indels* – criação de código de parada de transcrição (*Nonsense / Stopgain*). Também foram encontradas 36 variantes genéticas *SNV* - sinônimas (*Synonymous*). A porcentagem média de regiões alvo mapeadas com uma profundidade de leitura (*RD – read depth*) de 10x foi de 92,97% (Figura 5).

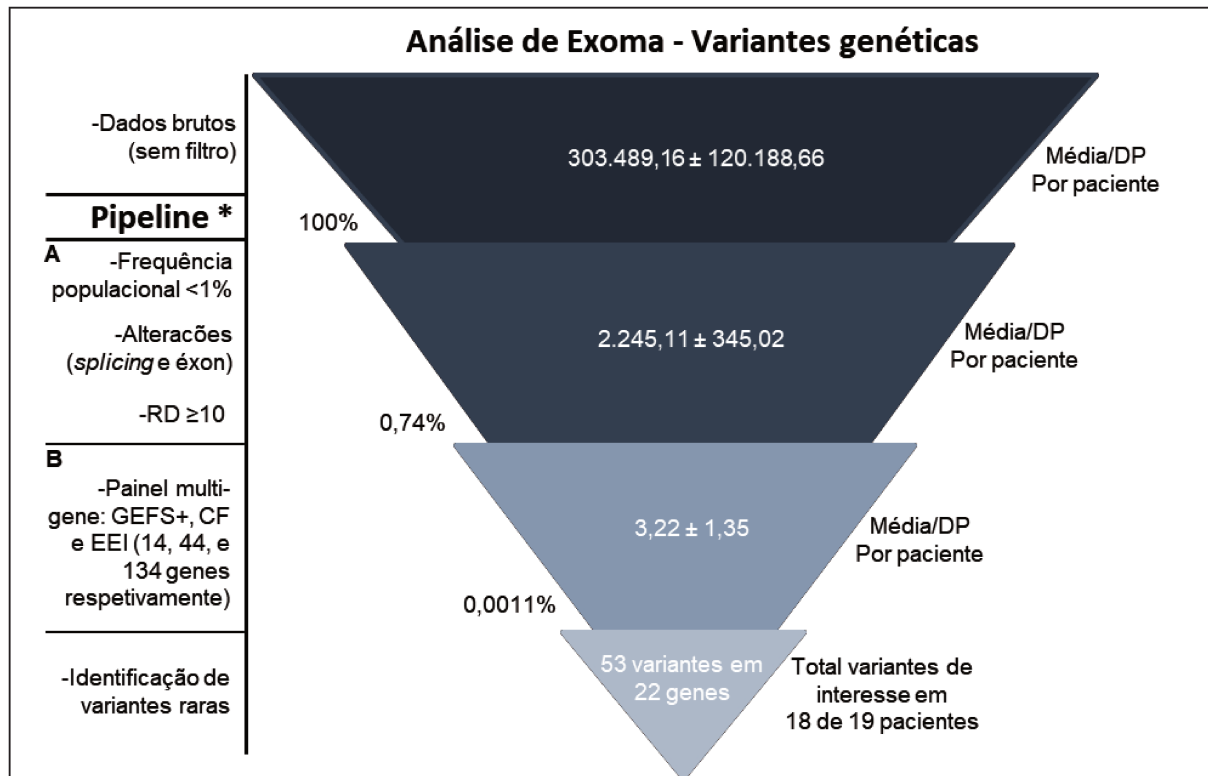


Figura 4. Fluxograma dos resultados gerais da análise de Exoma em pacientes com *GEFS+*.
*Pipeline definido pela nossa equipe de pesquisa, Laboratório de genética molecular, Unicamp. RD= profundidade de leitura (do inglês *read depth*).

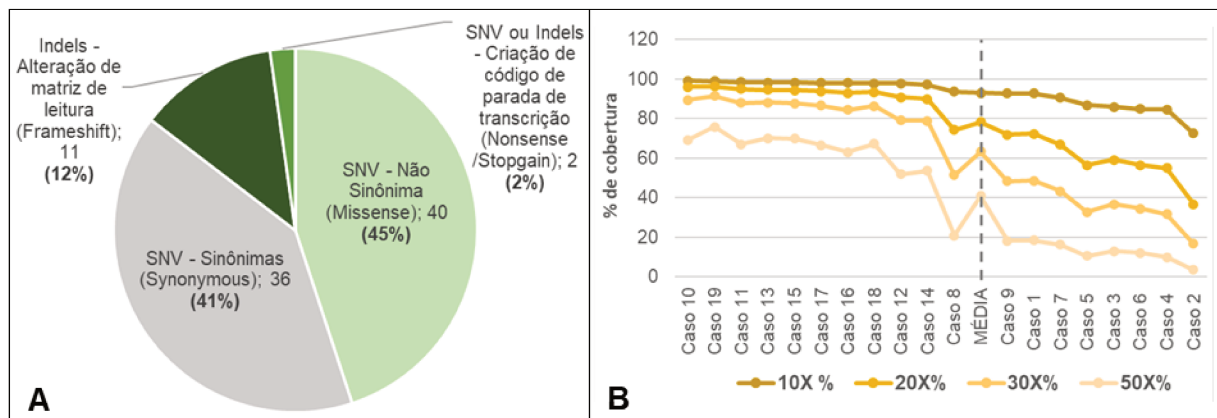


Figura 5. Tipos de variantes genéticas de interesse encontradas na análise de exoma A. Total e tipos de variantes genéticas de interesse encontradas, na análise de Exoma completo, após aplicação do pipeline de filtragem de variantes - Laboratório de genética Molecular, Unicamp-SP. B. Distribuição cumulativa da profundidade de leitura (*RD-read depth*) nas regiões alvo para cada amostra de 19 pacientes com *GEFS+*.

4.3.2. IDENTIFICAÇÃO DA PATOGENICIDADE DAS VARIANTES

Para avaliar as 53 variantes genéticas em 22 genes candidatos resultantes da filtragem inicial de alterações exposto na figura 4, foi feito uma análise de predição do potencial deletério e classificação da patogenicidade, segundo o fluxo de trabalho e critérios de classificação expostos na figura 3 e tabela 3 na metodologia. Como resultado dessa análise detalhada; foram identificadas 12 variantes genéticas patogênicas (P) e provavelmente patogênicas (PP) em 8 dos 22 genes candidatos, presentes em 7 (37%) dos 19 pacientes com *GEFS+* estudados. Dessas 12 variantes genéticas 8 (67%) foram do tipo troca de sentido (*missense*), 2 do tipo de mudança na matriz de leitura (*frameshift*) e 2 do tipo ganho de parada (*stopgain*) (Figura 6).

Dois das variantes genéticas foram classificadas como “patogênicas” do tipo “*missense*”: *SCN1A p.(R946C)*, e *SCN1A p.(R393H)*, as duas do tipo “*missense*”. Seis variantes foram classificadas como provavelmente patogênicas, do tipo “*missense*”; *SCN2A p.(E1153K)*, *EFHC1 p.(R221H)*, *EFHC1 p.(P77T)*, *CACNA1E p.(N1463D)*, e *CLCN2 p.(R629Q)* – esta última encontrada a mesma variante em dois pacientes diferentes. E, quatro variantes foram classificadas como provavelmente patogênicas, do tipo “*splicing*”, incluindo: *SCN3A p.(Ala461_Val462delinsLeuTer)*, *SLC2A1 p.(Pro266fs)*, *MTOR p.(Asn1106fs)*, e *MTOR p.(Ala1105delinsAlaAlaThrCysAlaArgSerTrpSerSerThrTer)*. As quatro variantes provavelmente patogênicas do tipo “*splicing*” são apresentadas na tabela 6. As duas variantes patogênicas e seis provavelmente patogênicas do tipo *missense* são apresentadas na tabela 7, nesta última também se apresentam quatro variantes de significância incerto “*VUS*”, que consideramos relevantes reportar pelos seguintes motivos: duas em *SCN1A p.(R1639C)* observada em dois indivíduos (gêmeas), encontrando-se a substituição da proteína em uma posição de domínio funcional onde as alterações patogênicas são mais frequentes e a variante não tem sido reportada nos bancos de dados de frequência populacional nem descrita na literatura; as outras duas alterações foram a *SCN1A p.(K1654R)* e *SCN1A p.(R101W)*, a primeira não tem sido reportada em bancos de dados de frequência populacional nem descrita na literatura, foi validada pelo método de sequenciamento Sanger observando-se a mesma variante na mãe, sendo uma variante de herança materna, e a segunda se encontra reportada nos bancos de dados com uma frequência (<0.1%), foi considerada deletéria pelos métodos de análise “*in silico*”. A

figura 7 ilustra as seis mutações “*minsense*” (2 patogênicas e 4 *VUS*) no gene *SCN1A*, confirmadas pelo método de *Sanger*. A validação das alterações genéticas nos outros genes está em andamento.

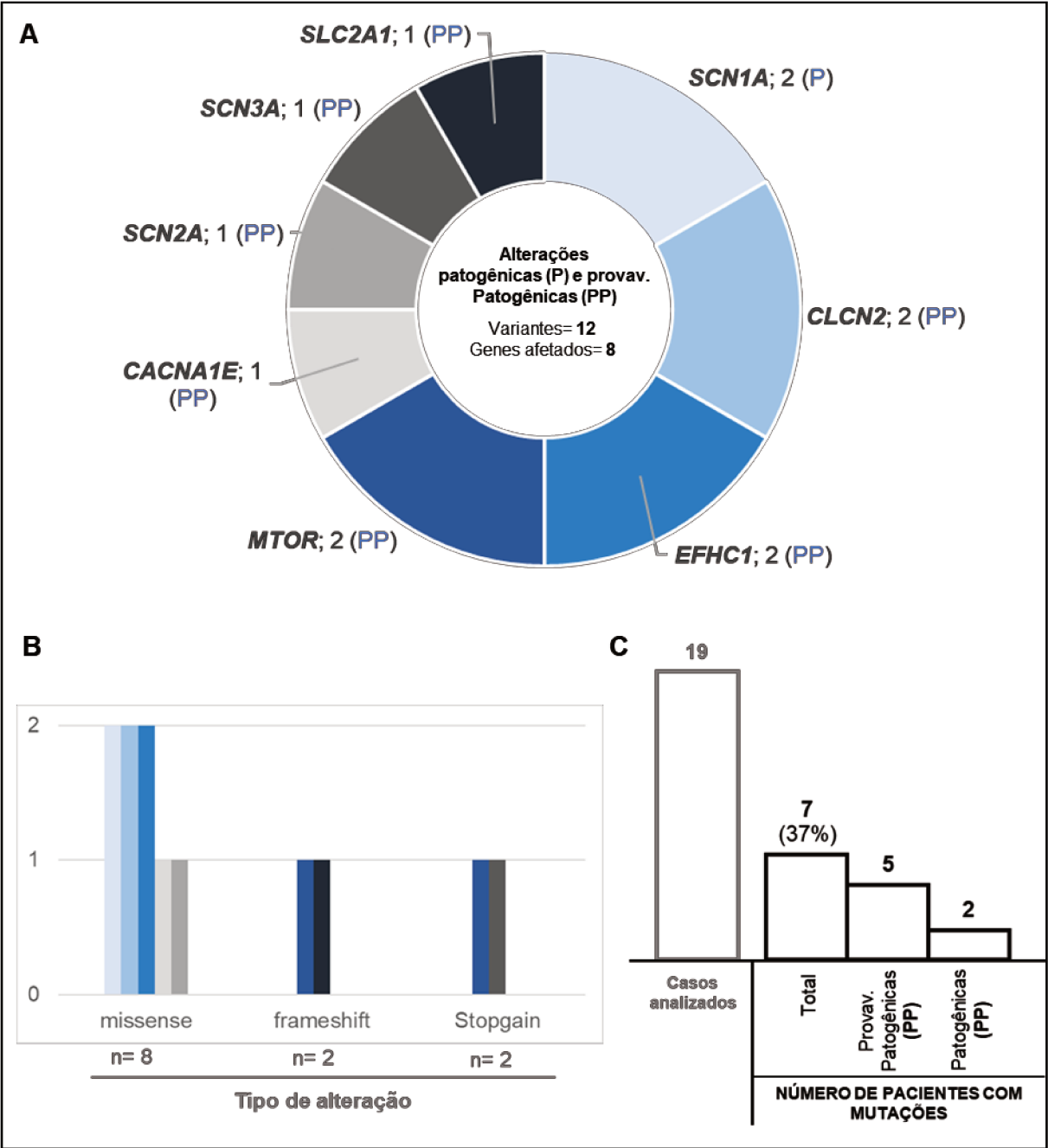


Figura 6. Alterações patogênicas (P) e provavelmente patogênicas (PP) nos pacientes com *GEFS+*. A. Total de variantes e número de genes afetados. B. Tipo de alterações. C. Número de pacientes com variantes P e PP.

Tabela 6. Classificação de patogenicidade das alterações *splicing* encontradas em pacientes com *GEFS+*. (SCORES)

No. caso	Alteração de Nucleotídeos	Alteração Proteica Prevista	Gene	Evidência de patogenicidade											Número De Critérios				Classificação	Validação	
				1. Tipo de variante		2. Revisão da literatura		3. Herança e estudos familiares			4. Frequência Populacional (Controles)			5. Localização em "hot spots"							6. Predição "in silico"
				PVS1	PM4	PS1	PS3	PM5	PS2	PM6	PP1	PS4	PM2	PM1	PP3	Muito forte	Forte	Moderado			Suporte
2	c.796_797insGTTCC AGAACATCCCGCT CCACCCAGCTCTC CCGCGTCCCCACA ACGCATCCGGCTG ATCGATCGGATTA	p.(Pro266fs)	SLC2A1	+	NA	-	-	-	-	-*	-**	-***	+	NA	NA	1	0	1	0	Provavelmente patogênico	A ser validada
	c.1380_1381insCTG TGACATTTCGATAG CCATGTGCAGGCG GCCGGCCGTGCC ACCGGCGAGGCG GGCGAGGTTCGCG TTCGGCACTGC	p.(Ala461_Val462delinsLeuTer)	SCN3A	+	NA	-	-	-	-	-*	-**	-***	+	NA	NA	1	0	1	0	Provavelmente patogênico	A ser validada
3	c.3315_3316insTGG AA	p.(Asn1106fs)	MTOR	+	NA	-	NA	-	-	-*	-**	-***	+	NA	NA	1	0	1	0	Provavelmente patogênico	A ser validada
	c.3314_3315insAGC CACCTGCGCAAGG TCCTGGTCGAGTA CGTGAACGAAACG GCAAGCGAGTGG GGCGCGAACATC	p.(Ala1105delinsAlaAlaThrCysAlaArgSerTrpSerSerThrTer)	MTOR	+	NA	-	NA	-	-	-*	-**	-***	+	NA	NA	1	0	1	0	Provavelmente patogênico	A ser validada

O Pipeline para determinar a evidência de patogenicidade e posterior classificação das variantes, está descrito na metodologia, na figura 3 e tabela 3 respectivamente. A tabela completa com a classificação para todas as variantes de interesse analisadas pode ser encontrada no apêndice 3.0. As tabelas completas que se correspondem com o numeral 2, 4 e 6 do apartado de evidência de patogenicidade, podem ser encontradas no apêndice 3.1, 3.2 e 3.3 *Os genitores (pais) não testados; **A co-segregação com a doença não foi investigada; ***A frequência não foi calculada, pois o n é muito baixo; + =presença; - = ausência; NA= não avaliado.

Tabela 7. Classificação de patogenicidade das alterações *missense* encontradas em pacientes com *GEFS+*. (SCORES)

No. Caso	Alteração de Nucleotídeos	Alteração Proteica Prevista	Gene	Evidência de patogenicidade												Número De Critérios				Classificação	Validação
				1. Tipo de variante		2. Revisão da literatura		3. Herança e estudos familiares			4. Frequência Populacional (Controles)			5. Localização em "hot spots"	6. Predição "in silico"						
				PVS1	PM4	PS1	PS3	PM5	PS2	PM6	PP1	PS4	PM2	PM1	PP3	Muito forte	Forte	Moderado	Suporte		
2	c.4387A>G	p.N1463D	CACNA1E	-	-	-	-	-	-	+	-**	-***	+	+	-	0	0	3	0	Provavelmente patogênico	A ser validada
4	c.1886G>A	p.R629Q	CLCN2	-	-	+	NA	-	-	+	-**	-***	+	NA	-	0	1	2	0	Provavelmente patogênico	A ser validada
5	c.1886G>A	p.R629Q	CLCN2	-	-	+	NA	-	-	+	-**	-***	+	NA	-	0	1	2	0	Provavelmente patogênico	A ser validada
	c.229C>A	p.P77T	EFHC1	-	-	+	NA	-	-	+	-**	-***	+	NA	-	0	1	2	0	Provavelmente patogênico	A ser validada
	c.662G>A	p.R221H	EFHC1	-	-	+	NA	-	-	+	-**	-***	+	NA	-	0	1	2	0	Provavelmente patogênico	A ser validada
7	c.4961A>G	p.K1654R	SCN1A	-	-	-	-	-	-	-	+	-***	+	-	-	0	0	1	1	VUS	Validada
10	c.2836C>T	p.R946C	SCN1A	-	-	+	+	+	-	+	-**	-***	+	+	+	0	2	4	1	Patogênico	Validada
13	c.4915C>T	p.R1639C	SCN1A	-	-	-	-	-	-	-*	-**	-***	+	+	+	0	0	2	1	VUS	Validada
14	c.4915C>T	p.R1639C	SCN1A	-	-	-	-	-	-	-*	-**	-***	+	+	+	0	0	2	1	VUS	Validada
15	c.301C>T	p.R101W	SCN1A	-	-	-	-	-	-	+	-**	-***	+	-	+	0	0	2	1	VUS	Validada
16	c.1178G>A	p.R393H	SCN1A	-	-	+	+	+	-	-*	-**	-***	+	+	-	0	2	3	0	Patogênico	Validada
18	c.3457G>A	p.E1153K	SCN2A	-	-	-	NA	-	-	+	-**	-***	+	+	-	0	0	3	0	Provavelmente patogênico	A ser validada

O Pipeline para determinar a evidência de patogenicidade e posterior classificação das variantes, está descrito na metodologia, na figura 3 e tabela 3 respectivamente. A tabela completa com a classificação para todas as variantes de interesse analisadas pode ser encontrado no apêndice 2.0. As tabelas completas que se correspondem com o numeral 2, 4 e 6 do apartado de evidência de patogenicidade, podem ser encontradas no apêndice 2.1, 2.2 e 3.3 respectivamente. VUS: Variantes de significado incerto (*Variants Unknown Significance*); *Os genitores (pais) não testados; **A co-segregação com a doença não foi investigada; ***A frequência não foi calculada, pois o n é muito baixo; + =presença; - = ausência; NA= não avaliado.

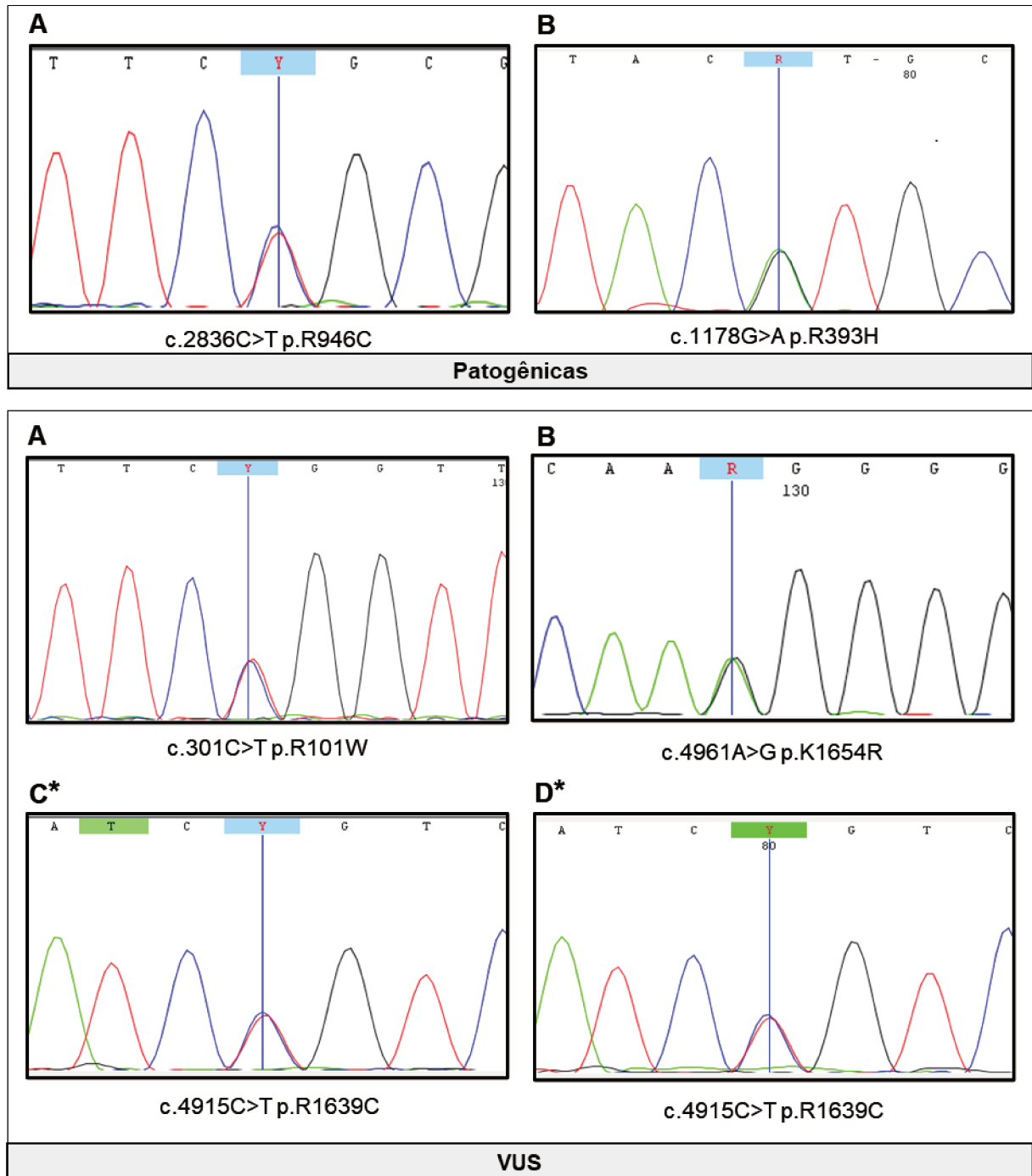


Figura 7. Alterações genéticas de interesse no gene *SCN1A* em pacientes com *GEFS+*. * Mesma alteração genética observada em dois indivíduos (gêmeas).

4.4. RESULTADOS DA ANÁLISE DE CMA

Dos 19 casos totais de nossa coorte de pacientes com *GEFS+*, 17 foram investigados para identificar alterações no número de cópias, 2 deles não tiveram material biológico (DNA) para a análise. Como descrito na metodologia a análise cromossômica em microarranjos (*Chromosomal Microarray Analysis – CMA*), foi realizada por dois métodos:

(a) Local pipeline – *CMA-BRAINN*, Carvalho et al. (*BRAINN*: do inglês *Brazilian Institute of Neuroscience and Neurotechnology*).

(b) Método *ChAS* (do inglês *Chromosome Analysis Suite*).

Alterações no número de cópias foram encontradas em 16 dos 17 pacientes estudados quando comparados com um grupo controle de 339 indivíduos da população brasileira. No total 48 *CNVs* foram observadas com uma média por indivíduo de 0,44 duplicações (ganhos) e 2,56 deleções. Em seguida, foi criado um mapa de todas as *CNVs* possíveis, localizando todos os pontos iniciais ou finais das *CNVs* observadas nos participantes do estudo. Este procedimento foi realizado em todos os cromossomos. Todas as *CNVs* de todos os pacientes foram plotadas como uma densidade de *CNV* ao longo dos cromossomos (Figura 8), observamos que há uma densidade mais alta no cromossomo 7, como consequência de 13 deleções em um dos casos do estudo, alteração identificada também pelo método *ChAS*, evidenciado que trata-se de uma deleção intersticial de aproximadamente 9,8 Mb no braço longo do cromossomo 7, envolvendo as bandas q33-q35 (arr[GRCh37] 7q33q35(136901668_146708552)x1). Assim, cariótipo de sangue periférico com banda G foi realizado a fim de confirmar a deleção no paciente (Figura 9.A), confirmando-se a alteração, seguidamente foi realizado o cariótipo dos genitores (Figura 9. B-C), cujo resultado foi normal para ambos os pais, sendo classificada a alteração como “*de novo*” e patogênica segundo os critérios da *ACMG/AMP* (Tabelas 8 e 9), pipeline *CMA-BRAINN* Carvalho et al., e método de *ChAS* respectivamente).

