

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

***Análise do gene *TUBB3* e de *Copy Number*
Variations em pacientes com Polimicrogria***

Marcella Gonçalves Mazutti

Monografia apresentada à UNESP, Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, para obtenção do título
de Bacharel em Ciências Biológicas



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA

Análise do gene *TUBB3* e de *Copy Number Variations* em pacientes com Polimicrogria

Marcella Gonçalves Mazutti

Orientadora: Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes

Monografia apresentada à UNESP, Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, para obtenção do título
de Bacharel em Ciências Biológicas

**Campinas – SP
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Mazutti, Marcella.

Análise do gene TUBB3 e de Copy Number Variations em pacientes com polimicrogiria / Marcella Mazutti. - Botucatu, 2013

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Iscia Lopes Cendes

Coorientador: Fabio Rossi Torres

Capes: 20205007

1. Polimicrogiria - Prognóstico. 2. Córtex cerebral - Anomalias. 3. Cérebro - Doenças - Diagnóstico. 4. Anomalias humanas. 5. Síndrome Perisylviana. 6. Reação em cadeia de polimerase.

Palavras-chave: Copy Number Variations; Gene TUBB3; Polimicrogiria.

AGRADECIMENTOS:

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha mãe, Roseli Gatti Gonçalves, aquela que esteve ao meu lado em todos os momentos, que sempre me apoiou em todas as minhas decisões, concordando ou não com elas, que me ajudou a enfrentar todas as dificuldades e que vibrou comigo nas minhas conquistas e em todos os meus bons momentos, que abriu mão de tantas coisas para que eu pudesse realizar meus sonhos, como se a minha felicidade fosse também a dela, em mesmo grau e intensidade. Obrigada mãe, por me ensinar tanto, por me motivar sempre com a sua inteligência e coragem. Com certeza eu não teria essa conquista e não seria nem a metade do que sou sem você. Agradeço também a toda minha família pelo apoio e pela união.

Agradeço a família que acabei ganhando de coração, a todas as meninas da República Naxincha pelos anos de aprendizagem e crescimento, pela amizade, pela parceria, pelas risadas, pelos conselhos, por todos os momentos especiais e pelas diferenças que tornaram cada uma de vocês únicas!

Agradeço ao meu namorado, Pedro Baseio, que acompanhou cada passo dessa fase de mudanças, que sempre esteve ao meu lado e me ajudou a enxergar tantas coisas boas. Obrigada meu amor, por todos os seus conselhos, toda a força e companheirismo, por sempre ser meu porto seguro!

Agradeço a minha orientadora, Iscia Lopes Cendes, pela confiança e oportunidade de aprender com uma grande equipe e fazer parte de um laboratório de excelência.

Gostaria de agradecer a cada um do Laboratório de Genética Molecular, pela recepção incrível que me deram, por todo carinho e aprendizagem.

Em especial, um muito obrigada ao meu co-orientador, Fábio Rossi Torres, pelo ensinamento indescritível, pela paciência de me ensinar desde o começo as coisas mais básicas da prática do laboratório e das teorias. Obrigada por me passar todo esse conhecimento, agradeço pela sua enorme confiança e por toda a atenção!

Por fim, agradeço a Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP por me receber e proporcionar a realização deste trabalho. Também agradeço ao Instituto de

Biociências da UNESP e a todos os seus docentes, os quais me proporcionaram uma educação de qualidade, contribuindo significativamente para minha formação em Ciências Biológicas.

SUMÁRIO

RESUMO	7
INTRODUÇÃO.....	9
OBJETIVOS.....	19
MATERIAL E MÉTODOS.....	20
RESULTADOS.....	28
DISCUSSÃO.....	51
CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

RESUMO

A polimicrogiria (PMG) é uma malformação do córtex cerebral causada por falhas no seu desenvolvimento, caracterizando-se por um número excessivo de pequenos giros e laminação anormal, dando à superfície cortical uma aparência irregular e grosseira. A gravidade de suas manifestações clínicas se relaciona diretamente com a extensão da malformação e das regiões cerebrais afetadas, sendo que a presença de lesões bilaterais ou unilaterais extensas indica um pior prognóstico. Uma das síndromes de polimicrogiria mais freqüentes e, conseqüentemente, mais bem descritas clinicamente, é a polimicrogiria perisylviana bilateral (PPB). Essa forma de PMG atinge a região que tange a fenda Sylviana, podendo apresentar-se tanto unilateralmente quanto em ambos os hemisférios. Vários genes têm sido relacionados a diferentes formas de polimicrogiria, são eles *AFF2*, *TUBA1A*, *TUBB2B* e *TUBA8*, *SRPX2* e *WDR62*. Estes genes já foram estudados pelo nosso grupo de pesquisa em um grupo de pacientes compostos de casos familiares e esporádicos, acometidos em sua maioria pela forma perisylviana de PMG. Nenhuma variante deletéria foi identificada nestes genes. Recentemente um novo gene foi implicado na etiologia molecular das PMG, o *TUBB3*. O gene em questão pertence à mesma família de *TUBA1A*, *TUBB2B* e *TUBA8* e codifica uma proteína de ligação aos microtúbulos, tendo importante papel na formação do fuso. Além deste gene, também tem sido descritas alterações genômicas, denominadas de *Copy Number Variations* (CNV), estas variações estruturais tem sido associadas com diversos distúrbios neurológicos, que vão desde transtornos psiquiátricos até malformações do córtex cerebral como a PMG. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar a existência de alterações de ponto deletérias no gene *TUBB3* em pacientes com PMG e também, o envolvimento de CNVs na etiologia deste tipo de malformação cortical. A análise do gene *TUBB3* foi realizada por amplificação dos exons codificantes pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e seqüenciamento direto dos produtos de amplificação pela técnica de Sanger em um ABI3500XL (Life Technologies Corporation). As variantes identificadas foram caracterizadas através de *softwares* de bioinformática para estimar o potencial patogênico das mesmas. Os pacientes negativos para alterações deletérias em *TUBB3* (e nos demais genes candidatos realizados em outros trabalhos) foram analisados para CNVs com o *kitCytoScan HD* (Affymetrix) seguindo recomendações do fabricante. A análise dos CNVs identificados foi realizada com o *software Chromosome Suite* (Affymetrix) eo potencial patogênico dos mesmos

foi aferido através de consulta de base de dados como DGV e Decipher. Assim, a partir do seqüenciamento do gene *TUBB3* por eletroforese capilar, foram identificadas alterações nos quatro exons do gene, no entanto apenas uma delas ainda não era descrita no banco de dados *Ensembl*, mas como se encontra na região intrônica, a probabilidade de possuir um potencial patogênico é baixa, assim como o restante das alterações. Com a análise das CNVs, identificamos diversas alterações estruturais, tanto de ganho como de perda, algumas delas foram consideradas como inéditas por não serem descritas anteriormente em banco de dados (DGV). Os resultados deste trabalho sugeriram novas hipóteses, as quais poderão contribuir em análises futuras acerca da etiologia das PMGs.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Desenvolvimento do Córtex Cerebral

O córtex cerebral é uma estrutura modular que possui o início de sua formação marcado por uma combinação de sinais que resultam na indução de grupos de neurônios na camada neuroepitelial que irão sofrer, posteriormente, outros processos funcionais. [1,2,3,4]

Os mecanismos relacionados com o desenvolvimento do córtex são extremamente complexos, envolvendo aproximadamente 100 bilhões de neurônios que migram pelo encéfalo e se organizam em um quadrilhão de sinapses. Todo esse processo é regulado por uma ação recíproca entre mecanismos genéticos intrínsecos e informações extrínsecas transmitidas ao córtex. Assim, fatores genéticos e ambientais podem ser influentes na ocorrência de distúrbios do desenvolvimento cortical [5;6;7]

O desenvolvimento do córtex cerebral humano é um processo que depende de uma eficiente maquinaria molecular e bioquímica para atingir o grau de organização apresentado pelas suas camadas neuronais [8,9]. Estes neurônios irão se diferenciar, migrar e se organizar no córtex adulto. Desta forma, podemos dividir a formação cortical em três grandes estágios que se sobrepõem: proliferação, migração e organização celular [10].

A fase de proliferação tem início na 5^a - 6^a semanas, ocorrendo até a 6^a - 20^a semanas de gestação. No início da corticogênese, células neuroepiteliais sofrem sucessivas divisões simétricas, aumentando a quantidade de células progenitoras. Posteriormente, as células neuroepiteliais se diferenciam em células da glia que, por sua vez, sofrem divisões assimétricas originando novas células gliais e progenitores intermediários. Estes últimos se dividem simetricamente para dar origem aos neurônios [11].

Os neurônios recém-formados devem migrar para seus destinos finais, caracterizando a fase de migração, que ocorre da 6^a - 7^a a 20^a - 24^a semanas de gestação. A migração celular ocorre através da movimentação dos neurônios corticais, tanto radialmente pelas fibras radiais gliais, quanto tangencialmente paralelo à superfície pial. Durante os estágios iniciais da migração, as células passam por um estágio chamado de multipolar, passando posteriormente, por uma fase de transição, na qual os neurônios adotam uma conformação bipolar e migram através das fibras radiais gliais. As

primeiras células que migram formarão a pré-placa. As demais ondas migratórias de neurônios irão, então, formar a placa cortical que irá dividir a pré-placa em uma camada mais externa denominada de zona marginal e uma camada mais interna chamada de sub-placa. Ao chegarem à placa cortical, os neurônios se organizam em camadas que irão se desenvolver no córtex adulto. Este processo segue um padrão chamado de “*inside-out*”, no qual os neurônios recém-chegados à placa cortical ultrapassam os neurônios mais antigos, acumulando-se progressivamente em camadas mais superficiais (Figura 1) [12]. Quando o estágio de migração se finaliza, o córtex passa a ser uma estrutura com seis camadas, com cada uma delas compreendendo diferentes tipos de neurônios, os quais se destinarão a funções distintas. Todas essas etapas ocorrem de uma maneira dinâmica e mais de um estágio pode ocorrer simultaneamente durante várias semanas de gestação [13].

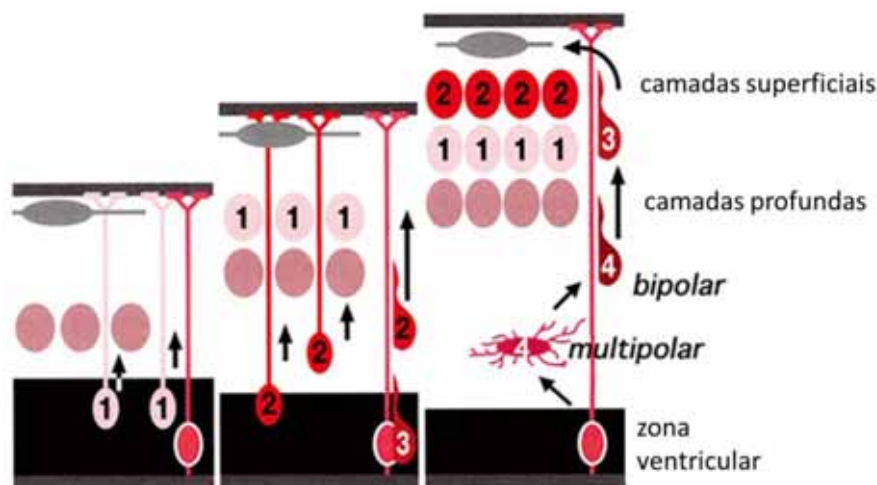


Figura 1: Exemplificação do processo *inside-out* na fase de migração neuronal e transição morfológica dos neurônios. Os neurônios recém-chegados à placa cortical [2] ultrapassam os neurônios mais antigos [1], acumulando-se progressivamente em camadas mais superficiais [3]. Os estágios multipolar e bipolar [4] mostram a transição morfológica sofrida pelas células no início da migração (adaptado de Riken)[14].

A fase de organização se inicia na 16ª semana de gestação e continua a acontecer mesmo após o nascimento [13]. Este estágio envolve processos de extensão de neuritos (axônios e dendritos), sinaptogênese e maturação neuronal, que irão resultar em uma

rede de ligações específicas entre as células, dando início à formação do neocórtex [4,15].

Qualquer alteração em algum desses três estágios pode resultar em diversas anomalias, desde a produção de células aberrantes em seu tamanho e morfologia, até um posicionamento errôneo dos neurônios [13]. Essas anormalidades são classificadas como malformações do desenvolvimento cortical.

1.2 Malformações do Desenvolvimento Cortical e Epilepsia

Em 1873, Camilo Golgi instaurou uma técnica que consistia na fixação e impregnação de células do tecido nervoso por prata. Em 1880 a aplicação desta técnica deu origem a um famoso artigo, o qual possuía minuciosas descrições de células nervosas de diferentes tecidos. Este fato foi o marco que deu início a uma série de investigações sobre a embriogênese dos tecidos do sistema nervoso [16]. A partir deste período, os estudos neuropatológicos avançaram de forma significativa, surgindo a primeira hipótese de que crises epiléticas podiam ser decorrentes de descargas elétricas anormais no cérebro e também, de que as malformações corticais estavam estreitamente relacionadas com a epilepsia [17,18,19].

A epilepsia é uma condição neurológica comum, que afeta de 1,5 - 2% da população mundial [20]. É considerada como um distúrbio crônico caracterizado pela presença de crises epiléticas recorrentes que são resultantes de descargas elétricas neuronais excessivas e anormais em determinada área do encéfalo [21, 22]. Possui grande variedade de manifestações clínicas, etiologias, graus variados de morbidade e prognóstico [23].

Em 1996, o termo malformações do desenvolvimento cortical (MDC) foi introduzido para designar um grupo comum de desordens em crianças com retardo no desenvolvimento e em indivíduos com epilepsia [24]. Desde então, muitos estudos foram realizados e hoje sabemos que as MDC englobam um amplo espectro de distúrbios, com diversas etiologias e manifestações clínicas. As malformações do córtex cerebral são apontadas como uma das principais causas de doença mental e epilepsia [25], estimando-se que esteja presente em até 40% das crianças com epilepsia refratária [26].

Para compreender as MDC, é importante entender as bases da embriologia do córtex cerebral. Como pode ser visualizado no tópico anterior, a interrupção ou

anormalidades durante os diversos estágios do desenvolvimento cortical podem levar as MDCs [27]. Portanto, existem pelo menos três mecanismos principais pelos quais as MDCs podem se desenvolver e que refletem as etapas embriológicas de formação do córtex: 1- anormalidades da proliferação e diferenciação de neurônios e da glia; 2- anormalidades na migração neuronal e 3- distúrbios na organização cortical [28].

A etiologia dessas malformações, muitas vezes multifatorial, pode ser devida a mutações genéticas ou influências ambientais que ocorrem na fase de desenvolvimento cortical no ambiente intraútero. O tempo, a gravidade e o tipo de influências ambientais, bem como de fatores genéticos, determinarão o tipo e a extensão da síndrome. [29; 30].

1.3 Polimicrogrias

O termo polimicrogria (PMG) define um excessivo número de pequenos giros anormais que produzem uma superfície irregular no córtex cerebral. Esse distúrbio resulta de uma anormalidade no desenvolvimento cortical, sendo um tipo comum de MDC. Seu mecanismo patogênico ainda não é totalmente compreendido, no entanto atualmente a PMG vem sendo associada com mutações em diversos genes [31].

A polimicrogria tem sido considerada há muitos anos como um espectro de transtornos os quais são unidos e classificados sob um único nome. Podemos encontrar na literatura muitas discussões sobre a polimicrogria “verdadeira” e as variantes de microgria [32,33,34]. Entretanto, o termo ainda é amplamente utilizado para descrever doenças que têm diferentes causas, diferentes conformações, associação com outros tipos de malformações e distintas aparências microscópicas, tornando-se assim, difícil de entender e classificar corretamente os distúrbios[35].

Esse distúrbio é relacionado a falhas na fase de organização cortical, incluindo o final da fase de migração (41), assim como a fase de padronização e organização do cérebro, geralmente entre a 17ª a 25-26ª semanas de gestação [36,15]

A aparência da PMG varia de acordo com a idade do paciente [37]. Em recém-nascidos e crianças, o córtex apresenta uma espessura muito fina, com múltiplas e pequenas ondulações. Após a mielinização, acontece um leve engrossamento do córtex com sutis irregularidades nas junções córtex - substância branca. As PMGs podem ser localizadas em um único giro e envolvem porções de um hemisfério, podendo ser bilaterais e assimétricas, bilateral e simétricas ou difusas [9].

Seu diagnóstico é normalmente realizado por ressonância magnética (MRI). A tomografia computadorizada (TC) e outros métodos de imagem geralmente não têm uma boa resolução ou contraste adequado para identificar os pequenos giros que definem a condição [38].

Infelizmente, pouco se sabe sobre a extensão histopatológica vista em PMG, em parte porque poucos estudos patológicos em larga escala foram executados. A escassez de dados patológicos de polimicrogiria ocorre também pelo fato de muitas vezes ela ser localizada em áreas corticais muito expressivas, assim, raramente pode-se adquirir tecido para o estudo, nos casos de cirurgias em epilepsia de difícil controle [39]. Estudos recentes sugerem uma grande heterogeneidade em seu aspecto [39, 40] e em sua microscopia [35], apoiando o conceito de que polimicrogiria é heterogênea em causa, embriogênese e características morfológicas [41]. No entanto, observa-se em estudos microscópicos que de fato o córtex cerebral é muito fino e possui uma laminação anormal. Assim, a conformação do córtex pode-se apresentar de duas maneiras: com ausência total de camadas ou com quatro camadas, ao invés das seis camadas que caracterizam o desenvolvimento cortical normal [42].

