



**Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,  
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**

**Caracterização fenotípica das epilepsias geneticamente determinadas  
diagnosticadas pelo sequenciamento de nova geração.**

**Fernanda Veiga de Góes**

Rio de Janeiro

Agosto de 2022



**Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,  
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**

**Caracterização fenotípica das epilepsias geneticamente determinadas  
diagnosticadas pelo sequenciamento de nova geração.**

Fernanda Veiga de Góes

Tese apresentada à pós-graduação em Pesquisa Aplicada à Saúde da Criança e da Mulher do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, da Fundação Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora – Dafne Dain Gandelman Horovitz

Coorientador – Fernando Kok

Rio de Janeiro

Agosto de 2022

## CIP - Catalogação na Publicação

Góes, Fernanda Veiga de .

Caracterização fenotípica das epilepsias geneticamente determinadas diagnosticadas pelo sequenciamento de nova geração / Fernanda Veiga de Góes. - Rio de Janeiro, 2022.  
182 f.

Tese (Doutorado Acadêmico em Pesquisa Aplicada à Saúde da Criança e da Mulher) - Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Rio de Janeiro - RJ, 2022.

Orientador: Dafne Dain Gandelman Horovitz.

Co-orientador: Fernando Kok.

Bibliografia: f. 144-164

1. Encefalopatia Epiléptica. 2. Encefalopatia Epiléptica e do Desenvolvimento. 3. Epilepsia. 4. Epilepsia farmacorresistente. 5. Genética. I. Título.

## **Dedicatória**

À minha família, meu alicerce. À Roberta, minha irmã, sempre aqui entre nós.

Ao meu super companheiro e parceiro de todas as horas, Rinaldo.

Aos pacientes, com minha gratidão, e à Neurologia Infantil, profissão que tanto amo.

## Agradecimentos

Perseverança é a minha palavra. Desistir jamais.

Meu objetivo pessoal sempre foi produzir uma tese de doutorado que agregasse muito conhecimento, não somente um título. Tive interesse por alguns temas, como erro inato do metabolismo, doenças neurogenéticas e, por fim, epilepsia de origem genética.

Não foi nada fácil, mas já estou acostumada. Sempre com muito trabalho, vida corrida com plantões, consultório, família e estudos.

Dificuldades surgiram ao longo do percurso. Logo no início do curso, vivenciei uma grave internação do meu pai durante três meses com Guillain-Barré. Contudo, após a calmaria, consegui qualificar. Aí surge uma pandemia, para mudar paradigmas. Adaptações no trabalho, medo e insegurança de uma doença nova e, além disso, a dor da perda. Minha irmã, mais uma vítima desta doença maldita, como milhares de brasileiros e milhões de pessoas no mundo. Rápido, doloroso e cruel; porém, como dizem, a vida tem que continuar. Mudanças na forma de coleta de dados, da orientação e do trabalho, resumindo muita resiliência e adaptações. Por vezes, sim, me senti perdida, mas certa de que iria realizar um desejo tão almejado.

Por isso, vou agradecer hoje e sempre a oportunidade de chegar a esse momento sonhado, apesar de todas as dificuldades enfrentadas.

Agradeço à minha família, a meus pais, Sandra e Roberto, que sempre me apoiam e acreditam na minha capacidade. Ao Rinaldo, companheiro de todas as jornadas, amor de todos os momentos. À Roberta, minha irmã, que está fisicamente ausente, mas com certeza orgulhosa. À minha sobrinha e “nova filha”

Giovanna, oficialmente o meu mais novo desafio, anteriormente não vivido. À minha irmã Daniela, a caçulinha da mamãe, que me presenteou com as minhas três sobrinhas lindas: Ana Beatriz, Maria Fernanda e a mais nova alegria da casa, Helena. Ao meu irmão e afilhado Gabriel Henrique, a meu pai e à Soninha, que sempre apoiam as minhas invenções acadêmicas. À minha filha emprestada Luana Videira, à minha afilhada Ana Paula Brandão Pinto, à madrinha Elizabeth, ao primo Marcelo e Silvia, além de toda a “grande família” que sempre entende a minha ausência e o meu amor pela medicina.

Às minhas amigas da “velha guarda” de residência e de toda a vida, Luciene Campos e Alessandra Fonseca, que “abandonei” um pouquinho por conta dos estudos.

Às minhas queridas mestras da Neurologia Infantil do IPPMG-UFRJ, que me ensinaram amar essa especialidade. À professora Lucia Fontenele (*in memoriam*), que ensinou muito mais do que neurologia infantil; à professora Alexandra Pruffer, que ensinou a perfeição acadêmica; e à querida Lais Pires, que se tornou, mais do que professora, uma companheira de profissão e uma segunda mãe.

Ao grupo de amigas que a Neurologia Infantil me deu, e que vivenciei comigo, mais que viagens ou congressos, principalmente amizade e apoio: Ilcimar Santos, Andreia Moreira, Silvia Miranda e Lais Pires, além da Lia Pires e da Consuelo Santos. À minha amiga Rosiane Fontana, mentora dos eletroencefalogramas.

Ao Instituto Fernandes Figueira e aos profissionais que lá trabalham com orgulho desta instituição. Como não agradecer à Pediatria e à Unidade Intermediária (UI), local onde comecei trabalhar há 14 anos? Ganhei novos

amigos de profissão e reencontrei antigos. Tenho orgulho de poder trabalhar com José Luiz Carvalho, chefe da UI, que sabe ensinar e chefiar com maestria. A toda a equipe de médicos, queridos enfermeiros, técnicos e auxiliares de limpeza, que fazem da UI um ambiente acolhedor e maravilhoso de se trabalhar. À amiga que o IFF me deu, Livia Menezes, sempre empenhada no melhor para os pacientes e no ensino dos residentes de pediatria. Por fim, como não falar do chefe Tom Meirelles, do melhor coordenador dos residentes de pediatria, Marcio Nehab, além dos amigos Leonardo Menezes, Felipe da Veiga, Paula Marins, Dra Julia, Dra Zina e Daniela Mancino, dentre tantas pessoas especiais?

Agora na Neurologia Infantil do IFF, sinto-me muito orgulhosa de participar e trabalhar com uma equipe maravilhosa composta pela Tânia Saad, Alessandra Penna e Marcela de Freitas – equipe essa que muito me ajudou e apoiou nesses momentos difíceis do doutorado. A todos do laboratório de neurofisiologia: à Ana Rafaski, que é mais que do uma secretária; às queridas Maria Alice, Socorro, Aldenis e Dolores, além do Talys, Dimitri e Vladimir. Devo com certeza agradecer à Ana Paula Amâncio e Renata Joviano, que, de residentes, tornaram-se companheiras do serviço.

Às minhas pupilas: Gabriela Rochedo, que, de aluna de pediatria, tornou-se amiga de profissão e hoje é parte da minha família; Rita Farias, residente de pediatria que convenci a se tornar neurologista infantil; Julia Almeida, polivalente neurologista infantil, neurogeneticista, artista, dentre outras coisas; e a minha nova ajudante de neurometabólica, Jessyca Mello. A todos os queridos atuais e ex-residentes: Lúcio, Nicolle, Paula, Naiana, Luana, Luisa Sotero, Larissa Nascimento, Larissa Moreira, Renata Salles, Renata Delfino, Daiane, Wilson,

Ana Luiza, Bruna e Aline, que me ensinam muito. Espero ter ajudado na formação de vocês.

Agradeço ainda aos neurologistas infantis e geneticistas do Rio de Janeiro que disponibilizaram seu pacientes e se prontificaram a participar da pesquisa e a contribuir com ela: Alexandre Fernandes, Aline Chacon, Ana Paula Amâncio, André Pinto, Andreia Moreira, Cassio, Charles, Consuelo Santos, Dafne, Eduardo Zayen, Eliane, Gislaine, Gilca, Gustavo Guida, Gustavo Torraca, Hanid, Ilcimar Santos, Isabela, Juan Llerena, Krizia, Lais Pires, Livia Lobo, Maria Angélica, Marcela, Marília, Maria Regina, Marlos, Patrícia Santana, Renata Salles, Roberta Tuler, Silvia Miranda, Tania Saad, Thiago, e especialmente Julia Lima, que me ajudou durante a coleta de dados.

Não posso esquecer das minhas companheiras de estudo de neurogenética e neurofisiologia: Katiane Souza, Luciana Midori e Luísa Simonsen; supervisionadas pelo excelente professor Claudio Felipe.

À minha mais nova “gurua” da genética, Inês, que foi minha professora e apoio para escrever essa tese.

Agradeço à minha orientadora Dafne, que aceitou o desafio de embarcar em uma missão neurológica e abrir as portas do conhecimento da genética.

Ao meu coorientador, Fernando Kok, que, mesmo distante, sempre me ajudou com o seu brilhante conhecimento.

Espero que gostem.



**Epigrafe**

A persistência é o caminho do êxito.

*Charles Chaplin*

**Lista de Siglas e Abreviaturas**

- ACMG – *American College of Medical Genetics and Genomics*
- AD – Padrão de herança autossômico dominante
- ADNPM – Atraso do desenvolvimento neuropsicomotor
- AR – Padrão de herança autossômico recessivo
- ARRAY – Técnica microarranjos
- AVC – Acidente vascular cerebral
- BCS – Bloqueadores do canal de sódio
- CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
- CNV – *Copy number variation* (modificação no número de cópias)
- CPO – Complexo ponta-onda
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- DI – Deficiência Intelectual
- EALCT – Epilepsia autolimitada centrotemporal
- EALCTa – Epilepsia autolimitada centrotemporal atípica
- ED – Encefalopatia do desenvolvimento
- EE – Encefalopatia Epiléptica
- EED – Encefalopatia Epiléptica e do Desenvolvimento
- EEDIP – Encefalopatia Epiléptica e do Desenvolvimento Infantil Precoce
- EEDPOS – Encefalopatia Epiléptica com complexos ponta-onda contínuos durante o sono
- EDMIFS – Epilepsia da infância com crise focais migratórias
- EMA – Epilepsia mioclônica-atônica
- EMP – Epilepsia mioclônica precoce
- ENAL – Epilepsia neonatal autolimitada
- EEG – Eletroencefalograma
- EIM – Erro inato do metabolismo
- EME – Estado de mal epiléptico
- ESES – Descargas epiléticas contínuas durante o sono de ondas lenta
- FISH – *Fluorescent in situ Hybridization* (hibridização *in situ* fluorescente)
- FS – Variante *frameshift* (mudança de quadro de leitura)

- GEFS+ – Epilepsia Generalizada com Convulsão Febril *plus*
- GLUT1 – Transportador cerebral de glicose
- gnomAD – *Genome Aggregation Database*
- GoF – *Gain-of-function* (ganho de função)
- HPC – Hipoplasia ponto cerebelar
- ILAE – *International League Against Epilepsy* (Liga Internacional de Epilepsia)
- LoF – *Loss-of-function* (perda de função)
- LX – Padrão de herança ligado ao cromossomo X
- Kb – Quilo pares de bases
- Mb – Mega pares de bases
- MAC – Medicação anti-crise
- MDC – Malformação do Desenvolvimento Cortical
- MLPA – *Multiplex ligation-dependent probe amplification* (técnica de amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação)
- MS – Variante *missense* (variante com troca do aminoácido)
- NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
- NGS – *Next generation sequencing* (Sequenciamento de nova geração)
- NS – Variante *nonsense* (variante que gera um códon de parada prematuro)
- OMIM – *Online Mendelian Inheritance in Man* (em tradução livre, Catálogo Online de Herança Mendeliana em Homens)
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- pb – Pares de bases de nucleotídeos
- pLi – *probability of being loss-of-function intolerant* (probabilidade de que a célula tolere ou não a perda de função de um gene específico)
- RNA – Acido Ribonucleico
- RNAm – RNA mensageiro
- RNA<sub>t</sub> – RNA transportador
- RM – Ressonância magnética
- SD – Síndrome de Dravet
- SLC – *solute carrier Family* (família de transportadores de soluto)
- SLG – Síndrome de Lennox-Gastaut
- SNC – Sistema Nervoso Central

- SNV – *Single-nucleotide variant* (substituição de um único nucleotídeo na sequência do DNA)
- SO – Síndrome de Ohtahara
- SP – Variante em regiões de sítio de *splicing*
- SW – Síndrome de West
- SUS – Sistema Único de Saúde
- TDAH – Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade
- TEA – Transtorno do Espectro Autista
- TC – Crise tônico-clônica
- VEEG – Videoeletroencefalograma
- VUS – *Variant of uncertain significance* (variante de significado incerto)
- XD – Padrão de herança dominante ligado ao cromossomo X
- XR – Padrão de herança recessivo ligado ao cromossomo X

## Resumo

Nos últimos anos, o emprego na prática clínica de painéis genéticos e do sequenciamento do exoma e do genoma permitiu o diagnóstico em pacientes sem uma etiologia definida, principalmente nas Encefalopatias Epilépticas e do Desenvolvimento (EEDs). A identificação das formas de epilepsia geneticamente determinadas permite caracterizar melhor sua história natural e orientar o tratamento, ao mesmo tempo em que propicia o aconselhamento genético. O objetivo do estudo foi descrever o fenótipo de indivíduos com epilepsia geneticamente determinada com variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas, previamente identificadas pelo NGS. Foram incluídos pacientes até a idade de 18 anos, acompanhados por serviços de Neurologia Infantil e/ou de Genética Médica no estado do Rio de Janeiro, provenientes de hospitais públicos ou de clínicas privadas. O estudo, de natureza descritiva e transversal, foi realizado através da análise de uma amostra de conveniência. No período de abril de 2020 até dezembro de 2021, foram incluídos 75 pacientes, cujo diagnóstico etiológico foi relacionado a 53 genes diferentes. O tipo de sequenciamento de nova geração realizado foi exoma em 56 (74,6%) pacientes, painel genético em 18 (24%) e genoma em um (1,7%). Em relação ao padrão de herança dos 53 genes, 50 (67%) pacientes apresentavam variantes deletérias em genes de herança autossômica dominante (AD), dez (13%) em genes com herança autossômica recessiva (AR), 12 (16%) em genes com o padrão dominante ligado ao X (XD) e 3 (4%) em genes com herança recessiva ligada ao X (XR). O teste em trio foi realizado em 37 pacientes (49,3%) e 33 pacientes apresentaram variantes *de novo*. O tipo de variante mais frequente foi a *missense*, seguida pelas variantes *frameshift*, variantes em regiões de sítio de *splicing*, deleções *in-frame* e variantes *nonsense*. A média de idade do diagnóstico da epilepsia foi de 18 meses, variando entre o primeiro dia de vida até 12 anos. Diagnóstico de EED foi estabelecido em 97,3% pacientes (N=73), na média de idade de 3 anos e 1 mês, e 36 pacientes apresentam uma síndrome epiléptica específica, sendo as mais comuns as Síndromes de West e de Lennox-Gastaut. O padrão de herança de maior frequência no grupo estudado foi AD. Os genes mais frequentes encontrados na nossa amostra foram: genes com herança AD: *SCN8A* (8%), *STXBPI* (8%), *KCNQ2* (6,6%), *KCNT1* (4%); ligada ao XD: *CDKL5* (4%); *PCDH19* (4%); e AR: *RARS2* (2,6%). O maior número de pacientes está associado a genes que sintetizam canais iônicos voltagem-dependentes (N=19/25,3%) e os genes mais frequentes foram, sucessivamente: *SCN8A*, *KCNQ2*, *KCNT1*, *KCNA2*. Na nossa amostra, somente dois pacientes conseguiram realizar o exame pelo SUS. O tempo médio de espera para realização do NGS foi de 8 meses. O conhecimento e a interpretação dos resultados dos testes genéticos moleculares têm evoluído de maneira substancial. Disponibilizar o NGS de forma universal para pacientes com suspeita de epilepsia de origem genética, permitirá o diagnóstico de um maior número de pacientes, a identificação de casos atípicos e a adequação terapêutica.

Palavras-chave: Encefalopatia Epiléptica; Encefalopatia Epiléptica e do Desenvolvimento; Epilepsia; Epilepsia farmacorresistente; Genética; Sequenciamento de nova geração.

## Abstract

In recent years, the use in clinical practice of genetic panels, exome and genome sequencing has allowed the diagnosis in patients without a defined etiology, mainly in epileptic and developmental encephalopathies (EED). The identification of genetically determined forms of epilepsy makes it possible to better characterize its natural history, guide treatment and provide genetic counseling. The aim of the study was to describe the phenotype of individuals with genetically determined epilepsy with pathogenic or probably pathogenic variants, previously identified by NGS. Patients up to the age of 18 years, followed by Child Neurology and/or Medical Genetics services in the State of Rio de Janeiro, from Public Hospitals or private clinics were included. The study was descriptive and transversal, through the analysis of a convenience sample. From April 2020 to December 2021, 75 patients were included, whose etiological diagnosis was related to 53 different genes. The type of next-generation sequencing performed was exome in 56 (74.6%) patients, genetic panel in 18 (24%) and 1 (1.7%) performed the genome. Regarding the inheritance pattern of the 53 genes, 50 (67%) patients had deleterious variants in genes of autosomal dominant inheritance (AD), 10 (13%) in genes with autosomal recessive inheritance (AR), 12 (16%) with dominant pattern X-linked (XD) and 3 (4%) with X-linked recessive inheritance (XR). Trio testing was performed in 37 patients (49.3%) and 33 patients have de novo variants. The most frequent type of variant was missense, followed by frameshift variants, variants in splicing site regions, in-frame and nonsense variants. The mean age of epilepsy diagnosis was 18 months, ranging from the first day of life to 12 years. Diagnosis of DEE was established in 97.3% patients (N=73), with a mean age of 3 years and 1 month and 36 patients presented a specific epileptic syndrome, the most common being West syndrome and Lennox- Gastaut. The most frequent inheritance pattern in the studied group was AD. The most frequent genes found in our sample were: genes with AD inheritance: SCN8A (8%), STXBP1 (8%), KCNQ2 (6.6%), KCNT1 (4%); XD-linked: CDKL5 (4%); PCDH19 (4%); and AR: RARS2 (2.6%). The largest number of patients is associated with genes that synthesize voltage-gated ion channels (N=19/25.3%) and the most frequent genes were successively: SCN8A, KCNQ2, KCNT1, KCNA2. In our sample, only 2 patients were able to perform the exam through the SUS. The mean waiting time for performing the NGS was 8 months. Knowledge and interpretation of molecular genetic test results have evolved substantially. Making NGS universally available in patients suspected of having epilepsy of genetic origin, will allow the diagnosis of a greater number of patients, identification of atypical cases and therapeutic adequacy.

**Keywords:** Developmental and Epileptic Encephalopathy; Epilepsy; Epileptic Encephalopathy; Genetic; Next-generation sequencing; Pharmacoresistant epilepsy.

## Sumário

1.	Introdução -----	17
2.	Justificativa -----	19
3.	Objetivo -----	21
3.1.	Objetivo geral -----	21
3.2.	Objetivos específicos -----	21
4.	Referencial teórico -----	21
4.1.	Epilepsia -----	21
4.1.1.	Definição -----	21
4.1.2.	Epidemiologia da epilepsia -----	23
4.1.3.	Tipos de crise epiléptica -----	24
4.1.4.	Tipos de epilepsia -----	27
4.1.5.	Síndromes epilépticas -----	28
4.1.6.	Epilepsia neonatal -----	30
4.1.7.	Definição de Encefalopatia Epiléptica e de Encefalopatia Epiléptica e do Desenvolvimento - -----	31
4.1.8.	Etiologia da epilepsia -----	33
4.1.9.	Epilepsia de origem genética -----	36
4.2.	Investigação genética -----	39
4.2.1.	Caracterizando os genes humanos que codificam proteínas -----	40
4.2.2.	Definindo mutações gênicas -----	43
4.2.3.	Exames genéticos utilizados na investigação da epilepsia -----	45
4.2.3.1.	Métodos de citogenética convencional -----	46
4.2.3.2.	Métodos de citogenética molecular (citogenômica) -----	47
4.2.3.3.	Método de investigação molecular tradicional -----	48
4.2.3.4.	Método de investigação molecular de nova geração (sequenciamento de nova geração) ----	49
4.2.4.	Classificação e descrição das variantes genéticas -----	53
4.2.5.	Associação genótipo-fenótipo -----	55
4.3.	Fisiopatologia da epileptogênese genética -----	59
4.3.1.	Genes relacionados a função de membrana -----	62
4.3.1.1.	Genes que sintetizam canais iônicos voltagem-dependentes -----	62
4.3.1.2.	Genes que sintetizam canais iônicos regulados por ligantes -----	67
4.3.1.3.	Genes que sintetizam proteínas de transporte transmembrana -----	69
4.3.2.	Genes que codificam proteínas localizadas no citoplasma -----	71
4.3.2.1.	Genes relacionados à regulação de vias celulares -----	71

4.3.2.2. Genes relacionados a adesão e citoesqueleto -----	74
4.3.2.3. Genes associados à estrutura sináptica -----	76
4.3.2.4. Genes mitocondriais ou localizados em outras organelas relacionados ao aparecimento de doenças metabólicas ou erros inatos do metabolismo -----	78
4.3.3. Genes que codificam proteínas localizadas principalmente no núcleo -----	81
4.3.3.1. Genes associados à modificação da estrutura da cromatina -----	82
4.3.3.2. Genes relacionados à regulação transcricional -----	84
4.3.3.3. Genes associados ao processamento de ácidos nucleicos -----	85
4.3.4. Genes que codificam proteínas localizadas na matriz extracelular -----	87
4.3.5. Genes e medicina de precisão -----	87
5. Metodologia -----	89
5.1. Desenho do estudo -----	89
5.2. População do estudo -----	90
5.3. Amostra -----	90
5.3.1. Critérios de inclusão -----	90
5.3.2. Critérios de exclusão -----	91
5.4. Materiais, procedimentos e técnicas -----	92
5.5. Análise e Apresentação dos dados -----	94
6. Resultados -----	94
7. Discussão -----	119
8. Conclusão -----	142
Referências -----	144
Anexo I -----	166
Apêndice I -----	167
Apêndice II -----	170
Apêndice III -----	172
Apêndice IV -----	178



## Lista de tabelas

Tabela 1:	Principais síndromes epilépticas classificadas segundo a idade de início. Descrição das manifestações clínicas, eletrográficas e dos principais genes associados ..... 29
Tabela 2:	Diferenciação entre Encefalopatia Epiléptica, Encefalopatia Epiléptica e do Desenvolvimento e Encefalopatia do Desenvolvimento ..... 33
Tabela 3:	Descrição dos tipos de mutações gênicas relacionadas a patologia molecular de perda de função (LoF) ou ganho de função (GoF) ..... 58
Tabela 4:	Recomendações relacionadas à terapêutica de epilepsias geneticamente determinadas ..... 89
Tabela 5:	Frequência de pacientes e genes encontrados na amostra classificados segundo o padrão de herança das variantes e teste de trio realizados ..... 96
Tabela 6:	Descrição das características em relação a epilepsia, tipo de crise epiléptica, síndrome epiléptica, EED, achados eletrográficos e de neuroimagem no total da amostra ..... 100
Tabela 7:	Número absoluto e percentual dos exames genéticos realizados no total da amostra ..... 101
Tabela 8:	Número absoluto e percentual dos achados em relação aos tratamentos farmacológico e não farmacológico empregados nos pacientes da amostra ..... 103
Tabela 9:	Número absoluto e percentual dos achados das características clínicas, baseado nos exames físico e neurológico, em relação ao total da amostra ..... 104
Tabela 10:	Descrição dos pacientes com epilepsia de origem genética segundo o gene encontrado e achados moleculares ..... 106
Tabela 11:	Descrição dos pacientes com epilepsia de origem genética segundo o gene encontrado, tipo e evolução da epilepsia, exames complementares e exame neurológico ..... 110
Tabela 12:	Número de pacientes identificados com variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas em genes que codificam proteínas transmembrana, subdivididos segundo classificação funcional ..... 115
Tabela 13:	Número de pacientes identificados com variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas em genes que codificam proteínas localizadas no citoplasma, separados segundo sua função ..... 116
Tabela 14:	Número de pacientes identificados com variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas em genes que codificam proteínas localizadas principalmente no núcleo e que estão envolvidos em modificação da estrutura da cromatina, em fatores de transcrição ou no processamento de ácidos nucleicos ..... 117
Tabela 15:	Número de pacientes identificados com variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas em genes envolvidos na matriz extracelular ..... 117
Tabela 16:	Genes encontrados na amostra associados a síndromes epilépticas específicas ..... 118
Tabela 17:	Correlação entre os genes relacionados a síndromes epilépticas encontrados neste estudo e os genes mais frequentemente descritos na literatura ..... 140

## Lista de figuras

Figura 1:	Esquema simplificado da classificação da epilepsia segundo a ILAE (2017) .....	25
Figura 2:	Esquema expandido da classificação da ILAE de 2017.....	27
Figura 3:	Esquema da epilepsia neonatal .....	31
Figura 4:	Classificação das epilepsias segundo as seis categorias etiológicas pela comissão de classificação e terminologia da ILAE .....	35
Figura 5:	Formação da cadeia polinucleotídica do DNA .....	40
Figura 6:	Processamento do gene humano. Processos de transcrição, processamento e <i>splicing</i> e tradução do gene da Hemoglobina humana .....	43
Figura 7:	Os três passos realizados no sequenciamento de Sanger .....	49
Figura 8:	Navegadores de genoma .....	51
Figura 9:	Canal de sódio voltagem-dependente e o mecanismo patogênico de LoF ou GoF .....	57
Figura 10:	Genes associados à epilepsia e sua relação com a topografia neuronal .....	62
Figura 11:	Canal de sódio com as subunidades .....	63
Figura 12:	Subunidade $\alpha$ do canal de $K^+$ voltagem-dependente e seus 6 segmentos ...	65
Figura 13:	Exemplos de alguns genes associados à EED que sintetizam canais iônicos .....	69
Figura 14:	Exemplos de alguns genes associados à EED que afetam o remodelamento da cromatina ou sintetizam fatores de regulação de transcrição .....	84
Figura 15:	Número absoluto e percentual de pacientes com genes de herança AD, AR e ligada ao X (LX) .....	96
Figura 16:	Número absoluto e percentual dos tipos de variantes (N=85) encontradas nos 75 pacientes.....	97
Figura 17:	Número absoluto do tipo de variante em relação ao padrão de herança encontrado nos 75 pacientes (AD, AR, XD, XR) .....	97
Figura 18:	Número absoluto do tipo de variante truncada, deleção <i>inframe</i> e variante <i>missense</i> em relação ao padrão de herança encontrado nos 75 pacientes (AD, AR, XD, XR) .....	98
Figura 19:	Linha do tempo da descoberta dos genes relacionados a epilepsia e a descrição de novos genes relacionados na amostra .....	119
Figura 20:	Variantes inéditas no <i>PURA</i> na coorte de pacientes de Johannesen e col. (2022) .....	138

## 1. Introdução

A epilepsia é uma condição neurológica ocasionada por atividade elétrica cerebral anormal e caracterizada clinicamente por: 1. pelo menos duas crises epiléticas não provocadas recorrentes ocorrendo em intervalo superior a 24 horas, ou 2. ao menos uma crise epilética não provocada, desde que haja risco de recorrência superior a 60%<sup>1</sup>.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a prevalência na população mundial é de 4 a 10 casos para cada mil habitantes<sup>2</sup>. A incidência de epilepsia na infância varia entre 41-187/100.000, sendo maior em países em desenvolvimento e nos primeiros anos de vida e declinando na vida adulta. Cerca de um terço das crianças com diagnóstico de epilepsia apresentam síndromes epiléticas específicas<sup>3,4</sup>.

Em 1989, a Liga Internacional de Epilepsia (ILAE – *International League Against Epilepsy*) propôs que as epilepsias fossem classificadas, quanto à etiologia, como de origem idiopática, criptogênica ou sintomática. Na classificação mais recente, publicada em 2017, a ILAE recomenda a classificação em cinco grupos etiológicos: genético, estrutural, metabólico, imunológico, infeccioso ou desconhecido<sup>4</sup>. É importante salientar que o mesmo indivíduo pode pertencer a mais de um grupo, tal como ocorre, por exemplo, na esclerose tuberosa, doença geneticamente determinada de herança autossômica dominante em que há alterações estruturais que predisõem à epilepsia<sup>4</sup>.

A epilepsia pode também ser classificada, de acordo com o tipo de crise, como focal, generalizada, combinada ou desconhecida. O conceito de síndrome epilética é definido por um determinado padrão de crises, evolução clínica e achados eletrencefalográficos. Essa precisão do diagnóstico da epilepsia permite uma

abordagem adequada para guiar o clínico na sua conduta diagnóstica e terapêutica<sup>4</sup>. O estabelecimento do diagnóstico etiológico das epilepsias foi favorecido pelo enorme avanço das técnicas de investigação em neuroimagem e em genética.

A suspeita da etiologia genética em pacientes com epilepsia remonta à Era de Hipócrates<sup>5</sup>. Entretanto, a expressão “epilepsia de origem genética” tem sido cada vez mais utilizada, a fim de incluir condições ocasionadas por variantes deletérias nas quais as crises epiléticas são as principais manifestações clínicas<sup>5</sup>.

Existem várias tecnologias disponíveis para identificar doenças genéticas, dentre as quais: 1. a citogenética convencional, que detecta alterações cromossômicas numéricas e estruturais; 2. a citogenética molecular, representada pelos estudos por microarranjos cromossômicos (CGH e *SNP array*), que permitem identificar perdas ou ganhos de longos trechos de DNA (deleções e duplicações, que não são visíveis no cariótipo); 3. a genética molecular tradicional, representada pelo sequenciamento de primeira geração, ou sequenciamento Sanger; e 4. a genética molecular de nova geração, que utiliza técnica de sequenciamento massivo paralelizado, permitindo assim a análise, em um único exame, de um painel composto por uma centenas de genes, de toda a região codificante do genoma (sequenciamento completo do exoma) ou mesmo de todo o genoma<sup>6,7</sup>.

O emprego do sequenciamento de nova geração propiciou uma explosão de conhecimento a respeito das bases genéticas das epilepsias com padrão de herança mendeliano<sup>8</sup>. Esse avanço se deu especialmente nos últimos anos, possibilitando o uso de painéis de genes e do sequenciamento completo do exoma na prática clínica<sup>9</sup>. O grupo de pacientes que mais se beneficiou desse avanço, com a descoberta de que muitos casos podem ter origem genética, foi o daqueles com Encefalopatias Epiléticas e do Desenvolvimento de início precoce, nos quais a epilepsia está

associada a graus variáveis de comprometimento do desenvolvimento neuropsicomotor<sup>9,10</sup>.

O sequenciamento de nova geração tem contribuído para identificar formas de epilepsia geneticamente determinadas, caracterizar melhor sua história natural, orientar o tratamento e propiciar o aconselhamento genético<sup>10</sup>. O entendimento do fenótipo clínico associado a variantes patogênicas de um gene específico pode ser importante para uma possível mudança da terapêutica, tal como ocorre, por exemplo, na Síndrome de Deficiência de GLUT1 (um transportador cerebral de glicose), cujo tratamento específico é feito pelo emprego da dieta cetogênica<sup>11</sup>. Entretanto, a modificação da conduta terapêutica nas epilepsias de origem genética é pouco frequente, pelo fato de a maioria ainda não ter tratamento específico<sup>11</sup>.

## **2. Justificativa**

As epilepsias de origem genética têm elevada prevalência na infância – sendo, portanto, frequente motivo de acompanhamento pelo Neurologista Infantil – e muitas vezes impõem desafios ao tratamento. Um terço dos pacientes com epilepsia evolui para epilepsia de difícil controle, e esse número parece não ter mudado apesar do surgimento de novas medicações anticrise<sup>12</sup>. Em 2010, a ILAE definiu como epilepsia farmacorresistente a falência do controle clínico após o uso de duas medicações anticrise escolhidas apropriadamente e bem toleradas, usadas tanto em monoterapia como em associação<sup>13</sup>.

A investigação genética em crianças com epilepsia sem um diagnóstico etiológico definido é de fundamental importância para os seguintes fins: o conhecimento da frequência das epilepsias de origem genética; a possibilidade de

adequação terapêutica visando ao almejado controle clínico das crises epiléticas; o fornecimento de subsídios para pesquisas futuras visando ao desenvolvimento de novas terapias alternativas<sup>11</sup>; a oferta de aconselhamento genético adequado<sup>8</sup>.

A confirmação diagnóstica genética evita a realização excessiva de exames complementares inconclusivos, que somente oneram a investigação sem gerar esclarecimento diagnóstico. Em particular, para além de propiciar a adequação da conduta terapêutica<sup>8</sup>, a identificação de uma determinada variante que justificaria o quadro clínico do paciente permite ainda prever em parte uma evolução determinada, a presença de comorbidades associadas (como transtorno de comportamento) e dificuldades de aprendizado ou alterações psicológicas.

Um fator limitante, por outro lado, é o elevado custo desses exames genéticos, que em sua grande maioria não são disponibilizados na rede pública de saúde e nem sempre são cobertos por todos os planos de saúde. A boa notícia a esse respeito é que o seu custo vem sendo reduzido ao longo dos últimos anos.

Neste momento, é importante coletar informações a respeito dos pacientes com epilepsia que já tiveram o seu diagnóstico estabelecido por meio dessas técnicas, o que poderá orientar e justificar a inclusão desses exames de forma mais abrangente. Tanto os pacientes atendidos através de planos de saúde quanto aqueles pelo Sistema Único de Saúde (SUS) devem ter acesso a realização do sequenciamento de nova geração e a possibilidade da confirmação diagnóstica.

Em resumo, a caracterização do fenótipo associado às variantes patogênicas identificadas nesses genes visa a aumentar o conhecimento nesta área, o que ratifica a importância do presente estudo.

### **3. Objetivos**

#### 3.1 Objetivo Geral

3.1.1 Descrever o fenótipo de indivíduos com epilepsia geneticamente determinada que apresentam variantes genéticas patogênicas ou provavelmente patogênicas previamente identificadas somente pelo sequenciamento de nova geração.

#### 3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Associar o genótipo desses pacientes com o seu fenótipo, aprofundando a descrição desse genótipo.

3.2.2 Descrever os aspectos clínicos, neurofisiológicos e de neuroimagem na população de estudo.

### **4. Referencial teórico**

#### **4.1 Epilepsia**

##### 4.1.1 Definição

Várias tentativas foram feitas desde o século XIX para classificar e padronizar os diferentes tipos de eventos epilépticos. A primeira classificação de epilepsia e tipos de crises foi proposta por Gastaut em 1969<sup>14,15</sup>. Em 1981, a ILAE publicou uma atualização considerando avanços advindos do eletroencefalograma (EEG)<sup>16</sup>. E,

1985, foi apresentada uma nova proposta de classificação<sup>17</sup>, que veio a ser novamente revisada pouco depois, em 1989<sup>18</sup>, quando foi introduzido o conceito de síndrome epiléptica. Finalmente, em 2017, a ILAE publicou a recente classificação operacional segundo os tipos de crises e epilepsias<sup>19</sup>.

A epilepsia foi definida em 2005 como um “evento transitório devido a uma descarga elétrica anormal e síncrona”<sup>14</sup>. Essa definição foi aprimorada em 2014, quando a epilepsia foi caracterizada como uma doença e não uma desordem, o que contribuiu para enfatizar sua importância, seu impacto e sua tendência duradoura de recorrência<sup>1,20</sup>. Anteriormente, era necessário que o indivíduo apresentasse pelo menos duas crises não provocadas ou reflexas, com intervalo maior que 24 horas, para ser diagnosticado como epiléptico. Atualmente, a definição de epilepsia inclui a descrição anterior de pelo menos duas crises não provocadas ou reflexas, mas abrange ainda pacientes com uma única crise não provocada ou reflexa com uma probabilidade de pelo menos 60% de apresentar outro evento nos 10 anos seguintes, assim como indivíduos que atendam a critérios para uma determinada síndrome epiléptica<sup>1</sup>.

O sistema de classificação ILAE de 1981 dividiu as crises em convulsões parciais ou generalizadas. Por sua vez, as crises parciais foram subdivididas em crises parciais simples, quando não havia comprometimento da consciência; crises parciais complexas, com alteração da consciência; e crises parciais com generalização secundária. Já as crises generalizadas foram desmembradas em ausência, mioclônica, tônica, clônica, tônico-clônica e atônica<sup>16</sup>.

Na classificação de 1985, as epilepsias eram distribuídas em idiopáticas ou sintomáticas<sup>17</sup>. O termo “idiopático” deriva do grego *idios*, que significa auto ou próprio. Tais epilepsias eram descritas como desordens sem nenhuma causa



subjacente. As epilepsias sintomáticas, diferentemente, eram aquelas causadas por doença ou lesão conhecida. Na classificação de 1989, foi adicionado o termo “criptogênico” para fazer referência as crises que provavelmente eram sintomáticas, entretanto nenhuma causa tinha sido identificada<sup>18</sup>.

A classificação atual da ILAE, de 2017, visa a categorizar as crises de acordo com os seguintes critérios: apresentação, região cerebral do início da crise, tipo de crise, idade de início, probabilidade de remissão, achados de EEG, achados radiológicos e genética<sup>4,20</sup>. A ILAE implementou uma força tarefa em 2020 visando à criação de uma classificação individualizada para as epilepsias neonatais baseada na Classificação atual de 2017<sup>21</sup>.

#### 4.1.2 Epidemiologia

A epilepsia afeta cerca de 50 milhões de pessoas em todo o mundo. A proporção estimada de pessoas com epilepsia ativa, em relação à população em geral, é de 4 a 10 por 1.000 pessoas<sup>2</sup>. Estudos internacionais revelam uma prevalência agregada de 7,6/1000 habitantes e uma incidência compartilhada de 61,44 para 100.000 habitantes<sup>22</sup>.

A incidência de epilepsia na infância varia entre 41-187/100.000, sendo maior em países em desenvolvimento e nos primeiros anos de vida, e declinando na vida adulta. Cerca de um terço das crianças com diagnóstico de epilepsia apresentam síndromes epiléticas específicas. A prevalência de epilepsia em crianças é consistentemente mais alta que a incidência, oscilando entre 3,2-5,5/1.000 nos países desenvolvidos e entre 3,6-44/1.000 nos países subdesenvolvidos<sup>3</sup>.

Existem poucos estudos sobre a epidemiologia da epilepsia no Brasil. Um dos estudos mais recentes, publicado em 2004 e realizado em São José do Rio Preto (São Paulo), estima que a prevalência de epilepsia acumulada é de 18,6/1000 habitantes, ao passo que a de epilepsia ativa é de 8,2/1000 por 2 anos<sup>23</sup>. Nunes e colaboradores estudaram a frequência de epilepsia na infância em uma cidade do Rio Grande do Sul (Passo Fundo) em 2003 e observaram a incidência de 7/100.000 crianças e a prevalência de 65,2/10.000 em crianças com até 4 anos de idade<sup>24</sup>.

#### 4.1.3 Tipos de crise epiléptica

Os termos para descrever tipos de crises devem ser uniformizados. Atualmente, as crises, que devem ser categorizadas pelas suas manifestações clínicas iniciais, dividem-se em focais, generalizadas, indeterminadas e não classificadas<sup>4</sup>. As crises focais se originam dentro de uma rede neuronal limitada a um hemisfério, enquanto as crises generalizadas se originam de algum lugar do cérebro e rapidamente se disseminam por meio de redes. Caso o início da crise não seja claro, ela deve ser nomeada como crise de início desconhecido<sup>19</sup>. Como se observa, o termo “focal” substituiu oficialmente o “parcial”, e a caracterização “generalizada” é aplicada a crises que envolvem redes bilaterais de início<sup>4</sup>. Com informações adicionais e observação de novas crises, podemos reclassificar, como crise focal ou generalizada, uma crise antes tratada como de início desconhecido (Figura 1).

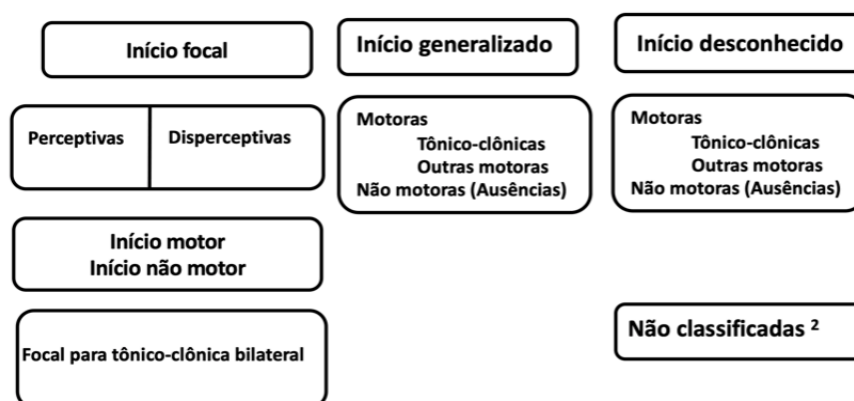


Figura 1 – Esquema simplificado da classificação da epilepsia segundo a ILAE (2017)<sup>4</sup>.

Nas crises focais, a classificação pode ser adicionalmente elaborada levando-se em conta um critério de percepção. O termo “percepção” é definido como o conhecimento de si mesmo e do ambiente; logo, durante uma crise focal perceptiva, considera-se que a percepção estará intacta. Por outro lado, se a percepção do evento estiver comprometida em qualquer momento da crise, então a crise deve ser nomeada como crise focal com comprometimento da percepção ou disperceptiva<sup>4</sup>. O termo “focal evoluindo para tônico-clônica bilateral” substitui o termo antigo “crise tônico-clônica secundariamente generalizada”<sup>19</sup>.

As crises de início generalizado são divididas em motoras e não motoras (ausência), não sendo utilizado como critério a percepção (diferentemente do que ocorre nas crises focais). As crises de início desconhecido podem ser categorizadas em motoras, não motoras e não classificadas, termo usado quando não há informações para sua classificação<sup>19</sup>.

A classificação expandida fornece mais detalhes de nomenclatura para crises epiléticas (Figura 2)<sup>4</sup>. As crises epiléticas focais, com ou sem percepção prejudicada, podem ser caracterizadas pelo padrão de início motor ou não motor, refletindo o primeiro sinal ou sintoma proeminente na crise. Os comportamentos

motores definem os seguintes tipos de crise: atônica (perda de tônus focal), tônica (contratura focal sustentada), clônica (abalos focais rítmicos regularmente espaçados), mioclônica (abalos focais breves e irregulares) e espasmos epilépticos (flexão ou extensão dos braços e/ou flexão do tronco). Outros comportamentos menos óbvios incluem atividade hipercinética (pedalar, movimentos bruscos de membros) e automatismos. As crises focais de início não motor são divididas em: crises autonômicas (sensações gastrointestinais, de calor ou frio; alterações nas frequências cardíaca ou respiratória, sudorese, cor da pele ou piloereção); crise de parada comportamental (cessação do movimento, descrita por sintomas clínicos de olhar vazio, cessação de falar ou se mover); crises cognitivas (implicam prejuízo de linguagem ou outros domínios cognitivos); crises emocionais (envolvem ansiedade, medo, alegria e outras emoções); e crises sensoriais<sup>4,19</sup>.

A classificação das crises de início generalizado é semelhante à de 1981, acrescentando-se alguns novos tipos<sup>4</sup>. Algumas crises tônico-clônicas generalizadas (TCG) podem ser precedidas por sentimento inespecífico prévio ou por uma curta versão cefálica ou de membros. As crises mioclônicas generalizadas podem ocorrer de forma isolada ou em conjunto com atividade tônica e atônica. A crise mioclônica difere de crise clônica por ser mais breve e irregular. As crises generalizadas mioclono-tônico-clônicas iniciam-se com alguns abalos mioclônicos seguidos de atividade tônico-clônica. Uma crise mioclônico-atônica abarca breves abalos dos membros e tronco seguidos por uma queda. Estas crises eram previamente chamadas de crises mioclônico-astáticas. As crises de ausência, que são evidentes por uma parada súbita da atividade ou percepção, tendem a ter início e fim abruptos e podem ser acompanhadas de automatismos. Já uma crise de ausência atípica tem início ou término lento, devendo estar fundamentada por achados eletroencefalográficos. As

crises de ausência mioclônicas apresentam movimentos mioclônicos rítmicos, associados a descargas de espícula-onda lenta generalizadas de 3 Hz. As mioclonias palpebrais estão incluídas entre as crises generalizadas não motoras e apresentam abalos mioclônicos das pálpebras com desvio dos globos oculares para cima<sup>4,19</sup>.

