



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

DEMETRIO SAUL LINDO SAMANAMUD

CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA INICIAL DE UM
SISTEMA *IN VITRO* EXPRESSANDO O GENE *SCN1A* SELVAGEM E MUTAÇÕES
ASSOCIADAS A SÍNDROME DE DRAVET

*CONSTRUCTION AND INITIAL ELECTROPHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION
OF AN IN VITRO SYSTEM EXPRESSING THE WILD-TYPE SCN1A GENE AND
MUTATIONS ASSOCIATED WITH DRAVET SYNDROME*

CAMPINAS

2022

DEMETRIO SAUL LINDO SAMANAMUD

CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA INICIAL DE UM SISTEMA *IN VITRO* EXPRESSANDO O GENE *SCN1A* SELVAGEM E MUTAÇÕES ASSOCIADAS A SÍNDROME DE DRAVET

CONSTRUCTION AND INITIAL ELECTROPHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF AN IN VITRO SYSTEM EXPRESSING THE WILD-TYPE SCN1A GENE AND MUTATIONS ASSOCIATED WITH DRAVET SYNDROME

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

Doctorate thesis presented to the School of Medical Sciences of the University of Campinas to obtain the Ph.D. grade in Sciences

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ÍSCIA TERESINHA LOPES CENDES
COORIENTADOR: PROF.DR. ANDRÉ SCHWAMBACH VIEIRA

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO
DEMETRIO SAUL LINDO SAMANAMUD, E ORIENTADA
PELA PROFA. DRA. ÍSCIA TERESINHA LOPES CENDES

CAMPINAS

2022

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

L645c Lindo Samanamud, Demetrio Saul, 1981-
Construção e caracterização eletrofisiológica inicial de um sistema *in vitro* expressando o gene *SCN1A* selvagem e mutações associadas a Síndrome de Dravet / Demetrio Saul Lindo Samanamud. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Iscia Teresinha Lopes Cendes.
Coorientador: André Schwambach Vieira.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Canais de sódio. 2. Epilepsia. 3. Gene SCN1A. 4. Técnicas de Patch-Clamp. 5. Síndrome de Dravet. 6. Mutação. 7. Canal de sódio disparado por voltagem NAV1.1. I. Lopes-Cendes, Íscia Teresinha, 1964-. II. Vieira, Andre Schwambach, 1982-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Construction and initial electrophysiological characterization of an *in vitro* system expressing the wild-type *SCN1A* gene and mutations associated with Dravet Syndrome

Palavras-chave em inglês:

Sodium channels

Epilepsy

SCN1A gene

Patch-Clamp techniques

Dravet syndrome

Mutation

NAV1.1 voltage-gated sodium channel

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Iscia Teresinha Lopes Cendes [Orientador]

Simoni Helena Avansini

Fábio Rogerio

José Eduardo Peixoto Santos

Vinicius D'Avila Bitencourt Pascoal

Data de defesa: 12-12-2022

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-3087-8984>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7255604093528150>

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

DEMETRIO SAUL LINDO SAMANAMUD

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ÍSCIA TERESINHA LOPES CENDES

COORIENTADOR: PROF. DR. ANDRÉ SCHWAMBACH VIEIRA

MEMBROS

1. PROFA. DRA. ÍSCIA TERESINHA LOPES CENDES

2. PROFA. DRA. SIMONI HELENA AVANSINI

3. PROF. DR. FÁBIO ROGERIO

4. PROF. DR. JOSÉ EDUARDO PEIXOTO SANTOS

5. PROF. DR. VINICIUS D'AVILA BITENCOURT PASCOAL

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: 12/12/2022

DEDICATÓRIA

Muita gente foi importante para a concretização deste trabalho, mas gostaria de dedica-lo a todas as crianças que sofrem de algum tipo de epilepsia, espero ter contribuído no esclarecimento do diagnóstico da Síndrome de Dravet. Ao longo do caminho de desenvolvimento deste trabalho, compreendi a complexidade desse tipo de epilepsia e a necessidade de conhecer a doença a fundo, pois qualquer avanço pode trazer benefícios para essas crianças.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos especiais a minha família, que mesmo não estando presente fisicamente, me apoiaram muito principalmente aos meus pais, Demetrio Lindo e Magda Samanamud. Também agradeço imensamente a Mary pelo apoio em qualquer decisão, e pelo amor incondicional que acompanhou na reta final deste trabalho, muito obrigado por tudo.

Agradecimentos especiais a Dra. Iscia Lopes-Cendes pelo apoio e incentivo durante o doutorado. Por ter aberto tantas portas para mim e fornecido oportunidades que me permitiram crescer pessoal e profissionalmente. Agradeço por acreditar e confiar em mim.

A meu co-orientador Dr. André Schwambach Vieira pela assistência durante esta jornada, que sempre torceu por mim, me deu forças e vivenciou toda a minha jornada acadêmica.

A toda a equipe do laboratório de Genética Molecular pela inestimável ajuda durante a realização deste projeto. Agradeço especialmente a Patrícia Aline Oliveira e Luciana Bonadia, pelo apoio na elaboração e execução da pesquisa. Agradeço às meninas que me ajudaram tanto no trabalho e por suas sugestões, Diana, Canto, Vanessa, Donatti, Jaque, Helena, Tânia, Dani, Maria e Estela. Agradeço também aos meninos: Alexandre Godoi, Douglas da Rosa e Jackeline Vieira pela ajuda na bancada nas sínteses dos plasmídeos. Levarei sempre todos vocês em meus pensamentos!

Agradecimentos especiais a Fabio Torres, Marina Gonsales e Simoni Avansini, por todas as contribuições e comentários pertinentes que ajudaram a enriquecer este trabalho. E que mesmo não estando presente fisicamente na reta final, acompanharam de longe mais uma conquista.

A equipe de Genética Cardiovascular do Instituto de Pesquisa Biomédica de Girona(IDIBGI)-Espanha por terem me acolhido em seus ambientes e me auxiliado nas etapas de eletrofisiologia celular. Um agradecimento especial a Dra. Fabiana Scornik, Dr. Guillermo Pérez e Dr. Ramon Brugada pelo enorme apoio, incentivo, e também pela paciência e disponibilidade. A todo o grupo de Gencardio que sempre me apoiaram, especialmente a Yajaira Alvarado, David Carreras, Marta Vallverdú e Rebecca Martinez por todo suporte científico e emocional durante a etapa final do doutorado. Sem tal ajuda e encorajamento, este trabalho não teria sido concluído com êxito.

Agradeço ao grupo de replicação cromossômica do IDIBGI, especialmente a Lucía Márquez, Adrián Jimenez e Marina Guerrero, pelas orientações sobre clonagem de plasmídeos.

Aos pacientes e familiares, pelo consentimento em participar de uma pesquisa anterior, que permitiu a realização deste trabalho.

Agradeço à UNICAMP, à universidade pública, que em sua feição mais genuína, me permitiu criar, compartilhar, transmitir conhecimento científico por meio das atividades indissociáveis de ensino e pesquisa.

Aos funcionários das secretarias do Departamento de Medicina Translacional e da pós-graduação, por todo apoio e serviços prestados.

Agradeço imensamente a “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP- processo nº 2016/03896-3”, pelo apoio e financiamento recebidos e dedicados a este trabalho.

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

E por último deixo o meu agradecimento mais especial a Deus, por sempre me dar vida, sabedoria, saúde, prosperidade econômica e forças para prosseguir, apesar das dificuldades.

RESUMO

As epilepsias são um grupo de doenças com sinais e sintomas específicos, apresentando características típicas no eletroencefalograma, e que frequentemente apresenta aspectos etiológicos próprios, tais como genéticos, estruturais, metabólicos e infecciosos. Atualmente, reconhece-se que muitos tipos de epilepsia têm fator etiológico genético, de caráter monogênico. Nesse contexto, o gene *SCN1A* tem importância reconhecida, tendo sido ligado a vários fenótipos de epilepsia. Tal gene codifica a subunidade- α -1 do canal de sódio voltagem dependente (Nav1.1). Este canal é um complexo multiproteico, cuja função é a de regular o transporte do íon de sódio entre o meio extracelular e intracelular. Variações genéticas no gene *SCN1A* podem causar alterações nas propriedades biofísicas do canal de sódio, que por sua vez provocam alterações no fluxo de íons de sódio, levando à hiperexcitabilidade neuronal. Digno de nota, a maioria dos pacientes com síndrome de Dravet (SD), uma encefalopatia epiléptica e do desenvolvimento caracterizada por crises de difícil controle, associadas a graus diversos de deficiência intelectual e de retardo do desenvolvimento neuropsicomotor, apresentam mutações que ocorrem, em geral, “de novo” no gene *SCN1A*. De fato, estudos prévios de nosso grupo determinaram que 81% dos pacientes com SD, apresentam variantes classificadas como patogênicas ou possivelmente patogênicas no gene *SCN1A*, sendo que a maioria dessas são do tipo “missense” e algumas do tipo “nonsense” e “frameshift”, que geram proteínas truncadas. Em geral, esses diferentes tipos de variantes ligados a doença levam a perda de função do canal de sódio, o que em última análise, determina a fisiopatologia da SD. Porém, apesar deste mecanismo em comum, observa-se grande diversidade nos fenótipos das epilepsias associadas a mutações no gene *SCN1A*. Esse aspecto, associado a permanente dificuldade que ainda se encontra na determinação da ligação entre variantes genéticas e o fenótipo dos pacientes, torna o diagnóstico molecular complexo. Isso acontece pois, atualmente, a determinação da associação entre a variação genética e a manifestação fenotípica da doença é determinada pela combinação de critérios que incluem: a utilização de ferramentas de predição do impacto das variantes na função proteica, frequência das variantes na população geral, e, principalmente, estudos funcionais das alterações na proteína. Este último critério é crucial na elucidação

de evidências mais conclusivas sobre a determinação da patogenicidade das variantes encontradas em pacientes. No entanto, os estudos funcionais são raros e na maioria dos casos não há critério funcional para se estabelecer o diagnóstico genético. Nesse sentido, nosso trabalho teve como objetivo a realização de estudos biofísicos de três mutações que foram encontradas em pacientes com o fenótipo de SD na nossa casuística, são elas: c.5177G>A, c.5329delG, c.5434T>C que produzem as proteínas mutantes W1726X, V1777fsX1778 e W1812R, respectivamente. Para essas mutações não foi possível utilizar ferramentas de predição “in silico” na análise de patogenicidade. Dessa forma, expressamos essas proteínas mutantes em células Hek-293T pôr não apresentar expressão endógena do canal de sódio e usamos a técnica de *Patch Clamp* para caracterizar as propriedades biofísicas desses canais mutantes. Nossos resultados, para os três casos estudados, mostram que a densidade de corrente diminui notavelmente em relação ao canal de sódio sem mutação, indicando perda de função em grau variado. Desse modo, concluímos que nos três casos, a variação genética presente no gene *SCN1A*, pode estar relacionada ao fenótipo de SD apresentado pelos pacientes. Nosso trabalho, além de levar a uma resolução do diagnóstico molecular dos pacientes em estudo e entender o efeito funcional de cada mutação, estabelece as bases para a implantação desse tipo de estudo na inferência da função do canal de sódio em nosso meio.

Palavras-chave: Canal de sódio, epilepsia, gene *SCN1A*, mutações, Nav1.1, *Patch Clamp*, Síndrome de Dravet.

ABSTRACT

Epilepsies are a group of diseases with specific signs and symptoms, with typical characteristics on the electroencephalogram, and which often have their etiological aspects, such as genetic, structural, metabolic, and infectious. Currently, it is recognized that many types of epilepsy have a genetic etiological factor, of a monogenic nature. In this context, the *SCN1A* gene has recognized importance, having been linked to several epilepsy phenotypes. This gene encodes the α -1 subunit of the voltage-gated sodium channel (Nav1.1). This channel is a multiprotein complex, whose function is to regulate the transport of sodium ions between the extracellular and intracellular environment. Genetic variants in the *SCN1A* gene can cause changes in the biophysical properties of the sodium channel, which may cause changes in the flow of sodium ions, leading to neuronal hyperexcitability. This way, most patients with Dravet syndrome (DS), an epileptic and developmental encephalopathy characterized by difficult-to-control seizures, associated with varying degrees of intellectual disability and neuropsychomotor developmental delay, have mutations that occur, in general, "de novo" in the *SCN1A* gene. Indeed, previous studies by our group determined that 81% of patients with DS present variants classified as pathogenic or possibly pathogenic in the *SCN1A* gene, most of which are of the "missense" type and some of the "nonsense" and "frameshift" types. ", which produce truncated proteins. In general, these different types of disease-linked variants lead to loss of sodium channel function, which ultimately determines the pathophysiology of DS. However, despite this common mechanism, there is great diversity in the phenotypes of epilepsies associated with mutations in the *SCN1A* gene. This aspect, associated with the ongoing difficulty that still exists in determining the link between genetic variants and the phenotype of patients, makes molecular diagnosis complex. This happens because, currently, the determination of the association between the genetic variation and the phenotypic manifestation of the disease is determined by a combination of criteria that include: the use of predictive tools of the impact of the variants in the protein function, frequency of the variants in the general population, and, mainly, functional studies of alterations in the protein. This last criterion is crucial in elucidating more conclusive evidence on determining the pathogenicity of the variants found in patients.

However, functional studies are rare; in most cases, there is no functional criterion to establish the genetic diagnosis. In this scenario, our work aimed to carry out biophysical studies of three mutations that were found in patients with the DS phenotype in our casuistry, they are c.5177G>A, c.5329delG, c.5434T>C that produces the mutant proteins W1726X, V1777fsX1778, and W1812R, respectively. For these mutations, it was not possible to use "in silico" prediction tools in the pathogenicity analysis. Thus, we express these mutant proteins in Hek-293T cells because they do not show endogenous expression of the sodium channel and we use the Patch Clamp technique to characterize the biophysical properties of these mutant channels. Our results, for the three cases studied, show that the current density decreases markedly about the sodium channel without mutation, indicating loss of function in varying degrees. Thus, we conclude that in the three cases, the genetic variation present in the *SCN1A* gene may be related to the DS phenotype presented by the patients. Our work, in addition to leading to a resolution of the molecular diagnosis of the patients under study and understanding the functional effect of each mutation, establishes the bases for the implementation of this type of study in the inference of the function of the sodium channel in our setting.

Key words: Sodium channel, epilepsy, *SCN1A* gene, mutations, Nav1.1, Patch Clamp, Dravet Syndrome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação de algumas das encefalopatias epiléticas e do desenvolvimento (EED).....	18
Figura 2. Subunidades dos canais de sódio.....	24
Figura 3. Dendrograma de canais de sódio em humanos.....	26
Figura 4. Esquema representativo dos estados conformacionais de um canal de sódio.....	31
Figura 5. Técnica Patch Clamp.....	33
Figura 6. Esquema representativo do sistema <i>Patch Clamp</i>	34
Figura 7. Esquema representativo dos registros de corrente típicas para NAV1.1.....	36
Figura 8. Gráfico de dependência de voltagem de ativação (G/Gmax)	38
Figura 9. Protocolo de voltagem usado na técnica de patch clamp na configuração Whole Cell.....	39
Figura 10. Gráfico de inativação dependente de voltagem em estado estacionário (I/I _{max})	40
Figura 11. Protocolos de voltagem usados para estudar a recuperação da inativação de canais.....	42
Figura 12. Mutações selecionadas para o estudo.....	47
Figura 13. Mapas dos plasmídeos trabalhados.....	50

Capítulo I

Figura 1. Analysis using the REPFIND program showing the distribution of the repetitive regions in the native plasmid pCMV-SCN1A.....	90
Figura 2. Image of NEB Stable competent cell (NSCC) colonies transformed and enzymatic digestion profile.....	90
Figura 3. Mutant linear plasmids vs the parental plasmid and NEB Stable competent cells (NSCC) subjected to transformation with methylated and unmethylated parental plasmids.	91
Figura 4. Sequence analysis of the cloned plasmids.....	92
Figura 5. Efficiency of stb12 and Neb Stable cells in the production of plasmids pCMV-SCN1A.....	92

Capítulo II

Figura 1. Biophysical parameters of the sodium channel Nav1.1-Wild type.....	108
Figura 2. Typical whole-cell recordings.....	109
Figura 3. Whole cell currents were elicited by depolarizing potentials for mutants and wild type.....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variantes selecionadas do gene <i>SCN1A</i> encontradas em três pacientes brasileiros, e suas características clínicas.....	47
Tabela 2. Primers para detectar, por PCR, a presença do gene inserido nos plasmídeos que contêm as subunidades betas.....	54
Tabela 3. Lista de soluções de banho e pipetas utilizadas nos estudos eletrofisiológicos.....	68

Capítulo II

Tabela 1. Sequences of primers used to generate mutant plasmids.....	104
Tabela 2. Variant genotype, demographic and clinical findings in patients with DS.....	107

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Epilepsias	16
1.2 Encefalopatias epiléticas e do desenvolvimento	16
1.3 Genética das epilepsias	17
1.4 Síndrome de Dravet	19
1.4.1 Mutações associadas à Síndrome de Dravet	19
1.4.2 Características clínicas da Síndrome de Dravet	21
1.4.3 Diagnóstico da Síndrome de Dravet	21
1.4.4 Mecanismo fisiopatológico da Síndrome de Dravet	22
1.5 Canais de sódio dependentes de voltagem	24
1.6 Os genes <i>SCN1A</i>, <i>SCN1B</i> E <i>SCN2B</i>	27
1.7 Propriedades biofísicas dos canais de sódio	28
1.8 Eletrofisiologia e <i>Patch-Clamp</i>	31
1.8.1 Propriedades biofísicas do canal de sódio estudadas com Patch	35
1.9 Estudos funcionais em canais de sódio	43
2. OBJETIVOS	45
2.1. OBJETIVO GERAL	45
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DE CADA ARTIGO	45
3. MÉTODOS	46
3.1. Métodos utilizados no artigo I	46
3.1.1. Aspectos éticos	46
3.1.2. Seleção de variantes no gene <i>SCN1A</i>	46
3.1.3. Plasmídeos	48
3.1.4. Meio de cultura bacteriana e reagentes	51
3.1.5. Cultura bacteriana	51
3.1.6. Mini-purificação de plasmídeo	53
3.1.7. Manipulação de plasmídeo	54
3.1.8. Perfil enzimático de plasmídeos- pCMV- <i>SCN1A</i>	56
3.1.9. Maxi-purificação de plasmídeo	56
3.1.10. Mutagênese sítio-dirigida	58
3.1.11. Recombinação de plasmídeo	59
3.1.12. Sequenciamento de nova geração de plasmídeos	60

3.2. Métodos utilizados no artigo II	63
3.2.1. Cultura celular de Hek-293T	63
3.2.2. Transfecção heteróloga	64
3.2.3. Individualização de células transfectadas	65
3.2.4. Eletrofisiologia celular	66
4. RESULTADOS (ARTIGOS)	69
Capítulo I. An optimized protocol for the creation of constructs expressing sodium channel subunits to be use in functional studies of genetic epilepsies	69
Capítulo II. Biophysical characteristics of genetic variants found in the <i>SCN1A</i> gene in patients with Dravet syndrome	97
5. DISCUSSÃO GERAL	117
6. CONCLUSÃO	124
7. REFERÊNCIAS	125
8. ANEXOS	133

1. INTRODUÇÃO

1.1 EPILEPSIAS

A epilepsia não é uma doença única, mas um grupo de distúrbios caracterizados por uma atividade elétrica anormal e episódica no cérebro, cuja principal característica é a ocorrência de crises epiléticas (1).

As crises são causadas por uma descarga elétrica excessiva de um grupo de neurônios. A epilepsia não constitui uma entidade nosológica única, mas sim, uma variedade de distúrbios, refletindo uma disfunção cerebral proveniente de diversas causas. Além disso, é uma das condições neurológicas mais frequentes e, conseqüentemente, um problema de saúde pública mundial (2).

A frequência de crises varia de diária a poucos episódios por ano (3). A prevalência de epilepsia em países desenvolvidos é de 1 a 1,5%, em países em desenvolvimento, como o Brasil, a prevalência de crises pode ser considerada o dobro em relação aos países desenvolvidos(4). As crises são ditas generalizadas, quando a descarga elétrica envolve todo o córtex; ou focais, quando o seu início pode ser definido em uma região específica do córtex (1).

1.2. ENCEFALOPATIAS EPILÉPTICAS E DO DESENVOLVIMENTO

As encefalopatias epiléticas e do desenvolvimento formam um grupo diversificado de epilepsias graves de início precoce, caracterizadas por diferentes tipos de crises epiléticas. Estas são de difícil controle e de intensa atividade interictal no eletroencefalograma (EEG), geralmente resistentes ao tratamento farmacológico e apresentam risco de deterioração cognitiva e neuropsicomotora progressiva (5).

De acordo com a Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE), as encefalopatias epiléticas e do desenvolvimento (EED) ocorrem quando, tanto o fator epilético, quanto o fator de desenvolvimento, atuam; às vezes dificultando a distinção de qual dos dois contribui mais para o quadro clínico do paciente (6–8).

Cerca de 35% das crianças que desenvolvem epilepsia dentro dos primeiros três anos de vida possuem refratariedade, apresentando alto risco de morte prematura, comorbidades cognitivas e comportamentais. A taxa de mortalidade pode chegar a 25% (9).

As EEDs compreendem várias síndromes com diferentes características clínicas e eletroencefalográficas relacionadas à idade de início das crises, que muitas vezes se sobrepõem, bem como suas características semiológicas e seus fenótipos. Portanto, a classificação clínica do tipo de síndrome do paciente é desafiadora, de modo que, muitas vezes, o diagnóstico clínico da EED é considerado indeterminado (Figura 1).

As EEDs são conhecidas por terem uma ampla gama de etiologias, incluindo, por exemplo, lesões cerebrais estruturais congênitas, doenças adquiridas, distúrbios metabólicos e causas genéticas (5,10). O diagnóstico de EED é baseado principalmente na clínica e no EEG, muito embora sua etiologia permaneça desconhecida para a maioria dos pacientes.

1.3. GENÉTICA DAS EPILEPSIAS

A primeira evidência de que sua etiologia poderia ser genética surgiu em 1950, quando foram realizados estudos de ligação em famílias numerosas, onde se observou que os genes codificadores de canais iônicos segregava com a doença (11,12). Assim, a partir dessa década, tais genes começaram a ser relacionados à epilepsia.

Estudos de herança familiar, bem como em gêmeos, mostraram que a epilepsia tem um grau significativo de herdabilidade (13). A maioria das epilepsias genéticas generalizadas e epilepsias focais não adquiridas têm uma forte base genética, incluindo padrão de herança complexo com múltiplos loci genéticos e fatores ambientais que contribuem para a etiologia da epilepsia (14).

Progresso notável foi alcançado nos últimos 20 anos no que diz respeito à descoberta de genes associados à epilepsia monogênica. Genes associados a síndromes de epilepsia geralmente codificam canais iônicos dependentes de voltagem, receptores de neurotransmissores, proteínas associadas a canais iônicos e proteínas sinápticas (15,16). No caso das epilepsias relacionadas a canais iônicos, a causa molecular é um influxo/efluxo anormal de íons através da membrana, resultando em alterações da polaridade da membrana neuronal (1,17). A primeira mutação relacionada a um único gene foi relatada em um paciente com síndrome de epilepsia, identificada em 1994, em uma subunidade do receptor de acetilcolina codificada pelo gene *CHRNA4* (18). Posteriormente, foram descritas outras mutações nos genes *KCNQ2* e *KCNQ3* que codificam as subunidades de canais iônicos de potássio (19).

A identificação de genes tem fornecido informações importantes para o entendimento das bases moleculares da epileptogênese. No entanto, os estudos populacionais para as formas mais comuns de epilepsia não identificaram um risco significativo associado aos genes da epilepsia monogênica. Em vez disso, o padrão de herança é considerado complexo, indicando que o fenótipo é determinado por mais de um gene, talvez em interação com fatores ambientais. Portanto, estudos ômicos permitiriam um melhor entendimento da epilepsia (20,21).

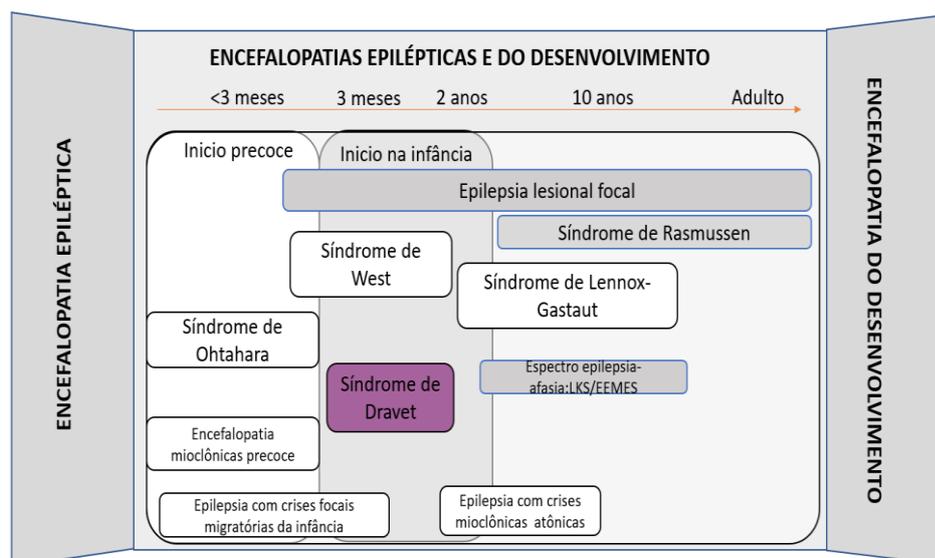


Figura 1. Representação esquemática de algumas das EEDs em relação a diferentes idades de início das crises (eixo X). A frequência da síndrome se correlaciona com o tamanho da caixa. Adaptado de I.E. Scheffer, J. Liao /European Journal of Pediatric Neurology 24 (2020).

1.4. SÍNDROME DE DRAVET

A Síndrome de Dravet, também conhecida anteriormente como Epilepsia Mioclônica Grave da Infância ("SMEI"), foi descrita em 1978 pela psiquiatra e epileptologista Charlotte Dravet (22). É uma forma rara de epilepsia em que a maioria dos casos é intratável. Começa na infância e continua com uma morbidade cumulativa que afeta significativamente as pessoas ao longo de suas vidas. Tem uma taxa de incidência estimada de 1:15.700 indivíduos(23).

A síndrome de Dravet é uma encefalopatia epiléptica e do desenvolvimento de origem genética, se enquadrando na família das canalopatias, já que mais de 80% dos pacientes com essa síndrome apresentam uma mutação *de novo* no gene *SCN1A*(24–26), ou seja, quando a mutação ocorre no esperma, no óvulo ou logo após a fertilização, todas as células-filhas derivadas do embrião em crescimento conterão a mutação(27).

1.4.1 Mutações associadas à Síndrome de Dravet

No caso do SD 90% das mutações *SCN1A* são de novo, o que significa que não são encontradas nos pais do paciente, no entanto, 4-10% das mutações *SCN1A* são herdadas dos pais. Nesse caso, há 50% de chance de passar a mutação para os filhos futuros, uma condição chamada de heterozigiosidade(28). Nesses casos, observou-se que o pai frequentemente apresenta menos sintomas e menos graves do que a criança, fenômeno conhecido como penetrância reduzida(27). Isso pode ser devido a outros impactos de sua composição genética pessoal, ou mosaicismo(29).

A região de codificação do gene tem 6.030 nucleotídeos de comprimento, portanto, há mais de 6.000 lugares para que ocorra uma mutação no gene *SCN1A*. Portanto, a maioria das mutações do gene em pacientes não foi relatada em outras pessoas e qualquer tipo de mutação *SCN1A* pode ser visto na síndrome de Dravet.

Existem três tipos principais de mutações: *missense*, *nonsense* e inserções/deleções.

Missense: Uma mutação sem sentido é uma substituição de um nucleotídeo por outro em uma única posição no gene. Essa mudança na sequência de nucleotídeos pode ou não resultar em uma mudança de aminoácidos na estrutura primária da proteína. Se uma mutação missense ocorrer perto da região de formação de poros do canal iônico de sódio, é provável que prejudique significativamente a função do canal iônico e leve a um caso mais grave de epilepsia relacionada ao *SCN1A*, como a síndrome de Dravet(29). Se uma mutação sem sentido ocorrer em um local menos crítico no gene, ela pode causar sintomas clínicos mais leves ou nenhum sintoma. Aproximadamente 47% das mutações observadas em pacientes com Dravet são mutações "Missense" (27).

Nonsense: Este tipo de mutação é semelhante à mutação missense em que um nucleotídeo é substituído por outro. No entanto, no caso de uma mutação sem sentido, essa substituição faz com que o códon seja lido como um sinal de "STOP". A maquinaria de tradução para de ler o gene prematuramente, e a proteína é significativamente encurtada ou truncada. Esse tipo de mutação é frequentemente associado a epilepsias mais graves relacionadas ao *SCN1A*, como a síndrome de Dravet (29). Aproximadamente 20-40% das mutações na síndrome de Dravet são mutações "Nonsense " (27).

Inserções/deleções: Nesse tipo de mutação, um ou mais nucleotídeos do gene são deletados ou inseridos, fazendo com que o quadro de leitura dos códons se desloque e cada aminoácido fique incorreto a partir desse ponto da cadeia em relação à sequência de aminoácidos da proteína nativa. Isso geralmente causa um canal de sódio disfuncional. Além disso, a mudança no quadro de leitura frequentemente fará com que um dos códons seja interpretado como um códon de parada, encerrando prematuramente uma cadeia já disfuncional.

Se um grupo de 3 nucleotídeos for inserido ou deletado, apenas um códon é adicionado ou deletado, respectivamente, e a proteína ainda pode ser funcional dependendo da localização dessa inserção ou deleção. Grandes segmentos de DNA podem ser inseridos ou excluídos, incluindo todo o gene *SCN1A* e/ou genes próximos. Essas mutações têm fenótipos diferentes e representam aproximadamente 2-5% das mutações de Dravet (27,29).

1.4.2 Características clínicas da Síndrome de Dravet

O início da síndrome ocorre no primeiro ano de vida, sendo caracterizado por crises clônicas ou tônico-clônicas generalizadas ou unilaterais de duração prolongada, tanto em contexto febril, quanto, às vezes, na ausência de febre. Em idades mais avançadas, é frequente o aparecimento de outros tipos de crise, como mioclônicas, ausências atípicas e parciais complexas. Outras comorbidades, como atraso no desenvolvimento e EEGs anormais, geralmente não são aparentes até o segundo ou terceiro ano de vida (30).

Problemas comuns associados à Síndrome de Dravet incluem: crises prolongadas e frequentes, atraso no desenvolvimento, distúrbios comportamentais, espectro do autismo, problemas de fala e linguagem. Além disso, a SD é altamente resistente ao tratamento medicamentoso (31), possuindo uma taxa de mortalidade de cerca de 15-20% devido à morte súbita inesperada na epilepsia ("SUDEP"), crises prolongadas, acidentes relacionados a crises, afogamento e infecções(32–34).

1.4.3 Diagnóstico da Síndrome de Dravet

O diagnóstico do SD precoce é fundamental, é feito combinando o diagnóstico clínico com um diagnóstico genético. O diagnóstico clínico pode em alguns casos ser difícil, porque em muitos portadores da síndrome não são observadas todas as características clínicas típicas do SD. Por isso, em caso de suspeita clínica de SD é importante recorrer ao diagnóstico genético baseado em sequenciamento dos genes envolvidos para SD (Painel Genético para Epilepsia), sendo o principal o gene *SCN1A* o qual pode identificar

alteração, confirmando o diagnóstico clínico para SD, é importante notar que a presença de uma mutação por si só não é suficiente para o diagnóstico, nem a ausência de uma mutação o exclui. As variantes do gene *SCN1A* estão associadas a um amplo espectro clínico de epilepsias, variando de epilepsia genética com convulsões febris mais (GEFS+) a encefalopatias epiléticas e de desenvolvimento, sendo a síndrome de Dravet representativa dos EEDs. Além da epilepsia, as variantes do gene *SCN1A* também foram associadas à enxaqueca hemiplégica familiar, um subtipo de enxaqueca com aura caracterizada por hemiparesia durante os ataques(35).

A SD pode estar associada mais raramente a mutações em genes diferentes de *SCN1A*, em alguns casos, indivíduos com essas mutações em outros genes apresentam sintomas ou características tão semelhantes à Síndrome de Dravet que nenhuma distinção pode ser feita de forma confiável apenas com base clínica(36).Essos genes corresponde a *SCN2A*, *SCN8A*, *SCN1B*, *PCDH19*, *GABRA1*, *GABRG2*, *STXBP1*, *HCN1*, *CHD2* e *KCNA2*, em esses casos as alterações genéticas encontradas foram em um pequeno número de indivíduos com diagnóstico clínico de Síndrome de Dravet. No entanto na maioria dos casos, os indivíduos com mutações em esses genes terão um tipo diferente de condição neurológica, com diferentes tipos de convulsões e comorbidades, e podem responder de forma diferente aos medicamentos do que indivíduos com Síndrome de Dravet relacionada a *SCN1A*.