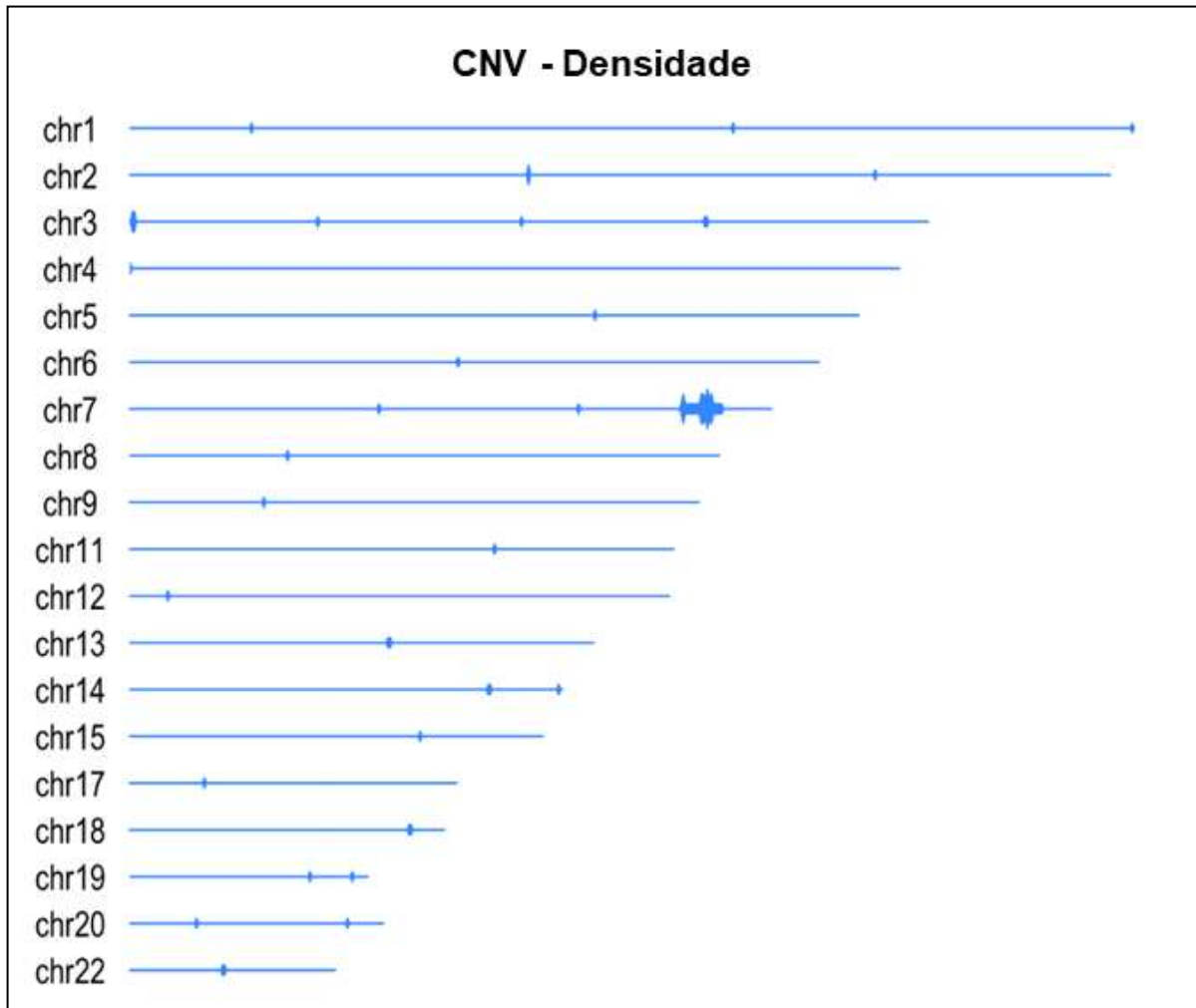


Figura 8. Densidade acumulada de *CNVs* ($n=47$) em todos os pacientes estudados ($n=16$) ao longo dos cromossomas -Método *CMA-BRAINN*. A altura é uma representação da densidade dos eventos *CNV* observados em cada região do cromossoma. Chama a atenção uma densidade mais alta no cromossoma 7.

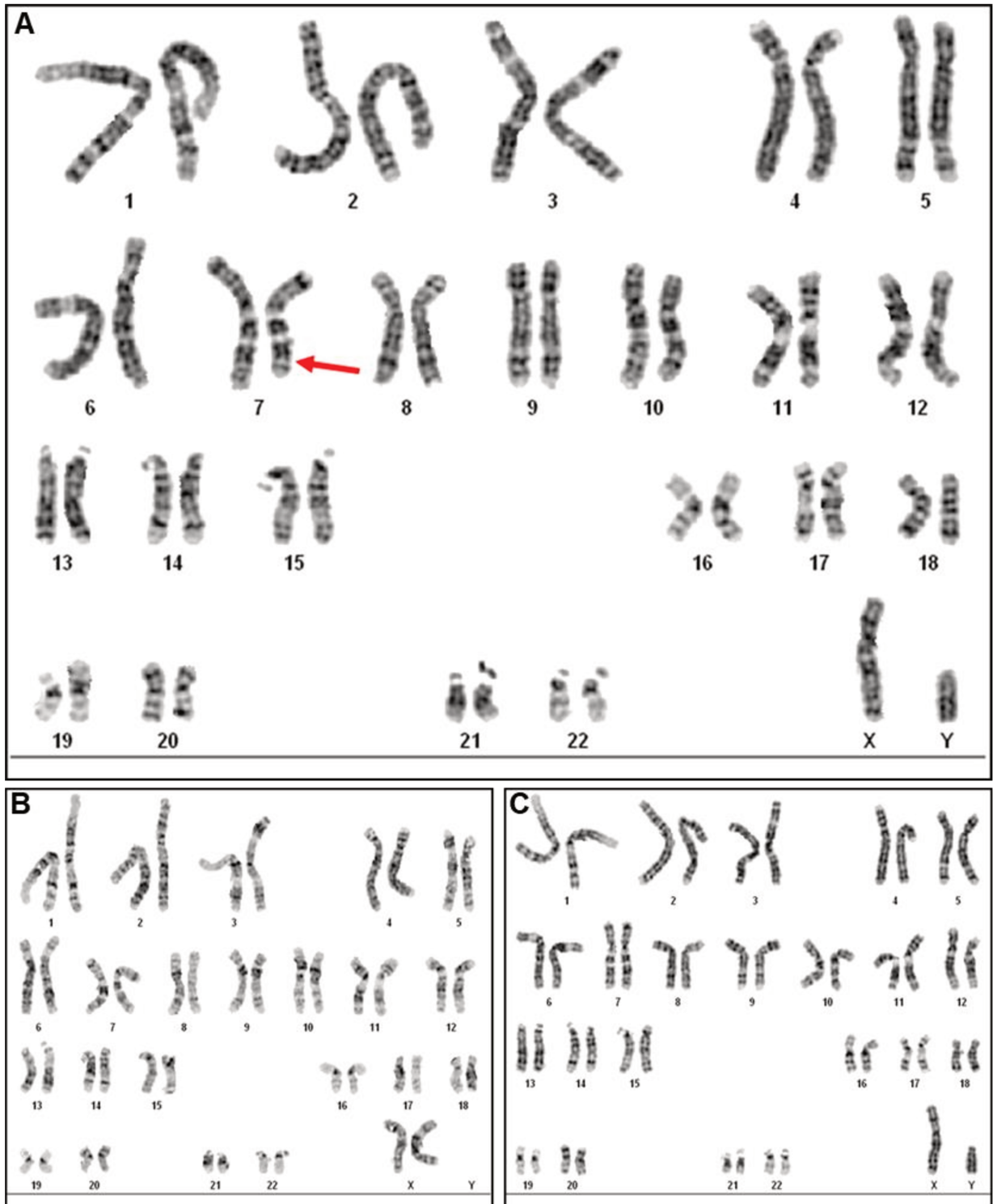


Figura 9. Cariótipo de sangue periférico com banda G. A. Cariótipo do probando confirmando a deleção intersticial em 7q33-q35. B e C. Cariótipo materno (B) e paterno (C) à direita, com resultado normal em ambos.

Tabela 8. Alteração patogênica no número de cópias. Resultado do *CMA (Chromosomal microarray analysis) – Pipeline CMA-BRAINN**

No Caso	Chr	Posição Inicial	Posição Final	Tamanho (Kb)	Tipo CNV	Sexo	aDGV	DGV	DECIPHER	ClinGen CNV	Classificação	Genes registrados no OMIM
7	7	136901669	137264283	362615	Deleção	Masculino	Sim	Sim	Sim	Sim	Patogênica	PTN(162095),DGKI(604072)
	7	137268624	137307434	38811								DGKI(604072)
	7	137315924	141753993	4438070								DGKI(604072),CREB3L2(608834),AKR1D1(604741),TRIM24(603406),SVOPL(611700),ATP6V0A4(605239),KIAA1549(613344),ZC3HAV1(607312),TTC26(617453),UBN2(613841),LUC7L2(613056),HIPK2(606868),TBXAS1(274180),PARP12(612481),NDUFB2(603838),BRAF(164757),MRPS33(611993),AGK(610345),WEE2(614084),SSBP1(600439),TAS2R3(604868),TAS2R4(604869),TAS2R5(605062),TAS2R38(607751),CLEC5A(604987),MGAM(154360)
	7	141795282	141802350	7069								MGAM(154360)
	7	142047385	142257596	210212								-
	7	142275699	142474641	198943								PRSS1(276000)
	7	142474939	142827953	353015								EPHB6(602757),TRPV6(606680),TRPV5(606679),KEL(613883)
	7	142891710	143218845	327136								TAS2R40(613964),GSTK1(602321),CASP2(600639),TMEM139(616524),CLCN1(118425),ZYG(602002),EPAH1(179610),TAS2R60(613968),TAS2R41(613965)
	7	143292111	143398030	138923								TCAF2(616252)
	7	143398031	143431033	138923								TCAF2(616252),OR2F1(608497)
	7	143568048	143873376	305329								TCAF2(616252)
	7	144075507	144105929	30423								ARHGEF5(600888),NOBOX(610934)
	7	144106496	144112265	5770								NOBOX(610934)
	7	144112435	146708552	2596118								TPK1(606370),CNTNAP2(604569)

* Pipeline CMA-BRAINN= método de análises de CMA desenvolvido na equipe de Bioinformática da nossa equipe de investigação, parte do Instituto Brasileiro de Neurociência e Neurotecnologia -BRAINN. Chr: cromossomo; Kb: Kilobase; CNV: variação de número de cópias (copy number variation); aDGV: Affymetrix® Database Genomic Variants; DGV: Database of Genomic Variants; DECIPHER: Databases of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources; ClinGen: Clinical Genome Resource; DNA: Deoxyribonucleic Acid

Tabela 9. Alteração patogênica no número de cópias, como resultado do CMA (Chromosomal microarray analysis) – Método ChAS*

No. Caso	N C	Tipo de CNV	Chr	Tamanho (Kb)	Qd e. Genes OMIM	Genes OMIM	Nomenclatura	Classificação
7	1	Deleção	7	9.806.884	50	PTN (162095), DGKI (604072), CREB3L2 (608834), AKR1D1 (604741), TRIM24 (603406), SVOPL (611700), ATP6V0A4 (605239), KIAA1549 (613344), ZC3HAV1 (607312), UBN2 (613841), LUC7L2 (613056), HIPK2 (606868), TBXAS1 (274180), PARP12 (612481), MKRN1 (607754), NDUFB2 (603838), BRAF (164757), MRPS33 (611993), AGK (610345), WEE2 (614084), SSBP1 (600439), TAS2R3 (604868), TAS2R4 (604869), TAS2R5 (605062), CLEC5A (604987), TAS2R38 (607751), MGAM (154360), PRSS1 (276000), EPHB6 (602757), TRPV6 (606680), TRPV5 (606679), KEL (613883), PIP (176720), TAS2R40 (613964), GSTK1 (602321), TMEM139 (616524), CASP2 (600639), CLCN1 (118425), ZYX (602002), EPHA1 (179610), TAS2R60 (613968), TAS2R41 (613965), TCAF2 (616252), TCAF1 (616251), OR2F1 (608497), CTAGE4 (608910), ARHGEF5 (600888), NOBOX (610934), TPK1 (606370), CNTNAP2 (604569)	arr[GRCh37] 7q33q35(136901668_146708552)x1	Classe 5 – Patogênica

NC: número de cópias; Chr: cromossomo; CNV: variação de número de cópias (copy number variation); Kb: Kilobase; OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man; DNA: Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid).

4.5. ANÁLISE FAMILIAR DOS CASOS COM ALTERAÇÕES GENÉTICAS RELEVANTES

A análise familiar foi possível em dois dos casos estudados, onde pelo menos ambos os pais dos pacientes foram investigados as alterações genéticas. Porém, se mostra na figura 11 o heredograma e alterações genéticas patogênicas e provavelmente patogênicas ou de significância incerto (*VUS*) de interesse, correspondentes a nossa coorte de pacientes com *GEFS+*. Os dados fenotípicos ampliados de todos os casos, se apresenta na tabela 9. As características detalhadas das mutações podem ser apreciadas na tabela 6 e 7.

Dentre a casuística, destaca-se o paciente número 7 (figura 11, família 7), pela raridade dos resultados. A descrição fenotípica e genotípica detalhada deste paciente são descritos a seguir:

Trata-se de um paciente do sexo masculino, filho mais novo de pais não consanguíneos. Ao nascimento, o paciente apresentou fístula perianal, manifestou alergia à proteína do leite com choro intenso e inúmeras evacuações por dia, e aos quatro meses apresentou hipotonia muscular e discreto atraso de desenvolvimento. As primeiras convulsões febris, sendo duas no mesmo dia, surgiram aos seis meses de idade, e houve recidiva das crises febris aos dez meses; aos dois anos e quatro meses; e aos dois anos e onze meses, sendo a última crise pós vacina. Aos oito meses teve a primeira crise afebril disperceptiva (olhar parado) dando início ao tratamento com Oxcarbazepina (OXC), entretanto houve recidiva após um mês. Desde então, as crises disperceptivas se tornaram mais frequentes e com um ano e um mês passaram a ser diárias e em salvas. Aos dez meses iniciaram crises atônicas generalizadas (queda súbita), sendo que estas foram mais raras, presentes até um ano e oito meses e controladas após associação OXC e Clonazepam (CNZ). Aos dois anos e 11 meses foi associado OXC e lamotrigina (LTG) por persistência e piora (crises mais prolongadas e com palidez), entretanto houve piora com LTG e apareceram crises mioclônicas por curto período, estas desapareceram com a redução e após a retirada da LTG. Aos quatro anos foi suspeitado de Síndrome de Dravet, fazendo a retirada das drogas contraindicadas em alterações genéticas envolvendo os canais de sódio (LTG + OXC) e introduzido Valproato (VPA). Assim, nesta época, foram relatadas crises prolongadas de perda de contato ao despertar, registradas por eletroencefalografia (EEG) e diagnosticada como crises de ausência atípicas, que coexistiam os dois padrões (focais e as ausências), sendo controladas apenas aos cinco anos e sete meses com a associação VPA + Etosuximida (ETX), em doses baixas de VPA 15,3 mg/kg/dia e ETX 20,4 mg/kg/dia. Desde então, não apresentou mais qualquer tipo de crise.

Aos quatro anos de idade, o paciente foi diagnosticado com hérnia inguinal que foi corrigida cirurgicamente. Avaliação auditiva através do exame *BERA* (*Brainstem Evoked Response Audiometry*), que investiga a integridade das vias auditivas, desde a orelha interna até o córtex cerebral, mostrou resultado normal. Além disso, o paciente apresentou precocemente um discreto atraso nos marcos do desenvolvimento motor (rolou entre os seis e sete meses, engatinhou aos onze meses e andou com um ano e seis meses), assim a coordenação motora global é muito boa, entretanto a coordenação fina é bastante limitada. Na linguagem, com um

ano e um mês apresentou apenas grunhidos e tinha conduta imitativa (batia palma e dava tchau). Entretanto, após meses (com um ano e quatro meses), o paciente evoluiu e teve um período de pouca interação e muita agitação (a mãe atribuíu ao CNZ, sendo então retirado). O paciente, apresenta ainda ausência de fala, apesar de compreender bem com boa interação e com melhora no comportamento. Tem dispraxia construtiva, só desenha círculos, e, também tem apraxia oral, não assopra e não solta beijo. Apresenta ainda, dificuldade de aprendizado, assim o paciente está sendo alfabetizado por meio do computador e por letras móveis, o que possibilitou a ele ler e digitar palavras e textos. Aos sete anos, foi investigado e diagnosticado com hipotireoidismo. A investigação da história familiar revelou que a mãe teve uma crise febril seguida de queda aos dois anos de idade, a irmã mais velha do paciente teve uma crise febril com um ano de idade, e um primo materno de primeiro grau apresentou crises de ausências no período entre dois e quatro anos de idade (ver detalhes no heredograma – figura 11.A Família 7).

A análise de *WES* revelou uma mutação de ponto em heterozigose no gene *SCN1A* ainda não descrita no espectro *GEFS+*. Na mutação apresentada, ocorre a troca de *A>G* no códon 4961 (*c.4961 A>G*) repercutindo na troca do aminoácido Lisina por Arginina (*p.K1654R*), entretanto esta alteração ainda não foi descrita na literatura e nos bancos de dados públicos. Para validar essa variante, o sequenciamento tradicional pelo método de Sanger foi realizado para o paciente, genitores, irmã e tio, mesma que foi confirmada no paciente e na mãe dele (Figura 10), caracterizando esta mutação como herdada, ou seja, de herança materna, a variante não foi relatada até o momento em banco de dados ou na literatura.

A *CMA* do paciente revelou ainda a deleção genômica importante, sendo considerada uma variação de número de cópias (do inglês, *copy number variations* – *CNV*) patogênica. A *CNV* patogênica do paciente aqui descrito, trata-se de uma deleção intersticial de aproximadamente 9,8 Mb no braço longo do cromossomo 7, envolvendo as bandas q33-q35 (arr[GRCh37] 7q33q35(136901668_146708552)x1). Alterações neste locus tem sido associada a alterações severas da linguagem como rasgo fenotípico característico. A discussão destes achados se apresenta na secção de discussão.

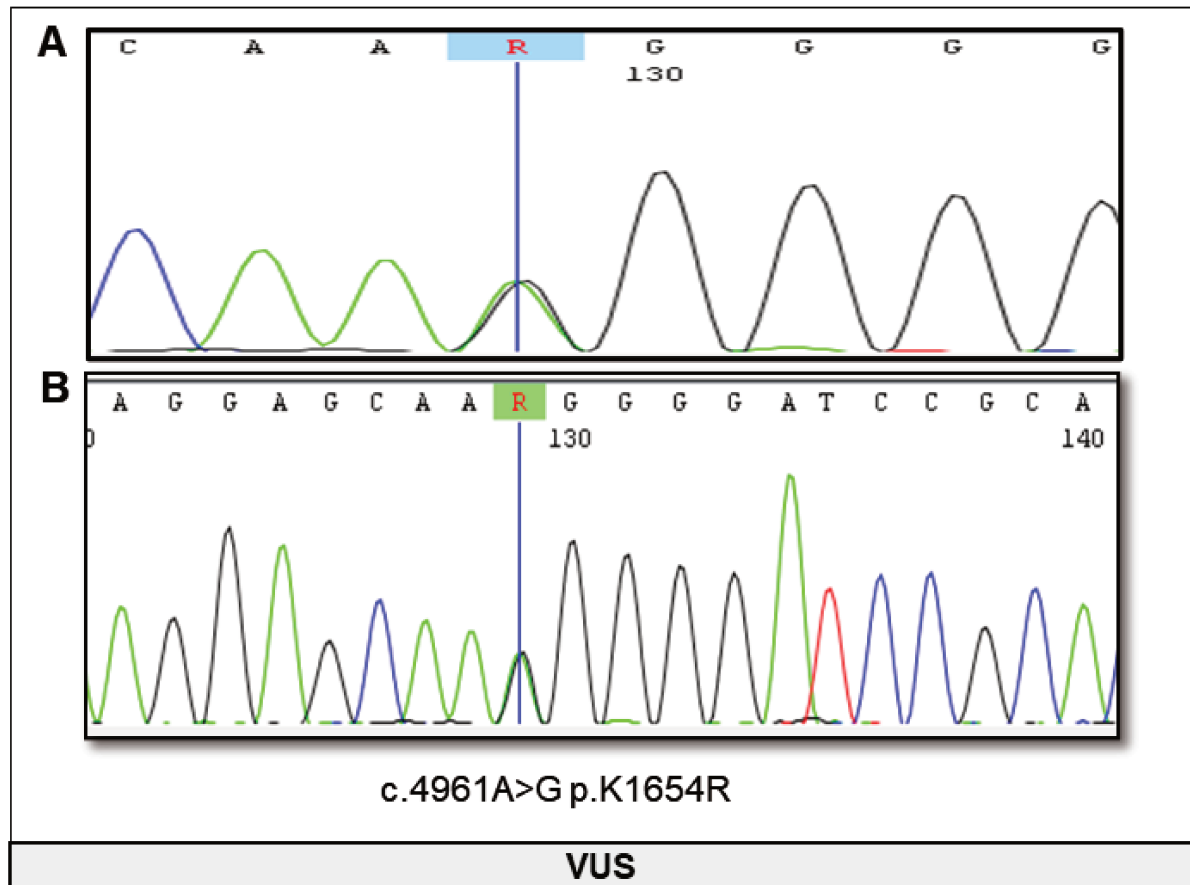


Figura 10. Alteração genética no gene SCN1A (VUS) paciente III-5 da família número 7 de herança materna. A= paciente; B= mãe do paciente.

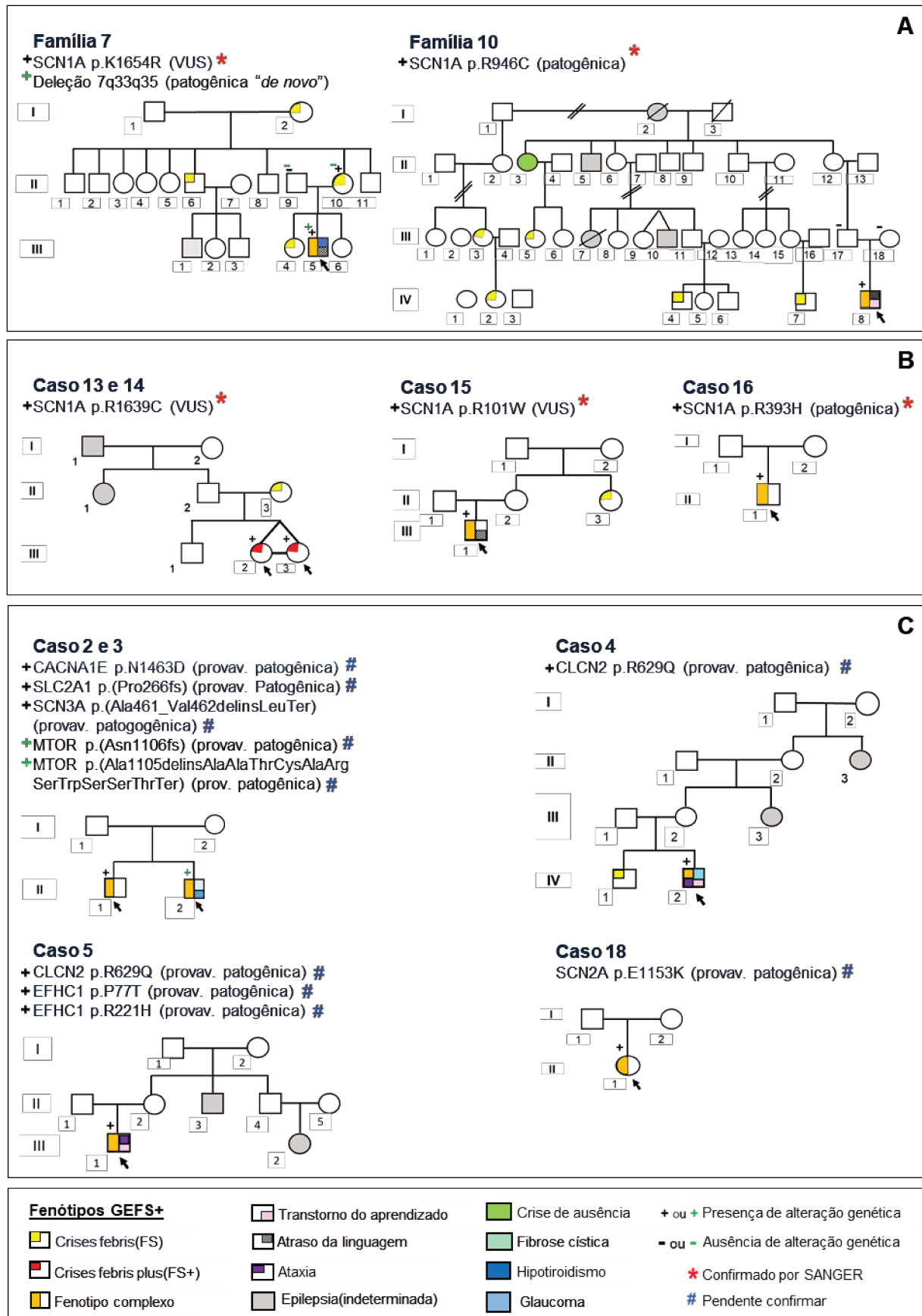


Figura 11. Heredogramas coorte de estudo de pacientes com GEFS+. A. Análises familiar. A - B. Alterações genéticas validadas por Sanger. C. Alterações genéticas com pendência de validação.

Tabela 10. Resumo das características clínicas dos pacientes com GEFS+.