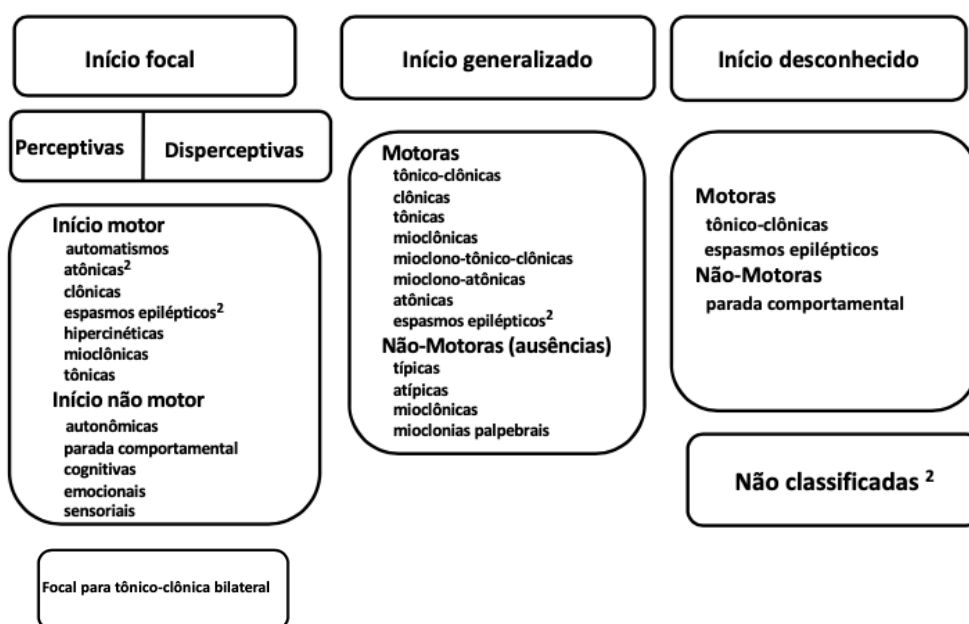


Figura 2 – Esquema expandido da classificação de epilepsia segundo a ILAE (2017)<sup>4</sup>.

#### 4.1.4 Tipos de epilepsia

O Sistema de Classificação atual visa a agrupar crises epilépticas de acordo com a apresentação clínica e a região cerebral do início da crise. Num segundo momento, as epilepsias devem ser categorizadas de acordo com o tipo de crise, idade de início, probabilidade de remissão, achados de EEG, achados radiológicos e genética. Os tipos de epilepsia podem ser divididos em: focal, generalizada, combinada (focal e generalizada) ou desconhecida<sup>4</sup>. As epilepsias focais incluem descargas únicas ou em um hemisfério, além das multifocais. As generalizadas caracterizam-se por diferentes tipos de crises generalizadas, com o EEG apresentando

complexos ponta-onda generalizados. As epilepsias combinadas foram recentemente criadas para contemplar pacientes que apresentam crises tanto focais quanto generalizadas. A epilepsia desconhecida contempla os pacientes para os quais não há determinação do tipo de crise e cujos exames complementares são inconclusivos<sup>19</sup>.

A classificação de crises epiléticas, epilepsias e síndromes de epilepsia permite o emprego de definições padronizadas a serem utilizadas por pacientes, suas famílias, clínicos e pesquisadores<sup>4,19</sup>.

#### 4.1.5 Síndromes epiléticas

O termo “síndrome epilética” é definido como "um conjunto de sinais e sintomas agrupando o tipo de crise, EEG e imagem, que tendem a ocorrer juntos"<sup>4</sup>. Fatores que ajudam nessa determinação incluem idade de início ou remissão, achados no EEG, estudos de imagem, desencadeadores, histórico familiar e algumas vezes comorbidades como disfunção psiquiátrica<sup>25-27</sup>.

O termo “síndrome epilética” não deve ser confundido com o de “Encefalopatia epilética”, a despeito do fato de que algumas síndromes epiléticas apresentam um padrão encefalopático<sup>26,27</sup>. Várias síndromes epiléticas distintas são descritas pela ILAE, sendo classificadas, segundo a idade de início, em: neonatal/lactente; infância; adolescência/adulto; qualquer idade<sup>28-33</sup>. O reconhecimento dessas síndromes não é importante apenas para tratamento e prognóstico; serve ainda para orientar a identificação de uma provável etiologia genética<sup>26,34</sup>.

Abaixo estão listadas as principais síndromes epiléticas segundo a recente classificação e definição da Liga Internacional de Epilepsia<sup>32-41</sup> (tabela 1).

**Tabela 1:** Principais síndromes epiléticas classificadas segundo a idade de início. Descrição das manifestações clínicas, eletrográficas e dos principais genes associados.

Síndrome epilética	Idade de início	Manifestações clínicas e eletrográficas	Genes associados
<b>Período neonatal</b>			
<b>Encefalopatia Epilética e do Desenvolvimento Infantil Precoce (EEDIP)</b>	(Síndrome de Ohtahara) 0-3 m	Epilepsia farmacorresistente; Exame neurológico anormal; crises: tônicas, espasmos epiléticos, mioclônicas EEG com surto-supressão Etiologia: lesões estruturais, EIM e/ou genética.	<i>ARX, GNAO1, KCNQ2, KNCT1, PIGA, SCN2A, SCN8A, SLC25A22, STXBPI</i>
	(Encefalopatia Mioclônica Precoce) 0-3 m		
<b>Epilepsia neonatal autolimitada (ENAL)</b>	0-1 m (2 a 7 dias)	Crises focais clônicas, tônicas, alternadas, TC bilateral EEG teta pontiagudo alternado focal / multifocal	<i>KCNQ2, KCNQ3</i>
<b>Período lactente</b>			
<b>Epilepsia infantil autolimitada</b>	3-36 m	Crises focais: parada comportamental, automatismos, desvio da cabeça e olhar, progridem TC bilateral; EEG normal ou lentificação ritmo de base	<i>PRRT2, SCN2A, KCNQ2, KCNQ3</i>
<b>Epilepsia da infância com crises focais migratórias (EDMIFS)</b>	3-12 m	Crises clônicas focais ou multifocais migratórias, parada comportamental ou autonômicas até EME EEG interictal com descargas multifocais	<i>KCNT1, SCN1A, SCN2A, PLCB1, TBC1D24, CHD2</i>
<b>Síndrome de Espasmo Epilético Infantil</b>	3-12 m (1-24m) (Síndrome de West)	Espasmos epiléticos em flexão, extensão ou ambos, em salvas e despertar; EEG hipsarrítmia / EEG ictal focal ou multifocal associado a alteração estrutural, alterações cromossômicas e EIM	<i>ARX, CDKL5, SPTAN1, STXBPI, além TSC1, TSC2</i>
<b>Síndrome de Dravet (SD)</b>	5-8 m (3-20m)	Crises febris ou afebris prolongadas, focais, focal para TC bilateral, mioclônicas ou TCG; Regressão do desenvolvimento; EME; EEG poliponta ou PO multifocais	<i>SCN1A, GABRG2, GABRA1, STXBPI, SCN1B</i>
<b>Início pré-escolar e escolar</b>			
<b>Síndrome Lennox-Gastaut (SLG)</b>	1-8 a	Crises tônicas e múltiplos tipo de crises: ausência atípica, atônica, espasmo, focal, mioclônica até EME; EEG interictal com CPO (< 2,5Hz) Etiologia alteração estrutural (70% casos)	<i>ALG13, CACNA1A, CDKL5, CHD2, DNMI, GABRB3, SCN2A, SCN8A, STXBPI</i>
<b>Epilepsia Mioclônica-Atônica (EMA)</b>	6m-6 a (2-4 a) (Síndrome de Doose)	Crises febris, TCG, mioclônicas-atônicas ou atônicas; EEG PO generalizada 3-6 Hz ou polipontas generalizadas	<i>SCN1A, SCL2A1</i>
<b>EED com ponta-onda ativada no sono (EEDPOS)</b>	2-12 a (4-5 a) (Síndrome de Landau-Kleffner)	Regressão cognitiva, comportamental ou motora EEG vigília normal ou pouco alterado e no sono CPO lento 1,5-2 Hz (>50% do traçado sono) Associado lesões talâmicas, malformações perisilviana, alterações cromossômicas / gênicas.	<i>GRIN2A, MECP2</i>
<b>Epilepsia autolimitada ponta centrot temporal (EALCT)</b>	3-14 a	Crises focais com disartria, disfagia e sialorreia (hemifaciais) progredir TC bilateral no sono; EEG com ondas ou PO centrotemporais; Remissão na adolescência.	Herança complexa ou <i>GRIN2A</i>
<b>Epilepsia do lobo occipital fotossensível</b>	1-14 a (Epilepsia Occipital tipo Panayatopolus)	Crises focais autonômicas e prolongadas (náusea, vômitos) progredir para TC bilateral; autolimitadas; EEG pontas ou polipontas occipitais	Herança poligênica
<b>Epilepsia visual de início na infância</b>	15m-19 a (Epilepsia Occipital tipo Gastaut)	Crises focais sensoriais (fenômenos visuais com ou sem prejuízo da consciência), EEG pontas ou PO occipitais; Desenvolvimento e cognição com boa evolução	Herança poligênica
<b>Ausência da infância</b>	4-10 a	Crises de ausência típicas 3-20 seg; EEG CPO 2,5 a 4 Hz; Desenvolvimento e cognição geralmente normais	Herança complexa ou <i>SCL2A1, CACNA1A, GRABG2</i>
<b>Adolescente / Adulto jovem</b>			
<b>Epilepsia ausência juvenil</b>	9-13 a	TCG prévia as ausências, História ocasional de crise febril; EEG CPO generalizados 3-5 Hz.	Herança complexa ou <i>SCL2A1, GRABG2</i>
<b>Epilepsia mioclônica juvenil</b>	8-25 a	Crises mioclônicas ao despertar e TCG precedida de mioclônica e/ou ausência típica; EEG CPO 3-5.5 Hz e fotossensibilidade	Herança complexa <i>CACNB4, GABRA1, CLCN2, GABRD</i>
<b>Epilepsia crises TC generalizadas</b>	5-20 a	Crises TCG piores com privação de sono, fadiga ou álcool; EEG CPO generalizados de 3-5.5 Hz.	Herança complexa ou <i>CLCN2</i>
<b>Epilepsia Hipermotora do sono (EHS)</b>	5-60 a (Epilepsia Focal noturna frontal AD)	Crises noturnas hipercinéticas, tônicas ou distônicas assimétricas de curta duração no sono; EEG normal ou alteração frontal; associado a DI	<i>CHRNA4, CHRNA2; CHRN2, KCNT1; DEPDC5, NPRL2, NPRL3, PRIMA1</i>
<b>Epilepsia focal familiar foco variável</b>	1m-52a AD	Crises focais; Imagem normal ou displasia focal; EEG normal ou focal (frontal ou temporal)	<i>DEPDC5, NPRL2, NPRL3</i>

Legenda: AD: autossômica dominante; CPO: complexo ponta-onda; EEG: eletroencefalograma; EME: estado de mal epilético; TCG: tônica clônica bilateral; PO: ponta-onda. Adaptado das seguintes Fontes: Pearl, 2018<sup>32</sup>; Riney, 2022<sup>35</sup>; Specchio, 2022<sup>36</sup>; Wirrell, 2022<sup>37</sup>; Zuberi, 2022<sup>38</sup>; Hirsch, 2022<sup>39</sup>.

#### 4.1.6 Epilepsia neonatal

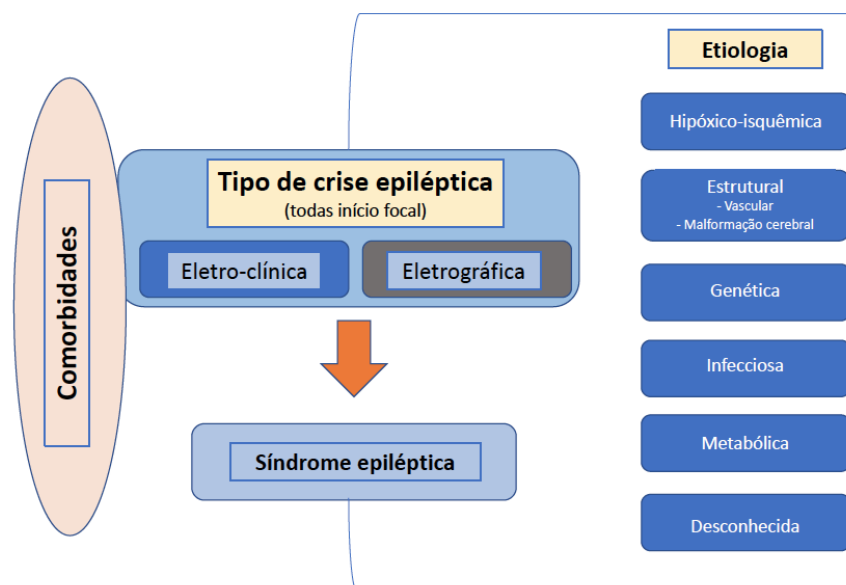
A ILAE implementou uma força tarefa em 2020 visando à criação de uma classificação individualizada para as epilepsias neonatais com base na Classificação atual de 2017<sup>21</sup>. A maioria das crises epiléticas neonatais são crises provocadas agudas (antigamente denominadas de sintomáticas agudas), secundárias a um insulto ou enfermidade aguda no SNC. Logo, todas as epilepsias neonatais atualmente são consideradas focais, não sendo necessária a classificação em generalizada ou focal. As crises epiléticas neonatais são divididas, segundo o eletroencefalograma, em crises somente eletrográficas ou eletroclínicas. As crises motoras podem ser classificadas em: automatismo, clônicas, espasmos epiléticos, mioclônicas e tônicas (Figura 3). As crises não motoras abrangem as autonômicas e as crises de parada comportamental. Por fim, no grupo das crises eletroclínicas, ainda existem as crises sequenciais (eventos com sequência de sinais, sintomas e mudanças eletrográficas em diferentes momentos) e as não classificadas<sup>21</sup>.

A consciência e a responsividade não podem ser avaliadas no período neonatal; por tal motivo, esses critérios não fazem parte da classificação. As síndromes epiléticas do período neonatal são divididas em: ENAL (anteriormente convulsão neonatal familiar benigna) e EEDIP [abrangendo a Epilepsia Mioclônica Precoce (EMP) e Síndrome de Ohtahara (SO)]. Na EEDIP, muitas vezes as manifestações clínicas são sobrepostas e apresentam o mesmo padrão eletrográfico em surto-supressão<sup>21</sup>. Na SO, o tipo de crise mais comum é o espasmo tônico; já na EMP, as crises mioclônicas migratórias e assimétricas são mais prevalentes.

Embora muitas etiologias estejam relacionadas às crises epiléticas neonatais, a encefalopatia hipóxico-isquêmica continua sendo a mais frequente. Outros fatores



causais envolvem: alterações estruturais (vasculares ou malformações), infecções, EIM, trauma, síndrome de abstinência e alterações genéticas<sup>21</sup>.



**Figura 3** – Esquema da epilepsia neonatal. Etiologia, tipos de crises epiléptica e síndromes epilépticas, traduzido e adaptado a partir da classificação da ILAE de 2017. Fonte: Pressler e col. (2021).

#### 4.1.7 Definição de Encefalopatia Epiléptica e de Encefalopatia Epiléptica e do Desenvolvimento

A Encefalopatia Epiléptica (EE) foi inicialmente descrita por Engel, em 2001, como uma condição de disfunção cerebral progressiva ocasionada por descargas epileptiformes<sup>28,31</sup>. A ILAE, em 2010, descreve a EE como uma condição na qual a atividade epileptiforme pode, por si só, contribuir para o comprometimento cognitivo e comportamental, de forma progressiva e grave, para além do esperado pela patologia subjacente, havendo ainda a possibilidade de que esse comprometimento piore com o tempo<sup>30,31</sup>. Embora a EE acometa indivíduos de qualquer faixa etária, ela é mais comum na infância. A deterioração pode ser global ou mais seletiva, o que significa

que ela ocorre sob a forma de um espectro de gravidade (tabela 1)<sup>32</sup>. Muitas síndromes epiléticas podem evoluir com Encefalopatia Epilética e algumas podem ser de origem genética<sup>33,37,41</sup>.

Várias alterações genéticas impactam no desenvolvimento em decorrência de um efeito direto da variante genética, para além do efeito frequente da própria epilepsia<sup>41</sup>. Algumas encefalopatias epiléticas acarretam comprometimento do desenvolvimento sem a presença de atividade epileptiforme intensa, uma condição recentemente designada pela Classificação 2017 como “Encefalopatia Epilética e do Desenvolvimento”<sup>4,19</sup> (EED). Entretanto, frequentemente não é possível determinar qual dos dois componentes é o mais importante na apresentação clínica do paciente, sendo possível assumir a presença das duas encefalopatias, a EE e a EED<sup>4,41</sup> (tabela 2). Essas desordens, embora individualmente raras, no geral ocorrem em 1 a cada 2.000 nascidos vivos por ano<sup>40</sup>.

Na Encefalopatia Epilética, após o controle das crises epiléticas, o paciente retoma os ganhos do desenvolvimento, o que não ocorre no paciente com Encefalopatia Epilética e do Desenvolvimento. Exemplo disso é a SW com sucesso no controle das crises epiléticas e melhora eletrográfica<sup>37,41</sup>.

Essa adaptação da denominação foi realizada pelo fato de muitos genes que causam EED serem reconhecidos por impactar no desenvolvimento de forma independente e adversa, mesmo sem a presença de epilepsia<sup>37</sup>. Por exemplo, o gene *SCN2A* está relacionado ao Transtorno do Espectro Autista devido a variantes com perda de função e também com EED. Muito da apresentação clínica desses pacientes com EEDs está relacionado aos efeitos da alteração genética sobre a função do gene, incluindo perda ou ganho de função<sup>41</sup>. Logo, o gene pode causar comprometimento do desenvolvimento, de maneira tal que, no contexto de uma Encefalopatia Epilética

sobreposta, há uma combinação do impacto de ambos os processos sobre o desenvolvimento e a cognição<sup>41</sup> (tabela 2).

Outro conceito importante é o de Encefalopatia do Desenvolvimento (ED), que diz respeito a uma encefalopatia estática ocasionada por uma deficiência intelectual (DI) ou atraso do desenvolvimento. Pacientes com ED apresentam risco maior de desenvolver epilepsia (ainda que não necessariamente EED), que pode estar ligada a diversas etiologias, inclusive as genéticas<sup>41</sup>.

**Tabela 2:** Diferenciação entre Encefalopatia Epiléptica, Encefalopatia Epiléptica e do Desenvolvimento e Encefalopatia do Desenvolvimento.

EE	EED	ED
Descargas epilépticas frequentes geram alterações cognitivas e comportamentais.	ADNPM e/ou regressão do desenvolvimento podem ser prévios à piora da epilepsia.	Epilepsia e ADNPM ocorrem juntos.
Regressão não justificada pela desordem de base.	Não justificada somente pela epilepsia. Correlação com alteração genética.	Epifenômeno da etiologia de base.
Tratamento eficaz e precoce da epilepsia melhora o desenvolvimento.	Na maioria das vezes sem melhora do desenvolvimento, mesmo com o controle epiléptico.	Sem regressão na presença da epilepsia.

Legenda: ADNPM – Atraso de desenvolvimento neuropsicomotor; EE – Encefalopatia Epiléptica; EED – Encefalopatia Epiléptica e do Desenvolvimento; ED – Encefalopatia do Desenvolvimento. Adaptado da fonte: Scheffer, 2017<sup>4</sup> Scheffer 2020<sup>41</sup>

#### 4.1.8 Etiologia da epilepsia

Devido aos importantes avanços de neuroimagem e pesquisas genéticas, a etiologia das crises epilépticas e epilepsias foi amplamente modificada no novo sistema de classificação<sup>4</sup>. Nas classificações anteriores, o termo “idiopática” referia-se a causas genéticas, o termo “sintomático” era usado quando havia uma desordem ou lesão conhecida e o termo “criptogênico” era aplicado para uma causa sintomática

presumida, porém desconhecida. Atualmente, esses termos não são mais utilizados. Em vez disso, postula-se a existência de seis categorias etiológicas, a saber: estrutural, genética, infecciosa, metabólica, imune e desconhecido (Figura 4)<sup>4</sup>. Quando várias etiologias estão presentes, deve ser dada prioridade à etiologia com a questão mais relevante<sup>4,25</sup>.

A etiologia estrutural é definida quando há alterações estruturais em estudos de neuroimagem correlacionados a uma avaliação eletroclínica, levando à inferência de que a anormalidade estrutural é a provável causa da epilepsia<sup>4</sup>. Essa anormalidade pode ser adquirida, genética ou simultaneamente adquirida e genética, como, por exemplo, em malformações do desenvolvimento cortical, lesão cerebral traumática e tumores, dentre outras possibilidades. A identificação das lesões estruturais sutis requer estudos de imagem com protocolos específicos para a epilepsia<sup>4,25</sup>.

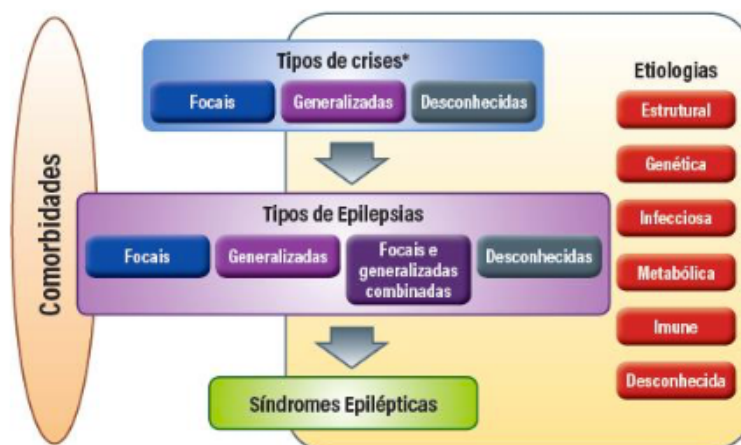
A etiologia infecciosa, que é a mais comum no mundo (principalmente em países em desenvolvimento), resulta de uma infecção conhecida. As crises que ocorrem durante o quadro clínico infeccioso são denominadas de crises sintomáticas agudas e não são classificadas como epilepsia. As principais etiologias infecciosas correlacionadas à epilepsia são toxoplasmose, tuberculose, meningites, neurocisticercose, citomegalovírus e atualmente a Síndrome do Zika Vírus. Geralmente, neste tipo de epilepsia o paciente exibe uma lesão estrutural<sup>4,25</sup>.

Uma epilepsia de etiologia metabólica é aquela decorrente de uma desordem metabólica conhecida ou presumida cuja principal manifestação clínica seja a epilepsia. Alguns exemplos são a uremia, aminoacidopatias, deficiência do transportador cerebral de glicose ou crises epilépticas por dependência de piridoxina. Em muitos casos, as alterações metabólicas apresentam uma base genética<sup>25,33</sup>.

A epilepsia de etiologia imune resulta de uma inflamação imuno-mediada no sistema nervoso central, acometendo tanto crianças quanto adultos. A maioria dos anticorpos são direcionados contra os antígenos de superfície da célula neuronal, incluindo receptores de neurotransmissores sinápticos, como a encefalite anti-NMDA, além de canais iônicos ou proteínas relacionadas. Um outro grupo de anticorpos são os direcionados aos antígenos nucleares ou citoplasmáticos intraneuronais<sup>25,32</sup>.

Na epilepsia de etiologia desconhecida, não é possível aferir um agente causal das crises, de modo que sua prevalência está relacionada à disponibilidade de exames complementares para inferência causal<sup>25</sup>.

A etiologia genética, por sua vez, será mais bem explanada no item abaixo.



**Figura 4:** Classificação das epilepsias segundo as seis categorias etiológicas pela comissão de classificação e terminologia da ILAE. Categorias são divididas em estrutural, genética, infecciosa, metabólica, imune e desconhecida. Adaptado da tradução da Comissão de Consenso da Liga Brasileira de epilepsia<sup>4</sup>.

#### 4.1.9 Epilepsia de origem genética

A existência de uma base genética para a epilepsia tem sido aventada por décadas, mas a primeira evidência concreta emergiu de estudos epidemiológicos que relataram um risco aumentado de epilepsia em parentes de indivíduos afetados<sup>42,43</sup>. Estudos de gêmeos mostraram que gêmeos monozigóticos têm uma taxa de concordância mais alta para epilepsia generalizada do que gêmeos dizigóticos, apoiando a hipótese de que a epilepsia tem uma base genética<sup>44</sup>.

A epilepsia genética é uma doença resultante de uma alteração genética conhecida ou presumida em relação à qual as crises epiléticas constituem o sintoma central<sup>4</sup>. As epilepsias genéticas são diversas e, na maioria dos casos, os genes ainda não foram relacionados. Há um número crescente de pacientes com anormalidades genéticas conhecidas causando epilepsias tanto leves quanto graves<sup>25</sup>. No geral, uma epilepsia de etiologia genética é definida pela detecção de uma variante conhecida, bem como pela apresentação clínica e pelo histórico familiar, ou por uma síndrome para a qual estudos prévios tenham sugerido uma etiologia genética<sup>42</sup>. Vale destacar, entretanto, que uma etiologia genética não exclui uma contribuição ambiental<sup>45</sup>.

O padrão de herança das epilepsias genéticas segue o modelo das Doenças Mendelianas, em que há uma separação entre padrão de herança autossômica dominante, autossômica recessiva e ligada ao X em decorrência de alterações no genoma nuclear. Existem ainda as alterações no DNA mitocondrial, cujo padrão de herança é denominado mitocondrial ou matrilinear; e, por fim, há a herança multifatorial ou doença complexa, ocasionada pela interação de algumas variantes genéticas e fatores ambientais pouco conhecidos<sup>42,46</sup>.

É importante dizer que “genético” nem sempre significa herdado. Embora algumas epilepsias sejam herdadas, muitas decorrem de uma mutação *de novo*\* no indivíduo afetado<sup>42,46</sup>. Em alguns casos, a alteração genética não é identificada, mas a apresentação clínica, os achados do EEG e a história familiar sugerem uma etiologia genética<sup>25</sup>. O padrão de herança é importante para o aconselhamento genético, aí incluído o cálculo de risco de recorrência na prole<sup>46</sup>. Uma mutação *de novo* apresenta um baixo risco de recorrência (menos de 1%). Essa probabilidade estaria relacionada à presença de mosaïcismo gonadal<sup>†</sup>, sendo difícil determinar se o mosaïcismo está presente apenas em células germinativas ou apenas em células somáticas<sup>46</sup>.

Após a identificação do gene *CHRNA4* (receptor nicotínico de Acetilcolina) como o primeiro relacionado à epilepsia em 1995<sup>47</sup>, a identificação de outros genes avançou de forma surpreendente. Com efeito, o surgimento de tecnologias genômicas, incluindo análise de microarranjos cromossômicos (*array*) e sequenciamento de nova geração (NGS), acelerou a compreensão das epilepsias genéticas<sup>42</sup>. Essa evolução da genética acarretou a associação de genes a determinados fenótipos antes não conhecidos, ampliando o conhecimento da epileptogênese para além dos canais iônicos e possibilitando o desenvolvimento de novas terapias<sup>42,45</sup>.

O estabelecimento da base genética da epilepsia é importante para fornecer orientações relativas ao prognóstico da doença, para guiar decisões acerca da possibilidade ou mudanças no tratamento e para fundamentar uma possível suspensão de vários exames médicos desnecessários<sup>45</sup>. Outro efeito positivo é a possibilidade de

---

\* Mutação *de novo* é a que ocorre como novo evento, geralmente ao acaso e sem histórico familiar prévio. Costumam ocorrer em heterozigose, com padrão de herança autossômico dominante.

† O mosaïcismo é definido pela presença em um indivíduo ou em um tecido de ao menos duas linhagens celulares geneticamente diferentes, porém derivadas de um único zigoto. No mosaïcismo gonadal essas linhagens diferentes estariam presentes somente nos gametas.<sup>38,43</sup>

proporcionar à família a oportunidade de identificar outras pessoas em uma situação semelhante e conectar-se a grupos de apoio<sup>42,45</sup>.

Quase todo o avanço no conhecimento da genética da epilepsia ocorreu com a identificação de genes associados a epilepsias monogênicas, que compreendem apenas uma fração de todas as epilepsias<sup>45</sup>. É importante frisar que a maioria das pessoas com epilepsia não tem parentes afetados, o que sugere que, na grande maioria dos casos, a epilepsia é geneticamente complexa<sup>47,49</sup>.

Alguns estudos mais recentes postulam que, mesmo nas epilepsias adquiridas, como as secundárias a um traumatismo craniano grave ou acidente vascular cerebral, fatores genéticos podem desempenhar um papel, embora as reais variantes ainda não tenham sido identificadas<sup>49</sup>.

A identificação de genes que influenciam o risco para as epilepsias tem implicações extremamente importantes para a pesquisa e a prática clínica<sup>48</sup>. Em um contexto de pesquisa, o estudo dos efeitos neurofisiológicos e relativos ao desenvolvimento neurológico de variantes patogênicas em genes identificados pode elucidar os processos subjacentes à suscetibilidade à epilepsia<sup>45</sup>. Essas informações podem levar ao desenvolvimento de novos tratamentos direcionados a mecanismos específicos ou mesmo à prevenção da epileptogênese<sup>45,50</sup>. Na prática clínica, outra aplicação importante é a identificação de genes por meio de um teste genético, visando a esclarecer o diagnóstico ou prever o risco de desenvolvimento da epilepsia devido a um histórico familiar<sup>42,49,50</sup>.



## 4.2 Investigação genética

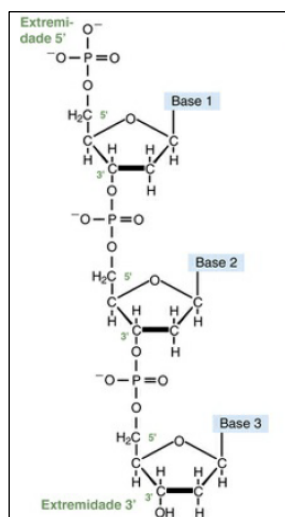
Os geneticistas trabalham para a compreensão, diagnóstico e possível tratamento de doenças de origem genética, principalmente aquelas que apresentam um padrão de herança mendeliana<sup>42,49</sup>. Com os avanços da citogenética e, posteriormente, da citogenômica, muitas entidades clínicas foram decifradas, porém algumas doenças ainda não estão completamente elucidadas<sup>47</sup>. Como várias doenças de origem genética se manifestam na infância, principalmente as monogênicas, é fundamental a interação entre o pediatra, o neurologista infantil e o geneticista clínico para elucidação diagnóstica<sup>49</sup>.

O Projeto Genoma Humano (*Human Genome Project*), iniciado em outubro de 1990 e concluído em abril de 2003, possibilitou a leitura do material genético completo de um ser humano, revelando cerca de 20.500 genes humanos<sup>51</sup>. O *International Human Genome Sequencing Consortium* publicou o primeiro rascunho do genoma humano na revista *Nature* em fevereiro de 2001, trabalho que foi finalizado em 2004<sup>51</sup>. Com a necessidade de manter e aprimorar a referência do genoma humano (*Human Genome Reference*), o *Genome Reference Consortium* (GRC) periodicamente atualiza e publica a versão mais atualizada. A atual, que está em vigor desde dezembro de 2013, denomina-se GRCh38/hg38. A montagem anterior (GRCh37/hg19, descrita em 2009), a atual e as anteriores estão disponíveis no *GenBank*<sup>52</sup>.

#### 4.2.1 Caracterizando os genes humanos que codificam proteínas

O genoma humano é formado por um conjunto haploide de cromossomos humanos composto por 22 cromossomos autossômicos, 2 cromossomos sexuais (X, Y) e o DNA mitocondrial (um cromossomo circular). Cada cromossomo humano é constituído por um único DNA de dupla hélice associado às proteínas histonas, totalizando mais de 6 bilhões de pares de nucleotídeos<sup>46</sup>.

Podemos definir os genes humanos como uma sequência de DNA específica que transcreve um RNA funcional, gerando ou não um polipeptídeo<sup>46</sup>. O DNA é formado por uma sequência de nucleotídeos, sendo estes compostos por uma base nitrogenada, um grupo fosfato e uma pentose chamada desoxirribose. As bases nitrogenadas são divididas em dois tipos: as purinas [adenina (A) e guanina (G)] e as pirimidinas [timina (T) e citosina (C)]<sup>53</sup>. Essa cadeia polinucleotídica apresenta em uma extremidade o carbono 5' (C) da pentose e, na outra, o C3' (Figura 5).



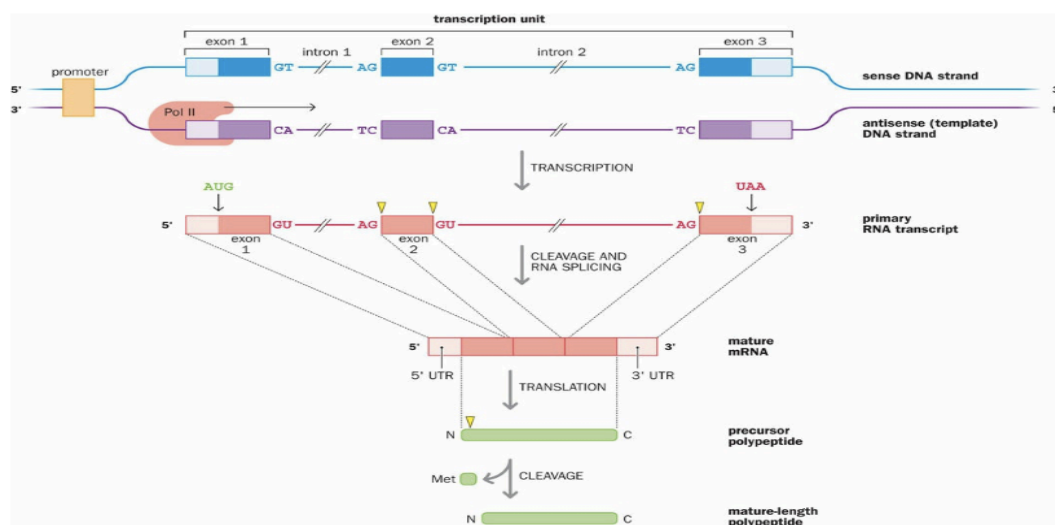
**Figura 5:** Formação da cadeia polinucleotídica do DNA. Evidência das ligações fosfodiéster 3'-5' que ligam nucleotídeos adjacentes. Adaptado de Nussbaum e col. (2016)<sup>46</sup>

O DNA pode ser duplicado, gerando outro DNA, ou pode ser transcrito, originando um RNA (mensageiro, transportador, ribossômico, entre outros funcionais). O RNA mensageiro (RNAm), também chamado de RNA codificante, é o que contém a informação sobre a sequência de aminoácidos na cadeia polipeptídica. O RNAm recém transcrito, conhecido como RNAm primário, contém regiões que serão removidas (íntrons) durante um processamento para a formação de um RNAm maduro. As regiões mantidas nesse RNAm são chamadas éxons<sup>46,53</sup>.

Um gene é uma sequência de DNA composta por regiões regulatórias e pela unidade de transcrição<sup>53</sup>. A região regulatória é formada por sequências promotoras e acentuadoras. Tais sequências, embora não sejam transcritas, serão reconhecidas, respectivamente, por fatores de transcrição ou fatores ativadores, necessários para o posicionamento da polimerase II<sup>53</sup>. A unidade de transcrição é composta pela porção do gene que será transcrita, abrangendo as seguintes regiões: 5'UTR (*untranslated region*), éxons, íntrons e 3'UTR. A transcrição de um gene é iniciada na região 5'UTR, que é região transcrita, mas não traduzida. O transcrito de RNAm primário é sintetizado a partir da ponta 5' para a ponta 3'<sup>46</sup>. A sequência promotora geralmente se localiza à jusante da extremidade 5' da fita código do gene. As regiões regulatórias (promotoras e acentuadoras) podem ser locais de mutação em doenças genéticas, podendo interferir na expressão normal de um gene. No processamento do transcrito primário de RNAm ocorre: adição de uma guanosina na extremidade 5' do RNA (ponta 5'); adição de uma cauda poliA à extremidade 3' do RNA, visando a aumentar a estabilidade do RNAm maduro; e processo de *splicing* dos íntrons (regiões dentro de um gene que serão removidas do RNAm e não estarão presentes no RNAm maduro)<sup>46,53</sup> (Figura 6).

O processo de *splicing* de RNAm, que é minucioso e altamente eficiente, produz RNAm maduro funcional<sup>46</sup>. As remoções dos íntrons são guiadas por sequências específicas no transcrito de RNAm primário, denominadas “sítios de *splicing*” em ambas as extremidades – 5' (doadora – “GU”) e 3' (acceptora – “AG”) – dos íntrons. O *splicing* também pode ser regulado por regiões acentuadoras localizadas nos éxons ou íntrons. O transcrito primário pode seguir múltiplas vias alternativas de *splicing*, levando à síntese de múltiplos RNAm relacionados com a tradução de produtos proteicos diferentes denominados de isoformas<sup>53</sup>. Alguns desses eventos são altamente específicos quanto ao tecido ou tipo celular e estão sujeitos a variação alélica entre indivíduos diferentes. Quase todos os genes humanos que codificam proteína sofrem *splicing* alternativo em algum grau, e estima-se que há uma média de dois ou três transcritos alternativos por gene no genoma humano<sup>46,53</sup>.

No citoplasma, o RNAm maduro é traduzido em polipeptídeos com a participação de RNAs transportadores (RNAt), que têm a tarefa de levar os aminoácidos para o ribossomo (complexos macromoleculares compostos de RNAs ribossômicos (RNAr) e várias proteínas ribossômicas). Desse modo, a cadeia polipeptídica à medida que o RNAm é traduzido<sup>46,53</sup> (Figura 6).



**Figura 6:** Processamento do gene humano. Processos de transcrição, processamento e *splicing* e tradução do gene da Hemoglobina humana. Fonte: Strachan e col. (2019)<sup>53</sup>.

A tradução é o processo que relaciona a ordem dos aminoácidos com a sequência de nucleotídeos do RNAm. A unidade de leitura (códon) é formada pela combinação de três bases nitrogenadas. Os 64 códons (3 de parada e 61 codificantes) constituem o código genético<sup>46,53</sup>.

#### 4.2.2 Definindo mutações gênicas

Mutação é qualquer alteração no DNA que não foi corrigida pelo sistema de reparo, resultando em uma modificação definitiva no DNA<sup>53</sup>. Algumas mutações gênicas são herdadas dos progenitores, incluindo mosaïcismo gonadal, e outras são mutações *de novo* que ocorrem no próprio paciente, no início do desenvolvimento embrionário. Essas alterações resultam de erros que ocorrem durante a replicação do DNA sem que o sistema de reparo consiga corrigi-los (o que torna tais modificações permanentes)<sup>46</sup>.

A substituição de um único nucleotídeo na sequência de DNA, denominada *single-nucleotide variant (SNV)*, pode ter implicações benigna, patogênica ou incerta.

As *SNV* podem acarretar três consequências no DNA: 1) *variantes sinônimas*, nas quais a troca do nucleotídeo não altera o aminoácido na proteína; 2) *variantes não sinônimas* ou *variantes missense*, que resultam na troca do aminoácido; 3) *variantes nonsense*, nas quais o códon gerado acarreta uma parada prematura (*stop codon*) na matriz de leitura do DNA<sup>53,54</sup>.

Inserções e deleções de nucleotídeos são denominadas coletivamente *indels*. Tais eventos são muito frequentes no genoma e somente podem ser identificados em exames de sequenciamento genômico<sup>54</sup>. Caso o *indel* tenha número de nucleotídeos diferente de três ou diferente de múltiplo de três, o resultado será uma alteração no quadro de leitura, designada *frameshift*<sup>46,53</sup>.

As mutações por defeitos no processamento de *splicing* do RNA podem ser divididas em três grupos, a depender da localização da mutação no RNAm imaturo: 1) mutações nos limites íntron-éxon de corte, no sítio doador 5' ou acceptor 3' dos íntrons ou nas sequências adjacentes às junções; 2) mutações intrônicas que resultam em defeitos dentro de um sítio de corte de um íntron, gerando aumento do uso do sítio críptico; 3) mudanças na sequência codificante que resultam de mutações na fase de leitura aberta, ativando um sítio de corte críptico em um éxon<sup>53</sup>.

Em qualquer sujeito saudável, o genoma humano contém milhares de regiões repetidas, mas aquelas relacionadas às doenças neurológicas geralmente são compostas de unidades de três repetições de nucleotídeos, chamadas de “repetições curtas em tandem”<sup>53</sup>. Essas repetições podem ocorrer tanto em regiões codificantes quanto em regiões regulatórias ou não traduzidas. Quando a célula se divide, o número de repetições pode aumentar (expansão) ou diminuir (contração), gerando desordens neurológicas como, por exemplo, a síndrome do X frágil, muitas ataxias espinocerebelares, distrofias miotônicas e doença de Huntington<sup>55,56</sup>.

A literatura sugere que mais de 12% do genoma de qualquer indivíduo é composto por alterações genômicas, incluindo modificações do número de cópias (*Copy number variation*, ou CNV)<sup>55</sup>. A CNV inclui duplicações e deleções do material genético que variam entre 50 pares de bases (pb) até megabases (Mb) de DNA, frequentemente difíceis de serem detectadas pelos métodos de sequenciamento<sup>55,57</sup>.

O fenótipo observado em um indivíduo não é consequência somente de uma alteração no DNA (como, por exemplo, deleção, inserção e/ou substituição), mas também da conformação da cromatina, o que gera modificações transitórias ou permanentes<sup>56</sup>. O estudo das alterações no ambiente da cromatina que geram modificações na função gênica é chamado de epigenética. Uma variedade de mecanismos epigenéticos já foram descritos: 1. metilação do DNA; 2. modificações nas caudas das histonas, alterando o empacotamento da cromatina e ativando ou silenciando a expressão gênica local; 3. substituição de histonas<sup>53</sup>. A metilação do DNA é ocasionada pela adição de um grupo metil à citosina, o que provoca o silenciamento de um gene (processo importante na diferenciação celular)<sup>53</sup>. No entanto, durante a gametogênese, todo esse processo é desfeito e refeito conforme o sexo do progenitor, ocasionando o fenômeno epigenético denominado de *imprinting*. Doenças específicas como as síndromes de Prader-Willi e Angelman estão relacionados a regiões sujeitas a *imprinting*<sup>55</sup>.

#### 4.2.3 Exames genéticos utilizados na investigação da epilepsia

Existem várias tecnologias disponíveis para identificar doenças genéticas, dentre as quais: a citogenética convencional, a citogenética molecular, a genética

molecular tradicional e genética molecular de nova geração<sup>5</sup>. Cada uma dessas técnicas deve ser aplicada segundo a alteração genética investigada. O cariótipo identifica alterações estruturais nos cromossomos, incluindo a perda (deleção) ou o ganho (inserção) de material genético maior que 5 Mb e a eventual troca entre segmentos cromossômicos não homólogos denominada de translocação<sup>53</sup>. Se este evento não envolve perda de material genético, é chamado de translocação balanceada. Caso o rearranjo cromossômico provoque perda de material genético, devemos utilizar o termo “translocação não balanceada”. Esse rearranjo muitas vezes não é visualizado pelo cariótipo e, por isso, demanda exames específicos, como a pesquisa de microarranjos (*array*) na busca por alterações submicroscópicas na citogenômica<sup>54</sup>.

Se o objetivo é detectar a expansão da repetição dos nucleotídeos de um determinado gene, o método de *Southern Blot* seria o exame de escolha, pois o sequenciamento não consegue detectar tal expansão. Esse método é específico para a região pesquisada; logo, quando há a possibilidade de que vários genes com repetições sejam os responsáveis pelo fenótipo, o ideal é solicitar um painel de *Southern Blot* englobando diversos genes, como, por exemplo, o painel para pesquisa das ataxias espinocerebelares<sup>53,55</sup>.

Para realizar o diagnóstico correto nas doenças de *imprinting* genômico, é necessária a utilização de testes específicos de metilação<sup>53,55</sup>.

#### 4.2.3.1 Métodos de Citogenética convencional

As alterações cromossômicas estão presentes em 1 para cada 150 nascidos vivos e geralmente decorrem da perda ou ganho de material cromossômico. As



alterações em nível cromossômico são a deleção ou duplicação de um cromossomo completo (aneuploidia), resultando em monossomia (deleção) ou trissomia (duplicação). Essas alterações podem ser visualizadas pelo cariótipo tradicional, em que os cromossomos são analisados na metáfase e são agrupados em pares de acordo com o tamanho e a posição do centrômero<sup>54</sup>.