1.4.4 Mecanismo fisiopatológico da Síndrome de Dravet

O principal mecanismo fisiopatológico propostos para tentar explicar a ocorrência de crises epiléticas a partir da mutação do gene *SCN1A* é o seguinte: Quando um neurônio está "em repouso", ele não se comunica com um neurônio vizinho, tem uma carga mais negativa em seu interior e mantém íons de carga mais positiva, como o sódio (Na^+), fora da célula. Quando um neurônio é estimulado (sinal químico do neurotransmissor) e precisa enviar uma mensagem, o neurônio permite que uma grande quantidade de sódio (Na^+) entre no citoplasma, iniciando uma corrente elétrica.

Todas essas mudanças no equilíbrio de íons positivos e negativos levam a uma corrente elétrica que pode se mover muito rapidamente pelas longas extensões do neurônio (axônios) para comunicar com a próxima célula.

Quando para se comunicar, o neurônio tem que inverter os íons para que haja novamente mais íons negativos no citoplasma e mais íons positivos no meio extracelular. Equilibrar o movimento dos íons é um passo importante para que a célula interrompa a atividade elétrica. Isso significa retirar mais íons positivos do citoplasma. Para mover íons para o meio intracelular e extracelular, o neurônio precisa de canais especiais. Quando esses canais não estão funcionando corretamente, o neurônio tem dificuldade em: 1) produzir, 2) regular e depois 3) parar as correntes elétricas e, quando essas correntes não podem ser controladas, podem levar a crises epiléticas.

A causa mais comum da síndrome de Dravet é o resultado de um problema com um canal de sódio "Nav1.1". As mutações *SCN1A* na síndrome de Dravet geralmente afetam apenas uma cópia (obtemos duas cópias de cada gene em nosso DNA). Isso significa que cerca de metade dos canais de sódio Nav1.1 necessários para o neurônio não estão funcionando adequadamente ou não estão sendo produzidos. Portanto, isso significa menos canais Nav1.1 funcionando adequadamente no axônio do neurônio (Haploinsuficiência da mutação do gene *SCN1A*). Isso torna muito difícil para os neurônios produzir, regular e parar correntes elétricas para comunicação entre um neurônio inibitório e excitatório.

O canal de sódio Nav1.1 é expresso e é o mais importante para os neurônios inibitórios (Interneurônios inibitórios GABAérgicos). Portanto, na síndrome de Dravet, esses neurônios inibitórios têm problemas para se comunicar. Normalmente, eles deveriam indicar aos neurônios excitatórios quando PARAR, mas como os neurônios inibitórios não conseguem fazê-lo corretamente, os neurônios excitatórios podem gerar muita corrente elétrica, causando crises epiléticas(37).

1.5. CANAIS DE SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM

Os canais de sódio dependentes de voltagem, também chamados em suas siglas em inglês de "VGSCs (Voltage-Gated Sodium Channel)", são complexos de proteínas de membrana essenciais para o funcionamento das células excitáveis, tais como, células neuronais, musculares e secretoras. Eles são complexos proteicos, cuja principal subunidade (subunidade α) da origem a um poro, que pode funcionar independentemente na produção de sinais elétricos ao longo das membranas celulares (38). As subunidade α são expressas em combinação com uma ou mais subunidades auxiliares (subunidades β), que podem aumentar o nível de expressão e modificar as propriedades de "gating" das subunidade α - seja por ativação dependente de voltagem ou por inativação e recuperação da inativação (Figura 2) (39).

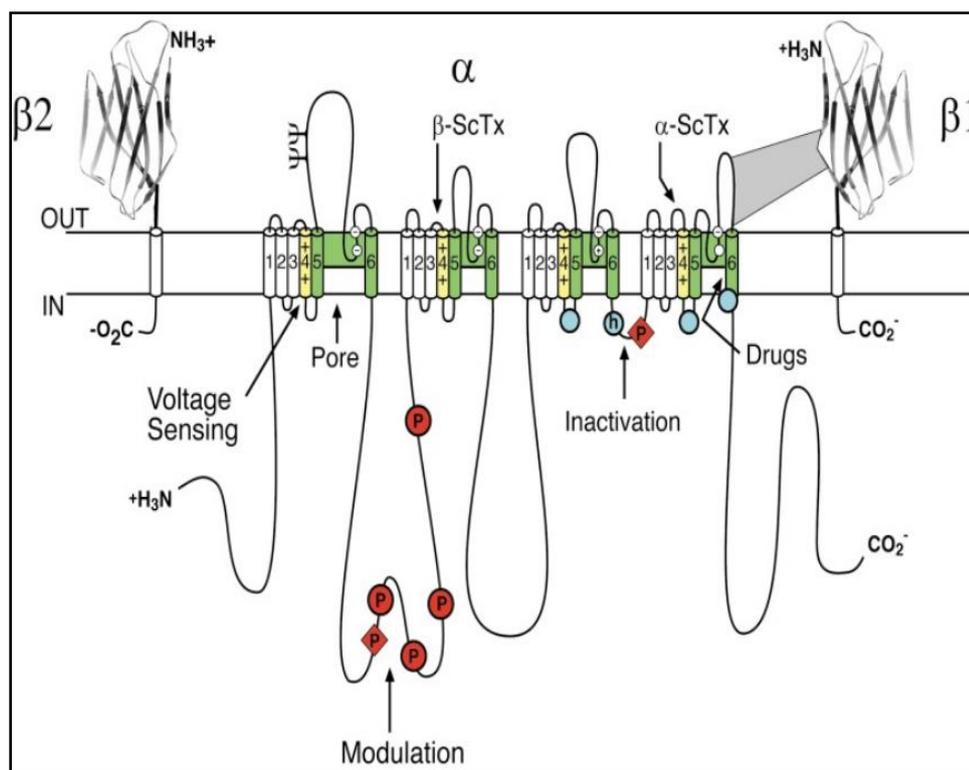


Figura 2. Subunidades dos canais de sódio. Canal de sódio é mostrado com as subunidades auxiliares beta e a subunidade alfa. Eles têm quatro domínios cada um ligado por um loop, cada domínio contém 6 segmentos. A subunidade principal é uma proteína lipossolúvel de grande peso molecular que comunica o meio intracelular e extracelular. Imagem retirada de Jeffrey L Noebels et al/ Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. 4th ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012.

A subunidade α é uma proteína composta por quatro domínios homólogos (D1-D4) e cada domínio consiste em seis segmentos transmembranas (S1 a S6) conectados por alças intra e extracelulares. Dez subunidades α foram descritas (Nav1.1-Nav1.9), cada uma codificada por um gene distinto (*SCN1A-SCN5A*, *SCN8A-SCN11A*). Além dos citados, existe o gene *SCN7A* (anteriormente denominado Gene *SCN6A*), que codifica a subunidade denominada Navx, que é o único canal de sódio ativado pelo aumento da concentração extracelular de sódio [~ 150 mM] (40).

A subunidade α dos canais de sódio Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 e Nav1.6 são fortemente expressas no cérebro (Figura 3)(41). As subunidades α são classificadas por sua homologia e sensibilidade à tetrodotoxina (TTX). A tetrodotoxina é uma neurotoxina hidrofílica, não proteica, produzida por várias espécies de peixes, gastrópodes marinhos, bivalves, bactérias, anfíbios, artrópodes e platelmintos, sendo considerada uma das toxinas marinhas mais potentes conhecidas (42). Esta substância liga-se aos poros dos canais de sódio existentes nas membranas das células excitáveis. A ligação desta toxina é resultado da interação entre o grupo guanidina (carregado positivamente) da TTX com os grupos carboxila (carregados negativamente) das cadeias laterais das subunidade α do canal de sódio (43). A ligação da TTX impede o influxo dos íons de sódio pelo canal, o que resulta numa impossibilidade de ocorrer a despolarização e propagação de potenciais de ação. Esta inibição dos canais de sódio leva à imobilização dos tecidos (44).

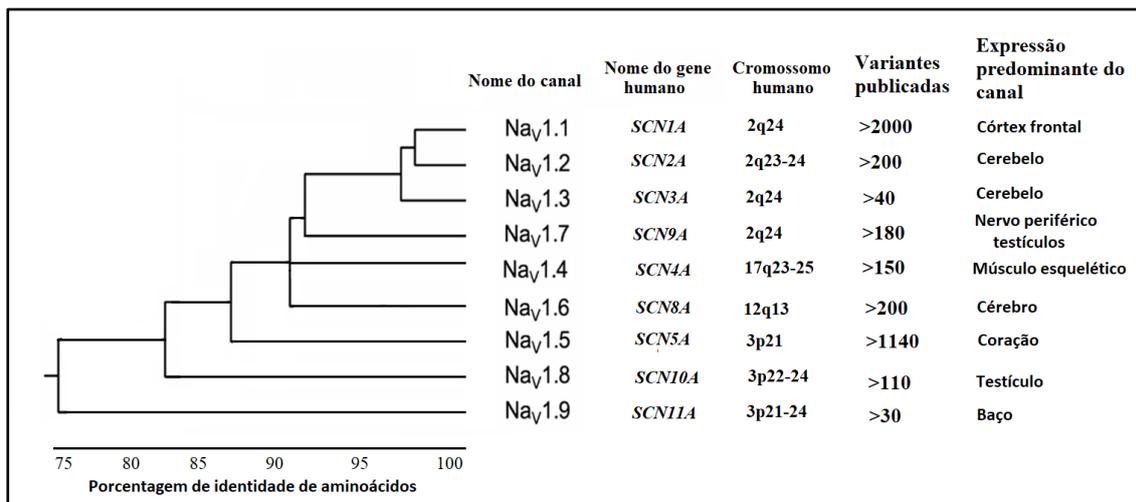


Figura 3. Dendrograma de canais de sódio em humanos. Comparação das nove subunidades alfa que formam canais de sódio, os cálculos foram realizados com o algoritmo Clustal. Os cromossomos e genes que codificam cada subunidade alfa são mostrados. As variantes genéticas foram determinadas a partir de: Human Gene Mutation Database e ClinVar. A abundância predominante da proteína foi determinada usando o banco de dados genecards.. Adaptado de Alan L. Goldin/The Journal of Experimental Biology 205 (2002).

As subunidades auxiliares $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ e $\beta 4$ (NaV $\beta 1$ a NaV $\beta 4$) são codificadas pelos genes *SCN1B-SCN4B* (41). Estruturalmente, $\beta 1$ e $\beta 3$ não estão covalentemente ligados à subunidade α , enquanto que $\beta 2$ e $\beta 4$ podem estar ligados à subunidade α mediante pontes dissulfeto (45). A estrutura das subunidades auxiliares contém uma alça extracelular de imunoglobulina (Ig) e um único domínio transmembrana. Além disso, exibem um domínio carboxi-terminal intracelular e um domínio amino-terminal extracelular com os quais também modulam a atividade da subunidade α (Figura 2). Ademais, tais domínios podem interagir com outras proteínas e estabelecer complexos de adesão com células adjacentes e com a matriz extracelular (46).

As subunidades β são mais do que apenas unidades auxiliares das subunidades α formadoras de poros, porque conferem diversas propriedades exclusivas aos VGSCs, permitindo o controle preciso da excitabilidade de uma maneira específica para cada tipo de célula. Por exemplo, as propriedades adesivas celulares das subunidades β estão relacionadas com o

desenvolvimento e a excitabilidade neuronal. A corrente de sódio impacta o desenvolvimento estrutural do cérebro por meio de vias dependentes da subunidade β , de modo que, defeitos que resultam na deleção do gene da subunidade β , podem conduzir à hiperexcitabilidade neuronal. Essas propriedades estão relacionadas às subunidades β dos VGSC nos mecanismos e potenciais tratamentos de várias doenças do sistema nervoso. As propriedades dependentes do tipo de célula e a farmacologia única das subunidades β também estão surgindo como ferramentas de pesquisa informativas para estudar os mecanismos da doença e desenvolver novas terapias (47).

1.6. OS GENES *SCN1A*, *SCN1B* E *SCN2B*

O gene *SCN1A* (Gene ID: 6323) está localizado no cromossomo 2 (2q24.3), tem 26 exons e abrange 164 kb de DNA genômico. O principal transcrito do *SCN1A* é a variante 1 de 11940 pb (NM_001165963.4) que gera a isoforma 1 com 2009 aminoácidos (NP_001159435), mas outras isoformas são transcritas em decorrência do fenômeno de *splicing* alternativo. A principal isoforma, a isoforma 2 (NM_006920.6), de 13079 pb, codifica uma proteína de 1998 aminoácidos, chamada subunidade alfa tipo 1 (NP_008851.3). Esta subunidade expressa na membrana celular e unida às subunidades betas formam o canal de sódio tipo 1 (Nav1.1) (39).

Com estudos de transcriptômica quantitativa (RNA-Seq), foi determinado que a subunidade alfa tipo 1 é conhecida pela abundância no córtex cerebral, cerebelo e medula espinhal (Figura 3). Apresenta uma expressão baixa no tecido pulmonar, testículos e tubas uterinas, portanto, Nav1.1 é essencialmente encontrado no sistema nervoso central (SNC) (48–50).

A subunidade $\beta 1$ é expressa principalmente no músculo esquelético, músculo cardíaco e SNC. O gene *SCN1B* (NM_001037.5), mapeado no cromossomo 19q13, tem 6 exons e abrange 9.980 bases de DNA genômico. Seu transcrito apresenta um comprimento de 1666 pb, com respectiva estrutura proteica de 218 aminoácidos (NP_001028) (51). Múltiplas isoformas

foram encontradas para tal proteína, de forma que mutações nesse gene resultam em epilepsia genética com crises febris plus, síndrome de Brugada e defeitos na condução cardíaca (52,53).

A subunidade $\beta 2$ é codificada pelo gene *SCN2B* (NM_004588.5) que é mapeado no cromossomo 11q23.3 e possui 4 exons, abrangendo 13.834 bases de DNA genômico. Seu mRNA possui um comprimento de 4937 pb e uma cadeia de aminoácidos de 215 (NP_004579), além de ser amplamente encontrado no SNC humano e músculo cardíaco (54). Defeitos neste gene podem ser a causa da síndrome de Brugada, fibrilação atrial ou síndrome da morte súbita infantil (55).

1.7. PROPRIEDADES BIOFÍSICAS DOS CANAIS DE SÓDIO

O canal de sódio tem a função de mediar a permeabilidade dos íons sódio nas membranas celulares excitáveis. Esses íons, carregados positivamente, entram na célula por gradiente eletroquímico, ou seja, há um movimento devido à carga e concentração (40). Essa entrada de sódio produz uma despolarização do potencial de membrana, que por sua vez facilita a abertura de mais canais, permitindo que o potencial de equilíbrio desse íon sódio seja alcançado em um tempo de 1-2 ms. Hodgkin-Huxley, em 1952, descreveu três características desses canais de sódio: ativação dependente de voltagem, inativação rápida e marcada seletividade iônica (Pk: PNa 0,8) (56). A abertura de um canal de sódio é um processo voltagem-dependente e tempo-dependente, ou seja, quando um estímulo despolarizante é aplicado, o canal se abre e os íons passam rapidamente pelo poro do canal. No entanto, este se inativa rapidamente em um intervalo de tempo entre 0,5 – 2 ms (o mecanismo molecular é detalhado posteriormente). O processo de reativação, que é definido quando a célula está em repouso e em estado inexcitável, ou seja, o período refratário absoluto, começa quando o potencial de membrana atinge potenciais largamente negativos (menores que -60 mV) e dura vários milissegundos após a repolarização da membrana da célula.

Durante o potencial de ação (PA) do neurônio, o canal de sódio adota três estados conformacionais: fechado, aberto e inativo (Figura 4). Ir de um estado para outro é um processo dependente de tensão e tempo (*gating* do canal) (45). A despolarização da membrana (fase 0 do PA) se dá pela abertura dos canais de sódio (ativação), provocando a entrada de sódio, o que resultará em um rápido aumento da concentração de sódio no citoplasma da célula (Figura 4B) (57).

Um mecanismo proposto para tal abertura do canal seria: o segmento S4 desliza 6-8 Å para fora através de uma ranhura estreita formada pelos segmentos S1, S2 e S3, girando aproximadamente 30°. Esta inclina-se para os lados através de um ponto de pivô formado por uma região hidrofóbica altamente conservada, localizada na região central do sensor de tensão. O segmento S4 tem uma conformação helicoidal no poro interno estreito, permitindo o movimento linear de cargas através da metade interna da membrana. As mudanças conformacionais da metade intracelular de S4 durante a ativação são acopladas ao movimento lateral do *loop* S4-S5, o que poderia induzir o movimento dos segmentos S5 e S6 e abrir a porta intracelular do poro (58).

Esse aumento da permeabilidade ao sódio é de curta duração devido a um processo de inativação, que depende da ativação (abertura do canal), ou seja, da alta concentração de íons sódio que entraram no citoplasma. Isso acaba induzindo o conector citoplasmático formado entre os domínios III e IV, atuando como uma dobradiça, assim, ocorre o acoplamento do conector nos segmentos S4-S5, gerando a inativação (Figura 4C). Armstrong e Bezanilla (1977) propuseram o modelo "bola e corrente" para explicar o processo de inativação rápida. Isso indica que, durante a despolarização, a porta de ativação do canal se abre e a bola inicia um movimento que permite sua união com o poro citoplasmático do canal, levando a sua oclusão. Dessa maneira, ocorre o impedimento da entrada de íons sódio, tornando o canal inativo (59).

Já se sabe que o conector citoplasmático entre os domínios III-IV e, em particular, a sequência Ile1488, Phe1489 e Met1490 (IFM) (60), bem como a glicina e a prolina adjacentes ("as dobradiças"), atuam como uma partícula inativadora que interage com vários aminoácidos localizados na porção

intracitoplasmática do segmento S6 ou no *loop* S4-S5 de DIII e DIV. Desta forma, a porção intracitoplasmática do poro do canal é ocluída, resultando na rápida inativação do canal após sua abertura (61–64). Outro fator importante no estado de inativação seria o extremo C-terminal do canal de sódio, pois isso permitiria que a inativação se estabilizasse e reduzisse sua probabilidade de reabertura(Figura 4D) (65).

De qualquer forma, quase todos os canais de sódio são inativados no final da fase 1 do PA, podendo ser reativados somente após a recuperação da inativação durante sua fase 4.

A inativação começa simultaneamente com a ativação, mas como o processo de inativação é mais lento, os canais permanecem transitoriamente abertos e geram a corrente de sódio durante a fase 0 do PA. Os canais que estão no estado inativo não podem ser reabertos até que sejam movidos do estado inativo para o estado fechado. Este processo é chamado de reativação do canal, e é um processo necessário para que o canal possa reabrir. Sob condições fisiológicas, a reativação ocorre quando o potencial de membrana atinge potenciais mais negativos que -60 mV durante a fase 3 do PA. A inativação serve para limitar a quantidade total de sódio que entra na célula e é essencial para a repolarização (aumento dos íons sódio no meio extracelular) do PA nos nodos de Ranvier (61). Após a repolarização, os canais de sódio entram no estado fechado e liberam a dobradiça de inativação em preparação para o próximo ciclo de despolarização e início do PA. Uma forma diferente de inativação mais lenta foi descrita, mas esse mecanismo permanece menos claro do que a inativação rápida (65).

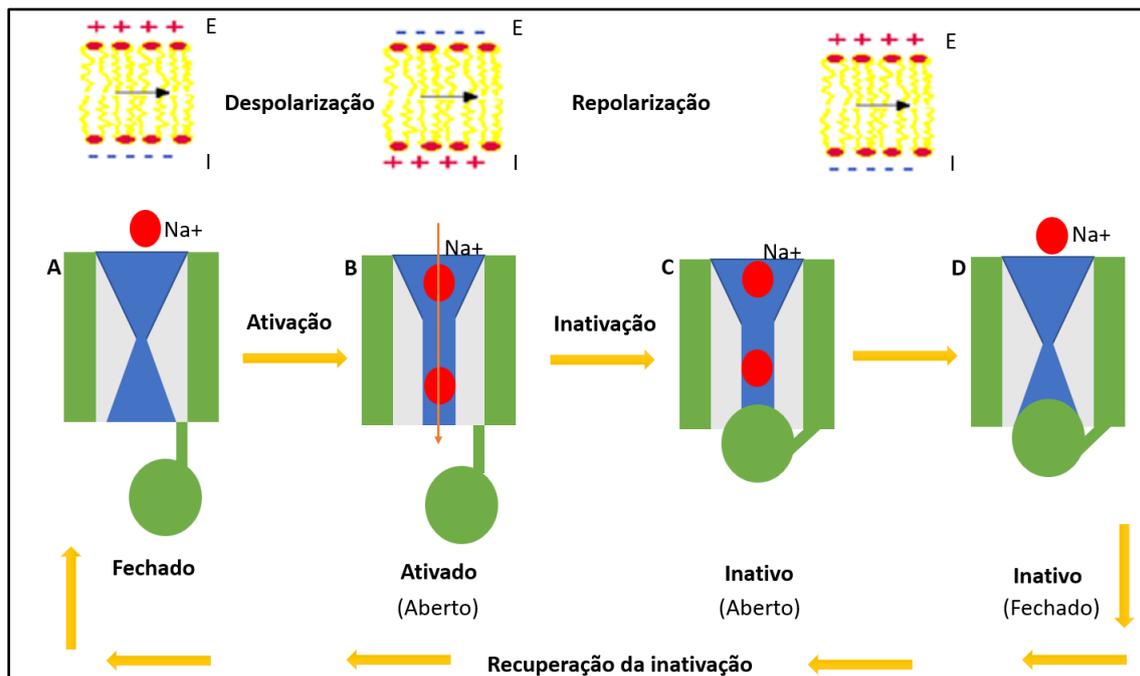


Figura 4. Esquema representativo dos estados conformacionais de um canal de sódio. A) Estado basal do canal, poro do canal fechado (-70mV). Os íons de sódio localizados no meio extracelular (E) não entram. B) Poro de canal aberto, íons de sódio entram no meio intracelular (I), isso causa despolarização da membrana celular. C) A parte interna do poro do canal é fechada pelo segmento de inativação, impedindo a entrada de íons sódio. D) O canal de sódio inativo consegue fechar o poro e o segmento de inativação é imediatamente liberado, retornando o canal ao seu estado basal.

1.8. ELETROFISIOLOGIA E *PATCH-CLAMP*

Desenvolvido em 1976 por Erwin Neher e Bert Sakmann, a técnica de *Patch Clamp* facilitou o estudo de correntes através de canais iônicos individuais de uma célula (Principalmente células excitáveis). Essa técnica de eletrofisiologia celular permite registrar a atividade elétrica da membrana celular na forma de mudanças de corrente de íons que ocorrem entre o meio intra e extracelular(66). Os avanços nesta técnica permitem a medição precisa da corrente gerada por uma célula (macrocorrente) ou por um único canal (microcorrente).

São realizados dois tipos principais de estudos: fixar o potencial transmembrana e registrar as correntes geradas antes da estimulação do potencial (modalidade chamada *voltage-clamp*); e fixar uma certa corrente para registrar o potencial transmembrana (modalidade chamada *current-clamp*) (67)

Esta técnica utiliza uma pipeta de vidro, que é gerada a partir de um capilar de borossilicato, no qual é aplicada uma fonte de calor em uma de suas extremidades para gerar uma ponta de aproximadamente 1-4 μm de diâmetro. Esta micropipeta é fabricada em um "*Micropipette Puller*", a qual contém uma solução iônica e um microeletrodo em seu interior. Utilizando um microscópio e um micro manipulador, aproximamos a micropipeta de vidro da célula de interesse, então fazemos uma pequena sucção gerando uma invaginação da membrana celular, permitindo o isolamento da área aprisionada pela micropipeta, o chamado selo de alta resistência (Giga selo)(68,69).

Essa vedação permite isolar eletricamente alguns canais, que ficam presos dentro da invaginação, evitando o contato com íons do meio extracelular; essa forma descrita é chamada de "*cell-attached*". Se for aplicada uma sucção mais forte, é gerada uma ruptura da membrana celular. Essa ruptura faz com que a solução intracelular entre em contato com a solução iônica da pipeta, denominando esse tipo de procedimento de *Patch Clamp* de célula inteira (chamada configuração em "*Wholl-cell*"). As células a serem registradas estão em uma solução de banho que simula o meio extracelular de uma célula, neste meio é colocado outro eletrodo (eletrodo de referência ou terra). Toda essa configuração permite o registro da corrente que circula entre o eletrodo que está na pipeta e o eletrodo de referência (69)(Figura 5).

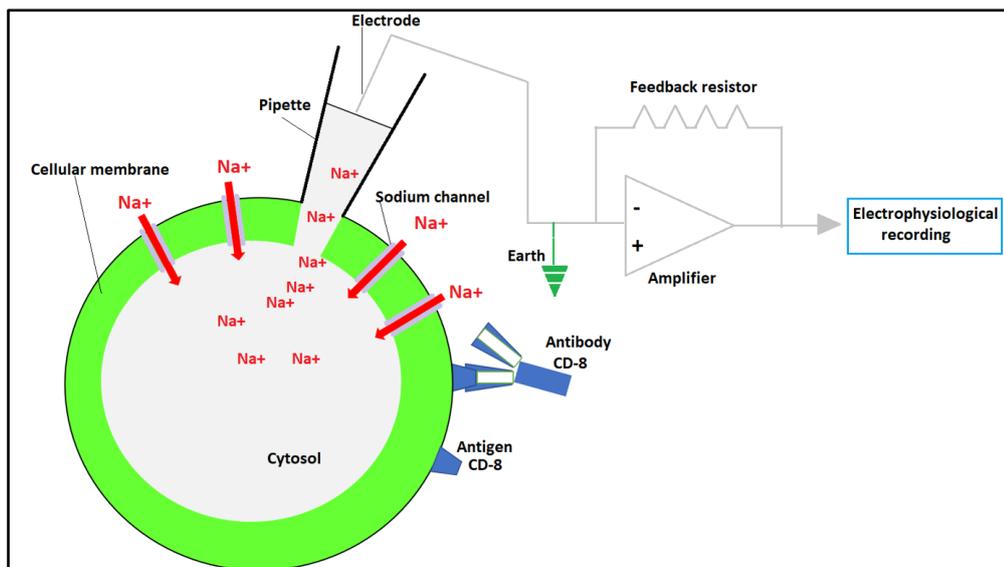


Figura 5. Técnica Patch Clamp. Técnica versátil e de alta resolução que fornece uma medição direta das correntes iônicas e/ou do potencial de membrana em células vivas. As gravações de células inteiras (Whole cell) envolvem a gravação de correntes através de vários canais simultaneamente, em uma grande região da membrana celular.

Para fazer as gravações, é utilizado um suporte (“*Holders*”) que se conecta a pipeta e ao eletrodo, este é conectado a um pré-amplificador que também recebe um sinal do eletrodo de referência (Figura 6). O pré-amplificador é unido a um amplificador de corrente, um conversor analógico-digital e um software. O software possui dois módulos importantes: o primeiro módulo permite o controle da aquisição de tensão, corrente e sinal. Ou seja, permite estimular a célula em diferentes voltagens com sequências de pulsos despolarizantes ou hiperpolarizantes, e ao mesmo tempo registrar a corrente de íons que passam pelos canais (Figura 6). O segundo módulo permite o cálculo de parâmetros a partir dos sinais obtidos na parte experimental (68).

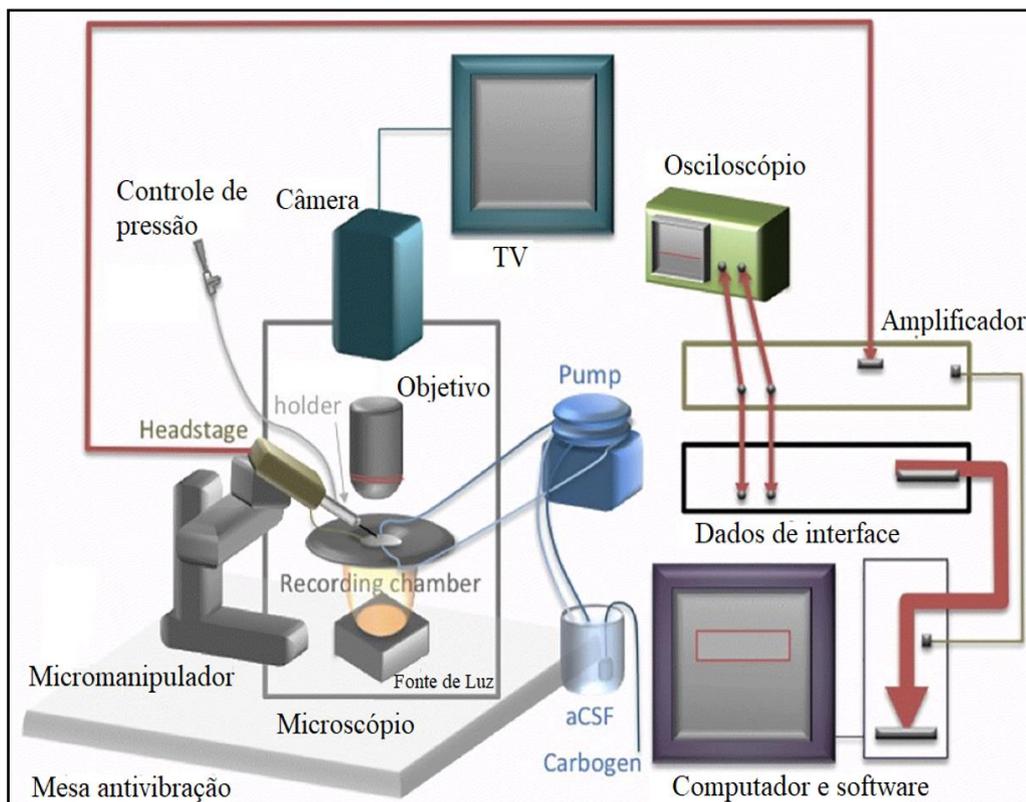


Figura 6. Esquema representativo do sistema *Patch Clamp*. Sistema de aquisição e análise de dados de eletrofisiologia mais amplamente utilizado para controle e registro de experimentos de voltage-clamp, current-clamp e patch-clamp. O Amplificador é instrumento que contém os circuitos necessários para medir correntes elétricas que passam por canais iônicos ou mudanças no potencial da membrana celular. O digitalizador é um instrumento de aquisição de dados que converte sinais analógicos em sinais digitais. Software de aquisição e análise dos dados proporcionado por o amplificador, digitalizador e qualquer outro dispositivo eletrônico patch-clamp. Headstage, dispositivo que contém as micropipetas com circuito integrado para transmitir sinais elétricos das micropipetas para o amplificador. Micromanipulador é um dispositivo que manobra mecanicamente a micropipeta com precisão nanométrica, com movimentos tridimensionais. Uma mesa antivibratória e gaiola de Faraday que cubre parte do sistema da configuração de patch-clamp para isolar fontes de interferência. Imagem retirado e adaptado de: <https://axolbio.com>

1.8.1 Propriedades biofísicas do canal de sódio estudadas com Patch Clamp

A) Estado fechado

O canal de sódio Nav1.1 está em estado fechado em potenciais negativos em torno de -70 mV (estado basal na célula nervosa) (Figura 4A). Em nível estrutural, o segmento de inativação está aberto, mas o poro do canal está fechado, não há entrada de íons sódio na célula e, portanto, não há fluxo de corrente(66,68).

Nos protocolos utilizados na técnica Patch Clamp, é aplicado um potencial de retenção de -120 mV para garantir que os canais estejam em estado fechado e disponíveis para serem ativados(Figura 7).

B) Estado aberto

Em potenciais despolarizantes, tanto o poro do canal quanto o segmento de inativação estão abertos e o canal permite a entrada de íons sódio, seguindo seu gradiente eletroquímico, ou seja, passando os íons de sódio do meio extracelular para o intracelular. O período de tempo que um canal permanece aberto varia de acordo com a voltagem da membrana (probabilidade de abertura) e, portanto, o fluxo de íons mudará em diferentes voltagens(70).

Curva I-V

A corrente transportada para os íons varia com a tensão da membrana e é representada como a relação corrente- voltagem (curva IV) para aquele íon (69).