A PMG pode se apresentar de forma generalizada ou focal, unilateral ou bilateral. Pode ocorrer como uma lesão isolada ou associada com outras malformações corticais, como a heterotopia nodular periventricular [43] ou a esquizencefalia [44], ou ainda como parte de múltiplas anomalias congênitas graves [13]. Deste modo, levando em conta essas características, ela pode ser classificada em diversos subtipos, de acordo com a região cerebral afetada, alguns deles são: (A) Polimicrogiria Frontal, caracterizada pela presença de atraso cognitivo e motor e epilepsia [45]; (B) Polimicrogiria Frontoparietal, caracterizada pela presença de grave atraso cognitivo e motor, disfunção cerebelar e convulsões [46,47,48]; (C) Polimicrogiria Perisylviana, caracterizada por comprometimento cognitivo, epilepsia e em alguns casos pela presença de artrogripose e/ou doença do neurônio motor inferior [49,50,51,52,53]; (D) Polimicrogiria Parieto-occipital Parasagital, caracterizada por convulsões parciais e alguns casos com deficiências intelectuais [54]; (E) Polimicrogiria Generalizada, caracterizada por atraso cognitivo e motor de gravidade variável e convulsões [55] (Figura 2). Entretanto, sua forma mais comum é simétrica, bilateral e acomete principalmente a região perisylviana.

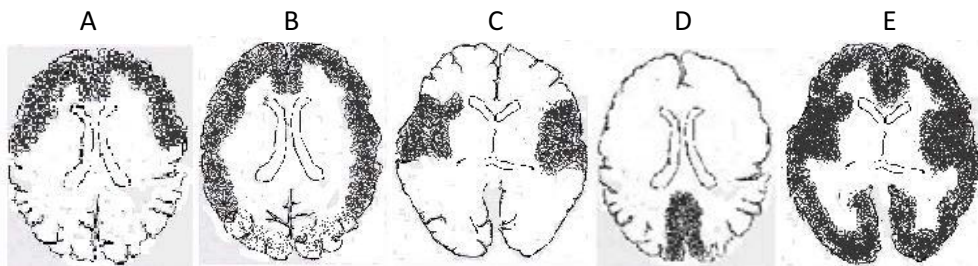


Figura 2: Desenhos ilustrativos que exemplificam a localização dos subtipos de polimicrogiria citados no texto. A- Polimicrogiria Frontal Bilateral; B- Polimicrogiria Frontoparietal Bilateral; C- Polimicrogiria Perisylviana Bilateral; D- Polimicrogiria Parieto-occipital Parassagital Bilateral; E- Polimicrogiria Generalizada Bilateral. (Adaptado de Chang et al 2004) [55].

Polimicrogiria Perisylviana Bilateral:

A polimicrogiria perisylviana bilateral (PPB), também chamada de polimicrogiria opercular bilateral ou displasia perisylviana bilateral, foi descrita inicialmente por Kuznieck *et al.* em 1993 [56], sendo a forma mais comum de polimicrogiria, apresentando espectro clínico e de neuroimagem muito amplos. Essa forma de PMG atinge bilateralmente a massa cinzenta que tange a fissura sylviana, usualmente orientadas verticalmente e estendendo-se mais posteriormente ao lobo parietal. A observação histológica ao microscópio revelou tanto a forma com quatro camadas, quanto à ausência total de camadas. Essas anormalidades, geralmente, se apresentam de forma simétrica, mas esse padrão pode variar nos pacientes [13]. Os pacientes apresentam em geral um quadro de diplegia facio-faríngeo-glosso-mastigatória, levando a prejuízo na fala e deglutição, e quando os danos são muito extensos, pode ser observado um quadro de quadriparesia espástica [57]. Além disso, a maioria dos pacientes possui quadro de retardo mental, sinais piramidais e epilepsia, com crises iniciadas, geralmente, entre quatro e 12 anos de idade. Dentro do grupo de pacientes com epilepsia, cerca de 65% têm dificuldade de controle das crises [58].

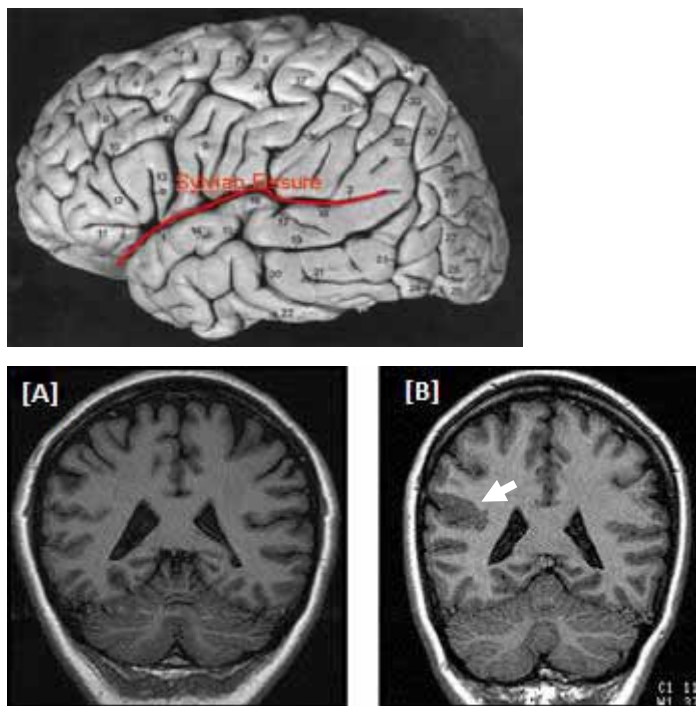


Figura 3: Na imagem superior observamos a localização da Fissura Sylviana. Logo abaixo, imagens de ressonância magnética de um indivíduo normal (A) e de outro, portador de polimicrogiria perisylviana (B – indicado pela seta).

1.4 Aspectos genéticos: Gene *TUBB3* e Malformações do Desenvolvimento Cortical

Estudos genéticos do desenvolvimento do córtex e da migração neuronal têm se caracterizado por uma grande evolução ao longo dos últimos anos, com descobertas de diversos genes que, quando mutados, causam desordens no desenvolvimento cortical [27].

A identificação de uma causa genética se reflete em um diagnóstico diferenciado a pacientes com MDC, facilitando uma previsão mais precisa da evolução do seu quadro clínico e possibilitando um aconselhamento genético mais preciso à família do paciente [59]. Além disso, o estudo desses distúrbios tem auxiliado muito no entendimento de processos do desenvolvimento do córtex [9].

Em 2008, Guerrini, Dobyns e Barkovich [9] listaram as malformações do córtex cerebral com causa genética até então descritas, totalizando 27 quadros clínicos, relacionados a 33 *loci*, dos quais 24 genes foram mapeados. Dos 33 *loci*, apenas quatro localizam-se no cromossomo X, sendo os outros 29 autossômicos. A grande maioria dos genes já identificados está relacionada a malformações da fase de migração, revelando a

importância de processos como o transporte via microtúbulos, posicionamento centrossomal, transporte nuclear, estabilização de microtúbulos, fusão e trânsito de vesículas e integridade neuroependimal no desenvolvimento cortical. Desde então, não surpreende que mutações nos genes de microtúbulo Alfatubulina 1A (*TUBA1A*), Alfatubulina 8 (*TUBA8*), Betatubulina 2B (*TUBB2B*) e Betatubulina 3 (*TUBB3*) têm sido associadas a malformações resultantes de migração neuronal anormal e de desenvolvimento pós-migratório. Em 2009, Jaglin *et al.* [60] relataram mutações *de novo* no gene *TUBB2B* encontradas em quatro pacientes com polimicrogiria bilateral assimétrica e em 2012, Guerrini *et al.* [61] descreveram três novas mutações, neste mesmo gene, em pacientes que apresentavam polimicrogiria difusa e paquigiria, aumentando o espectro fenotípico de malformações corticais associadas ao gene *TUBB2B*. Abdollahi *et al.* [62] identificaram um caso de síndrome autossômica recessiva causada por uma mutação no gene *TUBA8*, encontrada em pacientes com polimicrogiria generalizada associada a hipoplasia do nervo óptico.

Estudos neuropatológicos em pacientes portadores de mutações nos genes *TUBA1A* e *TUBB2B* mostraram defeitos de migração neuronal e características de desorganização na orientação axonal. Esse fato se confirma por investigações em modelos animais para os mesmos genes [60,63,64].

Todos os genes citados anteriormente pertencem à mesma família do gene estudado neste trabalho. No genoma humano, o gene *TUBB3* está localizado no cromossomo 16 (Figura 4), possuindo um total de nove exons e 15 transcritos (variantes de *splicing*). Porém, neste trabalho foram analisados somente quatro exons, os quais caracterizam a estrutura de um desuso transcritos que codifica a proteína de maior tamanho comparado com os outros. Este gene é responsável por codificar o isotipo III da proteína beta tubulina que faz parte da família das tubulinas, componentes dos microtúbulos. Os microtúbulos são estruturas proteicas que compõem o citoesqueleto nas células e se caracterizam por serem polímeros dinâmicos, que se unem por meio de um heterodímero de alfa, betatubulina e sustentam diversas funções nas células. Os humanos possuem nove genes (isotipos) que codificam diferentes monômeros de tubulina. A integridade estrutural e funcional dos microtúbulos é um componente crítico no desenvolvimento do sistema nervoso [65-67].

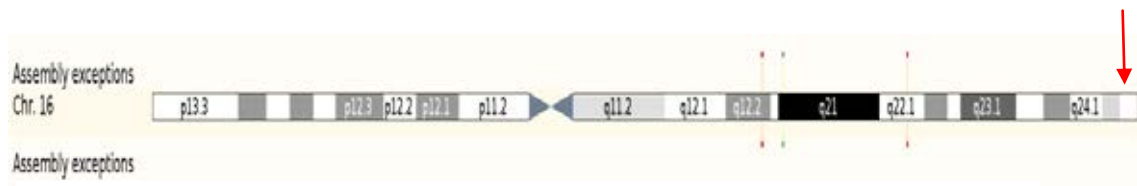


Figura 4: Estrutura do cromossomo 16 e localização do gene TUBB3 (seta).

A genética humana começou a elucidar os papéis de isotipos específicos de tubulina, apesar de muitos pontos ainda permanecerem incompreendidos. Vinte e três mutações heterozigóticas em humanos nos genes que codificam isotipos de beta tubulina, *TUBB2B* e *TUBB3*, têm sido descritas. Análises da relação genótipo – fenótipo sustentam correlações entre isotipos mutados e o fenótipo neurológico resultante, como é o caso de fenótipos envolvendo malformações corticais [60, 61, 69-71]. Como demonstração dessa relação, recentemente, foi relatado que mutações em heterozigose no *TUBB3* estão associadas com vários distúrbios neurológicos. Dados de neuroimagem de pacientes com mutações no *TUBB3* revelaram um espectro de anomalias, que incluem hipoplasia dos nervos oculomotores e degeneração do corpo caloso [68, 72]. Além disso, trabalhos também descrevem a relação do gene *TUBB2B*, também da família das tubulinas, com a PMG [61]. Portanto, devido à similaridade entre todos os genes da família das tubulinas, o *TUBB3* se apresenta como um importante gene candidato para ser testado.

1.5 Variações Estruturais e Malformações do Desenvolvimento Cortical

Para que a diversidade de fenótipos seja compreendida, é importante que analisemos os diversos tipos de variações do genoma humano. Anteriormente, acreditava-se que essas variações se caracterizavam por SNPs (*single nucleotide polymorphism*) como sendo seus principais elementos. Porém, com o avanço das tecnologias de triagem do genoma, foi descoberto um grande grupo de alterações estruturais com tamanho variável. Estas, são muitas vezes alterações submicroscópicas, não detectáveis por métodos de citogenética ou por seqüenciamentos tradicionais e podem compreender milhões de nucleotídeos polimórficos em cada genoma, e desta maneira, contribuir para a diversidade humana e a susceptibilidade a doenças [73]. As variações do número de cópias (*Copy Number Variations* – CNV) são as alterações estruturais que mais

prevalecem no genoma humano, tendo sido frequentemente encontradas na população [74].

A literatura apresenta alguns trabalhos que relacionam as CNVs com distúrbios do sistema nervoso central (SNC), sendo que CNs patogênicos são encontrados em 14-18% de pacientes com retardo mental e outros distúrbios relacionados ao SNC [75].

Na análise de um grande grupo de pacientes com diversos tipos de malformações corticais, incluindo lissencefalia, polimicrogiria, displasia cortical focal e agenesia do corpo caloso, foi encontrado pelo menos um CNV novo em 22.5% dos pacientes, e análises dessas regiões sugeriram novos genes candidatos para as malformações[76].

Valduga *et al.* [77] analisaram fetos com malformações congênicas diversas e encontraram CNVs patogênicas em 10% dos casos. CNVs foram encontradas em fetos com agenesia do corpo caloso, dimorfismos faciais, retardo do crescimento e complexas malformações cerebrais.

Deste modo, a identificação de variações estruturais (CNVs) pode ser de grande relevância para a descoberta de novas regiões e genes candidatos envolvidos nas MDCs. À medida que a base genética e os mecanismos moleculares das MDCs são identificados, abrem-se novas possibilidades. Quanto maior o número de investigações visando esclarecer os mecanismos fisiopatológicos das MDCs e das epilepsias, maior será o potencial estratégico no tratamento desses distúrbios. Portanto, é extremamente significativa a continuidade dos estudos moleculares do desenvolvimento do córtex cerebral.

2. OBJETIVOS

- 1) Analisar a existência de alterações de ponto deletérias no gene *TUBB3* em pacientes com polimicrogiria.
- 2) Analisar a presença de *Copy Number Variations* em pacientes com polimicrogiria.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pacientes e caracterização da amostra

Este trabalho foi realizado a partir da utilização de amostras que se encontravam em estoque no laboratório. Já haviam sido coletadas amostras de sangue de pacientes com diferentes tipos de polimicrogiria, a maior parte deles com polimicrogiria perisylviana bilateral. Totalizando 27 pacientes, todos eles haviam sido identificados e acompanhados nos ambulatórios do Hospital das Clínicas da UNICAMP e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP Ribeirão Preto. Os pacientes foram submetidos a exame neurológico detalhado e avaliação cognitiva e de linguagem por equipe multidisciplinar. Além disso, todos os pacientes e a maioria dos membros das famílias foram submetidos a exame de ressonância magnética de alta resolução para detecção de alterações morfológicas corticais.

O DNA do sangue coletado também já estava extraído. Este processo foi realizado a partir do protocolo de extração por fenol e clorofórmio que propicia a extração de grande quantidade de DNA (acima de 700µg a partir de 20mL de sangue venoso).

Tabela 1: Dados de pacientes cujos materiais genéticos foram avaliados neste trabalho (adaptado) [78].

REGISTRO DO DNA	UNIDADE DE COLETA	GÊNERO	DATA DE NASCIMENTO	NEUROIMAGEM	EXAME NEUROLÓGICO	SINAIS PSEUDOBULBARES
379/04	HC - UNICAMP	F	14/02/1996	PMG parietal posterior	normal	ausência
573/03	HC - UNICAMP	M	19/07/1993	PMG PS parietal posterior	normal	fala anasalada e explosiva
28/99	HC - UNICAMP	F	não disponível	PMG PS bilateral	Não especificado	Não especificado
47/10	HC - UNICAMP	M	06/10/2005	PMG difusa	não disponível	não especificado
1161/01	HC - UNICAMP	M	22/04/1991	PMG PS bilateral	normal	dificuldade de mobilização lateral e vertical da língua, assim como protusão
674/04	HC - UNICAMP	F	17/04/2000	PMG PS fronto parietal	dupla hemiparesia espástica, hiperreflexia global e presença de clônus	não especificado
1197/03	HC - UNICAMP	M	05/08/1990	PMG PS fronto parietal bilateral	normal	não protui a língua e nem lateraliza a língua, reflexo nauseoso diminuído, estrabismo convergente
1335/03	HC - UNICAMP	M	19/07/1995	PMG PS bilateral difusa	hemiparesia direita	dificuldade de lateralização e verticalização da língua
1337/03	HC - UNICAMP	F	25/08/1995	PMG PS parietal posterior	normal	dificuldade de mobilização da língua
1381/03	HC - UNICAMP	M	07/02/1997	PMG PS parietal posterior bilateral	normal	não tem
1386/03	HC - UNICAMP	M	29/06/1992	PMG PS bilateral difusa	normal	sialorréia, dificuldades de movimentação da língua
848/04	HC - UNICAMP	M	05/01/1995	PMG PS simétrica bilateral	normal	não especificado
2106/04	HC - UNICAMP	M	23/03/1997	PMG PS parietal posterior unilateral direita	hemiparesia esquerda	movimentação mímica facial diminuída
322/08	HC - UNICAMP	M	19/10/1996	PMG Parietal	não disponível	não especificado
539/08	HC - FMRP-USP	F	21/10/2008	PMG PS frontal e parietal direita	retardo mental moderado	não especificado
552/08	HC FMRP - USP	M	27/09/1989	PMG frontotemporal e parietal à direita	hemiparesia esquerda	não especificado
611/08	HC FMRP - USP	M	14/12/1996	PMG temporal direita	déficit auditivo e visual	não especificado
188/09	HC FMRP - USP	F	18/07/2003	PMG PS bilateral	hipotonia global e retardo mental moderado	não especificado
456/09	HC FMRP - USP	M	13/08/2000	PMG	retardo mental leve	não especificado
463/09	HC FMRP - USP	F	30/08/2000	agenesia parcial de corpo caloso e PMG rolândica	retardo mental grave, hidrocefalia, mielomeningocele, bexiga neurogênica	não especificado
497/09	HC FMRP - USP	F	14/04/2001	PMG	retardo mental moderado	não especificado
503/09	HC FMRP - USP	F	26/10/1992	PMG	retardo mental moderado, hemiparesia direita	não especificado
505/09	HC FMRP - USP	F	25/11/1997	PMG temporal	retardo mental moderado	não especificado
506/09	HC FMRP - USP	F	07/05/1994	Normal	retardo mental	não especificado
525/09	HC - UNICAMP	M	12/05/2001	PMG	não disponível	não especificado
533/09	HC FMRP - USP	M	13/08/2000	PMG fronto-parietal direita	hemiparesia esquerda e retardo mental	não especificado
569/09	HC - UNICAMP	M	08/11/2001	PMG PS	não disponível	não especificado

Onde F= feminino, M= masculino, PMG= polimicrogiria, PS= perisylviana

3.2 Aspectos Éticos

Todos os indivíduos cujo material genético foi utilizado neste estudo assinaram formulário de consentimento para coleta de sangue e análise molecular, tendo o mesmo sido aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (parecer #383/2000). Para assegurar que toda a manipulação da informação clínica e molecular seja confidencial, questionários clínicos e amostras de sangue e de DNA são identificados por um código comum designado no momento em que o indivíduo entra no estudo.