O cariótipo permite detectar alterações cromossômicas com perda ou ganho de material genético, além de alterações estruturais cromossômicas de tamanho entre 3 e 10 Mb<sup>53</sup>. No caso das microdeleções e microduplicações, somente métodos citogenéticos ou moleculares serão capazes de identificar as alterações<sup>56</sup>.

#### 4.2.3.2 Métodos de citogenética molecular (citogenômica)

Para superar as limitações do cariótipo tradicional e detectar alterações submicroscópicas, foram desenvolvidas técnicas de citogenômica, como a hibridização *in situ* fluorescente (*Fluorescent in situ Hybridization - FISH*) e a técnica de amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (*Multiplex ligation-dependent probe amplification - MLPA*)<sup>53</sup>. Esses métodos investigam as síndromes de microdeleção ou microduplicação, além das alterações subteloméricas. Uma limitação, contudo, é que a região a ser estudada deve ser conhecida em estudos prévios<sup>55</sup>.

A técnica de investigação de pequenas alterações cromossômicas por meio de hibridização com sondas (*array*) realiza uma varredura completa do genoma em busca de deleções, duplicações e dissomia uniparental (doenças de *imprinting* genômico relacionadas a problemas de metilação)<sup>54,56</sup>. A solicitação da técnica de microarranjos cromossômicos deve ser considerada em epilepsias graves ou generalizadas

associadas a outras características comórbidas, nas quais a probabilidade de encontrar uma CNV (variação no número de cópias) associada à doença é maior<sup>41,56</sup>.

A *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) publicou diretrizes em 2010<sup>58</sup>, atualizadas em 2021, recomendando que o microarranjo cromossômico seja realizado na investigação de pacientes com DI, TEA e/ou múltiplas malformações congênitas<sup>59</sup>. Entretanto, uma limitação do exame é não identificar translocações balanceadas, que se verificam quando parte de um cromossomo se rompe e adere a outro cromossomo, não envolvendo perda ou ganho de material genômico<sup>54,59</sup>.

#### 4.2.3.3 Métodos de genética molecular tradicional

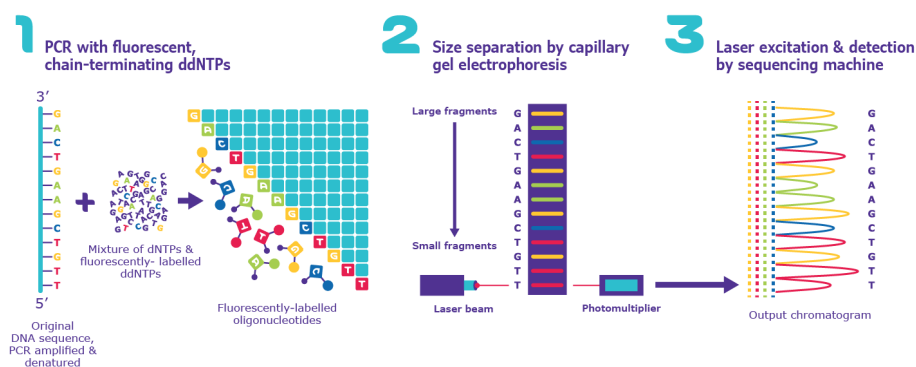
Por serem muito pequenos para serem detectados pelo cariótipo ou microarranjo cromossômico, os eventos genéticos no nível dos nucleotídeos requerem uma abordagem molecular a partir do sequenciamento do DNA<sup>54,56</sup>.

O método de sequenciamento desenvolvido por Sanger e colaboradores em 1977 revolucionou a aplicabilidade da genética molecular. Nesse método, para obter material suficiente para o sequenciamento, é necessária inicialmente a amplificação do DNA por meio da técnica de PCR<sup>‡</sup> (reação em cadeia da polimerase) ou clonagem do DNA (Figura 7)<sup>60</sup>. Embora se afirme que o sequenciamento Sanger é o padrão-ouro, funcionando assim como confirmação de um achado do NGS<sup>55</sup>, a melhoria das técnicas de NGS tem levado à contestação dessa ideia. Além disso, no sequenciamento Sanger, existe a possibilidade de que um dos alelos não seja

---

<sup>‡</sup> PCR – Reação em cadeia da polimerase é um método de amplificação do DNA no qual a DNA polimerase sintetiza cópias da fita do DNA a partir da fita molde com um *primer* iniciador.

amplificado (*allelic dropout*), resultando em uma interpretação errada da região estudada<sup>61</sup>.



**Figura 7:** Os três passos realizados no sequenciamento de Sanger. Amplificação da sequência alvo (1), separação por eletroforese em gel (2) e montagem o eletroesferograma (3). Os produtos da reação consistirão em fitas de DNA que possuem um didesoxinucleotídeo marcado na extremidade 3', carregando um fluoróforo distinto de acordo com o tipo de base incorporada, interrompendo o crescimento da cadeia (1). Os fragmentos de DNA serão separados de acordo com o tamanho usando a eletroforese em gel de placa, ou atualmente capilar, que é automatizada (2), para que os sinais fluorescentes sejam lidos e interpretados produzindo uma sequência de bases linear (3). Fonte: Retirada da internet do site da Merck. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/sager-sequencing.html>.

#### 4.2.3.4 Métodos de genética molecular de nova geração (Sequenciamento de nova geração)

O sequenciamento completo do genoma humano, realizado pelo Projeto Genoma Humano, produziu um aumento no conhecimento da epilepsia genética, graças à associação de novos genes a essa condição, e propiciou ainda a identificação de variantes gênicas<sup>45,49</sup> com diversas apresentações clínicas, desde epilepsias mais graves até formas mais brandas<sup>62</sup>.

O sequenciamento de nova geração (*next generation sequencing* – NGS) possibilita que trechos de DNA sejam analisados simultaneamente pela técnica de

*massive parallel sequencing*. De forma bastante resumida e simplificada, essa tecnologia inclui os seguintes passos após a extração do DNA<sup>56,63</sup>:

1. fragmentação do DNA com o auxílio de enzimas de restrição ou de sonificador, o que produzirá fragmentos com até 500 pb de DNA;
2. hibridização do DNA fragmentado com sondas de DNA ligadas a uma partícula metálica, sendo esse DNA complementar às regiões de interesse (habitualmente, éxons);
3. captura do DNA hibridizado, com retenção das sondas com partícula metálica pareadas a fragmentos de DNA, com auxílio de um campo magnético, e separação dos fragmentos de DNA de interesse;
4. ligação de um adaptador e de um *primer* universal ao fragmento de DNA de interesse e amplificação dessa sequência, levando à formação de uma “biblioteca” de sequências de interesse;
5. com apoio de nanotecnologia de alta complexidade, combinação da síntese do fragmento de interesse à detecção fotográfica de sinais fluorescentes gerados pela incorporação de um nucleotídeo às sequências que estão sendo sintetizadas, gerando-se, a partir disso, um arquivo com todos os dados do sequenciamento;
6. processamento e organização desses dados, o que é uma tarefa da bioinformática;
7. análise médica.

As variantes encontradas devem ser comparadas à sequência genômica de referência do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), um banco de dados públicos de sequências de nucleotídeos e proteínas administrado pela

Biblioteca Nacional de Medicina<sup>63</sup>. Outras ferramentas utilizadas são os navegadores de genoma *Ensembl*, do Instituto Europeu de Bioinformática e do *Wellcome Trust Sanger Institut*, e o *Santa Cruz Genome Browser*, navegador da UCSC (Universidade da Califórnia, Santa Cruz), disponíveis, respectivamente, em <https://www.ensembl.org/index.html> e <http://genome.ucsc.edu/><sup>63,64</sup>. A figura 8 ilustra a visualização do gene de fibrose cística *CFTR* no *Ensembl* e no navegador da UCSC<sup>63,64</sup>.

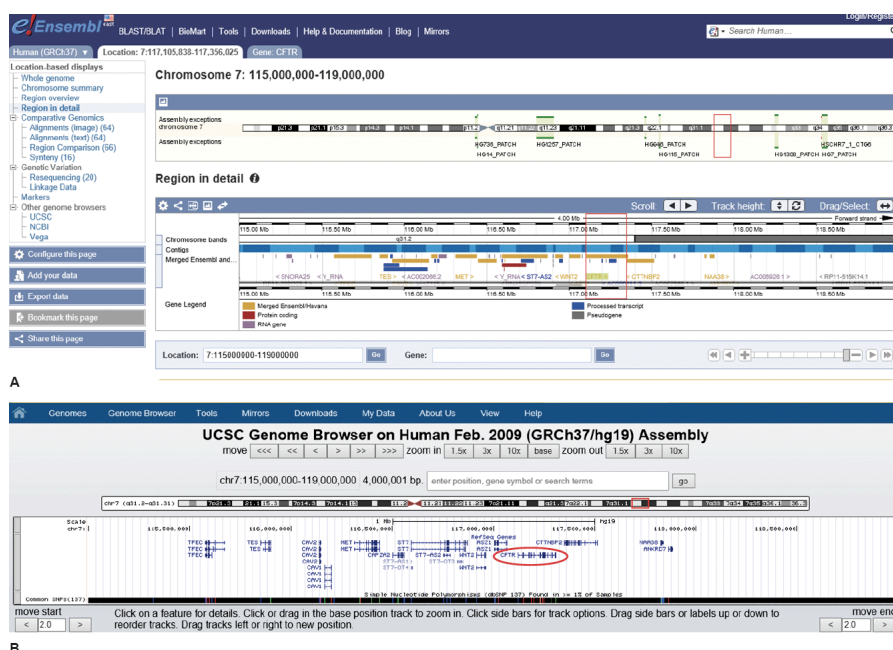


Figura 8: Navegadores de genoma. Região do cromossomo 7 contendo o gene da fibrose cística *CFTR* visto pelas ferramentas do *Ensembl* (A) ou *UCSC Genome Browser* (B). Fonte: Sertié e col. (2017)<sup>64</sup>.

Depois da exclusão das variantes benignas e comuns na população, somente as variantes com potencial patogênico devem ser consideradas. A presença de variantes em homocigose ou heterocigose composta é necessária para o diagnóstico de uma doença com padrão de herança autossômica recessiva; já em doenças autossômicas dominantes, revela-se no indivíduo uma variante em heterocigose<sup>63,64</sup>.

Podem ser realizados três tipos de sequenciamento: o sequenciamento de todo o genoma; o sequenciamento do exoma, apenas das regiões codificadoras, abrangendo aproximadamente 1% a 2% do genoma humano; e painéis contendo genes específicos<sup>64,66</sup>. O NGS pode ser realizado em DNA proveniente de diferentes materiais biológicos (por exemplo, saliva, sangue e fibroblastos) e pode ser empregado para investigação de variantes patogênicas em diferentes tecidos, visando à investigação de mosaïcismo somático<sup>49</sup>. Os painéis genéticos por NGS restringem a análise a um grupo de genes selecionados<sup>63,65</sup>, seja a partir de uma captura seletiva de éxons, seja pela análise focada em um número limitado de genes de um sequenciamento do exoma<sup>63</sup>.

O sequenciamento do exoma tornou-se econômico e tecnicamente viável com os avanços dos métodos de captura, facilitando, assim, tanto o diagnóstico quanto o desenvolvimento de novas pesquisas em doença mendeliana, que podem ser responsáveis por até 85% das doenças humanas genéticas. O resultado foi uma revolução na prática clínica, com a mudança do paradigma genótipo-fenótipo<sup>65</sup>.

Algumas sugestões clínicas para utilização do sequenciamento do exoma são:

1. paciente com fenótipo compatível com uma doença mendeliana descrita no OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*), sem gene conhecido até o momento;
2. paciente com fenótipo compatível com uma doença mendeliana descrita no OMIM que apresente heterogeneidade *de locus* e que teve os genes testados com resultado negativo; e
3. paciente com fenótipo sindrômico sem diagnóstico, porém com padrão de herança mendeliana provável<sup>55,63,65</sup>.

As limitações do sequenciamento de nova geração dizem respeito ao fato de que dependem da plataforma utilizada, pois cada uma apresenta um erro específico, sendo este de aproximadamente 1% (1 erro a cada 100 bp)<sup>63</sup>. Em relação ao sequenciamento do exoma, algumas questões limitadoras podem ser listadas: não analisa regiões intrônicas com papel regulatório na função dos éxons; não identifica expansão de trinucleotídeos; exibe limitação em doenças de *imprinting* genômico<sup>65</sup>. Alterações estruturais genômicas, tais como deleções e duplicações envolvendo três ou mais éxons, podem também ser detectadas pelo NGS com o emprego de protocolos de bioinformática, desde que se trate de uma região genômica sem parálogos, ou seja, que não seja decorrente de duplicações internas recentes<sup>63</sup>. É importante assinalar que algumas limitações podem ser minimizadas conforme a técnica de realização do exame<sup>63,65</sup>.

#### 4.2.4 Classificação e descrição das variantes genéticas

O desenvolvimento dos novos exames genéticos, principalmente em genética molecular, gerou um aumento de informações a respeito de novas variantes, que devem ser constantemente reanalisadas<sup>56,65</sup>.

Em 2015, Richards e colaboradores recomendaram a uniformização de critérios para a classificação das variantes identificadas em testes genéticos segundo o efeito final. De acordo com esta proposta, as variantes poderiam ser classificadas em: 1. patogênicas; 2. provavelmente patogênicas; 3. de significado incerto (VUS); 4. provavelmente benignas; 5. benignas<sup>66</sup>.

No processo de classificação das variantes, são utilizados diferentes fatores preditores, incluindo frequência populacional, impacto previsto sobre a função da proteína, estudos funcionais *in vitro* ou *in vivo*, programas computacionais preditores (*in silico*) de patogenicidade, estudo da segregação da variante e informações na literatura médica a respeito da variante<sup>55,66</sup>.

A testagem dos pais é necessária para reclassificar uma VUS com herança AD. Essa necessidade também se manifesta nas situações em que são encontradas duas variantes em um gene de padrão autossômico recessivo – nesses casos, é importante investigar se as variantes estão em *trans* (variantes em cromossomos homólogos, mas em alelos distintos)<sup>63</sup>. Diante disso, é altamente recomendável que o laboratório inclua amostras dos pais juntamente com a do paciente, realizando o denominado teste de "trio" (mãe, pai, filho afetado) no cenário do sequenciamento de exoma e genoma, particularmente por conta de causas suspeitas recessivas ou *de novo*<sup>49,66</sup>.

Uma questão que deve ser apontada é a utilização do resultado *variante de significado incerto* (VUS) e a sua aplicabilidade na conduta clínica<sup>65</sup>. Atualmente, a análise de variantes é imperfeita, de modo que a complementação da investigação com exames bioquímicos e funcionais pode auxiliar na conclusão diagnóstica<sup>66</sup>. A reanálise de um exoma ou genoma com resultado inicial negativo pode ser realizada após um período de 1 a 2 anos, visando à identificação da uma variante responsável pela sintomatologia que, no momento anterior, não havia sido descrita nos bancos de dados<sup>65</sup>.

Tendo como base o genoma de referência utilizado, as variantes podem ser reportadas de diferentes maneiras no que tange à sua localização no DNA e à sua provável consequência na proteína<sup>63,64</sup>. No que se refere à posição genômica, a



variante pode ser descrita segundo a posição cromossômica (abrange os íntrons e as regiões UTR) e segundo a região codificante (depende do transcrito analisado)<sup>65</sup>. Para exemplificar, vamos descrever a variante no gene *SCN8A*, segundo o genoma de referência GRCh37/Hg19, na posição cromossômica Chr12:52.162.699C>A, no DNA codificante c.2952C>A do transcrito ENST00000354534, com a consequência proteica p.(Asn984Lys). Essa variante já está depositada em bancos populacionais como o *ClinVar*, que é um arquivo público de acesso gratuito pertencente ao NCBI e projetado para apoiar a evolução de compreensão da relação entre genótipos e fenótipos importantes nos humanos (disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>)<sup>64</sup>.

#### 4.2.5 Associação fenótipo-genótipo

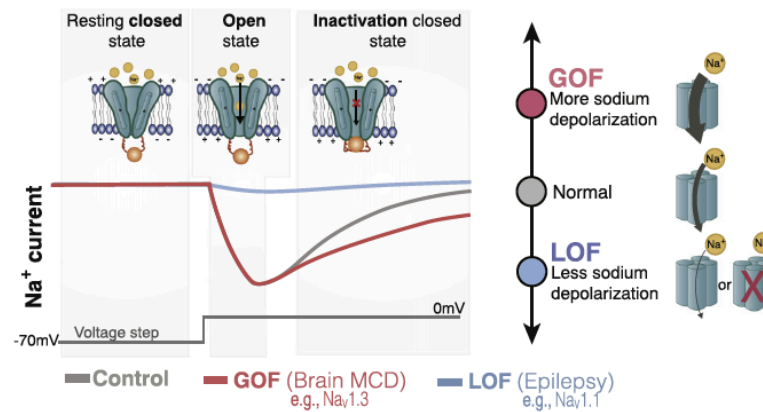
Com a evolução da genética nas últimas décadas, houve um aumento no conhecimento dos genótipos de doenças neurológicas e tentativas de associação entre genótipo e fenótipo<sup>64</sup>. Algumas condições apresentam o que é denominado de heterogeneidade alélica, na qual variantes no mesmo gene causam uma determinada doença com manifestações clínicas distintas<sup>46</sup>. Um exemplo é o gene que codifica o regulador de condutância transmembrana (*CFTR*) na fibrose cística: no caso de pacientes homocigotos para a variante  $\Delta F508$ , observam-se manifestações de insuficiência pancreática. Já a heterogeneidade *de locus* significa que variantes em diferentes genes podem apresentar o mesmo fenótipo, como ocorre, por exemplo, com os mais de 50 genes associados à retinite pigmentosa<sup>46</sup>. Por sua vez, a possibilidade de que variantes distintas em um único gene apresentem fenótipos diferentes ou doenças distintas é referida como heterogeneidade clínica ou fenotípica<sup>53</sup>. Por

exemplo, existem pelo menos três fenótipos bem caracterizados associados a variantes no *ATP1A3*: hemiplegia alterna da infância, distonia-parkinsonismo de início rápido e epilepsia infantil grave<sup>46</sup>.

A heterogeneidade genética da epilepsia influencia a solicitação dos testes genéticos, pois testar um gene de cada vez não é mais uma abordagem prática<sup>65</sup>. Nesse sentido, o desenvolvimento de painéis genéticos e a introdução do sequenciamento do exoma para diagnóstico clínico implicaram a disponibilização de opções mais abrangentes e acessíveis para o processo do diagnóstico<sup>42,65</sup>. Na maioria das síndromes de epilepsia monogênica, as variantes patogênicas têm sido descobertas em diferentes genes e em diferentes famílias com a mesma síndrome<sup>46</sup>. Frequentemente, os genes correlacionados à epilepsia codificam subunidades diferentes do mesmo canal de íons<sup>65</sup>.

Pesquisas de sequenciamento em grande escala mostraram que pessoas normais e saudáveis geralmente carregam variantes que inativam um ou outro gene, ou causam mudanças em um produto gênico. Daí decorre que uma alteração na sequência de um gene não é necessariamente patogênica<sup>62</sup>. Diante disso, a compreensão dos mecanismos de patologia molecular é importante para que seja realizada uma análise correta da associação fenótipo-genótipo<sup>65</sup>.

A perda de função (*loss-of-function* – LoF) de um gene pode ser total ou parcial e resulta da falha em gerar um dos produtos do gene. Um ganho de função (*Gain-of-function* – GoF) como consequência de uma variante gênica corresponde à aquisição de uma função totalmente nova e geralmente consiste em uma falha de regulação, fazendo que o produto do gene funcione inadequadamente<sup>53</sup>. Isso está ilustrado na figura 9<sup>67</sup>.



**Figura 9:** Canal de sódio voltagem-dependente e o mecanismo patogênico de LoF ou GoF. Exemplo de GoF na variante *SCN3A* e LoF na variante *SCN1A*. Fonte: Smith e col. (2020)<sup>67</sup>

Vários tipos de mutações gênicas podem gerar um produto com perda de função (LoF) ou ganho de função (GoF)<sup>53</sup> (tabela 3). Variantes que gerem a formação de um *stop-codon* prematuro (*frameshift*, *nonsense* ou *splicing* anormal) podem ocasionar a produção de uma proteína truncada<sup>53</sup>. Essa proteína alterada raramente é produzida, pois o mecanismo denominado *nonsense mediated decay (NMD)* detecta o RNAm marcado com proteínas do complexo de junção de éxons, o que ocasiona a sua degradação. Proteínas sintetizadas alteradas são potencialmente mais patogênicas do que a ausência dessas mesmas proteínas, uma vez que podem gerar um GoF proteico ou ainda interferir no funcionamento do produto normal (situação conhecida como efeito dominante negativo). Neste caso, o efeito final, considerando o alelo normal e o mutado, envolve perda de função do produto final<sup>46,53</sup>.

**Tabela 3:** Descrição dos tipos de mutações gênicas relacionadas à patologia molecular de perda de função (LoF) ou ganho de função (GoF).

Consequência celular (patologia molecular)	Tipos de mutações gênicas
<b>LoF</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Haplossuficiência</li> <li>• Haploinsuficiência</li> <li>• Efeito dominante negativo</li> </ul>	Deleção de todo o gene ou parte dele
	Alteração do gene por rearranjo cromossômico
	Deleção ou alteração em uma região promotora afetando a transcrição
	Exclusão ou alteração do códon de iniciação da tradução (AUG)
	Variantes <i>missense</i>
	<i>Splicing</i> anormal
	Variantes <i>frameshift</i> (mudança do quadro de leitura)
	Variantes <i>nonsense</i>
<b>GoF</b>	Variantes <i>missense</i>
	Expansões de trinucleotídeos

Fonte: Adaptado do Nussbaum, 2016<sup>46</sup> e Strachan, 2019<sup>53</sup>.

Se uma variante causa LoF, a herança dependerá de quão tolerantes as células ou tecidos são para uma redução de 50% na função proteica<sup>53</sup>. A haplossuficiência é definida pela presença por um heterozigoto saudável, e a produção de 50% da proteína é suficiente para manter a sua função celular. Porém, um *locus* mostra-se haploinsuficiente para manter um fenótipo normal quando o produto do gene requer mais do que a quantidade produzida por um único alelo funcional<sup>53,55</sup>.

Espera-se que variantes deletérias tenham frequências de alelos mais baixas na população, devido à seleção negativa. A criação de medidas de constrição por bancos de dados populacionais com sequências de genoma e exoma, como o *gnomAD* (*Genome Aggregation Database*), proporciona uma melhor interpretação da variante encontrada<sup>64</sup>. Uma medida utilizada é o pLi (*probably intolerant of loss-of-function variation*), que avalia o quanto uma variante é intolerante à perda de função. Nesse caso, quanto mais próximo o pLi estiver de 1, mais intolerante o gene é à perda de função; dessa forma, valores de pLi  $\geq 0,9$  estão relacionados a genes extremamente intolerantes à perda de função<sup>68</sup>.

### 4.3 Fisiopatologia da epileptogênese genética

A epileptogênese é um processo dinâmico que altera progressivamente a excitabilidade neuronal, gera interconexões críticas e possivelmente provoca mudanças estruturais antes da ocorrência da primeira crise epilética espontânea. Essas mudanças podem incluir: neurodegeneração, neurogênese, gliose, dano axonal ou brotamento, plasticidade dendrítica, dano na barreira hematoencefálica, recrutamento de células inflamatórias no tecido cerebral, reorganização da matriz extracelular e reorganização da arquitetura molecular de células neuronais<sup>69</sup>.

Historicamente, a geração de crises epiléticas (ictogênese) tem sido considerada como um desequilíbrio entre excitação neuronal e inibição neuronal<sup>69</sup>. O equilíbrio entre excitação e inibição (E/I) tenderia para a hiperexcitação, gerada por condição fisiológica que aumente a atividade sináptica glutamatérgica ou por correntes iônicas (por exemplo, influxo de  $\text{Na}^+$  ou efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$ ). Como resultado, ocorre a despolarização da membrana. Acrescente-se que o equilíbrio também pode ser alterado em situações de atividade GABAérgica diminuída ou hiperpolarização da membrana, situações que podem ser provocadas, por exemplo, pelo efluxo de  $\text{K}^+$  ou influxo de  $\text{Cl}^-$ . Entretanto, tal fisiopatologia é simplificada e não justifica todos os tipos de crises ou de epilepsia, o que significa que a crise pode também ocorrer quando a inibição é intensificada<sup>70</sup>.

Ainda não estão descritos na literatura mecanismos subjacentes que possam justificar a fisiopatologia das EED e dos padrões eletroencefalográficos comuns, como surto-supressão, hipsarritmia e/ou ponta-onda contínua durante o sono de ondas lentas ocasionados por diferentes variantes gênicas<sup>34</sup>.

As síndromes epiléticas são caracterizadas por tipos de crises específicas, EEG e prognóstico neurológico, ocorrendo em idade peculiar. Por exemplo, EMP, EEDIP ou EDMISF que se iniciam nos 3 primeiros meses; SW iniciando-se entre 3 a 12 meses; e SLG ocorrendo entre 18 meses e 8 anos<sup>37</sup>. Pode ocorrer progressão de uma síndrome epilética para outra; por exemplo, a Síndrome de Ohtahara pode evoluir para SW e posteriormente para SLG<sup>71</sup>. Entre as síndromes epiléticas mais comuns da infância, a SW é a mais frequente, com uma incidência entre 25-42/100.000 por ano<sup>37</sup>.

Um número substancial de pacientes com EED não apresentam fenótipos que se encaixam em uma síndrome epilética específica<sup>37</sup>. Variantes patogênicas em diferentes genes podem resultar na mesma síndrome epilética ou EED (situação denominada heterogeneidade genotípica). Nesse caso, o mecanismo fisiopatológico proposto envolve a ideia de que alterações em vias neuronais semelhantes podem determinar o mesmo fenótipo<sup>71</sup>. A heterogeneidade fenotípica decorre do fato de que variantes no mesmo gene causam diferentes fenótipos. As justificativas fisiopatológicas seriam: tipo de variante e sua ação temporal no desenvolvimento; presença de diferentes isoformas e a expressão gênica segundo a sua localização; fatores epigenéticos; presença de genes modificadores<sup>71</sup>.

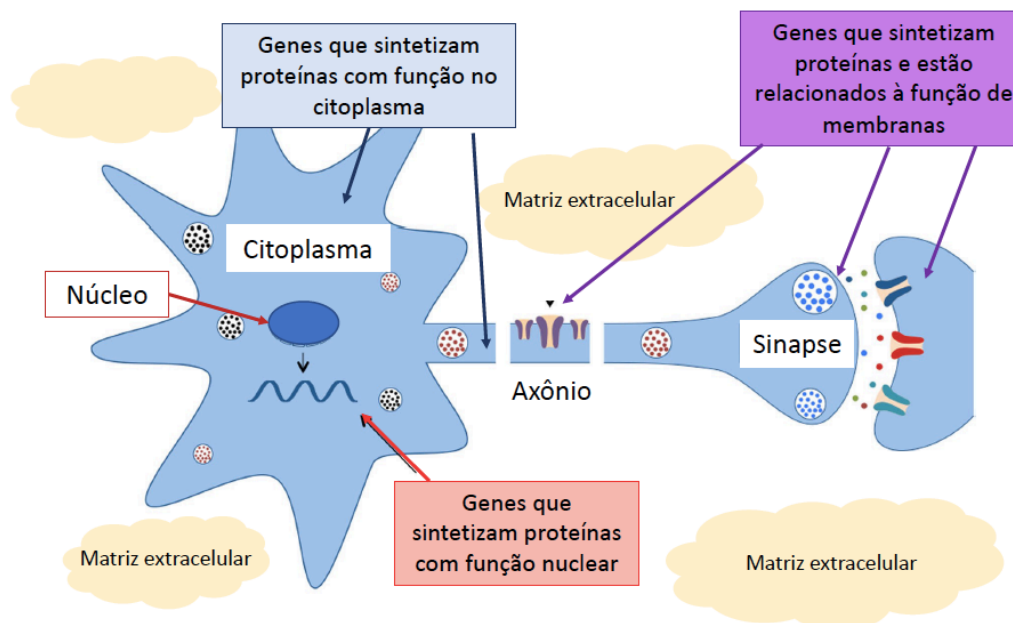
Muitos casos de EED são causados por variantes genéticas *de novo*. Nesses casos, a condição não é herdada de nenhum dos pais, o que reforça a importância da análise de trio<sup>71</sup>. O avanço das descobertas de novos genes relacionados à epilepsia – e, em particular, da sua grande heterogeneidade genética – tem contribuído para o aumento do conhecimento nos mecanismos da epileptogênese<sup>72</sup>.

Os genes que causam epilepsia de etiologia genética podem justificar a sua fisiopatologia por diferentes mecanismos subjacentes<sup>71</sup>. Como não existe uma

classificação estabelecida ou padronizada para esses genes, diferentes autores os dividem de formas diversas. Especificamente, Symonds e McTague (2020) sugerem que os genes associados à epilepsia podem ser agrupados em cinco grandes categorias funcionais: transporte de íons; crescimento e diferenciação celular; regulação dos processos sinápticos; transporte e metabolismo de pequenas moléculas dentro das células; e regulação da transcrição e tradução do gene<sup>73</sup>.

No presente estudo, optamos por classificar os genes relacionados à EED ou epilepsia de origem genética em: 1. **genes relacionados à função das membranas** (celular e internas); 2. **genes que codificam proteínas localizadas no citoplasma** (genes implicados em regulação de vias celulares, incluindo as enzimas quinases, no controle de proliferação celular e na apoptose; adesão celular e citoesqueleto; estrutura sináptica; além de genes mitocondriais ou localizados em outras organelas e relacionados a doenças metabólicas ou de EIM); 3) **genes que codificam proteínas localizadas principalmente no núcleo** (responsáveis pela estrutura da cromatina, regulação transcricional e processamento de ácidos nucleicos); e 4. **genes relacionados à função da matriz extracelular** (Figura 10).

Os genes abordados neste referencial teórico são os de interesse neste trabalho.



**Figura 10:** Genes associados à epilepsia e sua relação com a topografia neuronal. Modificado e adaptado da fonte von Deimling e col. (2017)<sup>34</sup>.

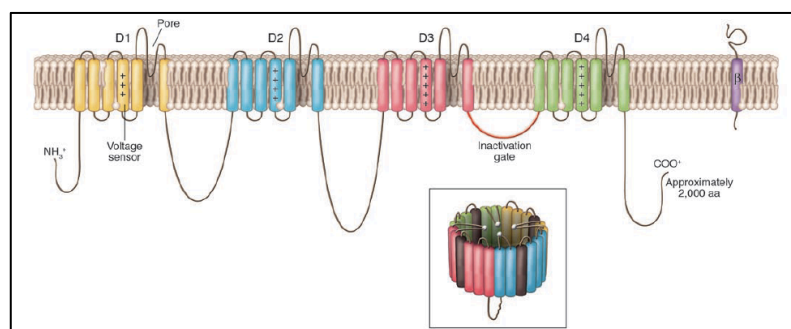
### 4.3.1 Genes relacionados à função das membranas

#### 4.3.1.1 Genes que sintetizam canais iônicos voltagem-dependentes

Os genes relacionados à função das membranas podem estar localizados na membrana celular ou em membranas internas da célula. Os canais iônicos controlam o influxo e efluxo de íons e têm sido tratados como um elemento chave na fisiopatologia da epilepsia relacionada a canalopatia<sup>34</sup>. Variantes patogênicas em genes que codificam componentes de canais iônicos com expressão cerebral são causas importantes de EED. Os canais de  $\text{Na}^+$  voltagem-dependentes são compostos por uma subunidade  $\alpha$  (formadora do poro) e duas subunidades  $\beta$  (estabilidade da subunidade  $\alpha$  e excitabilidade neuronal) (Figura 11). Os canais de sódio são



importantes para o início e condução do potencial de ação, e suas subunidades são expressas de maneira específica a cada tecido<sup>74</sup>. Os subtipos de canais  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.3$ , e  $Na_v1.6$  são codificados, respectivamente, pelos genes *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN3A* e *SCN8A*, sendo expressos amplamente no SNC<sup>75,76</sup>.



**Figura 11:** Canal de sódio com as subunidades. Ilustração do canal de sódio evidenciando as subunidades  $\alpha$  (4 domínios) e  $\beta$ . Fonte: Meisler, 2005<sup>76</sup>.

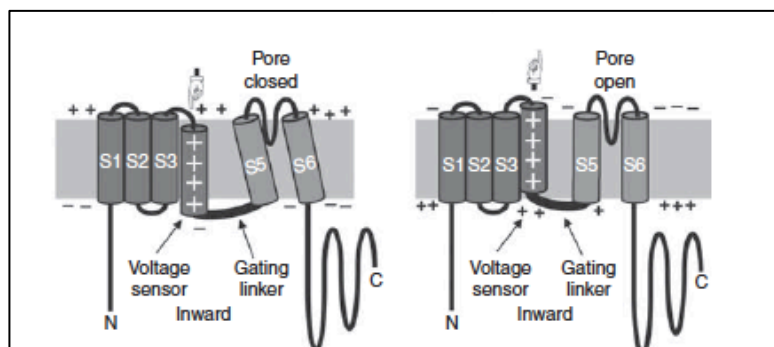
A epilepsia genética mais comum é a Síndrome de Dravet (SD), causada aproximadamente em 80% dos casos por variantes patogênicas *de novo* no *SCN1A* (*Sodium Voltage-Gated Channel, Alpha Subunit 1*)<sup>77</sup>. Ela pode, contudo, ser ocasionada também por outros genes, como *SCN2A* e *SCN8A*<sup>47</sup>. Variantes patogênicas do *SCN1A* podem apresentar diferentes fenótipos, como: outras EED; epilepsia farmacossensível; epilepsia generalizada com convulsões febris plus (GEFS+) <sup>47</sup> ou até um fenótipo intermediário de convulsão febril com epilepsia focal (PEFS+) <sup>74</sup>.

Variantes no *SCN2A* (*Sodium Voltage-Gated Channel, Alpha Subunit 2*) ( $Na_v1.2$ ) são associados a diferentes fenótipos: epilepsia infantil autolimitada, EED 11 e ataxia episódica tipo 9<sup>78</sup>. O canal de sódio  $Na_v1.2$  tem um papel importante na iniciação e propagação do potencial de ação, sendo expresso em todo o SNC humano, principalmente em neurônios glutamatérgicos excitatórios e no córtex cerebelar. As

síndromes epilépticas comuns são EDMISF, SO e SW. Estudos recentes sugerem que variantes *missense* com GoF em *SCN2A* estão associados a ENAL ou EEDIP, enquanto variantes *missense* com LoF ou truncadas são associadas a TEA e DI<sup>78</sup>.

O *SCN8A* (*Sodium Voltage-Gated Channel, Alpha Subunit 8*) codifica o canal  $Na_v1.6$ , que é encontrado no SNC e no sistema nervoso periférico, predominantemente em neurônios excitatórios, no segmento inicial do axônio e nos nódulos de Ranvier<sup>79</sup>. Estudos revelam que a epilepsia infantil autolimitada e a EED são causadas por variantes *missense* associadas a GoF, enquanto as variantes truncadas (algumas deleções e variantes *nonsense*) geram LoF. Por sua vez, variantes que ocasionem efeito tanto de LoF quanto de GoF foram associados a DI, TEA e transtorno do movimento, com ou sem epilepsia<sup>78</sup>. A encefalopatia-*SCN8A* está associada a vários tipos de crises epilépticas, ADNPM, hipotonia e desordem do movimento<sup>78</sup>. Johannesen e col. (2021) identificam cinco fenótipos clínicos: 1. epilepsia infantil autolimitada com cognição normal e crises tratáveis; 2. epilepsia intermediária com DI leve, parcialmente farmacorresponsiva; 3. EED farmacorresistente com DI grave; 4. epilepsia generalizada com DI leve a moderada (crises de ausência); e 5. ausência de epilepsia com DI leve a moderada<sup>80</sup>.

Os canais  $K^+$  controlam o potencial de membrana em repouso e permitem a repolarização rápida do potencial de ação (figura 12), constituindo-se como o maior grupo de canais iônicos expressos no SNC<sup>74</sup>. Genes que codificam canais de potássio voltagem-dependentes – como, por exemplo, *KCNQ2*, *KCNA2*, *KCNB1* – têm sido implicados em EED de início precoce, sendo variantes patogênicas do *KCNQ2* e correspondendo a até 80% dos pacientes EED de início neonatal<sup>47</sup>.



**Figura 12:** Subunidade  $\alpha$  do canal de  $K^+$  voltagem-dependente e seus 6 segmentos. Os canais são tetrâmeros de subunidades  $\alpha$  e 2 subunidades  $\beta$  (função modulatória). O segmento 5 (S5) e o 6 (S6) formam o poro do canal, sendo o S4 o sensor de tensão. Fonte: Pellock e col. (2017)<sup>69</sup>.

O *KCNA2* (*Potassium Channel, Voltage-Gated, Shaker-Related Subfamily, Member 2*) codifica o Kv1.2., que é responsável pela repolarização após um potencial de ação e é expresso em axônios e terminais pré-sinápticos do SNC. Variantes patogênicas em *KCNA2* estão associadas a EED-32, que apresenta um espectro de desordens neurológicas que inclui EEDIP, DI e desordem do movimento<sup>81</sup>. Döring e col., 2021, redefiniram o fenótipo e o genótipo das doenças neurológicas relacionadas ao *KCNA2*, identificando, além de EED de início precoce, indivíduos com epilepsia autolimitada, DI, paraparesia espástica hereditária e ataxia episódica<sup>82</sup>.

O *KCNT1* (*Potassium Channel, Subfamily T, Member 1*) codifica uma subunidade  $\alpha$ , um canal de potássio regulado por ligante que é ativado por sódio intracelular ( $K_{Ca4.1}$ )<sup>83</sup> e é expresso difusamente no SNC<sup>84</sup>. Tal canal tem papel importante na regulação da excitabilidade neuronal e contribui para a hiperpolarização lenta após um único potencial de ação ou disparos repetitivos (*firing*)<sup>84</sup>. Variantes patogênicas no *KCNT1* estão associadas a quatro fenótipos clínicos de apresentações: 1. EDMIFS; 2. EED não EDMIFS (SO, SW, entre outras); 3. epilepsia hipermotora autossômica dominante ou esporádica relacionada ao sono (EHS); e 4. outros fenótipos<sup>84</sup>. A EED-*KCNT1* é de difícil tratamento, com baixa

resposta às MACs e a algumas terapias possíveis (dieta cetogênica, quinidina, fenobarbital e clobazam, além do canabidiol)<sup>83</sup>.

O *KCNQ2* (*Potassium Channel, Voltage-Gated, Kqt-Like Subfamily, Member 2*) codifica a subunidade Kv7.2 dos canais de K<sup>+</sup> voltagem-dependentes, importantes no controle da excitabilidade da rede neuronal, principalmente no cérebro imaturo, onde o sistema GABAérgico apresenta efeitos excitatórios. Variantes patogênicas em *KCNQ2* estão associadas a ENAL e EED-7, esta última relacionada com EEDIP (Síndrome de Ohtahara)<sup>85</sup>. A remissão espontânea no grupo ENAL ocorre em cerca de 30% dos pacientes e, quando há necessidade de medicação, o fenobarbital e BCS costumam levar à remissão. Já nos pacientes com EED-7, o controle das crises é escasso e provavelmente alcançado com a utilização de BCS<sup>86</sup>.

Os canais de cálcio voltagem-dependentes (Ca<sub>v</sub>) provocam um influxo de cálcio após a despolarização mediada pelo potencial de ação. Cada canal de cálcio é composto por uma subunidade principal chamada de  $\alpha$  (forma o poro), modulada por outras subunidades  $\beta$ ,  $\alpha 2\delta$  e possível  $\gamma$ <sup>74</sup>. O *CACNA1A* (*Calcium Channel, Voltage-Dependent, P/Q Type, Alpha-1a Subunit*) codifica a subunidade  $\alpha$  do canal de cálcio P/Q neuronal, que está relacionado a vários transtornos neurológicos, dentre os quais: enxaqueca hemiplégica familiar tipo 1; ataxia episódica tipo 2; ataxia espinocerebelar tipo 6; distonia paroxística; epilepsia, ADNPM e EED-42. Uma hipótese emergente para variabilidade fenotípica é a de que ela seja dependente da idade do paciente<sup>87</sup>.

O *CACNA2D2* (*Calcium Channel, Voltage-Dependent, Alpha-2/Delta Subunit 2*) codifica a subunidade  $\alpha 2\delta$ -2 do canal Cálcio tipo P/Q, a qual se localiza principalmente no hipocampo e cerebelo. O mecanismo patogênico é o retardo da inativação do canal, gerando um GoF do Ca<sub>v</sub> e epileptogênese<sup>74</sup>. O *CACNA2D2* foi descrito pela primeira vez como um gene relacionado a EE em 2013, tendo sido

associado a atrofia cerebelar e DI. Nos pacientes com epilepsia do tipo ausência de início precoce, variantes no *CACNA2D2* devem ser ponderadas no diagnóstico diferencial<sup>88</sup>.

#### 4.3.1.2 Genes que sintetizam canais iônicos regulados por ligantes

Os canais HCN são um grupo de canais catiônicos duplamente ativados: por hiperpolarização de voltagem e pelo AMPc intracelular. Isso gera uma corrente mista de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup><sup>74</sup>. O *HCN1* (*Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Potassium Channel 1*) codifica o canal HCN1<sup>75</sup> e variantes patogênicas no *HCN1* podem ser herdadas de forma AD, levando a GoF ou a efeitos dominantes negativos. O espectro fenotípico de epilepsia associado ao *HCN1* pode incluir GEFS+, epilepsias generalizadas ou EEDIP<sup>89</sup>.

Os receptores do N-metil-D-aspartato (NMDAr) são canais iônicos regulados por ligantes (glicina e glutamato) e expressos em todo o cérebro, mediando a neurotransmissão excitatória. NMDAr são compostos por duas subunidades GluN1, que são responsáveis pela ligação com a glicina (e são codificadas pelo *GRIN1* – *Glutamate Receptor, Ionotropic, N-Methyl-D-Aspartate, Subunit 1*), e duas subunidades GluN2, de ligação com o glutamato (que são codificadas pelo *GRIN2*), ou duas subunidades GluN1 com a combinação de uma subunidade GluN2 e uma GluN3 (codificada pelo *GRIN3*)<sup>90</sup>. A ligação simultânea dos agonistas ativa o receptor, abrindo o poro seletivo para cátions e ocasionando um influxo de Ca<sup>2+</sup> e despolarização<sup>91</sup>.

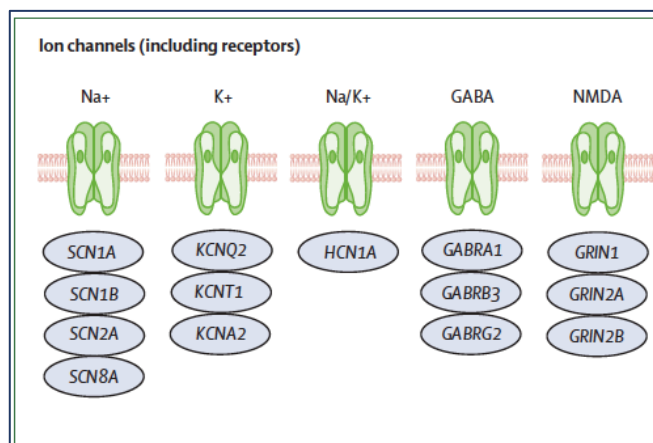
A desordem do neurodesenvolvimento relacionada ao *GRIN1* é caracterizada por ADNPM e/ou DI de grau leve a grave. As manifestações clínicas associadas são:

epilepsia, hipotonia, desordem do movimento, espasticidade, dificuldades de alimentação e transtorno de comportamento. A neuroimagem pode evidenciar malformação do desenvolvimento cortical (MDC) com polimicrogiria difusa e bilateral. Embora a herança AD seja a forma predominante, há também relatos de herança AR<sup>91</sup>. A epilepsia está presente em cerca de 70% dos pacientes com semiologia variada e diversos padrões de EEG<sup>92</sup>.

Variantes no *GRIN2A* estão associadas a um espectro de desordem do neurodesenvolvimento relacionada a atraso do desenvolvimento da fala e epilepsia. A variabilidade fenotípica abrange desde desenvolvimento normal ou discretamente atrasado com epilepsia autolimitada e atraso e/ou apraxia da fala até EEDPOS (Encefalopatia Epiléptica com complexos ponta-onda contínuos durante o sono)<sup>93</sup>.