A Figura 7 mostra registros de corrente típicos para NAV1.1, obtidos por patch clamp na configuração de célula completa (Whole cell). Em pulsos negativos (-80 mV, linha verde), não há entrada de íons de sódio. À medida

que a despolarização aumenta para -40 mV (linha amarela), os canais Nav1.1 se abrem e a intensidade se torna cada vez mais negativa (eixo -Y). Em -10 mV (linha vermelha) a probabilidade de abertura do canal aumenta e, portanto, a Intensidade é maior. À medida que o potencial atinge o potencial de equilíbrio do sódio (E_{Na}), a força motriz do Na diminui e, portanto, a intensidade também diminui, mesmo quando os canais estão abertos. Em potenciais ainda mais positivos que 80 mV (linha preta), além do potencial reverso, a Intensidade é positiva (eixo +Y). Assim, a curva IV é determinada a partir do efeito do potencial de membrana na probabilidade de abertura do canal e na força motriz(68). A corrente máxima a cada tensão aplicada pode ser normalizada pela capacitância da célula, obtendo-se assim a densidade Iones sodio. A capacitância é uma medida da capacidade da membrana de acumular cargas em um determinado potencial.

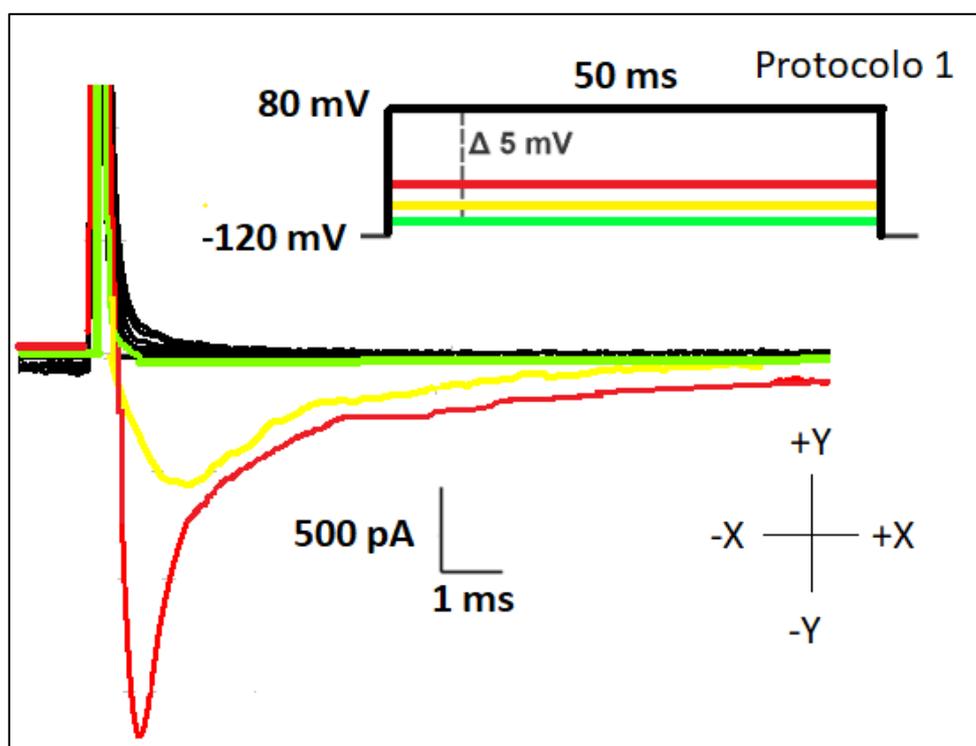


Figura 7. Esquema representativo dos registros de corrente típicas para NAV1.1, obtidos por patch clamp na configuração de Whole cell. Traços de corrente obtidos após pulsos despolarizantes de 50 ms com incremento de 5 mV. A linha verde representa a corrente obtida

em -80 mV, a linha amarela a corrente obtida em -40 mV, a linha vermelha a corrente obtida em -10 mV e a linha preta a corrente obtida em 80 mV.

Ativação dependente de voltagem

A ativação dependente de voltagem é diferente para cada tipo de canal e se refere à resposta de resíduos carregados no Segmento 4 quando o campo elétrico através da membrana é perturbado. A relação entre a ativação do canal e a voltagem pode ser determinada a partir da mesma curva IV, que nos permite calcular a condutância do canal (G) em cada voltagem a partir da lei de Ohm modificada:

$$G_{Na} = (\text{Pico } I_{Na}) / (V - E_{Na})$$

V é o potencial de membrana, pico I_{Na} é o valor máximo da corrente e E_{Na} o potencial de equilíbrio do Na(71).

Medindo a corrente em cada voltagem, a condutância pode ser calculada. A relação G/G_{max} pode então ser plotada em função da voltagem, para obter a curva de ativação (Figura 8).

A curva de ativação pode ser ajustada por uma equação de Boltzmann na forma:

$$G = \frac{G_{max}}{1 + \exp\left(\frac{v_{1/2} - v}{k}\right)}$$

G_{max} é a condutância máxima, $V_{1/2}$ é a voltagem na qual ocorre metade da ativação e K é o fator de inclinação que determina quão abruptamente a curva de ativação muda com a tensão.

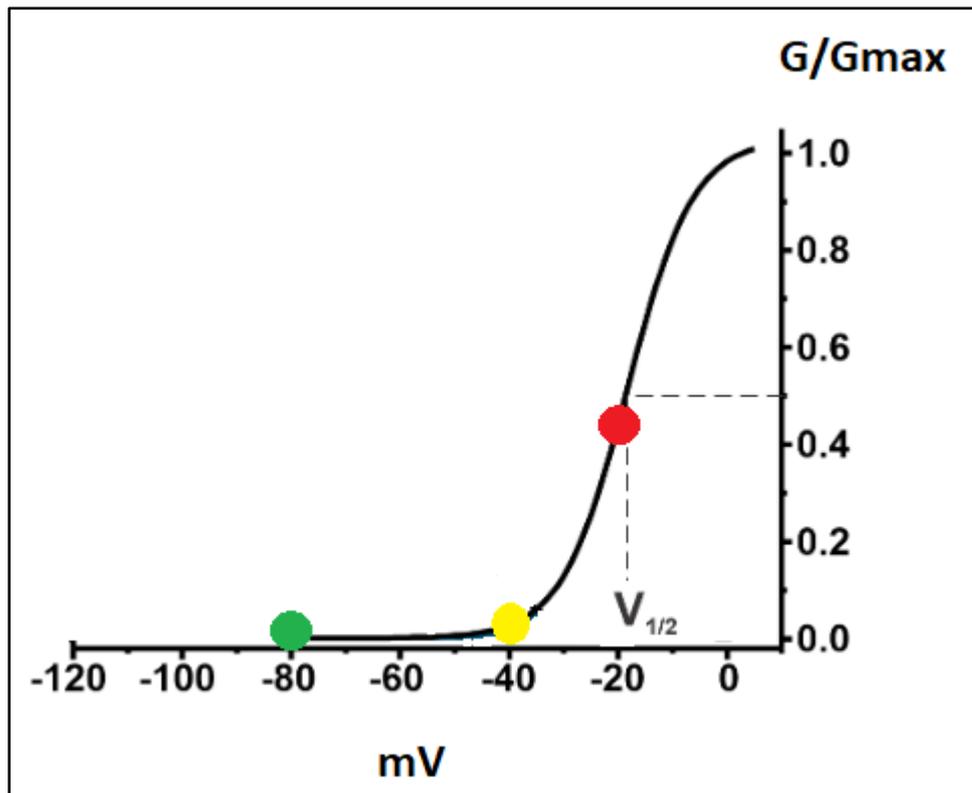


Figura 8. Gráfico de dependência de voltagem de ativação (G/G_{max}) obtido do protocolo 1. Os círculos coloridos correspondem aos pulsos de despolarização da mesma cor do protocolo 1. As linhas descontinuas representam como $V_{1/2}$ é obtido.

C) Estado inativo

A inativação do canal começa alguns milissegundos após a abertura do canal de sódio como consequência de uma mudança conformacional do canal após a despolarização. Isso prejudica a condutância de íons sódio mesmo que o sensor de tensão esteja em uma conformação ativa. O segmento de inativação é fechado dobrando-se no poro do canal (lado interno) e o canal entra em um estado inativo(71). Isso faz com que a membrana se repolarize, encerrando a inativação(72,73).

Inativação dependente de voltagem em estado estacionário

Representa a fração de canais que permanecem abertos após um pulso de voltagem despolarizante, no qual a corrente atingiu um estado estacionário de inativação. A Figura 9 mostra o protocolo 2 usado para medir I_{Na} em -20mV , após uma série de etapas de despolarização(26). Após um pré-pulso de -120mV (linha vermelha), os canais são fechados, mas estão disponíveis para serem abertos e, portanto, o pico I_{Na} é máximo quando um pulso de -20mV é aplicado. Após a aplicação de um pré-pulso de -80mV (amarela), uma pequena fração de canais já foi inativada, e o pico I_{Na} é menor no pulso de -20mV . Com um pré-pulso mais despolarizante (-40mV azul, -20mV verde e 5mV preto), o pico de I_{Na} após o pulso de -20mV é muito pequeno ou nulo, pois a maioria ou todos os canais já foram inativados. O protocolo 2 permite obter a fração de canais viáveis que podem ser ativados por um pulso de -20mV (I/I_{max} , Figura 10).

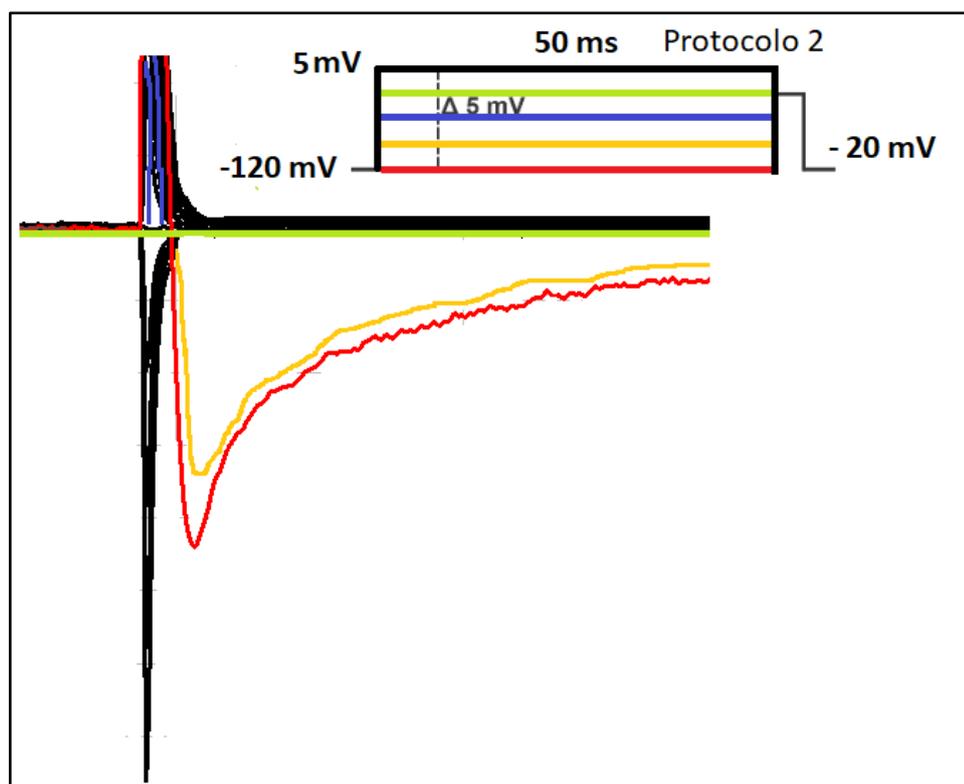


Figura 9. Protocolo de voltagem usado na técnica de patch clamp na configuração Whole Cell. Corrente obtidos a -20mV após um pré-pulso em diferentes potenciais de despolarização de 50ms com incremento de 5mV .

Os dados de inativação em estado estacionário também podem ser ajustados a uma equação de Boltzmann da forma:

$$I = \frac{I_{max}}{1 + \exp\left(\frac{V - v_{1/2}}{k}\right)}$$

I é amplitude do pico da corrente e I_{max} é a amplitude máxima da corrente, $V_{1/2}$ é a voltagem na qual ocorre metade da inativação e K é o fator de inclinação que determina o quão abruptamente a curva de inativação muda com a voltagem.

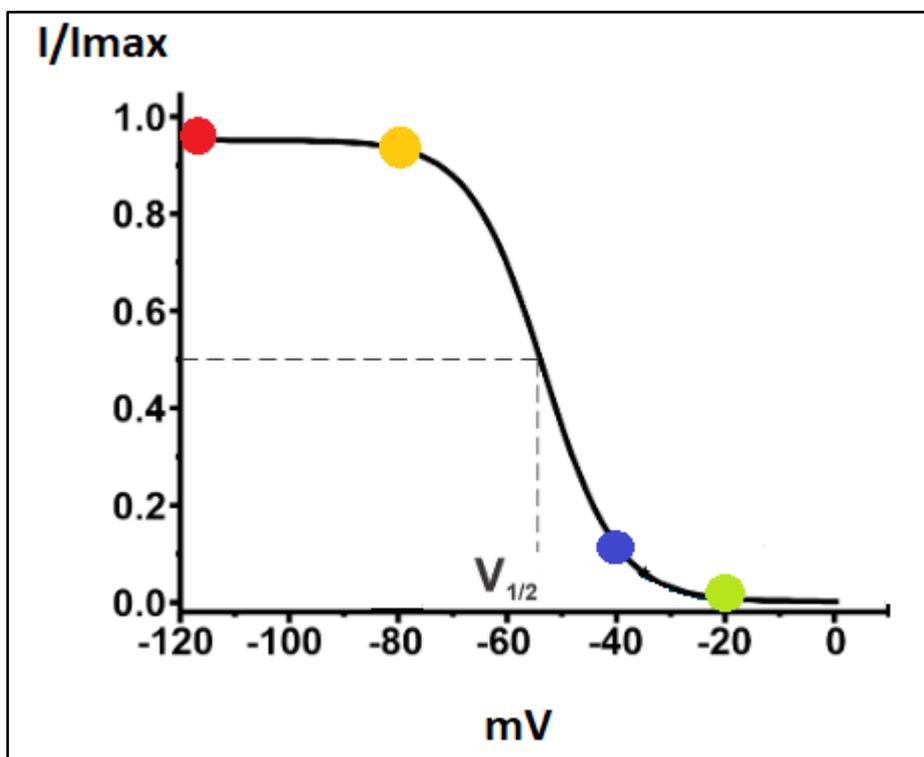


Figura 10. Gráfico de inativação dependente de voltagem em estado estacionário (I/I_{max}) obtido do protocolo 2. Os círculos coloridos correspondem aos pulsos de despolarização da mesma cor do protocolo 2. As linhas descontínuas representam como $V_{1/2}$ é obtido.

D) Estado cerrado-inativado

Após a repolarização da membrana, os resíduos carregados de ativação de cada S4 voltam para suas posições de repouso e fecham o poro do canal. Isso provoca a inativação e os canais entram no estado cerrado-inativado(73).

Recuperação da inativação

Depois de a corrente ter sido inativada, os canais precisam de um certo tempo para se recuperar e fazer a transição para a conformação fechada, e assim estarão disponíveis para serem abertos novamente. Este lapso de tempo é conhecido como recuperação da inativação(71,72). Você pode medir com um protocolo de dois pulsos (Protocolo 3). Entre ambos pulsos é aplicado um potencial de repouso de -120 mV com diferentes tempos de duração (1-40 ms). A figura 11 que a recuperação aumenta exponencialmente em alguns milissegundos quando o intervalo de interpulso é aumentado. A plotagem da corrente obtida em -20 mV (P2) normalizada pela corrente máxima obtida no primeiro pulso (P1), permite medir a recuperação da constante de tempo de inativação (τ) quando os dados são ajustados para uma função mono ou biexponencial.

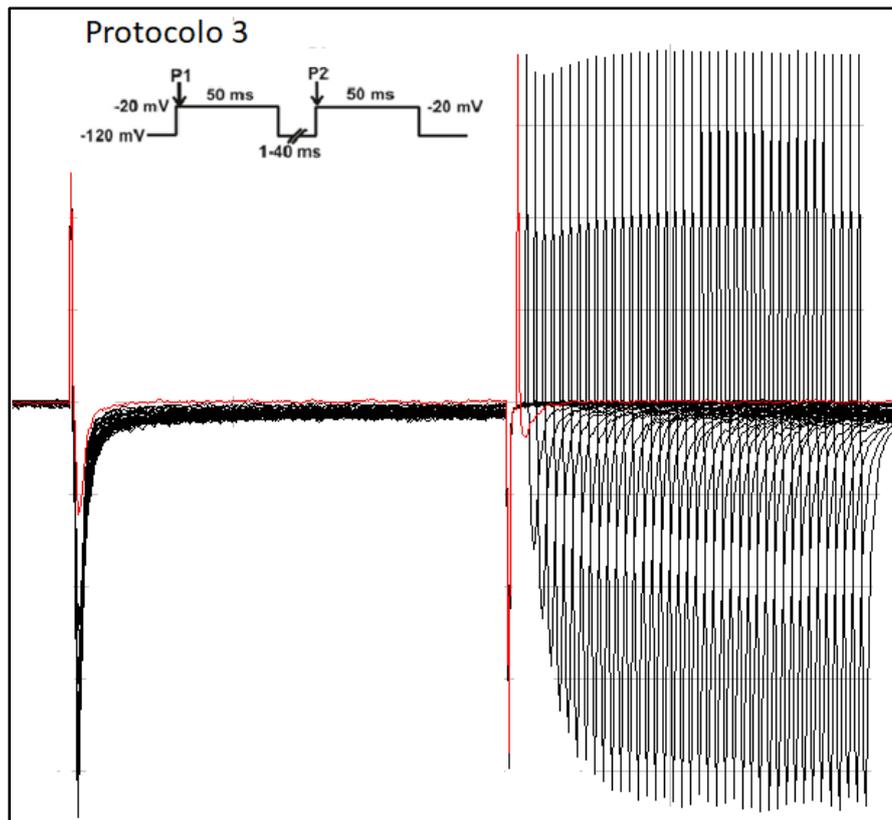


Figura 11. Protocolos de voltagem usados para estudar a recuperação da inativação de canais de sódio dependentes de voltagem usando a técnica de patch clamp na configuração Whole Cell. Correntes obtidas após um protocolo 3 de dois pulsos.

Estas propriedades biofísicas do canal de sódio explicadas podem ser alteradas pela aparição de uma mutação no canal de sódio ou em suas subunidades auxiliares. Portanto, isso poderia contribuir para um comportamento elétrico anormal das células e que pode ser estudada por Patch Clamp(74).

1.9. ESTUDOS FUNCIONAIS EM CANAIS DE SODIO

Embora se tenha descoberto que centenas de mutações em genes que codificam canais de sódio causam doenças, o conhecimento de como essas mutações afetam as funções dos canais é pouco estabelecido em doenças humanas. Estudos para entender os mecanismos subjacentes às diferentes canalopatias estão sendo desenvolvidos principalmente devido ao aprimoramento das tecnologias de biologia molecular (75).

Modelos murinos são comumente usados para estudar diversas canalopatias, incluindo canalopatias relacionadas ao sistema nervoso. Entretanto, estudos em modelos de peixe-zebra e mosca das frutas vêm sendo desenvolvidos e têm gerado maior importância para este tipo de doença, devido a que exibem o ambiente nativo dos tipos celulares afetados pela mutação, o que faz com que esse tipo de modelo se aproxime da realidade (76).

Além dos modelos animais, os modelos celulares também são usados há duas décadas. Esses modelos incluem sistemas de expressão heterólogos e, muito recentemente, células específicas de tecidos derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas (chamado em sua sigla em inglês "iPSc") (77). Neurônios derivados de iPSc têm sido utilizados em estudos de epilepsias genéticas, sendo uma das mais estudadas a SD (74,78). Este modelo é importante porque fornece do histórico genético específico do paciente e, portanto, de informações sobre a penetrância incompleta que algumas doenças exibem(79).

Os sistemas de expressão heterólogos são uma das técnicas mais utilizadas para estudar muitas funções celulares, sendo compostos basicamente por uma linhagem celular e DNA exógeno (80). As vantagens que este tipo de sistema apresenta vão desde seu baixo perfil de proteínas endógenas, até condições mínimas de manutenção, crescimento celular e a alta capacidade de absorver e expressar DNA exógeno (Transfecção de DNA)(81). Estas características fizeram com que as linhagens celulares HEK293T, TSA-201, COS-7, Ovócitos de *Xenopus laevis* e ovário de hamster chinês (CHO) sejam quase essenciais neste tipo de sistema de pesquisa

biológica (82). O DNA exógeno é basicamente um vetor, que é uma molécula de DNA que é utilizada como veículo para introduzir material genético exógeno em outra célula, onde a molécula de interesse pode ser expressa. Na maioria dos casos, são usados plasmídeos de expressão portadores do gene de interesse. Este tipo de sistema permite estudos de proteínas de membrana, sinalização intracelular e atividade enzimática utilizando técnicas de eletrofisiologia celular, imagens radiométricas de cálcio e western blot, respectivamente (83).

No caso da eletrofisiologia celular, a corrente expressa nas células HEK293T ou TSA-201 é estudada em experimentos com *Patch Clamp*. Essa estratégia tem sido usada para estudar o efeito de variantes de um solo nucleotídeo em genes que codificam canais iônicos relacionados à epilepsia ou canalopatias. No caso da Síndrome de Dravet, esses tipos de estudos forneceram uma análise detalhada das propriedades biofísicas do canal selvagem e mutante que contribuíram para aumentar a compreensão dos mecanismos moleculares (26,45).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Construir um sistema de expressão “*in vitro*” para o gene *SCN1A* e avaliar a patogênese molecular de algumas mutações selecionadas para esse gene usando a técnica de eletrofisiologia celular (*Patch Clamp*).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS PARA CADA ARTIGO

Artigo I: Clonagem dos plasmídeos contendo os cDNAs dos genes *SCN1A*, *SCN1B* e *SCN2B* de tipo selvagem.

Construir mutantes do gene *SCN1A* portadores de mutações previamente identificadas por nosso grupo em pacientes com epilepsia, utilizando tecnologia de mutagênese sítio-dirigida.

Artigo II: Realizar a transfecção heteróloga dos construtos de cDNA *SCN1B*, *SCN2B* e *SCN1A* (selvagens e mutantes) em linhagens celulares de mamíferos.

Avaliar o efeito de mutações no gene *SCNA1* no canal de sódio, usando a técnica *Patch Clamp*.

3. MÉTODOS

3.1. Métodos utilizadas no artigo I

3.1.1. Aspectos éticos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) com o parecer de número 4.600.574 e com o Certificado de Apresentação de Apreciação Ética de número 12112913.3.0000.5404 (Anexo 8.1). Adicionalmente este trabalho foi aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, processo CIBIO/FCM: 09/2019 (Anexo 8.2). Este trabalho não utilizou amostras de pacientes, no entanto, foi utilizada informação genética derivada de um projeto anterior que nos permitiu criar organismos modificados (OGMs).

3.1.2. Seleção de variantes no gene *SCN1A*

Selecionamos variantes relacionadas à síndrome de Dravet que ainda não foram descritas na literatura científica com estudos biofísicos. Essas variantes são do tipo pontual ao nível do DNA e apresentam modelos de predição que calculam a probabilidade de desenvolver a doença. As variantes correspondem a 3 pacientes que preencheram os critérios clínicos para SD de acordo com as diretrizes Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE) e uma descrição clínica detalhada é apresentada na Tabela 1. O tipo de mutação e efeito provocado a nível da proteína são mostrados na figura 12.

Tabela 1. Variantes selecionadas do gene *SCN1A* encontradas em três pacientes brasileiros, e suas características clínicas. G, gênero; F, feminino; M, masculino; SE, status epilépticos; CPS, crises parciais complexas; GTCS, crises tônico-clônicas generalizadas; Mio, crises mioclônicas; Tonic, crises tônica; Atonic, crises atônicas; HFC, história familiar de crises; VPA, ácido valpróico; LTG, lamotrigina; CNZ, clonazepam; CBZ, clobazam; KET, dieta cetogênica;(#), livre de crises;(*), não controla crises; GN, generalizado; FC, focal; ATX, ataxia; PYR, Liberação piramidal; LD, atraso de linguagem; AS, espectro do autismo;(-), não informado. Pd-DS: Probabilidade de desenvolver SD versus GEFS+ em função da variante *SCN1A* e idade de início das crises. GEFS+ : Epilepsia Generalizada com Crises Febris Plus

Variante	G	SE	Início das crises (mês)	Crises febril (Temperatura, °C)	Tipo de crises	HFC	Frequência de crises	Fármacos anticrises	Descargas epileptiformes	Exame neurológico	Pd-DS (%)
c.5177G>A	F	(-)	5	Sim (-)	Myo,GTCS	(-)	Semanais	VPA+CBZ(#)	GN/FC	ATX,PYR,LD	98,21
c.5329delG	M	Sim	3	Sim(38)	Tonic,CPS, Atonic	Sim	Diário	VPA+LTG+CNZ(*)	GN/FC	AS	99,33
c.5434T>C	F	Sim	5	Sim(37-37,5)	Myo,Atonic, CPS,GTCS	Não	Diário	KET+LTG+CNZ(*)	GN/FC	ATX,PYR	94,0

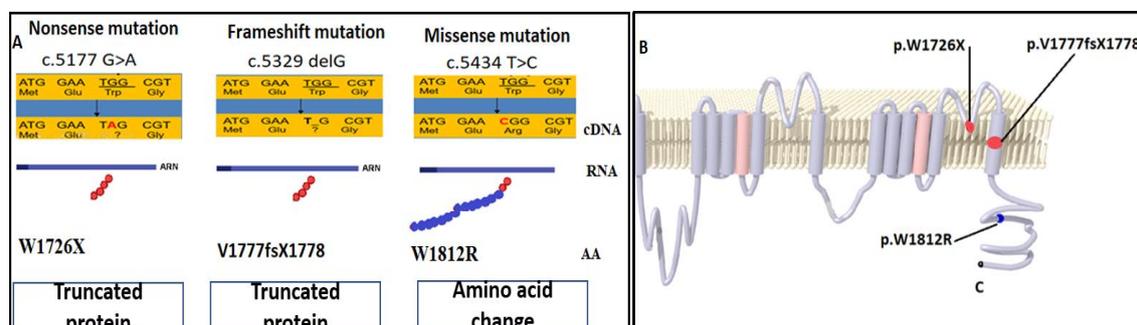


Figura 12. Mutações selecionadas para o estudo. A) Mutações não descritas anteriormente e sem estudos de eletrofisiologia celular disponíveis. Mutações encontradas em pacientes brasileiros com diagnóstico clínico de SD. B) localização das mutações ao nível da proteína, em todos os casos as mutações estão localizadas no domínio IV da subunidade alfa. Os pontos vermelhos correspondem a mutações que causam proteínas truncadas e os pontos azuis a mutações que causam uma proteína alterada. Image adapted from DeKeyser et al. Cryptic prokaryotic promoters explain instability of recombinant neuronal sodium channels in bacteria.296 (2021).

3.1.3. Plasmídeos

Todos os plasmídeos nativos foram gentilmente doados pelo Dr. Alfred L. George, Jr. (Department of Pharmacologic, Northwestern University Feinberg School of Medicine, Chicago, Illinois.). As isoformas de cDNA de tipo selvagem dos genes *SCN1A*, *SCN1B* e *SCN2B* foram clonadas nos plasmídeos descritos abaixo:

Plasmídeo-*SCN1A*

Plasmídeo de expressão para células de mamíferos, formado pelo vetor pCMV-Script de 4,3 kb e cDNA de 6,2 kb do gene *SCN1A* (região codificadora e UTR-3' do gene *SCN1A*). Este plasmídeo possui um gene de resistência a antibióticos chamado Canamicina e não possui gene repórter. Dessa forma, a maneira de verificar sua presença dentro da célula é apenas observando a corrente iônica de sódio pela técnica de *Patch Clamp*, identificando a presença do transcripto por Real Time PCR ou da proteína Nav1.1 através de técnicas como Western blot (Figura 13 C).

Plasmídeo-*SCN1B*

O plasmídeo pCD8-IRES-h β 1 possui formato circular e tamanho de 7865 pb, contém cDNAs que codificam o antígeno leucocitário CD8 e a subunidade β 1 do canal de sódio dependente de voltagem humano (556 pb). As duas regiões de codificação são acionadas pelo mesmo promotor (pCMV), mas separadas por um sítio de entrada ribossômico interno viral (IRES). As células que incorporaram este plasmídeo expressarão o antígeno CD8 na membrana (gene repórter), que pode ser detectado pela ligação de um anticorpo CD8. Estas apresentam também um gene de resistência à Canamicina, que permite selecionar colônias transformadas. As células que possuem mais de três ligações ao anticorpo CD8 são consideradas positivas por terem incorporado este plasmídeo no citoplasma (Figura 13 B).

Plasmídeo-SCN2B

O plasmídeo pGFP-IRES-h β 2, é do tipo circular e tem um tamanho de 6102pb. Contém cDNAs que codificam a proteína verde fluorescente (gene repórter) e a subunidade β 2 do canal de sódio voltagem-dependente humano (SCN2B) com um tamanho de 648 bp. As duas regiões de codificação são controladas pela mesma sequência promotora do citomegalovírus -(pCMV) e separadas por uma sequência do sítio de entrada ribossômico interno viral (IRES). Além disso, apresentam um gene de resistência à Canamicina, que permite selecionar colônias transformadas. As células que fluorescem em verde por indução de epifluorescência UV indicam que o plasmídeo pGFP-IRES-h β 2 está presente no citoplasma da célula. Para obter mais informações sobre o plasmídeo (Figura 13 A).

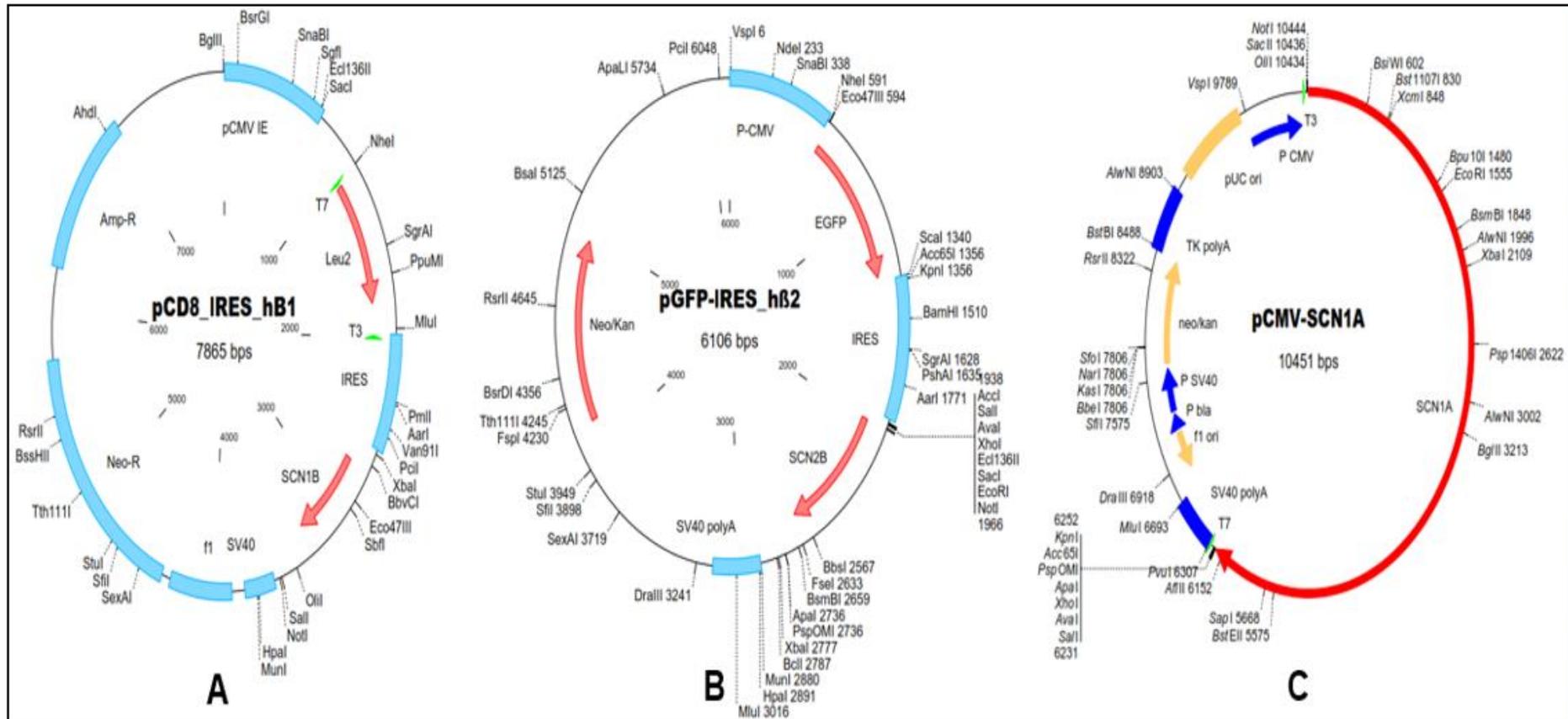


Figura 13. Mapas dos plasmídeos trabalhados. A estrutura dos plasmídeos GFP-IRES-h β 2, pGFP-IRES-h β 2 e pCMV-SCN1A é mostrada. Imagens utilizados neste estudo de Alfred L. George, Jr. et al/ Molecular basis of an inherited epilepsy. Neuron 34(2002).