3.3 Amplificação de DNA por PCR

O DNA genômico foi amplificado pela técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) utilizando-se primers específicos para a amplificação de todos os exons codificantes e das regiões intron/exon dos genes candidatos. A tabela 2 mostra as sequências dos primers, as temperaturas de anelamento específicas utilizadas (T_a) e o tamanho do fragmento amplificado na reação para cada par de primers.

As reações de PCR foram realizadas para um volume final de 15 μ L, contendo 40ng de DNA genômico; 3.5pmol de cada primer; 1.5 μ L de tampão 10x, 200 μ M de dGTP, dCTP, dTTP e dATP; 0.5 unidades de Taq DNA polimerase e 1.5mM de $MgCl_2$. Quando necessário também foi acrescentado DMSO à reação de forma que o mesmo atingisse 10% do volume total.

As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, temperatura de anelamento específica do primer por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguido de extensão final a 72°C por 7 minutos.

Ao finalizar a reação, os produtos amplificados foram testados em gel de agarose 1,5%, para a confirmação de que eles realmente foram amplificados.

Tabela2: Primers utilizados para amplificação do gene TUBB3

Primers TUBB3	Sequencia dos primers	Tamanho (pb)	Temperatura (Ta)
TUBB3 E1F TUBB3 E1R	cagctcctctgggagaca catcccttggtgcaggtt	448	56°
TUBB3 E2F TUBB3 E2R	gtagtgaggggctaaaaggctt agacctggtcagtcagacgc	229	61°
TUBB3 E3F TUBB3 E3R	tacaggctcttaggatgtga ccattcctgtttctcacag	280	55°
TUBB3 E4aF TUBB3 E4aR	ttgggatgttcaggcag gaagtagctgctgttctgc	790	56°
TUBB3 E4bF TUBB3 E4bR	atgccaagaacatgatggcc gatgagctcttcttgctg	821	62°

3.4 Sequenciamento (Sanger)

Após a reação de PCR, os fragmentos amplificados foram submetidos ao sequenciamento por eletroforese capilar pelo método de Sanger [79], utilizando o aparelho ABI 3500XL Genetic Analyser (Applied Biosystems). A reação submetida ao sequenciamento consistiu de 1µL de solução pré-mix (Big Dye), 1µL de primer (5 pmol/µL), 2µL de tampão (5X buffer), 2µL do produto de amplificação para um volume final de 10 µL. Essa reação foi submetida a 35 ciclos de 95°C por 10 segundos, 57°C por 5 segundos, 60°C por 4 minutos. A purificação foi realizada com etanol e EDTA a 125 mM, como sugerido pelo fabricante.

A análise das amostras seqüenciadas foi feita por meio de um programa de bioinformática: “*Codon Code Aligner*”. Este programa permite a identificação de mutações em heterozigose e mutações em homozigose, a partir da comparação da sequência do gene presente nos bancos de dados.

3.5 Detecção de *Copy Number Variations* (CNVs)

A identificação das variações do número de cópias foi realizada através da técnica de microarranjos utilizando o kit da Affymetrix CytoScan HD Array .

A técnica de microarranjos requer DNA de alta qualidade, sendo assim o DNA de todos os pacientes foi selecionado e purificado. Na primeira etapa, os DNAs foram analisados após eletroforese em gel de agarose 1.5% e marcados por SYBR® Safe. As amostras de DNA muito fragmentadas não foram submetidas à análise.

Os DNAs foram quantificados em um Epoch (Biotek). O grau de pureza dos DNAs foi aferido pelas razões de absorbância A260/280, A260/230 e A320. Consideramos como aceitáveis as amostras com valores de absorbância A260/280 entre 1.5 e 2.0, A260/230 com valores maiores que 1.1 e A320 com valores menores que 0.1.

3.5.1 Purificação das Amostras de DNA

Os DNAs selecionados foram purificados em colunas da Millipore para remoção de impurezas e traços de fenol-clorofórmio. Para tal, o DNA foi transferido para uma coluna acoplada a um tubo coletor, completando-se o volume para 500µL com água ultrapura. As amostras foram centrifugadas por 12 minutos a 14000G. Após a centrifugação, um novo tubo coletor foi colocado e a coluna foi invertida. As amostras foram novamente centrifugadas por 2 minutos a 1000G. As amostras captadas no tubo coletor foram diluídas com tampão low TE-EDTA 1x (Affymetrix®) para concentração final de 45ng/µL a 60ng/µL.

3.5.2 Digestão das amostras de DNA com a enzima *NspI*

Cada amostra de DNA, a 50ng/µL, foi submetida a uma reação de digestão composta por 1µL de enzima *NspI*, 2µL de tampão da enzima, 0,2µL de tampão BSA e 11,55µL de água. As reações foram transferidas para um termociclador (Mastercycler Gradiente Eppendorf®) onde permaneceram incubadas a 37°C por 120 minutos, seguida por nova incubação a 65°C por 20 minutos.

3.5.3 Reação de ligação com adaptadores

Para a reação de ligação, foram adicionadas às amostras de DNA digeridas com *NspI*, 0,75µL de solução com adaptadores (50µM); 2,5µL de tampão T4 *DNA Ligase* 10x e 2µL de enzima T4 *DNA Ligase*. Em seguida, as reações foram transferidas para um termociclador (Mastercycler Gradiente Eppendorf®) para ciclagem a 16°C por 180 minutos e 70°C por 20 minutos.

3.5.4 Amplificação dos fragmentos por PCR

As amostras de DNA que foram digeridas e ligadas a adaptadores foram diluídas com 75µL de água. Para cada amostra, quatro alíquotas de 10µL foram transferidas para uma nova placa. Estas alíquotas foram submetidas a uma reação de PCR seguindo o protocolo: 39,5µL de água, 10 µL de tampão TITANIUM Taq PCR 10x, 20µL de reagente GC-Melt, 14µL de dNTP (2,5mM), 4,5µL de primer e 2µL de enzima *TITANIUM Taq DNA Polimerase* 50x. A reação foi transferida para um termociclador (Mastercycler Gradient Eppendorf®) sendo submetida ao seguinte programa: 94°C por 3 minutos; trinta ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 45 segundos e 68°C por 15 segundos e uma extensão final a 68°C por 7 minutos.

A reação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 2% para verificação do padrão de amplificação dos fragmentos. Foram considerados aceitáveis os DNAs que apresentaram a maioria dos fragmentos entre 150pb e 2000pb.

3.5.5 Purificação

Para a purificação das amostras, as quatro alíquotas foram transferidas para um único tubo de 2,0 mL. Foram adicionados 720µL de beads magnéticas e a reação foi mantida a temperatura ambiente por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados por três minutos a 16100G e em seguida encaixados em um suporte magnético (MagnaRack™). O sobrenadante foi descartado e, em seguida adicionou-se 1.0 mL do tampão de lavagem em cada amostra. Os tubos foram vortexados por dois minutos e depois centrifugados por três minutos a 16100G. Os tubos foram novamente encaixados no suporte magnético e o sobrenadante foi totalmente descartado. Após a completa secagem das beads, 52µL do tampão de eluição foram adicionados e os tubos foram vortexados por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados por três minutos a 16100G e encaixados no suporte magnético. Após 10 minutos, 47µL do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa.

3.5.6 Quantificação

As amostras purificadas foram avaliadas quanto à concentração ideal (acima de 3000 ng/µL) e sua pureza foi observada pelas relações de absorbância (A260/280 entre 1,8 e 2,0 e A320 < 0,1). As quantificações foram realizadas no aparelho Epoch (BioTek®).

3.5.7 Fragmentação

Os produtos da purificação foram fragmentados utilizando-se para cada amostra: 123.8µL de água, 158.4 µL de tampão de fragmentação e 5.8µL de enzima de fragmentação (2.5U/µL). Tais volumes podem variar de acordo com a concentração da enzima utilizada e o número do lote do produto. A reação foi transferida para um termociclador (Mastercycler Gradiente Eppendorf®) e incubada a 37°C por 35 minutos e 95°C por 15 minutos, respectivamente. Em seguida, o padrão de fragmentação foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 3%. Foram considerados aceitáveis os DNAs que apresentaram a maioria dos fragmentos entre 25pb e 125pb.

3.5.8 Marcação do DNA

O próximo passo foi adicionar aos 51µL da reação de fragmentação para cada amostra, 14µL de tampão TdT 5x, 2µL de DNA Labeling Reagent 30mM e 3.5µL de enzima TdT. A reação foi incubada a 37°C por quatro horas e a 95°C por 15 minutos em um termociclador (Mastercycler Gradiente Eppendorf®).

3.5.9 Hibridação

Ao DNA marcado foram adicionados: 165µL de Hyb Buffer Part I, 15µL de Hyb Buffer Part II, 7µL de Hyb Buffer Part III, 1µL de Hyb Buffer Part IV e 2µL de Oligo Control Reagent 0100. Em seguida, os fragmentos de DNA foram desnaturados em um termociclador (Mastercycler Gradiente Eppendorf®) a 95°C por 10 minutos e posteriormente mantidos a 49°C. Foram aplicados 200 µL de cada amostra em cada chip. Os chips foram incubados em um forno de hibridação por 16 horas a temperatura de 50°C e rotação de 60rpm (Genechip® Hybridization Oven 645, Affymetrix®).

3.5.10 Lavagem

Após a hibridação, os chips passaram pela estação de lavagem (GeneChip Fluidics Station 450, Affymetrix®) que realiza automaticamente um processo de injeção de soluções para a lavagem dos chips. Esta etapa foi realizada no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS).

3.5.11 Escaneamento

Os chips foram escaneados pelo GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix®) do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS).

3.5.12 Análises

Sequenciamento Automático:

Os sequenciamentos foram analisados a partir do *software Codon Code Aligner*, no qual a sequência obtida pelo sequenciamento do gene era sobreposta à sequência obtida em banco de dados disponível na internet (*Ensembl*). As alterações encontradas nos cromatogramas foram analisadas posteriormente para a constatação se já eram ou não descritas, e para tanto, também utilizamos o *Ensembl*.

CytoScanHD:

A análise dos resultados das alterações estruturais foi realizada pelo *software Chromosome Analysis Suite* (Affymetrix®).

Para a análise dos CNVs com possível potencial patogênico foram consultados bancos de dados disponíveis na internet: DGV e DECIPHER. (Tabela 3).

- O DGV (*Database of Genomic Variants*) contém variações estruturais identificadas em indivíduos saudáveis e consideradas como normais.
- O DECIPHER (*Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources*) é um banco de dados público que possui informações de citogenética molecular e reúne dados de CNVs com importância clínica já relatada.

Tabela3: Bancos de dados utilizados para a análise das CNVs identificadas.

Banco	Endereço
DGV	projects.tcag.ca/variation/
DECIPHER	decipher.sanger.ac.uk

4. RESULTADOS

4.1 Sequenciamento do gene TUBB3

Foi realizado o sequenciamento das amostras de pacientes com polimicrogiria por eletroforese capilar (Sanger) de cada um dos quatro exons do gene TUBB3.

Porém, antes do sequenciamento ser efetivado, foi necessário que o DNA das amostras fosse amplificado, e para tanto, foi utilizado o método de PCR (reação em cadeia da polimerase). As reações de PCR foram protocoladas, no intuito de determinar a temperatura de anelamento ideal para cada éxon, além da proporção dos reagentes. Cada reação foi testada em gel de agarose 1,5% para confirmar e garantir que o material genético foi amplificado.

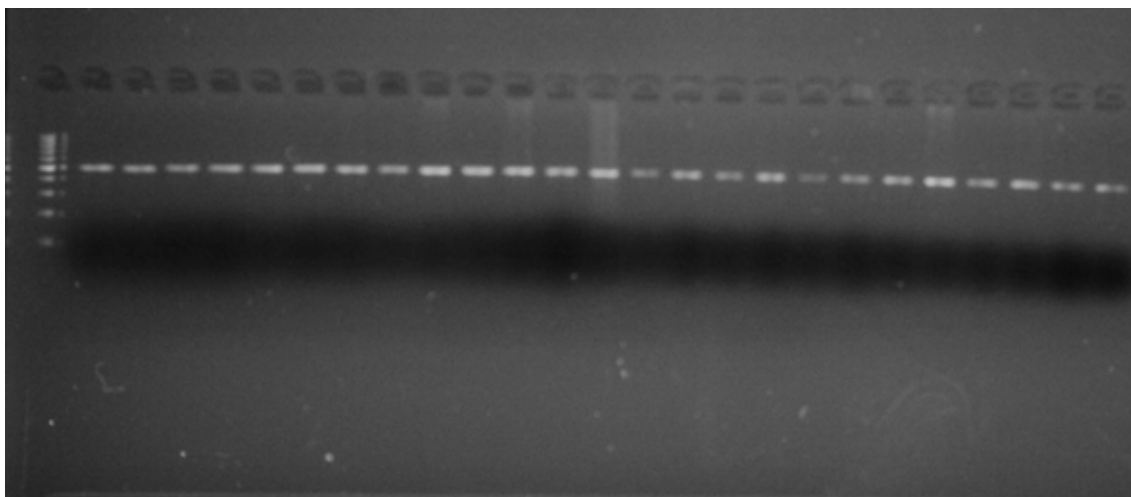


Figura 5: Produto amplificado da reação de PCR do exon 4 em gel de agarose 1,5%

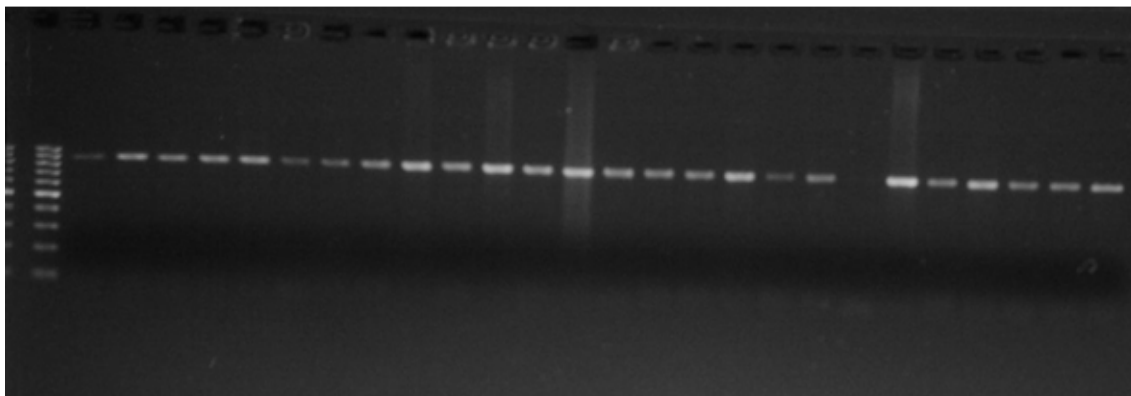


Figura 6: Produto amplificado da reação de PCR do exon 3 em gel de agarose 1,5%

Após a confirmação que todos os quatro exons das 27 amostras foram amplificados, o sequenciamento foi então efetuado. Diversas alterações foram encontradas. Com exceção de uma, todas elas são alterações já descritas nenhuma delas considerada como patogênica. A análise das alterações encontradas será dividida de acordo com cada exon. Os registros de DNA, apresentados anteriormente na Tabela 1, estão relacionados com cada alteração na Tabela 4, ao final da análise dos cromatogramas.

4.1.1 Exon 1:

O sequenciamento por eletroforese capilar revelou, no éxon 1, uma substituição de uma citosina (C) por uma timina (T) em heterozigose (Figura 7). A alteração se encontra na região intrônica, próxima à região codificante. Esse polimorfismo ainda não é descrito no banco de dados utilizado para a análise. (Ensemble).