A desordem de neurodesenvolvimento relacionada ao *GRIN2B* é caracterizada por ADNPM e/ou DI associados a alterações no tônus muscular (espasticidade e/ou hipotonia), epilepsia, TEA e transtorno de comportamento. Outros achados incluem: microcefalia, desordem de movimento e agnosia visual cortical. A epilepsia, que está presente em aproximadamente 50% dos indivíduos, geralmente é farmacorresistente. MDC é evidente em uma minoria dos indivíduos afetados<sup>94</sup>. O mecanismo fisiopatológico relacionado à MCD não está esclarecido, e não há associação entre o tipo de variante (truncada ou *missense*) e a presença de epilepsia<sup>95</sup>.

A figura 13 ilustra alguns dos genes envolvidos na formação de canais de membrana (voltagem-dependentes e regulados por ligante).



**Figura 13:** Exemplos de alguns genes associados à EED que sintetizam canais iônicos. Adaptado da fonte Ellis e col. (2020)<sup>72</sup>.

#### 4.3.1.3 Genes que sintetizam proteínas de transporte transmembrana

Diversos genes que codificam SLCs (*solute carrier Family* – transportadores de soluto ligados à membrana) são expressos no tecido cerebral e associados a EED. Entre eles, o mais conhecido é *SLC2A1* [*Solute Carrier Family 2 (Facilitated Glucose Transporter), Member 1*], que codifica o transportador de glicose mais importante do cérebro humano, o Glut1, cuja haploinsuficiência causa a Síndrome de Deficiência de Transportador de Glicose tipo 1 (Doença de Vivo ou Síndrome de Deficiência de Glut1)<sup>77</sup>. A Síndrome de Deficiência de Glut1 inclui a forma clássica e a não clássica, abrangendo nesta última: coreoatetose paroxística com espasticidade discinesia paroxística induzida pelo exercício e epilepsia; epilepsia de ausência atípica na infância; e EMA. O diagnóstico é estabelecido pela relação glicorraquia/glicemia (< 0,4) ou pela identificação de uma variante patogênica heterozigótica (ou, raramente, variantes bialélicas) em *SLC2A1*<sup>96</sup>.

O *SLC9A6* (*Solute Carrier Family 9, Member 6*) codifica a proteína NHE6, um trocador de sódio-hidrogênio ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ), com funções prováveis de regular o pH intraendossomal e relacionado a defeitos na sinalização endossômica e no tráfego de

proteínas<sup>97</sup>. Variantes no *SLC9A6* estão associadas à Síndrome de Christianson, XR, caracterizada por DI, transtorno de comportamento (TEA e/ou TDAH), epilepsia, ataxia, microcefalia pós-natal e anormalidades do movimento dos olhos. A epilepsia geralmente se inicia antes dos três anos de idade, com crises do tipo espasmos epilépticos ou crises generalizadas tônicas, TC, mioclônicas e atônicas<sup>97</sup>.

O *SLC35A2* [*Solute Carrier Family 35 (UDP-Galactose Transporter), Member 2*] codifica o transportador de soluto ligado à membrana (SLC) denominado UDP-galactose/UDP-N-acetilgalactosamina (UGT), e variantes patogênicas são associadas a uma desordem congênita da glicosilação ligada ao X, *SLC35A2*-CDG<sup>98</sup>. Os sintomas neurológicos são graves e caracterizam-se por ADNPM, DI e epilepsia, e o quadro é frequentemente associado a hipsarritmia no EEG. Anormalidades evidentes na RM de crânio são: atrofia cerebral, corpo caloso fino, atraso da mielinização e hiperintensidades na substância branca, sem padrão progressivo<sup>99</sup>. O diagnóstico pela isofocalização de transferrina é realizado em somente 15% dos pacientes, e os sintomas podem ser amenizados com a suplementação oral de galactose<sup>98</sup>.

Variantes patogênicas no *ATP7A* (*ATPase, Cu<sup>(2+)</sup>-Transporting Alpha Polypeptide*), que codificam uma transportadora transmembrana de cobre, ATPase tipo P (*ATP7A*), estão relacionadas a doença de Menkes, síndrome do corno occipital ou a uma forma de neuropatia motora distal<sup>100</sup>. A doença de Menkes é uma doença neurodegenerativa, XR, caracterizada por regressão motora, epilepsia, cabelo com uma alteração característica (*pili torti*), bochechas e fronte proeminentes e tortuosidade vascular. Evidências recentes sugerem que as injeções de reposição de cobre podem modificar a progressão da doença, desde que iniciadas nos primeiros dias após o nascimento<sup>100</sup>.



### 4.3.2 Genes que codificam proteínas localizadas no citoplasma

Vários genes sintetizam proteínas com função no citoplasma. Tais genes estão relacionados às seguintes ações: regulação de vias celulares, isto é, sinalização (incluindo as enzimas quinases, o controle de proliferação celular e a apoptose); adesão celular e citoesqueleto; estrutura sináptica (como fusão ou tráfico de vesículas); função mitocondrial ou relacionada a outras organelas no qual a sua disfunção ocasione o surgimento de doenças metabólicas ou de erros inatos de metabolismo.

#### 4.3.2.1 Genes relacionados à regulação de vias celulares

A proteína CDKL5, uma quinase pertencente à família das quinases serina-treonina, é amplamente expressa no cérebro e desempenha funções na proliferação celular, migração neuronal, crescimento axonal, morfogênese dendrítica e desenvolvimento de sinapses<sup>77,101</sup>. Variantes patogênicas em *CDKL5* (*Cyclin-Dependent Kinase-Like 5*) provocam o transtorno de Deficiência de CDKL5, uma desordem LX, com fenótipo mais grave em pacientes do sexo masculino<sup>102</sup>. A EED é caracterizada por epilepsia farmacorresistente, DI, TEA, transtorno do movimento e disfunção autonômica. Os espasmos infantis, que são o tipo de crise inicial, ocorrem em 80% dos indivíduos com o transtorno. A epilepsia progride para um padrão generalizado, focal ou misto, apresentando, como tipos de crises epiléticas mais comuns, espasmos, crises generalizadas tônicas e TC<sup>101,102</sup>. Olson e col. (2019) propõem três estágios de epilepsia: 1. início precoce, às vezes farmacorresponsivo; 2. EED; e 3. epilepsia multifocal e mioclônica refratária<sup>101</sup>.

As proteínas CYFIP (*Cytoplasmic FMRP-Interacting Protein*) são componentes do complexo regulador WAVE (WRC) e estão envolvidas na dinâmica da actina. Os pacientes com variantes patogênicas no *CYFIP2* evidenciam EED, hipotonia muscular, dismorfismos sutis, DI profundo e alterações visuais (deficiência visual e/ou estrabismo), além de alterações inespecíficas na RM de crânio<sup>103,104</sup>.

A proteína codificada por *DYRK1A* (*Dual-Specificity Tyrosine Phosphorylation-Regulated Kinase 1A*) desempenha diferentes funções no crescimento cerebral. Isso se dá por meio da proliferação e diferenciação neuronal, neurogênese, apoptose e plasticidade sináptica<sup>105</sup>. Variantes heterozigóticas no *DYRK1A* ocasionam a síndrome DYRK1A, que se caracteriza por: DI, microcefalia, convulsões febris e/ou epilepsia, atraso ou ausência do desenvolvimento da linguagem, hipotonia, ataxia, dismorfismos, déficit de crescimento e dificuldades alimentares, além de manifestações psiquiátricas como TEA e hiperatividade<sup>106</sup>.

O *NEXMIF* (*Neurite Extension and Migration Factor*) é um gene relacionado à morfogênese neuronal, bem como à migração e formação de sinapses. A DI ligada ao X-98 ou Encefalopatia-*NEXMIF* é um transtorno do neurodesenvolvimento caracterizado por ADNPM, transtorno de comportamento, características faciais dismórficas e epilepsia de início precoce<sup>107</sup>. A EED apresenta uma sobreposição entre as síndromes de EMA e mioclonia palpebral com ausência. Comorbidades relatadas na literatura foram: hipotonia infantil, ataxia, microcefalia, doença do refluxo gastroesofágico, estrabismo e dismorfismos. Os principais tipos de crises epiléticas identificados foram as generalizadas, e o padrão do EEG é composto por complexo ponta-onda<sup>107</sup>.

O *ARHGEF9* (*RHO Guanine Nucleotide Exchange Factor 9*) codifica a colibistina, que é importante na formação da proteína gefirina e aglomerados GABA<sub>A</sub>

na membrana pós-sináptica<sup>108</sup>. Variantes em *ARHGEF9* estão relacionadas a EED-8, uma doença XR, caracterizada pelo início da epilepsia antes dos 2 anos de idade com ADNPM grave, hiperecplexia, epilepsia, TEA e características dismórficas<sup>108</sup>. Os tipos de crises epiléticas descritas foram as generalizadas (TC, mioclônica ou tônica) e focais<sup>109</sup>.

O *CASR* (*Calcium-Sensing Receptor*), um receptor da membrana plasmática acoplado à proteína G que é expresso nas células produtoras de paratormônio da glândula paratireoide e nas células que revestem o túbulo renal, tem a capacidade de detectar pequenas mudanças na concentração de cálcio circulante<sup>110</sup>. Variantes patogênicas estão associadas a cinco fenótipos: hiperparatireoidismo neonatal; hipocalcemia AD; hipocalcemia AD com Síndrome de Bartter; hipercalcemia e hipocalciúria tipo 1; e suscetibilidade a epilepsia idiopática generalizada. Pacientes com variantes heterozigóticas no *CASR* foram associados a epilepsia generalizada ou epilepsia mioclônica juvenil, sem alterações eletrolíticas. Foi postulado que anormalidades de sinalização do cálcio podem afetar a excitabilidade neuronal, justificando a epilepsia<sup>110,111</sup>.

O *WDR45* (*WD Repeat-Containing Protein 45*) codifica uma proteína lisossomal envolvida na degradação de componentes celulares e autofagia. O acúmulo de ferro cerebral com neurodegeneração tipo 5 (NBIA5) é denominado de Encefalopatia Estática da Infância com Neurodegeneração na Idade Adulta (SENDA). Trata-se de uma desordem neurodegenerativa XD que se caracteriza por ADNPM, transtorno do movimento e características autistas e epilepsia, com ganhos motores e cognitivos lentos até a adolescência ou início da idade adulta<sup>112</sup>. Posteriormente, os pacientes desenvolvem distonia progressiva, parkinsonismo, sinais extrapiramidais e demência. A neuroimagem evidencia acúmulo de ferro no

globo pálido e na substância negra, além de atrofia cerebral e cerebelar<sup>112</sup>. A maioria dos pacientes apresentam epilepsia com espectro variável desde convulsão febril até epilepsia farmacorresistente<sup>113</sup>.

#### 4.3.2.2 Genes relacionados à adesão e citoesqueleto

As proteínas da superfamília das cinesinas (KIFs) atuam na regulação do transporte anterógrado e retrógrado de axônios, dendritos e sinapses de neurônios<sup>114</sup>. As cinesinas do tipo 5 (KIF5) estão envolvidas na regulação da transmissão sináptica GABAérgica e glutamatérgica em neurônios corticais e estriados. Variantes no *KIF5C* (*Kinesin Family Member 5C*) estão correlacionadas com MCDs sutis (paquigiria ou polimicrogria frontal), anormalidades do corpo caloso, epilepsia de início precoce, atraso no desenvolvimento neurológico e ausência de linguagem<sup>115</sup>.

O *DNMI* (*Dynamin 1*), que codifica a proteína dinamina 1, está envolvido na fissão da vesícula para a endocitose sináptica e na remoção de vesículas sinápticas ligadas à membrana plasmática<sup>116</sup>. Variantes patogênicas heterozigóticas na *DNMI* ocasionam EED-31 e podem ser responsáveis por SW e/ou SLG em até 2% dos pacientes<sup>116</sup>. A EED-31 é caracterizada por ADNPM precoce, epilepsia farmacorresistente (SW evoluindo para SLG) e transtorno do movimento. O fenótipo mais comum é DI grave a profundo e hipotonia, porém dismorfismos leves e microcefalia foram evidentes em 40% dos pacientes. Os tipos de crises epiléticas mais comuns são espasmos, mioclônicas, tônicas generalizadas, TC e crises focais<sup>117</sup>.

Variantes patogênicas no *PCDH19* (*Protocadherin 19*) são responsáveis pela EED-9, caracterizada por epilepsia de início precoce, DI e características autistas<sup>77,118</sup>. Embora os tipos de crises predominantes sejam as focais, desencadeadas por febre e

comumente em salva, podem surgir também crises generalizadas. O fenótipo é semelhante ao da SD; contudo, em comparação com esta, a *PCDH19* está menos relacionada a epilepsia mioclônica, EME desencadeado por febre e fotossensibilidade em comparação. O fenótipo clínico é altamente variável, variando de epilepsia bem controlada com desenvolvimento cognitivo normal até epilepsia farmacorresistente com DI grave<sup>119</sup>.

As tubulinas desempenham várias funções relacionadas à mitose, ao transporte intracelular, à morfologia dos neurônios e à motilidade ciliar e flagelar<sup>120</sup>. Variantes heterozigóticas no *TUBB3* (*Tubulin Beta-3*) ocasionam displasia cortical complexa com outras malformações cerebrais tipo 1, uma desordem de migração neuronal. Os indivíduos afetados apresentam DI leve a grave, estrabismo, hipotonia axial e espasticidade. A imagem cerebral mostra malformações variáveis do desenvolvimento cortical, incluindo polimicrogiria, desorganização giral e fusão dos gânglios da base, corpo caloso fino, tronco cerebral hipoplásico e vermis cerebelar displásico<sup>121</sup>.

A displasia cortical complexa com outras malformações cerebrais tipo 4 é ocasionada por variante heterozigótica no *TUBG1* (*Tubulin Gamma-1*) associada a epilepsia de início precoce. O fenótipo mais grave inclui microcefalia, tetraplegia espástica, agiria posterior, paquigiria frontal e córtex espesso. Em manifestações mais brandas, observa-se DI moderada, sem microcefalia e com neuroimagem evidenciando paquigiria posterior, heterotopia em banda subcortical posterior e corpo caloso dismórfico<sup>122</sup>.

O complexo citoplasmático de dineína está implicado no transporte axonal retrógrado, na distribuição de proteínas nas superfícies apicais e basolaterais e na redistribuição de organelas como endossomos e lisossomos<sup>122</sup>. Variantes no

*DYNC1H1* (gene da cadeia pesada da dineína 1 citoplasmática) foram associadas a três fenótipos: doença Charcot-Marie-Tooth do tipo axonal 20; atrofia muscular espinhal (AME) predominante nas extremidades inferiores tipo 1; e síndrome de retardo mental AD 13. Esta última é caracterizada por DI, defeitos de migração neuronal (malformações corticais como paquigiria posterior, polimicrogria frontal ou heterotopia nodular), epilepsia de início precoce e dismorfismos leves, podendo apresentar ainda sinais de neuropatia periférica. Becker e col. (2020) propõem uma nova classificação clínica abrangendo um espectro que vai de *DYNC1H1*, com doenças neuromusculares (DNM) associadas a um fenótipo no sistema nervoso periférico, até *DYNC1H1*-DNM, com envolvimento concomitante do SNC<sup>123</sup>.

#### 4.3.2.3 Genes associados à estrutura sináptica

A perturbação da exocitose sináptica é uma das principais patologias de EEDs. Na região pré-sináptica, podemos relacionar os *STXBPI* (*Syntaxin-Binding Protein 1*) e *STX1B* (*Syntaxin 1B*) à maquinaria molecular que medeia a fusão de vesículas sinápticas com a membrana plasmática pré-sináptica, de modo que esses genes atuam na liberação de neurotransmissores<sup>77</sup>. A encefalopatia-*STXBPI* é caracterizada por epilepsia de início precoce, incluindo vários tipos de crises epiléticas, dentre os quais espasmos epiléticos, crises generalizadas e focais. Embora tenha sido descrita inicialmente, em 2008, em pacientes com síndrome de Ohtahara, essa encefalopatia está associada a diversos tipos de síndromes epiléticas, como SW, SLG, SD e fenótipo de Síndrome de Rett<sup>124</sup>. O EEG é caracterizado por atividade epilética focal, surto-supressão, hipsarritmia ou ondas generalizadas. Outros achados neurológicos descritos são hipotonia, desordem do movimento, desordem de comportamento e

DI<sup>125,126</sup>. Já foram descritos vários tipos de variantes, e o mecanismo molecular provável é o de haploinsuficiência ou efeito dominante negativo<sup>126</sup>.

As epilepsias relacionadas ao *STX1B* evidenciam quatro fenótipos: 1. epilepsia autolimitada com convulsões febris e afebris correspondendo a GEFS+; 2. epilepsia generalizada; 3. EED com convulsões refratárias com ADNPM de moderado a grave; e 4. epilepsia focal. Em relação à associação genótipo-fenótipo, variantes *missense* no motivo SNARE da syntaxina-1B estão associadas a um fenótipo mais grave. O mecanismo patológico molecular provável é o de LoF<sup>127</sup>.

Em humanos, o complexo TRAPP é formado por várias proteínas exercendo sua função na via secretora e autofagia<sup>128</sup>. Van Bergen e col. (2020), ao descreverem pacientes com variante patogênica no *TRAPPC4* (*Trafficking Protein Particle Complex, Subunit 4*) na região intrônica (c.454 + 3<sup>a</sup>>G) em diferentes etnias, demonstram epilepsia precoce, DI grave a profunda, microcefalia progressiva, perda auditiva neurosensorial, tetraparesia espástica com atrofia cortical progressiva e cerebelar na neuroimagem<sup>129,130</sup>. Neste caso, pode ser utilizado o acrônimo NEDESBA, que significa Transtorno do Neurodesenvolvimento, Epilepsia, Espasticidade e Atrofia Cerebral<sup>130</sup>.

O *AP3B2* (*Adaptor-Related Protein Complex 3, Beta-2 Subunit*) codifica uma subunidade neurônio-específica do complexo proteico adaptador (AP-3) associada ou não à clatrina<sup>131</sup>. O AP-3 neuronal está localizado no soma e terminais nervosos, sendo relacionado ao transporte de proteínas da membrana vesicular do corpo celular ao terminal nervoso. Variantes em homozigose ou heterozigose composta no *AP3B2* estão relacionadas a EED-48, caracterizada por microcefalia adquirida, ADNPM, DI, epilepsia de início precoce (espasmos epiléticos ou mioclônicas), desordem de movimento e baixa interação visual<sup>132</sup>.

O *PRRT2* (*Proline-Rich Transmembrane Protein 2*) codifica uma proteína envolvida na exocitose da vesícula e a maquinaria de liberação de neurotransmissores<sup>133,134</sup>. Variantes patogênicas no *PRRT2* geram um espectro de desordens clínicas, incluindo: discinesia cinesigênica paroxística; epilepsia infantil familiar autolimitada; ataxia episódica; e enxaqueca hemiplégica. Na maioria das vezes, o padrão de herança é AD, com ocorrências familiares ou *de novo* (5% dos casos)<sup>134</sup>. Não há evidência de uma relação genótipo-fenótipo entre variantes *PRRT2*, e existe uma marcada variabilidade intrafamiliar dos quatro fenótipos distintos<sup>133</sup>.

#### **4.3.2.4 Genes mitocondriais ou localizados em outras organelas relacionados ao aparecimento de doenças metabólicas ou de erros inatos de metabolismo**

O *ALG13* (*UDP-N Acetylglucosaminyltransferase Subunit*) codifica uma uridina difosfato UDP-Nacetilglicosaminiltransferase para a síntese de lipídios ligados a oligossacarídeos. Variantes *de novo* em *ALG13* estão associadas a uma CDG EED-36<sup>135</sup>, caracterizada por epilepsia, ADNPM, regressão, hipotonia e desordem do movimento, além de dismorfismos e microcefalia. A epilepsia é farmacorresistente, e o tipo de crise mais comum o espasmo epiléptico, seguido de crises tônicas, mioclônicas, TC e focais. Esse tipo de CDG normalmente não é diagnosticado por avaliações laboratoriais habituais, o que acarreta a necessidade do NGS<sup>136</sup>.

A hiperglicinemia não cetótica é uma desordem do metabolismo da glicina resultante da atividade deficiente do seu sistema enzimático de clivagem<sup>137</sup>. O fenótipo mais grave (85% dos pacientes), caracterizado por ADNPM, espasticidade e epilepsia intratável, é geralmente causado por variantes nos genes *GLDC* (*Glycine descarboxilase*) e *AMT* (*Aminomethyltransferase*)<sup>137, 138</sup>. No fenótipo atenuado (15% dos pacientes), o desenvolvimento é variável, sendo evidente desordem de



movimento (coreia ou ataxia intermitente), letargia e transtorno do comportamento<sup>138</sup>. O diagnóstico de hiperglicinemia não cetótica é realizado com dosagem da glicina elevada no plasma e no LCR, neuroimagem cerebral (difusão restrita na cápsula interna, tronco cerebral anterior, tratos tegmentais posteriores e cerebelo) e identificação de variantes patogênicas bialélicas em um dos genes<sup>137</sup>.

A deficiência de carbamoil fosfato sintetase I (CPS1) é uma desordem do ciclo da ureia caracterizada pela tríade de hiperamonemia, encefalopatia e alcalose respiratória do ciclo da ureia, de herança AR<sup>139</sup>. Embora a maioria dos casos apareça no período neonatal, manifestações podem ocorrer em qualquer momento desde a infância até a idade adulta, a depender da extensão da perda de função da enzima. Mais de 240 variantes no *CPS1* (*Carbamoyl Phosphate Synthetase I*) já foram descritas, sendo a maioria do tipo *missense*<sup>139</sup>. O diagnóstico precoce por meio da triagem neonatal e tratamento agressivo são essenciais para melhorar o prognóstico<sup>140</sup>.

O *ECHS1* (*Enoyl-Coa Hydratase, Short-Chain, 1, Mitochondrial*) codifica a enzima enoil-CoA hidratase de cadeia curta, que é um componente importante na  $\beta$ -oxidação (ácidos graxos de cadeia curta e média) e está envolvida nas vias catabólicas da isoleucina e da valina<sup>141</sup>. Há a descrição de 3 fenótipos clínicos: 1. encefalopatia de início neonatal com hipotonia, crises epilépticas e acidose láctica, fenótipo semelhante ao da síndrome de Leigh; 2. Encefalopatia do Desenvolvimento ou EED com início na infância e regressão; 3. distonia paroxística isolada cinesiogênica (133). Os achados de RM cerebral típicos são evidentes nos três fenótipos, com hiperintensidade em T2 nos núcleos da base (putâmen e globo pálido), atrofia cerebral, afinamento do corpo caloso e espectroscopia com pico de lactato. O mecanismo fisiopatológico provável está relacionado a elevadas concentrações de

intermediários tóxicos de enoil-CoA, que prejudicam a função do complexo piruvato desidrogenase (PDH) e da cadeia respiratória mitocondrial<sup>142</sup>.

A deficiência do complexo desidrogenase (PDH) pode ser causada por alteração nas subunidades E1 $\alpha$ , E1 $\beta$ , E2 ou E3, sendo a mais comum causada pela subunidade E1 $\alpha$  (76%-85%)<sup>143</sup>. O *PDHA1* (*Pyruvate Dehydrogenase, Alpha-1*) codifica a subunidade E1 $\alpha$ , ligada ao X, que afeta tanto mulheres quanto homens e é frequentemente ocasionada por variantes *de novo*. Pacientes com menos de 15 a 20% da atividade normal da PDH geralmente apresentam manifestações neurológicas graves, incluindo acidose láctica neonatal, Síndrome de Leigh, miopatia e ataxia de início na idade adulta. As manifestações neurológicas abrangem ADNPM, microcefalia, hipotonia, epilepsia, hipertonia, ataxia, neuropatia periférica e distonia. Os achados de ressonância cerebral são inespecíficos, incluindo atrofia cerebral, ventriculomegalia, agenesia do corpo caloso e/ou hiperintensidade de sinal nos núcleos da base. O tratamento não é curativo, porém está indicada a reposição de vitamina B1 e dieta cetogênica<sup>144</sup>.

As aminoacil-tRNA sintetases (aaRS) são um grupo de enzimas catalíticas que desempenham um papel na tradução de proteínas e na fosforilação oxidativa<sup>145</sup>. Variantes intrônicas do *RARS2* (*Arginyl-TRNA Synthetase 2*) foram descritas pela primeira vez em 2007 em uma família judia sefardita com encefalopatia infantil grave e hipoplasia pontocerebelar tipo 6 (HPC 6) típica<sup>146</sup>. A HPC representa um grupo de desordens neurodegenerativas AR associadas a ADNPM e hipoplasia/atrofia do cerebelo e ponte, com RM de crânio evidenciando um padrão de “libélula” ou “borboleta” do cerebelo<sup>145</sup>. Posteriormente, vários autores relatam pacientes, com ou sem HPC, associados a Encefalopatia Epiléptica de início neonatal, acidose láctica, hipotonia, espasticidade, microcefalia adquirida e ADNPM grave causada por

variantes *RARS2*<sup>147,148</sup>. Não há correlações evidentes entre genótipo e fenótipo. Acredita-se que a gravidade da doença dependa do percentual da atividade de aminoacilação<sup>149</sup>.

Variantes patogênicas bialélicas no *VARS2* (*Valyl-tRNA Synthetase 2*), que codifica a valil tRNA-sintetase mitocondrial, ocasionam o defeito do Complexo I da fosforilação oxidativa (OXPHOS) e são caracterizadas por encefalomiopatias ou encefalocardiomiopatias, sendo a cardiomiopatia hipertrófica o padrão mais comum<sup>150</sup>. Os pacientes apresentam atrofia cerebelar e cerebral progressiva, microcefalia progressiva, epilepsia farmacorresistente e lactato elevado culminando em insuficiência respiratória. A RM de crânio evidencia graus variáveis de atrofia cerebral e cerebelar, anormalidades da substância branca e gânglios da base<sup>151</sup>.

O *QARS1* (*Glutaminyl-tRNA Synthetase 1*) codifica a glutaminil-tRNA sintetase, e variantes patogênicas bialélicas ocasionam epilepsia farmacorresistente, atrofia cerebral, DI grave e microcefalia progressiva<sup>152</sup>. Vários tipos de crises epilépticas foram relatados, sendo as mais frequentes as focais e multifocais. A atividade de aminoacilação em aminoacil-RNAt sintetases nem sempre se correlaciona com a gravidade da doença<sup>153</sup>.

#### 4.3.3 Genes que codificam proteínas localizadas principalmente no núcleo

Anormalidades em genes cujos produtos estejam relacionados a modificações da estrutura da cromatina, regulação transcricional ou moléculas de sinalização intracelular e processamento de ácidos nucleicos foram apontadas como a causa de EEDs.

#### 4.3.3.1 Genes associados à modificação da estrutura da cromatina

Entre os genes relacionados ao remodelamento de cromatina, o mais conhecido é o *MECP2* (*Methyl-CpG-Binding Protein 2*), responsável pela Síndrome de Rett, uma das causas genéticas mais comuns de DI e ADNPM em meninas<sup>154</sup>.

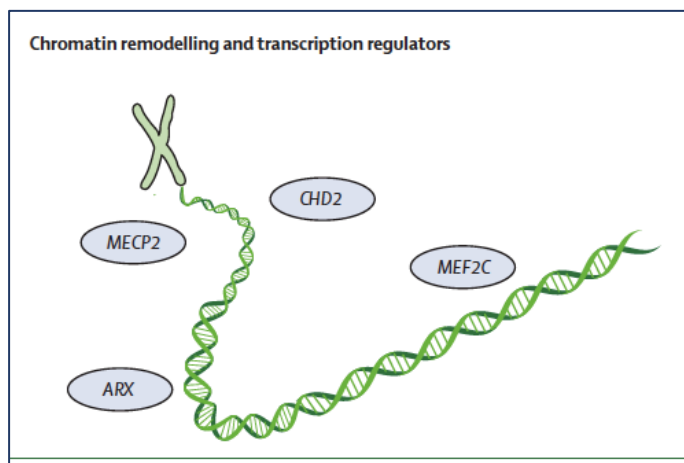
O *BCL11B* (*Baf Chromatin Remodeling Complex Subunit*) codifica um fator de transcrição Cys2-His2 *zinc finger*, que está envolvido no desenvolvimento de células progenitoras hematopoiéticas, incluindo apoptose, proliferação celular e diferenciação<sup>155</sup>. Além de sua função no sistema imunológico, o gene está relacionado ao neurodesenvolvimento humano<sup>156</sup>. Variantes no *BCL11B* que resultam em haploinsuficiência causam DI com atraso na fala, dismorfismos faciais e anormalidades das células T. Lessel e col. (2018) descreveram pacientes com ADNPM, DI e atraso na fala, além de transtorno do comportamento (TEA, TDAH, ansiedade), dismorfismos faciais e, muito raramente, epilepsia<sup>156</sup>.

Variantes patogênicas no *CHD3* (*Chromodomain Helicase DNA-Binding Protein 3*) são responsáveis pela Síndrome Snijders-Blok-Campeau, inicialmente descrita em 2018 em pacientes com ADNPM e DI de graus variados, e estão associadas a características autistas, hipotonia, atraso na linguagem, macrocefalia e dismorfismos<sup>157</sup>. A frequência de epilepsia é baixa, sendo limitada na primeira coorte a 2,8% (1/35) e, na segunda coorte, a 16,6% (4/24)<sup>158</sup>. O *CHD3* codifica uma proteína de remodelação da cromatina dependente de ATP que regula a estrutura da cromatina e modula, assim, a expressão gênica<sup>157</sup>.

O *EP300* (*E1A-Binding Protein*) codifica a p300, uma histona acetiltransferase que regula a transcrição via remodelação da cromatina e se mostra importante nos processos de proliferação e diferenciação celular<sup>159</sup>. A Síndrome de

Rubinstein-Taybi tipo 2 é causada por variantes patogênicas no *EP300* e está associada a um fenótipo mais leve, com menos dismorfismos faciais e melhor função cognitiva. Verifica-se, entretanto, maior prevalência de microcefalia e malformação das estruturas ósseas faciais em comparação com a síndrome de Rubinstein-Taybi tipo 1, causada pelo *CREBBP* (*Creb-Binding Protein*). Transtornos do comportamento são frequentes, incluindo ansiedade, hiperatividade ou agressividade. Além disso, um quarto dos pacientes apresentam características do TEA e descrição de epilepsia<sup>160</sup>.

O *MEF2C* (*Mads Box Transcription Enhancer Factor 2*) codifica um fator de transcrição MEF2 (*myocyte enhancer factor-2*) (figura 14) que desempenha papel fundamental na miogênese e regula o número de sinapses excitatórias, a morfologia dos dendritos e a diferenciação dendrítica pós-sináptica<sup>161</sup>. A haploinsuficiência do *MEF2C* provoca um transtorno do neurodesenvolvimento caracterizado por: hipotonia, movimentos estereotipados das mãos, epilepsia, atraso de linguagem, DI e transtornos comportamentais<sup>161</sup>. Aproximadamente 80% dos pacientes desenvolvem epilepsia com diferentes tipos de crise e com anormalidades na neuroimagem (dilatação de ventrículos, corpo caloso fino e atraso na mielinização)<sup>162</sup>.



**Figura 14:** Exemplos de alguns genes associados à EED que afetam o remodelamento da cromatina ou sintetizam fatores de regulação de transcrição. Adaptado da fonte Ellis e col. (2020)<sup>72</sup>.

#### 4.3.3.2 Genes associados à regulação transcricional

O *ZMIZ1* (*Zinc Finger Miz-Domain Containing 1*) codifica um coativador de vários fatores de transcrição, incluindo receptor andrógeno, p53 e NOTCH1. O Transtorno do Neurodesenvolvimento com Fácies Dismórfica e Anomalias Esqueléticas Distais (NEDDFSA) é ocasionado por variantes heterozigóticas *de novo* ou rearranjo do *ZMIZ1*. O ADNPM é variável, estando associado a transtorno do comportamento, TEA, TDAH, DI, características faciais dismórficas, anomalias oculares, hipotonia, hiper mobilidade articular e anomalias esqueléticas discretas (mãos e pés). A neuroimagem evidencia anormalidades inespecíficas, incluindo ventriculomegalia, atrofia cerebral, atraso da mielinização, corpo caloso fino e atrofia cerebelar<sup>163</sup>.

O *SATB1* (*Special AT-Rich Sequence-Binding Protein 1*) codifica um fator de transcrição com função no desenvolvimento e maturação de células T. O papel do *SATB1* no desenvolvimento cerebral foi estabelecido por den Hoed e col. (2021), que identificaram variantes heterozigóticas no *SATB1* em 42 pacientes com atraso no

desenvolvimento, dismorfismos faciais e anomalias dentárias (DEFDA)<sup>164</sup>. Manifestações associadas descritas são: epilepsia, alterações gastrointestinais, hipermobilidade articular e manifestações psiquiátricas comportamentais (TEA, agressividade e ansiedade). A maioria das variantes ocorreram *de novo*, embora haja alguns relatos de herança AD<sup>164</sup>.

#### 4.3.3.3 Genes associados ao processamento de ácidos nucleicos

O *SON* (*SON DNA-Binding Protein*) codifica uma proteína importante do complexo spliceossomo, que interfere no *splicing* constitutivo e alternativo e influencia ainda na progressão do ciclo celular, na integridade genômica e na manutenção da pluripotência em populações de células-tronco<sup>165</sup>. A haploinsuficiência no *SON* gera o fenótipo da Síndrome ZTTK (Síndrome Zhu-Tokita-Takenouchi-Kim), AD, caracterizada por ADNPM e DI. Os indivíduos afetados apresentam características faciais dismórficas, hipotonia e baixa estatura, além de anormalidades oculares e musculoesqueléticas. Em alguns casos, verificam-se ainda cardiopatia, alterações urogenitais e/ou redução de imunoglobulinas. A neuroimagem pode evidenciar atrofia cortical e/ou cerebelar, padrões de sulcação anormal, corpo caloso fino e cisto aracnoide. Metade dos pacientes apresentam epilepsia entre 1 e 6 anos de idade, sem descrição detalhada do tipo de crise ou epilepsia<sup>166</sup>.

As desordens do neurodesenvolvimento relacionadas ao *PURA* (*Purine-Rich Element-Binding Protein A*) são causadas por variantes heterozigóticas *de novo* (síndrome PURA) ou por deleção na região 5q31.3 (síndrome da deleção 5q31.3)<sup>167</sup>. A “proteína A ligadora a elementos ricos em purinas” (Pur-alfa) desempenha um

papel importante no desenvolvimento cerebral pós-natal, na proliferação de células neuronais e na formação de sinapses. A síndrome PURA é caracterizada por ADNPM moderado a grave com ausência de linguagem e marcha, hipotonia, hipotermia, hipersonolência, dificuldades alimentares, apneias centrais e obstrutivas recorrentes, epilepsia, desordem do movimento e visão anormal<sup>167</sup>. A epilepsia (relatada em pelo menos 50% dos pacientes) revela-se com frequência farmacorressistente, e os achados de neuroimagem são inespecíficos. Não há uma associação genótipo-fenótipo bem fundamentada e a maioria das variantes está localizada dentro das repetições PUR, o que reforça a importância dessas repetições na função do gene<sup>168</sup>.

O *SMC1A* (*Structural Maintenance Of Chromosomes 1A*) codifica uma das quatro subunidades que compõem a cohesina, com papel na segregação cromossômica durante a mitose, regulação da transcrição e reparo do DNA<sup>169</sup>. Variantes *SMC1A* são conhecidas por causar o fenótipo da Síndrome de Cornelia de Lange 2 e da EED-85, com ou sem Defeitos Cerebrais da Linha Média. A EED-85 é caracterizada por ADNPM, DI, atraso da fala, dismorfismos faciais e epilepsia farmacorressistente com início no primeiro ano de vida<sup>169</sup>. Os tipos de crises são variáveis, incluindo crises generalizadas ou focais, com um padrão cíclico de crises em salvas. A neuroimagem pode ser normal, demonstrar anomalias inespecíficas ou evidenciar Defeitos Cerebrais de Linha Média (afilamento do corpo caloso fino e holoprosencefalia semilobar). Quase todos os pacientes descritos são do sexo feminino e, na grande maioria dos casos, a causa são variantes *de novo*<sup>170</sup>.

O *AHDC1* (*AT-HOOK DNA-Binding Motif-Containing Protein 1*) provavelmente exerce sua função, mediada pela ligação ao DNA, utilizando os domínios de ligação *AT-hook*. A Síndrome de Xia-Gibbs tem apresentação clínica variável, caracterizando-se principalmente por atraso do desenvolvimento motor e de



linguagem, hipotonia, DI, apneia obstrutiva do sono, alterações cerebrais (hipoplasia do corpo caloso, simplificação giral e atraso de mielinização) e características faciais dismórficas leves<sup>171</sup>.

#### **4.3.4 Genes que codificam proteínas localizadas na matriz extracelular**

O *COL4A1* (*Collagen Type IV, Alpha-1*) codifica a subunidade  $\alpha$ -1 do colágeno tipo IV, um componente crucial da membrana basal. As desordens relacionadas ao *COL4A1* incluem os seguintes fenótipos: porencefalia familiar AD; doença cerebral de pequenos vasos AD com hemorragia; síndrome de angiopatia hereditária com nefropatia, aneurismas e câimbras musculares de gravidade variável; tortuosidade das artérias da retina; e catarata congênita AD não sindrômica<sup>172</sup>. Clinicamente, a doença cerebral de pequenos vasos se manifesta como hemiparesia infantil, acidente vascular cerebral (AVC) hemorrágico ou isquêmico, epilepsia e enxaqueca com aura isolada. Estudos de imagem evidenciam a doença cerebral de pequenos vasos se apresentando com leucoencefalopatia periventricular difusa, infartos lacunares, micro-hemorragia, espaços perivasculares dilatados e hemorragias intracerebrais profundas. MDC está associada a variantes *COL4A1*, incluindo: esquizecefalia, polimicrogiria, displasia cortical focal e heterotopia nodulares<sup>173</sup>. Essas variantes podem ser associadas ainda a sinais de insulto vascular da substância branca<sup>174</sup>.

#### **4.4 Genes e medicina de precisão**

A medicina de precisão vem sendo expandida em toda a medicina, com o objetivo de oferecer um tratamento personalizado, com um alvo terapêutico, a

desordens específicas. Em relação ao tratamento de epilepsia, a descoberta do gene envolvido e de sua alteração molecular específica pode proporcionar um tratamento direcionado. Desse modo, é possível escolher a MAC não somente pelo tipo de crise epiléptica – se focal ou generalizada –, mas também por sua fisiopatologia<sup>45,47</sup>.

Diagnosticar uma causa tratável de epilepsia e estabelecer um tratamento precoce melhora o prognóstico a longo prazo<sup>47,167</sup>. Entretanto, o tratamento específico está disponível somente para uma minoria de pacientes<sup>167</sup>. Nesse sentido, o avanço das pesquisas envolvendo o conhecimento sobre a fisiopatologia dos genes e suas variantes pode propiciar tanto o desenvolvimento de novas MACs quanto o aparecimento de terapias promissoras, dentre as quais se destaca a terapia genética/gênica – em particular, com o uso de oligonucleotídeo *antisense* (ASO). A Tabela 4 lista somente alguns exemplos de tratamentos direcionados para variantes específicas em epilepsia de origem genética, exemplificando a medicina de precisão<sup>50,175</sup>.

**Tabela 4:** Recomendações relacionadas à terapêutica de epilepsias geneticamente determinadas.

Fenótipo	Gene	Herança	Recomendações
Síndrome de deficiência de GLUT 1	<i>SLC2A1</i>	AD	Dieta cetogênica
Epilepsia piridoxina-dependente	<i>ALDH7A1</i>	AR	Suplementação de Piridoxina
Deficiência de piridoxal-fosfato	<i>PNPO</i>	AR	Suplementação de piridoxal-fosfato
Síndrome de Dravet (EED 6) Epilepsia genética com convulsão febril +	<i>SCN1A</i>	AD	Valproato + clobazam (Stiripentol) e/ou Canabidiol Evitar BCS
EED 13 / ENAL	<i>SCN8A</i>	AD	Favorecer BCS
EED 11 / EDMIFS ENAL / Epilepsia genética febril +	<i>SCN2A</i>	AD	GoF: BCS LoF: evitar BCS
EED 7 / ENAL / Ohtahara / EDMIFS	<i>KCNQ2</i>	AD	LoF: BCS Bloqueador canal de K <sup>+</sup> (retigabina, ezogabina)
EED 14 / Epilepsia hipermotora relacionada ao sono AD / EDMIFS	<i>KCNT1</i>	AD	GoF: Canais de K <sup>+</sup> (Quinidina)
EED 27 / Epilepsia focal com alteração da fala com ou sem DI	<i>GRIN2A</i>	AD	Antagonistas de NMDAr (memantina)
EED 27	<i>GRIN2B</i>	AD	Antagonistas de NMDAr (memantina)
Epilepsia relacionada- <i>POLG</i>	<i>POLG</i>	AR	Evitar valproato
ENAL / Discenesia paroxística cinesio gênica	<i>PRRT2</i>	AD	CBZ

Legenda: AD: autossômico dominante; AR: autossômico recessivo; EDMIFS = Epilepsia da infância com crises focais migratórias; ENAL= epilepsia neonatal autolimitada; LoF (*Loss-of-function*) perda de função; GoF (*gain-of-function*) ganho de função; NMDAr = receptor de N-metil-D-aspartato; BCS= Bloqueador de canal de Na<sup>+</sup>; MACs: CBZ = Carbamazepina, OXC = oxcarbazepina, FNT = fenitoína. Adaptada das Fontes: Striano, 2020<sup>50</sup> e Bayat, 2021<sup>175</sup>.

## 5 Metodologia

### 5.1 Desenho do estudo

Estudo descritivo e transversal, através da análise de uma série de casos selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão mencionados abaixo.

## 5.2 População do estudo

Pacientes com idade até 18 anos, acompanhados por serviços de Neurologia Infantil e/ou de Genética Médica no estado do Rio de Janeiro e provenientes de hospitais públicos ou de clínicas privadas. Foi selecionada uma amostra de conveniência em pacientes com epilepsia de origem genética diagnosticada por sequenciamento de nova geração e classificada como definitiva ou provavelmente patogênica, de acordo com o *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG, 2015).

O projeto foi submetido, sob o número CAAE: 09609319.1.0000.5269, ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, tendo sido aprovado em abril de 2019 (Anexo I). O termo de consentimento ratificado pelo CEP do IFF foi assinado pelos responsáveis no dia da entrevista ou em contato prévio, após as orientações do pesquisador a respeito do objetivo da pesquisa.

## 5.3 Amostra

Pacientes com epilepsias de origem genética identificadas por sequenciamento de nova geração (amostra por conveniência).

### 5.3.1 Critérios de inclusão:

- Ter epilepsia de origem genética identificada por sequenciamento de nova geração e com variante classificada como definitiva ou provavelmente patogênica, de

acordo com critérios do *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG). Pacientes com variantes de significado incerto (VUS) foram incluídos, após análise criteriosa das suas características, nos casos em que não era possível realizar estudo de segregação para demonstrar que a condição era decorrente de um evento mutacional *de novo* (quando se tratava condições de herança autossômica dominante ou ligadas ao X de caráter dominante) ou nos casos em que o estudo da fase da variante (cis ou trans) possibilitasse uma reclassificação da variante.

- Ter diagnóstico de epilepsia farmacorresistente, síndromes epiléticas, Encefalopatia Epilética e do Desenvolvimento ou outros tipos de epilepsia de origem genética.

- Ter epilepsia que tenha se iniciado até os 18 anos de idade.

- Ter consentido de forma livre e esclarecida em participar desta pesquisa.

### 5.3.2 Critérios de exclusão:

- Ter diagnóstico por sequenciamento de nova geração feito com vistas a uma condição específica com suspeita clínica prévia, como neurofibromatose, esclerose tuberosa, Síndrome de Rett e Síndrome de Dravet.

- Ter alterações cromossômicas conhecidas, como, por exemplo, Síndrome de Down, dentre outras síndromes de microdeleções ou microduplicações nas quais a epilepsia faz parte de um cortejo sintomático maior.

- Ter encefalopatia crônica não progressiva, encefalopatia hipóxico-isquêmica ou lesões estruturais cerebrais capazes de justificar, por si próprias, a presença da epilepsia.