No. Caso	Gênero / idade	Idade avaliação (anos)	Data início crises	DIC meses	Crises febris (F) / afebril (AF)	Tipo de crise	Desenvolvimento	Neuroimagem	HF epilepsia	Fenótipo	Comorbidades
1	F/13 ^a	13	1a6m	18	F/AF	C, F	TEA + atraso da linguagem	CT: normal	+	FS+	-----
2	M/18	20	3 m	3	F	TCG, M, AT, A, Fo	Normal	Leve AHE	+	FS+ com outras crises generalizadas e crises focais	-----
3	M/20	18	24m	24	F	TCG, M, EP	Normal	Leve AHE	+	FS+ com outras crises generalizadas	Glaucoma
4	M/17 ^a	17	1a3m	15	F/AF	TCG, M, Fo	TEA	Normal	+	FS+ com outras crises generalizadas e crises focais	Fibrose cística
5	M/17 ^a	17	11m	11	F/AF	TCG, A, M, CQ	TEA + ataxia	Normal	+	FS+ com outras crises generalizadas	-----
6	F/7 ^a	7	3 ^a	36	F/AF	Hemiclônia D, CQ	TEA + ataxia	Normal	+	FS+ com outras crises generalizadas	-----
7	M/7 ^a	7	6m	6	F/AF	TCG, AT, M, A, Fo	TEA + afasia	Normal	+	FS+ com outras crises generalizadas e crises focais	Hipotireoidismo
8	M/9 ^a	9	1a7m	19	F/AF	Fo. Discognitiva	TEA	Normal	-	FS+ com crises focais	-----
9	M/3 ^a	3	1a4m	16	F/AF	TCG, A, Fo	Normal	Normal	+	FS+ com outras crises generalizadas e crises focais	-----
10	F/5 ^a	5	7m	7	F/AF	TCG, M, A,	TEA + atraso da linguagem	Normal	+	FS+ com outras crises generalizadas	-----
11	F/5 ^a	5	10m	10	F/AF	TCG, C, A	TEA + atraso da linguagem	Normal	+	FS+ com outras crises generalizadas e crises focais	-----
12	M/12 ^a	12	3 ^a	36	F	TCG, Fo	TEA	CT: normal	+	FS+ com crises focais	-----
13	F/5 ^a	5	7m	7	F/AF	TCG	Normal	Hipersinal porção ant. corno ventricular	+	FS+	-----
14	F/5 ^a	5	10m	10	F	TCG	Normal	SD	+	FS+	-----
15	M/4 ^a	4	5m	5	F/AF	TCG, A	Atraso da linguagem	Normal	+	FS+ com outras crises generalizadas	-----
16	M/9 ^a	9	6m	6	F/AF	TCG, Fo	TEA + ataxia	CT: normal	-	FS+ com crises focais	-----
17	F/6 ^a	6	2a8m	32	F	TCG	Normal	SD	-	FS+	Fibrose cística
18	F/8a	8	5 ^a	60	F	TCG	Normal	Normal	SD	FS+	-----
19	M/16 ^a	16	3m	3	F/AF	TCG	TEA	Normal	+	FS+	-----

F: febril; **AF:** afebril; **a:** anos; **m:** meses; **TCG:** tônico-clônica generalizada; **M:** mioclônica; **T:** tônica; **AT:** atônica; **C:** clônicas; **Fo:** focal; **A:** ausência; **EP:** espasmos; **CQ:** crises de queda; **SD:** sem dados; **TEA:** transtorno específico do aprendizado; **MR:** ressonância magnética de crânio; **CT:** tomografia de crânio; **D:** direita; **AHE:** atrofia de hipocampo esquerdo; **HF:** histórico familiar.

5. DISCUSSÃO

5.1. HETEROGENEIDADE CLÍNICA

O espectro fenotípico de *GEFS+* tem mudado significativamente ao longo dos anos, cuja descrição é muito mais ampla do concebido inicialmente (1), e além das crises febris tônico-clônicas generalizadas; as crises mioclônicas, ausências, crises TCG afebris e crises focais tem sido descritas e aceitas dentro do espectro fenotípico do *GEFS+* (8-10), o que levou a à necessidade de uma classificação fenotípica mais abrangente: *FS* (crises febris), *FS+* (crises febris *plus*) e Fenótipo complexo, este último quando *FS* ou *FS+* se apresenta com outros tipos de crises (mioclônicas, ausências, atônicas, e focais) (40) (Tabela 1). Ainda assim, o fenótipo mais frequente continua sendo *FS* (44%), seguido de *FS+* (27%) (6). Ao contrário do relatado na literatura, na nossa coorte de 19 pacientes com *GEFS+*, o fenótipo mais frequente foi o fenótipo complexo (68%, n=13/19), seguido do *FS+* (31,6%, n=6/19), isto provavelmente ocorreu devido as características dos centros de atenção onde foram recrutados os pacientes, os quais usualmente atendem pacientes que requerem atenção especializada com espectros clínicos mais complexos, onde geralmente os pacientes com espectros clínicos mais leves não procuram, ou não são remitidos para o atendimento.

5.2. FREQUÊNCIA DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS

Segundo um amplo estudo publicado por Zhang et al, no ano 2017 (6), mundialmente foi estudado cerca de 160 famílias com *GEFS+*, nas quais aproximadamente 31% possuíam uma variante patogênica em um gene conhecido e associado com o fenótipo da síndrome, principalmente nos genes *SCN1A* (19%), *SCN1B* (8%) e *GABRG2* (9%). Nós encontramos alterações genéticas patogênicas ou provavelmente patogênicas em 36,8% (n=7/19) dos casos. Destes pacientes, o 42,9% (n=3/7) foram alterações genéticas nos genes geralmente associados com fenótipo *GEFS+*: duas patogênicas do tipo *missense* no gene *SCN1A* em dois pacientes (28,6%) com fenótipo complexo (caso 10 -*p.R946C* [fenótipo de *FS+* com outros tipos de crises generalizadas]; caso 16 -*p.R393H* [fenótipo de *FS+* com crises focais]), e uma alteração provavelmente patogênica no gene *SCN2A* *p.E1153K* em um paciente (14,3%) com *FS* (Figura 11). O 57,1% restante (n=4/7) tiveram

alterações genéticas provavelmente patogênicas em genes que tem sido associados principalmente com fenótipos de outros tipos de epilepsias genéticas generalizadas (42,9%, n=3/7) (*EFHC1*, *CLCN2* e *SLC2A1*) (51-55) e encefalopatias epiléticas na infância (28,6%, n=2/7) (*MTOR*, *SCN3A*, *CACNA1E*) (56- 58), todos os pacientes portadores destas alterações apresentaram o fenótipo *FS+* com outras crises generalizadas (ausências, mioclônicas, tônicas, clônicas, atônicas) e/ou focais (alterações ainda não confirmadas por *Sanger*). Nossos achados podem estar relacionados com a natureza da nossa coorte de estudo, que apresenta em 68,4% (n=13/19) um fenótipo complexo (Tabela 9), ou mesmo com uma provável natureza de fenótipos heterogêneos intrafamiliares dos casos estudados, cuja sobreposição fenotípica, especialmente entre *GEFS+* e as epilepsias generalizadas clássicas já vinha sendo relatado nas últimas duas décadas (9,8,10), porém essa sobreposição parece ser consideravelmente maior do que se pensava, cujos dados clínicos e moleculares sugerem que os dois principais grupos de epilepsias generalizadas compartilham determinantes genéticos, e que nas famílias com *GEFS+* até um 5% dos indivíduos afetados, podem ter principalmente epilepsia de ausência na infância ou epilepsia de mioclônica juvenil (6). Devido a limitações, em nosso estudo só foi possível fazer uma análise familiar mais detalhada, em dois pacientes da nossa coorte que apresentaram alterações no gene *SCN1A*. Não foi possível fazer a verificação aprofundada da genealogia dos casos com mutações em genes diferentes aos geralmente relatados nas famílias com *GEFS+*, porque a maioria dos pacientes nos quais encontramos estas alterações genéticas já se encontravam no banco de dados de nosso laboratório, e atualizar sua informação clínica e genealógica de forma personalizada e aprofundada não foi possível, embora foi tentado, por tanto, avaliar a provável heterogênea fenotípica nessas famílias e provável segregação dessas alterações genéticas, não foi possível. No caso das alterações no gene *EFHC1* deve ser olhado com cautela, já que a patogenicidade das variantes neste gene como causa monogênica de epilepsia é controversa (59), e a superestimação do seu potencial efeito genótipo-fenótipo pode influir negativamente nas decisões clínicas e atendimento dos pacientes (60), no entanto seu estudo para fins de pesquisa é sugerido e necessário para acrescentar evidência científica que ajude na melhor compressão do seu papel no desenvolvimento de epilepsia.

5.3. ANÁLISES GENÉTICA POR SEQUENCIAMENTO DE EXOMA COMPLETO – WES

A maioria dos estudos genéticos em famílias com *GEFS+* publicados, tem sido focados na procura de variantes em painéis predefinidos de genes bem estabelecidos com a associação do fenótipo *GEFS+*, principalmente em genes que atuam nos canais de sódio e receptores gabaérgicos (6), o que limita a possibilidade de achar outras alterações, sejam novas ou já descritas em outras doenças, que poderiam atuar como alterações genéticas causais, ou mesmo alterações poligênicas que justifiquem a heterogeneidade fenotípica observada nas famílias com *GEFS+*, um questionamento feito desde os estudos fenotípicos e genotípicos iniciais da síndrome (23). Nesse sentido o surgimento das tecnologias de sequenciamento de nova geração (do inglês: *next-generation sequencing* – *NGS*), especialmente a análise de exoma completo (do inglês: *whole-exome sequencing* – *WES*), tem aberto uma ampla janela de possibilidades, como o aumento da porcentagem de rendimento de diagnóstico molecular (61), assim como novos (18) ou adicionais fatores de risco genético em epilepsias genéticas comuns, com a possibilidade de expandir as variantes alvos a serem analisadas de acordo com o desejado, possível e planejado, sendo mais importante ainda, o fato de ser possível uma reanálise do conjunto de dados direcionando para outros alvos ou objetivos, o que é impossível com a metodologia de painéis fixos no número de genes (61).

Um estudo feito na Corei do Sul, em indivíduos com síndromes de epilepsia genética generalizada (EGG) utilizando sequenciamento de exoma completo (*WES*), realizou a análise focada em potenciais genes candidatos ou de susceptibilidade, sendo 51 genes relacionados com EGG e 61 genes relatados em outras epilepsias com crises de ausência, mioclônicas e tônico-clônicas generalizadas, encontrando que 27% das variantes encontradas pertenciam a genes que estavam relacionados com outros tipos de epilepsia genética, reforçando a hipótese de que geralmente genes conhecidos em vez de novos genes (desconhecidos) são os responsáveis pelas síndromes comuns das EGG (56). Nós observamos que das 12 variantes genéticas encontradas em 7 pacientes, apenas 25% ($n=3/12$) foram encontradas nos genes que tem uma associação conhecida com o fenótipo *GEFS+*; e o restante de 75% pertencem a variantes em genes associados com fenótipos de epilepsias genéticas generalizadas (41,7%) e genes relatados em pacientes com fenótipos de encefalopatias epiléticas (33,3%) (Figura 6), achados que podem ser explicados

devido a uma porcentagem maior de pacientes do fenótipo complexo analisados em nosso estudo, e a possível heterogeneidade fenotípica. Além disso, estes achados poderiam também estar relacionados com a investigação abrangente de alterações patogênicas e provavelmente patogênicas, o que foi possível fazer por meio da análise *WES*, avaliando 178 genes candidatos adicionais aos relacionados aos pacientes com *GEFS+* e que têm sido relacionados com outros tipos de epilepsia genética (tabela 2). Isto, poderia apoiar o sugerido por outros autores (6,8- 10), de que os pacientes com *GEFS+* compartilham determinantes genéticas com outros tipos de epilepsias genéticas, especialmente com o grupo de epilepsias genéticas generalizadas (EGG), além das alterações genéticas comuns já conhecidas compartilhadas entre os pacientes com *GEFS+* e outros com alguns tipos de encefalopatia epilética, como as Síndromes de *Dravet* e *Doose* (5).

Além das variantes patogênicas e provavelmente patogênicas, identificamos em outros quatro pacientes (21,1%), três variantes de significado incerto (*VUS*) que consideramos relevantes baseados em critérios clínicos e fenotípicos, sendo que duas delas não têm sido relatadas na literatura e tem segregação familiar em pacientes com fenótipos *FS+* (caso 13 e 14 [gêmeas]= *SCN1A p.R1639C*; caso 7= *SCN1A p.K1654R*), e a outra não se teve acesso aos materiais biológicos de outros membros da família afetados para conferir a presença ou não da alteração, entretanto, esta alteração já tem sido descrita na literatura sendo associada ao fenótipo *GEFS+* (caso 15= *SCN1A p.R101W*) (35,62-67), porém não preenche os critérios robustos suficientes para considerar sua patogenicidade. Assim, de modo geral, encontramos alterações genéticas de interesse no gene *SCN1A* que podem ter correlação com o fenótipo em 6 de um total de 19 pacientes (31.5%) com *GEFS+*. É importante mencionar ainda que, as recomendações do *ACMG/AMP* são de extrema importância na classificação de patogenicidade de variantes identificadas em genes que causam distúrbios mendelianos (43), a classificação e relato de uma variante de significado incerto (*VUS*) deve ser avaliada e julgada com cautela no cenário clínico, visto que com o aumento do conhecimento ao longo dos anos de fenótipos relacionados a diferentes doenças genéticas, a reanálise do exoma pode alterar a interpretação clínica de uma *VUS* (68).

5.4. ALTERAÇÕES POLIGÊNICAS EM PACIENTES COM GEFS+ MIMETIZANDO ENCEFALOPATIA EPILEPTICA

Na nossa coorte de estudo, nós destacamos o caso número 7. Trata-se de um paciente com 7 anos de idade no momento da avaliação, com fenótipo de *FS+* com outras crises generalizadas, além de TEA moderado e afasia. O início de crises febris se deu aos 6 meses de vida e afebris aos 7 meses, sem crises epiléticas desde os 5 anos de idade, porém sem desenvolvimento de fala (afasia) e pertencente a uma família com cinco pessoas afetadas da linha materna em três gerações, quatro com convulsões febris e uma com crises de ausência (padrão de herança autossômica dominante). Após a análise *WES*, foi encontrada uma mutação de ponto em heterozigose do tipo *missense* no gene *SCN1A p.K1654R*, alteração presente no paciente e na mãe (Figura 10). A *CMA* revelou uma *CNV* de aproximadamente 9,8 Mb, revelando uma deleção intersticial no braço longo do cromossomo 7, envolvendo as bandas q33-q35 (arr[GRCh37] 7q33q35(136901668_146708552)x1), alteração confirmada por cariótipo de sangue periférico com banda G e ausente nos progenitores (Figura 9).

A *CNV* (deleção 7q33q35) foi classificada como patogênica “*de novo*”, e a mutação no gene *SCN1A p.K1654R* como de significado incerto (*VUS*), segundo os critérios da ACMG/AMP (43,69). A *CMA* encontrada é uma deleção genômica importante. As deleções, também conhecidas como monossomias, são caracterizadas pela perda total ou parcial de segmentos genômicos/cromossômicos, que levam à haploinsuficiência de loci e podem contribuir para condições genéticas específicas (70). Entretanto, deleções intersticiais envolvendo o braço longo do cromossomo 7 têm sido raramente relatadas na literatura (71). Essa deleção encontrada em nosso paciente compreende 109 genes, dos quais 56 genes já estão registrados na base de dados *Online Mendelian Inheritance in Man® (OMIM®)*, e apesar da maioria dos genes contidos nessa deleção ainda não possuírem função conhecida ou sensibilidade a dosagem bem estabelecida, a *CNV* encontrada mostra que houve a interrupção do gene *CNTNAP2* pela deleção dos três primeiros exons. Este gene é altamente expresso no córtex cerebral em áreas envolvidas com função de linguagem (72,73) e tem sido descrito como gene candidato na apraxia infantil da fala e no comprometimento específico da linguagem (74,75), manifestações clínicas presentes em nosso paciente. Com relação à mutação *missense* no gene *SCN1A p.K1654R*, apesar de ter sido classificada como *VUS* segundo os critérios da

ACMG/AMP (43), as mutações no gene *SCN1A* são as mais frequentemente descritas com o espectro *GEFS+* (6), e essa variante encontrada neste paciente e na mãe dele, não foi relatada até o momento em banco de dados ou na literatura, por tanto, dada a apresentação fenotípica epiléptica clássica do paciente no contexto familiar de *GEFS+* e cujas alterações genéticas na *CNV* não conseguem explicar, a variante no *SCN1A*, poderiam sim, ser a responsável pelo fenótipo *GEFS+* apresentado neste caso.

Assim, o paciente aqui relatado apresenta alterações genéticas concomitantes, não relacionadas, sendo uma variante no gene *SCN1A* que sugere a causa do espectro *GEFS+* e a *CNV* patogênica (deleção “*de novo*” 7q33q35) que sugere relação com o restante do quadro clínico do paciente, visto que tais características não têm sido relatadas em outros pacientes com *GEFS+*. Por tanto, nós sugerimos que, na presença de pacientes no contexto familiar de *GEFS+* clássico, com alteração genética em genes previamente descritos para o fenótipo, com segregação demonstrada, porém com uma condição concomitante importante, como transtorno específico do aprendizado – TEA severo e/ou transtorno grave da linguagem sem que exista uma clara relação com a frequência e severidade das crises epiléticas, como provável causa desses transtornos em suas formas severa, poderia ser importante suspeitar e investigar outras alterações genéticas simultâneas e não relacionadas (em diferentes cromossomos), que possam explicar a variável expressão fenotípica do paciente, como exposto em nosso caso.

5.5. RELEVÂNCIA CLÍNICA E LIMITAÇÕES

A atenção especializada dos pacientes com *GEFS+* geralmente é negligenciada, por se tratar de um tipo de epilepsia que de modo geral tem bom prognóstico, não realizando um estudo clínico aprofundado, muito menos a pesquisa de suas prováveis etiologias genéticas, essa dificuldade de acesso aos pacientes com fenótipo leves do espectro *GEFS+*, se traduz em um processo mais lento de realização de estudos científicos que permitam avançar na melhor compreensão da doença, as características moleculares e seu impacto clínico. No entanto, a triagem de alterações genéticas em etapas precoces da doença pode influir de forma importante na terapia antiepilética adequada, prognóstico e assessoramento genético (11). Apesar de ser sugerido que as convulsões febris não têm

consequências a longo prazo na cognição, infelizmente cerca de 40% das crianças com uma primeira crise febril terão recorrência (3), e, no contexto de pacientes com *GEFS+*, onde geralmente os pacientes têm crises febris recorrentes pelo menos até os 5 anos de idade, aproximadamente 19% dos casos terão uma mutação no gene *SCN1A* (6) e um tratamento com medicação contraindicada poderia piorar a frequência e gravidade das crises epiléticas, o que provavelmente possa ter um efeito negativo no desenvolvimento cognitivo, principalmente nos primeiros 5 anos de vida (76). Além disso, o tratamento oportuno em etapas iniciais da doença, poderia limitar o potencial desenvolvimento na idade adulta de esclerose do hipocampo, já que convulsões febris prolongadas podem levar a esclerose mesial temporal e epilepsia do lobo temporal (ELT), embora, o grau de risco permaneça incerto (3), a relação entre crises febris e epilepsia do lobo temporal (ELT) estão sendo progressivamente esclarecidos (77,78).

Com relação à metodologia de investigação de alterações genéticas, um estudo de meta-análise realizado em 2019, aponta o *WES* como o teste de primeira triagem para o diagnóstico clínico, no caso de indivíduos com distúrbios do neurodesenvolvimento – *NDDs* (do inglês: *neurodevelopmental disorders*), demonstrando que o rendimento diagnóstico do *WES* supera consistentemente o da *CMA* (31-53% e 15-20%, respectivamente), propondo um algoritmo de diagnóstico que coloca o *WES* no início da avaliação (68). Em nosso caso, pela natureza das características genotípicas do *GEFS+*, onde o fenótipo geralmente é explicado por alterações de ponto (monogênicas), a análise de *WES*, é, sem dúvida mais eficiente do que a *CMA*. Entretanto, a combinação da análise *WES* no início, seguido da *CMA*, pode ser de grande relevância nos casos de pacientes com *GEFS+* com fenótipo pouco claro, podendo evidenciar alterações genéticas concomitantes não relacionadas, onde convergem alterações de ponto e *CNVs* relevantes, como no caso apresentado na nossa casuística (número 7). Ainda que estes casos possam ser excepcionais, a ampla compreensão da correlação fenótipo-genótipo desses tipos de pacientes, poderiam apoiar significativamente a reorientação do manejo clínico, além de ser de extrema importância para uma família angustiada na procura de respostas.

6. CONCLUSÃO

- a) Utilizando o sequenciamento do exoma associado a uma análise focada em painéis multigênicos abrangentes associados com o fenótipo *GEFS+* e com outras epilepsias na infância, nós permitiu encontrar alterações genéticas patogênicas ou provavelmente patogênicas em 36,8% (n=7/19) dos pacientes com *GEFS+* recrutados para nosso estudo. Nossa positividade diagnóstica foi, portanto, maior do que o relatado na literatura (30%).
- b) Na maioria dos pacientes com alterações genéticas provavelmente patogênicas (57%, n=4/7), foram encontradas mutações em genes associados a outros tipos de epilepsias generalizadas e encefalopatia epilética. Achados que podem estar relacionados com a natureza da nossa coorte de estudo, que apresenta 68,4% (n=13/19) de pacientes com fenótipo complexo (*FS+* com outros tipos de crises generalizadas – mioclônicas, ausências, atônicas e focais). Ainda assim, de acordo com esses achados, consideramos relevante que a investigação de alterações genéticas, quando possível, seja ampliada para genes de outras epilepsias na infância, especialmente para síndromes de epilepsia genética generalizada e encefalopatias epiléticas como as Síndromes de *Dravet* e *Doose*, onde a sobreposição fenotípica com *GEFS+* está sendo cada vez mais evidente por estudos genéticos e clínicos.
- c) Baseado em nossos achados, sugerimos que para pacientes no contexto familiar de *GEFS+* clássico, ,porém com comprometimento grave da linguagem ou de aprendizagem, sem correlação direta com a frequência e severidade das crises epiléticas, seja considerado também a procura por outras alterações genéticas simultâneas e não relacionadas (em diferentes cromossomos), que possam explicar a variedade de expressão fenotípica.

7. REFERÊNCIAS

1. Scheffer IE, Berkovic SF. Generalized epilepsy with febrile seizures plus. A genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes. *Brain*. 1997;120 (Pt 3):479-490. doi:10.1093/brain/120.3.479
2. Bureau, M., Genton, P., Dravet, C., Delgado-Escueta, A., Tassinari, C. A., Thomas, P., & Wolf, P. (2015). Síndromes epilépticos en lactantes niños y adolescentes (5a Ed.). John Libbey Eurotext Ltd. (pp. 179-192).
3. Camfield P, Camfield C. Febrile seizures and genetic epilepsy with febrile seizures plus (*GEFS+*). *Epileptic Disord*. 2015;17(2):124-133. doi:10.1684/epd.2015.0737
4. Singh R, Scheffer IE, Crossland K, Berkovic SF. Generalized epilepsy with febrile seizures plus: a common childhood-onset genetic epilepsy syndrome. *Ann Neurol*. 1999;45(1):75-81. doi:10.1002/1531-8249(199901)45:1<75::aid-art13>3.0.co;2-w
5. Singh R, Andermann E, Whitehouse WP, et al. Severe myoclonic epilepsy of infancy: extended spectrum of *GEFS+*?. *Epilepsia*. 2001;42(7):837-844. doi:10.1046/j.1528-1157.2001.042007837.x
6. Zhang YH, Burgess R, Malone JP, et al. Genetic epilepsy with febrile seizures plus: Refining the spectrum. *Neurology*. 2017;89(12):1210-1219. doi:10.1212/WNL.0000000000004384
7. "Abou-Khalil B, Ge Q, Desai R, Ryter BS, Bazyk MS, Bailey R, et al. Partial and generalized epilepsy with febrile seizures plus and a novel SCN1A mutation. *Neurology* 2001; 57: 2265-72. DOI: <https://doi.org/10.1212/WNL.57.12.2265>"
8. Marini C, Harkin LA, Wallace RH, Mulley JC, Scheffer IE, Berkovic SF. Childhood absence epilepsy and febrile seizures: a family with a GABA(A) receptor mutation. *Brain*. 2003;126(Pt 1):230-240. doi:10.1093/brain/awg018
9. Bonanni P, Malcarne M, Moro F, et al. Generalized epilepsy with febrile seizures plus (*GEFS+*): clinical spectrum in seven Italian families unrelated to SCN1A, SCN1B, and GABRG2 gene mutations. *Epilepsia*. 2004;45(2):149-158. doi:10.1111/j.0013-9580.2004.04303.x

10. Kivity S, Oliver KL, Afawi Z, et al. SCN1A clinical spectrum includes the self-limited focal epilepsies of childhood. *Epilepsy Res.* 2017;131:9-14. doi:10.1016/j.epilepsyres.2017.01.012
11. Myers KA, Burgess R, Afawi Z, et al. De novo SCN1A pathogenic variants in the *GEFS+* spectrum: Not always a familial syndrome. *Epilepsia.* 2017;58(2):e26-e30. doi:10.1111/epi.13649
12. Wallace RH, Wang DW, Singh R, et al. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel beta1 subunit gene SCN1B. *Nat Genet.* 1998;19(4):366-370. doi:10.1038/1252
13. Escayg A, MacDonald BT, Meisler MH, et al. Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with *GEFS+2*. *Nat Genet.* 2000;24(4):343-345. doi:10.1038/74159
14. Sugawara T, Tsurubuchi Y, Agarwala KL, et al. A missense mutation of the Na⁺ channel alpha II subunit gene Na(v)1.2 in a patient with febrile and afebrile seizures causes channel dysfunction [published correction appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Aug 28;98(18):10515]. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(11):6384-6389. doi:10.1073/pnas.111065098
15. Singh NA, Pappas C, Dahle EJ, et al. A role of SCN9A in human epilepsies, as a cause of febrile seizures and as a potential modifier of Dravet syndrome. *PLoS Genet.* 2009;5(9):e1000649. doi:10.1371/journal.pgen.1000649
16. Baulac S, Huberfeld G, Gourfinkel-An I, et al. First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. *Nat Genet.* 2001;28(1):46-48. doi:10.1038/ng0501-46
17. Brunklaus A, Ellis R, Stewart H, et al. Homozygous mutations in the SCN1A gene associated with genetic epilepsy with febrile seizures plus and Dravet syndrome in 2 families. *Eur J Paediatr Neurol.* 2015;19(4):484-488. doi:10.1016/j.ejpn.2015.02.001
18. Schubert J, Siekierska A, Langlois M, et al. Mutations in STX1B, encoding a presynaptic protein, cause fever-associated epilepsy syndromes. *Nat Genet.* 2014;46(12):1327-1332. doi:10.1038/ng.3130
19. Eckle VS, Shcheglovitov A, Vitko I, et al. Mechanisms by which a CACNA1H mutation in epilepsy patients increases seizure susceptibility. *J Physiol.* 2014;592(4):795-809. doi:10.1113/jphysiol.2013.264176