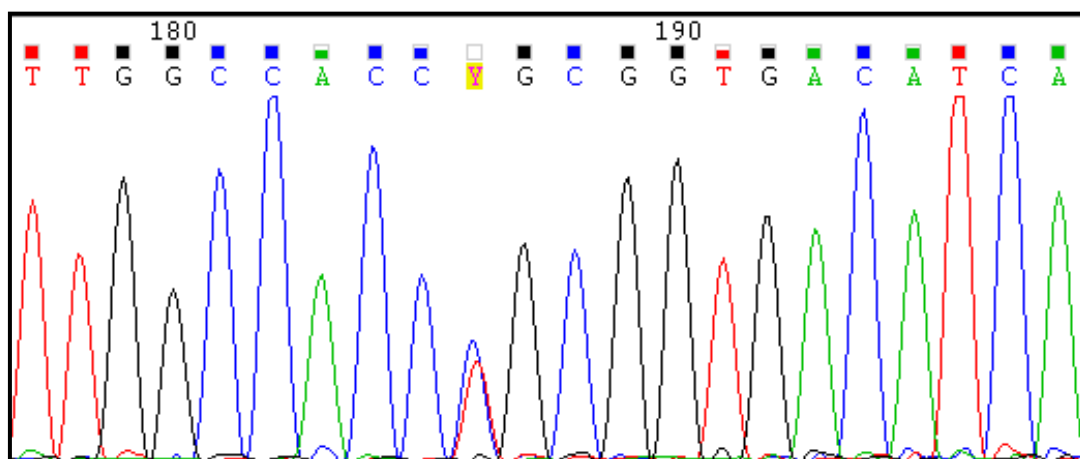


Figura 7: Cromatograma de sequenciamento por eletroforese capilar mostrando a região da substituição de bases em heterozigose (destaque).

4.1.2 Exon 2:

O sequenciamento por eletroforese capilar revelou, no éxon 2, uma substituição em heterozigose de uma citosina (C) por uma timina (T) (Figura 8). A alteração se encontra na região intrônica, porém próxima à região codificante e ao sítio de *splicing*, sendo um polimorfismo já descrito e identificado como SNP rs28593634. A Figura 9 mostra a frequência dos alelos para este locus no projeto 1000 genomas.

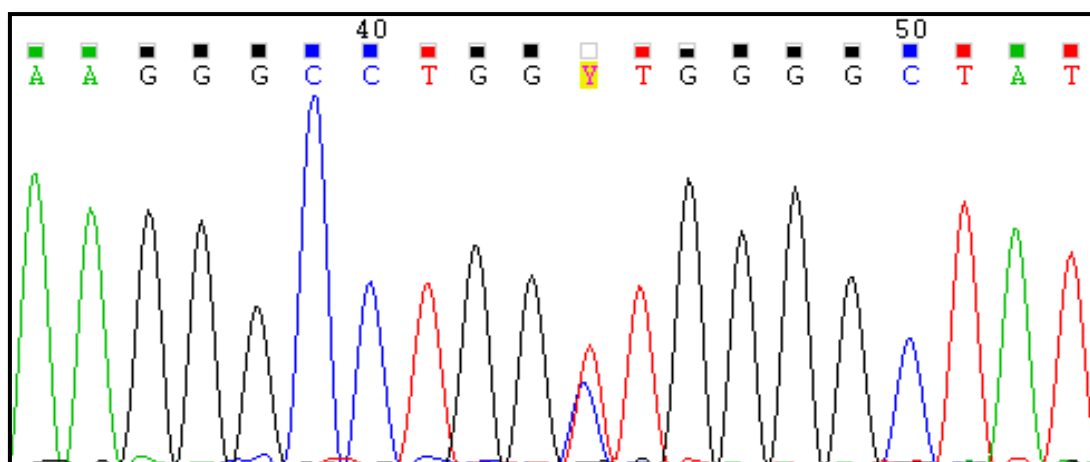


Figura 8: Cromatograma de seqüenciamento por eletroforese capilar mostrando a região da substituição de bases em heterozigose (destaque).

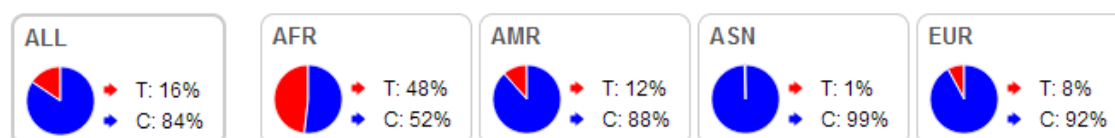


Figura 9:Gráfico representando a frequência alélica desta alteração em todos os indivíduos em diversas populações e em sua totalidade (Projeto 1000 genomas).

Ainda no éxon 2, foi observada uma outra substituição, também de uma citosina por uma timina em heterozigose (Figura 10). A alteração se encontra na região intrônica, porém ainda mais próxima à região codificante e ao sítio de *splicing* do que a alteração anterior, sendo um polimorfismo já descrito e identificado como SNP rs2302897. A Figura 11 mostra a frequência dos alelos para este locus no projeto 1000 genomas.

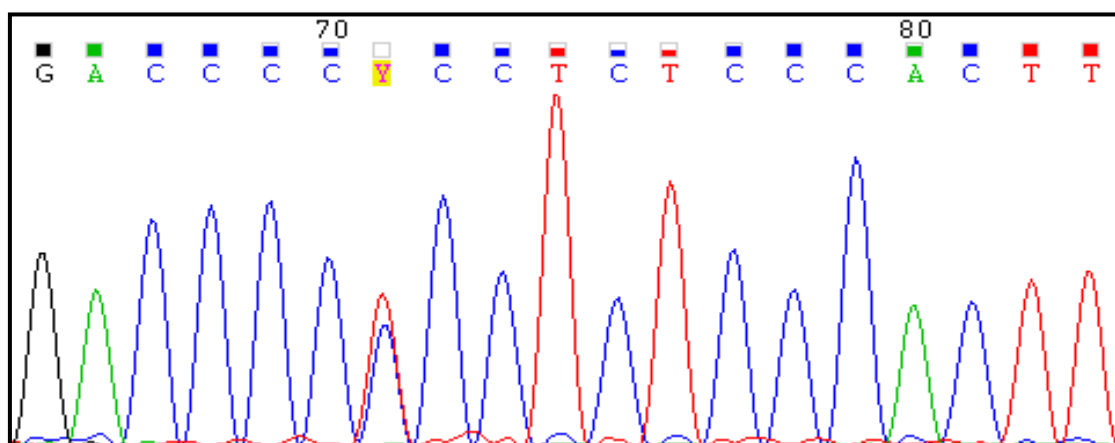


Figura 10: : Cromatograma de seqüenciamento por eletroforese capilar mostrando a região da substituição de bases em heterozigose (destaque).

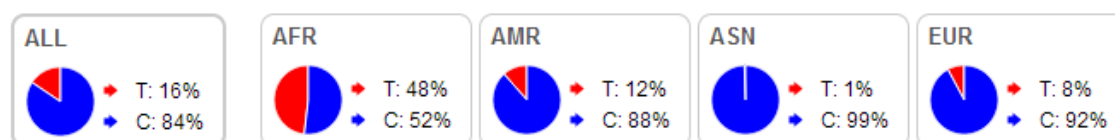


Figura 11: Gráfico representando a frequência alélica desta alteração em todos os indivíduos em diversas populações e em sua totalidade (Projeto 1000 genomas).

4.1.3 Exon 3:

O seqüenciamento do fragmento do éxon 3, revelou uma substituição de uma citosina por uma timina em heterozigose (Figura 12). A alteração se encontra na região intrônica, porém próxima à região codificante e ao sítio de splicing, sendo um polimorfismo já descrito e identificado como SNP rs77681059. O alelo T aparece muito mais freqüente do que o alelo C, o qual se encontra em proporções mínimas (Figura 13).

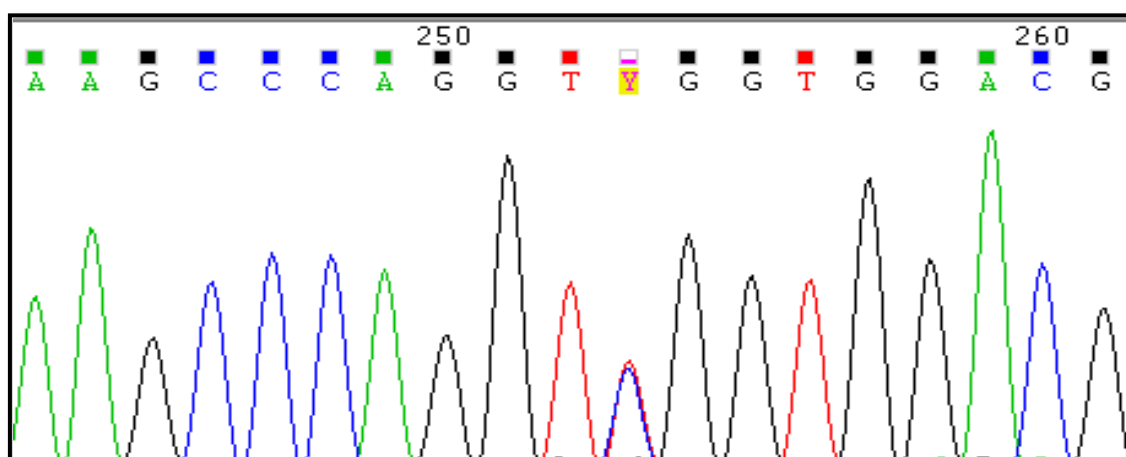


Figura 12: Cromatograma de seqüenciamento por eletroforese capilar mostrando a região da substituição de bases em heterozigose (destaque).

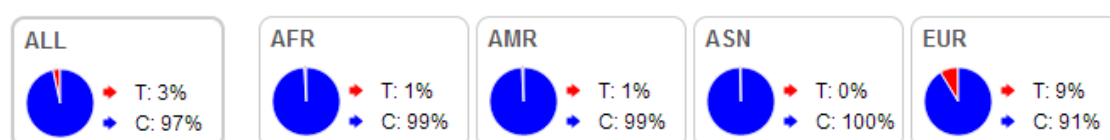


Figura 13: Gráfico representando a frequência alélica desta alteração em todos os indivíduos em diversas populações e em sua totalidade (Projeto 1000 genomas).

Ainda no éxon 3, observamos uma substituição de uma citosina por uma timina, em heterozigose (Figura 14). A alteração encontra-se muito próxima a região codificante e dentro do sítio de *splicing*. Caracteriza um polimorfismo já descrito e identificado como SNP_rs77191445. A Figura 15 mostra a frequência dos alelos para este locus no projeto 1000 genomas.

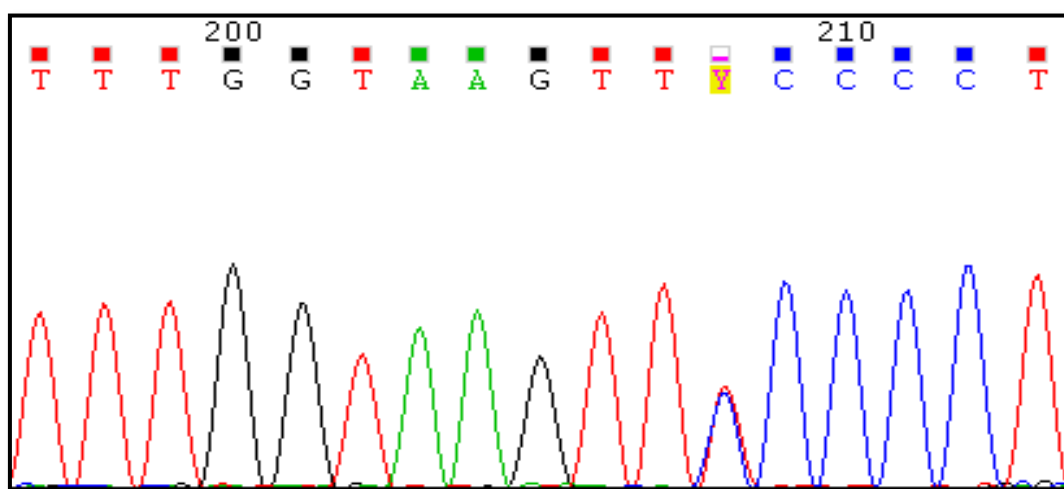


Figura 14: Cromatograma de sequenciamento por eletroforese capilar mostrando a região da substituição de bases em heterozigose (destaque).

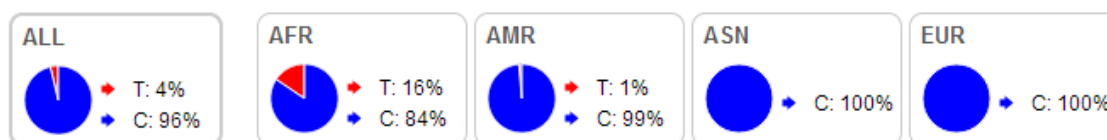


Figura 15: Gráfico representando a frequência alélica desta alteração em todos os indivíduos em diversas populações e em sua totalidade (Projeto 1000 genomas).

4.1.4 Exon 4:

Como o exon 4 apresenta um tamanho considerável, ele foi amplificado em duas partes com diferentes pares de primers (4A e 4B) para que toda a sua região codificante fosse seqüenciada de forma apropriada.

O seqüenciamento do fragmento do exon 4A demonstrou a ausência de alterações nesta parte do exon.

No entanto, no exon 4B foram observadas duas alterações distintas, mas localizadas na mesma região do fragmento e na mesma base, sendo que alguns pacientes apresentavam uma, enquanto outros pacientes apresentavam a outra. Essas alterações consistem em uma substituição de uma timina por uma citosina e em alguns pacientes tal substituição foi observada em homozigose (Figura 16) e em outros em heterozigose (Figura 17). A alteração se encontra na região codificante, sendo um polimorfismo já descrito e identificado como SNPrs1135425. A Figura 18 mostra a freqüência dos alelos para este locus no projeto 1000 genomas.

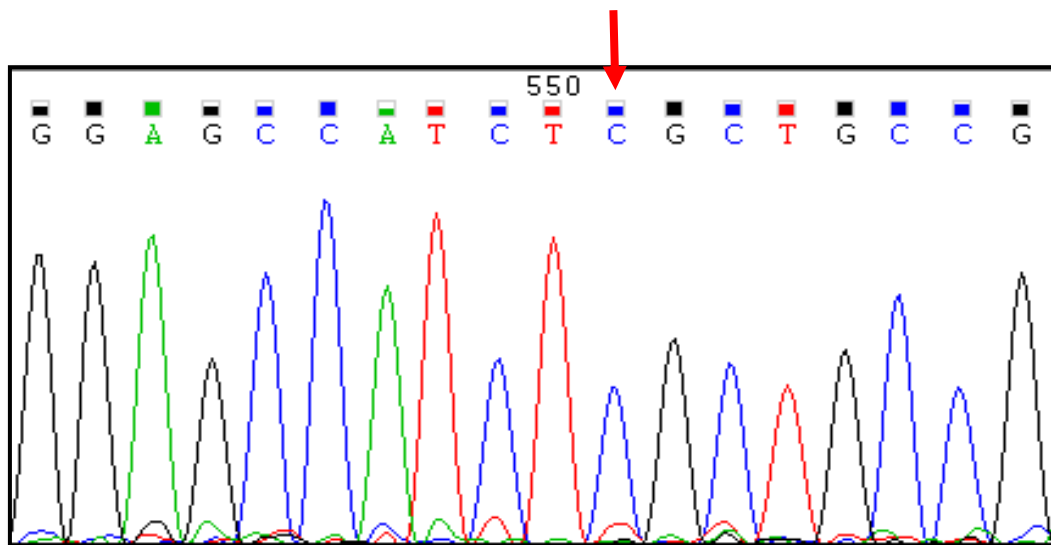


Figura 16: : Cromatograma de seqüenciamento por eletroforese capilar mostrando a região da substituição de bases em homozigose (destaque).

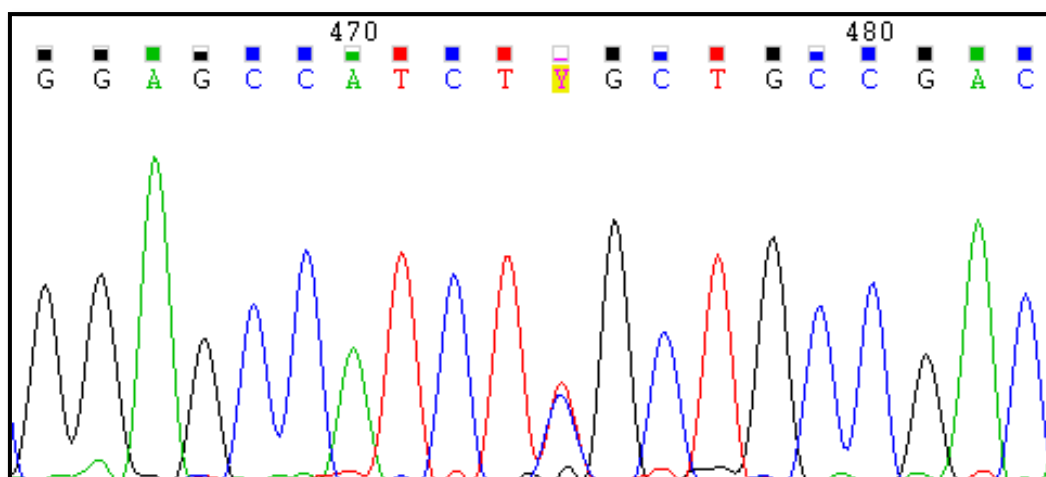


Figura 17: Cromatograma de seqüenciamento por eletroforese capilar mostrando a região da substituição de bases em heterozigose (destaque).

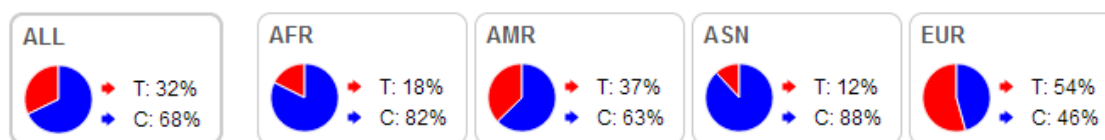


Figura 18: Gráfico representando a frequência alélica desta alteração em todos os indivíduos em diversas populações e em sua totalidade (Projeto 1000 genomas).