#### 5.4 Materiais, procedimentos e técnicas

Os pacientes ou responsáveis, além dos médicos neurologistas e geneticistas que acompanhavam a amostra elegível, foram entrevistados pelo pesquisador para o preenchimento de ficha clínica sobre a história, exame físico, evolução e resultados de exames realizados com finalidade diagnóstica. Os prontuários médicos e resultados dos exames complementares realizados foram revisados pelo pesquisador.

Os exames analisados foram: eletroencefalograma de curta duração, videoeletroencefalograma (VEEG) ou eletroencefalograma prolongado; estudos de neuroimagem estrutural e funcional, como tomografia e/ou ressonância de crânio; ultrassonografia de abdome; avaliação cardiológica; potencial evocado de tronco cerebral (BERA) e visual; exames bioquímicos ou enzimáticos utilizados para a investigação de doenças metabólicas, como cromatografia de aminoácidos, perfil de acilcarnitinas, isofocalização de transferrina, amônia e ácido láctico; e exames genéticos, como cariótipo, citogenética molecular, painel de epilepsia e sequenciamento de nova geração (NGS) (Apêndice II). Outros estudos – como eletroneuromiografia, polissonografia, avaliação oftalmológica e auditiva, dentre outros relevantes no caso estudado – foram descritos nos casos em que havia alterações.

Foram coletadas informações a respeito das variantes descritas nos resultados do NGS dos pacientes selecionados para amostra. As variantes foram analisadas segundo: a classificação baseada nos critérios da ACMG; a posição cromossômica; a região do DNA codificante conforme transcrito analisado; a consequência proteica presuntiva; o tipo de alteração no DNA; os repositórios populacionais (utilizando-se

o *ClinVar*); a frequência alélica segundo o *GnomAD*; o padrão de herança; e a realização do teste de trio, quando aplicável.

O exame físico foi realizado, sempre que possível, de maneira presencial; entretanto, o surgimento da pandemia do COVID-19 produziu limitações para a realização de consultas presenciais, que foram então substituídas por consultas online e análise do prontuário. Informações importantes para o pleno preenchimento da ficha de coleta de dados foram suplementadas com dados ou conhecimentos fornecidos pelos médicos que acompanhavam os pacientes. Não foi solicitado nenhum novo exame complementar, sendo somente analisados os exames realizados previamente.

Para a confirmação diagnóstica de Deficiência Intelectual (DI) ou a presença de características do Transtorno do Espectro Autista (TEA), foram utilizadas informações disponibilizadas em registros de prontuário ou informações fornecidas pelos médicos assistentes. Embora não tenha sido solicitada avaliação neuropsicológica de forma padronizada, tal informação era utilizada sempre que estava disponível. Os critérios definidores empregados para o diagnóstico de DI e TEA fundamentaram-se no Manual Diagnóstico de Saúde Mental (DSM IV ou V).

A análise conjunta do tipo de crise e padrão eletrográfico foi realizada visando à caracterização do tipo de crise, do tipo de epilepsia ou de uma determinada síndrome epiléptica. Foi descrita a presença de critérios para Encefalopatia Epiléptica e do Desenvolvimento e a idade na qual seu diagnóstico foi estabelecido.

Na descrição do tratamento, este foi categorizado em medicamentoso e não farmacológico. Para cada paciente, avaliaram-se as MACs utilizadas, a resposta medicamentosa e a presença de efeitos colaterais. O tratamento não farmacológico (corticoterapia, estimulador do nervo vago e tratamento dietético para epilepsia)

também foi observado, sendo descritas a resposta ao tratamento e a presença de efeitos colaterais que justificassem sua suspensão. A resposta às medicações ou ao tratamento não farmacológico no controle da epilepsia foi considerada benéfica quando a redução de crises foi superior a 50%, critério utilizado pela ILAE e outros autores.

Foi indagado ao médico assistente em que medida o diagnóstico da epilepsia de origem genética acarretou mudança na conduta terapêutica, incluindo adequação das MACs, aconselhamento genético, justificativa para a gravidade clínica e interrupção de exames complementares desnecessários.

## 5.5 Análise e Apresentação dos dados

As medidas de tendência central (média) foram calculadas. Os dados categóricos foram apresentados em forma de proporção e porcentagens. Dados relevantes foram agrupados e apresentados em figuras e tabelas. Como o estudo é descritivo, não possibilita que seja realizado análise estatística.

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

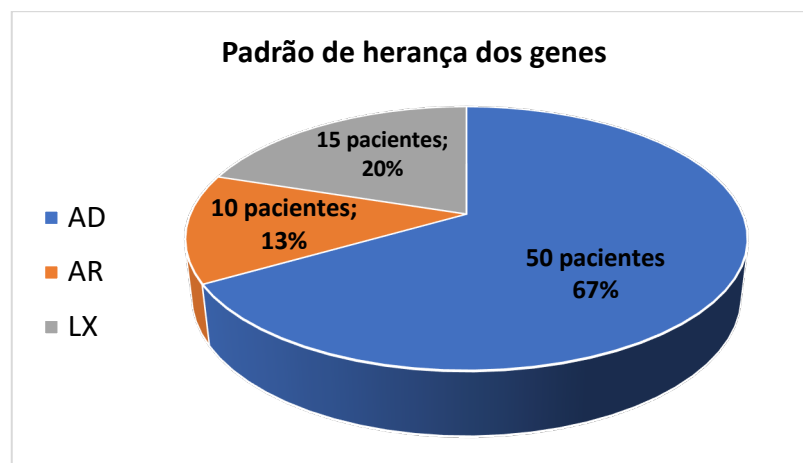
## 6. Resultados

No período de abril de 2020 até dezembro de 2021, foram incluídos na pesquisa 75 pacientes que preenchiam os critérios de inclusão, com alterações detectadas em 53 diferentes genes. Da amostra, 40 (53,3%) pacientes pertencem ao sexo masculino e 35 (46,7%), ao sexo feminino. O tipo de sequenciamento de nova



geração realizado que confirmou o diagnóstico foi exoma em 56 (74,6%) pacientes, painel genético em 18 (24%) pacientes; e sequenciamento do genoma completo em 1 (1,4%) paciente. A testagem dos pais foi realizada em 37 (49,3%) pacientes. O exame foi financiado pelo plano de saúde no caso de 46 (61,3%) pacientes, custeado pelos responsáveis com recursos próprios no caso de 20 (26,7%) pacientes e disponibilizado por painéis financiados pela indústria no caso de 7 (9,3%). Somente 2 (2,7%) pacientes tiveram financiamento público (em um caso, o exame foi realizado na própria Instituição – IFF; no outro, foi custeado pelo SUS e executado em laboratório particular por imposição judicial). Quanto ao intervalo de tempo entre a solicitação do exame (NGS) e a sua realização esteve, tivemos essa informação disponível em relação a 69 dos 75 pacientes (92%). O tempo médio de espera foi de 8 meses, variando de um período tão breve quanto 15 dias até um máximo de 2 anos. Especificamente, 7 (10%) pacientes esperaram 1 mês, 19 (27,5%) pacientes aguardaram 3 meses e 10 (14,5%) esperaram 2 anos para realização do exame. Dos 56 pacientes que confirmaram o diagnóstico por intermédio do exoma, 4 (7,14%) necessitaram da releitura do exoma e 3 (5,3%) foram submetidos a um novo sequenciamento de nova geração para a identificação da variante.

Em relação ao padrão de herança dos 53 genes encontrados na amostra de estudo de 75 pacientes, 50 (67%) pacientes apresentavam variantes em genes de herança autossômica dominante (AD), 10 (13%) apresentavam variantes em genes com herança autossômica recessiva (AR), 12 (16%) apresentavam padrão dominante ligado ao X (XD) e 3 (4%) apresentavam genes de herança recessiva ligada ao X (XR) (Figura 15). As informações referentes ao padrão de herança das variantes e resultado do teste de trio estão sintetizadas na tabela 5.



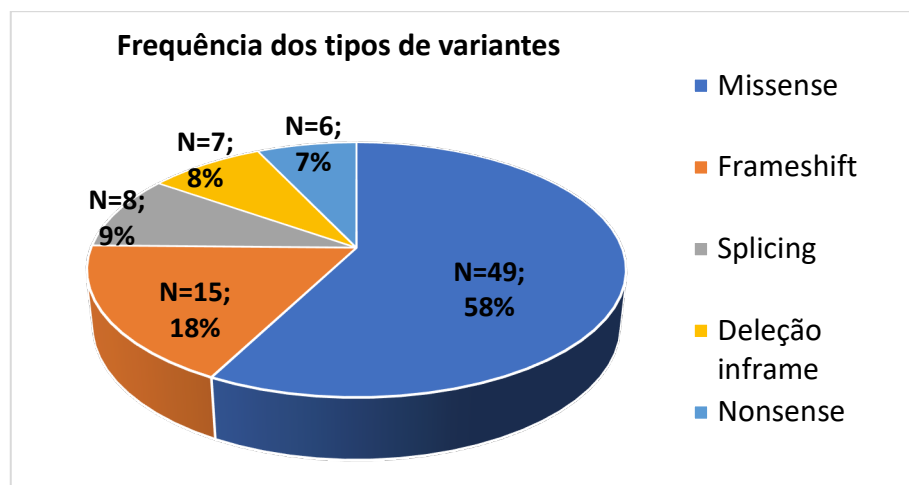
**Figura 15:** Número absoluto e percentual de pacientes com genes de herança AD, AR e ligada ao X (LX). Os pacientes LX compreendem o somatório dos pacientes XD e XR.

**Tabela 5:** Frequência de pacientes e genes encontrados na amostra classificados segundo o padrão de herança das variantes e teste de trio realizados.

Tipo de Herança	Pacientes (N=75)	Sexo	Genes (N=53)	Teste de trio (N variantes=85)
AD	50	19 F 31 M	31	26 <i>de novo</i> 24 NT
XD	12	11 F 1 M	8	6 <i>de novo</i> 5 NT 1 herança paterna ( <i>PCDH19</i> )
XR	3	3 M	3	1 <i>de novo</i> 2 NT
AR	10	5 F 5 M	9	4 (8) HMZ – NT 3 (6) HTZ composta herdados ( <i>RARS2</i> (2), <i>QARS1</i> ) 3 (6) HTZ presuntivamente composta NT ( <i>CPS1</i> , <i>ECHS1</i> , <i>VARS2</i> )

Legenda: HMZ = homozigose, HTZ = heterozigose; N = número; NT = progenitores não testados.

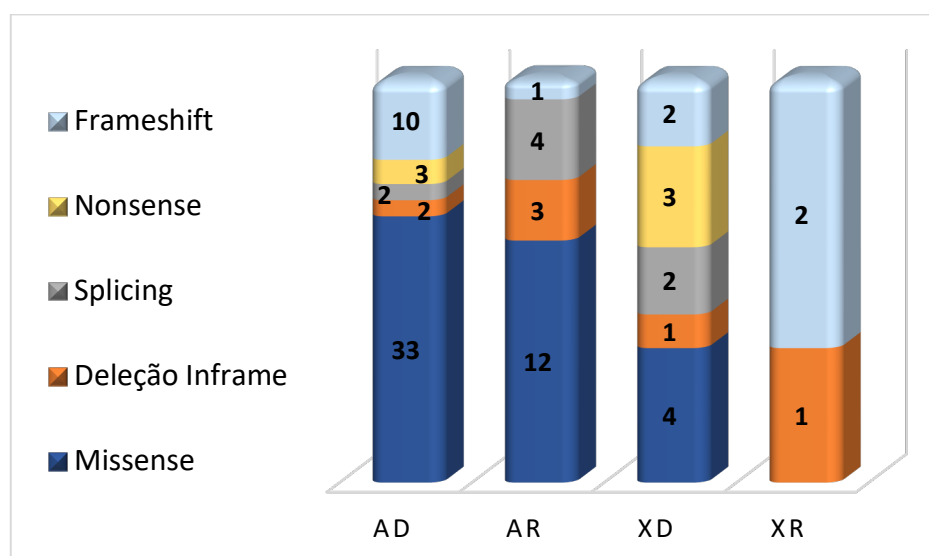
O total de variantes encontradas nos 75 pacientes foi de 85, sendo 41/85 (48,2%) classificadas segundo a ACMG como patogênicas, 39/85 (45,8%) como provavelmente patogênicas e 5/85 (6%) como variantes de significado incerto (VUS). O tipo de variante mais frequente foi a *missense* (49/57,7%), seguida pelas variantes *frameshift* (15/17,7%), variantes em regiões de sítio de *splicing* (8/9,4%), deleções *inframe* (7/8,2%) e variantes *nonsense* (6/7,0%). (Figura 16)



**Figura 16:** Número absoluto e percentual dos tipos de variantes (N=85) encontradas nos 75 pacientes.

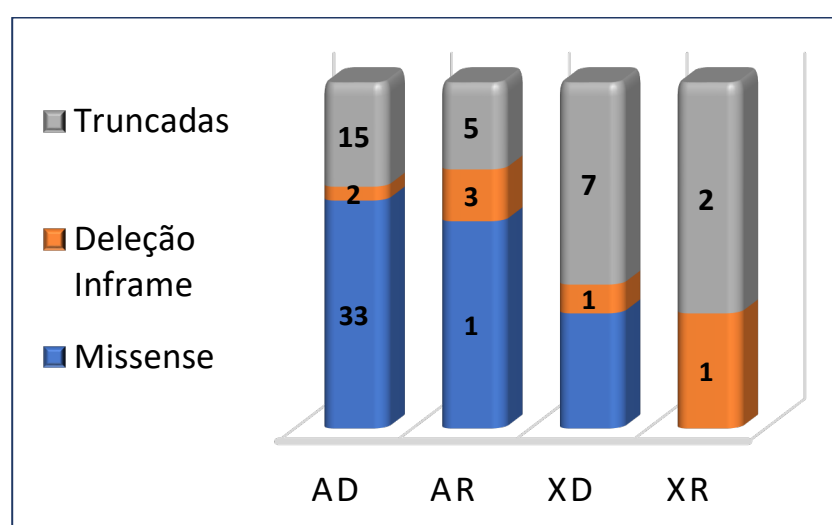
As variantes de significado incerto (VUS) foram incluídas de forma criteriosa e descritas em 3 pacientes. Das 5 VUSs, temos 4 variantes relacionadas a genes com padrões de herança recessiva (2 variantes em homozigose no *CACNA2D2* e 2 variantes em heterozigose composta no *QARSI*) e 1 variante no *KCNT1* com padrão de herança dominante e fenótipo altamente compatível com a clínica (tabela 10), aguardando o teste em trio dos pais.

O tipo de variante foi relacionado ao padrão de herança na figura 17.



**Figura 17:** Número absoluto do tipo de variante em relação ao padrão de herança encontrado nos 75 pacientes (AD, AR, XD, XR).

Das 85 variantes encontradas, 42 (49,4%) já foram descritas no *ClinVar* e 43 (50,6%) são variantes novas. As variantes truncadas, correlacionadas a perda de função do gene, totalizaram 29 (34,2 %) (*splicing, nonsense, frameshift*). Na amostra, por acaso não foi evidenciada a presença de pacientes com CNV, não havendo restrição a sua seleção. A figura 18 correlaciona as variantes truncadas, *del inframe* e *missense* ao padrão de herança.



**Figura 18:** Número absoluto do tipo de variante truncada, deleção *inframe* e variante *missense* em relação ao padrão de herança encontrado nos 75 pacientes (AD, AR, XD, XR). Variantes truncadas (somatórios das variantes *frameshift, nonsense* e *splicing*).

Todas as variantes AD (50), XD (12) e XR (3) tinham frequência alélica populacional zero determinada pelo gnomAD (*Genome Aggregation Database*). Nos pacientes com variantes AR, 10 variantes têm frequência zero e, das 10 variantes com frequência populacional (relacionadas aos genes *ECHS1, QARS1, RARS2, TRAPPC4* e *VARS2*), a mais frequente na população foi a c.454+3A>G no *TRAPPC4* (68/281054) (tabela 10).

As características e evolução da epilepsia na amostra são descritas na tabela 6, na qual se apresenta a idade da realização do diagnóstico de crises epiléticas e da

epilepsia, o tipo de crise epiléptica, a classificação da epilepsia segundo a ILAE (2017) e os achados do eletroencefalograma e neuroimagem. É importante frisar que o mesmo paciente pode apresentar vários tipos de crises, situação muito comum na nossa amostra.

O paciente mais novo a ser diagnosticado com EED tinha 2 meses de idade no momento do diagnóstico (*AMT*); o mais velho, 14 anos (*STXBPI*). O diagnóstico de EED em menores de 3 meses de idade foi demonstrado em 8 pacientes (10,9%) [*AMT*, *KCNQ2* (3), *KCNT1*, *SCN8A*, *STXBPI* (2)]; em menores de 2 anos, em 39 pacientes (53,4%); 11 pacientes (15%) tiveram o diagnóstico após os 5 anos [*BCL11B*, *COL4A1*, *DYRK1A*, *GRIN2A*, *KCNQ2*, *PDHA1*, *PURA*, *SCN8A*, *STXBPI* (2), *SON*].

Em relação aos exames de imagem, os resultados anormais da ressonância de crânio evidenciam: alterações inespecíficas em 21 pacientes (28%), incluindo alterações discretas na substância branca, hipoplasia do vermis cerebelar, má rotação de hipocampo, dentre outras que não permitem o diagnóstico etiológico e não justificam a epilepsia; Malformação do Desenvolvimento Cortical em 5 pacientes (6,6%) (*COL4A1*, *KIF5C*, *PCDH19*, *SON*, *TUBG1*); e alterações específicas em 10 pacientes (13,3%), incluindo atrofia cortical [*CYFIP2*, *KCNQ2* (2), *STXBPI*, *TRAPPC4*, *VARSS2*], atrofia cerebelar [*RARS2* (2)]; difusão restrita no trato cortico-espinhal (*AMT*, *CPS1*), encefalopatia hipóxico-isquêmica associada (*COL4A1*, *CPS1*, *KCNQ2*); e hemorragia parenquimatosa (*COL4A1*).

**Tabela 6:** Descrição das características em relação a epilepsia, tipo de crise epiléptica, síndrome epiléptica, EED, achados eletrográficos e de neuroimagem no total da amostra.

Características relativas à epilepsia	Pacientes (N, %)
Idade de início das crises epilépticas	12 meses (média)
Idade de início da epilepsia	18 meses (média) (variação 1 dia – 12 anos)
	< 2 anos – 57 (76%)
	< 5 anos – 69 (92%)
	> 5 anos – 6 (8%)
Diagnóstico de EED	N – 73 (97,3%) 3 anos 1 mês (média) (variação 2 meses – 14 anos)
	< 3 meses – 8 (10,9%)
	< 2 anos – 39 (53,4%)
	> 5 anos – 11 (15%)
Tipo de crise epiléptica	Focal – 66 (88%) Generalizada – 59 (78,6%) Desconhecida – 10 (13,3%) Não classificada – 3 (4%)
Tipo de epilepsia	Focal – 35 (46,7%) Generalizada – 7 (9,3%) Combinada – 32 (42,7%) Desconhecida – 1 (1,3%)
Síndrome epiléptica	N – 36 (48%) EEDIP – 8 [EMP (2) + SO (6)] EDMISF – 2 ENAL – 1 SW – 16 SLG – 14 EMA – 1 EALTC – 1 EALCTa – 1 EEDPOS – 4
EEG	N – 75 (100%) Ritmo de base: Desorganização – 52 (69,3%) Descargas epileptiformes: Focais – 65 (86,6%) Generalizadas – 38 (50%) Multifocais – 42 (56%)
Neuroimagem	CT de crânio – 50 (66,7%) Anormal 6/50 (12%) RM de crânio – 75 (100%) Normal – 39 (52%) Alterações inespecíficas – 21 (28%) Alterações específicas – 10 (13,3%) MDC – 5 (6,6%)

Legenda: CT = tomografia magnética de crânio; EALCT = Epilepsia autolimitada centrottemporal, EALCTa = Epilepsia autolimitada centrottemporal atípica; EEDIP = Encefalopatia Epiléptica e do Desenvolvimento infantil precoce; EDMISF = Epilepsia da infância com crise focais migratórias; EEDPOS = Encefalopatia Epiléptica e do Desenvolvimento ou Encefalopatia Epiléptica com ponta-onda no sono; EMA = Epilepsia mioclônica-atônica; EMP = Epilepsia mioclônica precoce; ENAL = Epilepsia neonatal autolimitada; MDC = malformação do desenvolvimento cortical; RM = ressonância magnética de crânio; SO = Síndrome de Ohtahara; SW = Síndrome de West; SLG = Síndrome de Lennox-Gastaut.

O resultado dos exames genéticos está apresentado na tabela 7. Os exames de microarranjo cromossômico foram realizados em 50% da amostra. Em 18,4%, foram observadas alterações inespecíficas que não justificam a clínica do paciente. Dos 23 (30,6%) pacientes que realizaram painel genético, 6 (26%) tiveram resultados normais, sendo submetidos posteriormente ao exoma e confirmando assim o diagnóstico.

**Tabela 7:** Número absoluto e percentual dos exames genéticos realizados no total da amostra.

Exames genéticos realizados	Pacientes (N, %)
Cariótipo	60 (80%) Normal – 60 (100%)
Array (microarranjo cromossômico)	38 (50%) Normal – 31 (81,6%) Alterado (VUS) – 7 (18,4%)
Painel genético	23 (30,6%) Normal – 6 (26%) Alterado – 17 (74%)
Exoma	57 (76%) Normal – 1 (1,7%) Alterado – 56 (98,3%)
Genoma	1 (1,3%) Alterado – 1 (100%)

Legenda: VUS = variante de significado incerto.

Vários outros exames foram executados durante a investigação diagnóstica, sendo a triagem para erros inatos do metabolismo solicitada em 70 (93,3%) pacientes. Dentre estes, foi observada amônia alterada em 18/69 (26%), com resultados variados e muitas vezes errôneos; lactato anormal em 11/70 (15,7%); cromatografia de aminoácidos com resultados anormais em 4/69 (5,7%); pesquisa de ácidos orgânicos na urina anormal em 6/57 (10,5%); e perfil de acilcarnitinas alterado em 3/66 (4,5%) pacientes. Nenhum desses exames foi suficiente para elucidação diagnóstica dos pacientes estudados.

Em relação ao tratamento medicamentoso, 12 (16%) pacientes foram considerados farmacoresponsivos, com a quantidade de MACs utilizadas variando entre 3 e 15 (Tabela 8). O tratamento não farmacológico foi empregado em 17 (22,6%) pacientes, sendo uma opção terapêutica nos pacientes com epilepsia farmacorresistente. A frequência do emprego da dieta quanto da corticoterapia foi utilizada em 15 (20%) pacientes. Tanto o uso de corticoterapia quanto o tratamento dietético reduziram as crises em 7/15 pacientes. O estimulador do nervo vago foi a terapia não farmacológica menos implantada, tendo sido empregada em 5 (6,6%) dos pacientes (Tabela 8).



**Tabela 8:** Número absoluto e percentual dos achados em relação aos tratamentos farmacológico e não farmacológico empregados nos pacientes da amostra.

Descrições sobre o tratamento (N; %)	Pacientes (N, %)
Tratamento farmacológico N = 75 (100%)	Classificação segundo a resposta ao tratamento: Farmacoresponsivo (FS) – 12 (16%) Farmacoresistente (FR) – 63 (84%)
	Nº de MACs utilizadas 1 MAC – 2 (2,6%) 2 MACs – 4 (5,3%) 3 MACs – 10 (13,3%) FS – 6 (8%) FR – 4 (5,3%) >10 MACs – 17 (22,6%)
Tratamento não farmacológico N = 17 (22,6%)	Canabidiol – 30 (40%) Melhora – 25 (83,3%) Piora das crises – 1 (3,3%) Efeitos colaterais – 5 (16,6%)
	Tratamento dietético – 15 (20%) Resposta – 7 (46,7%) Efeito colateral – 7 (46,7%)  BIG – 2 (13,3%) Atkins modificada – 5 (33%) Cetogênica clássica – 13 (86,6%)
	Imunoterapia – 15 (20%) Resposta – 7 (46,6%) Efeito colateral – 5 (33,4%)  ACTH – 5 (33%) Corticoide oral – 14 (93,4%) Pulsoterapia – 4 (26,6%) Ig – 1 (6,6%)
	VNS – 5 (6,6%) Resposta – 3 (60%) Efeito colateral – 1

Legenda: ACTH: hormônio adrenocorticotrópico; BIG: baixo índice glicêmico; FS: farmacoresponsivo; FR: farmacoresistente; Ig: Imunoglobulina; VNS: estimulador do nervo vago; MAC: medicação anticrise; Resposta: considerada redução de mais 50% das crises.

A frequência das características clínicas, com base nos exames físico e neurológico dos 75 pacientes, está apresentada na tabela 9. O diagnóstico compatível com o TEA e DI, bem como a história familiar de consanguinidade e de epilepsia, também foram analisados (tabela 9).

**Tabela 9:** Número absoluto e percentual dos achados das características clínicas, baseado nos exames físico e neurológico, em relação ao total da amostra.

Características clínicas da amostra	Pacientes (N, %)
Desenvolvimento	ADNPM 72 (96 %)
	Regressão 21 (28%)
Perímetro cefálico	Microcefalia 25 (33,3%)
	Macrocefalia 4 (5,3%)
Dismorfismos	29 (38,6%)
Tônus muscular	Hipotonia 65 (86,6%)
	Hipertonía 12 (16%)
Desordem do movimento (coreoatetose, distonia e/ou estereotípias)	49 (65,3%)
Ataxia	23 (30,6%)
Síndrome piramidal	35 (46,6%)
Síndrome extrapiramidal	11 (14,6%)
TEA	Presente 35 (46,7%)
	Ausente 32 (42,7%)
	NA 8 (10,6%)
DI	Presente 57 (76%)
	Ausente 8 (10,6%)
	NA 10 (13,4%)
História familiar de epilepsia	Presente 14 (18,6%)
Consanguinidade	Presente 4 (5,3%)
	( <i>AP3B2, CACNA2D2, CYFIP2, SCN2A</i> )

Legenda ADNPM = atraso do desenvolvimento neuropsicomotor; DI = Deficiência Intelectual; NA = não se aplica; TEA = transtorno do espectro autista.

A descrição completa, abrangendo todos os pacientes com epilepsia de origem genética segundo o gene encontrado e seus achados moleculares, está exposta na tabela 10. As características de cada paciente da amostra segundo o gene encontrado, tipo e evolução da epilepsia, bem como exames complementares e exame neurológico, encontram-se na tabela 11.

Os médicos assistentes foram arguidos a respeito da elucidação diagnóstica da epilepsia de origem genética e da mudança de sua conduta terapêutica. O relato de que o diagnóstico modificou a terapêutica ocorreu em relação a 52 (69,3%) pacientes, incluindo mudança no esquema terapêutico em 23 (30,6%) pacientes, justificativa para a gravidade do quadro clínico em 67 (89,3%) pacientes e interrupção da

realização de exames desnecessários em 68 (90,6%) pacientes. O aconselhamento genético foi realizado com todos os pacientes.

Após uma análise individual de cada ficha clínica, foi evidenciado que o tratamento foi modificado após o resultado do NGS em 24 pacientes (32%). Os genes associados à mudança terapêutica foram: *AMT* (Encefalopatia por glicina: evitar valproato e avaliar a utilização do antagonista NMDA); *ATP7A* (Síndrome de Menkes: utilização de histidina de cobre); *CACNA1A* (utilização de acetazolamina); *CPS1* (Deficiência de Carbamilfosfato sintetase I: dieta com restrição proteica associada a benzoato ou fenilbutirato de sódio); *ECHS1* (Deficiência de Enoil-CoA hidratase 1 de cadeia curta mitocondrial: evitar valproato); *KCNQ2* (5) (associação de bloqueadores de canal de sódio); *PDHAI* (Deficiência de piruvato desidrogenase E1 alfa: tiamina e dieta cetogênica); *QARS1* (Microcefalia progressiva, epilepsia, atrofia cerebral e cerebelar: evitar valproato); *RARS2* (2) (Hipoplasia pontocerebelar tipo 6: evitar valproato); *SCN8A* (6) (associação de bloqueadores de canal de sódio); *SLC2A1* (Deficiência de Glut-1: dieta cetogênica); *SCL35A2* (CDG tipo IIm: suplementação de galactose oral); *STX1B* (Epilepsia generalizada com convulsão febril, tipo 9: uso de levetiracetam); *VAR2* (Deficiência da fosforilação oxidativa combinada 20: evitar valproato).

**Tabela 10: Descrição dos pacientes com epilepsia de origem genética segundo o gene encontrado e achados moleculares.**

GENE	sexo	exame	Posição Cromossômica (GRCh37) / DNA codificante	Consequência proteica	ACMG	ClinVar / Nº ID	Tipo variante	Freq. Alélica	transcrito	Herança	herdado
<i>AHDC1</i>	F	exoma	Chr1:27.877.818 TCG>CG c.809delA	p.(Glu270Glyfs*19)	P	A	FS	0	ENST00000374011	AD	<i>de novo</i>
<i>ALG13</i>	F	exoma	ChrX:110.928.268 A>G c.320A>G	p.(Asn107Ser)	P	P 66086	MS	0	ENST00000394780	XD	<i>de novo</i>
<i>AMT</i>	F	exoma	Chr3:49.455.407 C>A c.746-1G>T homozigose	p.(?)	P	A	SP	0	ENST00000458307	AR	NT
<i>AP3B2</i>	F	exoma	Chr15: 83.350.298_83.350.301 CGGA>C c.392_394delCCT homozigose	p.(Leu131del)	LP	P 803113	Del IF	0	ENST00000261722	AR	NT
<i>ATP7A</i>	M	painel	ChrX:77.244.053_77.244.054 CT>C c.437delC	p.(Leu146Profs*3)	P	A	FS	0	ENST00000341514	XR	NT
<i>ARHGEF9</i>	M	exoma	ChrX:62.894.041 TA>TTA c.799dupA	p.(Tyr267Leufs*29)	LP	A	FS	0	ENST00000253401	XR	NT
<i>BCL11B</i>	M	exoma	Chr14:99.640.711 T>TCGCCGGTGTGGCTC c.2448_2461dup	p.(Glu821Glyfs*28)	P	A	FS	0	ENST00000357195	AD	<i>de novo</i>
<i>CACNA1A</i>	F	exoma	Chr19:13.373.585 C>T c.4055G>A	p.(Arg1352Gln)	LP	A	MS	0	ENST00000636549	AD	<i>de novo</i>
<i>CACNA2D2</i>	M	exoma	Chr3:30.471.769 A>G c.380T>C homozigose	p.(Leu127Pro)	VUS	A	MS	0	ENST00000479441	AR	NT
<i>CASR</i>	M	exoma	Chr3:121.976.134 G>T c.392G>T	p.(Cys131Phe)	P	A	MS	0	ENST00000638421	AD	<i>de novo</i>
<i>CDKL5</i>	F	exoma	ChrX:18.606.083 T>G c.564T>G	p.(Tyr188*)	LP	A	NS	0	ENST00000379996	XD	NT
<i>CDKL5</i>	F	exoma	ChrX:18.598.064 C>A c.379C>A	p.(His127Asn)	LP	A	MS	0	ENST00000379996	XD	<i>de novo</i>
<i>CDKL5</i>	F	exoma	ChrX:18.622.692 C>T c.1648C>T	p.(Arg550*)	P	P 143780	NS	0	ENST00000379996	XD	NT
<i>CHD3</i>	F	exoma	Chr17:7.812.606 T> TC c.5719_5720insC	p.(Lys1907Glnfs*194)	LP	A	FS	0	ENST00000380358	AD	<i>de novo</i>
<i>COL4A1</i>	M	exoma	Chr13:110.830.243 C>T c.2262G>A	p.(Gly888Arg)	P	P 209141	MS	0	ENST00000375820	AD	NT
<i>COL4A1</i>	M	exoma	Chr13:110.827.067_110.827.050 c.3210_3227del18	p.(Ile1071_Gly1076del)	LP	A	De IF	0	ENST 00000375820	AD	<i>de novo</i>
<i>CPS1</i>	F	painel	Variante 1: Chr2:211.476.997 C>G c.2548C>G Variante 2: Chr2:211.512.614 G>A c.3169G>A	p.(Arg850Gly)	P	P 801868	MS	0	ENST00000233072	AR	NT
<i>CYFIP2</i>	M	exoma	Chr5: 156.721.843 C>T c.259C>T	p.(Arg87Cys)	P	P 430807	MS	0	ENST00000620254	AD	<i>de novo</i>
<i>DNMI</i>	M	exoma	Chr9:130.965.861 G>A c.112G>A	p.(Gly38Ser)	LP	P 430561	MS	0	ENST00000475805	AD	<i>de novo</i>

GENE	sexo	exame	Posição Cromossômica (GRCh37) / DNA codificante	Consequência proteica	ACMG	ClinVar / Nº ID	Tipo variante	Freq. Alélica	transcrito	Herança	herdado
<i>DYNCH1</i>	M	exoma	Chr14:102.474.581 C>T c.5885C>T	p.(Arg1962Cys)	P	P 245597	MS	0	ENST00000360184	AD	NT
<i>DYRK1A</i>	M	exoma	Chr21:38.862.735 T>C c.896 T>C	p.(Phe299Ser)	LP	P 594952	MS	0	ENST00000646548	AD	de novo
<i>ECHS1</i>	M	2º exoma	Variante 1: Chr10:135.184.082 C>T c.268G>A	p.(Gly90Arg)	P	P 426299	MS	0	ENST00000368547	AR	NT
			Variante 2: Chr10:135.178.173 T>C c.796A>G	p.(Thr266Ala)	LP	P 802638	MS	1/ 251028			
<i>EP300</i>	M	exoma	Chr22: 41.168.447 A>C c.3875-2A>C	p.(?)	LP	A	SP	0	ENST00000263253	AD	NT
<i>GRIN1</i>	M	releitura exoma	Chr9:140.056.936 G>T c.1832G>T	p.(Trp611Leu)	LP	A	MS	0	ENST00000371561	AD	de novo
<i>GRIN2A</i>	M	exoma	Chr16:9.857.071 C>T c.4330G>A	p.(Val1444Ile)	LP	P 205684	MS	0	ENST00000330684	AD	de novo
<i>GRIN2B</i>	M	releitura exoma	Chr12:13.720.035 AGGTGTTTCGCAG>A c.2511_2521delCTGCGAACACC	p.(Cys838Phefs*69)	P	A	FS	0	ENST00000609686	AD	de novo
<i>HCN1</i>	F	painel	Chr5:45.396.686 T>A c.1138A>T	p.(Ile380Phe)	LP	P 1342979	MS	0	ENST00000303230	AD	de novo
<i>KCNA2</i>	M	exoma	Chr1:111.146.285 T>C c.1.120A>G	p.(Thr374Ala)	P	P 559647	MS	0	ENST00000316361	AD	de novo
<i>KCNA2</i>	M	exoma	Chr1:111.146.480 T>C c.925A>G	p.(Arg309Gly)	LP	A	MS	0	ENST00000316361	AD	de novo
<i>KCNQ2</i>	M	exoma	Chr20:62.073.884 CTC>C c.691-2_691-1delAG	p.(?)	LP	A	SP	0	ENST00000359125	AD	NT
<i>KCNQ2</i>	M	painel	Chr20:62.044.825 G>C c.1741C>G	p.(Arg581Gly)	P	P 265380	MS	0	ENST00000359125	AD	NT
<i>KCNQ2</i>	M	painel	Chr20:62.071.039 T>C c.839A>G	p.(Tyr280Cys)	LP	P 589856	MS	0	ENST00000359125	AD	NT
<i>KCNQ2</i>	F	painel	Chr20:62.073.835 G>A c.740C>T	p.(Ser247Leu)	P	P 205878	MS	0	ENST00000359125	AD	NT
<i>KCNQ2</i>	M	painel	Chr20:62.073.875 T>C c.700A>G	p.(The234Ala)	LP	A	MS	0	ENST00000359125	AD	NT
<i>KCNT1</i>	F	painel	Chr9:138.657.034 G>A c.1193G>A	p.(Arg398Gln)	P	P 39599	MS	0	ENST00000371757	AD	NT
<i>KCNT1</i>	F	exoma	Chr9: 138.671.275 G>A c.2800G>A	p.(Ala934Tre)	P	P 39594	MS	0	ENST00000371757	AD	NT
<i>KCNT1</i>	F	painel	Chr9:138.651.610 A>G c.940A>G	p.(Thr314Ala)	VUS	A	MS	0	ENST00000371757	AD	NT
<i>KIF5C</i>	M	exoma	Chr2:149.803.532 G>A c.709G>A	p.(Glu237Lys)	P	P 140740	MS	0	ENST00000435030	AD	de novo
<i>MEF2C</i>	F	painel	Chr5:88.027.698 G>A c.652C>T	p.(Arg218*)	P	A	NS	0	ENST00000424173	AD	NT

GENE	sexo	exame	Posição Cromossômica (GRCh37) / DNA codificante	Consequência proteica	ACMG	ClinVar / Nº ID	Tipo variante	Freq. Alélica	transcrito	Herança	herdado
<i>NEXMIF</i>	M	exoma	ChrX:73.960.702_73.960.703 AG>G c.3689delC	p.(Ala1230Valfs*42)	P	P 804032	FS	0	ENST00000055682	XD	<i>de novo</i>
<i>PCDH19</i>	F	painel	ChrX:99.596.900 C>A c.2848+1G>T	p.(?)	LP	A	SP	0	ENST00000373034	XD	NT
<i>PCDH19</i>	F	exoma	ChrX:99.662.154 T>C c.1442A>G	p.(Asp481Gly)	LP	P 804055	MS	0	ENST00000255531	XD	paterna
<i>PCDH19</i>	F	exoma	ChrX:99.662.061 G>T c.1535C>A	p.(Ser512*)	P	A	FS	0	ENST00000255531	XD	NT
<i>PDHA1</i>	F	exoma	ChrX:19.368.068 A>G c.131A>G	p.(His44Arg)	LP	A	MS	0	ENST00000422285	XD	<i>de novo</i>
<i>PRRT2</i>	F	painel	Chr16:29.825.015 CG>CCG c.649dupC	p.(Arg217Profs*8)	P	P 65758	FS	0	ENST00000358758	AD	NT
<i>PURA</i>	F	exoma	Chr5:139.494.207 CCTG>CTG c.441delC	p.(Leu148Trpfs*77)	LP	A	FS	0	ENST00000331327	AD	<i>de novo</i>
<i>QARS1</i>	M	painel	Chr3:49.142.109 CCTT>C c.55_57delAAG	p.(Lys19del)	VUS	A	Del IF	1/ 248828	ENST00000306125	AR	materna
			Chr3:49.137.278 T>C c.1304A>G	p.(Tyr435Cys)	VUS	A	MS	6/ 281566			paterna
<i>RARS2</i>	F	exoma	Variante 1: Chr6:88.228.436 A>G c.1327T>C	p.(Ser443Pro)	P	P 402195	MS	15/ 251374	ENST00000369536	AR	paterna
			Variante 2: Chr6:88.258.338 T>G c.422A>G	p.(His141Arg)	LP	A	MS	4/ 281534			materna
<i>RARS2</i>	M	2º exoma	Variante 1: Chr6:88.228.565 C>T c.1282G>A	p.(Gly428Arg)	P	P 802249	MS	2/ 251458	ENST00000691725	AR	paterna
			Variante 2: Chr6:88.258.353 A>G c.407T>C	p.(Val136Ala)	LP	A	MS	1/ 249720			materna
<i>SATB1</i>	F	releitura exoma	Chr3:18.428.091 C>G c.1219G>C	p.(Glu407Gln)	P	P 1050816	MS	0	ENST00000338745	AD	<i>de novo</i>
<i>SCN2A</i>	M	exoma	Chr2:166.229.828 A>G c.3943A>G	p.(Arg1315Gly)	LP	P 949926	MS	0	ENST00000283256	AD	<i>de novo</i>
<i>SCN8A</i>	M	exoma	Chr12:52.184.188 G>A c.4426G>A	p.(Gly1476Ser)	LP	P 418482	MS	0	ENST00000354534	AD	<i>de novo</i>
<i>SCN8A</i>	M	painel	Chr12:52.162.699 C>A c.2952C>A	p.(Asn984Lys)	P	P 192317	MS	0	ENST00000354534	AD	NT
<i>SCN8A</i>	M	painel	Chr12:52.200.884 C>T c.5614C>T	p.(Arg1872Trp)	P	P 207131	MS	0	ENST00000354534	AD	NT
<i>SCN8A</i>	M	exoma	Chr12:52.180.368 A>G c.3985A>G	p.(Asn1329Asp)	LP	P 195689	MS	0	ENST00000354534	AD	<i>de novo</i>
<i>SCN8A</i>	F	exoma	Chr12:52.093.362 A>G c.715A>G	p.(Thr239Ala)	LP	A	MS	0	ENST00000354534	AD	<i>de novo</i>
<i>SCN8A</i>	F	exoma	Chr12:52.009.292 T>C c.1226T>C	p.(Val409Ala)	LP	A	MS	0	ENST00000354534	AD	<i>de novo</i>

GENE	sexo	exame	Posição Cromossômica (GRCh37) / DNA codificante	Consequência proteica	ACMG	ClinVar / Nº ID	Tipo variante	Freq. Alélica	transcrito	Herança	herdado
<i>SLC2A1</i>	M	exoma	Chr1:43.408.964 c.46_47insTCATGCTGGCTCCTC + c.47C>T	p.(Ala15_Val16insSerCysTrpLeuLeu) + p.(Val21*)	P	A	NS	0	ENST00000426263	AD	de novo
<i>SLC35A2</i>	F	genoma	ChrX:48.767.245 GTACATATCCCTA>G c.193_204del	p.(Tyr65_Leu68del)	P	A	Del IF	0	ENST00000616181	XD	de novo
<i>SLC9A6</i>	M	exoma	ChrX:135.084.319 ACTT>A c.847_849delCTT	p.(Leu283del)	LP	A	Del IF	0	ENST00000370695	XR	de novo
<i>SMC1A</i>	F	exoma	ChrX:53.440.214 C>A c.583G>T	p.(Glu195*)	LP	P 804009	NS	0	ENST00000322213	XD	de novo
<i>SON</i>	M	exoma	Chr21:34.921.904 GAAAAG>G c.371_375delAAAAAG	p.(Glu124Glyfs*5)	LP	A	FS	0	ENST00000356577	AD	NT
<i>STX1B</i>	F	exoma	Chr16:31.004.549 TCAA>T c.686_688delTTG	p.(Ile229_Asp230delinsAsn)	LP	A	Del IF	0	ENST00000215095	AD	de novo
<i>STXBPI</i>	F	exoma	Chr9:130.422.330 G>T c.268G>T	p.(Asp90Tyr)	LP	A	MS	0	ENST00000373302	AD	de novo
<i>STXBPI</i>	M	exoma	Chr9:130.434.353 GA>A c.987delG	p.(Met330Cysfs*2)	P	A	FS	0	ENST00000373299	AD	NT
<i>STXBPI</i>	F	exoma	Chr9:130.428.506 CT>T c.725delC	p.(Pro242Leufs*6)	LP	A	FS	0	ENST00000373299	AD	NT
<i>STXBPI</i>	M	exoma	Chr9:130.425.622 C>T c.568C>T	p.(Arg190Trp)	P	P 207417	MS	0	ENST00000373302	AD	NT
<i>STXBPI</i>	F	painel	Chr9:130.438.188 C>T c.1216C>T	p.(Arg406Cys)	P	P 207431	MS	0	ENST00000373302	AD	NT
<i>STXBPI</i>	F	painel	Chr9:130.434.377 C>A c.1011C>A	p.(Tyr337*)	P	A	NS	0	ENST00000373302	AD	NT
<i>TRAPPC4</i>	F	exoma	Crh11:118.890.966 A >G c.454+3A>G homozigose	p.(?)	P	P 812649	SP	68/ 281054	ENST00000533632	AR	NT
<i>TUBB3</i>	M	exoma	Chr16:90.002.031 G>T c.1172G>T	p.(Arg391Leu)	P	P 265354	MS	0	ENST00000315491	AD	NT
<i>TUBG1</i>	M	painel	Chr17:40.765.949 C>T c.776C>T	p.(Ser259Leu)	P	P 437135	MS	0	ENST00000251413	AD	NT
<i>VAR52</i>	M	2º Exoma / releitura	Variante 1: Chr6:30.886.628 C>T c.590C>T	p.(Thr197Ile)	P	P 141427	MS	6/ 246604	ENST00000625423	AR	NT
			Variante 2: Chr6:30.889.919 CCT>C c.1414_1415delCT	p.(Leu472Valfs*100)	LP	A	FS	0			
<i>WDR45</i>	F	exoma	ChrX:48.933.022 C>T c.830+1G>A	p.(?)	P	P 265508	SP	0	ENST00000376372	XD	NT
<i>ZMIZ1</i>	M	exoma	Chr10: 81.052.083 AC>AAC c.927dupA	p.(Gln319Thrfs*18)	LP	A	FS	0	ENST00000334512	AD	NT

**Legenda:** Sexo: F = feminino; M = masculino; **Exame:** 2º exoma = novo exame realizado em laboratório diferente; Releitura exoma = reanálise do exoma 1 ou 2 anos após o resultado inicial do exoma; **ACMG:** P = patogênica; LP = provavelmente patogênica; VUS = variante de significado incerto; **ClinVar:** P = presente (Nº ID = número de identificação) ; A = ausente; **Tipo de variante:** Del IF = deleção *inframe*; FS = *frameshift*; MS = missense; NS = *nonsense*; SP = *splicing*; **Herança:** AD = autossômico dominante; AR = autossômico recessivo; XD = ligado ao X dominante; XR = ligado ao X recessivo; **Freq alélica:** Frequência Alélica determinada pelo GnomAD V2.1.1.