20. Dibbens LM, Reid CA, Hodgson B, et al. Augmented currents of an HCN2 variant in patients with febrile seizure syndromes. *Ann Neurol*. 2010;67(4):542-546. doi:10.1002/ana.21909
21. Puranam RS, He XP, Yao L, et al. Disruption of Fgf13 causes synaptic excitatory-inhibitory imbalance and genetic epilepsy and febrile seizures plus. *J Neurosci*. 2015;35(23):8866-8881. doi:10.1523/JNEUROSCI.3470-14.2015
22. Lopes-Cendes I, Scheffer IE, Berkovic SF, Rousseau M, Andermann E, Rouleau GA (1996) Mapping a locus for idiopathic generalized epilepsy in a large multiplex family. *Epilepsia* 37 Suppl 5:127 <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1996.tb01722.x>
23. Lopes-Cendes I, Scheffer IE, Berkovic SF, Rousseau M, Andermann E, Rouleau GA. A new locus for generalized epilepsy with febrile seizures plus maps to chromosome 2. *Am J Hum Genet*. 2000;66(2):698-701. doi:10.1086/302768
24. Moulard B, Guipponi M, Chaigne D, Mouthon D, Buresi C, Malafosse A. Identification of a new locus for generalized epilepsy with febrile seizures plus (*GEFS+*) on chromosome 2q24-q33. *Am J Hum Genet*. 1999;65(5):1396-1400. doi:10.1086/302621
25. Peiffer A, Thompson J, Charlier C, et al. A locus for febrile seizures (FEB3) maps to chromosome 2q23-24. *Ann Neurol*. 1999;46(4):671-678. doi:10.1002/1531-8249(199910)46:4<671::aid-ana20>3.0.co;2-5
26. Baulac S, Gourfinkel-An I, Picard F, et al. A second locus for familial generalized epilepsy with febrile seizures plus maps to chromosome 2q21-q33. *Am J Hum Genet*. 1999;65(4):1078-1085. doi:10.1086/302593
27. Dravet C. The core Dravet syndrome phenotype. *Epilepsia*. 2011;52 Suppl 2:3-9. doi:10.1111/j.1528-1167.2011.02994.x
28. Helbig I. Genetic Causes of Generalized Epilepsies. *Semin Neurol*. 2015;35(3):288-292. doi:10.1055/s-0035-1552922
29. Ito M, Shirasaka Y, Hirose S, Sugawara T, Yamakawa K. Seizure phenotypes of a family with missense mutations in SCN2A. *Pediatr Neurol*. 2004;31(2):150-152. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2004.02.013
30. Shi X, Yasumoto S, Nakagawa E, Fukasawa T, Uchiya S, Hirose S. Missense mutation of the sodium channel gene SCN2A causes Dravet syndrome. *Brain Dev*. 2009;31(10):758-762. doi:10.1016/j.braindev.2009.08.009

31. Shi X, Yasumoto S, Kurahashi H, et al. Clinical spectrum of SCN2A mutations. *Brain Dev.* 2012;34(7):541-545. doi:10.1016/j.braindev.2011.09.016
32. Mulley JC, Hodgson B, McMahon JM, et al. Role of the sodium channel SCN9A in genetic epilepsy with febrile seizures plus and Dravet syndrome. *Epilepsia.* 2013;54(9):e122-e126. doi:10.1111/epi.12323
33. Cen Z, Lou Y, Guo Y, Wang J, Feng J. Q10R mutation in SCN9A gene is associated with generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Seizure.* 2017;50:186-188. doi:10.1016/j.seizure.2017.06.023
34. Martin MS, Tang B, Papale LA, Yu FH, Catterall WA, Escayg A. The voltage-gated sodium channel Scn8a is a genetic modifier of severe myoclonic epilepsy of infancy. *Hum Mol Genet.* 2007;16(23):2892-2899. doi:10.1093/hmg/ddm248
35. Hawkins NA, Martin MS, Frankel WN, Kearney JA, Escayg A. Neuronal voltage-gated ion channels are genetic modifiers of generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Neurobiol Dis.* 2011;41(3):655-660. doi:10.1016/j.nbd.2010.11.016
36. Audenaert D, Schwartz E, Claeys KG, et al. A novel GABRG2 mutation associated with febrile seizures. *Neurology.* 2006;67(4):687-690. doi:10.1212/01.wnl.0000230145.73496.a2
37. Sun H, Zhang Y, Liang J, et al. SCN1A, SCN1B, and GABRG2 gene mutation analysis in Chinese families with generalized epilepsy with febrile seizures plus. *J Hum Genet.* 2008;53(8):769-774. doi:10.1007/s10038-008-0306-y
38. Boillot M, Morin-Brureau M, Picard F, et al. Novel GABRG2 mutations cause familial febrile seizures. *Neurol Genet.* 2015;1(4):e35. Published 2015 Nov 4. doi:10.1212/NXG.0000000000000035
39. Dibbens LM, Feng HJ, Richards MC, et al. GABRD encoding a protein for extra- or peri-synaptic GABAA receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies. *Hum Mol Genet.* 2004;13(13):1315-1319. doi:10.1093/hmg/ddh146
40. Myers KA, Scheffer IE, Berkovic SF; ILAE Genetics Commission. Genetic literacy series: genetic epilepsy with febrile seizures plus. *Epileptic Disord.* 2018;20(4):232-238. doi:10.1684/epd.2018.0985
41. "Borgues MG. Aplicação de protocolos e métodos em bioinformática para análise de sequenciamento de Exomas Humanos [dissertation]. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas; 2015."
42. Borges Murilo G., Rocha Cristiane S., Carvalho Benilton S., Lopes-Cendes Iscia. Methodological differences can affect sequencing depth with a possible impact on

- the accuracy of genetic diagnosis. *Genet. Mol. Biol.* [Internet]. 2020; 43(2): e20190270. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2019-0270>.
43. 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 for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-424. doi:10.1038/gim.2015.30
 44. Gonsales MC, Montenegro MA, Preto P, et al. Multimodal Analysis of SCN1A Missense Variants Improves Interpretation of Clinically Relevant Variants in Dravet Syndrome. *Front Neurol.* 2019;10:289. Published 2019 Mar 28. doi:10.3389/fneur.2019.00289
 45. Mayrhofer M, Viklund B, Isaksson A. Rawcopy: Improved copy number analysis with Affymetrix arrays. *Sci Rep.* 2016;6:36158. Published 2016 Oct 31. doi:10.1038/srep36158
 46. Olshen AB, Bengtsson H, Neuvial P, Spellman PT, Olshen RA, Seshan VE. Parent-specific copy number in paired tumor-normal studies using circular binary segmentation. *Bioinformatics.* 2011;27(15):2038-2046. doi:10.1093/bioinformatics/btr329
 47. Nilsen G, Liestøl K, Van Loo P, et al. Copynumber: Efficient algorithms for single- and multi-track copy number segmentation. *BMC Genomics.* 2012;13:591. Published 2012 Nov 4. doi:10.1186/1471-2164-13-591
 48. Pique-Regi R, Ortega A, Asgharzadeh S. Joint estimation of copy number variation and reference intensities on multiple DNA arrays using GADA. *Bioinformatics.* 2009;25(10):1223-1230. doi:10.1093/bioinformatics/btp119
 49. MOORHEAD PS, NOWELL PC, MELLMAN WJ, BATTIPS DM, HUNGERFORD DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res.* 1960;20:613-616. doi:10.1016/0014-4827(60)90138-5
 50. Sanchez O, Escobar JI, Yunis JJ. A simple G-banding technique. *Lancet* (London, England). 1973 Aug;2(7823):269. DOI: 10.1016/s0140-6736(73)93180-2.
 51. Suzuki T, Delgado-Escueta AV, Aguan K, et al. Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet.* 2004;36(8):842-849. doi:10.1038/ng1393
 52. Medina MT, Suzuki T, Alonso ME, et al. Novel mutations in Myoclonin1/EFHC1 in sporadic and familial juvenile myoclonic epilepsy. *Neurology.* 2008;70(22 Pt 2):2137-2144. doi:10.1212/01.wnl.0000313149.73035.99

53. Gaitán-Peñas H, Apaja PM, Arnedo T, et al. Leukoencephalopathy-causing CLCN2 mutations are associated with impaired Cl⁻ channel function and trafficking. *J Physiol*. 2017;595(22):6993-7008. doi:10.1113/JP275087
54. Wang D, Pascual JM, Yang H, et al. Glut-1 deficiency syndrome: clinical, genetic, and therapeutic aspects. *Ann Neurol*. 2005;57(1):111-118. doi:10.1002/ana.20331
55. Pearson TS, Akman C, Hinton VJ, Engelstad K, De Vivo DC. Phenotypic spectrum of glucose transporter type 1 deficiency syndrome (Glut1 DS). *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2013;13(4):342. doi:10.1007/s11910-013-0342-7
56. Lee CG, Lee J, Lee M. Multi-gene panel testing in Korean patients with common genetic generalized epilepsy syndromes. *PLoS One*. 2018;13(6):e0199321. Published 2018 Jun 20. doi:10.1371/journal.pone.0199321
57. Zaman T, Helbig I, Božović IB, et al. Mutations in SCN3A cause early infantile epileptic encephalopathy [published correction appears in *Ann Neurol*. 2019 Jun;85(6):948]. *Ann Neurol*. 2018;83(4):703-717. doi:10.1002/ana.25188
58. Helbig KL, Lauerer RJ, Bahr JC, et al. De Novo Pathogenic Variants in CACNA1E Cause Developmental and Epileptic Encephalopathy with Contractures, Macrocephaly, and Dyskinesias [published correction appears in *Am J Hum Genet*. 2019 Mar 7;104(3):562]. *Am J Hum Genet*. 2018;103(5):666-678. doi:10.1016/j.ajhg.2018.09.006
59. Gonsales MC, Ribeiro PAO, Betting LE, et al. Revisiting the clinical impact of variants in EFHC1 in patients with different phenotypes of genetic generalized epilepsy. *Epilepsy & Behavior* 2020, 112 (107469). <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2020.107469>.
60. Subaran, R. L., Conte, J. M., Stewart, W. C., & Greenberg, D. A. (2015). Pathogenic EFHC1 mutations are tolerated in healthy individuals dependent on reported ancestry. *Epilepsia*, 56(2), 188–194. <https://doi.org/10.1111/epi.12864>.
61. Srivastava S, Love-Nichols JA, Dies KA, et al. Meta-analysis and multidisciplinary consensus statement: exome sequencing is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with neurodevelopmental disorders. *Genet Med*. 2019;21(11):2413-2421. doi:10.1038/s41436-019-0554-6
62. Depienne C, Trouillard O, Saint-Martin C, et al. Spectrum of SCN1A gene mutations associated with Dravet syndrome: analysis of 333 patients. *J Med Genet*. 2009;46(3):183-191. doi:10.1136/jmg.2008.062323

63. Wang JW, Shi XY, Kurahashi H, et al. Prevalence of SCN1A mutations in children with suspected Dravet syndrome and intractable childhood epilepsy. *Epilepsy Res.* 2012;102(3):195-200. doi:10.1016/j.epilepsyres.2012.06.006
64. Zuberi SM, Brunklaus A, Birch R, Reavey E, Duncan J, Forbes GH. Genotype-phenotype associations in SCN1A-related epilepsies. *Neurology.* 2011;76(7):594-600. doi:10.1212/WNL.0b013e31820c309b
65. Fukuma G, Oguni H, Shirasaka Y, et al. Mutations of neuronal voltage-gated Na⁺ channel alpha 1 subunit gene SCN1A in core severe myoclonic epilepsy in infancy (SMEI) and in borderline SMEI (SMEB). *Epilepsia.* 2004;45(2):140-148. doi:10.1111/j.0013-9580.2004.15103.x
66. Harkin LA, McMahon JM, Iona X, et al. The spectrum of SCN1A-related infantile epileptic encephalopathies. *Brain.* 2007;130(Pt 3):843-852. doi:10.1093/brain/awm002
67. Heron SE, Scheffer IE, Iona X, et al. De novo SCN1A mutations in Dravet syndrome and related epileptic encephalopathies are largely of paternal origin. *J Med Genet.* 2010;47(2):137-141. doi:10.1136/jmg.2008.065912
68. Wright CF, FitzPatrick DR, Firth HV. Paediatric genomics: diagnosing rare disease in children [published correction appears in *Nat Rev Genet.* 2018 Feb 19;:]. *Nat Rev Genet.* 2018;19(5):253-268. doi:10.1038/nrg.2017.116
69. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST; Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med.* 2011;13(7):680-685. doi:10.1097/GIM.0b013e3182217a3a
70. Gardner RJM, Sutherland GR, Shaffer LG (2011) Chromosome abnormalities and genetic counseling. 4th ed. edn. Oxford University Press, Inc., New York
71. Kale T, Philip M. An Interstitial Deletion at 7q33-36.1 in a Patient with Intellectual Disability, Significant Language Delay, and Severe Microcephaly. *Case Rep Genet.* 2016;2016:6046351. doi:10.1155/2016/6046351
72. Abrahams BS, Tentler D, Perederiy JV, Oldham MC, Coppola G, Geschwind DH. Genome-wide analyses of human perisylvian cerebral cortical patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(45):17849-17854. doi:10.1073/pnas.0706128104

73. Vernes SC, Nicod J, Elahi FM, et al. Functional genetic analysis of mutations implicated in a human speech and language disorder. *Hum Mol Genet.* 2006;15(21):3154-3167. doi:10.1093/hmg/ddl392
74. Petrin AL, Giacheti CM, Maximino LP, et al. Identification of a microdeletion at the 7q33-q35 disrupting the CNTNAP2 gene in a Brazilian stuttering case. *Am J Med Genet A.* 2010;152A(12):3164-3172. doi:10.1002/ajmg.a.33749
75. Centanni TM, Sanmann JN, Green JR, et al. The role of candidate-gene CNTNAP2 in childhood apraxia of speech and specific language impairment. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2015;168(7):536-543. doi:10.1002/ajmg.b.32325
76. de Lange IM, Gunning B, Sonsma ACM, et al. Influence of contraindicated medication use on cognitive outcome in Dravet syndrome and age at first afebrile seizure as a clinical predictor in SCN1A-related seizure phenotypes. *Epilepsia.* 2018;59(6):1154-1165. doi:10.1111/epi.14191
77. Kasperaviciute D, Catarino CB, Matarin M, et al. Epilepsy, hippocampal sclerosis and febrile seizures linked by common genetic variation around SCN1A. *Brain.* 2013;136(Pt 10):3140-3150. doi:10.1093/brain/awt233
78. Patterson KP, Baram TZ, Shinnar S. Origins of temporal lobe epilepsy: febrile seizures and febrile status epilepticus. *Neurotherapeutics.* 2014;11(2):242-250. doi:10.1007/s13311-014-0263-4

8. APÊNDICES

8.1 Apêndice 1. Predição do potencial deletério – missense.

Predição do potencial deletério das alterações não sinônimas (missense - nonsynonymous SNV)																			
ID	Gene	Alteração Nucleotídica	Alteração Proteica	Posição Cromossômica CRCh37 (hg19)	SNP de Referência	Predição de potencial deletério													
						Gratham	Panther	Mutation Assessor	Mutation Taster	Condel	Provean	Polyphen2	SIFT	AlignGVGD	CADD	PhD-SNP	FATHMM	SNPs&GO	Mutpred2
Caso 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Caso 2	CACNA1E	c.4387A>G	p.N1463D	1:181727140 T/C	rs943418832	23	PP	B	P	P	P	PP	P	B	P	P	P	P	P
Caso 3	ARHGEF15	c.749G>C	p.R250P	17:8216387 C/G	rs763801843	103	PB	B	P	B	B	PP	B	P	P	B	B	B	B
	ARHGEF16	c.755A>C	p.H252P	17: 8216393 T/G	rs1317255418	77	PB	B	B	B	B	B	P	P	B	B	B	B	B
Caso 4	CLCN2	c.1886G>A	p.R629Q	3:184071129 C/T	rs115961753	43	PP	B	P	P	P	PP	B	P	P	P	P	P	P
Caso 5	CLCN2	c.1886G>A	p.R629Q	3:184071129 C/T	rs115961753	43	PP	B	P	P	P	PP	B	P	P	P	P	P	P
	ADGRV1	c.13037C>T	p.P4346L	5: 90074869 G/A	rs74632023	98	PP	P	P	B	P	PP	P	P	P	B	B	B	B
	EFHC1	c.229C>A	p.P77T	6:52288909 G/T	rs149055334	38	PB	B	B	B	B	B	P	P	B	B	B	B	B
	EFHC1	c.662G>A	p.R221H	6:52317574 C/T	rs79761183	29	PP	B	B	P	B	B	P	P	B	P	B	B	B
	ARHGEF15	c.749G>C	p.R250P	17:8216387 C/G	rs763801843	103	PB	B	P	B	B	PP	B	P	P	B	B	B	B

	SCN1A	c.4915C>T	p.R1639C	2:166848870 G/A	-	180	PP	P	P	P	P	PP	P	P	P	P	P	P	P
	ADGRV1	c.6443C>T	p.A2148V	5:89981765 G/A	rs375921325	64	PB	B	P	B	P	PP	P	P	P	B	B	B	B
	ADGRV1	c.10607G>A	p.R3536H	5:90040920 C/T	rs144618536	29	PB	B	B	B	B	B	P	B	B	B	B	B	B
Caso 15	SCN1A	c.301C>T	p.R101W	2:166915162 G/A	rs121917965	101	PP	P	P	P	P	PP	P	P	P	P	P	P	P
Caso 16	GABRD	c.1202C>T	p.T401M	1:1961564 G/A	rs116604393	81	PP	B	B	B	B	PP	P	P	B	B	P	B	B
	SCN1A	c.1178G>A	p.R393H	2:166903479 C/T	rs121917927	29	PP	P	P	P	P	PP	P	B	P	P	P	P	P
	ADGRV1	c.9607T>A	p.S3203T	5:90016024 A/T	rs116480183	58	PB	B	P	B	B	B	P	P	B	B	B	B	B
Caso 17	CACNA1H	c.826C>G	p.R276G	16:1250278 G/C	-	125	PB	B	B	B	B	PP	B	P	B	P	P	B	B
	KCNQ2	c.2264A>G	p.Y755C	20:62038352 T/C	rs3746366	194	PP	P	P	P	B	PP	B	P	B	B	P	P	B
	DEPDC5	c.2836G>A	p.A946T	22:32241065 C/T	rs538998618	58	PP	P	P	B	B	PP	P	P	B	B	B	B	B
Caso 18	SCN2A	c.3457G>A	p.E1153K	2:166221710 C/T	rs200138205	56	PP	P	P	P	P	PP	P	P	P	B	P	B	B
Caso 19	CACNA1H	c.3331G>A	p.G1111R	16:1258189 C/T	-	125	PB	B	B	P	B	P	P	P	B	B	P	B	B
	MECP2	c.1175T>G	p.V392G	x:153296140 A/C	-	109	PB	B	B	B	B	B	B	P	B	B	P	B	B

SNV: variante de nucleotídeo único (Single-Nucleotide Variant); ID: identificação da amostra; SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único (Single Nucleotide Polymorphism); B: Benigna; PB: Provavelmente Benigna; PP: Provavelmente Patogênica; P: Patogênica.

8.2. Apêndice 2. Banco de Dados de frequência populacional – missense.

Caso 3		Caso 2	Caso 1	ID	Alterações de nucleotídeo único	Bancos de dados de frequência populacional	
ARHGEF15	ARHGEF15	CACNA1E	-	Gene			
c.755A>C	c.749G>C	c.4387A>G	-	Alteração nucleotídica			
p.H252P	p.R250P	p.N1463D	-	Alteração proteica			
17: 8216393 T/G	17:8216387 C/G	1:181727140 T/C	-	Posição Cromossômica			
rs1317255418	rs763801843	rs943418832	-	Reference SNP			
0,068	0,039	0,000	-	BR	BipMed		
0,000	0,000	0,000	-	BR	ABraOM		
0,000	0,000	0,000	-	ALL	ESP6500si		
0,000	0,000	0,000	-	AA			
0,000	0,000	0,000	-	EA			
0,000	0,010	0,000	-	ALL	GnomAD		
0,000	0,001	0,000	-	AFR			
0,000	0,046	0,000	-	AJ			
0,000	0,003	0,000	-	EAS			
0,000	0,009	0,000	-	EUR (FIN)			
0,000	0,005	0,000	-	EUR (NFE)			
0,000	0,034	0,000	-	LAT			
0,000	0,003	0,000	-	SAS			
0,000	0,012	0,000	-	OTH			
0,000	0,000	0,000	-	ALL	1000 Genomes		
0,000	0,000	0,000	-	ACB			AFR
0,000	0,000	0,000	-	ASW			
0,000	0,000	0,000	-	ESN			
0,000	0,000	0,000	-	GWD			
0,000	0,000	0,000	-	LWK			
0,000	0,000	0,000	-	MSL			
0,000	0,000	0,000	-	YRI			
0,000	0,000	0,000	-	CLM			AMR
0,000	0,000	0,000	-	MXL			
0,000	0,000	0,000	-	PEL			
0,000	0,000	0,000	-	PUR			
0,000	0,000	0,000	-	CDX			EAS
0,000	0,000	0,000	-	CHB			
0,000	0,000	0,000	-	CHS			
0,000	0,000	0,000	-	JPT			
0,000	0,000	0,000	-	KHV			
0,000	0,000	0,000	-	CEU			EUR
0,000	0,000	0,000	-	FIN			
0,000	0,000	0,000	-	GBR			
0,000	0,000	0,000	-	IBS			
0,000	0,000	0,000	-	TSI			
0,000	0,000	0,000	-	BEB			SAS
0,000	0,000	0,000	-	GIH			
0,000	0,000	0,000	-	ITU			
0,000	0,000	0,000	-	PJL			
0,000	0,000	0,000	-	STU			

Caso 9		Caso 8	Caso 7		Caso 6
<i>ADGRV1</i>	<i>ADGRV1</i>	<i>CACNA1A</i>	<i>SCN1A</i>	<i>HNRNPU</i>	<i>ADGRV1</i>
<i>c.3191A>C</i>	<i>132-310-14</i>	<i>c.3358G>A</i>	<i>c.4961A>G</i>	<i>c.62A>G</i>	<i>c.16841C>T</i>
<i>p.E1064A</i>	<i>p.D1051Y</i>	<i>p.A1120T</i>	<i>p.K1654R</i>	<i>p.K21R</i>	<i>p.T5614I</i>
5:89943483 T/G	5:89943443 C/A	19:13397515 C/T	2:166848824 T/C	1:245027548 T/C	5:90136624 G/A
<i>rs190922596</i>	<i>rs145556097</i>	<i>rs199745070</i>	-	<i>rs755839601</i>	<i>rs149544995</i>
0,004	0,004	0,000	0,000	0,000	0,004
0.002463	0.002463	0.001642	0,000	0,000	0.003284
0,002	0,002	0,001	0,000	0,000	0,000
0,001	0,001	0,003	0,000	0,000	0,000
0,003	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,004
0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
0,003	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
0,003	0,003	0,000	0,000	0,000	0,032
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,002
0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,001
1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000
1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,008
1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000
1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000
1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000
1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000
1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000
0,011	0,011	0,000	0,000	0,000	1,000
0,023	0,023	0,000	0,000	0,000	0,023
1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,006
1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000
1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000
1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000
1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000
1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000
1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000
1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000
1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000
0,027	0,027	0,000	0,000	0,000	1,000
0,009	0,009	0,000	0,000	0,000	1,000
1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000
1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000
1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000
1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000
1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000
1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000

Caso 14	Caso 13				
SCN3A	ADGRV1	ADGRV1	SCN1A	SCN3A	KCNT1
c.3250G>A	c.10607G>A	c.6443C>T	c.4915C>T	c.3250G>A	c.1984G>A
p.V1084I	p.R3536H	p.A2148V	p.R1639C	p.V1084I	p.V662M
2:165984284 C/T	5:90040920 C/T	5:89981765 G/A	2:166848870 G/A	2:165984284 C/T	9:138662917 C/T
rs140990288	rs144618536	rs375921325	-	rs140990288	rs757867931
0,008	0,006	0,002	0,000	0,008	0,000
0.003284	0,005	0,000	0,000	0.003284	0,000
0,006	0,004	0,000	0,000	0,006	0,000
0,002	0,010	0,001	0,000	0,002	0,000
0,008	0,001	0,000	0,000	0,008	0,000
0,005	0,001	0,000	0,000	0,005	0,000
0,001	0,011	0,001	0,000	0,001	0,000
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,002	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000
0,007	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000
0,005	0,001	0,000	0,000	0,005	0,000
0,005	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000
0,007	0,001	0,000	0,000	0,007	0,000
0,002	0,004	0,000	0,000	0,002	0,000
1,000	0,021	1,000	0,000	1,000	0,000
1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000
1,000	0,010	1,000	0,000	1,000	0,000
1,000	0,013	1,000	0,000	1,000	0,000
1,000	0,035	0,005	0,000	1,000	0,000
1,000	0,006	1,000	0,000	1,000	0,000
1,000	0,005	1,000	0,000	1,000	0,000
1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000
0,016	1,000	1,000	0,000	0,016	0,000
1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000
0,005	1,000	1,000	0,000	0,005	0,000
1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000
1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000
1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000
1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000
1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000
0,010	1,000	1,000	0,000	0,010	0,000
1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000
0,011	1,000	1,000	0,000	0,011	0,000
0,005	1,000	1,000	0,000	0,005	0,000
0,005	1,000	1,000	0,000	0,005	0,000
1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000
1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000
1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000
0,005	1,000	1,000	0,000	0,005	0,000
1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000