3.1.4. Meio de cultura bacteriana e reagentes

Caldo Luria Bertani, Miller (LB)

12,5 g de caldo LB (Sigma-Aldrich) foram dissolvidos em 500 mL de água de grau molecular. Foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C e armazenados à temperatura ambiente.

LB Agar

20 g de LB Agar (Sigma-Aldrich) foram dissolvidos em 500 mL de água de grau molecular. Foram esterilizados em autoclave e armazenado à temperatura ambiente nas mesmas condições do meio LB.

Antibióticos, placas LB e caldo LB

Para preparar as placas LB, o ágar foi derretido e resfriado antes que a concentração correta de antibiótico Canamicina (Sigma-Aldrich) fosse adicionada. O ágar foi vertido em placas de 90 mm, deixado em repouso e armazenado a 4°C. Para a cultura de *E. coli* transformada, as concentrações finais de antibiótico adicionadas ao caldo LB foram de 50 µg/mL. Os estoques de antibióticos foram armazenados a -20°C em alíquotas de 1 mL.

3.1.5. Cultura bacteriana

Preparação de equipamentos e bactérias

Para evitar contaminação, os equipamentos e superfícies foram limpos com etanol 70%.

Os materiais de vidro e plástico foram esterilizados em autoclave e trabalhados em cabine de fluxo laminar.

As células DH5α™ (Thermo Fisher Scientific) são bactérias quimiocompetentes, portanto não foi necessário preparar sua competição, ou seja, preparar as bactérias para que sejam capazes de incorporar DNA exógeno.

Células competentes MAX Efficiency Stbl2 (Thermo Fisher Scientific) são adequadas para a clonagem de insertos instáveis, tais como sequências

retrovirais ou repetições diretas. Essas também são bactérias quimiocompetentes e foram armazenadas a -80°C .

NEB® Stable Competent *E. coli* (New England), bactérias que têm a capacidade de clonar plasmídeos instáveis e com tamanhos maiores que 10Kb, são bactérias quimiocompetentes e também foram armazenadas a -80°C .

Transformação de *E. coli* por choque térmico

Células DH5 α e MAX Efficiency Stbl2 foram usadas na transformação dos plasmídeos para as subunidades auxiliares $\beta 2$ e $\beta 1$ respectivamente.

Microtubos de polipropileno (Eppendorf) contendo 50 μL das bactérias competentes foram usados para transformação e colocados em gelo. 3 μL (5 ng/ μL) do respectivo plasmídeo foram imediatamente adicionados a cada microtubo e incubados em gelo por 30 minutos. Em seguida, as bactérias foram submetidas a um choque térmico por 30 segundos a 42°C e congeladas novamente por 2 minutos. As células foram diluídas em 750 μL de meio SOC (Thermo Fisher Scientific), e depois agitadas a 225 rpm durante uma hora a 37°C . O volume de transformação foi espalhado em 4 placas de ágar contendo o antibiótico de seleção e incubado a 37°C durante a noite.

Células Stbl2 (Thermo Fisher Scientific) foram usadas na transformação de plasmídeos *SCN1A* de tipo selvagem. Para a transformação, foi realizado o mesmo procedimento das células DH5 α , apenas alterando a temperatura de incubação para 30°C . As células NEB® Stable (New England) foram usadas na transformação de plasmídeos *SCN1A* do tipo selvagem e mutante. Para a transformação, foi realizado o mesmo procedimento das células Stbl2.

Para preparar "miniculturas", 4 mL de caldo LB contendo o antibiótico apropriado foram inoculados com uma única colônia de bactérias transformadas. As culturas foram incubadas durante 12 horas a 37°C (células DH5 α) ou 30°C (células Stbl2/célula Neb-Stable).

Preparou-se glicerol 50% (v/v) esterilizado, que foi utilizado para preparar o estoque das miniculturas obtidas. Foram adicionados 500 μ L de glicerol 50% e 500 μ L de minicultura, de forma que estes foram armazenados a -80 °C.

3.1.6. Mini-purificação de plasmídeo

Foi utilizado 1 mL de minicultura, de forma que este foi colocado em microtubos estéreis de 1,5 mL.

Um mL de miniculturas foram centrifugados a 6000 rpm por 5 min a 4°C. Os sobrenadantes foram removidos e os sedimentos celulares ressuspensos em 150 μ L de tampão de ressuspensão (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 μ g/mL de RNase A).

As amostras foram agitadas por 30 segundos com intuito de ressuspender adequadamente o pellet.

As células foram lisadas em 150 μ L de tampão de lise (200 mM NaOH, 1% (p/v) SDS), invertidas 10 vezes e incubadas à temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, as amostras foram tratadas com 200 μ L de tampão de neutralização (acetato de potássio pH 5,0) por 3 minutos. O conteúdo resultante foi depositado em um filtro (contendo uma membrana de sílica) adaptável a um microtubo.

Após cada amostra ser centrifugada a 12.000 rpm por 1 min a 4°C, os sobrenadantes foram removidos por decantação e então 150 μ L de tampão de lavagem foram adicionados a membrana de sílica e centrifugados a 12.000 rpm por 1 min a 4°C.

Finalmente o filtro foi eluído com 50 μ L de tampão TE, 1X, grau molecular (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA.Na₂ 1 mM) e centrifugado a 12000 rpm por 2 min a 4°C. Com isso, foi possível coletar os plasmídeos de interesse e purificá-los, de modo que estes foram armazenados a -20°C.

3.1.7. Manipulação de plasmídeo

Quantificação de plasmídeo

A concentração das amostras de DNA foi calculada usando um espectrofotômetro (NanoDrop 1000-Thermo Fisher Scientific). A concentração de DNA tomada como valor mínimo foi de 60 ng/μL em um volume final de 50 μL, com razão de absorbância 260/280 nm de 1,8.

Amplificação dos genes *SCN1B* e *SCN2B*

Para verificar se os plasmídeos purificados portadores das subunidades beta possuem o gene de interesse, foi realizada a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Portanto, projetamos com os programas Amplifx 1.5.4 e FastPCR 6.5.55, dois pares de primers para os cDNAs de *SCN1B* e *SCN2B* (Tabela 2).

Tabela 2. Primers para detectar por PCR a presença do gene dentro dos plasmídeos que contêm as subunidades betas.

Nome do Primer	Sequência de primer (5'-3')	Tm (°C)	Gene
F2 - <i>SCN1B</i> - ex3	AGAATGAGGTGTTGCAGCTGGA	56.3	<i>SCN1B</i>
R2- <i>SCN1B</i> - ex3	CGAGTGGTTGTAGGTGACATTGGT	56.3	<i>SCN1B</i>
F2 - <i>SCN2B</i> - ex3	ATGTGTCGGTGATGCTGAGAAACG	56.3	<i>SCN2B</i>
R2 - <i>SCN2B</i> - ex3	TTCCATGAGGACCTGCAGATGGAT	56.3	<i>SCN2B</i>

Condições de PCR

As mesmas condições de PCR foram utilizadas para a análise de ambos os genes, variando apenas a temperatura de alinhamento (T_a) de acordo com os primers. A reação em cadeia da polimerase foi executada da seguinte forma: 15 μ L de volume de reação com 20 ng de plasmídeos, 10 μ M de cada primer, 200 μ M de trifosfatases desoxinucleotídeos mistas (dNTPs), 7,5 μ L de mistura de reação AccuPrime™ Pfx 10X (Thermo Fisher Scientific) e 1,25 U de AccuPrime™ Pfx DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific).

O método de ciclagem térmica foi conduzido da seguinte forma: temperatura inicial 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 15 s, T_a por 30 s, 68°C por 1 min e fase final de alongamento de 68°C por 5 min.

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese usando géis de agarose 0,8% (p/v). Agarose (Sigma) foi dissolvida em TBE 1X (100 mM Tris, 83 mM ácido bórico, 1 mM EDTA) e fervida. Em seguida, a agarose foi resfriada, de forma que 20 μ L de SYBR™ Safe (Thermo Fisher Scientific) foram adicionados. A mistura foi então vertida em uma bandeja de eletroforese e deixada em repouso. Quando exposto à luz ultravioleta, o SYBR™ Safe unido ao DNA emite uma fluorescência mais intensa e permite a detecção de ácidos nucleicos.

Antes do carregamento das amostras no gel de agarose, 3 μ L de corante de carregamento de DNA 6X (Thermo Fisher Scientific) foram adicionados a cada amostra, com intuito de monitorar a migração de DNA. Foram utilizados marcadores de peso molecular de referência de 1 kb e 100 bp (Thermo Fisher Scientific). Os géis foram submetidos a eletroforese a 100 V por 45 minutos e visualizados usando um transiluminador UV (Bio-Rad Laboratories). Os registros foram fotografados digitalmente usando o sistema BioImaging.

3.1.8. Perfil enzimático de plasmídeos- pCMV-SCN1A

Os plasmídeos pCMV-SCN1A do tipo selvagem e mutante são geneticamente instáveis na sequência do gene, de modo que apresentam considerável susceptibilidade à recombinação e deleções espontâneas. Portanto, para verificar se o pCMV-SCN1A ainda retém a sequência de cDNA do gene *SCN1A* após a clonagem, realizamos a digestão enzimática dos plasmídeos com a enzima BamHI (Thermo Fisher Scientific). Quando um plasmídeo deste tipo não apresenta alteração, espera-se obter um perfil enzimático de 4 fragmentos com os seguintes tamanhos: 5,4, 2,5, 1,9 e 0,62 kb em eletroforese de agarose 1,5% a 90 V por 135 minutos. Aqueles pCMV-SCN1A nativos e mutantes com o perfil enzimático correto foram então sequenciados.

3.1.9. Maxi-purificação de plasmídeo

Os plasmídeos que não tiveram alteração após a clonagem e que foram confirmados por PCR ou perfil enzimático foram subclonados em volumes de 200 mL de meio LB (Maxicultura) distribuído em 4 frascos com o antibiótico de seleção (Canamicina) e 400 µL de minicultura.

Após este procedimento, foi realizada uma purificação Maxi de acordo com o protocolo: as bactérias foram coletadas por centrifugação a 6000 g por 15 min a 4°C. Cada maxicultura (50 mL) foi colocada em tubos de 50 mL (Falcon) e centrifugada. Em seguida, os pellets foram juntados em um único tubo de 50 mL, de forma que estes foram diluídos em 4 mL de tampão de ressuspensão. As bactérias foram completamente solubilizadas pipetando para cima e para baixo até que não sobrassem grumos.

Foram adicionados 4 mL de tampão de lise, em seguida, estas foram agitadas devidamente de 4-6 vezes e, posteriormente, incubadas por 5 min à temperatura ambiente - não permitindo que a reação de lise dure mais de 5 minutos. Adicionamos 4 mL do tampão de neutralização frio e, imediatamente, misturamos intensamente, invertendo o tubo 4-6 vezes e incubamos em gelo por 15 min.

Logo em seguida, as amostras foram centrifugadas a 17105 g por 30 min a 4°C. Os sobrenadantes foram então coletados por decantação e transferidos para novos tubos cuidadosamente (conteúdo contém o plasmídeo). Posteriormente, os mesmos foram novamente centrifugados a 17105 g por 15 min a 4°C e, por fim, coletados. Esta segunda etapa de centrifugação foi realizada para evitar a transferência de partículas suspensas para a membrana de purificação capazes de entupi-la.

Foi utilizado o removedor de endotoxina (RE-Qiagen) e adicionado 0,1% do volume obtido do sobrenadante, misturando intensamente e deixando em gelo por 30 minutos para que o removedor de endotoxina (RE) atue no sobrenadante contendo o plasmídeo.

As membranas de purificação foram ativadas (dentro de uma coluna) adicionando 4 mL de tampão de ativação, permitindo que a coluna esvazie por gravidade. O sobrenadante tratado com RE foi adicionado, permitindo que ele entre na coluna por gravidade.

As membranas foram limpas com 10 mL de tampão de limpeza, deixando que o mesmo esvazie por gravidade. Este passo foi repetido por mais uma vez.

Logo em seguida, o DNA foi eluído com 5 mL de tampão de eluição, colocando o tampão sobre a membrana que está contido em um tubo Falcon de 50 mL novo e estéril. Após isso, o mesmo foi precipitado através da adição de 3,5 mL de isopropanol (Sigma-Aldrich) à temperatura ambiente. As amostras foram então misturadas e centrifugadas imediatamente a 15.000 g por 30 min a 4°C. Em seguida, os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos por decantação.

Os pellets de DNA foram lavados com 2 mL de etanol 70%, preparado com água livre de nuclease, à temperatura ambiente. Estes foram misturados e centrifugados imediatamente a 15.000 g por 10 min a 4°C. Os sobrenadantes foram removidos cuidadosamente por decantação. Os pellets foram secos a temperatura ambiente por 12 horas.

Por fim, 100 μ L de Tampão TE (10 mM Tris HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) foram adicionados aos plasmídeos secos e mantidos a 4°C por 12 horas, com intuito de solubilizar o DNA. No dia seguinte, os plasmídeos foram homogeneizados e quantificados com o NANODROP-1000 (Thermo Scientific).

Foi descartada a presença de DNA genômico bacteriano através da realização de digestão com a enzima ECORI seguida de eletroforese em gel de agarose 1,5%.

3.1.10 Mutagênese sítio-dirigida

As mutações foram introduzidas em plasmídeos pCMV-SCN1A de tipo selvagem pelo sistema de mutagênese direcionada ao local, usando o sistema GeneArt™ PLUS (Thermo Fisher Scientific). Este protocolo contém quatro etapas: 1) Metilação, 2) Amplificação, 3) Recombinação e 4) Subclonagem.

Metilação

O objetivo desta etapa é inativar os plasmídeos parentais (circular) utilizados para gerar os plasmídeos mutantes (linear). Essa inativação é realizada através da metilação das regiões de metilação do plasmídeo, causando o silenciamento do gene de resistência ao antibiótico. Utilizou-se o seguinte protocolo: 8 ng de pCMV-SCN1A, 1,6 U de Metilasa (Thermo Fisher Scientific) e 0,8 μ L de S-Adenosil Metionina -25X SAM (Thermo Fisher Scientific) seguido de incubação a 37°C por 20 minutos.

Amplificação

Os primers de mutagênese foram projetados usando Primer X (site: <http://www.bioinformatics.org/primerx>), de forma que quatro tipos diferentes de mutação foram introduzidos no exon 26 do gene *SCN1A* (Tabela 1 do artigo II), resultando em quatro plasmídeos mutantes diferentes. A mutagênese do plasmídeo pCMV-SCN1A foi realizada usando o plasmídeo parental metilado na etapa anterior. A enzima utilizada para realizar a PCR foi a AccuPrime Pfx DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), ideal para amplificação de alta fidelidade de fragmentos de DNA para aplicações como clonagem e

mutagênese. Todas as PCRs foram realizadas usando um termociclador Mastercycler ep Gradient S (Eppendorf).

As PCRs foram realizadas com 40 ng de pCMV-SCN1A, 5 µL de cada primer (10 µM), 10 µL de tampão de reação 10X AccuPrime™ Pfx, 10 µL de 10X Enhancer, 1,25U AccuPrime™ Pfx polimerase (Thermo Fisher Scientific) e 66,2 µL de água de grau molecular em um volume total de 100 µL. As condições de PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguido de 18 ciclos de 95°C por 15 s, 55°C por 30 s, 68°C por 5,5 min, e alongamento final a 68°C por 5 min. Os mutantes pCMV-SCN1A foram submetidos ao sequenciamento de nova geração em um sequenciador de bancada Miseq (Illumina®) para avaliar se as mutações foram inseridas corretamente.

3.1.11 Recombinação do plasmídeo

Os plasmídeos lineares com a sequência correta foram recombinados com GeneArt® 2X Enzyme Mix (Thermo Fisher) e foram obtidos 4 tipos de plasmídeos mutantes pCMV-SCN1A do tipo circular. A reação de recombinação foi preparada em um volume final de 20 µL, para o qual foram utilizados 6 µL de produtos de PCR (plasmídeos lineares) e 10 µL de GeneArt 2X Enzyme Mix, incubados por 15 minutos a temperatura ambiente. A reação de recombinação foi interrompida com 1 µL de 0,5 M EDTA, e os tubos foram colocados em gelo, de forma que a subclonagem celular foi realizada imediatamente, em seguida os plasmídeos foram purificados e os perfis enzimáticos foram analisados de acordo com o protocolo mencionado acima.

3.1.12 Sequenciamento de nova geração de plasmídeos

Para verificar se os plasmídeos contêm o gene de interesse e se apresentam a sequência de interesse, realizamos o sequenciamento utilizando o sistema SeqCap Ez SR (Roche NimbleGen) que permitiu a criação das bibliotecas de sequenciamento conforme protocolo:

Preparação e fragmentação de plasmídeos (DNA)

A quantidade inicial de DNA utilizada foi de 1 μg (52,5 μL a uma concentração de 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$), conforme recomendado pela Roche NimbleGen. A qualidade e a concentração do DNA são testadas usando um nano espectrofotômetro (EPOCH), um fluorômetro-Qubit (Thermo Fisher) e a eletroforese em gel. A fragmentação do DNA do plasmídeo foi realizada usando um instrumento de corte chamado sonicador (M220-Covaris). Tal instrumento define-se como um ultrassonicador focado, que usa energia acústica ultrassônica para fragmentar mecanicamente o DNA. A fragmentação é obtida direcionando pulsos de ondas ultrassônicas em certas áreas de um recipiente (contendo a amostra de DNA) que é imerso em um banho-maria. As duas condições necessárias para uma fragmentação bem sucedida são a utilização de vasos especiais (Microtube-50-afa-Covaris) e a realização da fragmentação em condições isotérmicas, com os seguintes parâmetros: volume de amostra de 52,5 μL , tempo de 255 segundos, potência de 8,5 W e uma temperatura de 20°C.

Reparo final

Nesta etapa, o objetivo é reparar as extremidades do dsDNA fragmentado, usando o Kapa® End Repair Master Mix (Roche). A mistura continha uma enzima de reparo final e um tampão incubado em um termociclador com os fragmentos de DNA. Após a reação de reparo, os fragmentos foram limpos com Agencourt AMPure XP reactive® (Beckman coulter life sciences). O sistema de limpeza (Tecnologia SPRI) permitiu a fácil remoção de contaminantes como primers, primers dímeros, sais e dNTPs deixando apenas os fragmentos de DNA. Isso permitiu que esses fragmentos fossem usados em reações de PCR subsequentes.

Ligação de dAMP

Etapa necessária para a ligação do adaptador. É uma reação que visou adicionar um trecho de monofosfato de desoxiadenosina (dAMP) à extremidade 3 de fragmentos de dsDNA limpos. Essa reação utilizou um tampão Kapa® Tail A (Roche) e uma enzima em um termociclador. Após essa reação, os fragmentos de DNA foram limpos com tecnologia SPRI.

Ligação do adaptador

A reação de ligação entre o adaptador e o fragmento de DNA foi realizada utilizando uma mistura de KAPA® T4 DNA ligase (Roche), um tampão com a amostra de DNA de fita dupla e o adaptador de índice específico em um termociclador a 20°C por 20 minutos. Os adaptadores de índice são ligantes específicos da plataforma de sequenciamento que permitem que fragmentos da biblioteca sejam anexados à superfície da célula de fluxo chamada P5 e P7. Cada adaptador possui um índice que contém uma sequência única que identifica as amostras na sequência e permite sua multiplexação. Existem 24 adaptadores disponíveis comercialmente (Kits de adaptadores SeqCap® A e B-Roche) que permitem a indexação de 24 amostras.

Seleção de tamanho por Dual-SPRI

O objetivo desta etapa é selecionar fragmentos de DNA entre 250 e 450 pb por meio da dupla ligação do DNA a esferas magnéticas. Isso é importante porque nos permitiu selecionar uma faixa dentro do tamanho correspondente das sequências alvo, tornando possível o processamento dessas no sistema de sequenciamento MiSeq.

LM-PCR pré-capturado

O objetivo foi de amplificar os fragmentos de DNA selecionados, utilizando PCR, Master mix e oligonucleotídeos específicos. Após a reação, os fragmentos de DNA foram limpos com tecnologia SPRI.

Medidas de qualidade e quantidade

Usando um fluorômetro, verificamos que o rendimento da biblioteca foi maior que 1 µg de massa de DNA. Para garantir o tamanho dos fragmentos (média de 300 pb) foi usada a eletroforese microcapilar usando o chip Caliper® Bioanalyzer DNA-1000(Agilent).

Multiplexação

O objetivo foi misturar as 24 amostras em um microtubo (pool da biblioteca), elas foram misturadas em quantidades iguais em massa para cada biblioteca obtida gerando um único conjunto, com massa combinada de 1200 ng.

Preparação de bibliotecas para sequenciamento

Foi baseado nas concentrações obtidas por PCR em tempo real do pool da biblioteca. Em seguida foi utilizado tampão de eluição e a biblioteca foi diluída a 4 nM para obter a concentração adequada da amostra a ser colocada no Miseq. A amostra foi desnaturada quimicamente com NaOH, seguida pela adição de um tampão de hibridização especial (HT1-Illumina) diluindo a biblioteca para uma concentração final de 12 pM (volume final).

O volume final da biblioteca foi inserido dentro de uma nano flowcell e esta foi colocada no poço do cartucho do MiSeq v2, o qual, por sua vez, foi inserido na plataforma de sequenciamento MiSeq (Illumina®) para realizar o sequenciamento - procedimento durou aproximadamente 8 horas.

3.2. Métodos utilizadas no artigo II

3.2.1. Cultura celular de Hek-293T

HEK-293T é uma linhagem celular derivada de células renais embrionárias humanas-293 tsA201(HEK-293T, Health Protection Agency Culture Collections-Salisbury, UK). Também muitas vezes referidas como células HEK, essas células são amplamente utilizadas por sua facilidade de crescimento e transfecção.

A alta eficiência de transfecção das células HEK-293T permite a produção de proteínas ou vírus exógenos para pesquisa farmacêutica e biomédica. No caso de estudos de eletrofisiologia celular (*Patch-clamp*) para canais de sódio, tal emprego se baseia na falta de expressão endógena de canais de sódio (Nav1.1).

Cultura celular de HEK-293T em Frasco T-25

As células HEK-293T foram mantidas em Meio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco-Thermo Fisher Scientific), 1% de Penicilina - Estreptomicina (Gibco-Thermo Fisher Scientific) e 1% de glutamax (Gibco-Thermo Fisher Scientific) a 37°C em uma atmosfera umidificada de ar com CO₂ (5%). As células foram cultivadas em um frasco T-25 (Corning, New York, NY, USA) por 2 dias até atingir 80% de confluência.

Cultura em placas de Petri de 35mm

Os frascos T-25 foram removidos da incubadora de CO₂ (Thermo Fisher Scientific), os quais continham as células cultivadas em até 80% de confluência. Essas foram retiradas do meio de cultura com o aspirador dentro da cabine de fluxo laminar (LABSOM).

Foi adicionado 3 mL de Tampão fosfato-salino- em sus siglas em inglês "PBS" (Sigma-Aldrich-Merck), de forma que as células foram homogeneizadas por 1 minuto e lavadas cuidadosamente. Após isso, estas foram retiradas do PBS. Em seguida, foi adicionado 250 µL de 0.05% tripsina/EDTA (Corning) em uma extremidade do frasco, de modo que este foi homogeneizado

cuidadosamente, com intuito de que a tripsina fosse distribuída por toda cultura.

Os frascos de T-25 foram cobertos e colocados na incubadora por 2 minutos. Terminado o tempo de incubação com tripsina, 5 mL de meio DMEM foram adicionados para inativar da ação enzimática. O meio foi lavado e, em seguida, homogeneizado suavemente, garantindo que as células permaneçam em suspensão.

Foram adicionados 100 μ L de células em suspensão dentro da placa de Petri de 35 mm (Falcon-Corning), contendo 1 mL de meio DMEM. Por fim, a placa de Petri foi levada para a incubadora, de formar a aguardar uma confluência de 60% de células.

3.2.2. Transfecção heteróloga

A transfecção foi realizada por técnica química utilizando lipossomas. O tipo de transfecção para os três plasmídeos foi transitório. Para conseguir uma adequada transfecção e expressão dos genes que codificam as subunidades do canal de sódio, foi utilizada uma razão de massa de plasmídeos, com intuito de garantir a expressão estequiométrica das subunidades na membrana celular. Nesse sentido, foi utilizado 3000 ng como massa total de DNA com 6 μ L de Lipofectamina 2000 (Invitrogen).

Complexo de Plasmídeos

Foram diluídos 250 μ L de Opti-MEM® Medium (Invitrogen) e 6 μ L de Lipofectamine 2000® em um microtubo estéril. Tal solução foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Em paralelo, foi diluído, em outro microtubo estéril, 250 μ L de Opti-MEM® Medium e 3000 ng dos plasmídeos. O conteúdo de ambos os microtubos foi misturado, de forma a serem homogeneizados com uma micropipeta e incubados a temperatura ambiente por 20 minutos.

A placa de Petri com as células cultivadas a serem transfectadas (60% de confluência) foi então retirada da incubadora, o meio de cultura DMEM foi aspirado cuidadosamente e posteriormente foi adicionado 1,5 mL de meio DMEM.

Por fim, o complexo de transfecção foi distribuído por toda a placa Petri com meio de cultura, de modo que a placa teve seu conteúdo misturado movendo diagonal e transversalmente, até que o complexo de transfecção esteja bem homogeneizado em toda a placa.

3.2.3. Individualização de células transfectadas

Foi adicionado 300 μ L de Poli-D-Lisina (Gibco) em placas de Petri de 35 mm. Esta foi distribuída cuidadosamente por toda a placa de Petri e deixada por 1 minuto a temperatura ambiente. O excesso de Poli-D-Lisina foi retirado de uma extremidade da placa de Petri, e, adicionalmente, esta foi lavada com PBS para retirar o excesso de Poli-D-Lisina – foram realizadas 5 lavagens.

Foi adicionado 1,5 mL de meio DMEM fresco às novas placas tratadas com Poli-D-Lisina. Em seguida, a placa de Petri de 35 mm contendo células transfectadas por 24 horas foi removida da incubadora e o meio foi aspirado da placa de Petri. Foi adicionado 500 μ L de tripsina na placa de Petri contendo as células transfectadas, de forma a mantê-las por 2 minutos na incubadora a 37°C.

Após 2 minutos em que as células transfectadas foram tratadas com tripsina, 1 mL de meio DMEM fresco foi adicionado e homogeneizado suavemente para gerar células em suspensão.

Foi transferido 70 μ L das células em suspensão nas placas de Petri tratadas com Poli-D-Lisina - possuindo também meio de cultura -, em seguida, estas foram homogeneizadas movendo diagonal e transversalmente para que a aderência das células na placa seja a mais individualizada possível.

Essas novas placas de Petri foram colocadas novamente na incubadora por 12 horas, para que as células transfectadas se adiram e se recuperem. Após esse tempo, a eficácia deste procedimento foi determinada por a expressão dos genes repórter e a presença de corrente de íons sódio.

3.2.4. Eletrofisiologia celular

As células cultivadas, após a individualização celular, foram transferidas para a câmara de aquisição de um microscópio de fluorescência invertido (Nikon Eclipse TE300), alimentado continuamente à temperatura ambiente com solução de banho. Células apresentando expressão de genes repórteres, foram escolhidas para aquisição de dados.

As pipetas foram confeccionadas a partir de capilares de vidro de borossilicato (Instrument - Novato, CA, USA) com um extrator Narishige PC-10 (Narishige International Limite), e o polimento da pipeta foi realizado com um microforge (Microforge MF- 900- Narishige International Limited) de forma a obter uma resistência que variava entre 2,2 e 2,7 M Ω quando preenchido com solução de pipeta.

A solução de banho foi ajustada para pH 7,4 com NaOH, usando um medidor de pH SympHony (VWR-West Chester, PA, USA). A solução da pipeta foi ajustada para pH 7,2 com CsOH. Osmolalidade das soluções de banho e pipeta foi ajustada com glicose (Sigma-Aldrich) para 289 e 275 mOsm, respectivamente; usando um Micro-osmômetro 210(Fiske). A composição das soluções é mostrada na tabela 3.

A aquisição dos registros foi realizada na configuração da célula inteira usando um amplificador Axopatch 200B da Axon Instruments-Molecular Devices (Sunnyvale, CA, EUA). O sistema de aquisição pClamp10.2/Digidata 1440A (Axon Instruments-Molecular Devices) foi ajustado para uma frequência de amostragem de 25 kHz. Os dados foram filtrados a 5 kHz. A compensação de resistência em série de 80-90% foi usada quando foi necessário.

Entrando na configuração de célula inteira, aguardou-se 5 minutos para estabilização das soluções e, em seguida, foram iniciados os registros. As correntes de sódio foram registradas com os seguintes protocolos: para determinar a relação corrente-voltagem (IV) e ativação dependente de voltagem, as células foram mantidas a -120 mV e as correntes foram induzidas com pulsos despolarizantes de 50 ms, de -80 a 80 mV, em incrementos de 5 mV (Figura 7). A inativação dependente de voltagem foi determinada pela aplicação de pré-pulsos de 50 ms, de -140 a 5 mV, em incrementos de 5 mV, seguidos por um pulso teste de -20 mV (Figura 9). A recuperação da inativação foi estudada com um protocolo de dois pulsos, consistindo de um primeiro pulso de -20 mV de 50 ms a partir de um potencial de retenção de -120 mV, seguido por um interpulso de -120 mV de duração variável (1-40 ms); e um segundo pulso de -20 mV de 50 ms (Figura 11). Esses protocolos foram reproduzidos a partir da pesquisa de R Martinez-Moreno et al, gentilmente cedida a nós(84).

As análises dos dados obtidas das correntes de sódio foram analisadas com o software OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation -Northampton, MA, USA). A densidade de corrente foi obtida normalizando a corrente em cada potencial pela capacitância da célula e plotada contra a tensão aplicada.

Os dados de ativação dependente de voltagem foram plotados em relação à voltagem, aplicados e ajustados a uma equação de Boltzmann da forma já indica:

$$g = \frac{g_{max}}{\frac{1 + \exp \left(\frac{V_{1/2} - V}{k} \right)}{k}}$$

g é a condutância, g_{max} é a condutância máxima, $V_{1/2}$ é a voltagem na qual metade dos canais são ativados, V é o potencial de membrana e k é o fator de inclinação.

Os dados de inativação dependentes de voltagem foram plotados em relação à voltagem, aplicados e ajustados com a equação de Boltzmann da forma:

$$I = \frac{I_{max}}{1 + \exp\left(\frac{V - V_{1/2}}{k}\right)}$$

I é o pico de amplitude da corrente, I_{max} é a amplitude máxima da corrente, V_{1/2} é a voltagem na qual metade dos canais estão inativados, V é o potencial de membrana e k é o fator de inclinação.

Os dados de recuperação da inativação foram ajustados a uma função mono ou biexponencial para obter a constante de tempo. Os valores de pico das correntes P1/P2 foram plotados contra os diferentes intervalos de pulso.

Tabela 3. Lista de soluções de banho e pipeta utilizadas nos estudos eletrofisiológicos. Todos os componentes foram tomados do trabalho de R Martinez-Moreno et al/Frontiers in Cell and Developmental Biology 8(2020).

Solução	Composição
Solução de banho 140 NK	140 mM NaCl; 3 mM KCl; 10 mM HEPES; 1.8 mM CaCl ₂ ;
Solução de pipeta 130 CsCl	130 mM CsCl; 1 mM EGTA; 10 mM HEPES; 10 mM NaCl;

4. RESULTADOS (ARTIGOS)

CAPITULO I.

AN OPTIMIZED PROTOCOL FOR THE CREATION OF CONSTRUCTS EXPRESSING SODIUM CHANNEL SUBUNITS TO BE USED IN FUNCTIONAL STUDIES OF GENETIC EPILEPSIES

Artigo submetido ao periódico Plos-One

An optimized protocol for the creation of constructs expressing sodium channel subunits to be used in functional studies of genetic epilepsies

Saúl Lindo-Samanamud^{1,2}, Amanda M. do Canto^{1,2}, Fabio R. Torres^{1,2}, Marina C. Gonsales^{1,2}, Alexandre B. Godoi^{1,2}, Douglas C. da Rosa^{1,2}, André S. Vieira^{2,3}, Iscia Lopes-Cendes^{1,2}

¹ Department of Translational Medicine, School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil.

² The Brazilian Institute of Neuroscience and Neurotechnology (BRAINN), Campinas, Brazil.

³ Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil.