Ainda no éxon 4B, observamos uma substituição em heterozigose de uma adenina (A) por uma guanina (G)(Figura 19). A alteração encontra-se dentro da região codificante e caracteriza um polimorfismo já descrito e identificado como SNP rs12207. O alelo G aparece mais frequentemente do que o alelo A que se encontra em menores proporções (Figura 20).

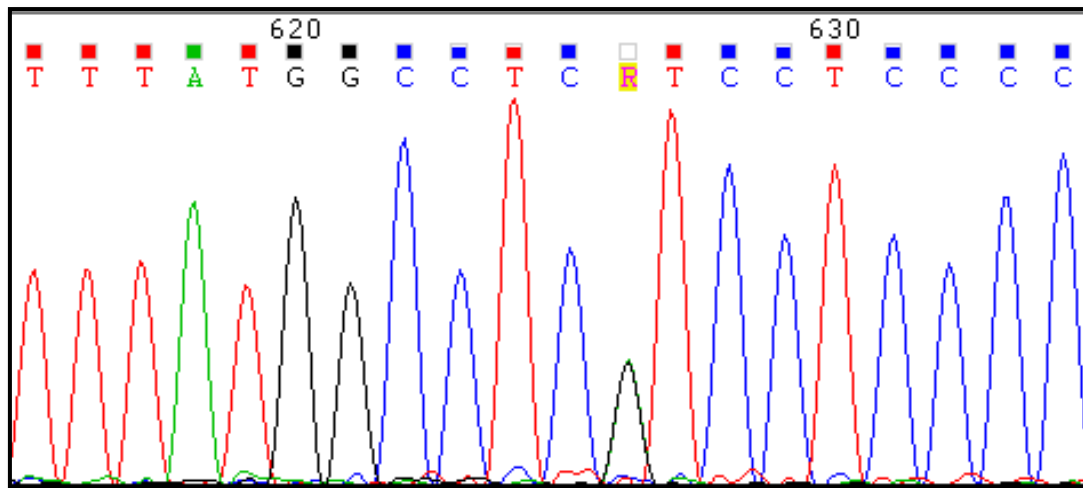


Figura 19: : Cromatograma de seqüenciamento por eletroforese capilar mostrando a região da substituição de bases em heterozigose (destaque).

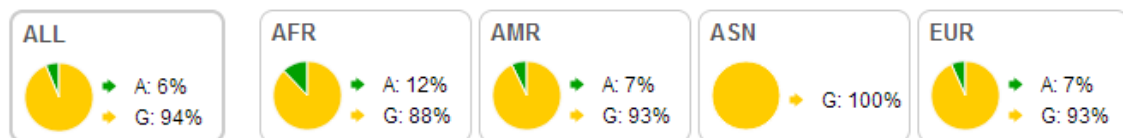


Figura 20: Gráfico representando a frequência alélica desta alteração em todos os indivíduos em diversas populações e em sua totalidade (Projeto 1000 genomas).

Tabela 4: Relação dos registros de DNA e os tipos de PMG descritos na Tabela 1 com cada uma das alterações descritas.

Registro de DNA	Tipo de PMG	Alteração no exon 1	Alteração no exon 2	Alteração no exon 3	Alteração no exon 4B
1161/01	PMG PS bilateral	(não descrita)	SNP rs28593634 ; SNP rs2302897		
1197/03	PMG PS frontoparietal biltateral			SNP rs77681059	SNP rs1135425 homozigose
1335/03	PMG PS bilateral difusa		SNP rs28593634 ; SNP rs2302897		SNP rs1135425 heterozigose
1337/03	PMG PS bilateral posterior		SNP rs28593634 ; SNP rs2302897		SNP rs1135425 heterozigose; SNP rs12207
1381/03	PMG PS bilateral parietal				SNP rs1135425 heterozigose
1386/03	PMG PS bilateral difusa		SNP rs28593634 ; SNP rs2302897		SNP rs1135425 homozigose
674/04	PMG PS frontoparietal				
848/04	PMG PS bilateral simétrica				
2106/04	PMG PS parietal unilateral direita			SNP rs77681059	SNP rs1135425 homozigose
322/08	PMG parietal				SNP rs1135425 heterozigose
539/08	PMG PS frontal e parietal direita				SNP rs1135425 heterozigose
552/08	PMG frontotemporal e parietal				SNP rs1135425 heterozigose
611/08	PMG temporal direita		SNP rs28593634 ; SNP rs2302897		SNP rs1135425 homozigose; SNP rs12207
188/09	PMG PS bilateral		SNP rs28593634 ; SNP rs2302897		SNP rs1135425 heterozigose
456/09	PMG				SNP rs1135425 heterozigose
463/09	PMG rolândica				SNP rs1135425 Heterozigose

497/09	PMG				SNP rs1135425 heterozigose
503/09	PMG				SNP rs1135425 homozigose
505/09	PMG temporal				SNP rs1135425 heterozigose
506/09	PMG				SNP rs1135425 heterozigose
525/09	PMG		SNP rs28593634 ; SNP rs2302897	SNP rs77191445	SNP rs1135425 homozigose
533/09	PMG frontoparietal direita				SNP rs1135425 heterozigose
569/09	PMG PS			SNP rs77681059	SNP rs1135425 heterozigose
47/10	PMG difusa				
28/99	PMG PS bilateral				SNP rs1135425 heterozigose
573/03	PMG parietal posterior		SNP rs2302897		SNP rs1135425 heterozigose
379/04	PMG parietal posterior				

Onde: PMG= polimicrogria; PS= Perisylviana

4.2 Busca de Alterações Estruturais por meio da técnica de microarranjo:

Todos os pacientes analisados se mostraram negativos para alterações deletérias nos gene candidato *TUBB3* e demais genes estudados em outros trabalhos (*SLITRK2*, *SLITRK4*, *SRPX2*, *AFF2*, *TUBA1A*, *TUBB2B* e *TUBA8*), sendo assim, todos eles foram submetidos à técnica de microarranjos para a busca de alterações estruturais denominadas *Copy Number Variations*(CNV).

As etapas de digestão, ligação dos adaptadores e PCR foram realizadas com sucesso. Podemos visualizar abaixo um gel de agarose que representa a etapa de PCR com o padrão de amplificação dos fragmentos genômicos entre 2000 e 150pb (Figura 21).

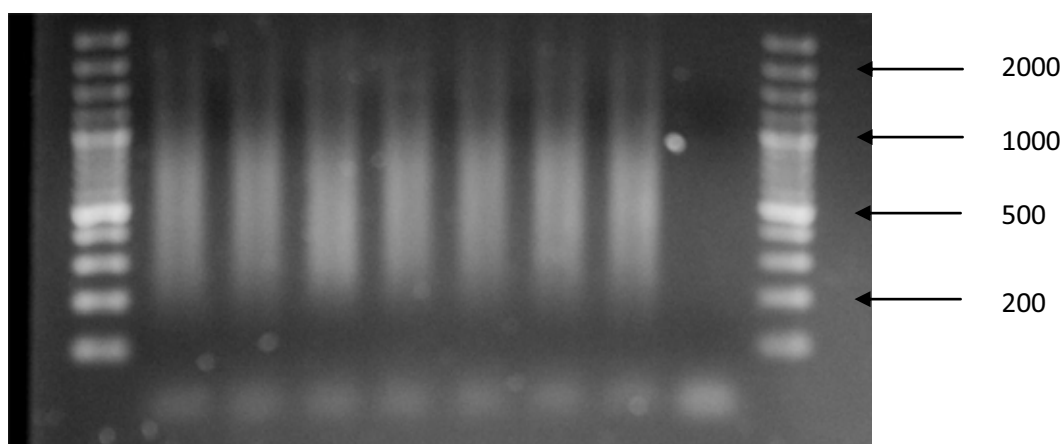


Figura 21: Visualização dos produtos de PCR em gel de agarose 2%. Amostras aleatórias. Nas laterais podemos ver o marcador de peso molecular de 100pb.

Posteriormente, seguimos com as etapas de purificação com *beads* magnéticas, quantificação e fragmentação do material amplificado. Todas essas etapas também foram realizadas com sucesso e ao final da fragmentação, todas as amostras se apresentaram com o padrão de fragmentos entre 125 e 25pb (Figura 22). Por fim foram realizadas as etapas de marcação, hibridação, lavagem e escaneamento dos microarranjos.

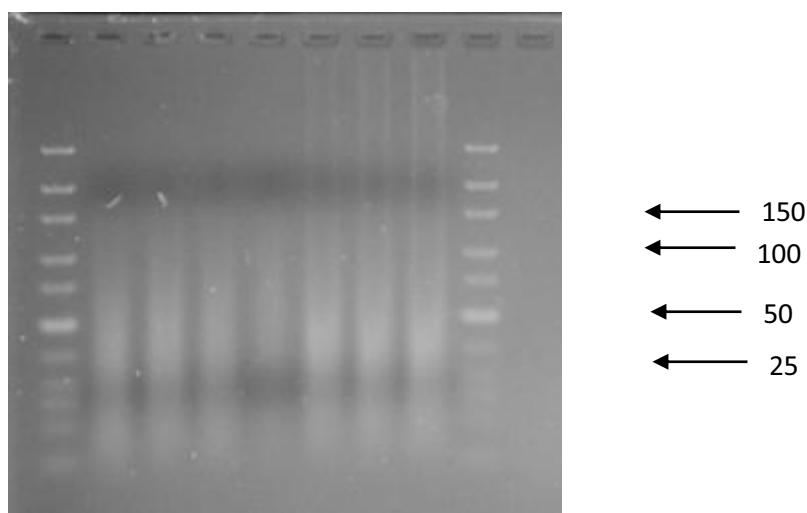


Figura 22: Visualização dos produtos da fragmentação em gel de agarose 2%. Amostras aleatórias. Nas laterais, o marcador de peso molecular 50bp.

Após o término dos experimentos, foi realizada a análise dos microarranjos utilizando o programa *Chromosome Analysis Suite*. Em um primeiro momento, analisamos somente alterações $\geq 100\text{Kb}$, pois estas têm uma maior probabilidade de serem patogênicas.

Como podemos visualizar abaixo (Tabela 5), diversas deleções e duplicações foram encontradas. A maior parte delas já é descritas, entretanto algumas são consideradas como inéditas e ainda não foram descritas no banco de dados DGV, sendo que estas possuem um potencial patogênico a ser considerado.

	3	Gain	20	220,117	q11.21 q22.3	q11.21 q22.3	FRG1B PCBP3, COL6A1, COL6A2, FTCD, C21orf56, LSS, MCM3AP-AS, MCM3AP, C21orf57, C21orf58, PCNT, DIP2A
	3	Gain	22	112,031	q11.22	q11.22	MIR650, IGLL5
539/08 PMG PS	1	Loss	1	135,735	q31.3	q31.3	CFHR3, CFHR1, CFHR4
	1	Loss	9	126,989	p23	p23	-
	3	Gain	8	888,306	p11.21	p11.1	FNTA, SGK196, HGSNAT, POTEA
	3	Gain	14	398,966	q32.33	q32.33	KIAA0125, ADAM6
	1	Gain	Y	161,981	p11.2	p11.2	PCDH11Y
322/08 PMG PS	1	Loss	1	186,662	p36.11	p36.11	C1orf63, RHD, TMEM50A, RHCE, TMEM57
	3	Gain	6	270,583	q22.1	q22.1	-
	3	Gain	6	122,724	q21	q21	C6orf186, DDO, SLC22A16
	3	Gain	17	100,951	q21.31	q21.31	KIAA1267, LOC644246
	3	Gain	22	112,031	q11.22	q11.22	MIR650, IGLL5
2106/04 PMG PS parietal posterior unilateral direita	1	Loss	8	114,579	p11.22	p11.22	ADAM5P, ADAM3A
	1	Loss	10	153,548	q21.1	q21.1	-
	0	Loss	Y	215,5	q11.23	q11.23	DAZ2, DAZ4, DAZ3, BPY2B, BPY2C, BPY2, TTTY4, TTTY4B, TTTY4C
	3	Gain	14	469,294	q32.33	q32.33	KIAA0125, ADAM6
	0	Loss	1	167,685	q44	q44	OR2G6, OR2T29, OR2T34, OR2T10, OR2T11, OR2T35, OR2T27
1337/03 PMG PS parietal posterior	1	Loss	4	166,713	q31.23	q31.23	ARHGAP10
	1	Loss	7	131,696	p12.1	p12.1	-
	1	Loss	8	137,24	p11.22	p11.22	ADAM5P, ADAM3A
	1	Loss	14	116,425	q11.2	q11.2	-
	1	Loss	16	837,294	p11.2	p11.2	TP53TG3B, TP53TG3, LOC390705
	0	Loss	19	124,6	p12	p12	ZNF826P
	3	Gain	14	459,339	q32.33	q32.33	KIAA0125, ADAM6
	4	Gain	17	100,951	q21.31	q21.31	KIAA1267, LOC644246
	3	Gain	22	133,872	q11.22	q11.22	MIR650, IGLL5
	0	Loss	8	139,855	p11.22	p11.22	ADAM5P, ADAM3A
1197/03 PMG PS fronto parietal bilateral	1	Loss	19	117,947	p12	p12	ZNF826P
	4	Gain	14	398,966	q32.33	q32.33	KIAA0125, ADAM6
	1	Loss	8	174,312	q24.23	q24.23	-
1335/03 PMG PS bilateral difusa	1	Loss	8	114,579	p11.22	p11.22	ADAM5P, ADAM3A

	1	Loss	8	110,14	p23.2	p23.2	-
	3	Gain	9	254,28	q31.1	q31.1	GRIN3A
	4	Gain	10	124,919	q26.3	q26.3	LOC619207, CYP2E1, SYCE1
	4	Gain	14	380,791	q32.33	q32.33	KIAA0125, ADAM6
188/09 PMG PS bilateral	1	Loss	1	185,141	q44	q44	OR2T2, OR2T3, OR2T5, OR2G6, OR2T29, OR2T34, OR2T10, OR2T11
	3	Gain	1	122,729	p36.32	p36.32	MEGF6, MIR551A, TPRG1L
	3	Gain	4	106,006	q13.2	q13.2	UGT2B15
	3	Gain	6	166,92	p22.2	p22.2	HIST1H2BC, HIST1H2AC, HIST1H1E, HIST1H2BD, HIST1H2BE, HIST1H4D, HIST1H3D, HIST1H2AD, HIST1H2BF, HIST1H4E, HIST1H2BG, HIST1H2AE, HIST1H3E, HIST1H1D, HIST1H4F, HIST1H4G, HIST1H3F, HIST1H2BH, HIST1H3G, HIST1H2BI, HIST1H4H
	3	Gain	14	636,355	q32.33	q32.33	KIAA0125, ADAM6, NCRNA00226
	3	Gain	16	284,519	p11.2	p11.1	LOC283914, LOC146481, LOC100130700
	3	Gain	19	104,067	q13.43	q13.43	ZSCAN22, A1BG, A1BG-AS, ZNF497, ZNF837, RPS5, LOC646862, ZNF584, ZNF132
	3	Gain	22	133,872	q11.22	q11.22	MIR650, IGLL5
	3	Gain	X	144,019	q28	q28	MAGEA8
	3	Gain	22	263,891	q11.22	q11.22	TOP3B
569/09	3	Gain	17	559,2	q21.31	q21.31	KIAA1267, LOC644246, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFPI, LRRC37A2, NSF
	3	Gain	14	463,743	q32.33	q32.33	KIAA0125, ADAM6
	3	Gain	8	123,209	p21.3	p21.3	SLC39A14, PPP3CC
	3	Gain	3	106,067	q12.2	q12.2	GPR128, TFG
497/09	4	Gain	14	398,966	q32.33	q32.33	KIAA0125, ADAM6
	3	Gain	X	182,772	q26.3	q26.3	CT45A1, CT45A2, CT45A4, CT45A3
	3	Gain	17	571,816	q21.31	q21.31	KIAA1267, LOC644246, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFPI, LRRC37A2, NSF
	1	Loss	14	413,847	q11.2	q11.2	-
	1	Loss	10	151,89	q21.1	q21.1	-
	1	Loss	8	139,855	p11.22	p11.22	ADAM5P, ADAM3A
	1	Loss	19	122,276	p12	p12	ZNF826P
	1	Loss	8	139,855	p11.22	p11.22	ADAM5P, ADAM3A
	3	Gain	X	202,87	p22.33	p22.33	-
	3	Gain	14	260,007	q32.33	q32.33	KIAA0125, ADAM6
	3	Gain	1	450,4	q44	q44	
							42

OR13G1, OR6F1, OR1C1, OR14A16, OR11L1, TRIM58, OR2W3, OR2T8, OR2L13, OR2L8,
OR2AK2, OR2L1P, OR2L2, OR2L3

	4	Gain	14	288,715	q32.33	q32.33	q32.33	NCRNA00226
	1	Loss	14	206,555	q11.2	q11.2	q11.2	-
	4	Gain	14	433,17	q32.33	q32.33	q32.33	KIAA0125, ADAM6
	1	Loss	14	132,776	q11.2	q11.2	q11.2	-
674/04	1	Loss	8	137,24	p11.22	p11.22	p11.22	ADAM5P, ADAM3A
	0	Loss	8	139,855	p11.22	p11.22	p11.22	ADAM5P, ADAM3A
456/09	1	Loss	14	410,689	q11.2	q11.2	q11.2	-
	1	Loss	9	159,259	p23	p23	p23	-
	3	Gain	18	669,852	q21.2	q21.2	q21.2	DCC
657/12	3	Gain	X	604,254	q27.1	q27.1	q27.2	SPANXB1, SPANXB2, SPANXF1, LDOC1, SPANXC, SPANXA2, SPANXA1

Em todos os pacientes analisados foram identificadas uma totalidade de 94 CNVs. O tamanho das CNVs variaram entre 100,951 kbp 1207,762 kbp, apresentando tamanho médio de 268,62. Destas, 83 CNVs já eram descritas e 11 foram consideradas como inéditas, ou seja, ainda não descritas na literatura ou em banco de dados. As CNVs já descritas apresentaram um tamanho médio de 270,911 kbp e as inéditas um tamanho médio de 277,814 kbp. Essas alterações estruturais podem ser tanto variações de perda, como de ganho. Assim, a média das CNVs encontradas que possuíam alteração de perda foi de 205,51 kbp, e a média de todas aquelas que possuíam alteração de ganho foi de 315,37. Apesar de a diferença ser pequena, houve maior predominância de ganhos de regiões em relação às perdas, foram encontrados 55 ganhos e 39 perdas. – Tabela 6.