8.3. Apêndice 3. Bancos de Dados de frequência populacional – “splincing”.

Caso 2	ID		Alterações de “Splincing”	Bancos de Dados de frequência populacional
MTOR	Gene			
c.3315_3316insTATCGCAGCCACCTGC GCAAGGTCCTGGTCGAGTACGTGAAC GAAACGGCAAGCGAGTGGGGCGCGA ACATCCTGGAA	Alteração de nucleotídeos			
1:11272935-11272935	Posição Cromossômica			
p.(Asn1106delinsTyrArgSerHisLeuArgLys ValLeuValGluTyrValAsnGluThrAlaSerGlu TrpGlyAlaAsnIleLeuGluAsn)	Alteração proteica prevista			
0,000000	BR		BipMed	
0,000000	BR		ABraOM	
0,000000	ALL		ESP6500si	
0,000000	AA			
0,000000	EA			
0,000000	ALL		GnomAD	
0,000000	AFR			
0,000000	AJ			
0,000000	EAS			
0,000000	EUR (FIN)			
0,000000	EUR (NFE)			
0,000000	LAT			
0,000000	SAS			
0,000000	OTH			
0,000000	ALL			
0,000000	ACB	AFR		
0,000000	ASW			
0,000000	ESN			
0,000000	GWD			
0,000000	LWK			
0,000000	MSL			
0,000000	YRI			
0,000000	CLM		AMR	
0,000000	MXL			
0,000000	PEL			
0,000000	PUR			
0,000000	CDX	EAS		
0,000000	CHB			
0,000000	CHS			
0,000000	JPT			
0,000000	KHV	EUR		
0,000000	CEU			
0,000000	FIN			
0,000000	GBR			
0,000000	IBS			
0,000000	TSI			
0,000000	BEB	SAS		
0,000000	GIH			
0,000000	ITU			
0,000000	PJL			
0,000000	STU			

8.4. Apêndice 4. “Scores” Geral ACMG.

ID	Alteração de Nucleotídeos	Alteração Proteica Prevista	Gene	Evidência de patogenicidade												Número De Critérios				Classificação	Validação
				1. Tipo de variante		2. Revisão da literatura		3. Herança e estudos familiares			4. Frequência Populacional (Controles)			5. Localização em "hot spots"	6. Predição "in silico"						
				PVS1	PM4	PS1	PS3	PM5	PS2	PM6	PP1	PS4	PM2	PM1	PP3	Muito forte	Forte	Moderado	Suporte		
Caso 1	<i>c.1080T>C</i>	<i>p.L360L</i>	<i>KCNT2</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	-	-	-	-	#	-
	<i>c.1513C>T</i>	<i>p.L505L</i>	<i>GRIN1</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	-	-	-	-	#	-
Caso 2	<i>c.3315_3316ins TATCGCAGCC ACCTGCGCAA GGTCTGGTC GAGTACGTGA ACGAACGGC AAGCGAGTG GGGCGCGAA CATCCTGGAA</i>	<i>p.(Asn1106delinsTyrArgSerHisLeuArgLysValLeuValGluTyrValAsnGluThrAlaSerGluTrpGlyAlaAsnIleLeuGluAsn)</i>	<i>MTOR</i>	Não	-	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	-	-	0	0	1	0	VUS	-
	<i>c.796_797insGT TCCAGAACAT CCCGCTCCAC CCAGCTCTCC CGCGTCCCCA CAACGCATCC GGCTGATCGA TCGGATTA</i>	<i>p.(Pro266fs)</i>	<i>SLC2A1</i>	Sim	-	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	-	-	1	0	1	0	Provavelmente patogênico	Validar
	<i>c.4387A>G</i>	<i>p.N1463D</i>	<i>CACNA1E</i>	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	+	Não**	Não***	Sim	sim	Não	0	0	3	0	Provavelmente patogênico	Validar
	<i>c.1380_1381ins CTGTGACATT CGATAGCCAT GTGCAGGCG GCCGGCCGT GCCACCGGC GAGGCGGGC GAGGTCGCG TTCGGCACTG C</i>	<i>p.(Ala461_Val462delinsLeuTer)</i>	<i>SCN3A</i>	Sim	-	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	-	-	1	0	1	0	Provavelmente patogênico	Validar
	<i>c.2500_2501ins</i>	<i>p.(Ile834delinsAsnIle)</i>	<i>SCN1A</i>	Não	Não	Não	-	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	-	-	0	0	1	0	VUS	-

	ATA																				
	<i>c.7176C>T</i>	<i>p.S2392S</i>	<i>ADGRV1</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	-	-	-	-	#	-
	<i>c.530_531insC CACCACCTCG CGGAACGCAT CATCCGGGG AGAACTCAAG GAACGGGAA CGTATCCAGG AGCAGAAGGT CACCCA</i>	<i>p.(Ala177delinsAlaHis HisLeuAlaGluArgIlell eArgGlyGluLeuLysGlu ArgGluArgIleGlnGluG lnLysValThrGln)</i>	<i>STXBP1</i>	Não	Não	Não	-	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	-	-	0	0	1	0	VUS	-
	<i>c.2703G>A</i>	<i>p.L901L</i>	<i>GRIN2B</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	-	-	-	-	#	-
Caso 3	<i>c.3315_3316ins TGGA</i>	<i>p.(Asn1106fs)</i>	<i>MTOR</i>	Sim	-	Não	-	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	-	-	1	0	1	0	Provavelmente patogênico	Validar
	<i>c.3314_3315ins AGCCACCTGC GCAAGGTCCT GGTCGAGTAC GTGAACGAAA CGGCAAGCG AGTGGGGCG CGAACATC</i>	<i>p.(Ala1105delinsAlaAl aThrCysAlaArgSerTrp SerSerThrTer)</i>	<i>MTOR</i>	Sim	-	Não	-	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	-	-	1	0	1	0	Provavelmente patogênico	Validar
	<i>c.1509T>C</i>	<i>p.Y503Y</i>	<i>KCNT2</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	-	-	-	-	#	-
	<i>c.2500_2501ins ATA</i>	<i>p.(Ile834delinsAsnIle)</i>	<i>SCN1A</i>	Não	Não	Não	-	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	-	-	0	0	1	0	VUS	-
	<i>c.1296G>A</i>	<i>p.T432T</i>	<i>EEF1A2</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	-	-	-	-	#	-
	<i>c.749G>C</i>	<i>p.R250P</i>	<i>ARHGEF15</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	-	Não	0	0	1	0	VUS	-
	<i>c.755A>C</i>	<i>p.H252P</i>	<i>ARHGEF15</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	-	Não	0	0	1	0	VUS	-
Caso 4	<i>c.1886G>A</i>	<i>p.R629Q</i>	<i>CLCN2</i>	Não	Não	Sim	-	Não	Não	Sim	Não**	Não***	Sim	-	Não	0	1	2	0	Provavelmente patogênico	Validar
Caso 5	<i>c.414G>A</i>	<i>p.T138T</i>	<i>GABRD</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	0	0	0	0	#	-
	<i>c.960C>T</i>	<i>p.S320S</i>	<i>SLC6A1</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	0	0	0	0	#	-
	<i>c.1886G>A</i>	<i>p.R629Q</i>	<i>CLCN2</i>	Não	Não	Sim	-	Não	Não	Sim	Não**	Não***	Sim	-	Não	0	1	2	0	Provavelmente patogênico	Validar
	<i>c.13037C>T</i>	<i>p.P4346L</i>	<i>ADGRV1</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	-	Não	0	0	1	0	VUS	-
	<i>c.229C>A</i>	<i>p.P77T</i>	<i>EFHC1</i>	Não	Não	Sim	-	Não	Não	Sim	Não**	Não***	Sim	-	Não	0	1	2	0	Provavelmente patogênico	Validar
	<i>c.662G>A</i>	<i>p.R221H</i>	<i>EFHC1</i>	Não	Não	Sim	-	Não	Não	Sim	Não**	Não***	Sim	-	Não	0	1	2	0	Provavelmente patogênico	Validar
	<i>c.749G>C</i>	<i>p.R250P</i>	<i>ARHGEF15</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	-	Não	0	0	1	0	VUS	-
Caso 6	<i>c.5244C>A</i>	<i>p.(Ala1748Ala)</i>	<i>MTOR</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	0	0	0	0	#	-
	<i>c.1209T>C</i>	<i>p.S403S</i>	<i>ATP6V1A</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	-	-	#	-
	<i>c.16841C>T</i>	<i>p.T5614I</i>	<i>ADGRV1</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	Não	Não	0	0	1	0	VUS	-
	<i>c.2235C>T</i>	<i>p.S745S</i>	<i>KCNT1</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	-	-	#	-
	<i>c.3189C>T</i>	<i>p.N1063N</i>	<i>CACNA1H</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	-	-	#	-
	<i>c.4965C>A</i>	<i>p.V1655V</i>	<i>CACNA1H</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	-	-	#	-

Caso 7	<i>c.2466C>T</i>	<i>p.N822N</i>	<i>KCNT2</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	-	-	#	-
	<i>c.62A>G</i>	<i>p.K21R</i>	<i>HNRNPU</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	-	-	VUS	-
	<i>c.4961A>G</i>	<i>p.K1654R</i>	<i>SCN1A</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não***	Sim	Não	Não	0	0	1	1	VUS	Validada
Caso	<i>c.5589G>A</i>	<i>p.S1863S</i>	<i>MTOR</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	-	-	#	-
	<i>c.3333A>C</i>	<i>p.P1111P</i>	<i>KCNT2</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	-	-	#	-
	<i>c.141C>T</i>	<i>p.A47A</i>	<i>HNRNPU</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	-	-	#	-
	<i>c.4281C>T</i>	<i>p.V1427V</i>	<i>SCN9A</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	-	-	#	-
	<i>c.90G>A</i>	<i>p.T30Y</i>	<i>EFHC1</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	-	-	#	-
	<i>c.1584G>A</i>	<i>p.E528E</i>	<i>GRIN1</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	-	-	#	-
	<i>c.2307G>T</i>	<i>p.S769S</i>	<i>IRF2BPL</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	-	-	#	-
	<i>c.2143_2151del</i>	<i>p.(715_717del)</i>	<i>HCN2</i>	Não	-	Não	-	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	Não	Não	0	0	1	0	VUS	-
	<i>c.3358G>A</i>	<i>p.A1120T</i>	<i>CACNA1A</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	Não	Não	0	0	1	0	VUS	-
Caso	<i>c.3151G>T</i>	<i>p.D1051Y</i>	<i>ADGRV1</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	Não	Sim	0	0	1	0	VUS	-
	<i>c.3191A>C</i>	<i>p.E1064A</i>	<i>ADGRV2</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	Não	Não	0	0	1	0	VUS	-
	<i>c.5490C>T</i>	<i>p.I1830I</i>	<i>SCN8A</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	-	-	-	-	#	-
	<i>c.5657G>T</i>	<i>p.R1886L</i>	<i>CACNA1H</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	0	0	1	0	VUS	-
	<i>c.5822C>T</i>	<i>p.P1941L</i>	<i>CACNA1H</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	0	0	1	1	VUS	-
	<i>c.6255C>T</i>	<i>p.A2085A</i>	<i>CACNA1H</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	-	-	#	-
Caso 10	<i>c.2836C>T</i>	<i>p.R946C</i>	<i>SCN1A</i>	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não**	Não***	Sim	Sim	Sim	0	2	4	1	Patogénico	Validada
	<i>c.2899G>C</i>	<i>p.V967L</i>	<i>GRIN2A</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	Não	Não	0	0	1	0	VUS	-
	<i>c.753C>T</i>	<i>p.F251F</i>	<i>GNAO1</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	-	-	-	-	#	-
	<i>c.3607_3609del</i>	<i>p.(1203_1203del)</i>	<i>CACNA1A</i>	Não	-	Não	-	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	-	Não	0	0	1	0	VUS	-
Caso 1	<i>c.252A>G</i>	<i>p.V84V</i>	<i>CLCN2</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	-	-	-	-	#	-
	<i>c.6293_6307del</i>	<i>p.(2098_2103del)</i>	<i>CACNA1H</i>	Não	-	Não	-	Não	Não	Não	Não**	Não***	Sim	Não	Não	0	0	1	0	VUS	-
	<i>c.4330G>A</i>	<i>p.V1444I</i>	<i>GRIN2A</i>	Não	Não	Não	-	Não	Não	Não	Não**	Não***	Sim	Não	Não	0	0	1	0	VUS	-
	<i>c.1332C>T</i>	<i>p.R444R</i>	<i>CDKL5</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	-	-	-	-	#	-
Caso 12	<i>c.5256G>A</i>	<i>p.G752G</i>	<i>SCN2A</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	-	-	-	-	#	-
	<i>c.5830G>A</i>	<i>p.D1944N</i>	<i>ADGRV1</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	Não	Não	0	0	1	0	VUS	-
	<i>c.1984G>A</i>	<i>p.V662M</i>	<i>KCNT1</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	Não	Não	0	0	1	0	VUS	-
	<i>c.1569C>T</i>	<i>p.V523V</i>	<i>GRIN2B</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	-	-	-	-	#	-
	<i>c.1551C>T</i>	<i>p.I517I</i>	<i>GRIN2D</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	-	-	-	-	#	-
Caso 1	<i>c.3250G>A</i>	<i>p.V1084I</i>	<i>SCN3A</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	Não	Não	0	0	1	0	VUS	-
	<i>c.4915C>T</i>	<i>p.R1639C</i>	<i>SCN1A</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	Sim	Sim	0	0	2	1	VUS	Validada
	<i>c.6443C>T</i>	<i>p.A2148V</i>	<i>ADGRV1</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	Não	Não	0	0	1	0	VUS	-
	<i>c.10607G>A</i>	<i>p.R3536H</i>	<i>ADGRV1</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	-	Não	0	0	1	0	VUS	-
Caso 14	<i>c.3250G>A</i>	<i>p.V1084I</i>	<i>SCN3A</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	-	Não	0	0	1	0	VUS	-
	<i>c.4915C>T</i>	<i>p.R1639C</i>	<i>SCN1A</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	Sim	Sim	0	0	2	1	VUS	Validada
	<i>c.6443C>T</i>	<i>p.A2148V</i>	<i>ADGRV1</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	-	Não	0	0	1	0	VUS	-
	<i>c.10607G>A</i>	<i>p.R3536H</i>	<i>ADGRV1</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	-	Não	0	0	1	0	VUS	-

	<i>c.4476G>A</i>	<i>p.G1492G</i>	<i>CHD2</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	-	-	-	-	#	-
Caso 15	<i>c.301C>T</i>	<i>p.R101W</i>	<i>SCN1A</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	Não	Sim	0	0	1	1	VUS	Validada
	<i>c.510C>T</i>	<i>p.R170R</i>	<i>IRF2BPL</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	-	-	#	-
Caso 16	<i>c.1202C>T</i>	<i>p.T401M</i>	<i>GABRD</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	-	-	1	0	VUS	-
	<i>c.1178G>A</i>	<i>p.R393H</i>	<i>SCN1A</i>	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	Sim	Não	0	2	3	0	Patogênico	Validada
	<i>c.9607T>A</i>	<i>p.S3203T</i>	<i>ADGRV1</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	-	-	1	-	VUS	-
	<i>c.726C>T</i>	<i>p.G242G</i>	<i>YWHAG</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	-	-	#	-
Caso 17	<i>c.491_492insC GC</i>	<i>p.(Ala164delinsAlaAla)</i>	<i>IRF2BPL</i>	Não	-	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	-	Não	0	0	1	0	VUS	-
	<i>c.826C>G</i>	<i>p.R276G</i>	<i>CACNA1H</i>	Não	-	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	-	Não	0	0	1	0	VUS	-
	<i>c.2264A>G</i>	<i>p.Y755C</i>	<i>KCNQ2</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não*	Não	Não***	Sim	Não	Não	0	0	1	0	VUS	-
	<i>c.2836G>A</i>	<i>p.A946T</i>	<i>DEPDC5</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não*	Não	Não***	Sim	Não	Não	0	0	1	0	VUS	-
Caso 18	<i>c.3457G>A</i>	<i>p.E1153K</i>	<i>SCN2A</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não**	Não***	Sim	Sim	Sim	0	0	3	0	Provavelmente patogênico	Validar
	<i>c.2376C>T</i>	<i>p.D792D</i>	<i>KCNT1</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	-	-	#	-
	<i>c.470_471insTG CCGCCGCCG C</i>	<i>p.(Ala157delinsAlaAla AlaAlaAla)</i>	<i>IRF2BPL</i>	Não	-	Não	-	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	-	Não	0	0	1	0	VUS	-
Caso 19	<i>c.1857G>A</i>	<i>p.E619E</i>	<i>KCNT2</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	-	-	#	-
	<i>c.1338C>T</i>	<i>p.S446S</i>	<i>SPTAN1</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	-	-	#	-
	<i>c.1968G>A</i>	<i>p.V656V</i>	<i>SPTAN1</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	-	-	#	-
	<i>c.3331G>A</i>	<i>p.G1111R</i>	<i>CACNA1H</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	Não	Não	0	0	1	0	VUS	-
	<i>c.1175T>G</i>	<i>p.V392G</i>	<i>MECP2</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não*	Não**	Não***	Sim	-	Não	0	0	1	0	VUS	-

VUS: Variantes de significado incerto (*Variants Unknown Significance*); #: alterações sinônimas. OBS: *Os genitores (pais) não testados; **A co-segregação com a doença não foi investigada; ***A frequência não foi calculada, pois nosso *n* é muito baixo.

8.5. Apêndice 5. CMA Geral – Pipeline CMA-BRAINN*

ID	Chr	Posição Inicial	Posição Final	Tamanho (Kb)	Tipo CNV	Sexo	aDGV	DGV	DECIPHER	ClinGEN CNV	Classificação	Genes registrados no OMIM	Genes de encefalopatias
Caso 1	2	185017179	185060167	429,89	Deleção	Feminino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-
	3	46783238	46793364	101,27	Deleção	Feminino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-
Caso 2	14	106547495	106564270	16776	Deleção	Masculino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-
Caso 3	8	39225914	39225940	27	Ganho	Masculino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-
Caso 4	1	248809358	248814080	4723	Deleção	Masculino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-
	22	23547441	23574494	27054	Deleção	Masculino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-
Caso 5	3	142634800	142986037	351238	Ganho	Masculino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	PAQR9(614580), CHST2(603798), SLC9A9(608396)	-
	7	61857934	61888128	30195	Deleção	Masculino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-
	13	64370796	64405310	34515	Deleção	Masculino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-
	19	44906512	44938779	32268	Deleção	Masculino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-
	22	23023185	23031338	8154	Deleção	Masculino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-
Caso 6	3	646057	876958	230902	Ganho	Feminino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-
	3	899528	1064031	164504	Ganho	Feminino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-
	3	1146646	1389117	242472	Ganho	Feminino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	CNTN6(607220)	-
	20	53946833	53989654	42822	Deleção	Feminino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-
Caso 7	7	136901669	137264283	362615	Deleção	Masculino	Sim	Sim	Sim	Sim	Patogênica	PTN(162095), DGKI(604072)	-
	7	137268624	137307434	38811	Deleção	Masculino	Sim	Sim	Sim	Sim	Patogênica	DGKI((604072)	-

Caso 8	7	137315924	141753993	4438070	Deleção	Masculino	Sim	Sim	Sim	Sim	Patogênica	DGKI((604072),CREB3L2(608834),AKR1D1(604741),TRIM24(603406),SV OPL(611700),ATP6V0A4(605239),KIAA1549(613344),ZC3HAV1(607312),TTC26(617453),UBN2(613841),LUC7L2(613056),HIPK2(606868),TBXAS1(274180),PARP12(612481),N DUFB2(603838),BRAF(164757),MRPS33(611993),AGK(610345),WEE2(614084),SSBP1(600439),TAS2R3(604868),TAS2R4(604869),TAS2R5(605062),TAS2R38(607751),CLEC5A(604987),MGAM(154360)	-
	7	141795282	141802350	7069	Deleção	Masculino	Sim	Sim	Sim	Sim	Patogênica	MGAM(154360)	-
	7	142047385	142257596	210212	Deleção	Masculino	Sim	Sim	Sim	Sim	Patogênica	-	-
	7	142275699	142474641	198943	Deleção	Masculino	Sim	Sim	Sim	Sim	Patogênica	PRSSI(276000)	-
	7	142474939	142827953	353015	Deleção	Masculino	Sim	Sim	Sim	Sim	Patogênica	EPHB6(602757),TRPV6(606680),TRPV5(606679),KEL(613883)	-
	7	142891710	143218845	327136	Deleção	Masculino	Sim	Sim	Sim	Sim	Patogênica	TAS2R40(613964),GSTK1(602321),CASP2(600639),TMEM139(616524),CLCN1(118425),ZYX(602002),EPHA1(179610),TAS2R60(613968)TAS2R41(613965)	-
	7	143292111	143398030	138923	Deleção	Masculino	Sim	Sim	Sim	Sim	Patogênica	TCAF2(616252)	-
	7	143398031	143431033	138923	Deleção	Masculino	Sim	Sim	Sim	Sim	Patogênica	TCAF2(616252),OR2F1(608497)	
	7	143568048	143873376	305329	Deleção	Masculino	Sim	Sim	Sim	Sim	Patogênica	TCAF2(616252)	
	7	144075507	144105929	30423	Deleção	Masculino	Sim	Sim	Sim	Sim	Patogênica	ARHGEF5(600888),NOBOX(610934)	
	7	144106496	144112265	5770	Deleção	Masculino	Sim	Sim	Sim	Sim	Patogênica	NOBOX(610934)	
	7	144112435	146708552	2596118	Deleção	Masculino	Sim	Sim	Sim	Sim	Patogênica	TPK1(606370),CNTNAP2(604569)	
Caso 8	1	149578711	149617439	38729	Deleção	Masculino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-

	7	111213063	111260535	47473	Deleção	Masculino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-
	11	90731050	90795301	64252	Deleção	Masculino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-
	19	55268216	55348691	80476	Deleção	Masculino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	<i>KIR2DL1(604936),KIR2DL4(604945),KIR3DL1(604946),KIR2DS4(604955)</i>	-
Caso 9	2	98698619	98702024	3406	Deleção	Masculino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-
	2	98793300	98798672	5373	Deleção	Masculino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	<i>VWA3B(614884)</i>	-
Caso 10	7	143292111	143398030	105920	Deleção	Masculino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	<i>TCAF2(616252)</i>	-
	14	89178464	89476761	298298	Ganho	Masculino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	<i>EML5(618119)</i>	-
	20	16565162	16575000	9839	Deleção	Masculino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	<i>TTC8(608132)</i>	-
Caso 11	6	81294330	81294910	581	Deleção	Feminino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-
	17	18317382	18358933	41552	Deleção	Feminino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-
Caso 12	3	96990786	97303661	312.876	Deleção	Masculino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	<i>EPHA6(600066)</i>	-
	15	71990150	72018933	28784	Deleção	Masculino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-
Caso 13	5	115625217	115625245	29	Deleção	Feminino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-
	9	33143181	33261061	117881	Ganho	Feminino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	<i>B4GALT1</i>	-
	12	9731638	9734958	3321	Deleção	Feminino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-
Caso 14	5	115625217	115625245	29	Deleção	Feminino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-
Caso 15	Sem CNVs relevantes												
Caso 16	1	30293452	30414051	120600	Deleção	Masculino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-
	4	217929	276983	59055	Deleção	Masculino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-
Caso 17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Em andamento - Não tem DNA	-
Caso 18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Em andamento - Não tem DNA	-
Caso 19	18	69380200	69721872	341673	Deleção	Masculino	Não	Não	Não	Não	Classe 3 - VOUS	-	-

ID: identificação da amostra; Chr: cromossomo; Kb: Kilobase; CNV: variação de número de cópias (*copy number variation*); aDGV: Affymetrix® Database Genomic Variants; DGV: Database of Genomic Variants; DECIPHER: Databases of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources; ClinGen: Clinical Genome Resource; DNA: Deoxyribonucleic Acid.