Address correspondence to: Iscia Lopes-Cendes, M.D., Ph.D.
Department of Translational Medicine
School of Medical Sciences
University of Campinas (UNICAMP)
Vital Brasil, 80
Campinas, SP, Brazil 13083-888
E-mail: icendes@unicamp.br

ABSTRACT

Background: We aim to develop a novel method for cloning highly unstable plasmids encoding sodium channel subunits expressed in the brain. **New method:** NEB Stable competent cells (NSCC) were transformed with the native plasmid. After purification, plasmids with the expected profile of enzymatic digestion were sequenced. Finally, mutant linear plasmids (MLP) created by site-directed mutagenesis were used to transform NSCC. **Results:** We found that choosing a suitable host for transformation and subcloning, the controlled temperature during cell growth, and a small volume of Luria Bertani (LB) medium allowed the generation of plasmids without undesirable mutations or structural alterations. **Comparison with existing method:** Currently, there is a lack of a gold standard method for cloning unstable plasmids. Using the method proposed here, we observed increased cell growth and precision in the sequence of the obtained plasmids. **Conclusion:** We have developed a novel and optimized strategy for replicating unstable plasmids using NSCC with an appropriate volume of culture medium and an adequate temperature in the cloning and subcloning phases. We have also demonstrated how to create the desired plasmid constructs by using site-directed mutagenesis. We expect that our protocol will assist investigators interested in functional studies of sodium channels expressed in the brain.

KEYWORDS: NEB Stable competent cells, plasmids, transformation, mutagenesis, *SCN1A* gene.

1. INTRODUCTION

Bacterial cells can be transformed, incorporating new genetic traits by acquiring a physiological state called “competence” (Veening and Blokesch, 2017). This state allows the expression of genes related to the absorption and processing of DNA. When exogenous DNA is incorporated into the cytoplasm, it can integrate into the bacteria’s genome or become a plasmid (Etchuuya et al., 2011; Million-Weaver and Camps, 2014). Plasmids are circular extrachromosomal DNA fragments with the ability to self-replicate and generate new phenotypes, allowing the host cell to adapt to environmental changes (Boucher et al., 2013; Ridenhour and Top, 2016).

Recombinant DNA technology allows plasmid engineering in *Escherichia coli*. However, several technical issues must be overcome to maintain and replicate the plasmid correctly (Al-Allaf et al., 2013). The main challenges are related to the size and constitution of the plasmid DNA, the technique used to introduce the exogenous DNA, the bacterial strain used in the transformation, the competence of the bacterial cell, and the cell growth protocol used (Corchero and Villaverde, 1998; Yoshida and Sato, 2009). If these parameters are not optimized, plasmid DNA stability and quality, as well as the expression of the cloned product, could be affected negatively. The possible causes for failure in these experiments are that the cell cannot maintain an adequate plasmid synthesis metabolism, or it may be affected by the stress of the culture maintenance. In addition, intrinsic characteristics of the host bacterium could lead to plasmid instability, causing unwanted losses or alterations in the plasmid sequence (Silva et al., 2012).

Voltage-dependent sodium channels (VGSC) are transmembrane proteins that allow sodium ions to flow across the cell membrane. These channels are hetero-oligomeric polypeptides formed by a functional alpha unit associated with one or two modulatory beta subunits. One of these alpha units is the Nav1.1 protein encoded by the *SCN1A* gene, which is located on

chromosome 2q24.3. *SCN1A* has 26 exons and 84 Mb of genomic DNA (Wallace et al., 2001), and mutations in *SCN1A* are a major cause of monogenic forms of epilepsy (Meng et al., 2015).

One alternative to study the functional effect of mutations in VGSC is by expressing the mutation in a heterologous system allowing for cell electrophysiological studies (Lossin et al., 2002; Sendfeld et al., 2019). However, these heterologous expression systems containing plasmids encoding subunits of sodium channels require complex and laborious cloning processes, a factor that frequently results in experimental failures. Furthermore, recent studies have indicated that the large size and the repetitive sequences in the insert lead to considerable molecular instability of these constructs, highlighting the need for optimized protocols (Feldman and Lossin, 2014; Ohmori et al., 2006). In this context, we report here a novel and optimized protocol using the NEB Stable bacteria (New England Biolabs) as an efficient host for plasmids containing the wild-type and mutant forms of the *SCN1A* gene. In addition, we describe in detail how to generate and confirm mutations using site-directed mutagenesis and next-generation sequencing technology.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Plasmids and bacterial strains

We used the pCMV-SCN1A plasmid, which is derived from the vector pCMV-script. The vector is linked to a 6230 bp fragment that includes the coding sequence and the 3' untranslated region (UTR) of the Nav1.1 channel (*SCN1A* gene); the size of the recombinant plasmid is 10451 bp (Lossin et al., 2002). Plasmid cloning was carried out using two competent *E. coli* strains: the NEB Stable competent cells (NSCC, New England Biolabs) and Stbl2 cells (Thermo Fisher Scientific). To better characterize the pCMV-SCN1A plasmid, we performed an *in-silico* analysis to identify the repetitive units and the regions more susceptible to recombination, using the REPFIND programs (<https://zlab.bu.edu/mfrith/cgi-bin/repfind.cgi>).

2.2. Transformation with wild type plasmids

We kept the native plasmid pCMV-SCN1A on ice for 10 minutes in a sterile 1.5-ml microtube. We then immediately added 25 μ l of the NSCC, avoiding bubbles, and left it on ice for 30 minutes. Subsequently, we moved the microtube containing the plasmid and cells to a water bath at 42°C for 30 seconds and immediately transferred the microtube to the ice for 2 minutes. After that, we added 400 μ l of NEB® 10-beta/Stable Outgrowth Medium and placed the microtube in the incubator at 30°C for 90 minutes at 225 rpm. This is the bacterial replication stage; therefore, it is important to control the incubation temperature, which should be between 27 and 30°C, to optimize the growth of the colonies. Subsequently, we added 113 μ l of the inoculum to four Petri dishes (90 \times 15 mm), containing solid Luria Bertani (LB) medium with 100 μ l of kanamycin (50 mg/ml). We spread this inoculum avoiding the borders of the LB plate and let the plate dry for 3 minutes, turned it upside down, and transferred it to the incubator at 30°C for 2–3 days.

2.3. Subcloning

After 48 hours, cell colonies were identified, isolated by using the tip of a sterile toothpick, and grown in sterile 1.5-ml microtubes containing 1200 μ l of liquid LB medium with 12 μ l of kanamycin (50 mg/ml). Microtube caps were perforated to promote gas exchange. All steps were performed in a sterile laminar flow cabinet. The microtubes were transferred to an oven at 30°C and 225 rpm for two days when cell cultures became turbid.

2.4. Extraction and purification

We used the commercially available Gen Elute Plasmid Miniprep kit (Sigma) according to the following protocol. Overnight bacterial cultures (600 μ l) were centrifuged at 12000 *g* for 1 minute at 27°C. The remaining 600 μ l of inoculum was stored at -20°C. Cell pellets were re-suspended in 200 μ l of resuspension buffer. The samples were vortexed until the disintegration of the cell pellet. Next, cells were lysed using 200 μ l of Lysis Buffer, followed by gentle shaking

by hand and incubation at room temperature for 5 minutes. At this point, we observed that the mixture had acquired increased viscosity. Next, samples were submitted to neutralization by adding 350 μ l of Neutralization/Binding Buffer and then mixing gently six times; we observed the formation of floating particles. Subsequently, samples were centrifuged at 12000 g for 10 minutes at 27°C, forming two phases: cell debris and the supernatant containing the plasmid DNA.

Purification columns were placed into 2-ml microtubes; 500 μ l of column preparation solution was added and centrifuged at 12000 g for 1 minute, and then the flow-through liquid was discarded. Next, the supernatant containing the plasmid was transferred to the purification column, centrifuged at 12000 g for 1 minute, and then the flow-through liquid was discarded. After that, we added 750 μ l of Wash Solution to the column with the plasmid trapped in the membrane, centrifuged it at 12000 g for 1 minute, and discarded the flow-through liquid. To remove the excess ethanol, we repeated this step, but with no washing solution added. Subsequently, we transferred the column to a new sterile 1.5-ml microtube, added 100 μ l of Elution Solution, and centrifuged for 12000 g for 1 minute. We discarded the column and recovered the purified plasmid. These plasmids were stored at -20°C for their subsequent characterization.

2.5. Quantification and analysis of the enzymatic profile

The purified plasmid was quantified by fluorometry and diluted to a concentration of 30 ng/ μ l in a final volume of 20 μ l. Plasmids were subjected to enzymatic digestion to evaluate the presence of structural rearrangements (enzymatic digestion profile). The enzyme used was FastDigest BamHI (Thermo Scientific), which digests the plasmid pCMV-SCN1A to generate a digestion profile of four DNA fragments (Positive Profile). We performed restriction digestion by using 17 μ l of the plasmid DNA (30 ng/ μ l), 2 μ l of FastDigest Green Buffer, and 1 μ l of the restriction enzyme BamHI. We incubated this reaction in a temperature cycler at 37°C for 5

minutes. The digested plasmids were then subjected to electrophoresis in a 0.8% agarose gel at 100 V and 300 mA for 35 minutes and then visualized in an ultraviolet radiation transilluminator. The colonies with the expected profiles were immediately subcloned with 200 μ l of the remaining inoculum seeded in 200 ml of LB medium containing 200 μ l of kanamycin (50 mg/ml). The purification and extraction of the plasmids were carried out with the GenElute™ HP Plasmid Midiprep kit (Sigma).

2.6. Next generation sequencing of plasmids

According to the manufacturer's standard protocol, libraries were prepared using NimbleGen Seqcap Ez library SR version 4.3 (Roche) and sequenced on a Miseq (Illumina) benchtop sequencer. We performed plasmid fragmentation by sonication using an M220 Focused-ultrasonicator (Covaris) following these parameters: power (50 W), temperature (20°C), cycle per base (200 cycles), duty factor (20%), and time (255 seconds). The KAPA kit (Roche) was adopted for constructing the plasmid library, which uses SeqCap EZ Choice custom capture panels. The library pool was quantified by real-time PCR (7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems) and diluted to 4 nM with the elution buffer containing Tween 20 (EBT). Next, we denatured the library pool using NaOH and added a hybridization buffer (HT1) to dilute the library to a final concentration of 12 pM. Samples were submitted to next generation sequencing by using a nanoFlowcell V2. All subsequent steps were performed in a Miseq benchtop sequencer, including cluster generation and 2×150 paired-end sequencings. Finally, we performed data analysis by using our in-house open-source pipeline.

2.7. Selection of variants and *in silico* prediction analysis

The variants selected for site-directed mutagenesis were previously reported in a cohort of Dravet syndrome (DS) patients (Gonsales et al., 2019). Three of them were found *de novo* and are considered implicated in the etiology of the disease. However, the other variant was also found in the unaffected mother and controls, suggesting non-pathogenicity.

To estimate the deleterious effects of the selected variants, we used 13 prediction algorithms: FATHMM^{*}, Condel[†], MutationTaster[‡], PANTHER[§], SNPs&GO^{**}, MutPred2^{††}, PROVEAN^{‡‡}, CADD^{§§}, PolyPhen2^{***}, MutationAssessor^{†††}, SIFT^{‡‡‡}, Align GVGD^{§§§}, and PhD-SNP^{****}.

2.8. Site-directed mutagenesis

Mutations were introduced into the plasmid using the GeneArt® Site-Directed Mutagenesis PLUS Kit (Thermo Fisher Scientific) and pCMV-SCN1A as the template plasmid. Mutagenesis primers were designed with the Primer X tool (<http://www.bioinformatics.org/primerx>). Four different mutation types were introduced in exon 26 of the *SCN1A* gene, resulting in four mutant plasmids. The synthesis of these mutations was performed in two steps: standardization of the primers to create the mutations and creation of the mutant plasmids.

2.8.1. Standardization of the primers

A mixture of the forward and reverse primers (both at 10 mM) was used to generate the mutations of interest. We used a polymerase with high processivity and fidelity (AccuPrime Pfx DNA Polymerase, Thermo Fisher Scientific) for PCR reactions. Each mutation was standardized individually. The PCR master mix was prepared according to the indications of the manufacturer

* <http://fathmm.biocompute.org.uk>

† <http://bg.upf.edu/condel/home>

‡ <http://www.mutationtaster.org>

§ <http://www.pantherdb.org/tools/csnpscoreForm.jsp>

** <http://snps.biofold.org/snps-and-go/snps-and-go.html>

†† <http://mutpred.mutdb.org>

‡‡ http://provean.jcvi.org/protein_batch_submit.php?species=human

§§ <http://cadd.gs.washington.edu>

*** <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/bgi.shtml>

††† <http://mutationassessor.org/r3>

‡‡‡ http://siftdna.org/www/SIFT_pid_subst_all_submit.html

§§§ http://agvgd.hci.utah.edu/agvgd_input.php

**** <http://snps.biofold.org/phd-snp/phd-snp.html>

of the mutagenesis kit (Thermo Fisher Scientific): We mixed 95 μl of master mix containing 82.2 μl of PCR-grade water, 10 μl of 10X AccuPrime™ Pfx Reaction mix, 2 μl of the native parental plasmid (20 ng/ μl), and 0.8 μl of AccuPrime™ Pfx (2.5 U/ μl). This master mix was aliquoted into five PCR tubes with 19 μl of the master mix per tube. Then, we added 1 μl of the primer mixture. The mutations were located in exon 26 of the *SCN1A* gene. They were generated by using the following PCR amplification protocol: initial denaturation of 94°C for 2 minutes; 18 cycles of denaturation at 94°C for 2 seconds, 57°C for 30 seconds, and 68°C for 5 minutes and 30 seconds; and a final extension of 68°C for 5 minutes.

PCR products (linear plasmid carrying the mutation) were subjected to 0.8% agarose gel electrophoresis at 100 V and 300 mA for 35 minutes. In addition, amplicons with the expected size (10.5 kb) were sequenced by NGS, following the same protocol described in section 2.6.

2.8.2. Creation of the mutant plasmids

After PCR confirmed the generated mutations, we performed site-directed mutagenesis, which has three steps.

1. *Methylation reaction*: We methylated the parental plasmid pCMV-SCN1A using a methylase. The methylation reaction was performed in a PCR microtube containing 4 μl of parental plasmid (20 ng/ μl) and 4 μl of DNA methylase (4 U/ μl), incubated in a PCR cycler at 37°C for 20 minutes. Then, the transformation of NSCC (according to the protocol described in section 2.2) was performed by using 4 μl of the methylation reaction containing the parental plasmid. In addition, a non-methylated parental plasmid was used as a positive transformation control.

2. *Parental plasmid amplification reaction*: For each mutation of interest, the methylated parental plasmid was amplified by PCR, whose standardized conditions are described in section 2.8.1. Electrophoresis in a 0.8% agarose gel was carried out to verify whether amplicons were 10.5 kb in size. PCR products with the appropriate size were stored at -20°C.

3. *Recombination reaction*: PCR products of 10.5 kb are clones of the parental plasmid; however, they are linear and need to be recirculated with a recombinant enzyme. The recombination reaction was carried out using 8 μ l of molecular-grade water, 2 μ l of the PCR product, and 10 μ l of the enzyme mix (recombinase with its respective buffer). Reactions were incubated at room temperature for 15 minutes and then stopped by adding 1 μ l of 0.5 M EDTA and placing the tubes on ice. We carried out the recombination reaction to a group of PCR products, and these recirculated products were used immediately in the transformation of both NSCC and Stbl2 cells to evaluate the metabolic capacity of the strains on the plasmid. Another group of PCR products was not subjected to recombination; we used linear PCR products. They were used to transform both bacterial strains to determine which strain has the best ability to recirculate and replicate plasmid (metabolic capacity of the strains).

4. *Next generation sequencing of PCR products*: The PCR products were sequenced to identify whether the mutation of interest is present after mutagenesis. Libraries were prepared by using NimbleGen Seqcap Ez version 4.3 SR library (Roche) according to the protocol described above and sequenced on a Miseq benchtop sequencer (Illumina).

2.9. Transformation of mutant plasmids

The NSCC and Stbl2 *E. coli* strains were transformed with the recirculated mutant plasmids. Subsequently, the extraction, purification, plasmid restriction enzyme profile analysis, and next generation sequencing were performed following the abovementioned protocols. In addition, NSCC cultures carrying mutant plasmids were submitted to purification with the GenElute™ HP Plasmid Midiprep kit (Sigma). Recovered plasmids were stored at -20°C.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Plasmids

The native plasmid pCMV-SCN1A was designed to express the alpha subunit of the Nav1.1 channel in eukaryotic cells. The expression is controlled by the human cytomegalovirus (CMV) promoter, which allows constitutive expression of genes cloned into the pCMV-script vector. *In silico* analysis (Figure 1) identified frequent repetitive units composed mainly of guanines (G) and cytosines (C) in the sequence of the native plasmid pCMV-SCN1A. Therefore, we found the presence of three clusters of CGC triplets between nucleotides 7072 and 10451 ($P = 3.33067e-16$). These correspond to the promoter region for the *SCN1A* gene, the resistance gene for kanamycin (*kanR*), and the plasmid origin of replication. The presence of these repetitive regions in the promoter region might lead to mutations that could disrupt the expression of the Nav1.1 protein in the cell membrane. In addition, mutations in the origin of replication or the *kanR* gene could inactivate cell replication, resulting in the absence of bacterial colonies.

3.2. Transformation of native plasmids

We observed that the number of colonies formed 72 hours after transformation was slightly higher for NSCC than Stb12 *E. coli* strains (data not shown). We obtained two types of colonies for both *E. coli* strains: yellow (mature) and white (growing). In both cases, they were stored at 4°C (Figure 2A). The colonies were classified as follows: i) the **subcloning colonies** are yellow, of a large size, grow faster in the first 48 hours, and are isolated from other colonies; ii) the **recombinant colonies** are yellow and grow in clusters, which could lead to plasmid recombination; therefore, they are not candidates for subcloning; iii) **satellite colonies** are those closest to each other, which can be false positives for the presence of the plasmid because they might grow where enzymes secreted by other bacteria have degraded the antibiotic. We rarely observed satellite colonies, but this could explain why some colonies were subcloned and did not grow in liquid LB medium with kanamycin. However, the native plasmid pCMV-SCN1A could

also be expelled by growing colonies. The optimal time interval of growth for subcloned colonies varied from 48 to 96 hours. We observed that growth efficiency was lower, and the probability of contamination with other microorganisms was higher for more extended incubation periods.

We also observed that growing bacterial colonies at 27–30°C slowed down cell metabolism and probably helped maintain the stability of the plasmid in the replication stage. However, we observed the opposite effect at temperatures greater than 30°C (Figure 2A). The subcloning phase of the mini cultures was 48 hours, showing turbidity in the LB medium. Isolated and purified plasmids had a concentration of 40 ng/μl in a final volume of 100 μl.

Analysis of enzymatic digestion assays of mini cultures revealed the expected profile: 5.4 kb, 2.5 kb, 1.9 kb, and 620 bp DNA fragments (Figure 2B). However, recombinant, and non-recombinant plasmids in the same sample were identified in some cell cultures, characterizing mosaicism of the plasmid. This mosaicism was more frequent in cultures from Stb2 cells, probably generated by the instability of the plasmid due to the repetitive regions and resulting in deletions. We also observed that the instability of the plasmid was directly proportional to the volume of the cell culture: at volumes less than 50 ml, this probability decreases. However, there is always greater instability with the Stb12 cells. One possible explanation is increased cell metabolism at larger volumes of LB culture, and stress leads to plasmid instability.

Subcloning of positive colonies of both bacterial strains was carried out in fractionated volumes of four tubes of 50 ml of LB medium for each colony. After purification of bacterial cultures of both strains, an average concentration of 30 ng/μl plasmid DNA was obtained in a final volume of 1 ml. In some bacterial cultures of both strains, we observed that despite the existence of cell mass, the plasmid DNA concentration was minimal (< 1 ng/μl) or null, this finding being more frequent in the cultures from the Stb12 cells. This probably occurs because, during cell replication, some bacteria expel the plasmids (large and unstable plasmids) to improve

their cellular metabolism and decrease energy expenditure. When the plasmids are expelled in the culture medium, they are degraded (Silva et al., 2012).

Generally, cell cultures are carried out at 37°C; however, at that temperature, even though colonies appeared after 24 hours of incubation, we observed that after enzymatic digestion and sequencing, many plasmids from both strains presented deletions. At 27–30°C, colony growth was observed for both strains after 72 hours. Although the number of colonies was smaller than at 37°C, after enzymatic digestion, fewer deletions were found in the plasmids from the NSCC. This is probably because lower temperatures slow cell growth, causing replication with fewer errors in the plasmid. In addition, there was a higher yield of plasmid DNA in the subcloning stage for both strains when it was purified as soon as possible. This phenomenon occurs because with time, there is an increased probability of the plasmid being expelled.

3.3. Site-directed mutagenesis

The annealing temperature for each pair of primers was between 55 and 57°C; however, better results were achieved at 57°C. We used high-fidelity polymerase, which does not generate mutations and does not add any additional nucleotides to the PCR product. The temperature and elongation time depend on the characteristics of the polymerase used. In this case, it was 1 kb per 30 seconds at a temperature of 68°C, so elongation of the 10451 bp parental plasmid would take 5 minutes and 30 seconds. Longer times can generate non-specificity and decrease the plasmid concentration. The PCR products are mutant linear plasmids (MLP) that differ from the parental plasmid because they are linear, not methylated, carry the mutation of interest, and can be converted into a circular shape by recombination. By contrast, a parental plasmid is circular, generated from cell cloning, and has the nucleotide sequence of interest without any mutation and with different degrees of coils (Figure 3A).

Methylation of the parental plasmid was demonstrated after transformation with both bacterial strains. In both cases, colony growth was not generated for these strains compared with controls (parental plasmid without methylation). The lack of growth of the bacterial strains could be because the promoter regions of the parental plasmid pCMV-SCN1A are silenced by DNA methylation.

The main promoter regions in the plasmid are CMV for the *SCN1A* gene and the promoter region for the *kanR* gene. The former contains the GATC and CCTGG sequences, which are susceptible to methylation; when methylated, they cause the silencing of the *SCN1A* gene that is, the absence of the native Nav1.1 protein. Meanwhile, the methylation of the promoter region of the *kanR* gene results in the absence of resistance to kanamycin (carrier of the parental plasmid), inhibiting cell growth (Figure 3B and C). Therefore, it is crucial to prevent the expression of the parental plasmid, ensuring only the expression of the mutant Nav1.1 protein because the simultaneous expression of the native and mutant Nav1.1 protein would generate erroneous electrophysiological recordings.

When testing the protocol presented here, we generated four types of MLP: pCMV-SCN1A_5434, pCMV-SCN1A_5329, pCMV-SCN1A_5864, and pCMV-SCN1A_5177. Mutation 5434 is a missense variant (T>C), which generates a change from tryptophan to arginine at amino acid 1812 of the polypeptide. According to the *in-silico* prediction analysis, this variant is predicted as deleterious by all algorithms; thus, it would likely lead to severe functional changes in the protein. Mutation 5329 is a deletion (delG) that results in a frameshift change, generating a premature stop codon potentially leading to a truncated protein with loss of the C-terminal portion, which is essential for anchoring the protein to the membrane and for regulation. Mutation 5864 is a missense variant (T>C), which generates a change from isoleucine to threonine at amino acid 1955 of the polypeptide. According to the prediction algorithms, the amino acid change is considered benign and predicted not to affect the protein function. Finally, mutation 5177 is a

nonsense variant (G>A) that generates a premature stop codon in the pore-forming region, leading to a truncated protein and loss of the C-terminal segment.

Although MLP differs by a single nucleotide, the electrophoretic pattern showed that all four plasmids were the same size. The electrophoretic migration pattern of MLP and the parental plasmid showed differences in migration. This may be because the circular parental plasmid presents different degrees of coiling (Figure 3A).

Some MLP were subjected to *in vitro* recombination reactions that made it possible to generate circular mutant plasmids. These mutant plasmids were used to transform NSCC and Stb12 cells with the standardized temperature, volume, and purification time parameters described in this paper. As a result, more colonies were observed in the NSCC than in the Stb12 cells. Furthermore, when transforming the NSCC and Stb12 cells with MLP without recombination, we observed that the NSCC showed greater growth and more colonies compared with the Stb12 cells. This observation led us to hypothesize that the NSCC have a better metabolic ability to induce the incoming MLP to acquire the circular format, thus making it easier for subsequent cloning and leading to an increased number and better growth of the NSCC colonies.

3.4. Sequencing plasmids

The sequencing of native plasmids after subcloning with the NSCC revealed that three plasmids had the correct sequence, and 21 plasmids presented mutations (Figure 4). Meanwhile, in the subcloning with the Stb12 cells, we needed to sequence over 70 plasmids to obtain at least one with the correct sequence. Thus, despite the limitations in plasmid replication in NSCC, our data show that they are more efficient than Stb12 cells to subclone this type of native plasmid.

Regarding MLP, 24 plasmids had the expected sequences, and no unexpected variations were detected. This is because MLP were obtained by PCR and were not cloned in any cell line; thus, the plasmids were not exposed to the metabolic load of the cell during the cloning stage,

decreasing the probability of mutation. It is important to indicate that sequencing an MLP before subcloning it into a cell serves as a checkpoint, indicating whether our site-directed mutagenesis experiment resulted in the expected mutation. Indeed, if we only sequenced after plasmid cloning, we could have the following possibilities: 1) find mutations that affect the expression of the gene and the mutation of interest; 2) find only mutations that affect the expression of the gene and the absence of the mutation of interest; 3), find the mutation of interest and mutations that do not affect the expression of the gene of interest because they are located in other plasmid regions that do not involve the gene; and 4) find only the mutation of interest. In cases 1 and 2, the plasmids could not be used for an expression study. In addition, we could not know whether these mutations had come from the mutagenesis reaction or had originated in the cell cloning stage. In cases 3 and 4, the plasmids could be used for expression studies and characterization by cell electrophysiology. Thus, sequencing before cloning allowed us to readily optimize our experiments, saving time and reagents.

After cloning the MLP plasmids (without *in vitro* recombination) in the Stbl2 cells, little colony growth was achieved, and the plasmids obtained presented deletions. This is probably due to the low efficiency of Stbl2 cells in recirculating MLP, which results in the loss of plasmid fragments or fragments that could be integrated into the bacterial genome. Meanwhile, the mutant plasmids that came from subcloning with NSCC revealed efficient cell growth and only single nucleotide mutations; therefore, the probability of obtaining a desired mutant plasmid was higher. Thus, although the number of colonies was not determined, our results indicate that the metabolic capacity of the NSCC strain is superior because it can better recirculate the plasmid and it is less likely to generate plasmids with unwanted deletions.

The results of sequencing MLP with *in vitro* recombination and cloning in NSCC revealed that the mutant plasmids had single-nucleotide mutations. Indeed, we observed that there is a probability of 1/960 to obtain the plasmid with the desired sequence (one of every 960 transformed NSCC colonies would contain the desired plasmid). Considering Stbl2 cells, this

probability is much lower: 1/2880 (one of every 2880 transformed Stbl2 colonies would contain the desired plasmid). Moreover, some of the plasmids obtained from subcloning with Stbl2 cells had deletions. The deletions generated, in most cases, affected a large region of the *SCN1A* gene. We have identified that bacterial strains tend to reduce the size of plasmids in order to save metabolic energy, which is why many deletions of the plasmid are observed in most colonies.

The digestion profiles of BamHI on the plasmid pCMV-SCN1A make it possible to determine which cell colonies are potential candidates to be sequenced. The probability of obtaining a colony with a positive BamHI digestion profile is 1/40 for NSCC colonies and 1/120 for Stbl2 colonies (Figure 5). Therefore, in the case of NSCC, of 24 colonies with a positive BamHI profile, only one presented the plasmid with the expected sequence. In the case of Stbl2 colonies, we found that of 80 colonies with a positive BamHI profile, only one of these colonies presented the plasmid with the expected sequence.

4. CONCLUSIONS

When cloning highly unstable plasmids encoding sodium channel subunits, point mutations and deletions are frequently generated in the cell subcloning stage. This phenomenon could be due to the high metabolic load of the cells leading to unstable plasmids recombining, generating unexpected variation. Therefore, to clone unstable plasmids, the following factors are critical: 1) use a bacterial strain that can support a high metabolic load; 2) perform cultures in small volumes of LB medium; 3) maintain the temperature between 27 and 30°C, thus promoting a slow growth of bacterial cultures; 4) perform the plasmid purification within 24 hours after culture; and 5) in the case of linear plasmids obtained by site-directed mutagenesis, *in vitro* recombination should be performed before the transformation. Our results have demonstrated that

the plasmid pCMV-SCN1A presents regions of high instability, leading to the generation of unexpected deletions or point mutations. Furthermore, the use of NSCC combined with the protocol described herein significantly improved the replication of the native pCMV-SCN1A and the mutant plasmids created for subsequent functional studies.

Funding

This work was supported by a grant from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grant number #2013/07559-3), SP, Brazil. S.L.-S., A.M.do C., A.B.G. and D.C.da R. were supported by fellowships from FAPESP (grants #2016/03896-3, 2019/25948-3, 2019/00213-0 and 2019/00048-0). I.L.-C. is supported by a grant from Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Brazil (311923/2019-4), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil, (grant #001).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Al-Allaf, F.A., Tolmachov, O.E., Zambetti, L.P., Tchetchelnitski, V., Mehmet, H., 2013. Remarkable stability of an instability-prone lentiviral vector plasmid in *Escherichia coli* Stbl3. *3 Biotech* 3, 61–70. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0070-8>
- Boucher, H.W., Talbot, G.H., Benjamin, D.K., Bradley, J., Guidos, R.J., Jones, R.N., Murray, B.E., Bonomo, R.A., Gilbert, D., Infectious Diseases Society of America, 2013. 10 x '20 Progress--development of new drugs active against gram-negative bacilli: an update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 56, 1685–1694. <https://doi.org/10.1093/cid/cit152>
- Corchero, J.L., Villaverde, A., 1998. Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins. *Biotechnol. Bioeng.* 58, 625–632. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980620\)58:6<625::AID-BIT8>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980620)58:6<625::AID-BIT8>3.0.CO;2-K)
- Etchuuya, R., Ito, M., Kitano, S., Shigi, F., Sobue, R., Maeda, S., 2011. Cell-to-cell transformation in *Escherichia coli*: a novel type of natural transformation involving cell-derived DNA and a putative promoting pheromone. *PloS One* 6, e16355. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016355>
- Feldman, D.H., Lossin, C., 2014. The Nav channel bench series: Plasmid preparation. *MethodsX* 1, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.01.002>
- Gonsales, M.C., Montenegro, M.A., Preto, P., Guerreiro, M.M., Coan, A.C., Quast, M.P., Carvalho, B.S., Lopes-Cendes, I., 2019. Multimodal Analysis of SCN1A Missense Variants Improves Interpretation of Clinically Relevant Variants in Dravet Syndrome. *Front. Neurol.* 0. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00289>
- Lossin, C., Wang, D.W., Rhodes, T.H., Vanoye, C.G., George, A.L., 2002. Molecular basis of an inherited epilepsy. *Neuron* 34, 877–884.
- Meng, H., Xu, H.-Q., Yu, L., Lin, G.-W., He, N., Su, T., Shi, Y.-W., Li, B., Wang, J., Liu, X.-R., Tang, B., Long, Y.-S., Yi, Y.-H., Liao, W.-P., 2015. The SCN1A Mutation Database: Updating Information and Analysis of the Relationships among Genotype, Functional Alteration, and Phenotype. *Hum. Mutat.* 36, 573–580. <https://doi.org/10.1002/humu.22782>
- Million-Weaver, S., Camps, M., 2014. Mechanisms of plasmid segregation: Have multicopy plasmids been overlooked? *Plasmid* 75, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2014.07.002>

- Ohmori, I., Kahlig, K.M., Rhodes, T.H., Wang, D.W., George, A.L., 2006. Nonfunctional SCN1A Is Common in Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy. *Epilepsia* 47, 1636–1642. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00643.x>
- Ridenhour, B.J., Top, E.M., 2016. Plasmid Driven Evolution of Bacteria, in: Kliman, R.M. (Ed.), *Encyclopedia of Evolutionary Biology*. Academic Press, Oxford, pp. 301–306. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800049-6.00237-7>
- Sendfeld, F., Selga, E., Scornik, F.S., Pérez, G.J., Mills, N.L., Brugada, R., 2019. Experimental Models of Brugada syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20092123>
- Silva, F., Queiroz, J.A., Domingues, F.C., 2012. Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*. *Biotechnol. Adv.* 30, 691–708. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.12.005>
- Veening, J.-W., Blokesch, M., 2017. Interbacterial predation as a strategy for DNA acquisition in naturally competent bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 621–629. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.66>
- Wallace, R.H., Scheffer, I.E., Barnett, S., Richards, M., Dibbens, L., Desai, R.R., Lerman-Sagie, T., Lev, D., Mazarib, A., Brand, N., Ben-Zeev, B., Goikhman, I., Singh, R., Kremmidiotis, G., Gardner, A., Sutherland, G.R., George, A.L., Mulley, J.C., Berkovic, S.F., 2001. Neuronal Sodium-Channel $\alpha 1$ -Subunit Mutations in Generalized Epilepsy with Febrile Seizures Plus. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 859–865. <https://doi.org/10.1086/319516>
- Yoshida, N., Sato, M., 2009. Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 791–798. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2042-4>

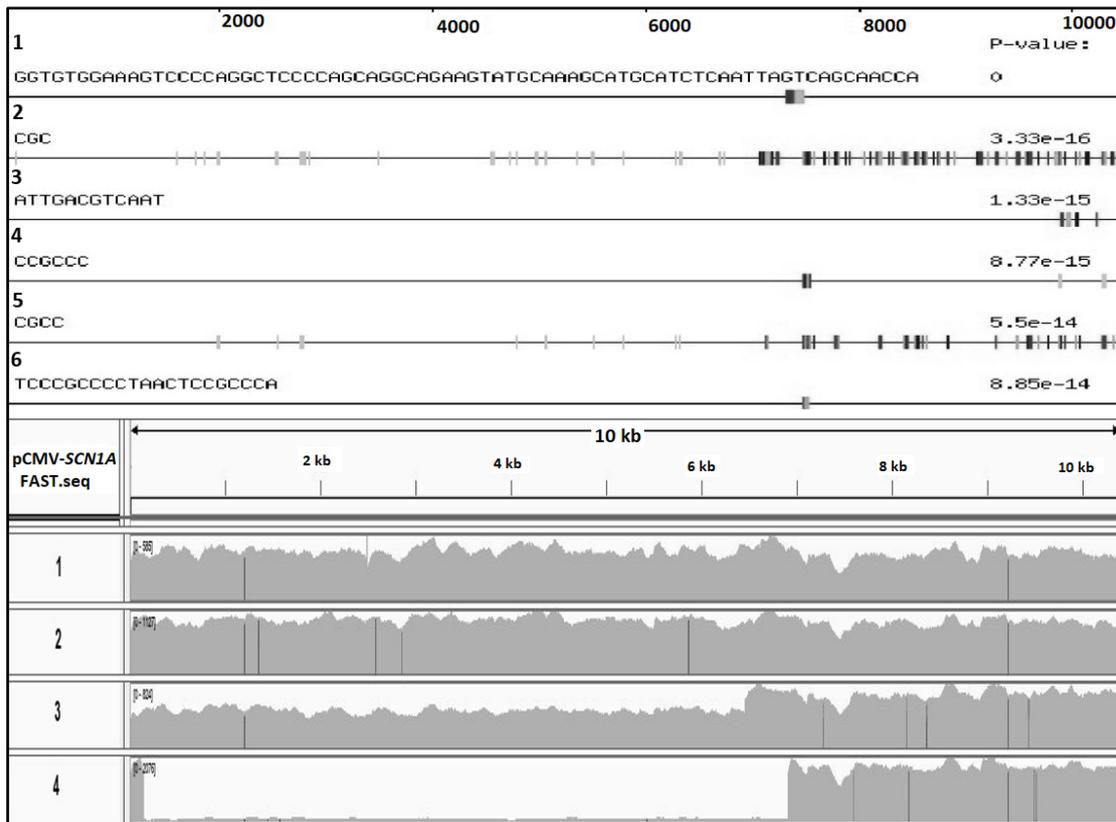


Figure 1. Analysis using the REPFIND program showing the distribution of the repetitive regions in the native plasmid pCMV-SCN1A. Black and gray vertical bars show the regions with repetitive units.