**Tabela 11: Descrição dos pacientes com epilepsia de origem genética segundo o gene encontrado, tipo e evolução da epilepsia, exames complementares e exame neurológico.**

GENE	OMIM gene (*)	OMIM doença (#)	Idade avaliação	Sexo	Idade início Epilepsia	Tipo Epilepsia	EED	Síndrome Epiléptica	Nº MAC	TTO NF	RM crânio	Exame neurológico	DI	TEA
<i>AHDC1</i>	615790	615829	9a	F	5a	F	S	N	5	NA	N	AGD, HIPO, DMov	N	S
<i>ALG13</i>	300776	300884	10a 5m	F	5m	C	S	SW	7	NA	N	AGD grave, HIPO, DMov, DISMF	S	S
<i>AMT</i>	238310	605899	2a 11m	F	1m	C	S	EEDIP	11	N	2	AGD grave, HIPO, DMov, BP	S	N
<i>AP3B2</i>	602166	617276	5a 4m	F	3m	C	S	SW SLG	7	S	2	AGD grave, HIPO, MI, SP, DMov	S	S
<i>ATP7A</i>	300011	309400	3a 3m	M	8m	C	S	SW SLG	3	NA	2	AGD grave, HIPO, HIPER, SP, REG	S	N
<i>ARHGEF9</i>	300429	300607	2a 4m	M	9m	F	S	N	4	NA	2	AGD, HIPO	NA	N
<i>BCL11B</i>	606558	618092	7a	M	1a 11m	C	S	N	3	NA	N	AGD, HIPO, DISM, TC	S	N
<i>CACNA1A</i>	601011	617106	6a 3m	F	2a 2m	F	S	N	4	NA	N	AGD, HIPO, ATA, REG	S	N
<i>CACNA2D2</i>	607082	618501	5a 4m	M	4m	C	S	SLG	8	S	N	AGD, HIPO, DISM, ATA	S	N
<i>CASR</i>	601199	145980	4a 5m	M	8m	F	S	N	2	NA	2	MA, HIPO, DISM	N	N
<i>CDKL5</i>	300203	300672	6a 1m	F	22d	C	S	EEDIP	10	N	N	AGD grave, HIPO, MI, DMov, SP	S	N
<i>CDKL5</i>	300203	300672	3a 8m	F	10m	C	S	N	5	NA	N	HIPO, DISM, DM	S	N
<i>CDKL5</i>	300203	300672	3a 3m	F	2m	G	S	SW	8	N	N	AGD grave, HIPO, MI, SE, SP, DMov	S	N
<i>CHD3</i>	602120	618205	7a 4m	F	2a 6m	F	S	N	8	NA	N	AGD, REG, HIPO, DM, DISM	S	S
<i>COL4A1</i>	120130	175780	12a 1m	M	4m	C	S	SLG	7	N	3	AGD grave, MI, SP, HIPER, DMov	S	S
<i>COL4A1</i>	120130	175780	6a 10m	M	8m	C	S	SW	15	S	1	AGD grave, HIPO, SP, MI	S	N
<i>CPS1</i>	608307	237300	4a 1m	F	10d	F	S	N	4	NA	3	AGD grave, MI, SP, HIPER, DMov	S	N
<i>CYFIP2</i>	606323	618008	3a 3m	M	25d	C	S	EEDIP SLG	11	NA	3	AGD grave, REG, HIPO, SP	S	N



GENE	OMIM gene (*)	OMIM doença (#)	Idade avaliação	Sexo	Idade início Epilepsia	Tipo Epilepsia	EED	Síndrome Epiléptica	Nº MAC	TTO NF	RM crânio	Exame neurológico	DI	TEA
<i>DNMI</i>	602377	616346	8a 3m	M	2a 3m	F	S	N	3	NA	N	AGD, HIPO, DM, DISM	S	S
<i>DYNC1H1</i>	600112	614563	1a 6m	M	8m	G	S	SW	2	NA	2	AGD grave, HIPO	NA	NA
<i>DYRK1A</i>	600855	614104	10a	M	7a 8m	F	S	N	3	NA	N	AGD, MI, TC	S	S
<i>ECHS1</i>	602292	616277	11a 3m	M	2a	F	S	N	4	NA	3	AGD grave, MI, DM, HIPO, DMov, SP, SE	S	N
<i>EP300</i>	602700	613684	6a 3m	M	4a 2m	G	S	N	5	NA	N	AGD, HIPO, MI, DISM	N	S
<i>GRIN1</i>	138249	614254	8a 1m	M	19m	F	S	N	3	NA	N	HIPO, MA	S	S
<i>GRIN2A</i>	138253	245570	13a 6m	M	6a 9m	F	S	EALCTa	5	NA	N	AGD, HIPO, ATA, DMov	S	S
<i>GRIN2B</i>	138252	613970	8a 2m	M	3a 4 m	F	S	EEDPOS	2	NA	2	AGD, HIPO	S	S
<i>HCN1</i>	602780	615871	11m	F	2m	F	S	N	9	N	N	AGD, HIPO, SP, DISM	NA	NA
<i>KCNA2</i>	176262	616366	4a	M	1m	F	S	N	3	NA	N	AGD, HIPO, DMov	S	N
<i>KCNA2</i>	176262	-	5a 1m	M	1a 5m	F	S	N	1	NA	N	AGD, MA, HIPO	N	N
<i>KCNQ2</i>	602235	613720	4a	M	3m	F	S	N	9	NA	3	AGD, MI, SP, SE	S	N
<i>KCNQ2</i>	602235	613720	6a 2m	M	17d	F	S	ENAL EEDPOS	5	NA	N	N	S	N
<i>KCNQ2</i>	602235	613720	9m	M	3d	C	S	SW	10	N	2	AGD grave, HIPO, SP	NA	NA
<i>KCNQ2</i>	602235	613720	1a	F	1d	G	S	EEDIP	8	NA	N	AGD grave, HIPO, MI	NA	NA
<i>KCNQ2</i>	602235	613720	5m	M	2d	F	S	N	3	NA	2	AGD, HIPO, DMov	NA	NA
<i>KCNT1</i>	608167	614959	14a 6m	F	6m	F	S	N	13	N	N	AGD grave, REG, HIPO, DMov, SP, SE	S	N
<i>KCNT1</i>	608167	614959	16a	F	6m	F	S	N	13	NA	N	AGD grave, HIPO, SP, DMov, ATA	S	S
<i>KCNT1</i>	608167	614959	5a	F	2d	F	S	EDMISF	13	S	N	AGD grave, HIPO, SP, MI, DMov	S	S
<i>KIF5C</i>	604593	615282	7a 5m	M	3m	C	S	N	12	NA	1	AGD grave, REG, HIPO, SP	S	S
<i>MEF2C</i>	600662	613443	3a 6m	F	2a 11m	F	S	N	1	NA	N	AGD, HIPO, ATA, DISM	S	S

GENE	OMIM gene (*)	OMIM doença (#)	Idade avaliação	Sexo	Idade início Epilepsia	Tipo Epilepsia	EED	Síndrome Epiléptica	Nº MAC	TTO NF	RM crânio	Exame neurológico	DI	TEA
<i>NEXMIF</i>	300524	300912	5a	M	4a	C	S	EEDPOS	5	NA	2	AGD, HIPO, DMov, TC	S	S
<i>PCDH19</i>	300460	300088	5a 7m	F	1a 3m	F	S	N	5	NA	1	DMov, Atraso ling	N	S
<i>PCDH19</i>	300460	300088	7a	F	1a 4m	F	S	N	6	NA	N	AGD, HIPO, ATA	S	S
<i>PCDH19</i>	300460	300088	9a 1m	F	11m	C	S	N	10	N	N	AGD, ATA, DMov	S	S
<i>PDHA1</i>	300502	312170	15a	F	4a	C	S	N	5	S	N	AGD, REG, MI, DISM, HIPO, SC, SE	S	N
<i>PRRT2</i>	614386	605751	11a	F	9a	F	N	EALCT	3	NA	N	N	N	N
<i>PURA</i>	600473	616158	15a 3m	F	12a	G	S	SLG	10	S	N	AGD grave, REG, MI, SP, SE, DMov	S	S
<i>QARS1</i>	603727	615760	2a	M	7m	F	S	N	7	N	N	AGD, REG, HIPO, MI	N	N
<i>RARS2</i>	611524	611523	3a 5m	F	6m	C	S	SW SLG	13	S	3	AGD grave, REG, HIPO, SC, SP, MI, DMov	S	S
<i>RARS2</i>	611524	611523	5a 3m	M	2m	C	S	SW SLG	7	S	3	AGD grave, HIPO, MI, SE, DMov	S	S
<i>SATB1</i>	602075	619228	6a	F	3m	C	S	SLG	5	NA	N	AGD grave, HIPO, MI, DISM, SP, DMov	S	S
<i>SCN2A</i>	182390	613721	7a	M	3m	C	S	SW	6	NA	2	AGD, HIPO, SP	S	N
<i>SCN8A</i>	600702	614558	14 a	M	5m	C	S	EEDPOS SLG	9	S	2	AGD, TC, DMov	S	S
<i>SCN8A</i>	600702	614558	1a 11m	M	4m	F	S	N	4	NA	N	HIPO, Atraso ling	NA	N
<i>SCN8A</i>	600702	614558	1a 7m	M	3m	F	S	N	10	NA	N	AGD grave, HIPO, ATA	NA	NA
<i>SCN8A</i>	600702	614558	9a	M	6m	F	S	N	13	N	N	AGD grave, MI, HIPO, ATA, DM	S	S
<i>SCN8A</i>	600702	614558	14a 3m	F	4m	C	S	SW SLG	10	S	N	AGD grave, MI, HIPO, DMov, SP	S	S
<i>SCN8A</i>	600702	614558	10m	F	3m	G	S	SW	6	N	2	AGD grave, HIPO, SP, DMov	NA	NA
<i>SLC2A1</i>	138140	612126	13a	M	1a 10m	F	S	N	4	S	2	AGD, HIPO, SC	S	N
<i>SLC35A2</i>	314375	300896	10a 6m	F	2m	C	S	EEDIP SW	14	N	2	AGD grave, HIPO, DISM, SP	S	N
<i>SLC9A6</i>	300231	300243	7a 6m	M	1a 9m	C	S	N	5	NA	2	AGD, REG, HIPO, TC, ATA, DMov, DISM	S	S
<i>SMCIA</i>	300040	301044	5a	F	1a	C	S	SLG	12	S	N	AGD grave, REG, HIPO, ATA, DISM	S	N

GENE	OMIM gene (*)	OMIM doença (#)	Idade avaliação	Sexo	Idade início Epilepsia	Tipo Epilepsia	EED	Síndrome Epiléptica	Nº MAC	TTO NF	RM crânio	Exame neurológico	DI	TEA
<i>SON</i>	182465	617140	13a 4m	M	9a	F	S	N	4	NA	1	AGD, HIPO, SP, DMov	S	S
<i>STX1B</i>	601485	616172	11a 5m	F	1a 4m	F	S	EMA	5	NA	N	AGD, HIPO, SC	S	N
<i>STXBPI</i>	602926	612164	18a	F	2m	F	S	N	10	NA	N	AGD grave, HIPO, DMov, SC, SP, SE	S	S
<i>STXBPI</i>	602926	612164	6a 4m	M	3m	C	S	EEDIP SW	8	NA	2	AGD, HIPO, SP, DMov	S	S
<i>STXBPI</i>	602926	612164	13a 6m	F	2m	C	S	SW	6	S	2	AGD grave, HIPO, ATA	S	S
<i>STXBPI</i>	602926	612164	6a 2m	M	3m	F	S	N	3	NA	N	AGD, HIPO, DMov, TC	S	S
<i>STXBPI</i>	602926	612164	8a 9m	F	1m	C	S	EEDIP	5	NA	2	AGD, HIPO, DMov	S	S
<i>STXBPI</i>	602926	612164	3a 7m	F	20 d	C	S	EEDIP	7	NA	N	AGD, HIPO, ATA, DMov	S	S
<i>TRAPPC4</i>	610971	618741	4a 3m	F	3a 8m	D	S	N	4	NA	3	AGD grave, REG, MI, SP, SE, DMov	S	N
<i>TUBB3</i>	602661	614039	7a 11m	M	8m	C	S	EDMISF SLG	11	S	2	AGD grave, HIPO, MI, SP, DMov	S	S
<i>TUBG1</i>	191135	615412	2a 2m	M	3m	C	S	N	7	NA	1	AGD grave, MI, HIPER, SP	S	N
<i>VARS2</i>	612802	615917	2a 9m (óbito)	M	5m	G	S	SW SLG	8	S	3	AGD grave, REG, MI, HIPER, SP, SE, DMov	NA	NA
<i>WRD45</i>	300526	300894	7a	F	2a 2m	C	S	N	2	NA	3	N, atraso motor fino	S	N
<i>ZMIZ1</i>	607159	618659	14a 1m	M	5a	F	N	N	3	NA	2	HIPO, DISM	N	N

**Legenda:** OMIM (#): *Online Mendelian Inheritance In Man* – número do fenótipo); OMIM (\*): *Online Mendelian Inheritance In Man* – número do gene); **Tipo de Epilepsia:** C = combinada, F = focal, G = generalizada, D = desconhecida; **Síndrome Epiléptica:** EALCT = Epilepsia autolimitada centrottemporal, EALCTa = Epilepsia autolimitada centrottemporal atípica, EEDIP = Encefalopatia Epiléptica e do Desenvolvimento infantil precoce, EEDPOS = Encefalopatia Epiléptica e do Desenvolvimento ou Encefalopatia Epiléptica com ponta-onda no sono; EDMIFS = Epilepsia da infância com crises focais migratórias, EMA = Epilepsia mioclônica-atônica, ENAL = Epilepsia neonatal autolimitada, SW = Síndrome de West; SLG = Síndrome de Lennox-Gastaut. **MAC** = medicação anticrise; **TTO NF = tratamento não farmacológico eficaz:** S = sim, com resposta; N = não, sem resposta, NA = não se aplica, não foi realizado. **RM crânio:** N = normal, 1 = malformação do SNC; 2 = alterações inespecíficas; 3 = alterações específicas. **Exame neurológico:** informações mais relevantes do exame neurológico; AGD = atraso global do desenvolvimento; ATA = ataxia; DISM = dismorfismos; TC = transtorno do comportamento; DMov = desordem do movimento; HIPO = hipotonia; HIPER = hipertonia, SC = síndrome cerebelar; SP = síndrome piramidal; SE = síndrome extrapiramidal; MI = microcefalia; MA = macrocefalia; N = normal, REG = regressão do desenvolvimento. **DI** = Deficiência Intelectual; **TEA** = transtorno do espectro autista; NA = não se aplica; S = sim; N = não.

Os 53 genes relacionados a epilepsia de origem genética foram classificados, de acordo com a sua função ou topografia neuronal, em quatro grupos principais.

1º grupo: genes que codificam proteínas relacionadas à função das membranas. Estes totalizam 15 genes (observados em 27 pacientes). Dentre eles, verificam-se: 7 genes (19 pacientes) que sintetizam canais iônicos voltagem-dependentes [*CACNA1A*, *CACNA2D2*, *KCNA2* (2), *KCNQ2* (5), *KCNT1* (3), *SCN2A*, *SCN8A* (6)]; 4 genes (4 pacientes) associados a canais iônicos regulados por ligantes (*HCNI*, *GRIN1*, *GRIN2A*, *GRIN2B*); e 4 genes (4 pacientes) relacionados a proteínas de transporte transmembrana (*ATP7A*, *SLC2A1*, *SLC9A6*, *SLC35A2*) (tabela 12).

2º grupo: genes que codificam proteínas localizadas no citoplasma. Estes totalizam 23 genes (observados em 36 pacientes). Dentre eles, verificam-se: 7 genes (9 pacientes) implicados na regulação de vias celulares (*ARHGEF9*, *CASR*, *CDKL5* (3), *CYFIP2*, *DYRK1A*, *NESMIF*, *WDR45*); 6 genes (8 pacientes) associados a alteração da adesão celular e citoesqueleto (*DNMI*, *DYNC1H1*, *KIF5C*, *PCDH19* (3), *TUBB3*, *TUBG1*); 5 genes (10 pacientes) relacionados a estrutura sináptica (*AP3B2*, *PRRT2*, *STXBP1* (6), *STX1B*, *TRAPPC4*); 8 genes (9 pacientes) pertinentes ao aparecimento de doenças metabólicas ou de erros inatos de metabolismo (*ALG13*, *AMT*, *CPS1*, *ECHS1*, *PDHA1*, *QARS1*, *RARS2* (2), *VARA2*) (tabela 13).

3º grupo: genes que codificam proteínas com função localizada principalmente no núcleo. Estes perfazem 10 (10 pacientes). Dentre eles, observam-se: 4 genes (4 pacientes) relacionados a modificação da estrutura da cromatina (*BCL11*, *HCD3*, *EP300*, *MEF2C*); 2 genes (2 pacientes) associados a fatores de transcrição (*SATB1*, *ZMIZ1*); 4 genes (4 pacientes) relacionados ao processamento de ácidos nucleicos (*AHCD1*, *PURA*, *SMC1A*, *SON*) (tabela 14).

4º grupo: gene que codifica proteína localizada na matriz extracelular. Neste grupo, há apenas 1 gene (2 pacientes) (*COL4A1*) (tabela 15).

**Tabela 12:** Número de pacientes identificados com variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas em genes que codificam proteínas transmembrana, subdivididos segundo classificação funcional.

Gene	OMIM (*)	pLI	OMIM (#)	Fenótipo OMIM	Nº pacientes
<b>Canais iônicos voltagem-dependentes (N=19)</b>					
<i>CACNA1A</i>	601011	1	617106	EED 42	1
<i>CACNA2D2</i>	607082	NA	618501	Atrofia cerebelar, epilepsia e atraso global variável	1
<i>KCNA2</i>	600397	0,91	616056	EED 26	1
<i>KCNA2</i>	600397	0,91	ND	ND	1
<i>KCNQ2</i>	602235	1	613720	EED 7	5
<i>KCNT1</i>	608167	0	614959	EED 14	3
<i>SCN2A</i>	182390	1	613721	EED 11	1
<i>SCN8A</i>	600702	1	614558	EED 13	6
<b>Canais iônicos regulados por ligantes (N=4)</b>					
<i>HCN1</i>	602780	1	615871	EED 24	1
<i>GRIN1</i>	138249	0,98	614254	ADNPM com ou sem movimentos hipercinéticos e crises epiléticas, AD	1
<i>GRIN2A</i>	138253	1	245570	Epilepsia focal com atraso na fala, com ou sem DI	1
<i>GRIN2B</i>	138252	1	613970	DI AD 6, com ou sem epilepsia	1
<b>Proteínas de Transporte transmembrana (N=4)</b>					
<i>ATP7A</i>	300011	1	309400	Síndrome de Menkes	1
<i>SLC2A1</i>	138140	0,99	614847	Deficiência de Glut-1 (Doença de De Vivo)	1
<i>SLC9A6</i>	300231	1	300243	Síndrome ligada ao X com RM, tipo Christianson com epilepsia	1
<i>SLC35A2</i>	314375	0,72	300896	CDG tipo IIm	1

Legenda: AD: Autossômica dominante, ADNPM: Atraso de desenvolvimento neuropsicomotor; CDG: Desordem Congênita da Glicosilação; EED: Encefalopatia Epilética e do Desenvolvimento; DI: deficiência intelectual; pLI: *probability of being loss-of-function intolerant* (probabilidade de que a célula tolere ou não a perda de função de um gene específico); OMIM (#): *Online Mendelian Inheritance In Man* – número do fenótipo); OMIM (\*): *Online Mendelian Inheritance In Man* – número do gene); NA – não se aplica; ND – fenótipo não descrito pelo OMIM; RM – retardo mental.

**Tabela 13:** Número de pacientes identificados com variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas em genes que codificam proteínas localizadas no citoplasma, separados segundo sua função.

Gene	OMIM (*)	pLI	OMIM (#)	Fenótipo OMIM	Nº pacientes
<b>Regulação de vias celulares (N=9)</b>					
<i>ARHGEF9</i>	300429	1	300607	EED 8	1
<i>CASR</i>	601199	0,05	612899	Epilepsia generalizada idiopática, tipo 8	1
<i>CDKL5</i>	300203	1	300672	EED 2	3
<i>CYFIP2</i>	606323	1	618008	EED 65	1
<i>DYRK1A</i>	600855	1	614104	Deficiência Intelectual AD, 7	1
<i>NEXMIF</i>	300524	1	300912	DI ligado ao X, 98	1
<i>WDR45</i>	300526	0,99	300894	NBIA5	1
<b>Adesão celular e citoesqueleto (N=8)</b>					
<i>DNM1</i>	602780	1	616346	EED 31	1
<i>DYNC1H1</i>	600112	1	614563	Deficiência Intelectual AD 13	1
<i>KIF5C</i>	604593	1	615282	Displasia cortical complexa com outras malformações 2	1
<i>PCDH19</i>	300460	1	300088	EED 9	3
<i>TUBB3</i>	602661	0,97	614039	Displasia cortical complexa e MFC 1	1
<i>TUBG1</i>	191135	0,13	615412	Displasia cortical complexa e MFC 4	1
<b>Estrutura sináptica (N=10)</b>					
<i>AP3B2</i>	602166	NA	617276	EED 48	1
<i>PRRT2</i>	614386	0,58	605751	Epilepsia infantil benigna, 2	1
<i>STXBP1</i>	612164	1	612164	EED 4	6
<i>STX1B</i>	601485	0,99	616172	Epilepsia generalizada com convulsão febril, tipo 9	1
<i>TRAPPC4</i>	610971	NA	618741	DN, com epilepsia, espasticidade e atrofia cerebral	1
<b>Erros inatos do metabolismo (N=9)</b>					
<i>ALG13</i>	300776	1	300884	EED 36	1
<i>AMT</i>	238310	NA	605899	Encefalopatia por glicina	1
<i>CPS1</i>	608307	NA	237300	Deficiência de Carbamilfosfato sintetase I	1
<i>ECHS1</i>	602292	NA	616277	Deficiência de Enoil-CoA hidratase I de cadeia curta mitocondrial	1
<i>PDHA1</i>	300502	1	312179	Deficiência de piruvato desidrogenase E1 alfa	1
<i>QARS1</i>	603727	NA	615760	Microcefalia progressiva, epilepsia, atrofia cerebral e cerebelar	1
<i>RARS2</i>	611524	NA	611523	Hipoplasia pontocerebelar tipo 6	2
<i>VARs2</i>	612802	NA	615917	Deficiência da fosforilação oxidativa combinada 20	1

Legenda: EED: Encefalopatia Epiléptica e do desenvolvimento; DN: desordem do neurodesenvolvimento; pLI: *probability of being loss-of-function intolerant* (probabilidade de que a célula tolere ou não a perda de função de um gene específico); OMIM (#): *Online Mendelian Inheritance In Man* – número do fenótipo); OMIM (\*): *Online Mendelian Inheritance In Man* – número do gene); NA: Não se aplica; NBIA5 – *Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation 5* (neurodegeneração com acúmulo de ferro 5)

**Tabela 14:** Número de pacientes identificados com variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas em genes que codificam proteínas localizadas principalmente no núcleo e que estão envolvidos em modificação da estrutura da cromatina, em fatores de transcrição ou no processamento de ácidos nucleicos.

Gene	OMIM (*)	pLI	OMIM (#)	Fenótipo OMIM	Nº pacientes
<b>Modificadores da estrutura da cromatina (N=4)</b>					
<i>BCL11B</i>	606558	0,99	618092	DI, dismorfismos, atraso de linguagem e anormalidades de células T	1
<i>CHD3</i>	602120	1	618205	Síndrome Snijders Blok-Campeau	1
<i>EP300</i>	602700	1	613684	Síndrome de Rubinstein-Taybi 2	1
<i>MEF2C</i>	600662	0,02	613443	ADNPM com hipotonia, estereotipias de mão e prejuízo de linguagem	1
<b>Fatores de transcrição (N=2)</b>					
<i>SATB1</i>	602075	0,99	619228	DN com fâcies dismórfica e anomalia dentária	1
<i>ZMIZ1</i>	607159	1	618659	DN com fâcies dismórfica e anomalias esqueléticas distais	1
<b>Processamento de ácidos nucleicos (N=4)</b>					
<i>AHDC1</i>	615790	1	615829	Síndrome Xia-Gibbs	1
<i>PURA</i>	600473	0,94	616158	EED relacionado PURA	1
<i>SMC1A</i>	300040	1	301044	EED 85	1
<i>SON</i>	182465	1	617140	Síndrome ZTTK	1

Legenda: EED: Encefalopatia Epiléptica e do Desenvolvimento; DN: desordem do neurodesenvolvimento; pLI: *probability of being loss-of-function intolerant* (probabilidade de que a célula tolere ou não a perda de função de um gene específico); OMIM (#): *Online Mendelian Inheritance In Man* – número do fenótipo); OMIM (\*): *Online Mendelian Inheritance In Man* – número do gene); Síndrome ZTTK – Síndrome Zhu-Tokita-Takenouchi-Kim.

**Tabela 15:** Número de pacientes identificados com variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas em genes envolvidos na matriz extracelular.

Gene	OMIM (*)	pLI	OMIM (#)	Fenótipo OMIM	Nº pacientes
<i>COL4A1</i>	120130	1	175780	Porencefalia familiar AD	2

Legenda: pLI: *probability of being loss-of-function intolerant* (probabilidade de que a célula tolere ou não a perda de função de um gene específico); OMIM (#): *Online Mendelian Inheritance In Man* – número do fenótipo); OMIM (\*): *Online Mendelian Inheritance In Man* – número do gene).

Em relação aos genes relacionados com a evolução de uma síndrome epiléptica específica, 16 pacientes atendiam a critérios associados a Síndrome de West, relacionada a 13 genes: *ALG13*, *AP3B2*, *ATP7A*, *CDKL5*, *COL4A1*, *DYNC1H1*, *KCNQ2*, *RARS2*, *SCN2A*, *SCN8A*, *SLC35A2*, *STXBPI* e *VAR2*. Já 14 pacientes tiveram em algum momento o diagnóstico de Síndrome de Lennox-Gastaut associado

aos seguintes 12 genes: *AP3B2*, *ATP7A*, *CACNA2D2*, *COL4A1*, *CYFIP2*, *PURA*, *RARS2*, *SMC1A*, *SCN8A*, *SATB1*, *TUBB3* e *VAR2*. A epilepsia da infância com crises focais migratórias (EDMISF) foi descrita em 2 pacientes, com variantes em 2 genes: o *KCNT1* e *TUBB3*. Encefalopatia Epiléptica e do Desenvolvimento com ponta-onda no sono (EEDPOS) foi evidente em 4 pacientes, estando associada aos seguintes genes: *GRIN2B*, *KCNQ2*, *NEXMIF* e *SCN8A*. Epilepsia Mioclônica Atônica (EMA) foi relacionada ao *STX1B*, Epilepsia Autolimitada Centrottemporal (EALCT) foi associada ao *PRRT2* e Epilepsia Autolimitada Centrottemporal Atípica (EALCTa) foi descrita no *GRIN2A* (tabela 16).

**Tabela 16:** Genes encontrados na amostra associados a síndromes epilépticas específicas.

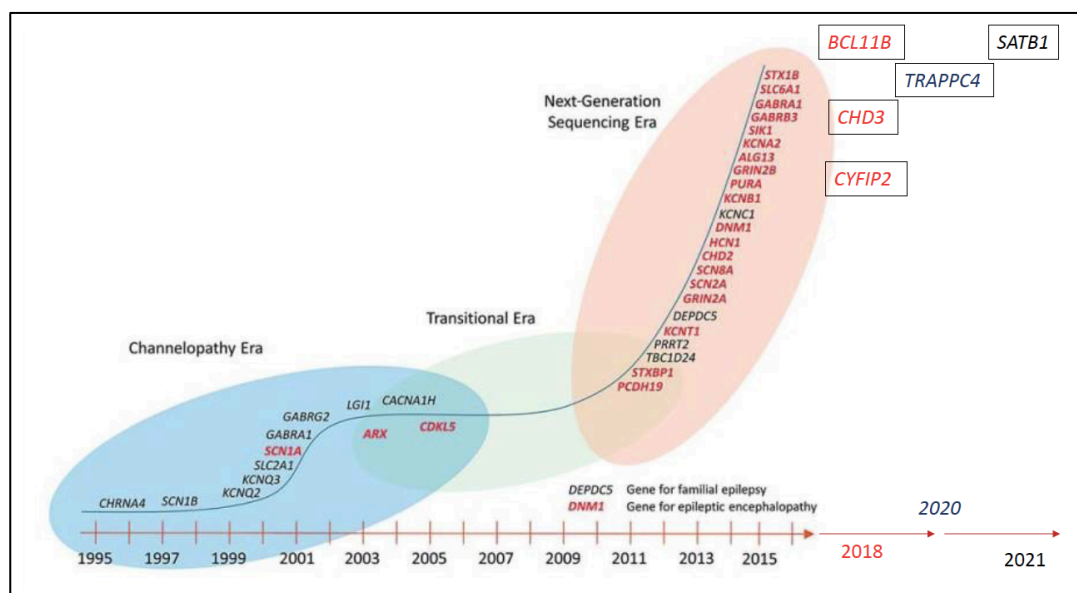
Síndromes Epilépticas	Genes relacionados	
Síndrome de West	<i>ALG13</i> , <i>AP3B2</i> , <i>APT7A</i> , <i>CDKL5</i> , <i>COL4A1</i> , <i>DYNCH1</i> , <i>KCNQ2</i> , <i>RARS2</i> (2), <i>SCN2A</i> , <i>SCN8A</i> (2), <i>SLC35A2</i> , <i>STXBP1</i> (2), <i>VAR2</i>	
Síndrome de Lennox-Gastaut	<i>AP3B2</i> , <i>APT7A</i> , <i>CACNA2D2</i> , <i>COL4A1</i> , <i>CYFIP2</i> , <i>PURA</i> , <i>RARS2</i> (2), <i>SMC1A</i> , <i>SCN8A</i> (2), <i>SATB1</i> , <i>TUBB3</i> , <i>VAR2</i>	
Encefalopatia Epiléptica e do desenvolvimento Infantil Precoce	Epilepsia Mioclônica Precoce <i>AMT</i> , <i>CDKL5</i>	Síndrome de Ohtahara <i>CYFIP2</i> , <i>KCNQ2</i> , <i>SLC35A2</i> , <i>STXBP1</i> (3)
Epilepsia infância crises focais migratórias	<i>KCNT1</i> , <i>TUBB3</i>	
EED com ponta-onda no sono	<i>GRIN2B</i> , <i>KCNQ2</i> , <i>NEXMIF</i> , <i>SCN8A</i>	
Epilepsia Mioclônica Atônica	<i>STX1B</i>	
Epilepsia autolimitada centrottemporal	<i>PRRT2</i>	
Epilepsia autolimitada centrottemporal atípica	<i>GRIN2A</i>	
Epilepsia Neonatal Autolimitada	<i>KCNQ2</i>	

Legenda: número dos pacientes entre parêntese.



## 7 Discussão

Graças a avanços tecnológicos e a uma maior disponibilidade para realização do sequenciamento de nova geração, o campo da epilepsia genética vem atravessando uma mudança de paradigma. Como resultado, temos testemunhado um progresso substancial na identificação de genes, principalmente aqueles relacionados à EED e/ou a atraso do neurodesenvolvimento<sup>73,176</sup>. A era da “canalopatia”, que atribuía alterações em canais iônicos a epilepsia de origem genética, foi substituída pela era do “sequenciamento de nova geração”. Essa mudança gerou um aumento exponencial na identificação de genes relacionados à epilepsia, sendo os genes de canais iônicos uma minoria do total<sup>73</sup>. A cada ano, muitos genes são associados a atraso do neurodesenvolvimento e/ou epilepsia, com diferentes mecanismos fisiopatológicos. Durante a nossa pesquisa, iniciada em 2018, pelo menos 5 novos genes relacionados à epilepsia foram identificados (Figura 19)<sup>176</sup>.



**Figura 19:** Linha do tempo da descoberta dos genes relacionados a epilepsia e a descrição de novos genes relacionados na amostra. Retirado e adaptado da Fonte: Helbig e col. (2016)<sup>176</sup>.

Embora não seja objetivo deste estudo determinar a incidência ou prevalência da epilepsia de origem genética no estado do Rio de Janeiro, é interessante observar que os genes mais frequentemente encontrados na nossa amostra foram: genes com herança AD: *SCN8A* (8%), *STXBPI* (8%), *KCNQ2* (6,6%), *KCNT1*(4%); ligada ao XD: *CDKL5* (4%); *PCDH19* (4%); e AR: *RARS2* (2,6%).

A incidência populacional das epilepsias genéticas permanece desconhecida, e alguns estudos recentes buscam determinar a incidência de epilepsia monogênica<sup>177,178</sup>. Symonds e col. (2019), ao investigarem crianças epiléticas escocesas com início das crises antes dos 3 anos de idade, verificaram diagnóstico genético em 24%<sup>178</sup>. A incidência anual global estimada de epilepsia ocasionada por um único gene foi de 1/2.120 nascidos vivos (47,2/100.000). O *PRRT2* foi o gene mais comum, com incidência de 1/9.970 nascidos vivos, seguido por *SCN1A*, *KCNQ2* e *SLC2A1*<sup>178</sup>. Este estudo associa a presença do diagnóstico genético ao fato de o início das crises ocorrer antes dos 6 meses de vida e à presença de crises focais afebris (após exclusão de causas metabólicas e estruturais). O gene mais frequente em pacientes epiléticos abaixo de 6 meses de vida foi o *KCNQ2*; já o gene mais frequente em crises afebris em menores de 12 meses o *PRRT2*. Por fim, se analisado EME febril ou afebril, o gene que se revela o mais prevalente é o *SCN1A*<sup>178</sup>.

Lindy e col. (2018), ao analisarem 8.500 pacientes com epilepsia e distúrbios do neurodesenvolvimento usando painel com 70 genes (NGS) e/ou *array*, identificaram uma etiologia genética em 15,4% dos pacientes, com média de idade do diagnóstico molecular de 6 anos, sendo a maioria das variantes descobertas por NGS (90,9%)<sup>177</sup>. Os genes *SCN1A* e *KCNQ2* foram os mais frequentes, com 24,8% e 13,2% dos casos positivos, respectivamente. Quando analisado o contexto de herança, o *CDKL5* foi o gene mais frequente ligado ao X e o *TPPI1* quando AR<sup>177</sup>. Symonds e

McTague (2020) pesquisaram na literatura coortes de pacientes com epilepsia e encontraram 24 artigos em que se relatou a utilização do NGS para o diagnóstico da epilepsia de origem genética<sup>73</sup>. No conjunto desses 24 estudos, foi relatada uma frequência de 17% de resultados positivos; além disso, os genes implicados em mais de 50% dos resultados positivos foram *SCN1A*, *KCNQ2*, *CDKL5*, *SCN2A*, *STXBPI* e *PCDH19*<sup>73</sup>.

O nosso estudo é descritivo, com uma amostra por conveniência no estado do Rio de Janeiro. Por conta disso, ele apresenta peculiaridades, como a exclusão de pacientes que apresentam os fenótipos clínicos conhecidos como Síndrome de Dravet (*SCN1A*), Síndrome de Rett (*MECP2*) e Esclerose Tuberosa (*TSC1*, *TSC2*). A justificativa para tal conduta reside na necessidade de enfatizar a importância do NGS em pacientes com epilepsia de origem genética sem um fenótipo provável. Ao mesmo tempo, porém, a comparação com outros trabalhos sobre incidência e prevalência fica comprometida por questões metodológicas.

O nosso estudo observou uma frequência discretamente mais alta para o sexo masculino (53,3%); esse dado, porém, tem se mostrado não relevante na literatura, pelo fato de os estudos oscilarem segundo a amostra estudada<sup>62,73</sup>. Quando analisados os pacientes com padrão de herança ligada ao X, notamos uma frequência feminina maior que a masculina, em particular nos pacientes com variantes em XD. Isso pode ser explicado (i) pelo fato de que as variantes patogênicas ligadas ao X em embriões masculinos talvez sejam letais ou (ii) pelo fato de que as mutações de ponto talvez ocorram com maior frequência na meiose masculina, levando a uma maior ocorrência dessas condições em pessoas do sexo feminino. Adicionalmente, nos embriões femininos heterozigotos a inativação aleatória do cromossomo X pode levar a uma atenuação dos sintomas<sup>64</sup>.

O principal tipo de NGS realizado no nosso trabalho para confirmação diagnóstica foi o exoma (74,6%); grande parte dos estudos, contudo, realizam painéis de epilepsia, com um número variável de genes<sup>73,177,178</sup>. Fernández e col. (2019) avaliaram a relação custo-efetividade entre *array*, painel e exoma; nessa análise, os dois últimos mais econômicos e o exoma foi tido como aquele com melhor rendimento diagnóstico<sup>179</sup>. Symonds e McTague (2020) demonstraram resultados semelhantes, isto é, um rendimento mais elevado em painéis (com um número maior de genes) e exomas<sup>73</sup>.

No nosso estudo, a testagem dos pais foi realizada em metade da amostra (49,3%). Verificou-se que 33 pacientes possuem variantes *de novo* (dentre os 37 testados). As principais variantes *de novo* estão relacionadas a herança AD (26/33, ou 78,8%), seguidas pelas variantes ligadas ao X (7/33, ou 21,2%). O teste de trio pode ajudar a avaliar a patogenicidade de uma variante e o risco de recorrência para a família. A maioria das variantes causadoras das epilepsias graves são *de novo*, com um risco de recorrência de aproximadamente 1%, levando-se em consideração a possibilidade de mosaicismo gonadal. No entanto, há na literatura a sugestão de que esse risco pode ser ainda mais elevado devido ao mosaicismo somático parental, mesmo quando os pais não são afetados<sup>49,73</sup>. No nosso estudo, no que se refere aos pacientes com variantes em genes de padrão AR, aqueles em homozigose (4/10) não realizaram teste de trio, uma vez que essa análise não iria auxiliar na reclassificação da variante. Dos 6/10 com variantes em heterozigose composta, a testagem dos pais foi realizada em 3/6, a fim de possibilitar a reclassificação das variantes em 3 pacientes, quando uma delas era uma VUS. Os outros 3/6 pacientes, que não realizaram o teste de trio, foram definidos com variantes em heterozigose presumidamente composta.

Apesar de as VUSs não estarem contempladas nos critérios de inclusão da nossa pesquisa, 3 pacientes foram mantidos no estudo pelo fato de as 5 variantes encontradas serem associadas ao fenótipo observado nos pacientes. Das 5 variantes, 4 estão relacionadas a genes com padrões AR e quadro clínico compatível, e somente 1 variante está associada a padrão AD no *KCNT1*.

Lindy e col. (2018) observaram um percentual elevado de variantes herdadas nos genes *PRRT2*, *MECP2*, *KCNQ2*, *SCN1A* e *PCDH19*<sup>177</sup>. Na nossa amostra, somente 1 paciente apresenta herança paterna *PCDH19* (XD). Dos 10 pacientes com variantes em genes de padrão AR, 4 apresentam variantes em homozigose; destes 2 têm pais sabidamente consanguíneos. A presença de consanguinidade foi evidenciada em 2 outras famílias; entretanto, a epilepsia não foi relacionada a genes de padrão AR, e sim a variantes em genes de padrão AD (*CYFIP2* e *SCN2A*).

O padrão de herança mais frequente na nossa população foi AD, uma observação que está em conformidade com a literatura<sup>177,178</sup>. Stöberg e col (2020) realizaram um estudo de base populacional em Estocolmo envolvendo 116 crianças com epilepsia iniciada antes de 2 anos de idade, a fim de avaliar a utilidade do NGS na investigação da epilepsia genética<sup>180</sup>. Tal etiologia foi descrita em 20% dos casos, sendo 17% de origem monogênica, com padrão de herança AD seguido, nessa ordem, pelos padrões AR e LX<sup>180</sup>. No nosso estudo, epilepsias de herança AD se mostraram as mais frequentes, seguidas das LX (XD =12 e XR =3) e, por último, das AR.

No nosso estudo, o tipo de variante mais frequente foi a *missense* (57,7%), seguida pelas variantes *frameshift* (17,7%), variantes em regiões de sítio de *splicing* (9,4 %), deleções *in-frame* (8,2%) e variantes *nonsense* (7%). Lindy e col. (2018) encontraram 1277 variantes tipo *missense*, *frameshift*, *nonsense* e *splicing* por ordem de frequência, e 137 variantes incluindo CNV e repetições de trinucleotídeos<sup>177</sup>.

Heyne e col. (2018) estudaram 6.753 indivíduos com ADNPM e portadores de alterações em variantes *de novo*; destes, 1.942 apresentavam epilepsia<sup>181</sup>. Neste estudo as variantes *missense* se mostraram mais fortemente associadas à presença de epilepsia do que variantes truncadas (NS, FS, SP), fato grande parte impulsionado por genes codificadores de canais iônicos. Os genes encontrados em maior frequência foram, nessa ordem, *KCNQ2*, *SCN2A* e *SCN1A* (relativamente a variantes tanto *missense* quanto truncadas). É sabido que as variantes *missense* causam epilepsia geralmente por efeito dominante negativo (por exemplo, *KCNQ2*) ou ganho de função (por exemplo, *SCN8A*). Entretanto, estudos sugerem que alterações na estrutura proteica podem desempenhar um papel maior do que a haploinsuficiência na fisiopatologia do paciente com epilepsia e atraso<sup>181</sup>.

Um tópico importante a ser avaliado é a presença do atraso global do desenvolvimento anterior ou concomitante à epilepsia. Nosso trabalho mostra que 96% dos pacientes apresentam ADNPM, além de apontar para regressão do desenvolvimento em 35% dos casos (podendo esta última acontecer de forma concomitante ou posterior ao início do atraso). O estudo Epi4K-E2 corrobora o fato de que 43% dos 49 indivíduos diagnosticados com EED apresentavam ADNPM antes do início da crise e que nem sempre existe uma distinção fenotípica evidente entre apresentar ou não EED<sup>116</sup>. Logo, os mecanismos que resultam em uma encefalopatia no curso de um paciente com ADNPM genético permanecem indescritíveis e podem ser multifatoriais, isto é, não somente relacionados à presença de epilepsia. A expansão da investigação de pacientes com epilepsia de provável etiologia genética, utilizando o NGS, proporcionou a associação de genes à epilepsia e encefalopatia, ou seja, foi possível constatar que o mesmo gene pode gerar transtornos cognitivos independentes de anormalidades epileptiformes<sup>182</sup>. A heterogeneidade fenotípica é

relatada por vários autores<sup>71,182</sup> e foi observada em nossa amostra – por exemplo, nas variantes patogênicas em *KCNQ2* e *KCNA2*.

Na nossa amostra, 5 (6,6%) pacientes apresentam MDC. No entanto, 10 genes listados no estudo já foram associados a MDC, dado que poderia ter elevado a frequência de MDC em nossa amostra para 13,3%.

Em relação à mudança de conduta, 69,3% dos médicos referiram mudança no tratamento; entretanto, quando a amostra foi analisada individualmente, verificou-se que o tratamento foi modificado, após o resultado do NGS, em 24 pacientes (32%). O principal grupo com mudança terapêutica foi o dos pacientes com variantes patogênicas em genes envolvidos com EIM (8/9).