8.6. Apêndice 6. CMA Geral – Método ChAS*

ID	NC	Tipo de CNV	Chr	Tamanho (Kb)	Qde. Genes OMIM	Genes OMIM	Nomenclatura	Classificação	Genes de encefalopatias
Caso 1	1	Perda	1	374,863	1	<i>FCGR1CP (601503)</i>	arr[GRCh37] 1q21.2(149061967_149436830)x1	Classe 3 - VOUS	
	1	Perda	8	347,284	2	<i>FAM90A7P (613044), FAM90A10P (613047)</i>	arr[GRCh37] 8p23.1(7400403_7747687)x1	Classe 3 - VOUS	
	3	Ganho	11	110,402	0	-	arr[GRCh37] 11p11.12(49823454_49933856)x3	Classe 3 - VOUS	
	3	Ganho	14	542,327	1	<i>KIAA0125 (616623)</i>	arr[GRCh37] 14q32.33(105988025_106530352)x3	Classe 3 - VOUS	
	3	Ganho	14	261,038	0	-	arr[GRCh37] 14q32.33(106567087_106828125)x3	Classe 3 - VOUS	
	3	Ganho	22	353,211	2	<i>GGTLC2 (612339), MIR650 (615379)</i>	arr[GRCh37] 22q11.22(22905392_23258603)x3	Classe 3 - VOUS	
Caso 2	3	Ganho	6	322,07	1	<i>TRIM27 (602165)</i>	arr[GRCh37] 6p22.1(28660217_28982287)x3	Classe 3 - VOUS	
	3	Ganho	11	435.655	27	<i>AHNAK (103390), EEF1G (130593), TUT1 (610641), MTA2 (603947), ROM1 (180721), B3GAT3 (606374), GANAB (104160), INTS5 (611349), UQCC3 (616097), UBXN1 (616378), BSCL2 (606158), GNG3 (608941), POLR2G (602013), TAF6L (602946), NXF1 (602647), STX5 (603189), SNHG1 (603222), SNORD22 (603223), SNORD31 (603230), SNORD30 (603229), SNORD29 (603228), SNORD28 (603227), SNORD27 (603226), SNORD26 (603225), SNORD25 (603224), SLC3A2 (158070), CHRM1 (118510)</i>	arr[GRCh37] 11q12.3(62270537_62706192)x3	Classe 3 - VOUS	<i>BSCL2</i>

3	Ganho	14	1026,07	1	<i>POTEG (608916)</i>	arr[GRCh37] 14q11.2(19273612_20299682)x3	Classe 3 - <i>VOUS</i>	-
3	Ganho	16	571.059	17	<i>LMF1 (611761), SOX8 (605923), SSTR5 (182455), C1QTNF8 (614147), CACNA1H (607904), TPSG1 (609341), TPSB2 (191081), TPSAB1 (191080), TPSD1 (609272), UBE2I (601661), BAIAP3 (604009), GNPTG (607838), CLCN7 (602727), PTX4 (613442), TELO2 (611140), IFT140 (614620), TMEM204 (611002)</i>	arr[GRCh37] 16p13.3(1015196_1586255)x3	Classe 4 - Provavelmente patogênica	<i>CACNA1H</i>
3	Ganho	17	314.288	24	<i>DLG4 (602887), ACADVL (609575), DVL2 (602151), PHF23 (612910), GABARAP (605125), CTDNEP1 (610684), ELP5 (615019), CLDN7 (609131), SLC2A4 (138190), YBX2 (611447), EIF5A (600187), GPS2 (601935), NEURL4 (615865), ACAP1 (607763), KCTD11 (609848), TNK1 (608076), PLSCR3 (607611), NLGN2 (606479), SPEM1 (615116), TMEM102 (613936), FGF11 (601514), CHRNBI (100710), ZBTB4 (612308), POLR2A (180660)</i>	arr[GRCh37] 17p13.1(7091649_7405937)x3	Classe 3 - <i>VOUS</i>	-
3	Ganho	17	470.809	7	<i>RPTOR (607130), CHMP6 (610901), BAIAP2 (605475), AATK (605276), MIR338 (614059), CEP131 (613479), SLC38A10 (616525)</i>	arr[GRCh37] 17q25.3(78918442_79389251)x3	Classe 3 - <i>VOUS</i>	-
3	Ganho	17	444.036	22	<i>HGS (604375), MRPL12 (602375), SLC25A10 (606794), GCGR (138033), MCRIP1 (616514), P4HB (176790), ARHGDIA (601925), ALYREF (604171), ANAPC11 (614534), NPB (607996), PCYT2 (602679), SIRT7 (606212), MAFG (602020), PYCR1 (179035), NOTUM (609847), ASPSCR1 (606236), STRA13 (615128), RAC3 (602050), DCXR (608347), RFNG (602578), GPS1 (601934), FASN (600212)</i>	arr[GRCh37] 17q25.3(79642198_80086234)x3	Classe 3 - <i>VOUS</i>	-

3	Ganho	19	429.405	18	<i>MRPL4 (611823), ICAM1 (147840), ICAM4 (614088), ICAM5 (601852), ZGLP1 (611639), FDX1L (614585), RAVR1 (609950), ICAM3 (146631), TYK2 (176941), CDC37 (605065), PDE4A (600126), KEAP1 (606016), SIPR5 (605146), ATG4D (611340), CDKN2D (600927), AP1M2 (607309), SLC44A2 (606106), ILF3 (603182)</i>	arr[GRCh37] 19p13.2(10355502_10784907)x3	Classe 3 - VOUS	-
3	Ganho	19	641.946	25	<i>SHC2 (605217), MADCAM1 (102670), CDC34 (116948), GZMM (600311), BSG (109480), HCN2 (602781), POLRMT (601778), FGF22 (605831), RNF126 (615177), FSTL3 (605343), PALM (608134), MISP (615289), PTBP1 (600693), PLPPR3 (610391), AZU1 (162815), PRTN3 (177020), ELANE (130130), CFD (134350), MED16 (604062), KISS1R (604161), ARID3A (603265), GRIN3B (606651), TMEM259 (611011), CNN2 (602373), ABCA7 (605414)</i>	arr[GRCh37] 19p13.3(416230_1058176)x3	Classe 3 - VOUS	<i>HCN2</i>
3	Ganho	19	657.362	21	<i>ATP8B3 (605866), REXO1 (609614), MIR1909 (615201), KLF16 (606139), ADAT3 (615302), SCAMP4 (613764), CSNK1G2 (602214), BTBD2 (608531), MKNK2 (605069), AP3D1 (607246), DOT1L (607375), SF3A2 (600796), AMH (600957), JSRP1 (608743), OAZ1 (601579), LINGO3 (609792), LSM7 (607287), SPPL2B (608239), TMPRSS9 (610477), TIMM13 (607383), LMNB2 (150341)</i>	arr[GRCh37] 19p13.3(1791086_2448448)x3	Classe 3 - VOUS	<i>LMNB2</i>
3	Ganho	19	334.349	11	<i>PIP5K1C (606102), TJP3 (612689), APBA3 (604262), MRPL54 (611858), RAX2 (610362), MATK (600038), ATCAY (608179), NMRK2 (608705), DAPK3 (603289), EEF2 (130610),</i>	arr[GRCh37] 19p13.3(3696290_4030639)x3	Classe 3 - VOUS	-

						<i>PIAS4 (605989)</i>			
	3	Ganho	19	427.578	13	<i>SIRT6 (606211), EBI3 (605816), SHD (610481), TMIGD2 (614715), FSD1 (609828), STAP2 (607881), SH3GL1 (601768), CHAF1A (601246), UBXN6 (611946), PLIN4 (613247), PLIN5 (613248), LRG1 (611289), SEMA6B (608873)</i>	arr[GRCh37] 19p13.3(4178399_4605977)x3	Classe 3 - <i>VOUS</i>	-
	2	Ganho	X	325.442	3	<i>ACOT9 (300862), SAT1 (313020), APOO (300753)</i>	arr[GRCh37] Xp22.11(23741885_24067327)x2	Classe 3 - <i>VOUS</i>	-
	2	Ganho	X	335.926	0	-	arr[GRCh37] Xp11.21(56618545_56954471)x2	Classe 3 - <i>VOUS</i>	-
	2	Ganho	X	327.696	0	-	arr[GRCh37] Xq21.1(78704703_79032399)x2	Classe 3 - <i>VOUS</i>	-
	2	Ganho	X	623.251	0	-	arr[GRCh37] Xq21.31(88350096_88973347)x2	Classe 3 - <i>VOUS</i>	-
	2	Ganho	X	696.827	0	-	arr[GRCh37] Xq21.31(89625482_90322309)x2	Classe 3 - <i>VOUS</i>	-
Caso 3	3	Ganho	10	151.904	0	-	arr[GRCh37] 10q11.21(45203116_45355020)x3	Classe 3 - <i>VOUS</i>	-
	3	Ganho	17	586.486	4	<i>KANSL1 (612452), LRRC37A (616555), LRRC37A2 (616556), NSF (601633)</i>	arr[GRCh37] 17q21.31(44165802_44752288)x3	Classe 3 - <i>VOUS</i>	<i>KANSL1</i>
Caso 4	3	Ganho	11	118.779	1	<i>PLEKHA7 (612686)</i>	arr[GRCh37] 11p15.1(16894828_17013607)x3	Classe 3 - <i>VOUS</i>	<i>KCNC1</i>
	2	Ganho	X	374.897	3	<i>VCX (300229), PNPLA4 (300102), VCX2 (300532)</i>	arr[GRCh37] Xp22.31(7770459_8145356)x2	Classe 3 - <i>VOUS</i>	-
Caso 5	3	Ganho	3	409.583	4	<i>PCOLCE2 (607064), PAQR9 (614580), CHST2 (603798), SLC9A9 (608396)</i>	arr[GRCh37] 3q23q24(142576454_142986037)x3	Classe 3 - <i>VOUS</i>	<i>SLC9A9</i>
Caso 6	3	Ganho	3	751.174	1	<i>CNTN6 (607220)</i>	arr[GRCh37] 3p26.3(627676_1378850)x3	Classe 3 - <i>VOUS</i>	-

Caso 7	1	Deleção	7	9.806.884	50	<i>PTN (162095), DGKI (604072), CREB3L2 (608834), AKR1D1 (604741), TRIM24 (603406), SVOPL (611700), ATP6V0A4 (605239), KIAA1549 (613344), ZC3HAV1 (607312), UBN2 (613841), LUC7L2 (613056), HIPK2 (606868), TBXAS1 (274180), PARP12 (612481), MKRN1 (607754), NDUF2 (603838), BRAF (164757), MRPS33 (611993), AGK (610345), WEE2 (614084), SSBP1 (600439), TAS2R3 (604868), TAS2R4 (604869), TAS2R5 (605062), CLEC5A (604987), TAS2R38 (607751), MGAM (154360), PRSSI (276000), EPHB6 (602757), TRPV6 (606680), TRPV5 (606679), KEL (613883), PIP (176720), TAS2R40 (613964), GSTK1 (602321), TMEM139 (616524), CASP2 (600639), CLCN1 (118425), ZYX (602002), EPHA1 (179610), TAS2R60 (613968), TAS2R41 (613965), TCAF2 (616252), TCAF1 (616251), OR2F1 (608497), CTAGE4 (608910), ARHGEF5 (600888), NOBOX (610934), TPK1 (606370), CNTNAP2 (604569)</i>	arr[GRCh37] 7q33q35(136901668_146708552)x1	Classe 5 - Patogênica	-
Caso 8	1	Deleção	7	116.227	0	-	arr[GRCh37] 7q35(143431033_143547260)x1	Classe 3 - VOUS	-
	1	Deleção	14	246.767	0	-	arr[GRCh37] 14q11.2(22718410_22965177)x1	Classe 3 - VOUS	-
	2	Ganho	X	623.604	4	<i>SPANXB1 (300669), LDOC1 (300402), SPANXA2 (300493), SPANXA1 (300305)</i>	arr[GRCh37] Xq27.1q27.2(140060361_140683965)x2	Classe 3 - VOUS	-
Caso 9	0	Deleção	8	151.363	0	-	arr[GRCh37] 8p11.22(39235590_39386953)x0	Classe 3 - VOUS	-
	1	Deleção	8	146.007	1	<i>FAM86B2 (616123)</i>	arr[GRCh37] 8p23.1(12232268_12378275)x1	Classe 3 - VOUS	-

Caso 10	3	Ganho	1	184,094	4	<i>MEGF6 (604266), MIR551A (615148), TPRG1L (611460), WRAP73 (606040)</i>	arr[GRCh37] 1p36.32(3366492_3550586)x3	Classe 3 - VOUS	-
	3	Ganho	2	347,224	3	<i>CD8A (186910), CD8B (186730), RGPD2 (612705)</i>	arr[GRCh37] 2p11.2(86913117_87260341)x3	Classe 3 - VOUS	-
	3	Ganho	2	222,008	0	-	arr[GRCh37] 2q21.2(132895240_133117248)x3	Classe 3 - VOUS	-
	1	Perda	7	328,415	1	<i>TCAF2 (616252)</i>	arr[GRCh37] 7q35(143218845_143547260)x1	Classe 3 - VOUS	-
	3	Ganho	8	305,777	1	<i>FAM86B2 (616123)</i>	arr[GRCh37] 8p23.1(12264600_12570377)x3	Classe 3 - VOUS	-
	3	Ganho	14	271,149	1	<i>TTC8 (608132)</i>	arr[GRCh37] 14q31.3(89203780_89474929)x3	Classe 3 - VOUS	-
	4	Ganho	14	335,888	1	<i>KIAA0125 (616623)</i>	arr[GRCh37] 14q32.33(106194464_106530352)x4	Classe 3 - VOUS	-
	3	Ganho	19	137,377	0	-	arr[GRCh37] 19p12(21256800_21394177)x3	Classe 3 - VOUS	-
Caso 11	3	Ganho	2	268,444	0	-	arr[GRCh37] 2p11.1(91653349_91921793)x3	Classe 3 - VOUS	-
	3	Ganho	3	287,696	0	-	arr[GRCh37] 3p12.3(75500751_75788447)x3	Classe 3 - VOUS	-
	3	Ganho	12	264,574	1	<i>FAM90A1 (613041)</i>	arr[GRCh37] 12p13.31(8343960_8608534)x3	Classe 3 - VOUS	-
	3	Ganho	19	145,875	0	-	arr[GRCh37] 19p12(21256875_21402750)x3	Classe 3 - VOUS	-
Caso 12	3	Ganho	2	437,524	0	-	arr[GRCh37] 2p11.1(91653349_92090873)x3	Classe 3 - VOUS	-
	1	Perda	3	319,895	1	<i>EPHA6 (600066)</i>	arr[GRCh37] 3q11.2(96983766_97303661)x1	Classe 3 - VOUS	-
	3	Ganho	8	326,828	1	<i>FAM86B2 (616123)</i>	arr[GRCh37] 8p23.1(12239822_12566650)x3	Classe 3 - VOUS	-
	3	Ganho	11	134,173	3	<i>LSP1 (153432), TNNT3 (600692), MRPL23</i>	arr[GRCh37]	Classe 3 - VOUS	-

Caso 19	3	Ganho	2	236,935	0	-	arr[GRCh37] 2p11.1(91622002_91858937)x3	Classe 3 - VOUS	-
	3	Ganho	8	555,746	2	<i>FAM86B1 (616122), FAM86B2 (616123)</i>	arr[GRCh37] 8p23.1(12000296_12556042)x3	Classe 3 - VOUS	-
	1	Perda	14	111,332	0	-	arr[GRCh37] 14q11.2(20310922_20422254)x1	Classe 3 - VOUS	-
	3	Ganho	15	562,094	0	-	arr[GRCh37] 15q11.1(20016315_20578409)x3	Classe 3 - VOUS	-

ID: identificação da amostra; NC: número de cópias; Chr: cromossomo; CNV: variação de número de cópias (*copy number variation*); Kb: Kilobase; OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*; DNA: Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*).

8.7. Apêndice 7. Alterações Sinônimas.

Alterações Sinônimas					
ID	Gene	Alteração Nucleotídica	Alteração Proteica	Posição cromossômica - <i>CRCh37 (hg19)</i>	SNP de Referência
Caso 1	<i>KCNT2</i>	<i>c.1080T>C</i>	<i>p.L360L</i>	1:196395023	<i>rs74382287</i>
	<i>GRIN1</i>	<i>c.1513C>T</i>	<i>p.L505L</i>	9:140056421	<i>rs139637382</i>
Caso 2	<i>ADGRV1</i>	<i>c.7176C>T</i>	<i>p.S2392S</i>	5:89989749	<i>rs111033452</i>
	<i>GRIN2B</i>	<i>c.2703G>A</i>	<i>p.L901L</i>	12:13717469	<i>rs145005918</i>
Caso 3	<i>KCNT2</i>	<i>c.1509T>C</i>	<i>p.Y503Y</i>	1:196311253	<i>rs145756671</i>
Caso 4	-	-	-	-	-
Caso 5	<i>GABRD</i>	<i>c.414G>A</i>	<i>p.T138T</i>	1:1957121	<i>rs77892827</i>
	<i>SLC6A1</i>	<i>c.960C>T</i>	<i>p.S320S</i>	3:11067927	<i>rs35972647</i>
Caso 6	<i>MTOR</i>	<i>c.5244C>A</i>	<i>p.A1748A</i>	1:11194410	<i>rs144768080</i>
	<i>ATP6V1A</i>	<i>c.1209T>C</i>	<i>p.S403S</i>	3:113514034	<i>rs771311957</i>
	<i>KCNT1</i>	<i>c.2235C>T</i>	<i>p.S745S</i>	9:138664787	<i>rs146810749</i>
	<i>CACNA1H</i>	<i>c.3189C>T</i>	<i>p.N1063N</i>	16:1258047	<i>rs61394370</i>
	<i>CACNA1H</i>	<i>c.4965C>A</i>	<i>p.V1655V</i>	16:1265025	<i>rs61382101</i>
Caso 7	<i>KCNT2</i>	<i>c.2466C>T</i>	<i>p.N822N</i>	1:196285039	<i>rs376595503</i>
Caso 8	<i>MTOR</i>	<i>c.5589G>A</i>	<i>p.S1863S</i>	1:11190610	<i>rs377406262</i>
	<i>KCNT2</i>	<i>c.3333A>C</i>	<i>p.P1111P</i>	1:196197429	<i>rs760206396</i>
	<i>HNRNPU</i>	<i>c.141C>T</i>	<i>p.A47A</i>	1:245027469	<i>rs111518952</i>
	<i>SCN9A</i>	<i>c.4281C>T</i>	<i>p.V1427V</i>	2:167083161	<i>rs188336294</i>
	<i>EFHC1</i>	<i>c.90G>A</i>	<i>p.T30T</i>	6:52288770	<i>rs140429638</i>
	<i>GRIN1</i>	<i>c.1584G>A</i>	<i>p.E528E</i>	9:140056492	<i>rs116006955</i>
	<i>IRF2BPL</i>	<i>c.2307G>T</i>	<i>p.S769S</i>	14:77491829	<i>rs145752129</i>
Caso 9	<i>SCN8A</i>	<i>c.5490C>T</i>	<i>p.I1830I</i>	12:52200760	<i>rs200546525</i>
	<i>CACNA1H</i>	<i>c.6255C>T</i>	<i>p.A2085A</i>	16:1270205	<i>rs59297244</i>

Caso 10 (331)	<i>GNAO1</i>	<i>c.753C>T</i>	<i>p.F251F</i>	16:56385325	<i>rs755484788</i>
Caso 11	<i>CLCN2</i>	<i>c.252A>G</i>	<i>p.V84V</i>	3:184076570	<i>rs370723107</i>
	<i>CDKL5</i>	<i>c.1332C>T</i>	<i>p.R444R</i>	x:18622376	<i>rs150844616</i>
Caso 12	<i>SCN2A</i>	<i>c.5256G>A</i>	<i>p.G1752G</i>	2:166245572	<i>rs778057743</i>
	<i>GRIN2B</i>	<i>c.1569C>T</i>	<i>p.V523V</i>	12:13768133	<i>rs148573953</i>
	<i>GRIN2D</i>	<i>c.1551C>T</i>	<i>p.I517I</i>	19:48918259	<i>rs76779682</i>
Caso 13	-	-	-	-	-
Caso 14	<i>CHD2</i>	<i>c.4476G>A</i>	<i>p.G1492G</i>	15:93552437	<i>rs1054091115</i>
Caso 15	<i>IRF2BPL</i>	<i>c.510C>T</i>	<i>p.R170R</i>	14:77493626	<i>rs376239276</i>
Caso 16	<i>YWHAG</i>	<i>c.726C>T</i>	<i>p.G242G</i>	5:75958912	<i>rs73703133</i>
Caso 17	-	-	-	-	-
Caso 18	<i>KCNT1</i>	<i>c.2376C>T</i>	<i>p.D792D</i>	9:138669210	<i>rs149028586</i>
Caso 19	<i>KCNT2</i>	<i>c.1857G>A</i>	<i>p.E619E</i>	1:196303117	<i>rs116401401</i>
	<i>SPTAN1</i>	<i>c.1338C>T</i>	<i>p.S446S</i>	9:131343215	<i>rs185614333</i>
	<i>SPTAN1</i>	<i>c.1968G>A</i>	<i>p.V656V</i>	16:131345517	<i>rs968327265</i>

D: identificação da amostra; SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphism*).

9. ANEXOS

9.1. Anexo I. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

 CEP UNICAMP COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS	 Plataforma Brasil
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DA EMENDA		
Título da Pesquisa: BIORREPOSITÓRIO ESTUDOS DE GENÉTICA MOLECULAR EM DOENÇAS NEUROPSIQUIÁTRICAS - FASE I.		
Pesquisador: Iscia Teresinha Lopes Cendes		
Área Temática: Genética Humana: (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP:);		
Versão: 21		
CAAE: 12112913.3.0000.5404		
Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP		
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 3.203.311		
Apresentação do Projeto: Solicitação de emenda ao projeto original.		
Justificativa da Emenda: Divulgar "chamada" para participantes/voluntários no sub-projeto I.		
Objetivo da Pesquisa: Inalterado.		
Avaliação dos Riscos e Benefícios: Inalterado.		
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: A emenda é destinada ao subprojeto 1 Epilepsias e Malformações do Desenvolvimento Cortical. Pesquisadora solicita anuência para divulgar uma chamada em websites acadêmicos, tais como FCM-UNICAMP, UNICAMP, CEPID/BRAINN, BIPMed, FAPESP e outros. A chamada é um, convite bastante claro e simples para voluntários adultos a participar da pesquisa. São 4 parágrafos esclarecendo objetivo, critérios de inclusão, voluntariedade, procedimento, obrigatoriedade de TCLE e contato com pesquisador para maiores informações.		
Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887 UF: SP Município: CAMPINAS Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7167 E-mail: cep@fcm.unicamp.br		



Continuação do Parecer: 3.203.311

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- carta_emenda11_CEP_01_03_2019.pdf 08/03/2019 : com justificativa e detalhamento da emenda.
- convite_pesquisa_crisisfebris.pdf 08/03/2019 : apresenta o conteúdo da chamada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O CEP –PRP – UNICAMP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 manifesta-se pela aprovação da emenda proposta ao projeto de pesquisa.

Situação: Emenda aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa.
- Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.203.311

Justificativa de Ausência	TCLE_UFSC.pdf	09/10/2018 13:09:25	Iscia Teresinha Lopes Cendes	Aceito
Outros	regulamento_biorrepositorio.pdf	13/08/2018 15:49:58	Iscia Teresinha Lopes Cendes	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	21/02/2013 11:21:13		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 16 de Março de 2019

Assinado por:
Maria Fernanda Ribeiro Bittar
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

9.2. Anexo II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



Versão 1- agosto/2018

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISA (Menores de 18 anos ou legalmente incapaz)

Título do projeto: Estudos de genética molecular em doenças neuropsiquiátricas – Fase I
Pesquisadora Responsável: Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes (tel: 19 3521 8242)

OBJETIVO DA PESQUISA:

O menor ou indivíduo legalmente incapaz, a qual você representa legalmente, está sendo convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa em neurociência e neurotecnologia envolvendo pacientes e famílias de indivíduos com:

- | | | |
|---|--|---|
| ☐ Acidente Vascular Cerebral | ☐ Distonias | ☐ Grupo Controle |
| ☐ Ataxias | ☐ Doenças mitocondriais | ☐ Malformações corticais |
| ☐ Crises Febris na Infância | ☐ Doenças musculares | ☐ Paraparesias |
| ☐ Coréias | ☐ Epilepsias | ☐ Parkinson |
| ☐ Demências | ☐ Esquizofrenia | ☐ Transtorno afetivo bipolar |

O objetivo desse estudo é identificar alteração genética que causa doenças e também estudar a população normal para comparação. Isso poderá melhorar o diagnóstico das doenças (se a alteração for encontrada) e poderá levar a um melhor tratamento no futuro. No entanto, muito provavelmente, o tratamento do(a) participante não será modificado com a participação nesse estudo.

ESCLARECIMENTOS:

- 1) A concessão do material é livre e não causará quaisquer prejuízos pessoais ou ao andamento do tratamento do participante.
- 2) As informações pessoais do(a) participante serão mantidas em sigilo e privacidade. Seus dados serão codificados e criptografados por sistemas informatizados. Somente dados relevantes para as pesquisas serão utilizados, mantendo como prioridade o anonimato dos(as) participantes. Toda informação médica, mas não os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, farão parte do prontuário médico e serão submetidos aos regulamentos do HC- UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica.
- 3) Você, como responsável legal do(a) participante, terá acesso gratuito, se assim desejar:
 - a) às informações sobre as finalidades do armazenamento, incluindo seu responsável, os riscos e benefícios potenciais, as garantias de qualidade de conservação e integridade do material biológico, e as medidas para garantir a privacidade e confidencialidade;
 - b) às informações e resultados obtidos a partir do material biológico utilizado, inclusive, aquelas que impliquem em riscos para doenças não preveníveis ou riscos familiares;
 - c) ao aconselhamento genético, quando aplicável.
- 4) Você, como responsável legal, poderá retirar seu consentimento de uso da amostra do participante a qualquer momento, sem prejuízo ou penalização alguma às partes envolvidas. Uma vez desautorizada, você, como responsável legal do(a) concedente, será solicitado(a) a formalizar e assinar sua manifestação por escrito, cabendo ao biorrepositório o descarte ou devolução da amostra, se assim for solicitado. A pesquisadora responsável pode interromper a participação nesse estudo a qualquer momento que julgar apropriado.
- 5) Você, como responsável legal, será comunicado(a) se houver a necessidade de descarte do material armazenado, o que poderá ocorrer se a amostra não atender a critérios mínimos de qualidade para pesquisa, se houver dificuldades institucionais para seu armazenamento (espaço) ou se o biorrepositório deixar de existir. Caso o material seja descartado, será feito de acordo com as normas de biossegurança legais.
- 6) O material concedido ficará sob a guarda da Faculdade de Ciências Médicas do Hospital de Clínicas da UNICAMP (FCM-UNICAMP), sob cuidados dos(as) responsáveis pelo biorrepositório, e será utilizado para obtenção de dados de pesquisa científica, que poderão ser divulgados em artigos e/ou congressos, resguardando-se sempre o sigilo quanto à identidade dos participantes da pesquisa.