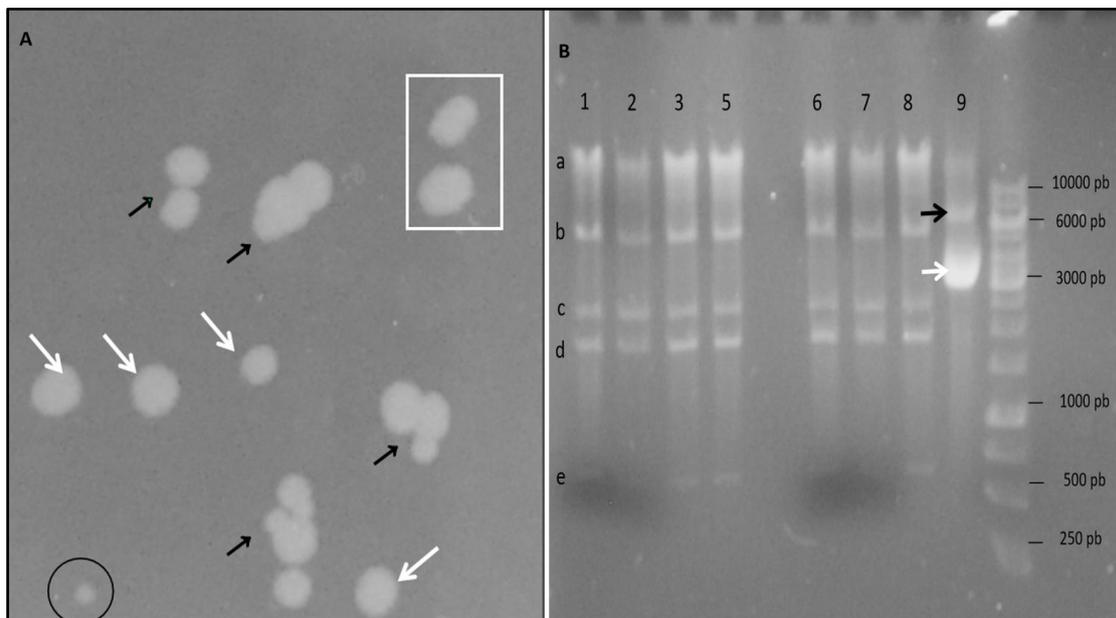


Figure 2. Image of NEB Stable competent cell (NSCC) colonies transformed and enzymatic digestion profile A) An image of NEB Stable competent cell (NSCC) colonies transformed with the native plasmid pCMV-SCN1A after being grown in solid Luria Bertani (LB) medium with kanamycin for 72 hours. White arrows show colonies that are candidates for subcloning. Black arrows show recombinant colonies. The rectangle shows satellite colonies. The circle contains a

small colony. B) Enzymatic digestion profile with the enzyme BamHI. Samples 1–9 show plasmids with the expected digestion profile with four fragments: 5.4 kb (b), 2.5 kb (c), 1.9 kb (d), and 620 bp (e). The largest band of 10450 bp (a) corresponds to the native plasmid that the enzyme could not digest. Sample 9 corresponds to a plasmid with structural alterations whose enzymatic digestion shows fragments of 3 and 6 kb (white and black arrows, respectively). The DNA ladder ranges from 250 bp to 10 kb.

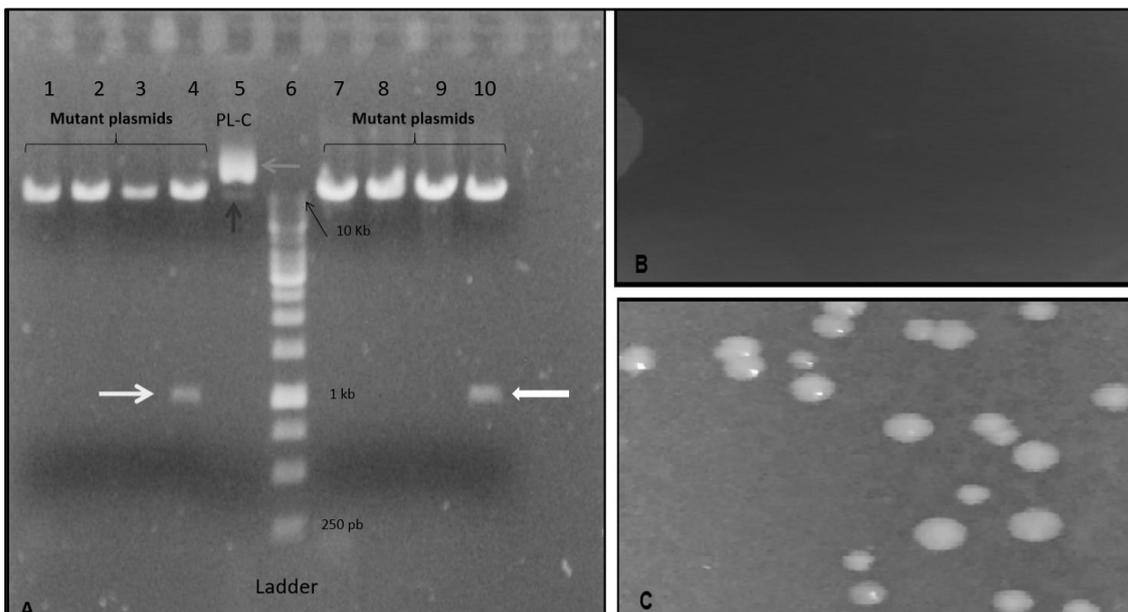


Figure 3. Mutant linear plasmids vs the parental plasmid and NEB Stable competent cells (NSCC) subjected to transformation with methylated and unmethylated parental plasmids. A) Mutant linear plasmids (MLP; 1–4 and 7–10), each of which carries a mutation inserted by site-directed mutagenesis. The parental plasmid (5: PL-C) has two to three conformations because it is circular and adopts different degrees of curl (black and gray arrows). Samples 4 and 10 are MLP that generated a non-specific product (white arrow). The DNA ladder ranges from 250 bp to 10 kb. B) and C) Images of NEB Stable competent cells (NSCC) subjected to transformation with methylated and unmethylated parental plasmids, cultured in solid Luria Bertani (LB) medium with kanamycin for 72 hours.

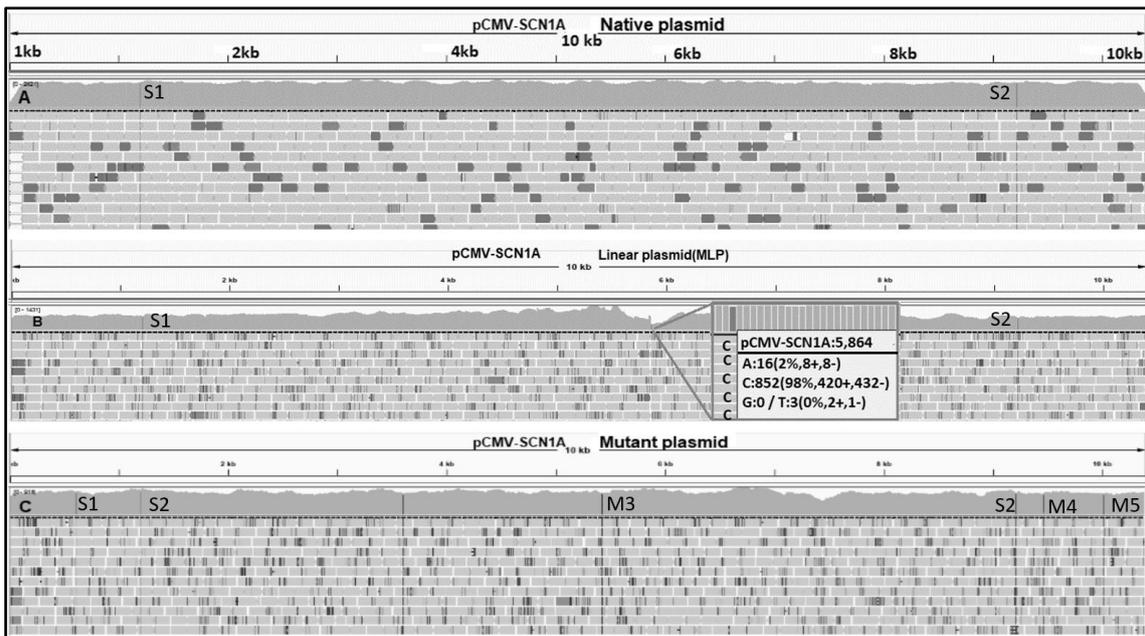


Figure 4. Sequence analysis of the cloned native plasmids. A) plasmid with two silent mutations (S1 and S2) and a plasmid with the correct sequence. B) Sequencing of site-directed mutagenesis linear plasmids. The square indicates that the 5864 mutation is thymine (3% of reads) for cytosine (98% of reads) substitution. C) A plasmid with point mutations (M): M1-3 are located in the SCN1A gene (1-6230 bp). M4-5 located in the vector region (6,231-1045 bp). All these mutations were generated in the subcloning stage. The silent mutations do not affect the expression of the Nav1.1 protein subunit. In other cases, the mutations may have a functional effect if they alter the subunit or some region of interest of the vector.

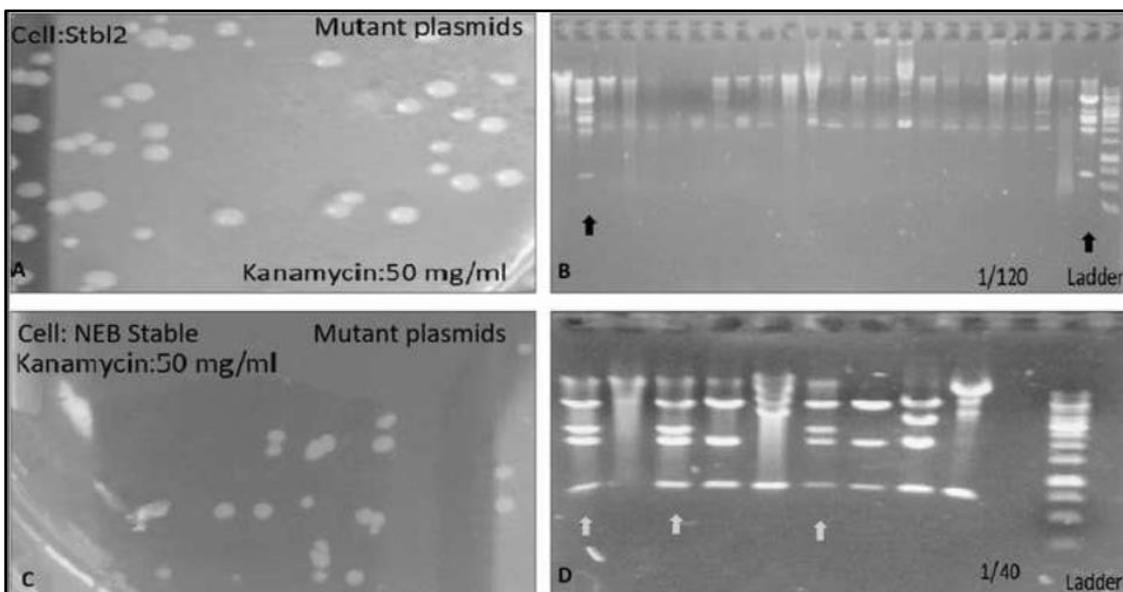


Figure 5. Efficiency of stb12 and Neb Stable cells in the production of plasmids pCMV-SCN1A. A and C) Post-transformation Stb12 and NEB Stable cell (NSCC) colonies carrying the same mutant plasmid and growing in solid Luria Bertani (LB) medium. B) Plasmids isolated from Stb12 cells show different digestion profiles, and only two show the four fragments of interest with an additional 6 kb fragment (black arrows). D) Several of the plasmids isolated from NSCC show the expected digestion profile (gray arrows). In addition, other digestion profiles were identified. The DNA ladder ranges from 250 bp to 10 kb. The samples were run on a 0.8% agarose gel.

An optimized protocol for the creation of constructs expressing sodium channel subunits to be used in functional studies of genetic epilepsies

Saúl Lindo-Samanamud, Amanda M. do Canto, Fabio R. Torres, Marina C. Gonsales,
Alexandre B. Godoi, Douglas C. da Rosa, André S. Vieira, Iscia Lopes-Cendes

Step-by-step protocol

Materials

- Plasmid DNA containing the DNA sequence of the *SCN1A* gene, with adequate concentration (10 ng/ μ l) and quality (unfragmented DNA).
- Competent bacterial cells with the ability to clone unstable plasmids, which are efficient in transforming methylated or unmethylated DNA without type 1 endonuclease activity (endA1) and recombinase activity (RecA1). Example: NEB[®] Stable (New England[®]).
- Petri dishes with LB agar medium
- Kanamycin (50mg/ml)
- SOC medium (Thermo Fisher[®])
- Incubator at a temperature of 27-30°C
- Laminar flow cabinet
- Corning[®] culture tubes containing LB broth
- Electrophoresis cuvette
- Power supply
- Temperature cycler
- Sowing loop
- Water bath
- Miseq Platform (Illumina[®])

Cloning of the plasmid pCMV-SCN1A - wild type

Step 1: Transformation

All the following steps should be carried out in a laminar flow cabinet.

- 1.-Cool the microtube that will be used for the transformation in dry ice/ethanol and when it is cold, transfer the microtube to a container with ice.
- 2.- Take a 50 μ l aliquot of bacteria kept at -80°C and place it in the dry ice/ethanol bath inside the laminar flow cabinet.
- 3.-Place the aliquot of bacteria in the pre-cooled microtube.
- 4.-Add 5-10 ng of the pCMV-SCN1A plasmid DNA to the pre-chilled microtube. If the plasmid comes from a site-directed mutagenesis reaction (includes the reaction that eliminates the parent plasmid), use between 1 to 2 μ l of the reaction.
- 5.-Gently shake the content of the tube, making some turns with a disposable pipette tip.
- 6.-Place the microtube on ice for 30 minutes.
- 7.-Place the microtube in a 42°C water bath for EXACTLY 30 seconds. The heat shock is a critical step for an optimal transformation reaction.
- 8.-Quickly place the microtube with the mixture on ice for 2 minutes.
- 9.-Add 100 μ l of SOC culture medium (at 30°C) to each tube. Incubate at 30°C with agitation at 220 rpm for 1 hour.

Step 2: Mini Bacterial Culture

All the following steps are performed in a laminar flow cabinet.

- 1.-Prepare 5 LB-AGAR plates, 4 plates will be used for the cultures, and one will be used as contamination control.
- 2.-Add 50 μ l of kanamycin to 100 ml of LB-Agar medium (kept at 50°C), mix the antibiotic, and distribute 20 ml of the mixture with a serological pipette on each plate (be careful not to generate bubbles).
- 3.-Wait for the LB agar to solidify, do not cover the Petri dishes, and allow them to cool inside the laminar flow cabinet.
- 4.-The microtube with the transformed bacteria has approximately 150 μ l, and this volume must be distributed in 4 Petri dishes, placing 35 μ l of transformed bacteria on each plate.
- 5.-Then spread the mixture using a sterile inoculation loop.
- 6.-Transformants will emerge as colonies after 48 hours of incubation at $27-30^{\circ}\text{C}$.

7.-After 72 hours, it is recommended to take the colonies with a sterile pipette tip and place them in Corning® culture tubes. The colonies to be extracted are small and must be distant from the large colonies and away from the edges of the plate.

8.-Take 100 ml of LB broth, add 50 µl of kanamycin, and mix well, distribute 4 ml of LB broth in the Corning® culture tubes from the previous step. It is recommended to prepare about 40 Corning® culture tubes.

10.-Take the Corning culture tubes to an incubator at a temperature of 27-30°C for 24 hours with agitation at 220 rpm.

Step3: Stock mini cultures in glycerol

All the following steps are performed in a laminar flow cabinet.

1.-Prepare 50% glycerol: 10ml of molecular water + 10ml of concentrated glycerol, homogenize and autoclave for 15 minutes at 121°C.

Store 800µl of the mini culture and 800µl of 50% glycerol in a sterile 2ml cryo vial, homogenize, and store at -80°C. After sequencing, only bacteria that have plasmids with the correct sequence should be left as stock.

Step 4: Mini Purifications

1.-Take 2ml of the mini culture and perform the extraction and purification of the plasmid with a mini purification kit.

The expected plasmid DNA mass yield should be >2000 ng.

2.-Store 1 ml of the mini culture at 4°C to be used as inoculum in the subcloning step.

Step 5: Enzyme Profile-1

This step is important because it allows for identifying which replicated plasmids did not present recombination.

It is recommended to use enzymes that allow the cDNA of the *SCN1A* gene to be cut at different points (>4). We use the enzyme FastDigest BamHI (Thermo Fisher®); this generates 5 fragments, the digestion time is only 5 minutes at 37°C, and the reaction can be carried out in a temperature cyclor or incubator.

1.-Use PCR microtubes and place between 400 – 600 ng of the plasmid to be digested. Digestion conditions depend on the digestion enzyme (follow the manufacturer's instructions).

2.-In our case; the digestion reaction consisted of 15 µl of molecular grade water, 2 µl of enzyme buffer, 2 µl of plasmid (with the indicated DNA mass), and 1 µl of the enzyme.

3.-After enzymatic digestion, it is recommended to use the 20 µl digestion reaction in 0.8% agarose gel electrophoresis at 90 volts, 300 mA, and 130 minutes.

4.-Only plasmids that present the expected enzyme profile will be used in the subcloning stage (Maxi cultures).

Step 6: Maxi cultures

The subcloning phase aims to obtain a larger DNA mass. Transfections require DNA per transfection >1500 ng.

1.-Take 1 ml of the mini culture (with correct enzyme profile) and distribute 200 μ l in 5 sterile flasks containing 50 ml of LB broth with 25 μ l of kanamycin.

2.-Place the maxi cultures in the incubator for 48 hours at 27-30°C at 250 rpm.

Step 7: Maxi Purifications

Due to the presented characteristics of the plasmid, it must be purified in LOW COPY format.

1.-Combine the aliquots from step 6 (maxi cultures) in a single volume to extract and purify the plasmid.

2.-Use a commercial kit that allows purification in a maxi format and removal of endotoxins. These endotoxins are generated in large extraction volumes and can interfere with the efficiency of plasmid transfection.

Contamination by bacterial genomic DNA must be avoided, so the maxi cultures must be purified in the shortest time possible, and the bacterial genome must not be fragmented. In addition, bacterial genomic DNA contamination can influence the stoichiometry of the transfection.

3.- After purification, take about 500 ng of plasmid DNA and digest with ECORI, enhancing 0.8% agarose gel electrophoresis. The presence of multiband indicates bacterial genomic DNA contamination.

4.-Quantify the plasmid by Nanodrop (Thermo Fisher®). Values of 260/280 between 1.8-2 and 260/230>1.8 should be obtained since contaminants influence the transfection.

The quantification must be as precise as possible since this concentration of DNA will be used to produce the stoichiometry of the sodium channel subunits in the cell membrane.

Step 8: Enzyme Profile-2

Perform the same as step number 5.

Enzymatic digestion is performed again to ensure that the mini cultures that gave a correct enzymatic profile have not generated recombinants when converted to the maxi culture format.

Only the plasmids from the maxi cultures and the correct enzymatic profile should be sequenced.

Step 9: Sequencing

Sanger sequencing can be used, which targets only the cDNA of the *SCN1A* gene.

We use next-generation sequencing on an Illumina® platform due to its speed and the fact that it allows for the analysis of the complete plasmid (alteration outside the cDNA region can also influence subsequent procedures).

Creation of the plasmid pCMV-SCN1A- mutant

Step 1: Site-Directed Mutagenesis (SDM)

1.-Using the plasmid pCMV-SCN1A-WT (parental plasmid) as a template. We change its sequence using specific primers in a PCR reaction.

Using a mutagenesis kit that allows the parent plasmid to be methylated, recombines the PCR products, and uses a high-fidelity polymerase is recommended. We used the GeneArt® Site-Directed Mutagenesis kit (Thermo Fisher®).

2.- We use the steps recommended by the manufacturer and run the SDM reactions in duplicate.

Step 2: Electrophoresis

After SDM, we performed electrophoresis to verify if the PCR reaction was successful.

1.-Carry out electrophoresis of the PCR products in a 0.8% agarose gel at 90 Volts for 45 minutes. It is expected to obtain bands of 1045 bp.

Step3: Sequencing

1.-We pool the volumes of duplicate reactions (increases the mass of the PCR product) and proceed to sequence to check if the desired mutation is present.

Generally, these mutagenesis kits are very efficient (>90%); however, we recommend checking it by sequencing.

Step 4: Recombination

We recombined the plasmids with the recombinase provided by the GeneArt® Site-Directed Mutagenesis kit.

1.-We use the manufacturer's instructions.

This stage aims to recirculate the PCR products (mutant plasmid), increasing the success rate of the transformation and preventing random recombination.

Step 5: Cloning of the mutant plasmid

We perform the same steps 1 through 8 of the wild-type plasmids cloning procedures.

RESULTADOS

CAPITULO II.

BIOPHYSICAL CHARACTERISTICS OF GENETIC VARIANTS FOUND
IN THE *SCN1A* GENE IN PATIENTS WITH DRAVET SYNDROME

Biophysical characteristics of genetic variants found in the *SCN1A* gene in patients with Dravet Syndrome

Saúl Lindo-Samanamud^{1,2}, Helena T. Moraes^{1,2}, Amanda M. do Canto^{1,2}, Fabio R. Torres^{1,2},
Marina C. Gonsales^{1,2}, Alexandre B. Godoi^{1,2}, André S. Vieira^{2,3}, Iscia Lopes-Cendes^{1,2}

¹ Department of Translational Medicine, School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil.

² The Brazilian Institute of Neuroscience and Neurotechnology (BRAINN), Campinas, Brazil.

³ Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil.

Address correspondence to: Iscia Lopes-Cendes, M.D., Ph.D.
Department of Translational Medicine
School of Medical Sciences
University of Campinas (UNICAMP)
Vital Brasil, 80
Campinas, SP, Brazil 13083-888
E-mail: icendes@unicamp.br

ABSTRACT

Most patients with Dravet syndrome (DS), a developmental and epileptic encephalopathy, present severe epilepsy and different degrees of developmental delay. Also, more than 80% of these patients have 'de novo' mutations in the *SCN1A* gene, leading to abnormal function of the encoded sodium channel. However, the remarkable variable severity of the disease and the great variety of genetic changes may make it difficult to establish the genetic diagnosis. Functional studies of the mutant sodium channel can help establish a genetic diagnosis for some of these patients. In this scenario, we aim to construct an *in-vitro* system to perform biophysical studies and to test three mutations in *SCN1A* found in patients with DS: c.5177G>A, c.5329delG, and c.5434T>C. These lead to the formation of the mutant proteins W1726X, V1777fsX1778, and W1812R, respectively. We expressed the mutant proteins in Hek-293T cells and used the Patch Clamp technique to characterize the biophysical properties of the mutant channels. We found that the current density decreases markedly in the three mutations, indicating a loss of function in the sodium channel formed by the mutant proteins studied. Our work contributes to the growing number of publications aimed at increasing the knowledge about the functional properties of ion channels in health and disease. Furthermore, we add essential information to assist in the genetic diagnosis of patients with DS.

INTRODUCTION

Studies of the *SCN1A* gene have made it possible to identify more than 2,210 genetic variants reported in databases such as The Human Gene Mutation Database - HGMD. These are associated with a spectrum of phenotypes ranging from self-limited epilepsies, such as genetic epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+)(1,2), to severe phenotypes, such as Dravet syndrome (DS)(3,4). In most patients, DS presents drug-resistant, prolonged, febrile, and afebrile focal or generalized clonic seizures in the first year of life. In addition, children with DS demonstrate cognitive and behavioral impairments from the second year of life. Furthermore, other types of seizures may occur, such as myoclonic and atypical absence seizures and progressive gait abnormalities. Considering that there are clear differences in the phenotypes of patients with GEFS+ and DS (5-7), it is remarkable that these are caused by genetic variants in the same gene, *SCN1A*. Furthermore, it has been shown that the variation in phenotypes can be partially explained by the functional consequences of the mutations in the sodium channel (5).

Most patients with DS have missense variants that lead to a single amino acid substitution in the Nav1.1 protein (encoded by the *SCN1A* gene). However, frameshift and nonsense variants can produce truncated proteins (4–6). The Nav1.1 protein is the sodium channel's main subunit, which combines with two other auxiliary beta subunits to form a protein complex. Studies with this protein have made it possible to identify structural or functional regions responsible for the stability and activity of the sodium channel(7). Nav1.1 has four homologous domains (DI-DIV), each consisting of six transmembrane segments (S1-S6). Also, site-directed mutagenesis studies have identified and characterized the channel pore, formed by segments 5 and 6 of each domain, the voltage sensor formed by the S4, the phosphorylation sites (intracellular loop), and the

gate of inactivation formed by the loop that is generated between the DIII-DIV (8). Nav1.1 is mainly expressed in the soma of neuronal cells in the brain and is responsible for the increase in action potential(9).

Functional studies of mutations associated with GEFS+ and DS have been carried out previously, and the biophysical properties of the channel have been characterized. In most patients with GEFS+, it has revealed a relationship with the activation property of the channel, which, when altered, contributes to a persistent entry of the sodium ion(10,11). By contrast, in DS there is evidence of a partial or total loss of sodium ion conductance through the channel(4,12,13),17). Thus, by studying the biophysical properties of the mutant sodium channel, it is possible, in most cases, to determine the prognosis of patients with *SCN1A*-associated phenotypes. Also, the remarkable variable severity of the disease, combined with the great variety of genetic changes found, may make it difficult to establish the genetic diagnosis in some patients, leading to inconclusive genetic results. Thus, functional studies of the mutant sodium channel can help establish a genetic diagnosis (4,9,17).

In this context, we aim to construct an *in-vitro* system to perform biophysical studies and to test three mutations in *SCN1A* found in patients with the phenotype of DS: c.5177G>A, c.5329delG, and c.5434T>C.

MATERIALS AND METHODS

Patients and genetic variants

The cellular electrophysiology study included three variants in the *SCN1A* gene identified in a previously published sequencing work performed in patients with the phenotype of DS (14). These patients fulfilled the clinical criteria for DS according to the guidelines of the International League Against Epilepsy (ILAE)(15), and a detailed clinical description of the patients has been published previously (16). For the present study, we chose variants present in unrelated patients, two females and one male. In addition, all parents signed an informed consent approved by the Research Ethics Committee of the University of Campinas (UNICAMP), Brazil.

The three *SCN1A* variants studied, c.5177G>A, c.5329delG, and c.5434T>C, are shown in Table 1. All variants were 'de novo,' and none had biophysical studies reported previously. According to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) guidelines for variants interpretation, these three variants are likely pathogenic (19).

Bacterial transformations and mutagenesis

Plasmids pCMV-SCN1A, pCD8-IRES-h β 1, and pGFP-IRES-h β 2, which contain the cDNAs for the SCN1A, SCN1B, and SCN2B genes, were donated by Dr. Alfred George Jr. (Vanderbilt University Division of Genetics) Medicine, Nashville, TN, USA). The subcloning of these plasmids was carried out according to the protocol of Lossin et al(5). Site-directed mutagenesis used pCMV-SCN1A as a template to obtain the mutations: 5177G>A, 5329delG, and 5434T>C (Recombinant Plasmids: p.W1726X, p.V1777fsX1778 and p.W1812R), using the GeneArt™ Site-Directed Mutagenesis PLUS System (Thermo Fisher Scientific) and the following primers (Table 1).

Plasmids were sequenced by next-generation sequencing to verify the presence of the target mutation and the absence of unwanted variants.

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Tm (°C)	Mutation
F-T582C-1	AGATGTTCTATGAGGTTTCGGGAGAAGTTTG	55	c.5434 T>C
R- T582C-1	AACCTCATAGAACATCTCAAAGTCATCC	55	c.5434 T>C
F-G477del-1	ATATCCTTCCTGGTTTGGTGAACATGTACA	55	c.5329delG
R-G477del-1	AACCAGGAAGGATATGATGATGTAAGTCTG	55	c.5329delG
F-G325A-1	ACAACCTCTGCTGGCTAGGATGGATTGCTA	55	c.5177G>A
R-G325A-1	AGCCAGCAGAGGTTGTAATTTGGAATAG	55	c.5177G>A

Table 1. Sequences of primers used to generate mutant plasmids.

Cell Culture and Heterologous Expression of NaV1.1 and recombinant NaV1.1

HEK-293 tsA201 cells (UK Health Security Agency-UKHSA) were used to express all sodium channel subunits. Cell culture conditions were 37°C and 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin, and 1% GlutaMAX (all from Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). After the cells reached 70% cell confluency, they were transiently transfected for 24 h with Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc.) and 3 mg of total mass DNA, encoding for NaV1.1- WT and the beta subunit. The mass ratio for transfection of mutant Nav1.1 with beta subunits was the same as that used for NaV1.1-WT.

Subsequently, the HEK-transfected cells were split and re-plated for 24 h in 35 mm plates coated with poly-L-lysine (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, United States) to obtain individual cells. Cellular electrophysiology studies were performed 24 h after the split.

Electrophysiological Studies

Sodium currents from transfected HEK cells expressing reporter genes were studied at room temperature using the patch clamp whole-cell setup. Patch pipettes were fabricated from borosilicate glass (Sutter Instrument, Novato, CA, USA) with a Narishige PC-10 extractor (Narishige International LTD, London, UK) and fire-polished using a microforge (MF 830, Narishige, Tokyo, Japan) and their final resistance were between 2.3 to 2.7 megohms when filled with pipette solution.