Algumas variantes gênicas permitem uma associação genótipo-fenótipo precisa; na maioria das vezes, porém, o espectro de fenótipos associados a um determinado gene é inexplicável e não se mostra necessariamente relacionado a uma variante particular desse gene<sup>176</sup>. Isso ficou evidente na nossa amostra, visto que grande parte dos pacientes não apresentaram associação genótipo-fenótipo precisa.

Quando analisada a amostra conforme a função ou topografia neuronal do gene estabelecida nesta pesquisa (figura 10), o grupo de pacientes mais frequente foi aquele cujos genes estão associados a variantes que codificam proteínas localizadas no citoplasma (36 pacientes em 26 genes, 48% da amostra), seguido pelo grupo de pacientes relacionado a genes que produzem proteínas transmembranas (27 pacientes em 15 genes, perfazendo 36% da amostra, incluindo os canais iônicos voltagem-dependentes). Os grupos de pacientes com variantes em genes que sintetizam proteínas com função localizada principalmente no núcleo (10 pacientes em 10 genes, totalizando 13,3%) e com gene localizado na matriz extracelular (2 pacientes com 1 gene, totalizando com 2,6%) foram os menos frequentes. No entanto, se analisarmos

a amostra segundo o seu produto proteico final, observamos que o maior número de pacientes está associado a variantes em genes que codificam canais iônicos voltagem-dependentes (N=19/25,3%), seguido pelo grupo de pacientes com variantes em genes envolvidos na estrutura sináptica (N=10/13,3%) (tabela 12 e 13).

Em relação à associação entre genótipo e fenótipo nos pacientes da nossa amostra, serão enfocados os casos mais frequentes e aqueles com fenótipos não descritos, visando a abordar dados relevantes da literatura. Apresentamos a análise de acordo com a classificação dos grupos estabelecida nesta pesquisa, isto é, pela função ou topografia neuronal do gene. Iniciamos pelos genes do grupo 1 e seguimos, na ordem, com os demais grupos. É importante frisar que 50,6% da amostra apresentam variantes novas, não depositadas nos repositórios de variantes (*ClinVar*), o que prejudica a informação sobre a patologia molecular de tais variantes.

No grupo 1, 23/27 (85,1%) pacientes apresentam variantes em genes que sintetizam canais iônicos (voltagem-dependentes e regulados por ligantes), sendo o *SCN8A* o mais frequente no grupo de pacientes com variantes em canais iônicos voltagem-dependentes, conforme observado em 6/19 pacientes (31,5%). Dos 6 pacientes da amostra, todos apresentam variantes *missense*, sendo 3 já depositadas no *ClinVar* e 4 variantes *de novo*. A presença de uma síndrome epiléptica foi descrita em 50% (3/6) dos nossos pacientes, com 2 indivíduos com critérios para SW, 2 com critérios para SLG e 1 com EEDPOS. Kim e col. (2019) identificaram a SW como a síndrome epiléptica inicial mais comum nos pacientes com EED-*SCN8A*<sup>183</sup>. A idade média do diagnóstico de epilepsia da nossa amostra foi de 4 meses de idade, aproximando-se assim da descrição de Gardella e col. (2018)<sup>184</sup>, cujo estudo incluiu 22 pacientes. À luz da classificação de Johannesen e col. (2021)<sup>80</sup> em cinco fenótipos clínicos, é possível afirmar que todos apresentaram o fenótipo de EED-*SCN8A*, com



epilepsia farmacorresistente<sup>79</sup>. Das variantes encontradas no nosso trabalho, a variante p.(Arg1872Trp) resulta em GoF com prejuízo da transição do estado aberto do canal para o estado inativo, previamente descrita em pacientes com EEDIP<sup>185</sup>. A variante p.(Gly1476Ser) gera um aminoácido alterado na alça citoplasmática entre o III e IV domínios do canal de sódio, porém não há estudo funcional. A variante p.(Asn984Lys) foi descrita por Blanchard e col. (2015) em um paciente com EEDIP, e a abertura prematura da canal gera hiperatividade neuronal com GoF<sup>186</sup>.

No que se refere aos 5 pacientes com variantes *KCNQ2* descritos na nossa amostra, 4 variantes foram do tipo *missense* e 1 foi do tipo *splicing*. O paciente com a variante p.(Arg581Gly) evoluiu com ENAL, tornando-se farmacorresistente aos 5 anos (EEDPOS). Tal variante já foi associada a um fenótipo de SW<sup>187</sup> e EEDIP com EEG com surto-supressão<sup>188</sup>. O fenótipo do nosso paciente com a variante *missense* p.(Ser247Leu) foi de EEDIP (SO), já descrito por Dedek e col. (2003)<sup>189</sup>. A EEDIP foi associada, por Freibauer e col. (2018)<sup>190</sup>, a EDMISF com alteração da funcionalidade do canal na região do poro. A maioria das variantes *KCNQ2*-ENAL geram haploinsuficiência, ao passo que, em pacientes com EED-*KCNQ2*, gera-se efeito dominante negativo, causado principalmente por variantes do tipo *missense*<sup>85</sup>. As variantes c.691-2\_691-1delAG, p.(?) e p.(The234Ala), que estão ausentes do *ClinVar*, associaram-se a fenótipo de epilepsia farmacorresistente. No que tange às 3 variantes *missense* já depositadas, a situação é a seguinte: p.(Tyr280Cys) sintetiza aminoácido localizado na região do filtro de seletividade do canal de K<sup>+</sup>; p.(Ser247Leu) sintetiza aminoácido localizado na região do poro, associada a EED; p.(Arg581Gly) muda a estrutura proteica do canal no domínio C-terminal citoplasmático associada a ENAL e DI.

Dos 3 pacientes com variantes tipo *missense* no *KCNT1*, somente 1 evoluiu com o fenótipo de EDMISF [p.(Thr314Ala)]. Todos apresentavam epilepsia farmacorresistente, do tipo focal, e utilizaram pelo menos 13 MACs para o controle parcial das crises. As variantes p.(Arg398Gln) e (p.Ala934Thr), ambas patogênicas, estão associadas a 2 fenótipos descritos, a EED-14 e a EHS<sup>84</sup>. A literatura recente refere que apenas variantes *missense* e uma deleção *inframe* foram associadas a EED-*KCNT1*, indicando GoF e aumento da corrente de K<sup>+</sup>. Segundo Bonardi e col. (2021), até o momento, nenhuma variante patogênica com LoF foi descrita (no entanto, variantes truncadas já foram vistas em controles saudáveis<sup>84</sup>). No nosso paciente com EDMIFS, a medicação com melhor resposta terapêutica (redução de 80% das crises) foi o canabidiol. Essa possibilidade de tratamento já foi relatada por Borlot e col (2020)<sup>83</sup>.

Variantes *de novo* no *KCNA2* causam EED associadas a LoF e/ou GoF. Na nossa amostra a variante p.(Thr374Ala) foi associada a LoF e GoF, foi observada em uma região do poro altamente conservada e importante para seletividade do canal e apresentou o fenótipo descrito por Masnada e col. (2017)<sup>81</sup>. Döring e col. (2021) redefiniram o fenótipo e genótipo das doenças neurológicas relacionadas a *KCNA2* identificando, além de EEDIP, epilepsia autolimitada, DI, paraparesia espástica hereditária e ataxia episódica<sup>82</sup>. Nosso paciente com a variante p.(Arg309Gly), ausente no *ClinVar*, não apresentou fenótipo descrito pelo OMIM, apresentando, em vez disso, ADNPM e epilepsia autolimitada<sup>82</sup>.

Até o momento, é sabido que variantes *missense* em *SCN2A* com GoF estão associadas a epilepsia neonatal ou EEDIP, enquanto variantes *missense* com LoF ou variantes que geram proteínas truncadas estão associadas a TEA e epilepsia de início

tardio<sup>78</sup>. A variante encontrada na nossa amostra, a saber, p.(Arg1315Gly), apresentou o fenótipo clínico de EED-11 (SW), descrita no *ClinVar*.

Em relação aos pacientes com variantes em genes que sintetizam canais de cálcio, a variante p.(Arg1352Gln) no *CACNA1A* não é descrita na literatura. No entanto, já foi observado que variantes *missense* que levam à substituição da arginina no segmento S4 estão associadas a doenças mais graves<sup>87</sup>. Já a variante p.(Leu127Pro) em homozigose no *CACNA2D2*, ausente do *ClinVar*, apresentou fenótipo de EED (SLG), embora sem atrofia cerebelar, achado já referido anteriormente<sup>88,191</sup>.

As variantes na nossa amostra em genes que sintetizam canais iônicos regulados por ligantes apresentam fenótipos semelhante aos descritos na literatura. A variante *missense* p.(Trp611Leu), *de novo*, no *GRIN1*, tem um fenótipo de desordem do desenvolvimento-*GRIN1*<sup>91,192</sup>, entretanto com neuroimagem normal, não evidenciando, a malformação cortical (polimicrogiria) descrita por Fry e col. (2018)<sup>193</sup> em variantes *missense* no *GRIN1*. A variante p.(Val1444Ile) no *GRIN2A* é descrita na literatura (no entanto, sem estudos funcionais) e está associada a EALCTa<sup>93,194</sup>. A variante do tipo *frameshift* p.(Cys838Phefs\*69) no *GRIN2B* está ausente de repositórios de variantes e apresenta fenótipo compatível, estando associada a TEA e EEDPOS<sup>95</sup>. A variante p.(Ile380Phe) no *HCN1* é descrita na literatura (porém, ainda sem estudo funcional) com o fenótipo de EED-24 com EEDIP<sup>89,195</sup>.

Dentre as variantes no nosso estudo que sintetizam proteínas de transporte de membrana, a variante *nonsense* p.(Ala15\_Val16insSerCysTrpLeuLeu) + p.(Val21\*) no *SLC2A1* está ausente do *ClinVar* e apresentou fenótipo compatível com a Síndrome de Deficiência de GLUT1 de forma atípica. A epilepsia se iniciou aos 22 meses, porém o diagnóstico só pôde ser estabelecido aos 5 anos, após o NGS. Isso

provocou importante mudança terapêutica, graças à introdução da dieta cetogênica<sup>96</sup>. Klepper e col. (2020) sugerem que tipos específicos de variantes se correlacionam com a gravidade fenotípica: assim, variantes *missense* se correlacionariam com gravidade leve e moderada, variantes *splicing*, *nonsense* ou deleção de um éxon estariam associadas a clínica moderada ou grave, e microdeleções completas teriam associação com manifestações graves<sup>196</sup>. O paciente com a variante p.(Leu283del) no *SLC9A6* do tipo deleção *inframe* apresentou fenótipo compatível com a Síndrome Christianson e epilepsia farmacorresistente, sendo suposta uma função residual<sup>197</sup>. A variante p.(Tyr65\_Leu68del) no *SLC35A2* do tipo deleção *inframe*, que foi identificada pelo genoma e não está descrita no *ClinVar*, apresentou fenótipo compatível com CDG tipo II<sup>m</sup><sup>98,99</sup>, exibindo manifestações clínicas<sup>130</sup> multisistêmicas graves, EEDIP (SO evoluindo para SW) e neuroimagem com alterações de substância branca. Nog e col. (2019) descreveram pacientes com *SLC35A2*-CDG<sup>198</sup>, sendo um deles portador de uma deleção *inframe* muito semelhante à nossa [c.193\_204del; p.(Phe65\_Thr68del)] e com fenótipo análogo. A variante patogênica p.(Leu146Profs\*3) no *ATP7A*, que é do tipo *frameshift* e está ausente dos repositórios de variantes, apresentou fenótipo de SW progredindo para SLG, sem características fenotípicas iniciais que pudessem sugerir a doença de Menkes<sup>100</sup>. Variantes truncadas geram LoF com uma redução importante da sua atividade (0% a 15% da função residual) e resultam na doença de Menkes, enquanto variantes do tipo *missense* estão associadas a fenótipos mais leves<sup>199</sup>.

Em relação aos genes reunidos no grupo 2, os que produzem proteínas responsáveis pela estrutura sináptica foram os mais frequentes, tendo sido o gene *STXBPI* descrito em 6 pacientes. A Encefalopatia-*STXBPI* se verifica na maioria das variantes LoF com redução da função sináptica tanto GABAérgica quanto

glutamatérgica, resultando em hiperexcitabilidade<sup>124</sup>. As variantes encontradas em nosso estudo foram: 3 do tipo *missense*, 2 do tipo *frameshift* e 1 do tipo *nonsense*. Entre os pacientes, 4 apresentavam uma síndrome epiléptica específica (EEDIP e SW) e todos apresentavam DI e TEA, em conformidade com a literatura<sup>126</sup>. Da nossa amostra, 4 pacientes [p.(Asp90Tyr); p.(Met330Cysfs\*2); p.(Pro242Leufs\*6); p.(Arg190Trp)] participaram de um estudo multicêntrico que analisou 534 indivíduos com desordem relacionada ao *STXBPI*. O estudo descreve cinco *hotspots* genéticos com variantes recorrentes, incluindo uma das nossas variantes [p.(Arg190Trp)], sem associação genótipo-fenótipo<sup>126</sup>. Uma associação referida por Xian e col. (2022) foi que indivíduos com variantes truncadas e deleções em *STXBPI* são quase duas vezes mais propensos a apresentar SW. Dos nossos 6 pacientes, 2 com SW apresentam variantes *frameshift*<sup>200</sup>. As duas outras variantes encontradas no nosso trabalho foram as p.(Arg406Cys) e p.(Try337\*) cursando com EEDIP, sendo as variantes p.(Arg406Cys/His) as mais frequentes na descrição de Xian et col. (2022)<sup>200</sup>.

As outras variantes descritas no grupo 2 em genes que sintetizam proteínas relacionadas à estrutura sináptica apresentam fenótipo compatível, porém com algumas peculiaridades. A variante p.(Ile229\_Asp230delinsAsn) no *STX1B*, uma deleção *inframe*, é ausente do *ClinVar* e localiza-se numa região responsável pela síntese do motivo SNARE. Apresenta o fenótipo de EED-*STX1B* (EMA) resultante da haploinsuficiência de *STX1B*<sup>201</sup>. Variantes *missense* no *STX1B* localizadas no motivo SNARE são associadas a um fenótipo mais grave por efeito dominante negativo<sup>127</sup>. A variante p.(Arg217Profs\*8) no *PRRT2* do tipo *frameshift* já foi relacionada aos quatro fenótipos clínicos, e o nosso paciente possuiu EALCT<sup>202</sup>, com mecanismo de patologia molecular por LoF<sup>133</sup>. A variante p.(Leu131del) em homozigose no *AP3B2* é uma deleção *inframe*, já descrita no *ClinVar*, ainda sem

estudo funcional, e relacionada a EED-48. Em relação a essa variante, Assoum e col. (2016) sugerem um efeito de LoF<sup>132</sup> e Nahasbat e col. (2019) descreveram pacientes com SLG<sup>203</sup>. A variante c.454+3A>G; p.(?) encontrada em homozigose no *TRAPPC4* do tipo *splicing* é bem descrita na literatura, com fenótipo semelhante<sup>129</sup> e com a geração de um transcrito aberrante e sua consequente degradação pelo *NMD*<sup>130</sup>.

No grupo 2 com variantes associadas a genes que sintetizam proteínas responsáveis pela regulação de vias celulares, encontramos 3 pacientes do sexo feminino com variantes no *CDKL5* e fenótipo de Deficiência-*CDKL5*, sendo 1 do tipo *missense* e 2 *nonsense*. A variante *nonsense* p.(Arg550\*) é descrita como uma das mais frequentes e apresenta mecanismo patogênico por LoF, consequência da degradação do RNAm pela *NMD*, ou a produção de uma proteína truncada<sup>204</sup>. Kobayashi e col. (2021) relacionaram essa variante à SW, além de propor que tal síndrome epiléptica é a mais comum em pacientes com EED-*CDKL5*<sup>102</sup>. As outras 2 variantes estão ausente do *ClinVar*: a variante *nonsense* p.(Tyr188\*) está associada a EEDIP (EMP) e a variante *missense* p.(His127Asn) apresenta fenótipo menos grave. A associação genótipo-fenótipo é limitada na literatura<sup>101</sup>.

Os outros genes foram encontrados na nossa amostra com variantes gênicas associadas a síntese de proteínas relacionadas à regulação de vias celulares. A variante *frameshift* p.(Tyr267Leufs\*29) no *ARHGEF9*, ausente dos repositórios de variantes, está associada ao fenótipo de EED-8<sup>108</sup>. O paciente com variante heterozigota *missense* p.(Cys131Phe) *de novo* no *CASR* não apresenta hipocalcemia ou hipoparatiroidismo, mas somente ADNPM leve e epilepsia focal<sup>110</sup>, provavelmente por anormalidades de sinalização do cálcio afetando a excitabilidade neuronal<sup>111</sup>. O paciente com a variante *missense* p.(Arg87Cys) no *CYFIP2*, já descrita na literatura, evidencia o fenótipo de EED<sup>103</sup>, e variantes localizadas em p.Arg87 estão associadas

ao fenótipo mais grave, por prováveis efeitos de GoF na via de sinalização WAVE<sup>104</sup>. A variante *missense* p.(Phe299Ser) *de novo* no *DYRK1A* apresenta um fenótipo clássico compatível com a síndrome DYRK1A ou Retardo Mental AD 7<sup>106</sup>, com mecanismo de haploinsuficiência<sup>205</sup>. A variante *frameshift* em hemizigose p.(Ala1230Valfs\*42) *de novo* no *NEXMIF* foi evidente em um paciente do sexo masculino, com padrão de herança XD, e apresentou fenótipo compatível com encefalopatia-*NEXMIF*. A síndrome epiléptica encontrada foi de EEDPOS, diferente da EMA e da mioclonia palpebral com ausência, ambas relacionadas à encefalopatia. O mecanismo patogênico é a LoF, variando de perda total de função em machos hemizigóticos até a perda parcial da função em mulheres<sup>107</sup>. A variante do tipo *splicing* c.830+1G>A; p.(?) no *WDR45* é associada a SENDA, uma desordem neurodegenerativa. Entretanto, o paciente foi avaliado aos 2 anos de idade demonstrando ADNPM leve e epilepsia farmacossensível. A neuroimagem do paciente do estudo não demonstra acúmulo de ferro no globo pálido e na substância negra (que são achados comuns na literatura<sup>112,113</sup>), porém apresenta hipersinal nos núcleos da base e núcleo denteado

Entre os 8 pacientes do grupo 2 com variantes relacionadas aos 6 genes que sintetizam proteínas responsáveis pela adesão celular e citoesqueleto, variantes no gene *PCDH19* foram encontradas em 3 pacientes do sexo feminino com fenótipo compatível com a EED-9<sup>119</sup>. As variantes descritas foram: 1 no sítio de *splicing*, 1 *missense* e 1 *frameshift*. Somente a variante p.(Asp481Gly) é descrita nos repositórios de variantes (porém, sem estudo funcional), sendo herdada do pai. As outras duas variantes c.2848+1G>T; p.(?) e p.(Ser512\*) não foram confirmadas nos progenitores e também não são relatadas no *ClinVar*. Malformações corticais focais, já identificadas em pacientes com EED-9, foram evidentes na paciente com a variante

c.2848+1G>T; p.(?) com displasia cortical focal<sup>206,207</sup>. Mecanismos de patologia molecular estão provavelmente relacionados a LoF<sup>208</sup>, entretanto não há correlações genótipo-fenótipo estabelecidas.

O paciente com a variante *missense* heterozigótica p.(Gly38Ser) no *DNMI*, presente nos repositórios de variantes, apresenta o fenótipo compatível com EED-31<sup>117</sup>, porém não há estudo funcional da variante. A variante *missense* p.(Arg1962Cys) no *DYNC1H1*, associada ao fenótipo de Retardo Mental AD-13 e localizada no domínio motor da proteína 1 da cadeia pesada 1 citoplasmática da dineína gera LoF<sup>123,209</sup>. Tal variante foi relatada por Poirier e col. (2013) em um indivíduo com paquigiria posterior<sup>122</sup>, entretanto o nosso paciente não apresenta malformação cortical. Variantes no *KIF5C* estão correlacionadas com MCDs sutis, fenótipo encontrado no nosso paciente com a variante p.(Glu237Lys)<sup>114,115</sup>, ocasionando uma perda da capacidade de hidrolisar ATP no domínio motor e afetando a ligação dessas proteínas aos microtúbulos<sup>115</sup>.

O paciente com a variante *missense* p.(Ser259Leu) no *TUBG1*, já descrita por Poirier e col. (2013)<sup>122</sup>, apresenta epilepsia farmacorresistente e complexo agiria-paquigiria (duplo córtex), podendo estar associado a lissencefalia<sup>210</sup>. A associação genótipo-fenótipo envolve alteração na sequência primária e na estrutura terciária da proteína<sup>120</sup>. O paciente com a variante *missense* p.(Arg391Leu) no *TUBB3* evoluiu com epilepsia farmacorresistente (EDMISF e SLG). A RM de crânio não exhibe malformação cortical, demonstrando alteração na substância branca (leucopatia) e cistos na região temporal. Não há relato na literatura de associação do *TUBB3* a leucopatia; há, contudo, relato de sua associação com a displasia cortical complexa tipo 1, uma desordem de migração neuronal<sup>121</sup>.



Ainda no grupo 2, variantes patogênicas em genes mitocondriais ou localizados em outras organelas relacionadas a doenças metabólicas ou de EIM foram evidentes em 9 pacientes e se mostraram relacionadas a 8 genes nucleares. Dos 9 pacientes, 4 pacientes apresentavam variantes bialélicas em genes que sintetizam aminoacil-RNAt sintetases<sup>145</sup>. Os 2 pacientes com variantes em heterozigose composta no *RARS2* evoluíram com grave ADNPM anterior ao início da epilepsia farmacorresistente (SW/SLG), sem uma neuroimagem típica de HPC 6<sup>211</sup>. O paciente da nossa amostra com variantes em heterozigose presuntivamente composta no *VARS2* apresentava um fenótipo compatível com o defeito do Complexo I da fosforilação oxidativa (OXPHOS)<sup>151</sup>, sendo necessária a reanálise do NGS. O paciente com variantes em heterozigose composta no *QARS1* apresentou um fenótipo mais brando, com crises parcialmente controladas, já tendo sido descrito fenótipo semelhante<sup>153</sup>. A variante *missense* p.(Asn107Ser) *de novo* no *ALG13*, já referida na literatura, apresenta fenótipo compatível com o da EED-36 (CDG-ALG13)<sup>135</sup>. O paciente da amostra com variantes em heterozigose presuntivamente composta no *CPS1* apresentou um fenótipo compatível com deficiência clássica de *CPS1*, porém o diagnóstico só foi estabelecido aos 3 meses de vida. A variantes do tipo *splicing* em homozigose c.746-1G>T; p.(?) no *AMT* ocasionaram um fenótipo clássico de hiperglicemia não cetótica com EEDIP (EMP)<sup>138</sup>. Essa variante está ausente nos bancos de dados populacionais; entretanto, a variante com uma troca de nucleotídeo diferente, c.746-1G>A, é considerada patogênica por afetar o *splicing* de RNAm. O paciente com variantes *missense* em heterozigose presuntivamente composta no *ECHS1* [p.(Gly90Arg) e p.(Thr266Ala)] apresenta um fenótipo clínico semelhante á Síndrome de Leigh. As variantes *missense* são as mais frequentes e o fenótipo clínico mais grave estaria associado a um defeito secundário na fosforilação oxidativa<sup>212</sup>. A

variante *missense* p.(His44Arg) *de novo* no *PDHA1*, ausente dos repositórios de variantes, é responsável pela deficiência do complexo PDH. O fenótipo apresentado é atípico com ADNPM, microcefalia, epilepsia, síndrome cerebelar e extrapiramidal<sup>144</sup>. Após o diagnóstico, houve uma estabilização das crises, com início da dieta cetogênica e reposição de vitamina B1. No entanto, é importante citar que o dano neurológico prévio não é revertido e que esse tratamento pode não ser eficaz em pacientes graves<sup>141</sup>.

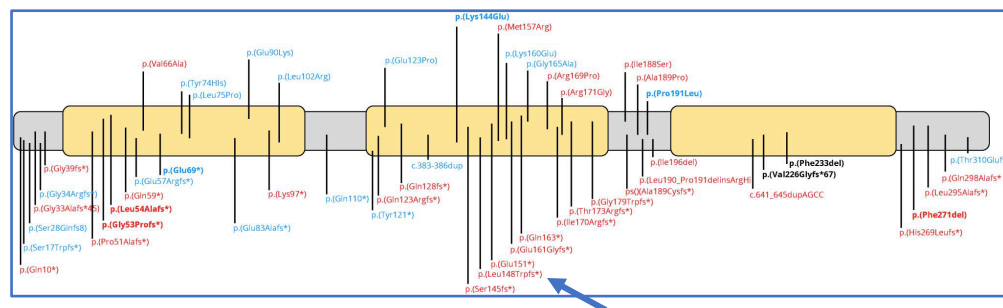
O grupo 3 inclui variantes em genes que codificam proteínas localizadas principalmente no núcleo. No subgrupo das variantes gênicas relacionadas a modificações da estrutura da cromatina, encontramos 4 pacientes. A variante *nonsense* p.(Arg218\*) no *MEF2C* ocasiona o fenótipo compatível com o transtorno do neurodesenvolvimento associado-*MEF2C*<sup>161</sup>. O mecanismo patogênico é a haploinsuficiência, e aproximadamente 80% dos pacientes desenvolvem epilepsia<sup>162,214</sup>. A variante *frameshift* p.(Lys1907Glnfs\*194) no *CHD3*, *de novo*, associada ao fenótipo da Síndrome Snijders-Blok-Campeau<sup>157</sup>, raramente está associada a epilepsia, ocorrendo em 2,8% na primeira coorte e 16,6 % na segunda coorte<sup>158</sup>. A variante do tipo *splicing* c.3875-2A>C; p.(?) no *EP300*, ausente dos repositórios de variantes, ocasiona a Síndrome de Rubinstein-Taybi tipo 2<sup>159</sup>, sendo raramente associada a epilepsia<sup>160</sup>. A variante *frameshift* p.(Glu821Glyfs\*28) no *BCL11B*, encontrada na nossa amostra e não relatada nos repositórios de variantes, apresenta fenótipo compatível com a literatura. Dos 13 pacientes relatados por Lessel e col. (2018), somente 1 apresentava epilepsia (sintoma não descrito no OMIM<sup>156</sup>).

No subgrupo das variantes em genes que codificam proteínas localizadas principalmente no núcleo e estão relacionados à regulação transcricional, encontramos 2 pacientes. A paciente com a variante *missense* p.(Glu407Gln) no

*SATB1* participou da coorte de den Hoed e col. (2021) com 42 pacientes<sup>164</sup>. A epilepsia é farmacorresistente (SLG) e está associada a baixo peso e estatura, com imunodeficiência e puberdade precoce. Variantes *missense* localizadas nos domínios de ligação ao DNA, CUT1 e CUT2 resultam em um fenótipo grave. Como a variante p.(Glu407Gln) afeta o domínio CUT1, justifica-se assim o fenótipo grave<sup>164</sup>. A variante *frameshift* p.(Gln319Thrfs\*18) no *ZMIZ1* foi compatível com o transtorno do neurodesenvolvimento com fâcies dismórficas e anomalias esqueléticas distais (NEDDFSA)<sup>163</sup>.

No subgrupo das variantes em genes que codificam proteínas localizadas principalmente no núcleo e estão relacionados ao processamento de ácidos nucleicos, descrevemos 4 pacientes na nossa amostra. A variante *nonsense* p.(Glu195\*) *de novo* em heterozigose no *SMCIA* apresenta o fenótipo de EED-85, com ou sem Defeitos Cerebrais da Linha Média, e não o fenótipo da Síndrome de Cornelia de Lange. O mecanismo fisiopatológico postulado é o de LoF, e é possível que o produto proteico acarrete um efeito dominante negativo<sup>170</sup>. A variante *frameshift* p.(Glu124Glyfs\*5) no *SON* é responsável pela Síndrome ZTTK (Síndrome Zhu-Tokita-Takenouchi-Kim)<sup>166</sup>, com fenótipo compatível e neuroimagem evidenciando malformação cerebral (paquigiria e polimicrogria, além de heterotopia). O *SON* é intolerante a LoF e postula-se que variantes *missense* sejam toleradas<sup>165,166</sup>. A variante *frameshift* p.(Glu270Glyfs\*19) no *AHDC1*, *de novo*, apresenta fenótipo compatível com a Síndrome de Xia-Gibbs, já descrita por Faergeman e col. (2021)<sup>177,214</sup>. Variantes do tipo *frameshift* geram um mecanismo molecular patogênico por haploinsuficiência ou efeito dominante negativo<sup>215</sup>. A paciente com a variante *frameshift* p.(Leu148Trpfs\*77) no *PURA* participou do estudo do espectro genotípico e fenotípico dos pacientes com EED relacionada ao *PURA*<sup>216</sup>. Ao analisarem 142

pacientes, Johannesen e col. (2022) evidenciaram as principais características de hipotonia neonatal, dificuldades de alimentação e desconforto respiratório. Epilepsia foi frequente (60%), com múltiplos tipos de crises. O diagnóstico de SLG foi estabelecido em 5 pacientes, incluindo o nosso paciente (Figura 20). Variantes *missense* foram evidentes em 24,6% dos pacientes, enquanto os 65,5% restantes apresentavam variantes truncadas. Verificou-se variabilidade fenotípica, de modo que a mesma variante foi observada em pacientes com e sem epilepsia<sup>216</sup>.



**Figura 20:** Variantes inéditas no *PURA* na coorte de pacientes de Johannesen e col. (2022). Variantes *missense* são localizadas acima; variantes relacionadas ao truncamento de proteínas são descritas abaixo; pacientes com epilepsia em vermelho; sem epilepsia em azul; variantes recorrentes em negrito; em amarelo, os domínios de repetição (*PURA*); e seta azul, nosso paciente participante da coorte. Retirado e adaptado de Johannesen e col. (2022)<sup>216</sup>.

O quarto grupo de pacientes está associado a variantes gênicas que codificam proteínas localizadas na matriz extracelular. Esse grupo inclui 2 pacientes com variantes no *COL4A1*, p.(Gly888Arg) e p.(Ile1071\_Gly1076del). Não há associação genótipo-fenótipo; entretanto, a maioria das variantes patogênicas estão localizados em resíduos de glicina, que desempenham um papel importante para estabilização do domínio helicoidal triplo do colágeno<sup>172</sup>. Enquanto a primeira variante já foi descrita nos repositórios de variantes<sup>217</sup>, a segunda está ausente. Artigos relatam uma frequência elevada de MDCs como polimicrogiria, esquizencefalia ou displasia cortical focal<sup>173,218</sup>. O paciente com a variante p.(Ile1071\_Gly1076del) apresentou áreas com polimicrogiria e esquizencefalia, sem, contudo, uma imagem típica de

porencefalia. Os defeitos oculares foram as manifestações extra-SNC mais frequentes, e ambos os pacientes da nossa amostra apresentaram catarata congênita<sup>173</sup>.

Em relação às síndromes epiléticas frequentes na nossa amostra, a mais frequente foi a SW, seguida pela SLG. Embora esse dado seja evidente em alguns estudos com epilepsia de origem genética<sup>181</sup>, no estudo de Symond e col. (2019), a SW foi sucedida pela SD<sup>178</sup>. Dos 13 genes associados a SW encontrados na nossa amostra, 5 são descritos na literatura. Dos 12 genes do nosso estudo que estão relacionados a SLG, somente o *SCN8A* é relatado na literatura. Os nossos pacientes com EEDIP, *KCNQ2* e *STXBPI* foram relacionados a SO e cerca de 50% deles evoluíram com SW, informação já relatada por Kosseifi e col. (2019)<sup>192</sup>. Na EDMISF, o gene mais frequentemente relatado nos estudos é o *KCNT1*<sup>84</sup>, que foi encontrado na nossa amostra (tabela 17).

**Tabela 17:** Correlação entre os genes relacionados a síndromes epiléticas encontrados neste estudo e os genes mais frequentemente descritos na literatura.

Síndromes Epiléticas	Genes encontrados neste estudo		Genes descritos na literatura	
Síndrome de West	<i>ALG13, AP3B2, APT7A, CDKL5, COL4A1, DYNC1H1, KCNQ2, RARS2(2), SCN2A, SCN8A (2), SLC35A2, STXBPI(2), VARS2</i>		<i>ALG13, ARX*, CDKL5*, DNMI, FOXG1, GNAOI, GRAB1, GRING2A, GRIN2B, KCNA2, KNCT1, KCNQ2, HCN1, PCDH19, PIGA, SCN1A, SCN1B, SCN2A, SCN8A, SLC2A1, MEF2C, STXBPI*, TSC1, TSC2</i>	
Síndrome de Lennox-Gastaut	<i>AP3B2, APT7A, CACNA2D2, COL4A1, CYFIP2, PURA, RARS2 (2), SMC1A, SCN8A (2), SATB1, TUBB3, VARS2</i>		<i>ALG13, CACNA1A, CDKL5*, CHD2, DNMI, GABRB3, HNPRNU, SCN2A*, SCN8A, STXBPI*</i>	
Encefalopatia Epilética e desenvolvimento Infantil Precoce	EMP <i>AMT, CDKL5</i>	Síndrome de Ohtahara <i>CYFIP2, KCNQ2, SLC35A2, STXBPI(3)</i>	EMP <i>PIGA, SLC25A22*, SETBP1</i>	Síndrome de Ohtahara <i>ARX*, CACNA2D2, GNAOI, KCNQ2*, KNCT1, PIGA, SCN2A*, SCN8A, SLC25A22, STXBPI*</i>
Epilepsia da Infância Crises focais migratórias	<i>KCNT1, TUBB3</i>		<i>ATPIA3, CDKL5, CHD2, KCNT1*, KCNQ2, SLC25A22, SCN1A, SCN2A*, SCN8A, HCN1, PIGA, SMC1A, QARS</i>	
EED com ponta-onda no sono	<i>GRIN2B, KCNQ2, NEXMIF, SCN8A</i>		<i>GRIN2A, CNKSR2</i>	
Epilepsia Mioclônica Atônica	<i>STXB1</i>		<i>SCN1A, SCL2A1, SCL6A1, GRAB1, SLC25A22</i>	
Epilepsia autolimitada centrottemporal	<i>PRRT2</i>		<i>GRIN2A</i>	
Epilepsia autolimitada centrottemporal atípica	<i>GRIN2A</i>		<i>GRIN2A</i>	
Epilepsia Neonatal Autolimitada	<i>KCNQ2</i>		<i>KCNQ2, KCNQ3</i>	

**Legenda:** Genes em **negrito**: genes encontrados em estudo semelhante a literatura; **genes com \*** = principais genes encontrados na literatura. EMP = epilepsia mioclônica precoce.

Fonte: McTague, 2016<sup>71</sup>; Wei, 2017<sup>74</sup>; Shidley, 2018; Symonds, 2020<sup>73</sup>; Bayat, 2021<sup>175</sup>.

As limitações do nosso estudo estão relacionadas ao tipo de amostra e aos critérios de exclusão da pesquisa, graças aos quais pacientes com fenótipos típicos de Síndrome de Dravet, Síndrome de Rett, esclerose tuberosa e neurofibromatose foram excluídos. Sendo assim, casos atípicos das síndromes relatadas não foram incluídos e, conseqüentemente, não foram descritos. O desenho do estudo seleciona casos já confirmados pelo NGS e não a partir de uma coorte prospectiva.

O custo do NGS vem diminuindo, tornando essa abordagem mais prática para o diagnóstico molecular. Nos primeiros trabalhos que utilizaram exoma para

investigação de casos monogênicos, as taxas de diagnóstico eram elevadas. Elas, no entanto, não eram representativas da prática clínica, na qual se verifica uma taxa de aproximadamente 20-40%<sup>219</sup>. Estudos sobre custo-benefício do *array*, exoma, painel genético e teste de gene único mostraram que o exoma em trio apresenta uma taxa de diagnóstico mais elevada, sendo o mais indicado no início da odisseia diagnóstica<sup>220</sup>. Entretanto, no nosso país o custo do exame e sua pouca disponibilidade ainda são fatores que limitam a investigação dos pacientes com EED.

Na nossa amostra, somente 2 (2,6%) pacientes tiveram os seus exames inteiramente financiados pelo Estado, o que evidencia a dificuldade de acesso. O tempo de espera para a realização do NGS foi referido em 92% da amostra. Embora o tempo médio tenha sido de 8 meses e a maioria tenha aguardado pelo menos 3 meses para realizar o exame (27,5%), alguns pacientes (14,5%) esperaram até 2 anos. Outro dado importante diz respeito à realização de outros exames anteriores à solicitação do NGS durante a investigação, fato que retardou o diagnóstico. Na nossa amostra, muitos realizaram cariótipo (80%) e/ou pesquisa de microarranjos (50%) antes da realização do NGS. A aferição da duração de toda a investigação diagnóstica não foi, contudo, contemplada na amostra.

O conhecimento e a interpretação dos resultados dos testes genéticos moleculares, importantes no diagnóstico das EED, tem evoluído de maneira substancial. Os resultados podem mudar com o passar do tempo e com a aquisição de novos conhecimentos médicos. No caso de um exame negativo, a reanálise é recomendada após o período de 1 a 2 anos da sua realização, uma iniciativa capaz de propiciar a reinterpretação de variantes ou associação de novos genes antes não implicados na etiologia<sup>221</sup>. SoRelle e col. (2020) avaliaram a variação interlaboratorial relativas às interpretações de resultados de testes genéticos e as suas implicações

terapêuticas. Os autores identificaram uma discrepância de 3,2% entre os laboratórios<sup>222</sup>. Na nossa amostra, 74,6% realizaram o exoma, dos quais 7,14% necessitaram da releitura do exoma e 5,3% foram submetidos a um novo sequenciamento para a identificação da variante. Rochtus e col. (2019) observaram que o exoma deve ser considerado precocemente em crianças com epilepsia de provável origem genética e ressaltaram a relevância da reanálise dos NGS em pacientes epiléticos sem etiologia, como evidencia a taxa de diagnóstico de 25% na reanálise futura<sup>221</sup>.

Um exame com resultado negativo não implica que o paciente não tenha uma etiologia genética para sua epilepsia e nem mesmo significa um diagnóstico específico com base no fenótipo. Resultados negativos podem surgir de limitações inerentes ao teste, de erro humano e das limitações de nosso entendimento<sup>223</sup>.

O nosso estudo buscou reforçar o NGS (painel, exoma e/ou genoma) como instrumento de investigação em pacientes com epilepsia de origem genética, para os quais a clínica e a associação a outros exames bioquímicos e genéticos não foram suficientes para concluir o diagnóstico. A ACMG recomenda que o exoma ou genoma sejam considerados como um teste de primeira ou segunda escolha para pacientes com uma ou mais anomalias congênitas antes de 1 ano de idade, além de pacientes com atraso do desenvolvimento ou DI com início antes de 18 anos de idade<sup>224</sup>.

## **8 Conclusão**

Por muito tempo, o diagnóstico de epilepsia de origem genética era realizado, na prática clínica, quase exclusivamente de forma presuntiva, de maneira que o diagnóstico de certeza ficava quase inteiramente restrito ao âmbito da pesquisa. A prolongada elucidação etiológica era consequência da pesquisa gene a gene. Com o



recente advento do sequenciamento de nova geração (NGS) e a possibilidade da análise de trechos do DNA simultaneamente proporcionou que vários genes pudessem ser avaliados concomitantemente. A maior disponibilidade do NGS e o custo mais acessível propiciaram uma revolução na conduta da investigação diagnóstica das epilepsias de origem genética, principalmente para encefalopatias epiléticas e do desenvolvimento.

A confirmação de uma epilepsia geneticamente determinada permite caracterizar melhor sua história natural e o entendimento da sua fisiopatologia. Em relação ao tratamento da epilepsia, a descoberta de uma alteração molecular específica pode proporcionar um tratamento direcionado em alguns casos, além de propiciar o aconselhamento genético e estudos para novas medicações específicas.

Disponibilizar o sequenciamento de nova geração a pacientes com suspeita de epilepsia de origem genética, principalmente nos casos de EED, permitirá o diagnóstico de um maior número de pacientes e a identificação de casos atípicos. O NGS deve ser ofertado de forma universal, estendendo-se tanto a pacientes do Sistema Único de Saúde e quanto aos que possuem plano de saúde. A confirmação diagnóstica pode proporcionar uma mudança terapêutica nos casos aplicáveis, bem como a redução da quantidade de exames desnecessários ao diagnóstico, aconselhamento genético do paciente e seus familiares, justificativa para evolução e gravidade do quadro clínico.

Apesar do aumento significativo na identificação de genes relacionados à epilepsia, ainda estamos em uma fase de construção de conhecimento com a descoberta de novos genes e diferentes mecanismos fisiopatológicos. Portanto, mais estudos devem ser realizados para ampliar a ciência.

### 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. doi:10.1111/epi.12550.
2. Organização Mundial da Saúde. Epilepsy. Facts sheet no 999, January 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>.
3. Camfield P, Camfield C. Incidence, prevalence and aetiology of seizures and epilepsy in children. *Epileptic Disord*. 2015;17(2):117-23. doi:10.1684/epd.2015.0736.
4. Scheffer IE, Berkovic SF, 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*. 2017;58(4):512-21.
5. Hani AJ, Mikati HM, Mikati MA. Genetics of Pediatric Epilepsy. *Pediatr Clin N Am*. 2015;62:703-22.
6. Ottman R, Hirose S, Jain S, Lerche H, Lopes-Cendes I, Noebels JL, et al. Genetic testing in the epilepsies--report of the ILAE Genetics Commission. *Epilepsia*. 2010;51(4):655–670. doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02429.x.
7. Clark MM, Stark Z, Farnaes L, Tan TY, White SM, Dimmock D, et al. Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of genome and exoma sequencing and chromosomal microarray in children with suspected genetic diseases. *NPJ Genom Med*. 2018;2-1.
8. Shbarou R, Mikati MA. The Expanding Clinical Spectrum of Genetic Pediatric Epileptic Encephalopathies. *Semin Pediatr Neurol*. 2016; 23:134-42.
9. Møller RS, Dahl HA, Helbig I. The contribution of next generation sequencing to epilepsy genetics. *Expert Rev. Mol. Diagn* [periódicos na internet]. 2015 Nov [acesso em 03 jan 2018];1-8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1586/14737159.2015.1113132>.
10. Mei D, Parrini E, Marini C, Guerrini R. The Impact of Next-Generation Sequencing on the Diagnosis and Treatment of Epilepsy in Paediatric Patients. *Mol Diagn Ther*. 2017;21:357–73.
11. EpiPM Consortium. A roadmap for precision medicine in the epilepsies. *Lancet Neurol*. 2015;14:1219-28.