Rubrica do(a) pesquisador(a)

Rubrica do(a) responsável legal

- 7) Este TCLE deverá ser elaborado em duas vias, rubricado em todas as páginas e assinado pelo(a) responsável legal e pelo(a) pesquisador(a) responsável. Uma via deverá ficar com o responsável legal e outra com o(a) pesquisador(a).
- 8) Em caso de dúvidas sobre as amostras concedidas ao biorrepositório, o(a) responsável pelo(a) participante poderá entrar em contato com: Profª D^{ra} Iscia Lopes Cendes, telefones: (19) 3521-7754 ou (19) 3521- 8242.
- 9) Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas de estudo, o(a) responsável pelo(a) participante poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:30 às 11:30 e das 13:00 às 17:00 na Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, CEP: 13083-887, Campinas – SP; telefones: (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br.
- 10) Os esclarecimentos para material biológicos acima também são aplicáveis quando houver concessão somente de dados genômicos (genoma, exoma, painel gênico, etc). Neste caso, desconsidere os itens “RISCO E DESCONFORTO DOS PROCEDIMENTOS DE COLETAS” e “ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA”.

COLETA DE MATERIAL:

O(s) pesquisador(a) fará perguntas sobre os antecedentes médicos e familiares do participante, que poderá ser convidado(a) a participar de exame físico, neurológico e/ou psiquiátrico para estabelecimento de seu estado clínico. Poderão ser solicitados exames como eletroencefalograma (EEG), eletromiografia (EMG) tomografia computadorizada e ressonância magnética de crânio. Será ainda convidado(a) a realizar coleta de material biológico, como especificado abaixo.

O(a) responsável pelo(a) participante autoriza a coleta do seguinte material:

- | | |
|--|---|
| ☐ Biópsia de pele (2 a 4 mm) | ☐ Raspado da mucosa bucal / saliva |
| ☐ Dados genômicos | ☐ Sangue (20 a 30 ml) |
| ☐ Fezes (5g ou um copo de coleta) | |

Caso seja necessário, poderão fazer parte desta pesquisa informações clínicas disponíveis em prontuários médicos, com isso você, responsável pelo(a) participante:

- ☐ Autoriza o uso de dados clínicos presentes no prontuário ou laudo médico do(a) participante.
- ☐ Não autoriza o uso de dados clínicos presentes no prontuário ou laudo médico do(a) participante.

RISCO E DESCONFORTO DOS PROCEDIMENTOS DE COLETAS:

Biópsia de pele: é uma pequena cirurgia, geralmente superficial. O procedimento é realizado por um médico, com instrumentos e materiais estéreis e há risco de infecção e dor local. Eventualmente pode ser necessário o uso de pontos para fechamento do local. Nesse caso, será necessário o uso de anestesia local e prescrição de medicamentos para controlar a dor e inflamação. Se houver sinal de infecção, antibióticos serão necessários. Há a necessidade de comparecer novamente ao ambulatório para retirada dos pontos e haverá orientação para a realização dos curativos e procedimentos de cuidado e higiene locais.

Fezes: será feita em casa, seguindo as orientações que forem passadas pelo(a) pesquisador(a), ou será feita no ambulatório. Não há desconforto ou risco associados, somente será necessário cuidado ao transportar o material, caso a coleta seja feita em casa, para evitar vazamentos, mau cheiro e contaminações.

Sangue: podem ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizada por profissional treinado e habilitado para realizar esse procedimento.

Para raspado de mucosa bucal/saliva e dados genômicos não existem riscos ou desconfortos associados.

ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA:

Não haverá necessidade de acompanhamento médico específico. No caso de alguma intercorrência médica o(a) responsável pelo(a) participante deve procurar a pesquisadora responsável para assistência.

Rubrica do(a) pesquisador(a)	Rubrica do(a) responsável legal
------------------------------	---------------------------------



Versão1- agosto/2018

Em caso de danos ocorridos de sua participação, o(a) participante tem direito a indenização prevista a qualquer cidadão pelo código civil. Se for paciente, sua participação será feita em conjunto com os retornos agendados para consulta no HC-UNICAMP, porém, se for necessário uma visita fora dos retornos agendados para consulta, poderemos ressarcir os gastos com transporte e alimentação; essa prerrogativa também é válida para voluntários pertencentes ao grupo controle, bastando para isso avisar a pesquisadora responsável previamente.

O diagnóstico pré-sintomático não faz parte dessa pesquisa, mas se o(a) responsável pelo(a) participante desejar obter orientação/aconselhamento genético, será oferecido no ambulatório de neurogenética do HC/Unicamp, tel. (19) 3521-7754.

DISPONIBILIZAÇÃO PÚBLICA DOS DADOS GENÔMICOS:

Com o avanço das pesquisas na área genômica, é de grande importância compartilhar em bancos de dados públicos os resultados de alguns testes moleculares. No compartilhamento dos dados genômicos é sempre assegurado que não haverá qualquer referência aos identificadores das amostras, (exemplo de identificadores: nome, filiação, endereço, número de registro hospitalar), mas poderão ser incluídas informações relevantes para a interpretação dos dados genômicos no contexto das pesquisas, tais como: sexo, idade, pais e região de procedência, diagnóstico e outras informações clínicas pertinentes. O(a) responsável pelo participante:

☐ Autoriza que os resultados dos testes genômicos realizados no âmbito deste projeto de pesquisa sejam disponibilizados em bancos de dados públicos que poderão ser consultados por pesquisadores(as) da área médica, desde que esses dados não sejam vinculados com identificadores da amostra (veja acima exemplos de identificadores).

☐ Não autoriza a disponibilização dos resultados dos testes genéticos realizados neste projeto de pesquisa.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser concedidos a: _____ (pedir para o(a) responsável legal indicar o nome de uma pessoa a ser contatada).

Diante destas informações, o(a) responsável pelo(a) participante declara consentimento livre para ceder o material de origem biológica para o Biorrepositório do BRAINN, assinando o presente termo:

Campinas, _____ de _____ de 20 ____.

Nome do(a) participante

HC do(a) participante

Nome do(a) responsável pelo(a) participante

Assinatura do(a) responsável pelo(a) participante

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

RESPONSABILIDADE DO(A) PESQUISADOR(A):

O(a) pesquisador(a) explicou a (nome do(a) responsável pelo(a) participante) _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor de seu conhecimento e se compromete a fornecer uma via desse termo de consentimento ao participante.

Nome do(a) pesquisador(a) ou associado(a)

Assinatura do(a) pesquisador(a) ou associado(a)

9.3. Anexo III – Protocolo de extração com fenol-clorofórmio

EXTRAÇÃO DE DNA DE SANGUE PERIFÉRICO

MÉTODO FENOL-CLOROFÓRMIO

Reagentes e materiais para extração – 1a fase.

- a) Descarte com hipoclorito, água e detergente
- b) Pipetas pasteur
- c) Tubos falcon identificados
- d) Tampão RSB 1x
- e) Nonidet (detergente que lisa as células)
- f) SDS (lisa os núcleos, quebra a porção lipídica da membrana)
- g) Proteinase K (quebra porção proteica da membrana)

Reagentes e materiais para extração – 2a fase.

- a) Pipetas Pasteur
- b) Tubos Falcon
- c) Fenol (purificação - precipita as proteínas)
- d) Clorofórmio álcool isoamílico (purificação)
- e) Etanol 100% gelado (precipitação do DNA, conversa a estrutura do DNA)

Extração de DNA – 1ª fase (aproximadamente 1 hora).

1. Coletar 12mL de sangue em 2 tubos com EDTA (tampa roxa de 6mL cada)
2. Centrifugar o sangue por 10 minutos a 2500rpm e descartar o plasma
3. Transferir os leucócitos (glóbulos brancos) para tubo falcon com pipeta pasteur
4. Adicionar tampão RSD 1x com pipeta pasteur até completar o volume final de 11mL no tubo.
5. Adicionar 60uL de nonidet p40 (6 gotas), homogeneizar por 10 minutos até ficar translúcido e cor cereja contra a luz
6. Centrifugar por 10 minutos a 2500rpm e desprezar o sobrenadante, virando o tubo no descarte de sangue
7. Ressuspender o pellet em 500uL de tampão RSB 1x
8. Lisar os núcleos com 3mL de SDS
9. Adicionar 80uL de proteinase K, agitar por 10 minutos

10. Incubar por 2-3 horas ou overnight a 37°C na estufa
11. Esperar 1 semana para realizar a 2a fase (pode ser realizada no dia seguinte).

Extração de DNA – 2ª fase (aproximadamente 11/2 - 2 horas)

1. Adicionar 3mL de fenol saturado (pipeta de plástico), misturar, invertendo gentilmente o tubo, e homogeneizar por 10 minutos. Centrifugar 10 minutos a 2500rpm.
2. Transferir a porção superior do tubo (transparente) com uma pipeta pasteur para outro tubo falcon. Tomar cuidado para não agitar a porção inferior que será descartada).
3. Adicionar 1,5mL de fenol e 1,5mL de clorofórmio (com pipeta de vidro). Misturar a solução e homogeneizar por 10 minutos. Centrifugar por 10 minutos a 2500rpm. Remover a porção inferior do tubo e descartar.
4. Adicionar 3mL de clorofórmio. Misturar a solução e homogeneizar por 10 minutos. Centrifugar por 10 minutos a 2500rpm. Remover completamente a porção inferior do tubo e descartar.
5. Adicionar 6mL de etanol 100% gelado e misturar levemente, até observar o aparecimento do precipitado de DNA.
6. Levar o frasco para geladeira overnight.
7. Pescar o DNA e ressuspender em 200uL de H₂O
8. Deixar entrar em solução à temperatura ambiente overnight.
9. Guardar a amostra na caixa de estoque.

9.4. Anexo IV Protocolo utilizado para análise de CMA.

Protocolo SNP Array 6.0 – Affymetrix

Preparação

- Diluir as amostras a 50ng/uL em 25uL com tampão TE com EDTA reduzido
- Quantificar as amostras para verificar diluição
- O array pode ser feito com 24, 48 ou 96 amostras
- Utilizar os termocicladores com placa de platina, que possuem menos tempo de rampagem entre as temperaturas: Eppendorf 1 ou Veriti
- **Dica:** Ligar o termociclador e já deixar com a tampa pré-aquecida antes de iniciar os experimentos

OBS.: Manter as placas sempre em gelo no cooling chamber

DIGESTÃO

- Adicionar **5uL de amostra** por pocinho
- C+ = 5uL de Reference Genomic DNA (kit)
- C- = 5uL de H2O RNase Free

A etapa de digestão ocorre com 2 enzimas de restrição: Nsp e Sty, que devem ocorrer separadamente (pegar as enzimas somente na hora, não vortexar, dar spin)

- Fazer **2 mix de digestão**: um para a enzima Nsp e outro para a enzima Sty

Tabela 5 - Digestão com enzima NspI, valores em uL

Reagentes	1 amostra	24 amostras (15%)	48 amostras (15%)
H ₂ O RNase Free	11,55	318,8	637,6
Nsp Buffer	2	55,2	110,4
BSA	0,2	5,5	11
NspI	1	27,6	55,2

Tabela 6 - Digestão com enzima StyI, valores em uL.

Reagentes	1 amostra	24 amostras (15%)	48 amostras (15%)
H ₂ O RNase Free	11,55	318,8	637,6
Sty Buffer	2	55,2	110,4

BSA	0,2	5,5	11
StyI	1	27,6	55,2

- Aliquotar **33,5uL (24 amostras) ou 67 uL (48 amostras) de mix** em um strip de 12 tubos
- Usando a multicanal, distribuir 14,75uL de mix por amostra

Tabela 7 - Exemplo de placa para 24 amostras. Cada pocinho da placa se refere a uma amostra.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Nsp	Nsp	Nsp	Nsp	Nsp	Nsp	Nsp	Nsp	Nsp	Nsp	Nsp	Nsp
B	Nsp	Nsp	Nsp	Nsp	Nsp	Nsp	Nsp	Nsp	Nsp	Nsp	C+	C-
C												
D	Sty	Sty	Sty	Sty	Sty	Sty	Sty	Sty	Sty	Sty	Sty	Sty
E	Sty	Sty	Sty	Sty	Sty	Sty	Sty	Sty	Sty	Sty	C+	C-
F												
G												
H												

Pode cortar a placa, caso prefira.

- Selar muito bem a placa, para que não ocorra contaminação entre as amostras
- Vortexar a placa (3x de 2 segundos em cada parte ou 30s no vortex de placa)
- Dar um spin de 30s
- Pré-aquecer a tampa do termociclador antes de colocar a placa → Iniciar programa escolhido > esperar chegar a ~100°C (dependendo do termociclador) > pausar > abrir > colocar a placa > fechar > continuar programa (Play ou Resume)
- Programas:
 - Eppendorf – Simoni > cytoscan > digest
 - Veriti - Cytoscandigest

Temperatura	Tempo
37°C	120min
65°C	20min
4°C	Hold

• LIGAÇÃO

- Fazer **2 mix de ligação**: um para a enzima Nsp e outro para a enzima Sty (**Obs.** Vortexar o Ligase Buffer até ressuspender os precipitados)

Tabela 8 - Mix de reação para Ligação com NspI, valores em uL

Reagentes	1 amostra	24 amostras (25%)	48 amostras (25%)
10x T4 Buffer	2,5	75	150
Nsp Adaptor	0,75	22,5	45
T4 Ligase	2	60	120

Tabela 9 - Mix de reação para Ligação com StyI, valores em uL

Reagentes	1 amostra	24 amostras (25%)	48 amostras (25%)
10x T4 Buffer	2,5	75	150
Sty Adaptor	0,75	22,5	45
T4 Ligase	2	60	120

- Aliquotar **12,5uL (24 amostras) ou 25uL (48 amostras) de mix** em um strip de 12 tubos
- Usando a multicanal, distribuir **5,25uL de mix** por amostra digerida
- Selar a placa, vortexar e dar spin de 30s
- Pré-aquecer o termociclador antes de colocar a placa
- Programas:
 - Eppendorf – Simoni > cytoscan > ligate
 - Veriti - Cytoscanligate

Temperatura	Tempo
16°C	180 min
70°C	20 min
4°C	Hold

>> Ponto de parada da reação: armazenar a -20°C

- **PCR**

Os PCRs são feitos em quadruplicata para a enzima Nsp e em triplicata para a enzima Sty

- Usando a multicanal, adicionar **75uL** de H₂O RNase Free em cada amostra pós-ligação
 - Dar um vortex (ou up and down) e spin
- Transferir **10uL** das amostras ligadas com Nsp para nova placa de PCR >> 4x

Tabela 10 - Esquema de placa para PCR com enzima NspI, utilizando 24 amostras. Amostras em quadruplicata.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Nsp 01	Nsp 02	Nsp 03	Nsp 04	Nsp 05	Nsp 06	Nsp 07	Nsp 08	Nsp 09	Nsp 10	Nsp 11	Nsp 12
B	Nsp 13	Nsp 14	Nsp 15	Nsp 16	Nsp 17	Nsp 18	Nsp 19	Nsp 20	Nsp 21	Nsp 22	C+	C-
C	Nsp 01	Nsp 02	Nsp 03	Nsp 04	Nsp 05	Nsp 06	Nsp 07	Nsp 08	Nsp 09	Nsp 10	Nsp 11	Nsp 12
D	Nsp 13	Nsp 14	Nsp 15	Nsp 16	Nsp 17	Nsp 18	Nsp 19	Nsp 20	Nsp 21	Nsp 22	C+	C-
E	Nsp 01	Nsp 02	Nsp 03	Nsp 04	Nsp 05	Nsp 06	Nsp 07	Nsp 08	Nsp 09	Nsp 10	Nsp 11	Nsp 12
F	Nsp 13	Nsp 14	Nsp 15	Nsp 16	Nsp 17	Nsp 18	Nsp 19	Nsp 20	Nsp 21	Nsp 22	C+	C-
G	Nsp 01	Nsp 02	Nsp 03	Nsp 04	Nsp 05	Nsp 06	Nsp 07	Nsp 08	Nsp 09	Nsp 10	Nsp 11	Nsp 12
H	Nsp 13	Nsp 14	Nsp 15	Nsp 16	Nsp 17	Nsp 18	Nsp 19	Nsp 20	Nsp 21	Nsp 22	C+	C-

- Transferir **10uL** das amostras ligadas com Sty para nova placa de PCR >> 3x

Tabela 11 - Esquema de placa para PCR com enzima StyI, utilizando 24 amostras.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sty 01	Sty 02	Sty 03	Sty 04	Sty 05	Sty 06	Sty 07	Sty 08	Sty 09	Sty 10	Sty 11	Sty 12
B	Sty 13	Sty 14	Sty 15	Sty 16	Sty 17	Sty 18	Sty 19	Sty 20	Sty 21	Sty 22	C+	C-
C	Sty 01	Sty 02	Sty 03	Sty 04	Sty 05	Sty 06	Sty 07	Sty 08	Sty 09	Sty 10	Sty 11	Sty 12
D	Sty 13	Sty 14	Sty 15	Sty 16	Sty 17	Sty 18	Sty 19	Sty 20	Sty 21	Sty 22	C+	C-
E	Sty 01	Sty 02	Sty 03	Sty 04	Sty 05	Sty 06	Sty 07	Sty 08	Sty 09	Sty 10	Sty 11	Sty 12
F	Sty 13	Sty 14	Sty 15	Sty 16	Sty 17	Sty 18	Sty 19	Sty 20	Sty 21	Sty 22	C+	C-
G												
H												

- Se for correr as duas reações ao mesmo tempo, pode-se fazer o mix de reação junto. Caso contrário, fazer 2 mixes separados
- Kit de reagentes TITANIUM >> freezer 6. Primer 002 vem junto com o kit

Reagentes	1	24 amostras (15%)		48 amostras (15%)	
	amostra	Nsp	Sty	Nsp	Sty
H ₂ O RNase Free	39,5	4361	3270,5	8722	6541
Titanium Taq Buffer	10	1104	828	2208	1656
GC-Melt	20	2208	1656	4416	3312
dNTPs	14	1545,5	1159	3091	2318
Primer 002	4,5	497	372,5	994	745
Taq Polymerase	2	221	165,5	442	331

- Despejar o mix no reservatório para reagentes
- Usando a multicanal, adicionar **90uL** do mix por amostra
- Selar a placa, vortexar e dar spin de 30s
- Pré-aquecer o termociclador antes de colocar a placa
- Programas:
 - Eppendorf – Simoni > cytoscan > PCR
 - Veriti – CytoscanPCR

Temperatura	Tempo	Ciclos
94°C	3 min	---
94°C	30 s	
60°C	45 s	30
68°C	15 s	
68°C	7 min	---
4°C	Hold	---

>> Ponto de parada da reação: armazenar a -20°C

3.1) Verificação do PCR

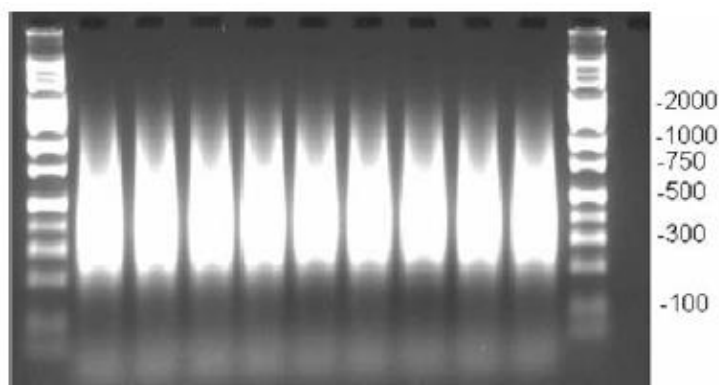
- Correr dois géis de agarose 2% para verificar se as amostras foram corretamente amplificadas e se não há contaminação
- Correr gel por amostragem. Cuidado para não correr 2x a mesma amostra. É importante correr mais de um (ou todos) os C-, para verificar se não há contaminação

Tabela 12 - Sugestão de seleção das amostras do PCR para correr em gel. **IMPORTANTE** correr os C+ e C-.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----

A	Nsp01	Nsp02	Nsp03	Nsp04	Nsp05	Nsp06	Nsp07	Nsp08	Nsp09	Nsp10	Nsp11	Nsp12
B	Nsp13	Nsp14	Nsp15	Nsp16	Nsp17	Nsp18	Nsp19	Nsp20	Nsp21	Nsp22	C+	C-
C	Nsp01	Nsp02	Nsp03	Nsp04	Nsp05	Nsp06	Nsp07	Nsp08	Nsp09	Nsp10	Nsp11	Nsp12
D	Nsp13	Nsp14	Nsp15	Nsp16	Nsp17	Nsp18	Nsp19	Nsp20	Nsp21	Nsp22	C+	C-
E	Nsp01	Nsp02	Nsp03	Nsp04	Nsp05	Nsp06	Nsp07	Nsp08	Nsp09	Nsp10	Nsp11	Nsp12
F	Nsp13	Nsp14	Nsp15	Nsp16	Nsp17	Nsp18	Nsp19	Nsp20	Nsp21	Nsp22	C+	C-
G	Nsp01	Nsp02	Nsp03	Nsp04	Nsp05	Nsp06	Nsp07	Nsp08	Nsp09	Nsp10	Nsp11	Nsp12
H	Nsp13	Nsp14	Nsp15	Nsp16	Nsp17	Nsp18	Nsp19	Nsp20	Nsp21	Nsp22	C+	C-

- Seguir o mesmo princípio para o gel do produto do PCR com Sty.
- Quantidades:
 - Gel de agarose 2%
 - 3uL de azul de bromofenol
 - 3uL de amostra
 - 2uL de ladder 1kb
- Os géis devem apresentar um smir (rastros) entre **1100pb e 200pb**.



• PURIFICAÇÃO POR BEADS

Antes de começar:

- Retirar as beads da geladeira
- Nomear os tubos
- Preparar etanol 75% (para 24 amostras = ~40mL)

- Juntar todas as alíquotas (7x) da mesma amostra em um tubo 2mL
- Adicionar 1mL de BEAD AMPure XP em cada tubo
- Inverter a rack magnética 10x
- Incubar em temperatura ambiente por 10 min
- Centrifugar por 3 min a 16100rcf
- Colocar na rack magnética
- Retirar o sobrenadante
- Adicionar 1,5mL de etanol 75% fresco

- Vortexar as amostras por 2 min a 75% da velocidade máxima
 - Utilizar o vortex adaptado da citogenética
- Centrifugar por 3 min a 16100rcf
- Colocar na rack magnética
- Retirar o sobrenadante sem mexer nas beads
- Dar um spin por 30s a 16100rcf
- Colocar na rack magnética
- Retirar o restante de etanol 75%
- Deixar o tubo secar aberto em temperatura ambiente por ~15min para secar o halo
 - Não pode craquelar muito
- Colocar 55uL de EB Buffer (kit)
- Tentar eluir o pellet antes de colocar no vortex para aumentar a eficiência de reação
- Vortexar por 10 min a 75% da velocidade máxima
- Centrifugar por 5 min a 16100rcf
- Colocar os tubos na rack magnética e deixar por 5 min sem mexer
- Transferir 45uL de amostra para nova placa

4.1) Quantificação

Diluir as amostras 1:10 para poder quantificar pelo epoch >>

2uL amostra em 18uL de H2O

- Parâmetros: $\square = 450 - 700 \text{ ng/uL}$
- $260/280 = > 1,8$
- $320 = < 0,1$

• FRAGMENTAÇÃO

REAÇÃO TODA NO GELO!!!

Descongelar os reagentes no gelo.

Deixar os reagentes, tubo do mix, placa, strip no gelo por pelo menos 10 min antes de começar a reação

Deixar o termocilador a 37°C (aquecer a tampa e pausar) por, no mínimo, 10 min antes de colocar a reação.