Média de todas as CNVs encontradas	268,62
Média de todas as alterações de perda	205,51
Média de todas as alterações de ganho	315,37
Média das CNVs já descritas	270,911
Médias das CNVs inéditas	277,814
Range	100,951 – 1207,762
Total de CNVs	94
CNVs já descritas	83
CNVs inéditas	11
CNVs de ganho	55
CNVs de perda	39

Tabela 6: Apresentação dos cálculos das CNVs da tabela 5. As médias e o range foram calculados a partir do tamanho dos fragmentos (kbp).

Algumas das alterações estruturais ainda não descritas no DGV e com um possível potencial patogênico podem ser observadas nas figuras abaixo, as quais foram divididas por paciente.

4.2.1 Caso 657/12

Trata-se de um paciente com polimicrogiria bilateral. O indivíduo em questão possui duplicação de 604,254kbp no cromossomo X. Essa CNV envolve os genes *SPANXB1*, *SPANXB2*, *SPANXF1*, *LDOC1*, *SPANXC*, *SPANXA2*, *SPANXA1* (Figura 23).

Essa CNV foi também analisada no banco de dados Decipher, o qual possui informações se a CNV inédita possui sobreposição com variantes já descritas como patogênicas ou se existe associação com síndromes bem caracterizadas do ponto de vista clínico. Encontramos uma sobreposição dessa CNV com outra já descrita no Decipher, a qual se encontra na mesma localização e está presente em pacientes com fenótipos de atraso no desenvolvimento da fala e da linguagem, distúrbios psiquiátricos, microcefalia, distúrbios intelectuais e hiperatividade (Figura 24).

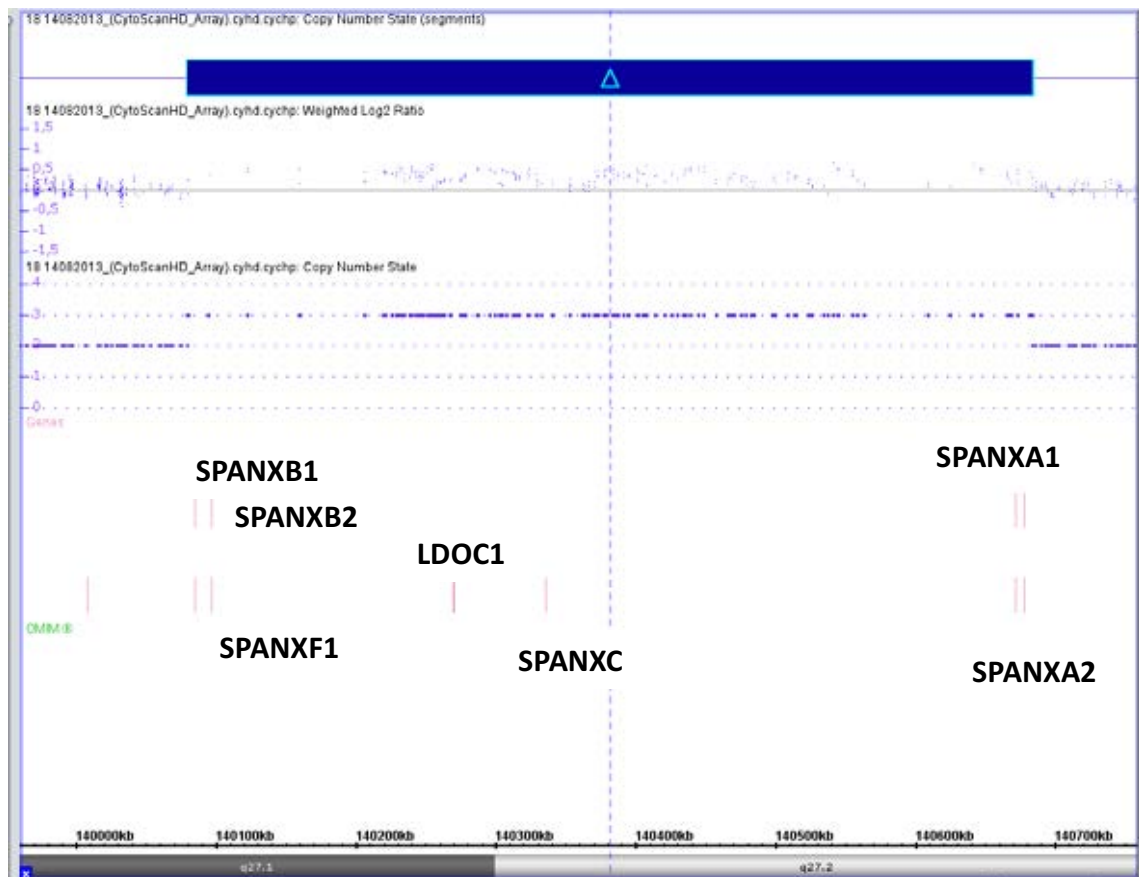


Figura 23: Análise de alta resolução da alteração estrutural no cromossomo X do indivíduo 657/12. Notar na parte superior da figura a barra em azul que representa a variação no número de cópias do indivíduo, azul representando alteração de ganho e vermelho de perda. Na parte inferior, encontramos os genes englobados pela variação: *SPANXB1*, *SPANXB2*, *SPANXF1*, *LDOC1*, *SPANXC*, *SPANXA2*, *SPANXA1*.

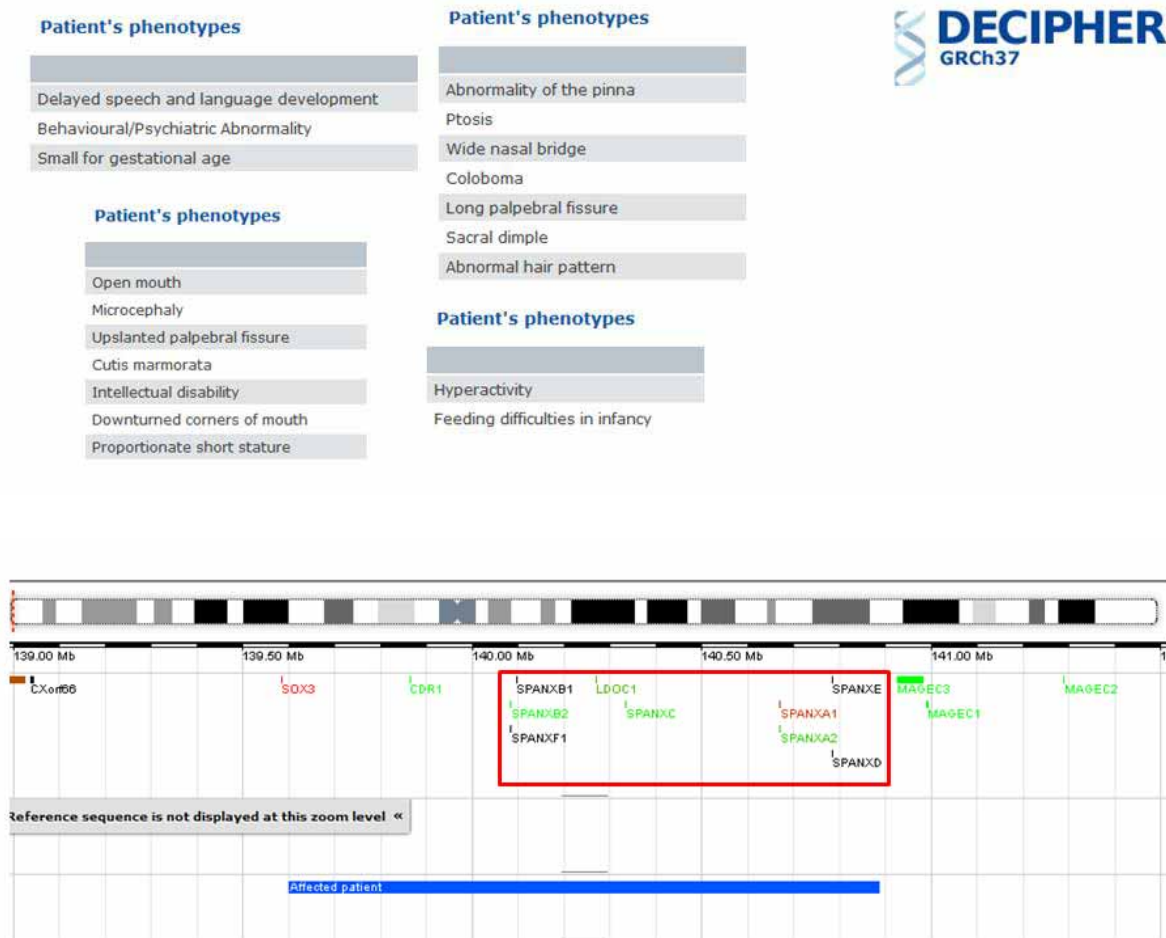


Figura 24: CNV analisada no banco de dados Decipher que se sobrepõe à CNV identificada pelo nosso grupo. Na porção superior, os fenótipos dos pacientes os quais essa alteração foi identificada. Mais abaixo, em destaque, os genes que a CNV engloba.

4.2.2 Caso 848/04

Trata-se de um paciente do sexo masculino, com polimicrogiria perisilviana simétrica bilateral. O indivíduo em questão possui duplicação de 117,943kbp no cromossomo 19. Essa CNV envolve os genes : *ZNF564*, *ZNF490*, *ZNF791* (Figura 25).

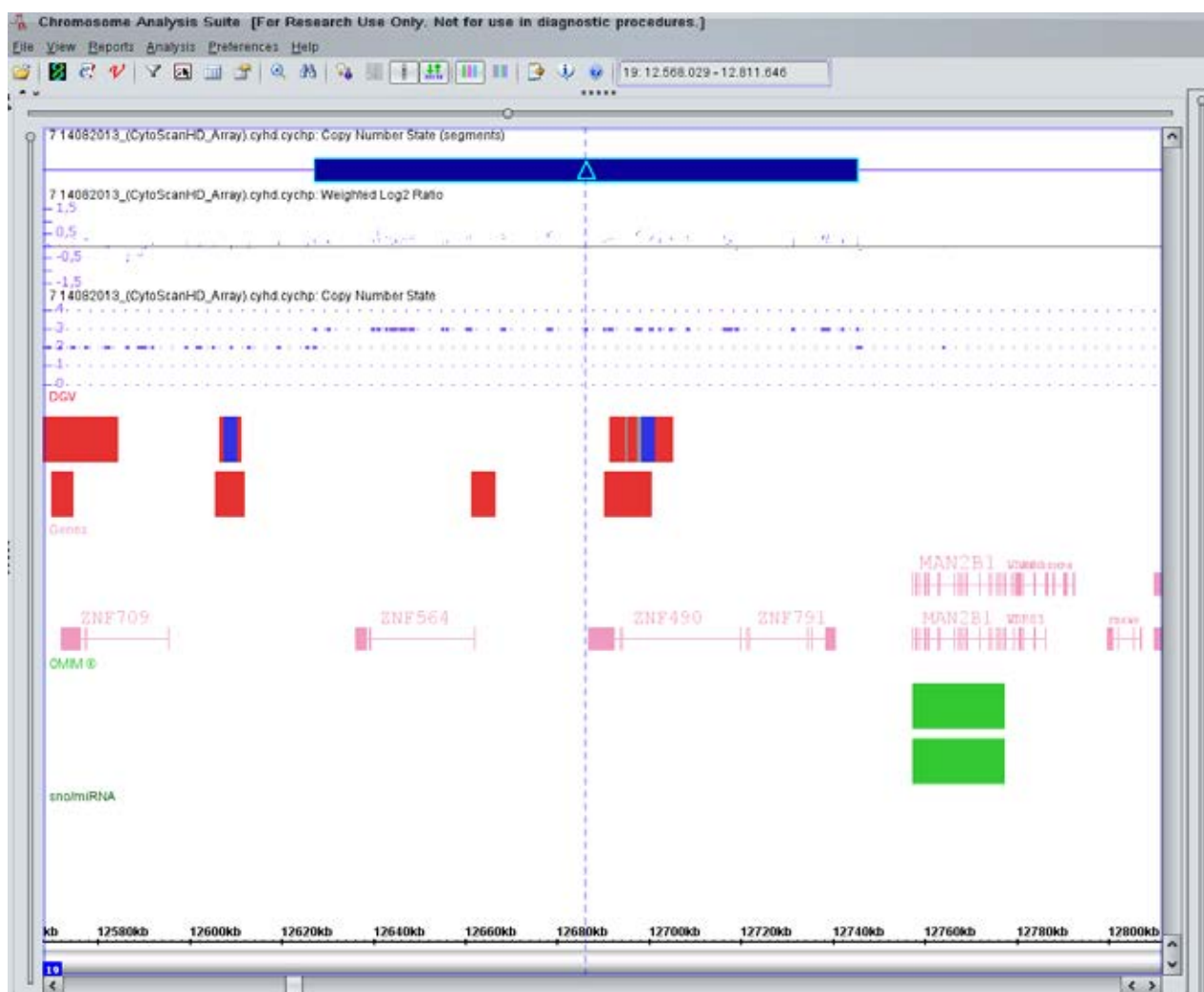


Figura 25: Análise de alta resolução da alteração estrutural no cromossomo 19 do indivíduo 848/04. Notar na parte superior da figura a barra em azul que representa a variação no número de cópias do indivíduo, azul representando alteração de ganho e vermelho de perda. Logo abaixo podemos observar barras em vermelho e azul que são as variações já descritas em bancos de dados e não associadas a quadros patológicos. Também na parte inferior, encontramos os genes englobados pela variação: *ZNF564*, *ZNF490*, *ZNF791*

4.2.3 Caso 505/09

Trata-se de um paciente do sexo feminino, com polimicrogiriata temporal. O indivíduo em questão possui duplicação de 553,55kbp no cromossomo 21. Essa CNV envolve diversos genes : *PCBP3*, *COL6A1*, *COL6A2*, *FTCD*, *C21orf56*, *LSS*, *MCM3AP-AS*, *MCM3AP*, *C21orf57*, *C21orf58*, *PCNT*, *DIP2A* (Figura 26).

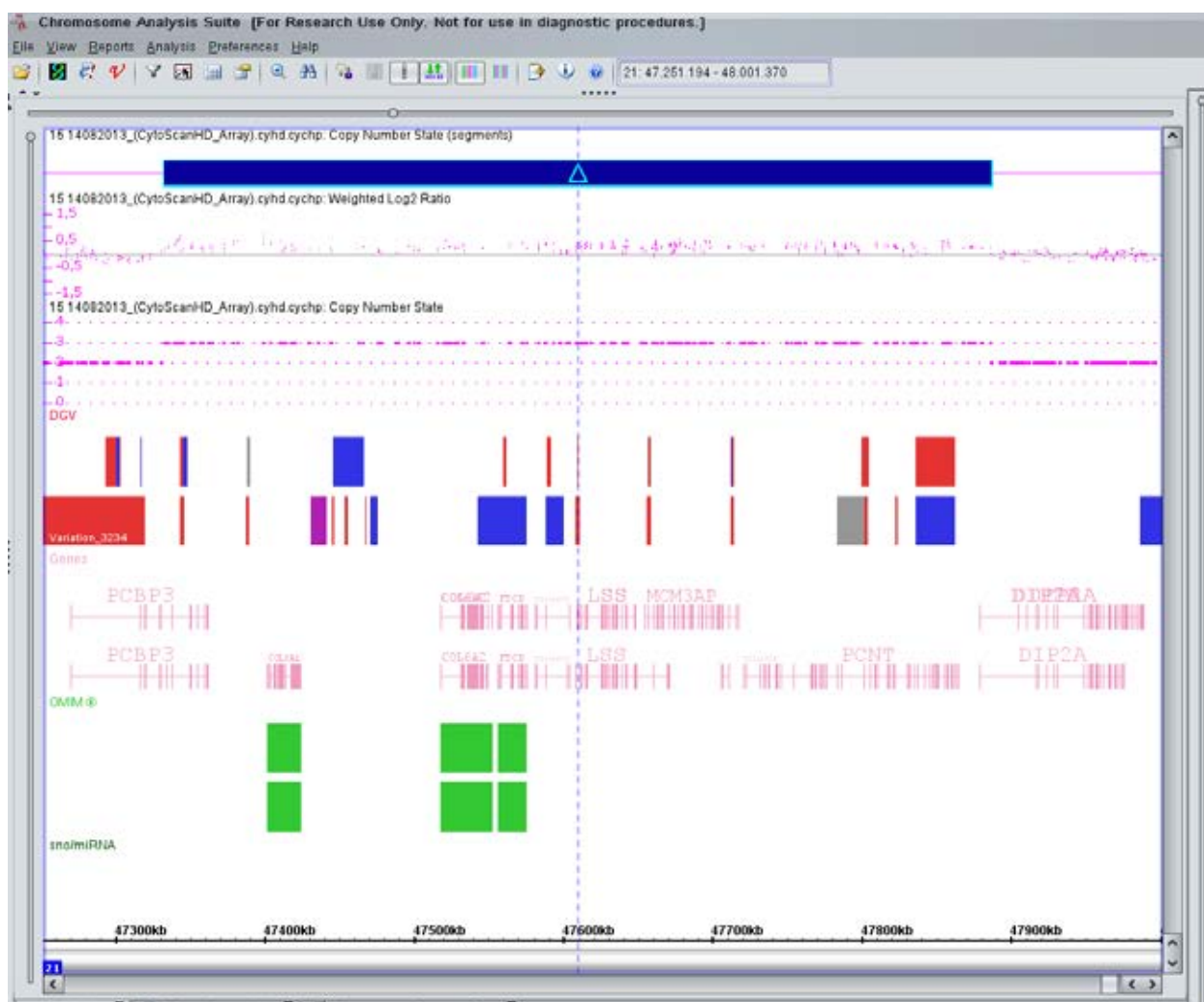


Figura 26: Análise de alta resolução da alteração estrutural no cromossomo 21 do indivíduo 505/09. Notar na parte superior da figura a barra em azul que representa a variação no número de cópias do indivíduo, azul representando alteração de ganho e vermelho de perda. Logo abaixo podemos observar barras em vermelho e azul que são as variações já descritas em bancos de dados e não associadas a quadros patológicos. Também na parte inferior, encontramos os genes englobados pela variação: *PCBP3*, *COL6A1*, *COL6A2*, *FTCD*, *C21orf56*, *LSS*, *MCM3AP-AS*, *MCM3AP*, *C21orf57*, *C21orf58*, *PCNT*, *DIP2A*

4.2.4 Caso 322/08

Trata-se de um paciente do sexo masculino, com polimicrogria parietal. O indivíduo em questão possui duplicação de 122,724kbp no cromossomo 6. Essa CNV envolve os genes : *C6orf186*, *DDO*, *SLC22A16* (Figura 27).