The pipette solution contained (in mmol/l): 130 CsCl, 1 EGTA, 10 HEPES, 10 NaCl, and 2 ATP-Mg²⁺, pH 7.2 (CsOH). The bath solution contained (in mmol/l): 140 NaCl, 3 KCl, 10 HEPES, 1.8 CaCl₂, and 1.2 MgCl₂, pH 7.4 (NaOH). The osmolality of bath and pipette solutions was adjusted with glucose to 275 and 289 mOsm, respectively. The experiments were performed with an Axopatch 200B amplifier and a pClamp10.2/Digidata 1440A acquisition system (Axon Instruments, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, United States) at a sampling frequency of 20 kHz. Leak subtraction was not used. Before measuring currents, cells were allowed to stabilize for 5 min after establishing the Whole-cell configuration (current stabilization). Cells were held at -120 mV to obtain the current-voltage relationship and the voltage dependence of activation, and currents with 50 ms depolarizing pulses were elicited from -80 to 80 mV in 5 mV increments.

The voltage dependence of inactivation was determined by applying 50 ms pre-pulses maybe from -140 to 5 mV in 5 mV increments, followed by a test pulse of -20 mV. To recovery from inactivation stage, we use a protocol of two types of pulses: a first pulse of -20 mV of 50 ms from a retention potential of -120 mV, followed by an interpulse of -120 mV of variable duration ($1-40$ ms) and a second pulse of -20 mV of 50 ms. Cells not meeting these criteria for excessively large current amplitudes were excluded from the final analysis.

Data Analysis

OriginPro8.5 software (OriginLab Corporation, Northampton, MA, United States) was used for data and statistics analysis. First, leakage currents were subtracted using an online P/4 procedure.

The current density was obtained by normalizing the current in each potential by cell capacitance. Activation and steady-state inactivation data were fitted to a Boltzmann equation: $G = G_{\max} / (1 + \exp((V_{1/2} - V)/k))$ and $I = I_{\max} / (1 + \exp((V - V_{1/2})/k))$, respectively. G is conductance, G_{\max} is maximum conductance, $V_{1/2}$ is the voltage at which half of the channels are activated or inactivated, V is the membrane potential, K is the slope factor, I is the maximum current amplitude, and I_{\max} is the maximum current amplitude. Recovery from inactivation data was fitted to a monoexponential function to obtain the time constant. The results obtained were presented as means \pm standard error. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Clinical-genetic findings

The first patient carrying the 5177G>A mutation has no family history of epilepsy, and the age of onset of the seizures was five-month-old. The second patient that harbored a 5329delG mutation in *SCN1A* has a family history of epilepsy and the seizures onset started at three-month-old. Finally, the third patient is a carrier of the 5434T>C mutation, has no family history of epilepsy, and the age of onset of seizures was five months.

All patients included in this study were characterized at the time of recruitment at the outpatient epilepsy clinic of the University of Campinas (UNICAMP) hospital. All patients had been diagnosed with DS after extensive clinical assessment, routine EEG, prolonged, only one used the ketogenic diet (see table 2).

DNA Change	Phenotype	G	SE	Seizure onset (months)	Febrile seizure (temperature, °C)	Seizure Type	FSH	Seizure frequency	Current Antiepileptic	Epileptic Discharges	Neurological Examination
c.5177G>A	DS	F	(-)	5	Yes(-)	Myo,GTCS	(-)	Weekly	VPA+CBZ(#)	GN/FC	ATX,PYR,LD
c.5329delG	DS	M	Yes	3	Yes(38)	GTCS,Myo, Tonic,CPS, Atonic	Yes	Daily	VPA+LTG+CNZ(*)	GN/FC	AS
c.5434T>C	DS	F	Yes	5	Yes(37-37,5)	Myo,Atonic, CPS,GTCS	No	Daily	KET+LTG+CNZ(*)	GN/FC	ATX,PYR

Table 2. Variant genotype, demographic, and clinical findings in patients with DS studied. All variants were present in the heterozygous form. G, gender; F, female; M, male; SE, status epilepticus; CPS, complex partial seizures; GTCS, generalized tonic-clonic seizures; Myo, myoclonic seizures; Tonic, tonic seizure; Atonic, atonic seizures; FSH, family history of seizures; VPA, valproic acid; LTG, lamotrigine; CNZ, clonazepam; CBZ, clobazam; KET, ketogenic diet;(#) seizure-free with antiseizure medication; (*) no seizure control with antiseizure medication; GN, generalized; FC, focal; ATX, ataxia; PYR, pyramidal; LD language delay; AS autism spectrum; (-) not informed.

Functional characterization of wild-type *SCN1A*

Sodium currents were observed, and the channel was rapidly activated and inactivated in response to emitted depolarizing test potentials (33 pulses) (Figure 1A). No endogenous internal currents greater than 0.2 nA were observed in transfected HEK-293T cells. The maximum point of sodium current density occurred at -10 mV, -107 ± 4.38 (Figure 1B). Half maximal inactivation reached at: -57.5 ± 1.4 mV (Figure 1C). The time constant for the recovery state from inactivation was 2.2 ± 1.1 ms (Figure 1D). All properties of the wild-type sodium channel found in this investigation closely resemble the properties of native human neuronal sodium channels described previously (10). The average number of cells recorded in each protocol was 10. Only cells expressing reporter genes (green fluorescence and CD8 antigen binding) were recorded.

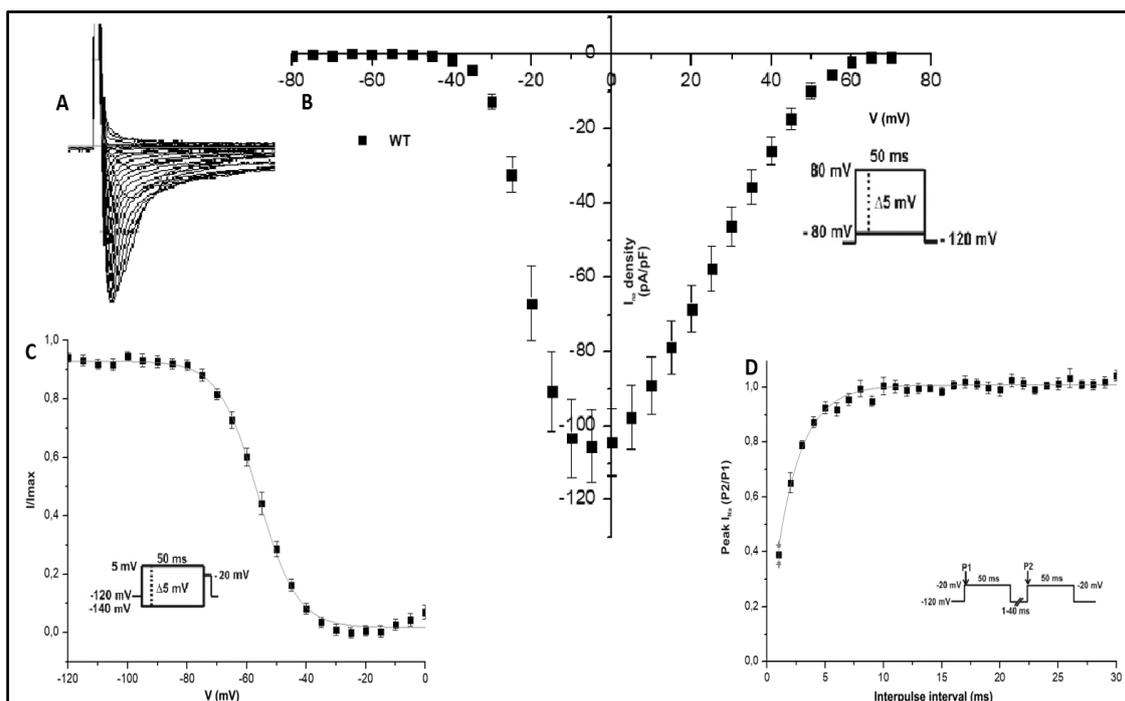


Figure 1. Biophysical parameters of the channel Nav1.1- Wild type. Representative whole-cell recordings of sodium current from HEK-293T cells expressing the WT human Nav1.1 channel. The sodium currents generated by the expression of our exogenous gene are shown in figure (1A). Current-voltage relationships were normalized with the cell capacitance (1B). The voltage dependence of channel inactivation (1C). Time course of recovery from quenching at -120 mV. (1D). The protocols used are shown in each graph.

Functional characteristics of the *SCN1A* variants associated with DS

The W1726X mutation is located in the loop formed between segments 5 and 6 of domain IV of the channel, a region committed to the ion channel selection filter. The logs showed decreased ion current. The V1777fsX1778 mutation is in segment 6 of domain IV of the channel, a region also related to the selection of the filter channel. This caused the total absence of an ionic current. Finally, the W1812R mutation is in the carboxyl-terminal, a region committed to the inactivation and stability of the channel, and the recordings showed a decrease in ionic current (Figure 2).

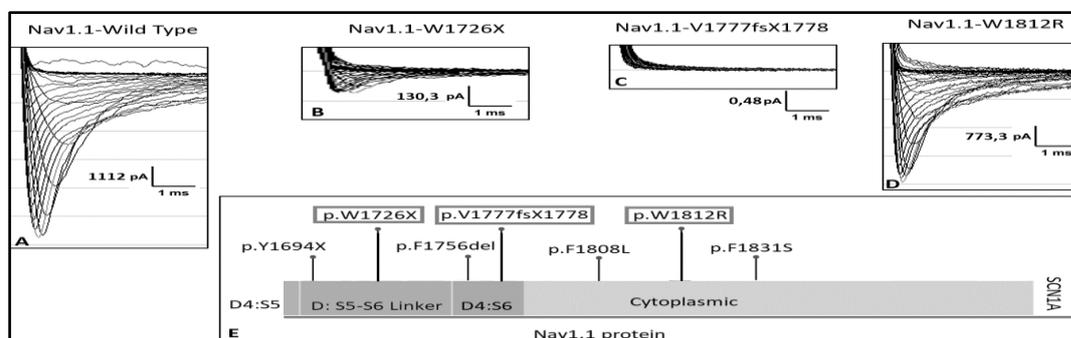


Figure 2. Typical whole-cell recordings(A-D) were obtained from HEK-293 cells expressing recombinant plasmids: (W1726X, V177fsX1778, and W1812R). E) Locations of DS-associated mutations in the sodium channel protein Nav1.1 (Only the DIV and carboxyl terminus are shown). The mutants studied are boxed, and the rest correspond to those described by other authors: Nonsense Y1694X, Frameshift F1756del, Missense F1808L, and Missense F1831S.

We used the current-voltage relationship protocol applied to Nav1,1-WT. The densities found in the mutants were: The W1726X mutation showed that the sodium currents are small but detectable (Figure 2B). It presents a current density of 28.03% ($-30 \pm 1,2$). It is a mutant that generates the partial loss of function of the channel (pLOF) (Figure 3A). The V1777fsX1778 mutation generated a total absence of sodium current (Figure 2C) and presented a current density of 0%. Finally, the W1812R mutation showed that this variant generates a partial loss of function (Figure 2D) and has a current density of 39.3% ($-42 \pm 1,4$) compared to wild-type Nav1.1. In all three cases, the current

densities of the Nav1.1 mutants studied are less than 40% compared to Nav1.1-WT (Figure 3A).

In the case of voltage-gated sodium channel inactivation (steady-state inactivation) for mutants W1726X and W1812R, the same standard double-pulse protocol was used for Nav1.1-WT. As a result, the maximum mean inactivation was similar to the wild-type channel, with a factor slope of 5.25 ± 0.5 ($n=10$) (Figure 3B).

The recovery time from inactivation at -120 mV for the mutants showing current was determined using the same pulse protocol used for the Nav1.1-WT. The time constant was similar to the Nav1.1-WT (Figure 3C).

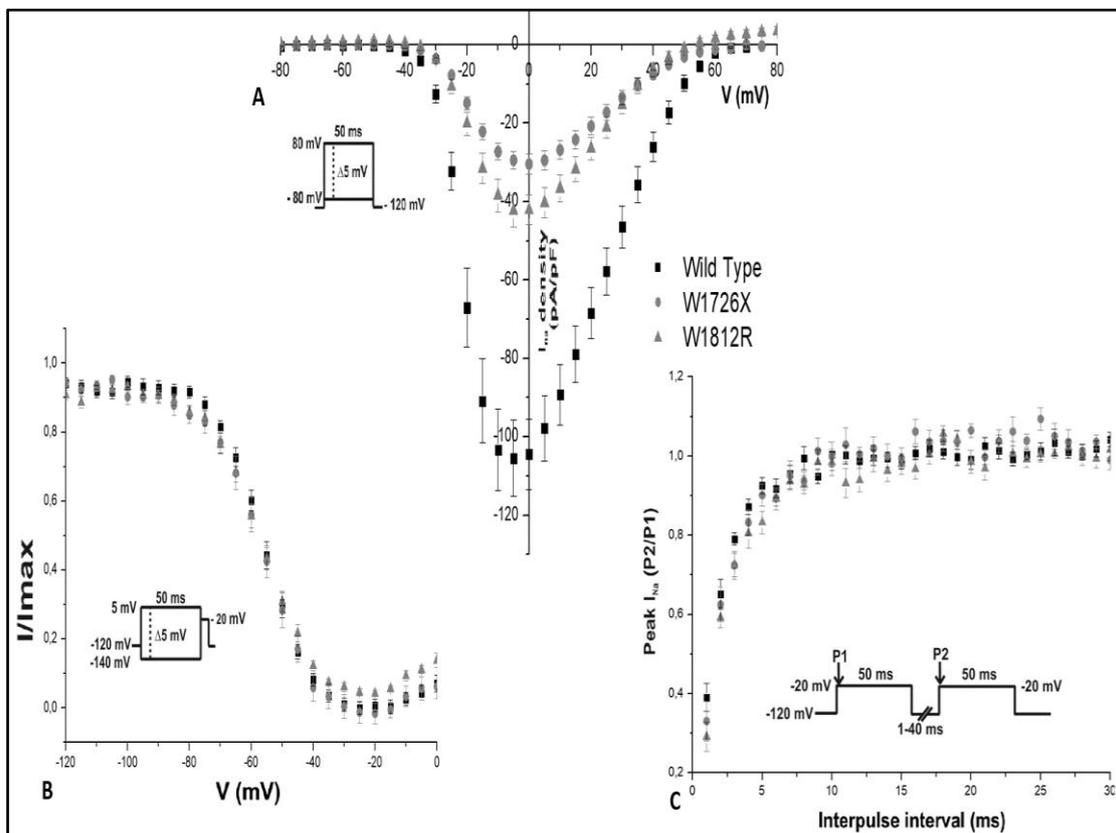


Figure 3. Whole-cell currents were elicited by depolarizing potentials for mutants and wild type. Circles depict data for Nav1.1-W1726X, triangles for Nav1.1-W1812R, and squares for Nav1.1-WT. (A) Mean the cell capacitance normalized current-voltage relationship sodium ions amplitude to obtain sodium ions density values. (B) Sodium ions steady state voltages dependence inactivation plots. (C) Recovery from inactivation curves.

DISCUSSION

Mutations in sodium channels can cause a variety of channelopathies with phenotypes in the brain, muscles, and heart, including seizure disorders, muscle paralysis, and cardiac arrhythmias(17,18).

The W1726X mutation, which is predicted to form a truncated protein that loses part of the S5-S6 loop, the S6 segment, and the carboxyl end, remarkably generates a channel that remains active, although with a markedly decreased current density. One of the probable explanations for this finding is that the remaining protein segments still manage to form a partially functional channel. This phenomenon has been observed with the mutation M1619fs*7, which generates a truncated protein and still partially maintains its biophysical properties(4). An alternative explanation is that the mutation could affect protein trafficking, causing it to temporarily reach the membrane and be secreted as it does not have the carboxyl end, which acts as a membrane anchor(19).

The V1777fsX1778 mutation causes a total loss of the biophysical properties of the channel. According to functional and expression studies of truncated channels, most of these cases generate truncated proteins that would not produce a functional channel, except those that occur at the extreme C-terminal. This is likely to occur due to alterations in protein trafficking. That is, the protein would not reach the membrane, causing an absence of ionic current. Alternatively, the functional architecture of the channel could be affected if the truncation occurs in a part of S6 of domain 4. This segment is closely related to the formation of the pore(4,20). Thus, it is not surprising that microdeletions in *SCN1A*, leading to large peptide losses, may significantly impact protein structure and function. However, in the case described here, it is surprising that a truncation of the protein that occurs close to the C-terminus (Loss of a small peptide) generates a total loss of function, which seems to have a greater functional consequence than loss of function larger peptides.

The wild-type sodium channel Nav1.1 studied in our case has the alpha subunit in its type 1 isoform and has 2009 amino acids. Thus, the truncated proteins p.W1726X and p. V1777fsX1778 have lost 283 and 232 amino acids, respectively, compared to the wild-type protein. The only difference at the sequence level between both proteins is a segment of 51 amino acids; however, at the functional level of the channel, this segment is causing a partial loss (p. W1726X) or a total loss (p. V1777fsX1778) of current ionic. Some explanations for these findings are i) the presence of this segment influences the functional architecture of p. V1777fsX1778 that would cause the closure of the channel, and ii) The segment would have a role in the transit of the protein toward the membrane since it can cause it to be retained in some region of the cytoplasm or to be degraded in its transit toward the cell membrane(21).

When truncated proteins are studied by *in silico* prediction systems, the results show little information at the functional level of the channel, which is why Patch Clamp analysis is important because there is the possibility of showing the presence of ionic currents, although these currents can be minimal in some cases, such as in those that generate truncated proteins in domain IV of the alpha subunit.

It is important to note that transfections were carried out in Hek-293T cells, where they received 50% of the DNA mass of the Nav1.1-mutant and 50% of the DNA mass of the Nav1.1-wild type (cellular heterozygous for Nav1.1), observing in both W1726X and V1777fsX1778 mutations that presented current densities that do not exceed 44% concerning the Wild Type (Data not shown). Therefore, the expected minimum would be a current density of 50%; This could indicate, as has already been reported in other works, that DS is caused by haploinsufficiency that is generated by mutations that occur in the SCN1A gene(21).

The W1812R mutation is located in a region of the C-terminal cytoplasmic domain, a region related to interactions with accessory subunits, folding, and anchoring to the membrane(11). Therefore, the ionic current decrease would likely be due to protein folding problems. Thus, the mutant proteins would be retained in the endoplasmic reticulum in their transit to the membrane. However, some proteins may reach the membrane or temporarily reach the membrane and are most likely eliminated prematurely(19). This phenomenon has already been described for the related mutations: Missense F1808L and F1831S(22,23) and in other missense mutations of Nav1.1 (24).

Currently, the ability to make *in silico* predictions about the function of the sodium channel is limited despite the availability of extensive genetic data(25). This limits the use of genetic knowledge alone to identify or design drugs directed to specific mutations. Thus, the data acquired by functional studies of the mutant channels are essential to advance precision or personalized treatments for patients with DS. In addition, functional information may be relevant to establish an accurate genetic diagnosis and prognosis for the various epilepsies related to SCN1A mutations, provided there is a cell model that has the genetic background of the patient, because the heterologous expression system used (Hek- 293T) do not show the native environment of the inhibitory neuronal cells affected by the mutation, however it is already a great advance for the specific knowledge of how a point mutation affects the architecture and functionality of the channel. Finally, a better understanding of the functional effects of the sodium channel caused by mutations is an essential next step in understanding genotype-phenotype relationships in *SCN1A*-associated epilepsies.

CONCLUSIONS

Despite the different locations of the variants in the protein, the type of mutation, and the phenotypes associated with DS, we found evidence that all three variants studied here cause loss of sodium ion conductance in the Nav1.1 channel. The nonsense and frameshift mutations cause truncated Nav1.1 proteins and are closely related to the phenotype of typical DS patients. However, for the missense variant, we need additional studies to understand better the cause of the loss of functionality seen in our experiments. Furthermore, the present work established a reliable in-vitro system that can now be used to study additional variants in *SCN1A* found in patients with different epilepsy phenotypes. This may assist in diagnosing patients with genetic variants in *SCN1A* and in studies aiming to better understand the effects of genetic variation on protein function. Our work also contributes to the growing number of publications aimed at increasing the knowledge about the functional properties of ion channels in health and disease.

REFERENCES

1. Rusconi R, Combi R, Cestèle S, Grioni D, Franceschetti S, Dalprà L, et al. A rescuable folding defective Nav1.1 (SCN1A) sodium channel mutant causes GEFS+: common mechanism in Nav1.1 related epilepsies? *Hum Mutat.* julio de 2009;30(7):E747-760.
2. Escayg A, Heils A, MacDonald BT, Haug K, Sander T, Meisler MH. A novel SCN1A mutation associated with generalized epilepsy with febrile seizures plus--and prevalence of variants in patients with epilepsy. *Am J Hum Genet.* abril de 2001;68(4):866-73.
3. Sugiura Y, Ogiwara I, Hoshi A, Yamakawa K, Ugawa Y. Different degrees of loss of function between GEFS+ and SMEI Nav 1.1 missense mutants at the same residue induced by rescuable folding defects. *Epilepsia.* junio de 2012;53(6):e111-114.
4. Wang JY, Tang B, Sheng WX, Hua LD, Zeng Y, Fan CX, et al. Clinical and Functional Features of Epilepsy-Associated In-Frame Deletion Variants in SCN1A. *Front Mol Neurosci.* 2022;15:828846.

5. Lossin C, Wang DW, Rhodes TH, Vanoye CG, George AL. Molecular basis of an inherited epilepsy. *Neuron*. 13 de junio de 2002;34(6):877-84.
6. Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, Fukushima K, Shimomura J, Fujiwara T, Hamano S, et al. Frequent mutations of SCN1A in severe myoclonic epilepsy in infancy. *Neurology*. 9 de abril de 2002;58(7):1122-4.
7. Sah DW. Human fetal central neurons in culture: voltage- and ligand-gated currents. *J Neurophysiol*. 1 de noviembre de 1995;74(5):1889-99.
8. Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 2000;26(1):13-25.
9. Reckziegel G, Beck H, Schramm J, Elger CE, Urban BW. Electrophysiological characterization of Na⁺ currents in acutely isolated human hippocampal dentate granule cells. *J Physiol*. 1998;509(1):139-50.
10. Alekov A, Rahman MM, Mitrovic N, Lehmann-Horn F, Lerche H. A sodium channel mutation causing epilepsy in man exhibits subtle defects in fast inactivation and activation in vitro. *J Physiol*. 15 de diciembre de 2000;529 Pt 3:533-9.
11. Spampinato J, Kearney JA, de Haan G, McEwen DP, Escayg A, Aradi I, et al. A novel epilepsy mutation in the sodium channel SCN1A identifies a cytoplasmic domain for beta subunit interaction. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 3 de noviembre de 2004;24(44):10022-34.
12. Yamakawa K. Na channel gene mutations in epilepsy--the functional consequences. *Epilepsy Res*. agosto de 2006;70 Suppl 1:S218-222.
13. Meng H, Xu HQ, Yu L, Lin GW, He N, Su T, et al. The SCN1A Mutation Database: Updating Information and Analysis of the Relationships among Genotype, Functional Alteration, and Phenotype. *Hum Mutat*. 2015;36(6):573-80.
14. Gonsales MC, Montenegro MA, Preto P, Guerreiro MM, Coan AC, Quast MP, et al. Multimodal Analysis of SCN1A Missense Variants Improves Interpretation of Clinically Relevant Variants in Dravet Syndrome. *Front Neurol [Internet]*. 2019 [citado 5 de agosto de 2021];0. Disponible en: <https://internal-journal.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2019.00289/full>
15. Wilmschurst JM, Gaillard WD, Vinayan KP, Tsuchida TN, Plouin P, Van Bogaert P, et al. Summary of recommendations for the management of infantile seizures: Task Force Report for the ILAE Commission of Pediatrics. *Epilepsia*. 2015;56(8):1185-97.
16. Preto PM, Guimarães CA, Yasuda CL, Schmutzler KMRS, Gonzalez M, Montenegro MA, et al. Clinical and EEG profile in Dravet and Doose syndromes. *J Pediatr Epilepsy*. 1 de enero de 2012;1(1):43-9.
17. Mantegazza M, Broccoli V. SCN1A/NaV 1.1 channelopathies: Mechanisms in expression systems, animal models, and human iPSC models. *Epilepsia*. diciembre de 2019;60 Suppl 3:S25-38.

18. Fonseca DJ, Vaz da Silva MJ. Cardiac channelopathies: The role of sodium channel mutations. *Rev Port Cardiol Engl Ed.* 1 de febrero de 2018;37(2):179-99.
19. Sanders CR, Myers JK. Disease-Related Misassembly of Membrane Proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2004;33(1):25-51.
20. Fukuma G, Oguni H, Shirasaka Y, Watanabe K, Miyajima T, Yasumoto S, et al. Mutations of Neuronal Voltage-gated Na⁺ Channel α 1 Subunit Gene SCN1A in Core Severe Myoclonic Epilepsy in Infancy (SMEI) and in Borderline SMEI (SMEB). *Epilepsia.* 2004;45(2):140-8.
21. Bechi G, Scalmani P, Schiavon E, Rusconi R, Franceschetti S, Mantegazza M. Pure haploinsufficiency for Dravet syndrome Na(V)1.1 (SCN1A) sodium channel truncating mutations. *Epilepsia.* enero de 2012;53(1):87-100.
22. Rhodes TH, Vanoye CG, Ohmori I, Ogiwara I, Yamakawa K, George AL. Sodium channel dysfunction in intractable childhood epilepsy with generalized tonic-clonic seizures. *J Physiol.* 1 de diciembre de 2005;569(Pt 2):433-45.
23. Meisler MH, O'Brien JE, Sharkey LM. Sodium channel gene family: epilepsy mutations, gene interactions and modifier effects. *J Physiol.* 2010;588(11):1841-8.
24. Thompson CH, Porter JC, Kahlig KM, Daniels MA, George AL. Nontruncating SCN1A Mutations Associated with Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy Impair Cell Surface Expression. *J Biol Chem.* 7 de diciembre de 2012;287(50):42001-8.
25. Brunklaus A, Lal D. Sodium channel epilepsies and neurodevelopmental disorders: from disease mechanisms to clinical application. *Dev Med Child Neurol.* julio de 2020;62(7):784-92.

5. DISCUSSÃO GERAL

O gene *SCN1A* é o responsável pela codificação do canal de sódio dependente de voltagem Nav1.1. Mutações nesse gene que são expressas no cérebro estão, principalmente, associadas a epilepsias (56). Entre os muitos métodos para estudar a função do canal iônico, a eletrofisiologia celular (*Patch Clamp*) é considerada o padrão-ouro por fornecer alta precisão e flexibilidade(85). No entanto, para realizar estudos funcionais existem desafios únicos, sendo um deles a instabilidade que o cDNA apresenta quando se propaga em bactérias. Isso ocorre devido à geração de muitas mutações espontâneas que tornam o plasmídeo inviável para estudos funcionais.

Nesta pesquisa, um dos primeiros desafios foi obter o plasmídeo selvagem (pCMV-*SCN1A*-selvagem) em grandes quantidades e criar os plasmídeos mutantes de interesse (pCMV-*SCN1A*-mutante), pois apenas desejaríamos analisar o efeito de uma única mutação no gene *SCN1A* e a presença de outras mutações geraria estudos funcionais errôneos.

O plasmídeo selvagem pCMV-*SCN1A* foi projetado para expressar a subunidade alfa do canal Nav1.1 em células eucarióticas. A expressão é controlada pelo promotor do citomegalovírus humano (CMV), que permite a expressão constitutiva do gene em células de mamíferos. Além disso, apresenta outros elementos de sequência dentro do plasmídeo que fazem com que ele tenha um tamanho de 10450 pb, que é considerado um plasmídeo relativamente grande (26). O tamanho do plasmídeo é um fator importante a considerar na transformação e replicação bacteriana (clonagem e subclonagem), porque é necessária uma técnica eficiente na transformação bacteriana e com um bom genótipo bacteriano para replicar este tipo de plasmídeos.

A análise *in silico* mostrou a presença de sequências repetitivas no cDNA do gene *SCN1A*, compostas principalmente por citosinas e guaninas. Além disso, foi possível identificar que existem regiões mais suscetíveis a gerar mutações, que são encontradas principalmente no mesmo cDNA do gene. Nossos dados gerados a partir de NGS demonstram que há uma tendência

para que mutações ou deleções pontuais sejam sempre geradas na mesma região do gene (entre os éxons 1 a 26 do gene *SCN1A*).

Este é um fator muito importante (região do gene), que explicaria a instabilidade do plasmídeo, pois, apesar de mudar o vetor, o problema sempre estará presente devido a mesma sequência de cDNA entre os exons 1 a 26 do gene *SCN1A*. Outras regiões do plasmídeo suscetíveis a mutações em menor grau também foram observadas no sequenciamento e na análise *in silico*. Por exemplo, a região promotora do gene de resistência, cuja presença explicaria, em alguns casos de subclonagem, a diminuição da replicação bacteriana que resulta na baixa concentração de plasmídeos obtidos após a purificação. Este problema também foi identificado em outros estudos, como o de DeKeyser e colaboradores, onde, além de identificar o que apontamos, eles encontraram promotores no cDNA do gene *SCN1A* que são muito semelhantes aos promotores bacterianos que impulsionam a produção de transcritos e que são tóxicos para as bactérias (86).

No caso de culturas com mais de 72 horas, ocorre a morte bacteriana e isso pode influenciar na degradação do plasmídeo. Também pode ocorrer maior probabilidade de contaminação por outro agente ou pode ser gerado maior estresse celular, o que induz negativamente a replicação do plasmídeo.

Em relação à temperatura de cultivo das bactérias, observamos que, entre 27-30°C, a presença de mutações espontâneas diminui. Uma explicação seria que em temperaturas mais baixas um crescimento bacteriano lento é promovido e o estresse seria menor, favorecendo a diminuição de mutações espontâneas no plasmídeo (87).

Com relação aos volumes de culturas utilizados, os resultados nos mostraram que volumes inferiores a 50 mL na fase de subclonagem, permite um plasmídeo com a sequência conservada. Uma explicação seria que, com um volume menor de culturas, a carga metabólica da bactéria seria menor, promovendo uma replicação mais bem sucedida do plasmídeo. Em volumes maiores que 100 mL observamos a presença de culturas com diferentes plasmídeos e isso pode ser devido à grande carga metabólica utilizada para a

replicação. Uma explicação seria que, visando minimizar seu gasto metabólico, algumas bactérias acabam modificando ou encurtando os plasmídeos (88).

É importante que a digestão enzimática do plasmídeo após a subclonagem seja realizada antes do sequenciamento, pois economiza tempo e reagentes. Portanto, a digestão enzimática do plasmídeo deve incluir mais de cinco pontos de interrupção na região de cDNA do gene. A digestão enzimática ajuda a identificar macroalterações que ocorrem no plasmídeo, mas é improvável que identifique mutações pontuais, razão pela qual o sequenciamento é importante (87).

Realizamos o NGS para o plasmídeo total principalmente por dois motivos: primeiro devido à alta velocidade de sequenciamento, e segundo, porque nos permitiu verificar a presença de mutações importantes em outras regiões que podem influenciar outros processos subsequentes, como metilação do plasmídeo ou transfecções.

Embora as bactérias *E. coli Stbl2* e *Neb Stable* transformem eficientemente o plasmídeo, a *Neb Stable*, como célula hospedeira, contribuiu significativamente para a preservação da sequência do plasmídeo. Isso foi observado no perfil de digestão enzimática do plasmídeo transformado com *Neb Stable*, pois foram superiores ao de *E. coli Stbl2*. Uma explicação para *Neb Stable* seria a contribuição de seu genótipo que auxilia na clonagem desses tipos de plasmídeos.

No caso da geração de plasmídeos mutantes pCMV-SCN1A, nossos dados mostram que a metilação do plasmídeo parental *in vitro* é a maneira mais conveniente que a digestão enzimática do plasmídeo parental. Dessa forma silenciámos o plasmídeo parental para que ele não se replique em paralelo com os plasmídeos mutantes, diminuindo a carga metabólica nas bactérias e deixando apenas o plasmídeo mutante para ser replicado.

A metilação do plasmídeo parental, nos permite ter só plásmidos mutantes pCMV-SCN1A que foram expressados na célula HEK-293T assegurando só adquirir registros eletrofisiológicos dos canais Nav1.1 mutantes.

A recombinação dos plasmídeos mutantes *in vitro* após PCR diminuiu a carga metabólica da bactéria, pois não há necessidade de recirculação do plasmídeo. Além disso, aumentou a taxa de transformação pela incorporação de mais plasmídeos circulares dentro da bactéria, resultando em maiores concentrações de plasmídeo, esse fenômeno foi observado com mais sucesso na bactéria *Neb Stable*.