Ligar a centrífuga a 4°C

- Aliquotar **12uL (24 amostras)** ou **28uL (48 amostras)** de **10x Fragmentation Buffer** em um strip de 12 tubos
- Usando a multicanal, adicionar **5uL** de Fragmentation Buffer em cada amostra
 - Amostras devem ficar com 50uL no total
- Selar, dar um vortex e um spin na placa
- Fazer o mix de reação no gelo
 - Assumindo que o Fragmentation Reagent está a 2.5U/uL

Reagentes	24 amostras	48 amostras	24 amostras (novo)
------------------	--------------------	--------------------	---------------------------

H2O RNase Free	154,8	309,6	172,0
Fragmentation Buffer	18	36	20,0
Fragmentation Reagent (2.5U/uL)	7,2	14,4	8,0

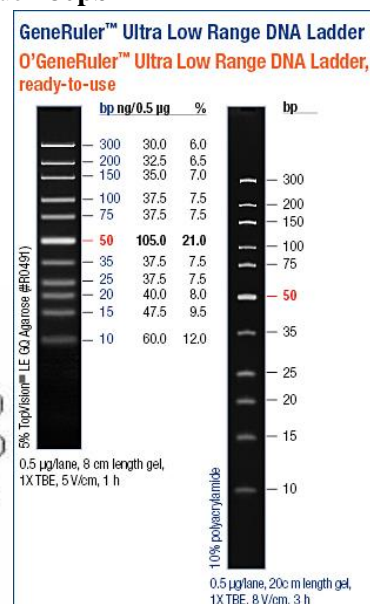
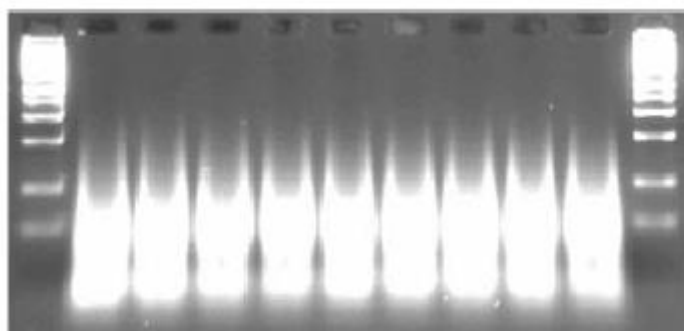
- Aliquotar **12uL (24 amostras) ou 28uL (48 amostras) de mix** em um strip de 12 tubos
- Usando a multicanal, distribuir **5uL** de mix em cada amostra
- Selar a placa, vortexar e dar spin de 30s a 4°C por 2000 rpm
- Pré-aquecer o termociclador a 37°C antes de colocar a placa
- Programas:
 - Eppendorf – Simoni > cytoscan > fragmentation
 - Veriti - Cytoscanfrag

Temperatura	Tempo
37°C	35 min
95°C	15 min
4°C	Hold

>> Ponto de parada da reação: armazenar a -20°C

5.1) Verificação da Fragmentação

- *Correr em gel 3% TODAS as amostras*
- Quantidades:
 - Gel de agarose 3%
 - 4uL de azul de bromofenol
 - 1,5uL de amostra
 - 2uL de gene ruler ultra low range (freezer)
- Os géis devem apresentar um smir (rastros) menor que **180pb**



• **MARCAÇÃO**

- Preparar o **mix** de reação:

Reagentes	1 amostra	24 amostras (15%)	48 amostras (15%)
5x TdT Buffer	14	386,4	772,8
DNA Labeling Reagent	2	55,2	110,4
30U/uL TdT Enzyme	3,5	96,6	193,2

- Aliquotar **44,5uL (24 amostras) ou 89uL (48 amostras) de mix** em um strip de 12 tubos
- Usando a multicanal, distribuir **19,5uL** de mix por amostra
- Selar a placa, vortexar e dar spin de 30s
- Pré-aquecer o termociclador antes de colocar a placa
- Programas:
 - Eppendorf – Simoni > cytoscan > label
 - Veriti – Cytoscanlabel

Temperatura	Tempo
37°C	4 h
95°C	15 min
4°C	Hold

Ponto de parada >> Aconselha-se a armazenar as amostras com tampão de hibridação para mantê-las mais estáveis. Se não for hibridar no mesmo dia, colocar o mix de hibridação por amostra e armazenar a -20°C. Caso contrário, só seguir para a próxima etapa

OBS1.: Colocar a reação no termociclador somente das amostras que foram hibridar no chip naquele dia

OBS2.: As hibridações no chip devem ocorrer de 12 em 12, pois só temos 4 estações de lavagem. Cortar as placas **ANTES** de colocar o mix de hibridação (volume muito alto e alto risco de contaminação)

OBS3.: Evitar descongelar muitas vezes o mix de hibridação + reação >> perda da estabilidade

• **HIBRIDAÇÃO**

- Mix de hibridação:
 - Fazer o mix em tubo falcon

Reagentes	24 amostras	48 amostras
Hib Buffer Part 1	4537,5	9075
Hib Buffer Part 2	412,5	825
Hib Buffer Part 3	192,5	385

Hib Buffer Part 4	27,5	55
OCR 0100	55	110

- Despejar o mix no reservatório para reagentes
- Usando a multicanal, distribuir **190uL de mix** por amostra
 - Fazer up and down com cuidado para não vaziar amostra, pois o volume fica no limite da placa
 - Não colocar a ponteira no fundo do pocinho da placa, para não vaziar amostra
- Selar bem. Se for continuar, dar um spin e colocar no termocilador pré-aquecido. Se não, colocar no freezer
 - Se colocar no freezer, no dia seguinte colocar no termociclador antes de hibridar
- Programas:
 - Eppendorf – Simoni > cytoscan > hibridization
 - Veriti – Cytoscanhib

Temperatura	Tempo
95°C	10 min
49°C	Hold

- Ao final do ciclo no termociclador, sem tirar a placa do equipamento, fazer up and down nas amostras para eluir bem
- Transferir **200uL** de cada amostra para os respectivos chips
 - Os chips devem estar em temperatura ambiente, nomeados e com uma ponteira amarela enfiada no septo de cima
 - Ejetar a amostra no chip na posição de 90° (vertical) e verificar se ficou uma bolha móvel dentro do chip, girando-o e dando umas batidinhas caso não esteja se movendo
 - Vedar com adesivos de bolinhas
- Colocar os chips no forno de hibridação a 50°C, com rotação de 60rpm, de 16 a 18 horas
 - Os chips devem ser colocados de 4 em 4 no forno, e assim por diante, até que todas as amostras sejam colocadas nos chips e levadas ao forno
 - Colocar 8 chips por barquinha
 - Código de barras do chip sempre para fora da barca
- Guardar a placa com as amostras restantes a -20°C.

• **CADASTRO DE CHIPS**

- Antes de lavar, é importante cadastrar os chips no sistema
 - Ligar o computador
 - Affymetrix Launcher >> Portal >> (vai abrir janela do Explorer) >> Samples >> Quick registration
 - Adicionar quantos chips serão registrados, selecionar projeto e tipo de chip (GenomeWide6.0)

- Colocar o código de barras para escanear >> preencher o nome/número/registo pessoal do chip
- Após registrar todos os chips >> Next. Dando a página de cadastro completo, pode fechar a janela.

• **LAVAGEM**

- Deixar em temperatura ambiente, 20-30 min antes de usar, o Holding Buffer e os tampões de lavagem aliquotados (**Stain 1, Stain 2 e Holding Buffer**) em eppendorfs 1.5 mL
 - **600uL SAPE Stain Solution (Stain 1)**
 - **600uL Antibody Stain Solution (Stain 2)**
 - **1000uL Array Holding Buffer**
- Retirar a placa das amostras do freezer
- Retirar os chips do forno de hibridação, colocar as ponteiros amarelas nos septos de cima e retirar cada amostra de dentro do chip, transferindo-a para a placa de reação no poço correspondente.
- Adicionar **~250ul de Holding buffer** nos chips, **sem deixar bolhas**
 - Completar o chip com tampão até preencher tudo
 - Colocar na posição vertical, não ultrapassando o primeiro estágio da pipeta
 - Caso faça bolhas, retirar o tampão e colocá-lo novamente até a bolha desaparecer
- Podem ser lavados somente quatro chips por vez. Nos demais deve-se colocar os adesivos, envolve-los em papel alumínio e armazenar na geladeira até no máximo 4 horas.
- Antes da lavagem, realizar um **Priming**
 - Abrir o programa Affymetrix Launcher, AGCC Fluidics Control, Select Protocol Prime_450, Station 1: Module 1-4
 - Na estação colocar H₂O, Wash A e Wash B em seus respectivos lugares
 - Colocar 3 eppendorfs limpos em cada módulo e retirar os chips “pó”
 - Abaixar as alavancas e deixar rodar o programa
- Na lavagem dos chips:
 - Colocar os tampões aliquotados (1, 2 e 3) na estação
 - Em AGCC Fluidics Control, Station 1 ID, selecionar o nome da amostra pré-cadastrada, o tipo de protocolo: Genome Wide SNP6_450 e correr
 - Colocar os chips sem adesivos
 - Lavagem dura ~1h e 30 min
- Após a lavagem, retirar o chip da estação e verificar a presença de bolhas. Caso tiver, colocar o chip novamente, colocar 1 ml de Holding Buffer no eppendorf 3 e fechar a alavanca. A estação reconhece o processo como sinal de presença de bolhas. Se continuar com bolhas, repetir o processo. Caso não haja, colocar o selo adesivo, limpar bem a tela do chip (sem deixar manchas e pelos) e por pra escanear
- Após a lavagem de 16 amostras ou mudança de protocolo realizar um BLEACH.

• **SCANNER**

- Programa AGCC Scan Control
- Colocar os chips limpos e vedados no scanner (a partir da marca vermelha para trás)
- Correr (Start)
- Pode colocar mais amostras pra escanear sem ter acabado a leitura dos 4 chips. Mas deve ter acabado a leitura de pelo menos um chip: Add chip - Pause - Colocar chip - Resume
- Quando acaba a leitura de todos os chips a máquina entra em standby-by, não sendo necessário desligá-la imediatamente

9.5. Anexo V Protocolo de análise e interpretação de CMA



LABORATÓRIO DE CITOGENÉTICA HUMANA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA - FCM - UNICAMP

GUIA PRÁTICO PARA INTERPRETAÇÃO DE DESEQUÍLIBRIOS GENÔMICOS IDENTIFICADOS PELAS TÉCNICAS DE *CHROMOSOMAL MICROARRAY* *ANALYSIS (CMA)*

Táris Antonio Paiva Vieira

Protocolo adaptado a partir de revisão da literatura (1 – 9)

Etapa 01: verificar os parâmetros de qualidade no software de análise da plataforma utilizada.

- *Cytoscan Affymetrix*: verificar os seguintes parâmetros:

✓ SNPQC: ≥ 15 ($\geq 12^*$)

✓ mapd: $\leq 0,25$

✓ wavines: $\leq 0,12$

* Se os demais parâmetros forem adequados, *arrays* com SNPQC acima de 12 podem ser analisados. Se apenas o SNPQC estiver abaixo de 12 (com demais parâmetros bons) prosseguir a análise, verificando apenas o gráfico de Log2ratio. Não analisar regiões de LOH (etapa 06).

** Se apenas um dos dois parâmetros (mapd ou wavines) não for adequado, verificar o valor (se limítrofe ou muito discrepante) e prosseguir a análise considerando apenas as alterações ≥ 300 Kb e reportar no relatório final uma observação descrevendo os valores dos parâmetros obtidos na reação.

*** Se os dois parâmetros de qualidade (mapd e wavines) falharem, não prosseguir com a análise.

Etapa 02: verificar a configuração de filtros das alterações que o programa irá mostrar:

Cytoscan Affymetrix:

- Selecionar o número mínimo de 50 marcadores para duplicações e de 25 marcadores para deleções. Não selecionar nenhum tamanho mínimo (em Kb) de alterações*.
- Para alterações em mosaico, selecionar o número mínimo de 5.000 marcadores, tanto para deleções como para duplicações.
- Para perda de heterozigose (LOH) selecionar o número mínimo de 500 marcadores e tamanho de 1.500 kb.

* CNVs raras menores que 20 kb não devem ser relatadas, a não ser que incluam um gene ou parte de um gene relevante para o fenótipo do indivíduo. Essas devem ser confirmadas por outro método.

LABORATÓRIO DE CITOGENÉTICA HUMANA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA -FCM - UNICAMP

Etapa 03: verificar se há alterações grandes (maiores que ~ 500 Kb) em regiões de desequilíbrios genômicos recorrentes (Síndromes de deleções/ duplicações).

- Se sim, verificar conforme etapa 04 e comparar os dados clínicos com os descritos na literatura (DECIPHER, OMIM, GeneReviews ou artigos de revisão). Além disso, verificar os outros desequilíbrios genômicos encontrados. Para a interpretação desses, seguir para as próximas etapas.

Etapa 04: para cada desequilíbrio genômico encontrado, verificar:

- “Confiabilidade” da alteração identificada pelo programa, principalmente para as alterações muito pequenas. Para isso, verificar:
 - ✓ Número de marcadores dentro da região do desequilíbrio (se a cobertura e distribuição são boas ou não);
 - ✓ Gráficos de *Log2 Ratio* e checar se “aparentemente” a alteração “realmente” existe;
 - ✓ Se a alteração é confirmada pelos oligonucleotídeos de SNPs.

Observação 01: não descrever alterações “não confiáveis” como patogênicas. Se a alteração for relevante (ex.: incluir gene de doença que possa explicar o fenótipo) indicar a confirmação desta, por outra técnica.

- Se a alteração já foi descrita em controles internos (grupo controle brasileiro) e no aDGV. Verificar se o tipo de alteração do controle é o mesmo do paciente. Se sim, é uma alteração frequente ou rara? Considerar frequentes as alterações encontradas em pelo menos > 1% dos indivíduos nessas bases.

Alterações que também são comuns nesses grupos controle são classificadas como benignas (Classe I).

Observação 02: Deve-se levar em conta a sobreposição da região alterada com os controles. Se não houver 100% de sobreposição, verificar se há genes na região sem sobreposição. Se houver, a alteração não pode ser considerada como uma mesma alteração.

Se a alteração tiver frequência $\leq 1\%$ nos controles, seguir para a etapa 05.

LABORATÓRIO DE CITOGENÉTICA HUMANA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA -FCM - UNICAMP

Etapa 05:

Após essa análise inicial, selecionar as alterações que ainda não foram classificadas como patogênicas e nem benignas, copiar as coordenadas genômicas e pesquisar no UCSC Genome Browser: <https://genome.ucsc.edu/>

- Configurar o UCSC da seguinte maneira:
 - ✓ Selecionar a versão do genoma (*Human assembly*) adequada (de acordo com a versão do chip utilizado);
 - ✓ Selecionar os seguintes *tracks*:
 - Base position: full
 - Chrom. Band: pack
 - RefSeq genes: full
 - OMIM genes: pack
 - ClinGen CNVs: pack
 - DECIPHER: pack
 - DGV Structural Variation: pack
 - Segmental Duplications: pack
 - SNP arrays (Affy CytoScan array) dense
- Verificar se a alteração já foi descrita no DGV. Verificar a % de sobreposição com as alterações descritas no DGV, conforme observação 01, abaixo. Se sim, é uma alteração frequente ou rara? Considerar raras as alterações encontradas em menos de dois indivíduos e em menos de dois estudos diferentes (critério estrigente)⁵.

Alterações que também são comuns no DGV (> 1%) são classificadas como benignas (Classe I).

Observação 01: Deve-se levar em conta a sobreposição da região alterada com os controles. Se não houver 100% de sobreposição, verificar se há genes na região sem sobreposição. Se houver, a alteração não pode ser considerada como uma mesma alteração. Além disso, verificar qual a plataforma utilizada nos casos descritos no DGV. As alterações descritas no DGV que foram encontradas apenas em *arrays* de BAC não podem ser consideradas.

LABORATÓRIO DE CITOGENÉTICA HUMANA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA -FCM - UNICAMP

- Verificar se a alteração já foi descrita em bases de dados clínicos (DECIPHER e ClinGen). Se sim, verificar se no paciente da base de dados foram encontradas outras alterações e como foram classificadas (se patogênicas ou não). Quando possível, comparar o fenótipo. Comparar preferencialmente com as alterações de tamanho igual ou menor.
- Verificar a presença de genes OMIM dentro da região. Verificar se a alteração inclui éxons. Iniciar a investigação pelos genes comprovadamente relacionados à doença (marcados em verde escuro). Quando houver, verificar o padrão de herança da doença e o mecanismo patogênico da mutação (ganho ou perda de função) para correlacionar com o tipo de alteração encontrada (duplicação ou deleção) e verificar se os sinais clínicos são compatíveis.
- Após essa análise, as alterações devem ser classificadas em cinco diferentes classes, seguindo as recomendações abaixo^{3,5}:
 - ✓ **Classe I – Benignas:** variantes comuns encontradas em mais de 1% da população geral.
 - ✓ **Classe II – Provavelmente benignas:** variantes raras, que não possuem genes em sua extensão, ou ainda que compreendam apenas regiões intrônicas. A CNV foi descrita em um pequeno número de casos ($\leq 1\%$) ou em um único estudo em bases de dados da população geral (controles internos, aDGV e DGV) e não é uma CNV comum*.

*Atenção às CNVs com penetrância incompleta/ de susceptibilidade que estão presentes em ambas as bases (fenótipo anormal e controles) (exemplo 15q11 BP1 BP2; 15q13, 16p11.2, etc). Essas são exceções e devem ser descritas como classe III ou IV, conforme correlação genótipo-fenótipo.
 - ✓ **Classe III – Variante de significado clínico incerto (VOUS):** variantes raras, que não foram encontradas em controles (interno, aDGV e DGV) e que não foram encontradas anteriormente em outros pacientes com quadro clínico semelhante. Podem ser “*de novo*” ou herdadas. Incluem éxons de genes sem função definida, não relacionados a doenças ou não sensíveis a dosagem, e que não tem significado clínico conhecido.
 - ✓ **Classe IV – Provavelmente patogênicas:** variantes raras, que não foram encontradas em controles (interno, aDGV e DGV), com pontos de quebra que se sobrepõe parcialmente aos de outros indivíduos com fenótipo anormal, portadores do mesmo desequilíbrio, porém o gene ou região crítica ainda não foram identificados; variantes descritas previamente em apenas um indivíduo com o fenótipo similar; variantes que incluem éxons de genes

LABORATÓRIO DE CITOGENÉTICA HUMANA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA -FCM - UNICAMP

comprovadamente relacionados a doenças e aos sinais clínicos do indivíduo em avaliação, e possuem padrão de herança compatível com o número de cópias e consequências patogênicas da mutação – ganho ou perda de função.

- ✓ **Classe V – Patogênicas:** variantes documentadas e bem estabelecidas na literatura, como as síndromes de deleção e duplicação; descritas em dois ou mais casos registrados nos bancos de dados de indivíduos com descrições fenotípicas similares, correlação evidente entre o desequilíbrio genômico e o fenótipo do indivíduo em investigação. Em geral, alterações maiores que 3 a 5 Mb que incluem múltiplos genes, mesmo que não se enquadrem nos critérios acima, são patogênicas.

Etapas 06: verificar se há regiões de homozigose grandes e (ou) em múltiplas regiões do genoma:

- Comparar com os controles utilizando os mesmos parâmetros utilizados para CNVs. Liberar no relatório final (laudo) apenas LOHs maiores que 10 Mb encontradas em um único cromossomo, ou quando houver mais que 1% de regiões de homozigose no genoma autossômico, conforme cálculo abaixo.

Cálculo da porcentagem de regiões de homozigose (ROH):

$$\% \text{ homozigose no genoma autossômico} = \frac{\text{soma dos segmentos com ROH nos autossomos}}{3.020 \text{ Mb (genoma autossômico total)}} \times 100.$$

- No relatório final, quando uma única LOH maior que 10 Mb for encontrada, descrevê-la conforme ISCN 2016. Quando forem encontradas múltiplas LOHs, descrever a porcentagem que foi encontrada no genoma autossômico e uma tabela com as regiões e os pontos de início e término das LOHs. Porém, não liberar como alterações patogênicas. Essas ainda necessitam ser mais bem investigadas.
- As ROH ou LOH são classificadas conforme recomendações abaixo. Ambas as classes são relatadas.
 - ✓ **Classe I – Consanguinidade/ Identidade por descendência:** que são múltiplas regiões de homozigose, em geral maiores que 10 Mb, e que são encontradas em múltiplos cromossomos (a soma ultrapassa 1% do genoma autossômico).
 - ✓ **Classe II – LOHs causadas provavelmente por dissomia uniparental total ou segmentar:** uma ou mais regiões de homozigose, em geral maiores que 10 Mb, encontradas em um único cromossomo.

LABORATÓRIO DE CITOGENÉTICA HUMANA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA -FCM - UNICAMP

Etapa 07: verificar se há alterações em mosaico:

- Se houver alguma alteração em mosaico: verificar todos os parâmetros das etapas 04 e 05 deste protocolo.

Referências Bibliográficas:

1. Gijsbers AC, Schoumans J, Ruivenkamp CA. Interpretation of array comparative genome hybridization data: a major challenge. *Cytogenet Genome Res.* 2011;135(3-4):222-7.
2. de Leeuw N, Hehir-Kwa JY, Simons A, Geurts van Kessel A, Smeets DF, Faas BH, Pfundt R. SNP array analysis in constitutional and cancer genome diagnostics—copy number variants, genotyping and quality control. *Cytogenet Genome Res.* 2011;135(3-4):212-21.
3. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST; Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med.* 2011;13(7):680-5.
4. de Leeuw N, Dijkhuizen T, Hehir-Kwa JY, Carter NP, Feuk L, Firth HV, et al. Diagnostic interpretation of array data using public databases and internet sources. *Hum Mutat.* 2012;33(6):930-40.
5. Vermeesch JR, Brady PD, Sanlaville D, Kok K, Hastings RJ. Genome-wide arrays: quality criteria and platforms to be used in routine diagnostics. *Hum Mutat.* 2012;33(6):906-15.
6. Hehir-Kwa JY, Pfundt R, Veltman JA, de Leeuw N. Pathogenic or not? Assessing the clinical relevance of copy number variants. *Clin Genet.* 2013;84(5):415-21.
7. Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. *Nat Rev Genet.* 2015;16(3):172-83.
8. Kearney HM, Kearney JB, Conlin LK. Diagnostic implications of excessive homozygosity detected by SNP-based microarrays: consanguinity, uniparental disomy, and recessive single-gene mutations. *Clin Lab Med.* 2011;31(4):595-613.
9. Sund KL, Zimmerman SL, Thomas C, Mitchell AL, Prada CE, Grote L, et al. Regions of homozygosity identified by SNP microarray analysis aid in the diagnosis of autosomal recessive disease and incidentally detect parental blood relationships. *Genet Med.* 2013;15(1):70-8.

9.6. Anexo VI Protocolo de cariótipo de sangue periférico



Departamento de Genética Médica e Medicina Genômica
Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica

1

CULTURA DE SANGUE PERIFÉRICO

1. COLETA

Coletar de 2 a 5mL de sangue através de punção venosa em tubos de coleta a vácuo contendo heparina sódica (tubos com tampa verde), após assepsia local com álcool 70%. Também pode ser utilizado tubo de coleta a vácuo contendo citrato de sódio para a coleta.

*Utilizar tubos de boa qualidade, pois a qualidade da heparina sódica interfere diretamente na qualidade da cultura.

2. PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA E SEMEADURA

Para a realização da cultura, utilizar todos os reagentes descritos acima em temperatura ambiente, exceto a fitohemaglutinina que após o descongelamento deve ser deixada na geladeira até o uso.

Limpar o fluxo laminar com álcool 70% e colocar todos os materiais necessários (conforme quantidade de amostras). Ligar o fluxo laminar e a luz UV do mesmo, por 20 minutos. Limpar todos os frascos de reagentes com álcool 70%, antes da abertura dos mesmos.

3. PREPARAÇÃO DO MASTER MIX PARA SEMEADURA

De acordo com a quantidade necessária para as amostras que serão preparadas, preparar um master mix adicionando em um tubo para centrifuga tipo Falcon em Polipropileno 50 mL estéril:

- 80% de meio de cultura RPMI-1640
- 20% de soro fetal bovino
- 150 µl de fitohemaglutinina (para cada tubo tipo Falcon 15 mL estéril)
- Ajustar o pH para 6,8 – 7,4 (preferencialmente 7,1) adicionando algumas gotas (uma a uma) de HCl 1M
- Distribuir 5 mL do master mix em cada tubo tipo Falcon 15 mL estéril e adicionar de 0,5 mL a 1 mL de sangue total heparinizado em cada tubo
- Incubar os frascos de cultura a 37°C por 72 horas



4. OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS METAFÁSICOS E PROMETAFÁSICOS

Entre 1,5 a 2 horas antes do término das 72 horas, adicionar 50 µl solução de uso *CRA* e deixar incubado a 37°C por 1 hora. Em seguida, adicionar 50 µl solução de uso colchicina 4x10E-5M e deixar incubado a 37°C por 1 hora.

5. HIPOTONIA

Após retirar os tubos de cultura da estufa, centrifugar a 1.700 rpm por 5 minutos e retirar o sobrenadante, deixando 2 mL. Ressuspender no vórtex (por aproximadamente 15 segundos), adicionar 8 mL de KCl 0,075M a 37°C e ressuspender novamente no vórtex (por aproximadamente 15 segundos). Colocar os tubos na incubadora a 37°C por 1 hora.

6. FIXAÇÃO

Interromper a hipotonia adicionando 0,5 mL de solução fixadora e ressuspender no vórtex até que todo o material esteja com a coloração homogênea. Centrifugar a 1700 rpm por 5 minutos. Retirar o sobrenadante, deixando apenas 2 mL no tubo, adicionar 4 mL de solução fixadora, ressuspender e centrifugar novamente (1700 rpm por 5 minutos). Repetir o passo anterior por mais 2 vezes, ou até o *pellet* ficar incolor. Colocar os tubos no freezer por no mínimo 2 horas ou, preferencialmente, deixar por uma noite.

7. PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

Deixar as lâminas em uma cuba com álcool 70% por cinco minutos, secá-las com papel macio e identificá-las. Retirar o material do freezer, centrifugar e retirar o sobrenadante. Adicionar 4 mL de fixador, centrifugar novamente e retirar o sobrenadante deixando apenas 1 mL (conferir *pellet*). Com pipetas Pasteur, pingar de três a quatro gotas do material sobre as lâminas de vidro. Colocar as lâminas em uma estufa a 50°C - 56°C, durante 15 minutos e em seguida, observar em microscópio óptico comum com o diafragma fechado, ou em microscópio de fase.

*pode ser utilizado um borel com água gelada para a confecção das lâminas. Assim, antes de pingar o material na lâmina, passar a lâmina na água gelada.