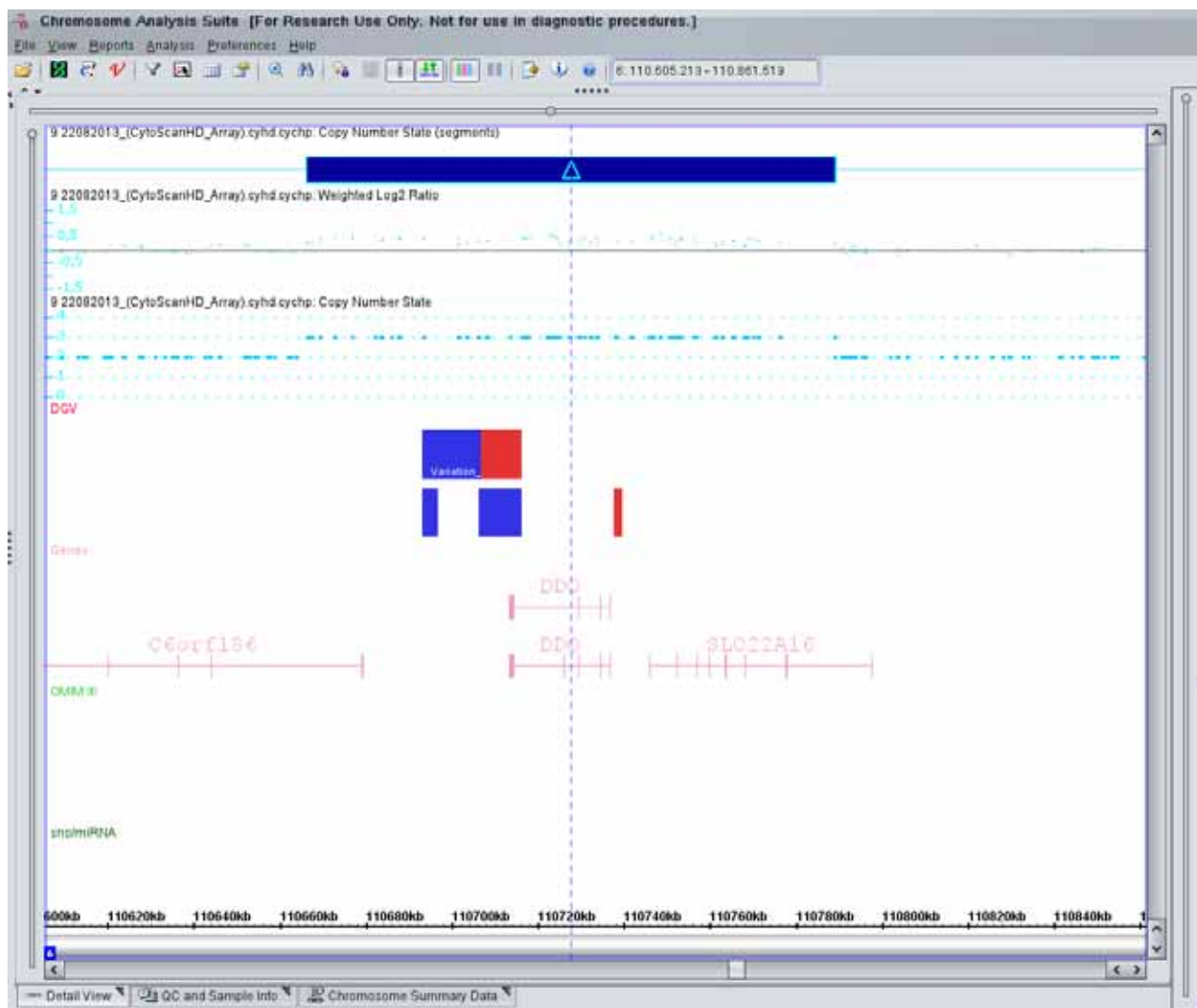


Figura 27: Análise de alta resolução da alteração estrutural no cromossomo 6 do indivíduo 322/08. Notar na parte superior da figura a barra em azul que representa a variação no número de cópias do indivíduo, azul representando alteração de ganho e vermelho de perda. Logo abaixo podemos observar barras em vermelho e azul que são as variações já descritas em bancos de dados e não associadas a quadros patológicos. Também na parte inferior, encontramos os genes englobados pela variação: *C6orf186*, *DDO*, *SLC22A16*.

4.2.5 Caso 1337/03

Trata-se de um paciente do sexo feminino portador de polimicrogria perisilviana parietal posterior. O indivíduo em questão possui deleção de 166,713kbp no cromossomo 4. Essa CNV envolve apenas o gene: *ARHGAP10* (Figura 28).

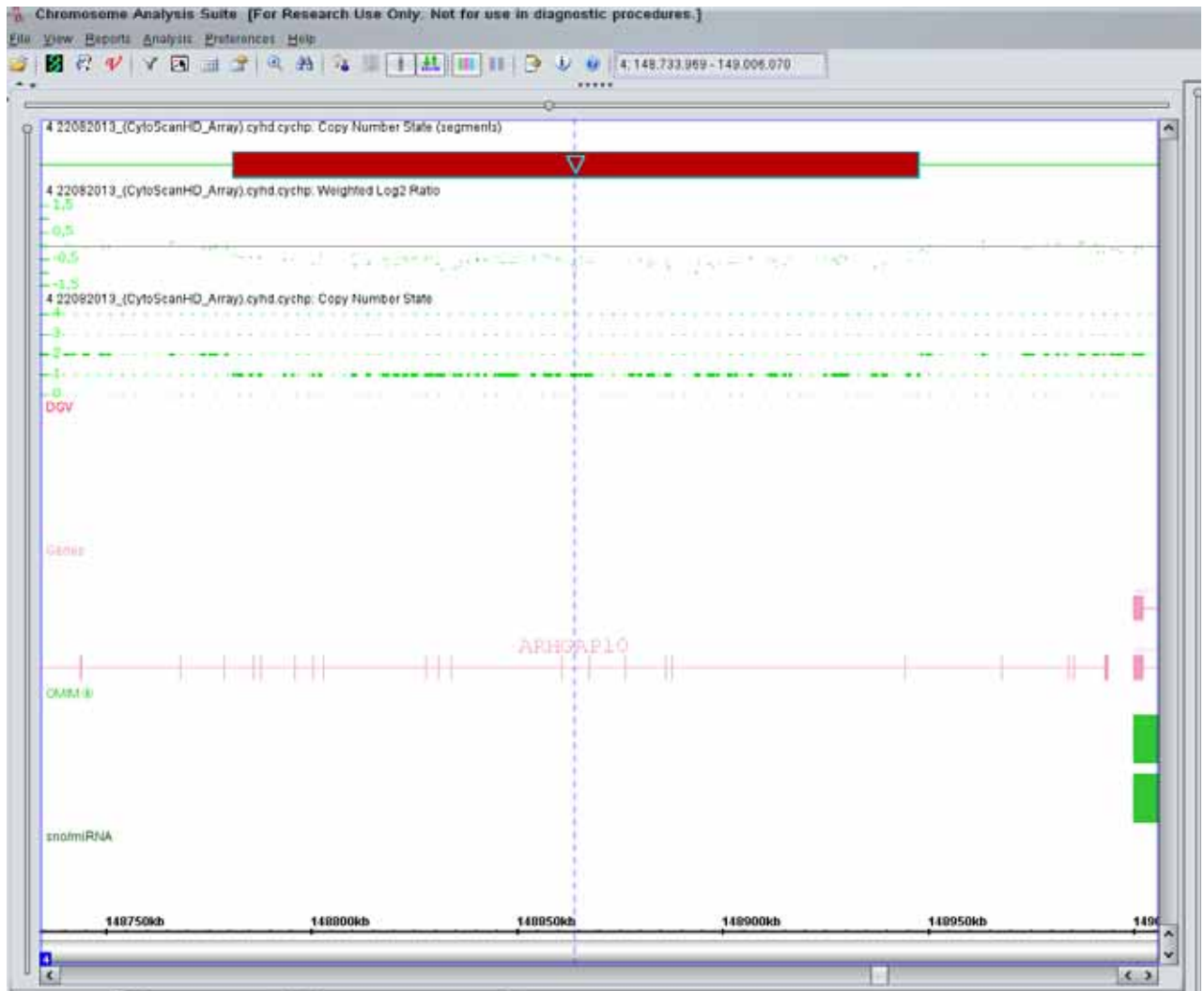


Figura 28: Análise de alta resolução da alteração estrutural no cromossomo 4 do indivíduo 1337/03. Notar na parte superior da figura a barra em azul que representa a variação no número de cópias do indivíduo, azul representando alteração de ganho e vermelho de perda. Logo abaixo podemos observar barras em vermelho e azul que são as variações já descritas em bancos de dados e não associadas a quadros patológicos. Também na parte inferior, encontramos os genes englobados pela variação: *ARHGAP10*

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento do córtex cerebral envolve uma série de mecanismos complexos. Os motivos pelos quais algumas falhas são geradas em todo este processo, ainda permanecem incompreendidos. No entanto, já é claro que interrupções ou anormalidades nos diversos estágios do desenvolvimento do córtex podem levar a origem das MDCs [10].

Aproximadamente 100 bilhões de neurônios migram pelo encéfalo e se organizam em um quadrilhão de sinapses [7]. Os estágios que caracterizam a migração neuronal e os eventos pós-migracionais sempre se encontram enfatizados em diversos estudos sobre a investigação destes distúrbios. O papel do citoesqueleto e a importância dos microtubulos ganha maior significância pela associação de mutações com genes da família das tubulinas [72].

O gene *TUBB3*, localizado no cromossomo 16 do genoma humano, é responsável por codificar proteínas beta-tubulina do isotipo III, fazendo parte do complexo alfa-beta-tubulina, principais componentes dos microtúbulos. Este gene é estruturado em um total de 9 éxons e 15 transcritos. Este trabalho teve como objetivo analisar os 4 exons codificantes que geram uma proteína de 450 aminoácidos.

A triagem de mutações do gene *TUBB3* realizada em pacientes com Polimicrogiria, identificou alterações em todos os quatro exons. Com exceção de uma, todas as alterações encontradas já haviam sido anteriormente descritas, e a partir disso, constatou-se que estas são pouco prováveis de apresentarem um potencial patogênico. A alteração que ainda não havia sido descrita também possui uma pequena probabilidade de ser patogênica, devido ao fato de que ela não se localiza na região codificante e nem no sítio de *splicing*. Foram identificadas três mutações na região de íntrons e apesar de estarem muito próximas a região codificante e ao sítio de *splicing*, provavelmente não são patogênicas, já que também estão presentes com frequências consideráveis em indivíduos clinicamente normais (figuras mostrando distribuições alélicas no 1000 genomas). Uma das mutações encontradas estava presente dentro da região de sítio de *splicing*, havendo assim, uma pequena possibilidade de alterá-lo; porém ainda assim, ela não foi descrita como patogênica no *Ensembl*. Também foram identificadas duas alterações dentro da região codificante, mas pelo fato de ambas já terem sido descritas anteriormente (*Ensembl*), a possibilidade de estarem relacionadas com o quadro clínico dos pacientes é ínfima.

Posteriormente, realizamos a análise das alterações estruturais, e assim, foi possível detectar algumas CNVs com potencial patogênico não descritas no banco de dados do DGV. Incluímos no trabalho o paciente 657/12 que apresenta um quadro clínico de PMG Bilateral e era um suspeito de possuir alterações estruturais nesta região, assim resolvemos confirmar pela técnica de SNP Array, junto com os demais pacientes.

Na Figura 23, observamos uma alteração no cromossomo X do indivíduo 657/12. Essa CNV engloba diversos genes - *SPANXB1*, *SPANXB2*, *SPANXF1*, *LDOC1*, *SPANXC*, *SPANXA2*, *SPANXA1* – e ainda não é descrita, entretanto podemos encontrar em banco de dados de variantes patogênicas a descrição de outra CNV que se sobrepõe a esta, possuindo exatamente a mesma localização e englobando os mesmos genes. Essa variação já descrita está presente em pacientes com fenótipos de atraso no desenvolvimento da fala e da linguagem, distúrbios psiquiátricos, microcefalia, distúrbios intelectuais e hiperatividade (Figura 24). Portanto, essa variação identificada pelo nosso grupo suporta fortemente a hipótese de uma relação entre a PMG e CNVs nesta região do cromossomo X. Outra evidencia, é o locus descrito por nosso grupo em Xq27, para uma família com Polimicrogria Perisilviana Bilateral (80), mesma localização na CNV em questão.

Na Figura 25, observamos uma alteração no cromossomo 19 do indivíduo 848/04. Essa CNV engloba três genes - *ZNF564*, *ZNF490*, *ZNF791* – e se caracteriza como uma alteração de ganho no número de cópias. Entretanto, a maior parte das CNVs já descritas no DGV que não são associadas a quadros patológicos são alterações de perda no número de cópias, encontrando pequenas alterações de ganho, mas nenhuma que englobe todos os três genes, como a variante identificada em nosso pacientes.

Na Figura 26, observamos uma alteração no cromossomo 21 do indivíduo 505/09. Essa CNV engloba diversos genes - *PCBP3*, *COL6A1*, *COL6A2*, *FTCD*, *C21orf56*, *LSS*, *MCM3AP-AS*, *MCM3AP*, *C21orf57*, *C21orf58*, *PCNT*, *DIP2A* – e também se caracteriza como uma alteração de ganho no número de cópias. Há alterações de perda e ganho descritas no DGV, porém são pequenas CNVs que não englobam todos os genes citados anteriormente.

Na Figura 28, observamos uma alteração no cromossomo 4 do indivíduo 1337/03. Essa CNV se caracteriza como uma alteração de perda no número de cópias e engloba apenas um gene. Porém, ainda não há descrições no DVG de nenhuma CNV neste locus.

Na Figura 27 e no restante das alterações inéditas destacadas em vermelho na Tabela 5, encontramos CNVs que são descritas no DVG, mas nenhuma delas que englobam os mesmos genes das CNVs apresentadas neste trabalho.