O sequenciamento dos plasmídeos mutantes antes de serem subclonados mostrou que as condições em que se realizou a mutagênese sítio-dirigida eram adequadas. Ao sequenciar os mesmos plasmídeos mutantes, após serem subclonados, evidenciamos uma alta instabilidade do plasmídeo mutante nos perfis de digestão enzimática. Isso indicaria que a instabilidade do plasmídeo (pCMV-SCN1A selvagem ou mutante) acontece quando passa por um sistema de clonagem celular (86). Portanto, é importante minimizar a instabilidade do plasmídeo na cultura bacteriana, controlando o tipo de hospedeiro, o tempo de cultura, a recombinação de plasmídeo *in vitro*, os volumes de cultura e a temperatura (87).

A produção dos plasmídeos selvagem contendo as subunidades auxiliares beta não apresentou problemas de instabilidade, isso se deve ao fato do cDNA dos genes *SCN1B* e *SCN2B* terem tamanho de 600 pb e não apresentarem regiões instáveis. Eles estão contidos em pequenos vetores e os plasmídeos não excedem tamanho de 7,2 kb (26). Isso foi evidenciado em nossos experimentos, pois foram clonados com muita facilidade e no primeiro sequenciamento já foram encontrados os plasmídeos com as sequências esperadas.

As transfecções heterólogas realizadas na célula Hek-293T mostraram que os plasmídeos nativos eram funcionais, isso devido à evidência de corrente de íons de sódio na célula Hek-293T (26). Neste caso, encontramos uma densidade de corrente de sódio de 107 pA/pF e as demais propriedades biofísicas foram similares às indicadas em outras investigações (25,89).

Foi possível estabelecer a quantidade de massa total de plasmídeo a ser transfectado. O sistema de transfecção usado foi o Lipofectamine-2000, modelo que também foi usado na transfecção heteróloga para os plasmídeos mutantes (26).

É importante indicar que foram registradas células sem transfecções ou apenas transfectadas com subunidades betas, nestes casos as gravações mostraram ausência de corrente. Isso se deve no primeiro caso ao fato de não haver expressão exógena ou endógena do canal de sódio e no segundo caso, como a subunidade principal não está presente, o canal de sódio não é formado. Transfecções de células expressando apenas a subunidade alfa também foram realizadas onde foi evidenciada pouca corrente. Essas variantes de transfecções foram feitas com o fim de obter pontos de comparação na transfecção e nos registros eletrofisiológicos, como já é feito em outros trabalhos semelhantes (82).

A mutação W1726X gera uma proteína truncada e elimina parte do loop S5-S6, o segmento S6 e o terminal carboxílico. Neste caso um resultado surpreendente foi observado: a propriedade biofísica do canal permanece ativa, embora com uma densidade de corrente marcadamente diminuída. Uma das explicações prováveis é que os demais segmentos conseguem formar um canal parcialmente funcional. Esse fenômeno foi observado em outros trabalhos com a mutação M1619fs*7, que gera uma proteína truncada e ainda mantém parcialmente suas propriedades biofísicas (90). Também pode ser devido ao fato de que a mutação afeta o tráfego da proteína, fazendo com que ela atinja temporariamente a membrana e seja secretada, pois não possui o extremo carbóxico, que atua como âncora de membrana (91).

A mutação V1777fsX1778 causa uma perda total das propriedades biofísicas do canal. De acordo com estudos funcionais e de expressão de canais truncados, a maioria desses casos gera proteínas truncadas que não produziram um canal funcional, exceto aquelas que ocorrem no extremo C-terminal. Uma provável explicação seria o tráfego de proteínas, ou seja, a proteína não estaria atingindo a membrana causando ausência de corrente iônica ou a arquitetura funcional do canal seria totalmente afetada. Sendo

assim, o truncamento afetaria parte de S6 do domínio 4, e esse segmento está intimamente relacionado à formação do poro (90,92).

Em casos de macrodeleções onde grande parte do peptídeo é perdido, é lógico observar um impacto significativo na estrutura e função da proteína. No entanto, é surpreendente que uma simples eliminação, como neste caso, gere uma perda total de função ou que em uma maior perda de peptídeo o canal continue funcional. É importante indicar que existe uma diferença de apenas 51 aminoácidos entre estas duas proteínas truncadas, porém, isso seria o suficiente para passar de uma proteína com perda parcial de função para perda total. Fenômeno que não pôde ser evidenciado pelos sistemas de predição *in silico*, onde apenas foi indicado a produção de uma proteína truncada. Com isso, podemos dizer que uma proteína truncada não necessariamente gera perda total da função do canal.

Transfecções heterozigóticas foram realizadas em células Hek-293T onde receberam 50% da massa de DNA do mutante Nav1.1 e 50% da massa de DNA do tipo selvagem Nav1.1 (heterozigoto celular para Nav1.1). Neste caso, observamos, em ambas as mutações W1726X e V1777fsX1778, a presença de densidades de corrente que não ultrapassam 44% em relação ao tipo selvagem (Dados não mostrados). O mínimo esperado seria uma densidade de corrente de 50%, isso poderia indicar que a proteína mutante está interagindo negativamente com o tipo selvagem (93).

A mutação W1812R está localizada em uma região do domínio citoplasmático C-terminal, região que está relacionada a interações com subunidades acessórias, com dobramento e ancoragem à membrana (94). A diminuição da corrente iônica seria devido a problemas de dobramento da proteína. Sendo assim, teriam seu trânsito para a membrana prejudicado pois acabariam retidas no retículo endoplasmático. Em alguns casos poderiam alcançar a membrana temporariamente e/ou poderiam ser eliminadas prematuramente (45,91). Esse fenômeno já foi descrito, por exemplo, para as mutações relacionadas Missense F1808L e F1831S (15,95), e em outras mutações missense de Nav1.1(89) .

Levando em consideração as localizações das variantes estudadas no canal de sódio, o tipo de mutação, os estudos semelhantes, os critérios ACMG e a clínica associada à SD, foi encontrada uma forte semelhança a nível biofísico para sustentar que as três mutações causam perda de função de canal, que é um dos mecanismos moleculares que explicam a SD (96).

Atualmente, a capacidade de fazer previsões *in silico* da função do canal de sódio é muito limitada, apesar da grande disponibilidade de dados genéticos (97), o que limita o uso do conhecimento genético para melhora de abordagens no tratamento e prognóstico das diversas epilepsias relacionadas ao *SCN1A*. Compreender os efeitos funcionais do canal de sódio causados por mutações é um próximo passo essencial na compreensão das relações genótipo-fenótipo em epilepsias associadas a *SCN1A*.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os objetivos propostos nesse trabalho, as principais conclusões obtidas foram:

- A obtenção dos plasmídeos do tipo selvagem utilizando as técnicas de transformação e clonagem apropriadas permitiu concentração e qualidade adequadas dos plasmídeos. Também foi possível obter sequências de cDNA confiáveis e alta qualidade dos genes codificadores das subunidades do canal de sódio Nav1.1.
- O desenho experimental da mutagênese no cDNA do gene *SCN1A*, a transformação e clonagem bacterianas nos permitiram obter três plasmídeos diferentes, cada um deles contendo uma mutação de interesse, além de apresentar qualidade, concentração e sequências satisfatórias.
- A transfecção heteróloga nos permitiu criar a célula modelo em HEK-293T expressando o canal de sódio Nav1.1 dos tipos selvagem e mutante, evidenciado pela presença de corrente de íons de sódio.
- Estudos de eletrofisiologia celular das três mutações em *SCN1A* encontradas em pacientes com Síndrome de Dravet, c.5177G>A, c.5329delG e c.5434T>C que levam à formação de proteínas mutantes W1726X, V1777fsX1778 e W1812R respectivamente, mostraram resultados que indicam que a densidade de corrente diminui notavelmente. Portanto, parece haver uma perda de função no canal de sódio formado pelas proteínas mutantes. Concluímos que a perda de função detectada provavelmente levará à Síndrome de Dravet em pacientes portadores das mutações estudadas.

7. REFERÊNCIAS

1. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014;55(4):475-82.
2. Institute of Medicine (US) Committee on the Public Health Dimensions of the Epilepsies. *Epilepsy Across the Spectrum: Promoting Health and Understanding* [Internet]. England MJ, Liverman CT, Schultz AM, Strawbridge LM, editores. Washington (DC): National Academies Press (US); 2012 [citado 9 de septiembre de 2022]. (The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK91506/>
3. Berg AT, Shinnar S, Levy SR, Testa FM. Newly Diagnosed Epilepsy in Children: Presentation at Diagnosis. *Epilepsia*. 1999;40(4):445-52.
4. Hauser WA, Annegers JF, Rocca WA. Descriptive Epidemiology of Epilepsy: Contributions of Population-Based Studies From Rochester, Minnesota. *Mayo Clin Proc*. 1 de junio de 1996;71(6):576-86.
5. McTague A, Howell KB, Cross JH, Kurian MA, Scheffer IE. The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *Lancet Neurol*. marzo de 2016;15(3):304-16.
6. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*. abril de 2010;51(4):676-85.
7. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. abril de 2017;58(4):512-21.
8. Specchio N, Curatolo P. Developmental and epileptic encephalopathies: what we do and do not know. *Brain J Neurol*. 12 de febrero de 2021;144(1):32-43.
9. Keezer MR, Sisodiya SM, Sander JW. Comorbidities of epilepsy: current concepts and future perspectives. *Lancet Neurol*. enero de 2016;15(1):106-15.
10. Tavyev Asher YJ, Scaglia F. Molecular bases and clinical spectrum of early infantile epileptic encephalopathies. *Eur J Med Genet*. mayo de 2012;55(5):299-306.
11. Lennox WG. The heredity of epilepsy as told by relatives and twins. *J Am Med Assoc*. 9 de junio de 1951;146(6):529-36.

12. Metrakos K, Metrakos JD. Genetics of convulsive disorders. II. Genetic and electroencephalographic studies in centrencephalic epilepsy. *Neurology*. junio de 1961;11:474-83.
13. Peljto AL, Barker-Cummings C, Vasoli VM, Leibson CL, Hauser WA, Buchhalter JR, et al. Familial risk of epilepsy: a population-based study. *Brain*. 1 de marzo de 2014;137(3):795-805.
14. Rees MI. The genetics of epilepsy—The past, the present and future. *Seizure*. 1 de diciembre de 2010;19(10):680-3.
15. Meisler MH, O'Brien JE, Sharkey LM. Sodium channel gene family: epilepsy mutations, gene interactions and modifier effects. *J Physiol*. 2010;588(11):1841-8.
16. Poduri A, Lowenstein D. Epilepsy genetics—past, present, and future. *Curr Opin Genet Dev*. 1 de junio de 2011;21(3):325-32.
17. Lopes-Cendes I, Oliveira Ribeiro PA. Aspectos genéticos das epilepsias: uma visão atual. *Rev Médica Clínica Las Condes*. 1 de noviembre de 2013;24(6):903-8.
18. Scheffer IE, Berkovic SF, Bhatia KP, Fish DR, Marsden CD, Lopes-Cendes I, et al. Autosomal dominant frontal epilepsy misdiagnosed as sleep disorder. *The Lancet*. 26 de febrero de 1994;343(8896):515-7.
19. Charlier C, Singh NA, Ryan SG, Lewis TB, Reus BE, Leach RJ, et al. A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet*. enero de 1998;18(1):53-5.
20. Kearney JA. Advances in Epilepsy Genetics and Genomics: Advances in Epilepsy Genetics and Genomics. *Epilepsy Curr*. 1 de julio de 2012;12(4):143-6.
21. Myers KA, Johnstone DL, Dymont DA. Epilepsy genetics: Current knowledge, applications, and future directions. *Clin Genet*. 2019;95(1):95-111.
22. Dravet C, Oguni H. Dravet syndrome (severe myoclonic epilepsy in infancy). *Handb Clin Neurol*. 2013;111:627-33.
23. Wu YW, Sullivan J, McDaniel SS, Meisler MH, Walsh EM, Li SX, et al. Incidence of Dravet Syndrome in a US Population. *Pediatrics*. noviembre de 2015;136(5):e1310-1315.
24. Mulley JC, Scheffer IE, Petrou S, Dibbens LM, Berkovic SF, Harkin LA. SCN1A mutations and epilepsy. *Hum Mutat*. 2005;25(6):535-42.
25. Catterall WA. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *J Physiol*. 2013;2577-89.
26. Lossin C, Wang DW, Rhodes TH, Vanoye CG, George AL. Molecular basis of an inherited epilepsy. *Neuron*. 13 de junio de 2002;34(6):877-84.

27. Xu X jing, Zhang Y hua, Sun H hui, Liu X yan, Jiang Y wu, Wu X ru. [Genetic and phenotypic characteristics of SCN1A mutations in Dravet syndrome]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi Chin J Med Genet.* diciembre de 2012;29(6):625-30.
28. Brunklaus A, Ellis R, Stewart H, Aylett S, Reavey E, Jefferson R, 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 EJPJ Off J Eur Paediatr Neurol Soc.* julio de 2015;19(4):484-8.
29. Meng H, Xu HQ, Yu L, Lin GW, He N, Su T, et al. The SCN1A mutation database: updating information and analysis of the relationships among genotype, functional alteration, and phenotype. *Hum Mutat.* junio de 2015;36(6):573-80.
30. Dravet C. The core Dravet syndrome phenotype. *Epilepsia.* 2011;52(s2):3-9.
31. Preto PM, Guimarães CA, Yasuda CL, Schmutzler KMRS, Gonzalez M, Montenegro MA, et al. Clinical and EEG profile in Dravet and Doose syndromes. *J Pediatr Epilepsy.* 1 de enero de 2012;1(1):43-9.
32. Ms C, A M, De C, Jm M, A S, K F, et al. Mortality in Dravet syndrome. *Epilepsy Res [Internet].* diciembre de 2016 [citado 10 de enero de 2023];128. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27810515/>
33. Jv S, Kp W, O P, B W, P C. Dravet syndrome and parent associations: the IDEA League experience with comorbid conditions, mortality, management, adaptation, and grief. *Epilepsia [Internet].* abril de 2011 [citado 10 de enero de 2023];52 Suppl 2. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21463290/>
34. Auerbach DS, Jones J, Clawson BC, Offord J, Lenk GM, Ogiwara I, et al. Altered cardiac electrophysiology and SUDEP in a model of Dravet syndrome. *PloS One.* 2013;8(10):e77843.
35. Miller IO, Sotero de Menezes MA. SCN1A Seizure Disorders. En: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, et al., editores. *GeneReviews® [Internet].* Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [citado 10 de enero de 2023]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1318/>
36. Ducros A. Genetics of migraine. *Rev Neurol (Paris).* septiembre de 2021;177(7):801-8.
37. Catterall WA. Dravet Syndrome: A Sodium Channel Interneuronopathy. *Curr Opin Physiol.* abril de 2018;2:42-50.
38. Catterall WA. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol Rev.* 1 de diciembre de 2005;57(4):411-25.

39. Wallace RH, Scheffer IE, Barnett S, Richards M, Dibbens L, Desai RR, et al. Neuronal Sodium-Channel α 1-Subunit Mutations in Generalized Epilepsy with Febrile Seizures Plus. *Am J Hum Genet.* 1 de abril de 2001;68(4):859-65.
40. Hiyama TY, Watanabe E, Ono K, Inenaga K, Tamkun MM, Yoshida S, et al. Na^x channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nat Neurosci.* junio de 2002;5(6):511-2.
41. Yu FH, Catterall WA. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol.* 24 de febrero de 2003;4(3):207.
42. Lorentz MN, Stokes AN, Rößler DC, Lötters S. Tetrodotoxin. *Curr Biol.* 10 de octubre de 2016;26(19):R870-2.
43. Bane V, Lehane M, Dikshit M, O'Riordan A, Furey A. Tetrodotoxin: chemistry, toxicity, source, distribution and detection. *Toxins.* 21 de febrero de 2014;6(2):693-755.
44. Lago J, Rodríguez LP, Blanco L, Vieites JM, Cabado AG. Tetrodotoxin, an Extremely Potent Marine Neurotoxin: Distribution, Toxicity, Origin and Therapeutical Uses. *Mar Drugs.* 19 de octubre de 2015;13(10):6384-406.
45. Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron.* 2000;26(1):13-25.
46. Isom LL. THE ROLE OF SODIUM CHANNELS IN CELL ADHESION. :13.
47. Hull JM, Isom LL. Voltage-gated sodium channel β subunits: The power outside the pore in brain development and disease. *Neuropharmacology.* abril de 2018;132:43-57.
48. Klugbauer N, Lacinova L, Flockerzi V, Hofmann F. Structure and functional expression of a new member of the tetrodotoxin-sensitive voltage-activated sodium channel family from human neuroendocrine cells. *EMBO J.* 1 de marzo de 1995;14(6):1084-90.
49. Beckh S. Differential expression of sodium channel mRNAs in rat peripheral nervous system and innervated tissues. *FEBS Lett.* 1990;262(2):317-22.
50. Fagerberg L, Hallström BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, et al. Analysis of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide Integration of Transcriptomics and Antibody-based Proteomics. *Mol Cell Proteomics MCP.* febrero de 2014;13(2):397-406.
51. Isom LL, Jongh KD, Patton DE, Reber BF, Offord J, Charbonneau H, et al. Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science.* 8 de mayo de 1992;256(5058):839-42.
52. Patino GA, Claes LRF, Lopez-Santiago LF, Slat EA, Dondeti RSR, Chen C, et al. A Functional Null Mutation of SCN1B in a Patient with Dravet Syndrome. *J Neurosci.* 26 de agosto de 2009;29(34):10764-78.

53. Watanabe H, Darbar D, Kaiser DW, Jiramongkolchai K, Chopra S, Donahue BS, et al. Mutations in sodium channel β 1- and β 2-subunits associated with atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* junio de 2009;2(3):268-75.
54. Wollner DA, Messner DJ, Catterall WA. Beta 2 subunits of sodium channels from vertebrate brain. Studies with subunit-specific antibodies. *J Biol Chem.* 25 de octubre de 1987;262(30):14709-15.
55. Riuró H, Beltran-Alvarez P, Tarradas A, Selga E, Campuzano O, Vergés M, et al. A Missense Mutation in the Sodium Channel β 2 Subunit Reveals SCN2B as a New Candidate Gene for Brugada Syndrome. *Hum Mutat.* 2013;34(7):961-6.
56. Catterall WA, Raman IM, Robinson HPC, Sejnowski TJ, Paulsen O. The Hodgkin-Huxley heritage: from channels to circuits. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 10 de octubre de 2012;32(41):14064-73.
57. Balse JR. The cardiac sodium channel: gating function and molecular pharmacology. *J Mol Cell Cardiol.* abril de 2001;33(4):599-613.
58. Yarov-Yarovoy V, DeCaen PG, Westenbroek RE, Pan CY, Scheuer T, Baker D, et al. Structural basis for gating charge movement in the voltage sensor of a sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 10 de enero de 2012;109(2):E93-102.
59. Armstrong CM. Sodium channels and gating currents. *Physiol Rev.* julio de 1981;61(3):644-83.
60. Eaholtz G, Scheuer T, Catterall WA. Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron.* mayo de 1994;12(5):1041-8.
61. Stühmer W, Conti F, Suzuki H, Wang XD, Noda M, Yahagi N, et al. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature.* 22 de junio de 1989;339(6226):597-603.
62. Patton DE, West JW, Catterall WA, Goldin AL. Amino acid residues required for fast Na(+)-channel inactivation: charge neutralizations and deletions in the III-IV linker. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 de noviembre de 1992;89(22):10905-9.
63. McPhee JC, Ragsdale DS, Scheuer T, Catterall WA. A critical role for transmembrane segment IVS6 of the sodium channel alpha subunit in fast inactivation. *J Biol Chem.* 19 de mayo de 1995;270(20):12025-34.
64. West JW, Patton DE, Scheuer T, Wang Y, Goldin AL, Catterall WA. A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na(+)-channel inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 de noviembre de 1992;89(22):10910-4.

65. Motoike HK, Liu H, Glaaser IW, Yang AS, Tateyama M, Kass RS. The Na⁺ channel inactivation gate is a molecular complex: a novel role of the COOH-terminal domain. *J Gen Physiol.* febrero de 2004;123(2):155-65.
66. Sakmann B, Neher E. Patch Clamp Techniques for Studying Ionic Channels in Excitable Membranes. *Annu Rev Physiol.* 1984;46(1):455-72.
67. Auerbach A, Sachs F. Patch Clamp Studies of Single Ionic Channels. *Annu Rev Biophys Bioeng.* 1984;13(1):269-302.
68. Hill CL, Stephens GJ. An Introduction to Patch Clamp Recording. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2021;2188:1-19.
69. Kornreich BG. The patch clamp technique: principles and technical considerations. *J Vet Cardiol Off J Eur Soc Vet Cardiol.* mayo de 2007;9(1):25-37.
70. Boron WF, Boulpaep EL. *Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach.* Saunders/Elsevier; 2012. 1337 p.
71. de Lera Ruiz M, Kraus RL. Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *J Med Chem.* 24 de septiembre de 2015;58(18):7093-118.
72. Hille B. *Ionic Channels of Excitable Membranes.* Sinauer; 2001. 814 p.
73. Xu L, Ding X, Wang T, Mou S, Sun H, Hou T. Voltage-gated sodium channels: structures, functions, and molecular modeling. *Drug Discov Today.* 1 de julio de 2019;24(7):1389-97.
74. Higurashi N, Uchida T, Lossin C, Misumi Y, Okada Y, Akamatsu W, et al. A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells. *Mol Brain.* 2 de mayo de 2013;6:19.
75. Bell DC, Fermini B. Use of automated patch clamp in cardiac safety assessment: Past, present & future perspectives. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1 de septiembre de 2021;111:107114.
76. Schutte SS, Schutte RJ, Barragan EV, O'Dowd DK. Model systems for studying cellular mechanisms of SCN1A-related epilepsy. *J Neurophysiol.* 3 de febrero de 2016;115(4):1755-66.
77. Mantegazza M, Broccoli V. SCN1A/NaV 1.1 channelopathies: Mechanisms in expression systems, animal models, and human iPSC models. *Epilepsia.* diciembre de 2019;60 Suppl 3:S25-38.
78. Liu S, Zheng P. Altered PKA modulation in the Nav1.1 epilepsy variant I1656M. *J Neurophysiol.* 14 de agosto de 2013;110(9):2090-8.
79. de la Roche J, Angsutararux P, Kempf H, Janan M, Bolesani E, Thiemann S, et al. Comparing human iPSC-cardiomyocytes versus HEK293T cells unveils

- disease-causing effects of Brugada mutation A735V of NaV1.5 sodium channels. *Sci Rep.* 1 de agosto de 2019;9(1):11173.
80. Ooi A, Wong A, Esau L, Lemtiri-Chlieh F, Gehring C. A Guide to Transient Expression of Membrane Proteins in HEK-293 Cells for Functional Characterization. *Front Physiol.* 2016;7:300.
 81. Griffin A, Hamling KR, Hong S, Anvar M, Lee LP, Baraban SC. Preclinical Animal Models for Dravet Syndrome: Seizure Phenotypes, Comorbidities and Drug Screening. *Front Pharmacol.* 2018;9:573.
 82. Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods.* junio de 2005;51(3):187-200.
 83. Hazan A, Kumar R, Matzner H, Priel A. The pain receptor TRPV1 displays agonist-dependent activation stoichiometry. *Sci Rep.* 21 de julio de 2015;5:12278.
 84. Martinez-Moreno R, Selga E, Riuró H, Carreras D, Parnes M, Srinivasan C, et al. An SCN1B Variant Affects Both Cardiac-Type (NaV1.5) and Brain-Type (NaV1.1) Sodium Currents and Contributes to Complex Concomitant Brain and Cardiac Disorders. *Front Cell Dev Biol.* 29 de septiembre de 2020;8:528742.
 85. Li T, Lu G, Chiang EY, Chernov-Rogan T, Grogan JL, Chen J. High-throughput electrophysiological assays for voltage gated ion channels using SyncroPatch 768PE. *PLoS One.* 2017;12(7):e0180154.
 86. DeKeyser JM, Thompson CH, George AL. Cryptic prokaryotic promoters explain instability of recombinant neuronal sodium channels in bacteria. *J Biol Chem.* 15 de enero de 2021;296:100298.
 87. Feldman DH, Lossin C. The Nav channel bench series: Plasmid preparation. *MethodsX.* 1 de febrero de 2014;1:6-11.
 88. Silva F, Queiroz JA, Domingues FC. Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*. *Biotechnol Adv.* junio de 2012;30(3):691-708.
 89. Thompson CH, Porter JC, Kahlig KM, Daniels MA, George AL. Nontruncating SCN1A Mutations Associated with Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy Impair Cell Surface Expression. *J Biol Chem.* 7 de diciembre de 2012;287(50):42001-8.
 90. Wang JY, Tang B, Sheng WX, Hua LD, Zeng Y, Fan CX, et al. Clinical and Functional Features of Epilepsy-Associated In-Frame Deletion Variants in SCN1A. *Front Mol Neurosci.* 2022;15:828846.
 91. Sanders CR, Myers JK. Disease-Related Misassembly of Membrane Proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2004;33(1):25-51.

92. Fukuma G, Oguni H, Shirasaka Y, Watanabe K, Miyajima T, Yasumoto S, et al. Mutations of Neuronal Voltage-gated Na⁺ Channel α 1 Subunit Gene SCN1A in Core Severe Myoclonic Epilepsy in Infancy (SMEI) and in Borderline SMEI (SMEB). *Epilepsia*. 2004;45(2):140-8.
93. Sottas V, Abriel H. Negative-dominance phenomenon with genetic variants of the cardiac sodium channel Nav1.5. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 1 de julio de 2016;1863(7, Part B):1791-8.
94. Spampinato J, Kearney JA, de Haan G, McEwen DP, Escayg A, Aradi I, et al. A novel epilepsy mutation in the sodium channel SCN1A identifies a cytoplasmic domain for beta subunit interaction. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 3 de noviembre de 2004;24(44):10022-34.
95. Rhodes TH, Vanoye CG, Ohmori I, Ogiwara I, Yamakawa K, George AL. Sodium channel dysfunction in intractable childhood epilepsy with generalized tonic-clonic seizures. *J Physiol*. 1 de diciembre de 2005;569(Pt 2):433-45.
96. Catterall WA, Kalume F, Oakley JC. NaV1.1 channels and epilepsy. *J Physiol*. 1 de junio de 2010;588(Pt 11):1849-59.
97. Brunklaus A, Lal D. Sodium channel epilepsies and neurodevelopmental disorders: from disease mechanisms to clinical application. *Dev Med Child Neurol*. julio de 2020;62(7):784-92.

8. ANEXOS

8.1. PARECER APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



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: 25

CAAE: 12112913.3.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.600.574

Apresentação do Projeto:

Solicitação de emenda ao projeto original.

Segundo o documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1714813_E14.pdf 09/03/2021, Justificativa da Emenda:

1. Inclusão dos nomes listados abaixo como parte da equipe do projeto: a. Patricia Aline Oliveira Ribeiro de Aguiar: Assistente de Pesquisa. Servidora, bióloga do Laboratório de Genética Molecular da FCMUNICAMP. Ela será juntamente comigo a responsável pela inclusão de documentos e emendas ao projeto na Plataforma Brasil. b. Guilherme Rossi Assis de Mendonça: pesquisador de pós-doutorado. Atuará no subprojeto I - "Epilepsias, Crises Febris e Malformações do Desenvolvimento Cortical", sob supervisão do Prof. Dr. Fabio Rogerio do departamento de Patologia da FCM-UNICAMP. c. Ingrid Carolina da Silva Cardoso: aluna de iniciação científica. Atuará no subprojeto I - "Epilepsias, Crises Febris e Malformações do Desenvolvimento Cortical", sob a orientação do Prof. Dr. Fabio Rogerio do departamento de Patologia da FCM-UNICAMP. Informo ainda que não houve alteração dos objetivos, métodos e previsão de riscos e benefícios do projeto. Além disso, o TCLE não foi alterado

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-867

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.600.574

Objetivo da Pesquisa:

Inalterados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Inalterados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto original aprovado em 26 de Abril de 2013, parecer 252.068.

A emenda solicita:

Inclusão dos nomes listados abaixo como parte da equipe do projeto:

- a. Patrícia Aline Oliveira Ribeiro de Aguiar: Assistente de Pesquisa. Servidora, bióloga do Laboratório de Genética Molecular da FCM-UNICAMP. Ela será juntamente comigo a responsável pela inclusão de documentos e emendas ao projeto na Plataforma Brasil.
- b. Guilherme Rossi Assis de Mendonça: pesquisador de pós-doutorado. Atuará no subprojeto I- "Epilepsias, Crises Febris e Malformações do Desenvolvimento Cortical", sob supervisão do Prof. Dr. Fabio Rogerio do departamento de Patologia da FCM-UNICAMP.
- c. Ingrid Carolina da Silva Cardoso: aluna de iniciação científica. Atuará no subprojeto I - "Epilepsias, Crises Febris e Malformações do Desenvolvimento Cortical", sob a orientação do Prof. Dr. Fabio Rogerio do departamento de Patologia da FCM-UNICAMP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1714813_E14.pdf 09/03/2021: com a justificativa da emenda.
- Carta.pdf 09/03/2021: carta ao CEP detalhando as alterações da emenda.

Recomendações:

Enviar relatório parcial de acompanhamento do projeto como notificação ao CEP em formulário adequado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o CEP –PRP – UNICAMP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 do CNS, 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,

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: 4.600.574

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 semestrais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMACOES_BASICAS_171481	09/03/2021		Aceito

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: 4.600.574

Básicas do Projeto	_E14.pdf	09:21:46		Aceito
Outros	Carta.pdf	09/03/2021 09:19:11	Isclia Teresinha Lopes Cendes	Aceito
Outros	TALE.pdf	30/09/2020 11:18:30	Isclia Teresinha Lopes Cendes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	30/09/2020 11:18:03	Isclia Teresinha Lopes Cendes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	30/09/2020 11:16:12	Isclia 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, 19 de Março de 2021

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

8.2. PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA EM PESQUIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA

Processo CIBIO/FCM: 09/2019

Docente Responsável: Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes

Departamento: Genética Médica

Laboratório: Laboratório de Genética Molecular

PARECER

Trata-se de solicitação de credenciamento junto ao CIBIO para o projeto de pesquisa intitulado “Caracterização funcional de mutações em canais de sódio associadas a epilepsia”. O objetivo do grupo é avaliar a patogênese molecular de mutações no gene *SCN1A* em linhagem celular TSA 201 usando técnicas de eletrofisiologia. Assim irão realizar a análise funcional, por estudos *in vitro*, de Nav1.1 com mutações encontradas em pacientes e introduzir quatro mutações em *SCN1A*, usando ferramentas de edição genética e realizar medidas biofísicas, a fim de caracterizar a função de canal iônico. Para este estudo irão utilizar as linhagens celulares adquiridas comercialmente: *E. coli* Neb Stable (New England Biolabs), *E. coli* Stb12 (ThermoFisher), *E. coli* DH α 5 (ThermoFisher), HEK293 (Sigma), TSA201 (Sigma) e COS-7 (Sigma). Também usarão os plasmídeos nativos: pCMV-SCN1A, pCD8-IRES-h β 1 e pGFP-IRES-h β 2; e os Plasmídeos mutantes: pCMV-SCN1A_5434, pCMV-SCN1A_5329, pCMV-SCN1A_5864 e pCMV-SCN1A_5177. São OGMs classificados como nível de biossegurança NB-1, em contenção e não objetiva liberação posterior no meio ambiente. Todos os procedimentos serão realizados em fluxo laminar e as etapas serão acompanhadas por desinfecção de área com álcool 70% antes e após o uso, materiais descartáveis serão autoclavados e descartados em sanito próprio (material infectante) para posterior incineração, garantindo a destruição total do material genético. As informações e o material fornecido comprovam que o laboratório tem nível de segurança e está adequadamente preparado para o trabalho com os OGMs do grupo I. Ficou também demonstrado, na documentação fornecida, que o grupo possui treinamento em questões de segurança para o trabalho com OGMs do grupo I.

Conclusão: APROVADO

Lista de pendências ou adequações: Não há

Necessita de vistoria? Não

Aprovado em reunião da CIBIO/FCM em 10 de dezembro de 2019.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA

A CIBIO/FCM analisa apenas as questões relativas à biossegurança dos projetos de acordo com a legislação vigente no país para o trabalho com OGMs. Não avaliamos questões éticas dos projetos de pesquisa submetidos. Essas questões devem ser avaliadas e aprovadas pelos órgãos competentes.

A CIBIO/FCM apenas avalia projetos sob responsabilidade dos docentes e pesquisadores vinculados à FCM-UNICAMP ou aqueles desenvolvidos em laboratório devidamente cadastrado na Comissão de Pesquisa da FCM-UNICAMP e que tenham aprovação escrita do docente responsável pelo laboratório perante a FCM.

Dioze Guadagnini - membro CIBIO/FCM

Íscia Lopes Cendés – Coordenadora CIBIO/FCM