6. CONCLUSÕES

1. Diante dos resultados obtidos nesse estudo, podemos concluir que o gene *TUBB3* não possui nenhuma alteração que se mostrasse significativamente envolvida na etiologia da polimicrogiria em nosso grupo de pacientes;
2. Também podemos concluir pela análise de *Copy Number Variations*, que as alterações apresentadas neste trabalho, consideradas como inéditas por não terem sido descritas no banco de dados DGV, podem sugerir novas hipóteses de genes que possivelmente estejam envolvidos na etiologia da polimicrogiria.
3. Perspectivas: as alterações estruturais inéditas ainda serão validadas em outra plataforma como parte de algum trabalho posterior e, além disso, as famílias desses pacientes também serão analisadas posteriormente para investigar se estas se tratam de alterações herdadas. Além disso, poderemos investigar o SNP encontrado no exon 3, o qual se encontra em região de sítio de splicing e possui baixa frequência na população controle brasileira.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Cholfin JA, Rubenstein JL.** Patternin of frontal cortex subdivisions byFgf17. *Proc Nat Acad Sci USA* 2007; 104: 7652–7.
2. **Cholfin JA, Rubenstein JL.** Frontal cortex subdivision patterning is coordinately regulated by Fgf8, Fgf17, and Emx2. *J Comp Neurol* 2008; 509: 144–55.
3. **Hoch RV, Rubenstein JL, Pleasure SJ.** Genes and signaling events that establish regional patterning of the mammalian forebrain. *Semin Cell Dev Biol* 2009; 20: 378–86.
4. **Sansom SN, Livesey FJ.** Gradients in the brain: the control of the development of form and function in the cerebral cortex. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1: a002519.
5. **O’Leary DM, Chou S-J, Sahara S.** Area patterning of the mammalian cortex. *Neuron* 2007; 56: 252–69.
6. **Rakic P, Ayoub AE, Breunig JJ, Dominguez MH.** Decision by division: making cortical maps. *Trends Neurosci* 2009; 32: 291–301.
7. **Delatycki MB, Leventer RJ.** Listen carefully: LIS1 and DCX MLPA in lissencephaly and subcortica band heterotopia. *Eur J Hum Genet.* 2009, Vol. 17.
8. **Francis F, Meyer G, Fallet-Bianco C, Moreno S, Kappeler C, Socorro AC, et al.** Human disorders of cortical development: from past to present. *European Journal of Neuroscience*, 2006; 23: 877–893.
9. **Guerrini R, Dobyns WB, Barkovich AJ.**Abnormal development of the human cerebral cortex: genetics, functional consequences and treatment options. *Trends in Neurosciences* 2008; 31 (3): 154-162.
10. **Barkovich AJ, Guerrini R, KuznieckyRI, Jackson GD, Dobyns WB.** A developmental and genetic classification for malformations of cortical development update 2012. *Brain.* 2012, Vols. 135: 1348-69.
11. **Sahara S, O’Leary DDM.** . Fgf10 regulates transition period of cortical stem cell differentiation to radial glia controlling generation of neurons and basal progenitors. *Neuron.* 63, 2009, Vols. 1:48-62.
12. **Sidman RL and Rakic P.** Neuronal migration with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res.* 1973, Vols. 62: 1-35.
13. **Guerrini R, Marini C.** Genetic malformations of cortical development. *Exp Brain Res.* 173, 2006, Vol. 2.
14. **Rikens.** Laboratory for Developmental Neurobiolgy. *New Discovery for Mechanism of Neuronal Migration and Morphogenesis.* [Online] julho 2008. [Cited: maio 30, 2013.] <http://www.brain.riken.jp/bsi-news/en/no40/research03.html>.
15. **Kanekar S, Gent M.** Malformations of Cortical Development. *Semin Ultrasound CT MRI* 2011; 32:211-227.
16. **Bentivoglio M, Tassi L, Pech E, Costa C, Fabene PF, Spreafico R.** Cortical development and focal cortical dysplasia. *Epileptic Disord* 2003; 5 (Suppl 2): S 27–S 34
17. **Tungel, C.** Ein Fall von Neubildung grauer Hirnssubstanz. *Virchous Arch. Pathol. Anat.* 1859; 16, 166–168.

18. **Virchow, R.** Zur Pathologischen Anatomie des Gehirns. II. Heterotopie des grauen Hirnsubstanz. Arch. Pathol. Anat. 1867; 38, 138–142.
19. **Alzheimer, A.** Die Gruppierung der Epilepsie. Allg. Z. Psychiatri. 1907; 64, 418–421.
20. **Hauser, W.A.; Annegers, J.F.; Kurland, L.T.** (1993) Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. *Epilepsia* 34:453-468.
21. **Gastaut H, Broughton R.** (1974) Ataques epilépticos. *Barcelona: Toray* p.17
22. **Gastaut H.** (1985) Dicionário de epilepsia. Parte 1: Definições. Edição Portuguesa. São Paulo: Clínica Neurológica da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP;
23. **Guereiro, C.A.M., Guereiro, M.M., Cendes, F., Lopes-Cendes, I.** (2000). Considerações Gerais. In: *Epilepsia*. Lemos, São Paulo: 1-10.
24. **Barkovich AJ.** (1996) Subcortical heterotopia: a distinct clinico-radiologic entity. *AJNR Am J Neuroradiol* 1996; 17: 1315–22.
25. **Kuzniecky R, Murro A, King D, Morawetz R, Smith J, Powers R, et al.** Magnetic resonance imaging in childhood intractable partial epilepsies: pathologic correlations. *Neurology* 1993; 43: 681-697
26. **Kuzniecky RI.** (1994) Magnetic resonance imaging in developmental disorders of the cerebral cortex. *Epilepsia*. 1994;35(suppl 6):S44 –S56.
27. **Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Jackson GD, et al.** (2005) A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. *Neurology*. 2005;65:1873–1887.
28. **BARKOVICH, A.J. et al.** (2001) Classification system for malformations of cortical development. *Neurology*, v.57, p. 2168-2178, 2001.
29. **Lombroso CT.** (200) Can early postnatal closed head injury induce cortical dysplasia. *Epilepsia*. 2000;41:245–253.
30. **Sarnat HB.** (1987) Disturbances of late neuronal migrations in the perinatal period. *Am J Dis Child*. 1987;141:969 –980.
31. **Englund, C. et al.** (2005) Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J. Neurosci*.
32. **Volpe JJ, Adams RD.** Cerebro-hepato-renal syndrome of Zellweger. An inherited disorder of neuronal migration. *Acta Neuropathol* 1972; 20:175–98.
33. **Evrard P, de Saint-Georges P, Kadhim HJ, Gadisseux J-F.** Pathology of prenatal encephalopathies. In: French J, editor. *Child neurology and developmental disabilities*. Baltimore: Paul H. Brookes; 1989. p. 153–76.
34. **Barkovich AJ.** Current concepts of polymicrogyria. *Neuroradiology* 2010.
35. **Judkins AR, Martinez D, Ferreira P, Dobyns WB, Golden JA.** Polymicrogyria includes fusion of the molecular layer and decreased neuronal populations but normal cortical laminar organization. *J Neuropathol Exp Neurol* 2011; 70: 438–43.
36. **Piao X, Hill RS, Bodell A, Chang BS, Basel-Vanagaite L, Straussberg R, et al;** G protein-coupled receptor-dependent development of human frontal cortex. *Science* 2004; 303:2033-6.
37. **Takanashi, J. and Barkovich, A.** (2003) The changing MR imaging appearance of polymicrogyria: a consequence of myelination. *AJNR Am. J. Neuroradiol*. 24, 788–793

38. **Raybaud C, Girard N, Canto-Moreira N, Poncet M** (1996) High-definition magnetic resonance imaging identification of cortical dysplasias: micropolygyria versus lissencephaly. In: Guerrini R, Andermann F, Canapicchi R, Roger J, Zifkin BG, Pfanner P (eds) *Dysplasias of cerebral cortex and epilepsy*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 131-44.
39. **Leventer RJ, Jansen A, Pilz DT, Stoodley N, Marini C, Dubeau F, et al.** Clinical and imaging heterogeneity of polymicrogyria: a study of 328 patients. *Brain* 2010; 133: 1415–27.
40. **Barkovich AJ.** MRI analysis of sulcation morphology in polymicrogyria. *Epilepsia* 2010.
41. **Robin N, Taylor C, McDonald-McGinn D, Zackai E, Bingham P, Collins K, et al.** Polymicrogyria and deletion 22q11.2 syndrome: window to the etiology of a common cortical malformation. *Am J Med Genet A* 2006; 140A: 2416–25.
42. **Harding B, Copp AJ** (1997) Malformations. In: Graham DI, Lantos PL, eds. *Greenfield's Neuropathology*. 6 ed. London, UK: Arnold; 1997.
43. **Wieck G, Leventer RJ, Squier WM, Jansen A, Andermann E, Dubeau F, et al.** Periventricular nodular heterotopia with overlying polymicrogyria. *Brain*. 2005; 128 (12):2811-21.
44. **Kuzniecky RI, Barkovich AJ.** Pathogenesis and pathology of focal malformations of cortical development and epilepsy. *J Clin Neurophysiol*. 1996 Nov;13(6):468-80. Review.
45. **Guerrini R, Barkovich AJ, Sztriha L, Dobyns WB.** Bilateral frontal polymicrogyria: a newly recognized brain malformation syndrome. *Neurology*. 2000;54:909–13.
46. **Chang BS, Piao X, Bodell A, Basel-Vanagaite L, Straussberg R, Dobyns WB, Qasrawi B, Winter RM, Innes AM, Voit T, Grant PE, Barkovich AJ, Walsh CA.** Bilateral frontoparietal polymicrogyria: clinical and radiological features in 10 families with linkage to chromosome 16. *Ann Neurol*. 2003;53:596–606.
47. **Piao X, Basel-Vanagaite L, Straussberg R, Grant PE, Pugh EW, Doheny K, Doan B, Hong SE, Shugart YY, Walsh CA.** An autosomal recessive form of bilateral frontoparietal polymicrogyria maps to chromosome 16q12.2-21. *Am J Hum Genet*. 2002;70:1028–33.
48. **Piao X, Chang BS, Bodell A, Woods K, Benzev B, Topcu M, Guerrini R, Goldberg-Stern H, Sztriha L, Dobyns WB, Barkovich AJ, Walsh CA.** Genotype-phenotype analysis of human frontoparietal polymicrogyria syndromes. *Ann Neurol*. 2005;58:680–7.
49. **Gropman AL, Barkovich AJ, Vezina LG, Conry JA, Dubovsky EC, Packer RJ.** Pediatric congenital bilateral perisylvian syndrome: clinical and MRI features in 12 patients. *Neuropediatrics*. 1997;28:198–203.
50. **Guerreiro MM, Andermann E, Guerrini R, Dobyns WB, Kuzniecky R, Silver K, Van Bogaert P, Gillain C, David P, Ambrosetto G, Rosati A, Bartolomei F, Parmeggiani A, Paetau R, Salonen O, Ignatius J, Borgatti R, Zucca C, Bastos AC, Palmmini A, Fernandes W, Montenegro MA, Cendes F, Andermann F.** Familial perisylvian polymicrogyria: a new familial syndrome of cortical maldevelopment. *Ann Neurol*. 2000;48:39–48.
51. **Villard L, Nguyen K, Cardoso C, Martin CL, Weiss AM, Sifry-Platt M, Grix AW, Graham JM, Winter RM, Leventer RJ, Dobyns WB.** A locus for bilateral perisylvian polymicrogyria maps to Xq28. *Am J Hum Genet*. 2002;70:1003–8.

52. **Jansen AC, Leonard G, Bastos AC, Esposito-Festen JE, Tampieri D, Watkins K, Andermann F, Andermann E.** Cognitive functioning in bilateral perisylvian polymicrogyria (BPP): clinical and radiological correlations. *Epilepsy Behav.*2005;6:393–404.
53. **Clark M, Pitt M, Neville BG.** Lower motor neuron involvement in perisylvian polymicrogyria. *Dev Med Child Neurol.*2006;48:842–6.
54. **Guerrini R, Dubeau F, Dulac O, Barkovich AJ, Kuzniecky R, Fett C, Jones-Gotman M, Canapicchi R, Cross H, Fish D, Bonanni P, Jambaque I, Andermann F.** Bilateral parasagittal parietooccipital polymicrogyria and epilepsy. *Ann Neurol.*1997;41:65–73.
55. **Chang BS, Piao X, Giannini C, Cascino GD, Scheffer I, Woods CG, Topcu M, Tezcan K, Bodell A, Leventer RJ, Barkovich AJ, Grant PE, Walsh CA.** Bilateral generalized polymicrogyria (BGP): a distinct syndrome of cortical malformation. *Neurology.* 2004;62:1722–8.
56. **Kuzniecky R, Andermann F, Guerrini R.** Congenital bilateral perisylvian syndrome: study of 31 patients. The CBPS Multicenter Collaborative Study. *Lancet* 1993; 341: 608-612.
57. **Guerrini R, Dravet C, Raybaud C, Roger J, Bureau M, Battaglia A, Livet MO, Gambarelli D, Robain O.** Epilepsy and focal gyral anomalies detected by MRI: electroclinico-morphological correlations and follow-up. *Dev Med Child Neurol.* 1992;34(8):706-18.
58. **Guerrini R, Carrozzo R.** Epilepsy and genetic malformations of the cerebral cortex. *Am J Med Genet.* 2001;106(2):160-73. Review.
59. **Hehr U, Schuierer G.** Genetic Assessment of Cortical Malformations. *Neuropediatrics* 2011; 42: 43–50.
60. **Jaglin XH, Poirier K, Saillour Y, Buhler E, Tian G, Bahi-Buisson N.** Mutations in the beta-tubulin gene TUBB2B result in asymmetrical polymicrogyria. *Nat Genet.* 2009; 41(6):746-52.
61. **Guerrini R, Mei D, Cordelli DM, Pucatti D, Franzoni E, Parrini E.** Symmetric polymicrogyria and pachygyria associated with TUBB2B gene mutations. *European Journal of Human Genetics* 2012; doi:10.1038/ejhg.2012.21.
62. **Abdollahi MR, Morrison E, Sirey T, Molnar Z, Hayward BE, Carr IM, Springell K, Woods CG, Ahmed M, Hattingh L, Corry P, Pilz DT, Stoodley N, Crow Y, Taylor GR, Bonthron DT, Sheridan E.** Mutation of the variant alpha-tubulin TUBA8 results in polymicrogyria with optic nerve hypoplasia. *Am J Hum Genet.* 2009; 85(5):737-44.
63. **Keays, D.A., Tian, G., Poirier, K., Huang, G.J., Siebold, C., Cleak, J., Oliver, P.L., Fray, M., Harvey, R.J., Molna'r, Z. et al. (2007)** Mutations inalpha-tubulin cause abnormal neuronal migration in mice andlissencephaly in humans. *Cell*, 128, 45–57.
64. **Poirier, K., Keays, D.A., Francis, F., Saillour, Y., Bahi-Buisson, N.,Manouvrier, S., Fallet-Bianco, C., Pasquier, L., Toutain, A., Tuy, F.P.et al. (2007)** Large spectrum of lissencephaly and pachygyria phenotypesresulting from de novo missense mutations in tubulin alpha 1A (TUBA1A). *Hum. Mut.*, 28, 1055–1064.
65. **Little, M. and Seehaus, T. (1988)** Comparative analysis of tubulinsequences. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 90, 655–670.
66. **Luduena, R.F. (1993)** Are tubulin isotypes functionally significant. *Mol.Biol. Cell.*, 4, 445–457.

67. **Sullivan, K.F. and Cleveland, D.W.** (1986) Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate beta tubulin polypeptide classes. *PNAS.*, 83, 4327–4331.
68. **Tischfield, M.A., Baris, H.N., Wu, C., Rudolph, G., Van Maldergem, L., He, W., Chan, W.M., Andrews, C., Demer, J.L., Robertson, R.L. et al.** (2010) Human TUBB3 mutations perturb microtubule dynamics, kinesin interactions, and axon guidance. *Cell*, 140, 74–87.
69. **Poirier, K., Saillour, Y., Bahi-Buisson, N., Jaglin, X.H., Fallet-Bianco, C., Nabbout, R., Castelnau-Ptakhine, L., Roubertie, A., Attie-Bitach, T., Desguerre, I. et al.** (2010) Mutations in the neuronal α -tubulin subunit TUBB3 result in malformation of cortical development and neuronal migration defects. *Hum. Mol. Gen.*, 19, 4462–4473.
70. **Romaniello, R., Tonelli, A., Arrigoni, F., Baschiroto, C., Triulzi, F., Bresolin, N., Bassi, M.T. and Borgatti, R.** (2012) A novel mutation in the beta-tubulin gene TUBB2B associated with complex malformation of cortical development and deficits in axonal guidance. *Dev. Med. Child Neurol.*, 54, 765–769.
71. **Tischfield, M.A., Cederquist, G.Y., Gupta, M.L. Jr and Engle, E.C.** (2011) Phenotypic spectrum of the tubulin-related disorders and functional implications of disease-causing mutations. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 21, 286–294.
72. **Jaglin, X.H. and Chelly, J.** (2009) Tubulin-related cortical dysgeneses: microtubule dysfunction underlying neuronal migration defects. *Trends Genet.*, 25, 555–566.
73. **Feuk L, Carson AR, Scherer SW.** Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet.* 7, 2006, Vols. 2:85-97, Review.
74. **Pinto D, Marshall C, Feuk L, Scherer SW.** Copy-number variation in control population cohort. *Human Molecular Genetics.* 2007, Vols. 16:168–73, Review.
75. **62. Hochstenbach R, Buizer-Voskamp JE, Vorstman JAS, Ophoff RA.** Genome Arrays for the Detection of Copy Number Variations in Idiopathic Mental Retardation, Idiopathic Generalized Epilepsy and Neuropsychiatric Disorders: Lessons for Diagnostic Workflow and Research. *Cytogenet Genome Res.* 2011, Vols. 135: 174-202.
76. **63. Kariminejad R, Lind-Thomsen A, Tumer Z, Erdogan F, Ropers HH, Tommerup N, et al.** High Frequency of Rare Copy Number Variants Affecting Functionally Related Genes in Patients with Structural Brain Malformations. *Human Mutation.* 12, 2011, Vols. 32: 1427-35.
77. **64. Valduga M, Philippe C, Bach Segura P, Thiebaugeorges O, Miton A, Beri, et al.** A retrospective study by oligonucleotide array-CGH analysis in 50 fetuses with multiple malformations. *Prenat Diagn.* 2010, Vols. 30: 333–341.
78. **Tsuneda, S. S.** Estratégia para investigação molecular de epilepsia com identificação de genes relacionados a formas de polimicrogiria. Tese de doutorado.
79. **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977, Vols. 74: 5463-67.
80. **Santos NF, Secolin R, Brandão-Almeida IL, Silva MS, Torres FR, Tsuneda SS, et al.** A new candidate locus for bilateral perisylvian polymicrogyria mapped on chromosome Xq27. *Am J Med Genet A.* 2008; 146(9):1151-7.