12. Kwan P, Schachter SC, Brodie MJ. Drug-resistant epilepsy. *N Eng J Med*. 2011;365(10):919-26.
13. Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Hauser WA, Mathern G, *et al*. Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*. 2010;51(6):1069-2010.
14. Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, *et al*. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 2005;46(4):470–72. doi:10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x.
15. Gastaut H. Classification of the epilepsies. Proposal for an international classification. *Epilepsia*. 1969;10(suppl):14–21. doi:10.1111/j.1528-1157.1970.tb03873.x.
16. Gastaut H. Clinical and electroencephalographical classification of epileptic seizures. *Epilepsia*. 1970; 11(1):102–113. doi:10.1111/j.1528-1157.1970.tb03871.x.
17. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and terminology of the International League against Epilepsy. *Epilepsia* .1981;22(4):489–501.
18. Proposal for classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League against Epilepsy. *Epilepsia*. 1985;26(3):268–78.
19. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League against Epilepsy. *Epilepsia*. 1989;30(4):389–99.
20. Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurash IV, Hirsch E, Jansen FE, *et al*. Operational classification of seizure types by the International League against Epilepsy: position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017;58(4):522–530. doi:10.1111/epi.13670.
21. Pressler RM, Cilio MR, Mizrahi EM, Moshé SL, Nunes ML, Plouin P, *et al*. The ILAE classification of seizures and the epilepsies: Modification for seizures in the neonate. Position paper by the ILAE Task Force on Neonatal Seizures. *Epilepsia*. 2021;62(3):615-628.
22. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon CS, Dykeman J, *et al*. Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology*. 2017;88:296–303.
23. Borges MA, Min LL, Guerreiro CA, Yacubian EMT, Cordeiro JA, Tognola WA, *et al*. Urban

- prevalence of epilepsy: population study in São José do Rio Preto, a medium-sized city in Brasil. *Arq Neuropsiquiatr.* 2004;62:199-204.
24. Nunes ML, Geib LT; Grupo Apego. Incidence of epilepsy and seizure disorders in childhood and association with social determinants: a birth cohort study. *J Pediatr (Rio J).* 2011;87(1):50-6.
  25. Pack AM. Epilepsy Overview and Revised Classification of Seizures and Epilepsies. *Continuum (Minneap Minn)* 2019;25(2, Epilepsy):306–21.
  26. Scheffer IE. A new classification and class 1 evidence transform clinical practice in epilepsy. *Lancet Neurol.* 2018;17(1):7–8. doi:10.1016/S1474- 4422(17)30432-5.
  27. Howell KB, Harvey AS, Archer JS. Epileptic encephalopathy: Use and misuse of a clinically and conceptually important concept. *Epilepsia.* 2016;57(3):343–7. doi: 10.1111/epi.13306.
  28. Engel J, International League against Epilepsy (ILAE). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia.* 2001 Jun;42(6):796-803.
  29. Engel J Jr. ILAE classification of epilepsy syndromes. *Epilepsy Res.* 2006 Aug;70 Suppl 1:S5-10. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2005.11.014.
  30. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Bucchhalter J, Cossio 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.* 2010;51(4):676-85.
  31. Capovilla G, Wolf P, Beccaria F, Avanzini G. The history of the concept of epileptic encephalopathy. *Epilepsia.* 2013;54(8):2-5.
  32. Pearl PL. Epilepsy syndromes in childhood. *Continuum: Lifelong Learning in Neurology.* 2018;24(1):186-209.
  33. Hussain SA. Epileptic Encephalopathies. *Continuum (Minneap Minn)* 2018;24 (1, Child Neurology):171–85.
  34. von Deimling M, Helbig I, Marsh ED. Epileptic Encephalopathies-Clinical Syndromes and Pathophysiological Concepts. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2017;17(2):10. doi: 10.1007/s11910-017-0720-7.
  35. Riney K, Bogacz A, Somerville E, Hirsch E, Nabbout R, Scheffer IE, *et al.* International League Against Epilepsy classification and definition of epilepsy syndromes with onset at a

- variable age: position statement by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia*. 2022 May 3. doi: 10.1111/epi.17240.
36. Specchio N, Wirrell EC, Scheffer IE, Nabbout R, Riney K, Samia P, et al. International League Against Epilepsy classification and definition of epilepsy syndromes with onset in childhood: Position paper by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia*. 2022 May 3. doi: 10.1111/epi.17241.
  37. Wirrell EC, Nabbout R, Scheffer IE, Alsaadi T, Bogacz A, French JA, et al. Methodology for classification and definition of epilepsy syndromes with list of syndromes: Report of the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia*. 2022 May 3. doi: 10.1111/epi.17237.
  38. Zuberi SM, Wirrell E, Yozawitz E, Wilmshurst JM, Specchio N, Riney K, et al. ILAE classification and definition of epilepsy syndromes with onset in neonates and infants: Position statement by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia*. 2022 May 3. doi: 10.1111/epi.17239.
  39. Hirsch E, French J, Scheffer IE, Bogacz A, Alsaadi T, Sperling MR, et al. ILAE definition of the Idiopathic Generalized Epilepsy Syndromes: Position statement by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia*. 2022 May 3. doi: 10.1111/epi.17236.
  40. Howell KB, Eggers S, Dalziel K, Riseley J, Mandelstam S, Myers CT, et al. A population-based cost effectiveness study of early genetic testing in severe epilepsies of infancy. *Epilepsia*. 2018;59:1177–87.
  41. Scheffer IE, Liao J. Deciphering the concepts behind "Epileptic encephalopathy" and "Developmental and epileptic encephalopathy". *Eur J Paediatr Neurol*. 2020;24:11-14. doi: 10.1016/j.ejpn.2019.12.023.
  42. Schuele SU. Evaluation of Seizure Etiology from Routine Testing to Genetic Evaluation. *Continuum (Minneap Minn)* 2019;25(2, Epilepsy):322–42.
  43. Annegres JF, Hauser WA, Anderson VE, Kurland LT. The risks of seizure disorders among relatives of patients with childhood onset epilepsy. *Neurology*. 1982;32:174–9.
  44. Berkovic SF, Howell RA, Hay DA, Hopper JL. Epilepsies in twins: genetics of the major epilepsy syndromes. *Ann Neurol*. 1998;43:435–45.
  45. Myers CT, Mefford HC. Advancing epilepsy genetics in the genomic era. *Genome Med* 2015;25: 7:91. doi: 10.1186/s13073-015-0214-7.
  46. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson and Thompson: genética médica. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016.

47. Sheidley BR, Smith LA, Helbig KL. Genetics of Epilepsy in the Era of Precision Medicine: Implications for Testing, Treatment, and Genetic Counseling. *Curr Genet Med Rep.* 2018;6: 73–82.
48. Orsini A, Esposito M, Perna D, Bonuccelli A, Peroni A, Striano P. Personalized medicine in epilepsy patients. *J Transl Genet Genom.* 2018;2:16
49. Perucca P, Bahlo M, Berkovic SF. The Genetics of Epilepsy. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2020;21:205-230. doi: 10.1146/annurev-genom-120219-074937.
50. Striano P, Minassian BA. From the genetic testing to precision medicine in Epilepsy. *Neurotherapeutics.* 2020 Jan 24. doi: 10.1007/s13311-020-00835-4.
51. Collins FS, Lander ES, Rogers J, Waterston RH, Conso IH. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 2004;431(7011):931-45.
52. 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015;526:68-74. doi: 10.1038/nature15393.
53. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics.* 5<sup>th</sup> Ed. Boca Raton: FL. Taylor & Francis Group, LLC 2019.
54. Zanardo EA, Dias AT, Kulikowshi LD. Microarray cromossômico. In: Pedroso JL, França JR, Camargos MC, Barsottini OGP, Kok F. *Neurogenética na Prática Clínica.* 1<sup>a</sup> Ed Rio de Janeiro: Atheneu, 2019. p. 19-27.
55. Silveira-Moriyama L, Paciorkowski AR. Genetic Diagnostics for Neurologists. *Continuum (Minneapolis Minn)* 2018;24 (1,Child Neurology):18–36. doi: 10.1212/CON.0000000000000556.
56. Martin CL, Warburton D. Detection of chromosomal aberrations in clinical practice: From Karyotype to genome sequence. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2015;16:309-26.
57. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L. Perry GH, Andrews TD, et al. Global variation in copy number in human genome. *Nature.* 2006(23);444:444-54.
58. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothaman AR, Carter NP, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010;86:906-15

59. Shao L, Akkari Y, Cooley LD, Miller DT, Seifert BA, Wolff DJ et al. Chromosomal microarray analysis, including constitutional and neoplastic disease applications, 2021 revision: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* 2021;23,1818–1829. <https://doi.org/10.1038/s41436-021-01214-w>
60. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74:5463-7.
61. Shestak AG, Bukaeva AA, Saber S, Zaklyazminskaya EV. Allelic Dropout Is a Common Phenomenon That Reduces the Diagnostic Yield of PCR-Based Sequencing of Targeted Gene Panels. *Front Genet*. 2021 Feb 1;12:620337. doi: 10.3389/fgene.2021.620337.
62. Epi25 Collaborative. Ultra-Rare Genetic Variation in the Epilepsies: A Whole-Exome Sequencing Study of 17,606 Individuals. *Am J Hum Genet*. 2019 Aug 1;105(2):267-282. doi: 10.1016/j.ajhg.2019.05.020.
63. Migliavacca MP, Kok F. Sequenciamento de nova geração: painéis de genes e exoma. In: Pedroso JL, França JR, Camargos MC, Barsottini OGP, Kok F. *Neurogenética na Prática Clínica*. 1ª Ed Rio de Janeiro: Atheneu, 2019. p. 35-42.
64. Sertié AL, Splendore A, Fanganiello RD, Passos-Bueno MR. Identificação de mecanismos causadores de doenças genéticas humanas. In: Menck CFM, Sluys MAV. *Genética molecular básica: dos genes aos genomas*. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
65. Demkow U, Ploski R. *Clinical application for the next-generation sequencing*. London: Elsevier; 2016.
66. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Gen Med*. 2015;17:405-24.
67. Smith RS, Walsh CA. Ion Channel Functions in Early Brain Development. *Trends Neurosci*. 2020 Feb;43(2):103-114. doi: 10.1016/j.tins.2019.12.004.
68. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 2016;536, 285–291. doi: 10.1038/nature19057.
69. Pellock JM, Nordli Jr DR, Sankar R, Wheless JW. *Pellock Pediatric Epilepsy: diagnosis and therapy*. 4a Ed. New York, NY. 2017 Demos Medical Publishing.

70. Shao LR, Habela CW, Stafstrom CE. Pediatric Epilepsy Mechanisms: Expanding the Paradigm of Excitation/Inhibition Imbalance. *Children* (Basel). 2019;6:23. doi:10.3390/children6020023.
71. McTague A, Howell KB, Cross JH, Kurian MA, Scheffer IE. The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *Lancet Neurol*. 2016 Mar;15(3):304-16. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00250-1.
72. Ellis CA, Petrovski S, Berkovic SF. Epilepsy genetics: clinical impacts and biological insights. *Lancet Neurol*. 2020 Jan;19(1):93-100. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30269-8.
73. Symonds JD, McTague A. Epilepsy and developmental disorders: Next generation sequencing in the clinic. *Eur J Paediatr Neurol*. 2020;24:15-23 doi: 10.1016/j.ejpn.2019.12.008.
74. Wei F, Yan LM, Su T, He N, Lin ZJ, Wang J, et al. Ion Channel Genes and Epilepsy: Functional Alteration, Pathogenic Potential, and Mechanism of Epilepsy. *Neurosci Bull*. 2017;33(4):455-477. doi: 10.1007/s12264-017-0134-1.
75. Catterall WA. Sodium Channel Mutations and Epilepsy. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, et al., editors. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* [Internet]. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012.
76. Meisler MH, Kearney JA. Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders. *J Clin Invest*. 2005;115(8):2010-7. doi: 10.1172/JCI25466.
77. Takai A, Yamaguchi M, Yoshida H, Chiyonobu T. Investigating Developmental and Epileptic Encephalopathy Using *Drosophila melanogaster*. *Int. J. Mol. Sci*. 2020; 21: 6442. doi:10.3390/ijms21176442.
78. Brunklaus A, Du J, Steckler F, Ghanty II, Johannesen KM, Fenger CD, et al. Biological concepts in human sodium channel epilepsies and their relevance in clinical practice. *Epilepsia*. 2020;61(3):387-399. doi: 10.1111/epi.16438.
79. Talwar D, Hammer MF. SCN8A Epilepsy, Developmental Encephalopathy, and Related Disorders. *Pediatric Neurology*. 2021; 122:76-83. doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2021.06.011.
80. Johannesen KM, Liu Y, Gjerulfsen CE, Koko M, Sonnenberg L, Schubert J, et al. Genotype-phenotype correlations in *SCN8A*-related disorders reveal prognostic and therapeutic implications. medRxiv 2021.03.22.21253711. doi.org/10.1101/2021.03.22.21253711.



81. Masnada S, Hedrich UBS, Gardella E, Schubert J, Kaiwar C, Klee EW, et al. Clinical spectrum and genotype-phenotype associations of KCNA2-related encephalopathies. *Brain*. 2017;140(9):2337-2354. doi: 10.1093/brain/awx184.
82. Döring JH, Schröter J, Jüngling J, Biskup S, Klotz KA, Bast T, et al. Refining Genotypes and Phenotypes in KCNA2-Related Neurological Disorders. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet] 2021;22(6):2824. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22062824>.
83. Borlot F, Abushama A, Morrison-Levy N, et al. KCNT1-related epilepsy: An international multicenter cohort of 27 pediatric cases. *Epilepsia*. 2020;00:1–14. <https://doi.org/10.1111/epi.16480>
84. Bonardi CM, Heyne HO, Fiannacca M, Fitzgerald MP, Gardella E, Gunning B, et al. *KCNT1*-related epilepsies and epileptic encephalopathies: phenotypic and mutational spectrum. *Brain* 2021;144: 3635–3650. <https://doi.org/10.1093/brain/awab219>.
85. Malerba F, Alberini G, Balagura G, Marchese F, Amadori E, Riva A, et al. Genotype-phenotype correlations in patients with de novo KCNQ2 pathogenic variants. *Neurol Genet*. 2020;6:e528. doi:10.1212/NXG.0000000000000528.
86. Kuersten M, Tacke M, Gerstl L, Hoelz H, Stülpnagel CV, Borggraefe I. Antiepileptic therapy approaches in KCNQ2 related epilepsy: A systematic review. *Eur J Med Genet*. 2020;63(1):103628. doi: 10.1016/j.ejmg.2019.02.001.
87. Elisabetta I, Sylvia B. From Genotype to Phenotype: Expanding the Clinical Spectrum of *CACNA1A* Variants in the Era of Next Generation Sequencing. *Front Neurol*. 2021;12:263-73. doi: 10.3389/fneur.2021.639994.
88. Punetha J, Karaca E, Gezdirici A, Lamont RE, Pehlivan D, Marafi D. Biallelic *CACNA2D2* variants in epileptic encephalopathy and cerebellar atrophy. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 2019; 6(8): 1395–1406. doi: 10.1002/acn3.50824
89. Marini C, Porro A, Rastetter A, Dalle C, Rivolta I, Bauer D, et al. HCN1 mutation spectrum: from neonatal epileptic encephalopathy to benign generalized epilepsy and beyond. *Brain*. 2018;141(11):3160-3178. doi: 10.1093/brain/awy263
90. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev*. 2010;62:405–96. PubMed PMID: 20716669.
91. Platzer K, Lemke JR. *GRIN1*-Related Neurodevelopmental Disorder. 2019 Jun 20 [Updated 2021 Apr 1]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]

92. Kurlemann G, Arnold GL, Bhambhani V, Bartholdi D, Pedurupillay CR, Misceo D, et al. Delineating the GRIN1 phenotypic spectrum: A distinct genetic NMDA receptor encephalopathy. *Neurology*. 2016;86(23):2171-8. doi: 10.1212/WNL.0000000000002740.
93. Strehlow V, Heyne HO, Vlaskamp DRM, Marwick KFM, Rudolf G, de Bellescize J, et al. GRIN2A-related disorders: genotype and functional consequence predict phenotype. *Brain*. 2019;142(1):80-92. doi: 10.1093/brain/awy304
94. Platzer K, Lemke JR. *GRIN2B*-Related Neurodevelopmental Disorder. 2018 May 31 [Updated 2021 Mar 25]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet].
95. Platzer K, Yuan H, Schütz H, Winschel A, Chen W, Hu C et al. GRIN2B encephalopathy: novel findings on phenotype, variant clustering, functional consequences and treatment aspects. *J Med Genet* 2017;54:460–470. doi:10.1136/jmedgenet-2016-104509.
96. Wang D, Pascual JM, De Vivo D. Glucose Transporter Type 1 Deficiency Syndrome. 2002 Jul 30 [Updated 2018 Mar 1]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReview [Internet].
97. Morrow EM, Pescosolido MF. Christianson Syndrome. 2018 Jan 11. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet].
98. Verheijen J, Tahata S, Kozicz T, Witters P, Morava E. Therapeutic approaches in Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) involving N-linked glycosylation: an update. *Genet Med*. 2020;22(2):268-279. doi: 10.1038/s41436-019-0647-2.
99. Vals M-A, Ashikov A, Ilves P, et al. Clinical, neuroradiological, and biochemical features of SLC35A2-CDG patients. *J Inherit Metab Dis*. 2019;42:553–564. <https://doi.org/10.1002/jimd.12055>.
100. Vairo FPE, Chwal BC, Perini S, Ferreira MAP, de Freitas Lopes AC, Saute JAM. A systematic review and evidence-based guideline for diagnosis and treatment of Menkes disease. *Mol Genet Metab*. 2019;126(1):6-13. doi: 10.1016/j.ymgme.2018.12.005.
101. Olson HE, Demarest ST, Pestana-Knight EM, Swanson LC, Iqbal S, Lal D, et al. Cyclin-Dependent Kinase-Like 5 Deficiency Disorder: Clinical Review. *Pediatr Neurol*. 2019;97:18-25. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2019.02.015.
102. Kobayashi Y, Tohyama J, Takahashi Y, Goto T, Haginoya K, Inoue T, et al. Clinical manifestations and epilepsy treatment in Japanese patients with pathogenic CDKL5 variants. *Brain Dev*. 2021;43(4):505-514. doi: 10.1016/j.braindev.2020.12.006.

103. Nakashima M, Kato M, Aoto K, et al. De Novo hotspot variants in CYFIP2 cause early-onset epileptic encephalopathy. *Ann Neurol.* 2018;83:794–806. <https://doi.org/10.1002/ana.25208>.
104. Zweier M, Begemann A, McWalter K, Cho MT, Abela L, Banka S, et al. Spatially clustering de novo variants in CYFIP2, encoding the cytoplasmic FMRP interacting protein 2, cause intellectual disability and seizures. *Eur J Hum Genet* 2019; 27:747–759. doi: 10.1038/s41431-018-0331-z.
105. Courcet JB, Faivre L, Malzac P, Masurel-Paulet A, Lopez E, Callier P, et al. The DYRK1A gene is a cause of syndromic intellectual disability with severe microcephaly and epilepsy. *J Med Genet.* 2012 ;49(12):731-6. doi: 10.1136/jmedgenet-2012-101251.
106. Courraud J, Chater-Diehl E, Durand B, Vincent M, del Mar Muniz Moreno M, Boujelbene I, et al. Integrative approach to interpret DYRK1A variants, leading to a frequent neurodevelopmental disorder. *Genet Med.* 2021;23(11):2150-9. doi:10.1038/s41436-021-01263-1
107. de Lange IM, Helbig KL, Weckhuysen S, Moller RS, Velinov M, Dolzhanskaya N, et al. De novo mutations of KIAA2022 in females cause intellectual disability and intractable epilepsy. *J. Med. Genet.* 2016;53(12): 850-858. doi: 10.1136/jmedgenet-2016-103909.
108. Ghesh L, Besnard T, Nizon M, Trochu E, Landeau-Trottier G, Breheret F, et al. Loss-of-function variants in ARHGEF9 are associated with an X-linked intellectual disability dominant disorder. *Hum Mutat.* 2021;42(5):498-505. doi: 10.1002/humu.24188.
109. Alber M, Kalscheuer VM, Marco E, Sherr E, Lesca G, Till M, et al. *ARHGEF9* disease: Phenotype clarification and genotype-phenotype correlation. *Neurol Genet.* 2017;3(3):e148. doi: 10.1212/NXG.0000000000000148.
110. Wang J, Lin ZJ, Liu L, Xu HQ, Shi YW, Yi YH, He N, Liao WP. Epilepsy-associated genes. *Seizure.* 2017;44:11-20. doi: 10.1016/j.seizure.2016.11.030.
111. Kapoor A, Satishchandra P, Ratnapriya R, Reddy R, Kadandale J, Shankar SK, et al. An idiopathic epilepsy syndrome linked to 3q13.3-q21 and missense mutations in the extracellular calcium sensing receptor gene. *Ann. Neurol.* 2008;64:158-167. doi: 10.1002/ana.21428.
112. Adang LA, Pizzino A, Malhotra A, Dubbs H, Williams C, Sherbini O, et al. Phenotypic and Imaging Spectrum Associated with WDR45. *Pediatr Neurol.* 2020;109:56-62. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2020.03.005.
113. Chen H, Qian Y, Yu S, Xiao D, Guo X, Wang Q, et al. Early onset developmental delay and epilepsy in pediatric patients with WDR45 variants. *Eur J Med Genet.* 2019;62(2):149-160. doi: 10.1016/j.ejmg.2018.07.002.

114. Willemsen MH, Ba W, Wissink-Lindhout WM, de Brouwer APM, Haas SA, Bienek M, et al. Involvement of the kinesin family members KIF4A and KIF5C in intellectual disability and synaptic function. *J Med Genet.* 2014;51(7): 487-94. doi: 10.1136/jmedgenet-2013-102182.
115. Michels S, Foss K, Park K, Golden-Grant K, Saneto R, Lopez J, et al. Mutations of KIF5C cause a neurodevelopmental disorder of infantile-onset epilepsy, absent language, and distinctive malformations of cortical development. *Am J Med Genetic A.* 2017;173(12):3127-31.
116. EuroEPINOMICS-RES Consortium; Epilepsy Phenome/Genome Project; Epi4K Consortium. De novo mutations in synaptic transmission genes including DNMI1 cause epileptic encephalopathies. *Am J Hum Genet.* 2014;95(4):360-70. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.08.013.
117. von Spiczak S, Helbig KL, Shinde DN, Huether R, Pendziwiat M, Lourenço C, et al. *DNMI1* encephalopathy: A new disease of vesicle fission. *Neurology.* 2017 Jul 25;89(4):385-394. doi: 10.1212/WNL.0000000000004152.
118. Gerosa L, Francolini M, Bassani S, Passafaro M. The Role of Protocadherin 19 (PCDH19) in Neurodevelopment and in the Pathophysiology of Early Infantile Epileptic Encephalopathy-9 (EIEE9). *Dev Neurobiol.* 2019;79(1):75-84. doi: 10.1002/dneu.22654.
119. Trivisano M, Pietrafusa N, Terracciano A, Marini C, Mei D, Darra F, et al. Defining the electroclinical phenotype and outcome of PCDH19-related epilepsy: A multicenter study. *Epilepsia.* 2018;59(12):2260-2271. doi: 10.1111/epi.14600. Epub 2018 Nov 19. PMID: 30451291.
120. Romaniello R, Arrigoni F, Fry AE, Bassi MT, Rees MI, Borgatti R, Pilz DT, Cushion TD. Tubulin genes and malformations of cortical development. *Eur J Med Genet.* 2018;61(12):744-754. doi: 10.1016/j.ejmg.2018.07.012.
121. Poirier K, Saillour Y, Bahi-Buisson N, Jaglin XH, Fallet-Bianco C, Nabbout R, et al. Mutations in the neuronal beta-tubulin subunit *TUBB3* result in malformation of cortical development and neuronal migration defects. *Hum. Molec. Genet.* 2010;19:4462-73.
122. Poirier K, Lebrun N, Broix L, Tian G, Saillour Y, Boscheron C, et al. Mutations in *TUBG1*, *DYNC1H1*, *KIF5C* and *KIF2A* cause malformations of cortical development and microcephaly. *Nature Genet.* 2013;45:639-647. doi: 10.1038/ng.2613.
123. Becker LL, Dafsari HS, Schallner J, Abdin D, Seifert M, Petit F, et al. The clinical-phenotype continuum in *DYNC1H1*-related disorders-genomic profiling and proposal for a novel classification. *J Hum Genet.* 2020;65(11):1003-1017. doi: 10.1038/s10038-020-0803-1.

124. Stamberger H, Nikanorova M, Willemsen MH, Accorsi P, Angriman M, Baier H, *et al.* STXBP1 encephalopathy: A neurodevelopmental disorder including epilepsy. *Neurology* 2016;86:954-962. DOI 10.1212/WNL.0000000000002457.
125. Khaikin Y, Mercimek-Mahmutoglu S. *STXBP1* Encephalopathy with Epilepsy. 2016 Dec 1. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, *et al.*, editors. GeneReviews® [\[Internet\]](#).
126. Abramov D, Guiberson NGL, Burré J. STXBP1 encephalopathies: Clinical spectrum, disease mechanisms, and therapeutic strategies. *J Neurochem*. 2021;157(2):165-178. doi: 10.1111/jnc.15120.
127. Wolking S, May P, Mei D, Møller RS, Balestrini S, Helbig KL, *et al.* Clinical spectrum of *STX1B*-related epileptic disorders. *Neurology*. 2019;92(11):e1238-e1249. doi: 10.1212/WNL.0000000000007089.
128. Sacher M, Shahrzad N, Kamel H, Milev MP. TRAPPopathies: An emerging set of disorders linked to variations in the genes encoding transport protein particle (TRAPP)-associated proteins. *Traffic* 2019;20: 5–26. doi: 10.1111/tra.12615.
129. Van Bergen NJ, Guo Y, Al-Deri N, Lipatova Z, Stanga D, Zhao S, *et al.* Deficiencies in vesicular transport mediated by TRAPPC4 are associated with severe syndromic intellectual disability. *Brain*. 2020;143(1):112-130. doi: 10.1093/brain/awz374.
130. Ghosh SG, Scala M, Beetz C, Helman G, Stanley V, Yang X, *et al.* A relatively common homozygous TRAPPC4splicing variant is associated with an early-infantile neurodegenerative syndrome. *Eur J Hum Genet* 2021;29:271–279. doi.org/10.1038/s41431-020-00717-5.
131. Boehm M, Bonifacino JS. Adaptins: the final recount. *Mol. Biol. Cell* 2001;12, 2907–2920.
132. Assoum M, Philippe C, Isidor B, Perrin L, Makrythanasis P, Sondheimer N, *et al.* Autosomal-Recessive Mutations in AP3B2, Adaptor-Related Protein Complex 3 Beta 2 Subunit, Cause an Early-Onset Epileptic Encephalopathy with Optic Atrophy. *Am J Hum Genet*. 2016;99(6):1368-1376. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.10.009.
133. Döring JH, Saffari A, Bast T, Brockmann K, Ehrhardt L, Fazeli W, *et al.* The Phenotypic Spectrum of PRRT2-Associated Paroxysmal Neurologic Disorders in Childhood. *Biomedicines* 2020; 8:456. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8110456>.
134. Landolfi A, Barone P, Erro R. The Spectrum of *PRRT2*-Associated Disorders: Update on Clinical Features and Pathophysiology. *Front Neurol*. 2021;12:629747. Published 2021 Mar 4. doi:10.3389/fneur.2021.629747.

135. Ng BG, Eklund EA, Shiryayev SA, Dong YY, Abbott MA, Asteggiano C, et al. Predominant and novel de novo variants in 29 individuals with ALG13 deficiency: Clinical description, biomarker status, biochemical analysis, and treatment suggestions. *J Inherit Metab Dis.* 2020;43(6):1333-1348. doi: 10.1002/jimd.12290.
136. Datta AN, Bahi-Buisson N, Bienvenu T, Buerki SE, Gardiner F, Cross JH, et al. The phenotypic spectrum of X-linked, infantile onset ALG13-related developmental and epileptic encephalopathy. *Epilepsia.* 2021;62:325-334. doi: 10.1111/epi.16761.
137. Van Hove JLK, Coughlin CII, Swanson M, et al. Nonketotic Hyperglycinemia. 2002 Nov 14 [Updated 2019 May 23]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet].
138. Coughlin CR 2nd, Swanson MA, Kronquist K, Acquaviva C, Hutchin T, Rodríguez-Pombo P, et al. The genetic basis of classic nonketotic hyperglycinemia due to mutations in GLDC and AMT. *Genet Med.* 2017;19:104-111. doi: 10.1038/gim.2016.74.
139. Nitzahn M, Lipshutz GS. CPS1: Looking at an ancient enzyme in a modern light. *Mol Genet Metab.* 2020 Nov;131(3):289-298. doi: 10.1016/j.ymgme.2020.10.003.
140. Ah Mew N, Simpson KL, Gropman AL, et al. Urea Cycle Disorders Overview. 2003 Apr 29 [Updated 2017 Jun 22]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet].
141. Ganetzky R, Stojinski C. Mitochondrial Short-Chain Enoyl-CoA Hydratase 1 Deficiency. 2019 Jun 20. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet].
142. Masnada S, Parazzini C, Bini P, Barbarini M, Alberti L, Valente M, et al. Phenotypic spectrum of short-chain enoyl-Coa hydratase-1 (ECHS1) deficiency. *Eur J Paediatr Neurol.* 2020;28:151-158. doi: 10.1016/j.ejpn.2020.07.007.
143. Ganetzky R, McCormick EM, Falk MJ. Primary Pyruvate Dehydrogenase Complex Deficiency Overview. 2021 Jun 17. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews.*
144. Bhandary S, Aguan K. Pyruvate dehydrogenase complex deficiency and its relationship with epilepsy frequency--An overview. *Epilepsy Res.* 2015;116:40-52. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2015.07.002.
145. Diodato D, Ghezzi D, Tiranti V. The mitochondrial aminoacyl tRNA synthetases: genes and syndromes. *Int J Cell Biol.* 2014;2014: 787956. <https://doi.org/10.1155/2014/787956>.

146. Edvardson S, Shaag A, Kolesnikova O, Gomori JM, Tarassov I, Einbinder T, et al. Deleterious mutation in the mitochondrial arginyl- transfer RNA synthetase gene is associated with pontocerebellar hypoplasia. *Am J Hum Genet* 2007;81:857–862. doi: 10.1086/521227.
147. Lühl S, Bode H, Schlötzer W, Bartsakoulia M, Horvath R, Abicht A, et al. Novel homozygous RARS2 mutation in two siblings without pontocerebellar hypoplasia - further expansion of the phenotypic spectrum. *Orphanet J Rare Dis.* 2016 Oct 21;11(1):140. doi: 10.1186/s13023-016-0525-9.
148. Mathew T, Avati A, D’Souza D, Therambil M. Expanding spectrum of RARS2 gene disorders: Myoclonic epilepsy, mental retardation, spasticity, and extrapyramidal features. *Epilepsia Open* 2018; 3(2):270–275. doi: 10.1002/epi4.12108.
149. Nevanlinna V, Konovalova S, Ceulemans B, Muona M, Laari A, Hilander T, et al. A patient with pontocerebellar hypoplasia type 6: Novel RARS2 mutations, comparison to previously published patients and clinical distinction from PEHO syndrome. *Eur J Med Genet.* 2020;63:103766. doi: 10.1016/j.ejmg.2019.103766.
150. Ruzman L, Kolic I, Nisevic JR, Barsic AR, Prpic IS, Prpic I. A novel VARS2 gene variant in a patient with epileptic encephalopathy, *Upsala Journal of Medical Sciences* 2019;124:4, 273-277. doi:10.1080/03009734.2019.1670297.
151. Bruni F, Di Meo I, Bellacchio E, Webb BD, McFarland R, Chrzanowska-Lightowlers ZMA, et al. Clinical, biochemical, and genetic features associated with VARS2-related mitochondrial disease. *Hum Mutat.* 2018;39(4):563-578. doi: 10.1002/humu.23398.
152. Johannesen KM, Mitter D, Janowski R, Roth C, Toulouse J, Poulat AL, et al. Defining and expanding the phenotype of *QARS*-associated developmental epileptic encephalopathy. *Neurol Genet.* 2019 Dec 10;5(6):e373. doi: 10.1212/NXG.0000000000000373.
153. Chan DL, Rudinger-Thirion J, Frugier M, Riley LG, Ho G, Kothur K, et al. A case of *QARS1* associated epileptic encephalopathy and review of epilepsy in aminoacyl-tRNA synthetase disorders. *Brain Dev.* 2022;44(2):142-147. doi: 10.1016/j.braindev.2021.10.009.
154. Fu C, Armstrong D, Marsh E, Lieberman D, Motil K, Witt R, et al. Consensus guidelines on managing Rett syndrome across the lifespan. *BMJ Paediatrics Open* 2020;4:e000717. doi:10.1136/bmjpo-2020-000717.
155. Punwani D, Zhang Y, Yu J, Cowan MJ, Rana S, Kwan A, et al. Multisystem Anomalies in Severe Combined Immunodeficiency with Mutant *BCL11B*. *N Engl J Med.* 2016;375(22):2165-2176. doi: 10.1056/NEJMoa1509164.
156. Lessel D, Gehbauer C, Bramswig NC, Schluth-Bolard C, Venkataramanappa S, van Gassen KLI, et al. *BCL11B* mutations in patients affected by a neurodevelopmental disorder with

- reduced type 2 innate lymphoid cells. *Brain* 2018;141:2299-2311. doi: 10.1093/brain/awy173.
157. Snijders Blok L, Rousseau J, Twist J, Ehresmann S, Takaku M, Venselaar H, *et al.* CDH3 helicase domain mutations cause a neurodevelopmental syndrome with macrocephaly and impaired speech and language. *Nature Commun.* 2018;9:4619. doi: 10.1038/s41467-018-06014-6.
158. Drivas TG, Li D, Nair D, Alaimo JT, Alders M, Altmüller J, *et al.* A second cohort of *CHD3* patients expands the molecular mechanisms known to cause Snijders Blok-Campeau syndrome. *Eur J Hum Genet* 2020;28:1422–31. <https://doi.org/10.1038/s41431-020-0654-4>.
159. Stevens CA. Rubinstein-Taybi Syndrome. 2002 Aug 30 [Updated 2019 Aug 22]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, *et al.*, editors. GeneReviews® [Internet]
160. Cohen JL, Schrier Vergano SA, Mazzola S, Strong A, Keena B, McDougall C, *et al.* EP300-related Rubinstein-Taybi syndrome: Highlighted rare phenotypic findings and a genotype-phenotype meta-analysis of 74 patients. *Am J Med Genet A.* 2020 Dec;182(12):2926-2938. doi: 10.1002/ajmg.a.61883.
161. Wan L, Liu X, Hu L, Chen H, Sun Y, Li Z, *et al.* Genotypes and Phenotypes of MEF2C Haploinsufficiency Syndrome: New Cases and Novel Point Mutations. *Front. Pediatr.* 2021;9:664449. doi: 10.3389/fped.2021.664449.
162. Borlot F, Whitney R, Cohn RD, Weiss SK. MEF2C-related epilepsy: Delineating the phenotypic spectrum from a novel mutation and literature review. *Seizure.* 2019;67:86-90. doi: 10.1016/j.seizure.2019.03.015.
163. Carapito R, Ivanova EL, Morlon A, Meng L, Molitor A, Erdmann E, *et al.* ZMIZ1 variants cause a syndromic neurodevelopmental disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 2019;104:319-330. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.12.007.
164. den Hoed J, de Boer E, Voisin N, Dingemans AJM, Guex N, Wiel L, *et al.* Mutation-specific pathophysiological mechanisms define different neurodevelopmental disorders associated with SATB1 dysfunction. *Am. J. Hum. Genet.* 2021;108: 346-356. doi: 10.1016/j.ajhg.2021.01.007.
165. Tokita MJ, Braxton AA,1,2 Yunru Shao Y, Lewis AM, Vincent M, Küry S, Besnard T, *et al.* De Novo Truncating Variants in *SON* Cause Intellectual Disability, Congenital Malformations, and Failure to Thrive, *The American Journal of Human Genetics* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.06.035>.
166. Kim JH, Shinde DN, Reijnders MRF, Hauser NA, Belmonte RL, Wilson GR, *et al.* De novo mutations in SON disrupt RNA splicing of genes essential for brain development and



- metabolism, causing an intellectual-disability syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 2016;99:711-719.
167. Reijnders MRF, Janowski R, Alvi M, Self JE, van Essen TJ, Vreeburg M, *et al.* PURA syndrome: clinical delineation and genotype-phenotype study in 32 individuals with review of published literature. *Journal of Medical Genetics* 2018;55:104-113. doi: 10.1136/jmedgenet-2017-104946.
168. Lee BH, Reijnders MRF, Abubakare O, Tuttle E, Lape B, Minks KQ, *et al.* Expanding the neurodevelopmental phenotype of PURA syndrome. *Am J Med Genet A.* 2018 Jan;176(1):56-67. doi: 10.1002/ajmg.a.38521.
169. Huisman S, Mulder PA, Redeker E, Bader I, Bisgaard AM, Brooks A, *et al.* Phenotypes and genotypes in individuals with SMC1A variants. *Am J Med Genet A.* 2017 Aug;173(8):2108-2125. doi: 10.1002/ajmg.a.38279.
170. Symonds JD, Joss S, Metcalfe KA, Somarathi S, Cruden J, Devlin AM, *et al.* Heterozygous truncation mutations of the SMC1A gene cause a severe early onset epilepsy with cluster seizures in females: detailed phenotyping of 10 new cases. *Epilepsia.* 2017;58: 565-575. doi: 10.1111/epi.13669.
171. Xia F, Bainbridge MN, Tan TY, Wangler MF, Scheuerle AE, *et al.* De novo truncating mutations in *AHDCl* in individuals with syndromic expressive language delay, hypotonia, and sleep apnea. *Am. J. Hum. Genet.* 2014;94: 784-789. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.04.006.
172. Plaisier E, Ronco P. *COL4A1*-Related Disorders. 2009 Jun 25 [Updated 2016 Jul 7]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, *et al.*, editors. *GeneReviews*.
173. Zagaglia S, Selch C, Nisevic JR, Mei D, Michalak Z, Hernandez-Hernandez L, *et al.* Neurologic phenotypes associated with *COL4A1/2* mutations: Expanding the spectrum of disease. *Neurology.* 2018;91(22):e2078-e2088. doi: 10.1212/WNL.0000000000006567.
174. Vitale G, Pichiecchio A, Ormitti F, Tonduti D, Asaro A, Farina L, *et al.* Cortical malformations and COL4A1 mutation: Three new cases. *Eur J Paediatr Neurol.* 2019;23(3):410-417. doi: 10.1016/j.ejpn.2019.02.006.
175. Bayat A, Bayat M, Rubboli G, Møller RS. Epilepsy Syndromes in the First Year of Life and Usefulness of Genetic Testing for Precision Therapy. *Genes.* 2021; 12: 1051-70. <https://doi.org/10.3390/genes12071051>.
176. Helbig I, Tayoun AA. Understanding Genotypes and Phenotypes in Epileptic Encephalopathies. *Mol Syndromol.* 2016;7(4):172-181. doi: 10.1159/000448530.

177. Lindy AS, Stosser MB, Bulter E, Downtain-Pickersgill C, Shanmugham A, Retterer K, et al. Diagnostic outcomes for genetic testing of 70 genes in 8565 patients with epilepsy and neurodevelopmental disorders. *Epilepsia* 2018; 59:1062–71. doi: 10.1111/epi.14074.
178. Symonds JD, Zuberi SM, Stewart K, McLellan A, O'Regan M, MacLeod S, et al. Incidence and phenotypes of childhood-onset genetic epilepsies: a prospective population-based national cohort. *Brain*. 2019;142(8):2303-2318. doi: 10.1093/brain/awz195.
179. Fernández IS, Loddenkemper T, Gaínza-Lein M, Sheidley BR, Poduri A. Diagnostic yield of genetic tests in epilepsy: A meta-analysis and cost-effectiveness study. *Neurology*. 2019;92(5):e418-28. doi: 10.1212/WNL.0000000000006850.
180. Stöberg T, Tomson T, Barbaro M, Stranneheim H, Anderlid BM, Carlsson S, et al. Epilepsy syndromes, etiologies, and the use of next-generation sequencing in epilepsy presenting in the first 2 years of life: A population-based study. *Epilepsia*. 2020;61(11):2486-2499. doi: 10.1111/epi.16701.
181. Heyne HO, Singh T, Stamberger H, Abou Jamra R, Caglayan H, Craiu D, et al. De novo variants in neurodevelopmental disorders with epilepsy. *Nat Genet*. 2018;50(7):1048-1053. doi: 10.1038/s41588-018-0143-7.
182. Specchio N, Curatolo P. Developmental and epileptic encephalopathies: what we do and do not know. *Brain*. 2021;144(1):32–43. doi.org/10.1093/brain/awaa371.
183. Kim HJ, Yang D, Kim SH, Kim B, Kim HD, Lee JS, et al. Genetic and clinical features of SCN8A developmental and epileptic encephalopathy. *Epilepsy Res*. 2019;158:106222. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2019.106222.
184. Gardella E, Marini C, Trivisano M, Fitzgerald MP, Alber M, Howell KB, et al. The phenotype of SCN8A developmental and epileptic encephalopathy. *Neurology*. 2018;91(12):e1112-e1124. doi: 10.1212/WNL.0000000000006199.
185. Wagnon JL, Barker BS, Hounshell JA, Haaxma CA, Shealy A, Moss T, Parikh S, Messer RD, Patel MK, Meisler MH. Pathogenic mechanism of recurrent mutations of SCN8A in epileptic encephalopathy. *Ann Clin Transl Neurol*. 2015;3(2):114-23. doi: 10.1002/acn3.276.
186. Blanchard MG, Willemsen MH, Walker JB, Dib-Hajj SD, Waxman SG, Jongmans MC, et al. De novo gain-of-function and loss-of-function mutations of SCN8A in patients with intellectual disabilities and epilepsy. *J Med Genet*. 2015;52(5):330-7. doi: 10.1136/jmedgenet-2014-102813.
187. Yuskaitis CJ, Ruzhnikov MRZ, Howell KB, Allen IE, Kapur K, Dlugos DJ, et al. Infantile Spasms of Unknown Cause: Predictors of Outcome and Genotype-Phenotype Correlation. *Pediatr Neurol*. 2018;87:48-56. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2018.04.012.

188. Olson HE, Kelly M, LaCoursiere CM, Pinsky R, Tambunan D, Shain C, et al. Genetics and genotype-phenotype correlations in early onset epileptic encephalopathy with burst suppression. *Ann Neurol*. 2017;81(3):419-429. doi: 10.1002/ana.24883.
189. Dedek K, Fusco L, Teloy N, Steinlein OK. Neonatal convulsions and epileptic encephalopathy in an Italian family with a missense mutation in the fifth transmembrane region of KCNQ2. *Epilepsy Res*. 2003;54(1):21-7. doi: 10.1016/s0920-1211(03)00037-8.
190. Freibauer A, Jones K. KCNQ2 mutation in an infant with encephalopathy of infancy with migrating focal seizures. *Epileptic Disord*. 2018;20(6):541-544. doi: 10.1684/epd.2018.1011.
191. Edvardson S, Oz S, Abulhijaa FA, Taher FB, Shaag A, Zenvirt S, et al. Early infantile epileptic encephalopathy associated with a high voltage gated calcium channelopathy. *J Med Genet*. 2013;50:118–23.
192. Kosseifi CE, Cornet MC, Cilio MR. Neonatal Developmental and Epileptic Encephalopathies. *Semin Pediatr Neurol*. 2019;21:100770.
193. Fry AE, Fawcett KA, Zelnik N, Yuan H, Thompson BAN, Shemer-Meiri L, et al. De novo mutations in GRIN1 cause extensive bilateral polymicrogyria. *Brain*. 2018;141(3):698-712. doi: 10.1093/brain/awx358.
194. Myers SJ, Yuan H, Kang JQ, Tan FCK, Traynellis SF, Low CM. Distinct roles of *GRIN2A* and *GRIN2B* variants in neurological conditions [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research* 2019, **8**(F1000 Faculty Rev):1940. doi.org/10.12688/f1000research.18949.1
195. Bleakley LE, McKenzie CE, Soh MS, Forster IC, Pinares-Garcia P, Sedo A, et al. Cation leak underlies neuronal excitability in an HCN1 developmental and epileptic encephalopathy. *Brain*. 2021;144(7):2060-2073. doi: 10.1093/brain/awab145.
196. Klepper J, Akman C, Armeno M, Auvin S, Cervenka M, Cross HJ, et al. Glut1 Deficiency Syndrome (Glut1DS): State of the art in 2020 and recommendations of the international Glut1DS study group. *Epilepsia Open*. 2020;5(3):354-365. doi: 10.1002/epi4.12414.
197. Lan Y, Yi S, Li M, Wang J, Yang Q, Yi S, et al. Case Report: Christianson Syndrome Caused by *SLC9A6* Mutation: From Case to Genotype-Phenotype Analysis. *Front Genet*. 2021;12:783841. doi: 10.3389/fgene.2021.783841.
198. Ng BG, Sosicka P, Agadi S, Almannai M, Bacino CA, Barone R, et al. SLC35A2-CDG: Functional characterization, expanded molecular, clinical, and biochemical phenotypes of 30 unreported Individuals. *Hum Mutat*. 2019 Jul;40(7):908-925. doi: 10.1002/humu.23731.

199. Ojha R, Prasad AN. Menkes disease: what a multidisciplinary approach can do. *J Multidiscip Healthc.* 2016;9:371-85. doi: 10.2147/JMDH.S93454.
200. Xian J, Parthasarathy S, Ruggiero S, Balagura G, Fitch E, Helbig K, et al. Assessing the landscape of *STXBPI*-related disorders in 534 individuals, *Brain.* 2021; awab327, <https://doi.org/10.1093/brain/awab327>.
201. Vlaskamp DR, Rump P, Callenbach PM, Vos YJ, Sikkema-Raddatz B, van Ravenswaaij-Arts CM, et al. Haploinsufficiency of the *STX1B* gene is associated with myoclonic astatic epilepsy. *Eur J Paediatr Neurol.* 2016;20(3):489-92. doi: 10.1016/j.ejpn.2015.12.014.
202. Heron SE, Dibbens LM. Role of *PRRT2* in common paroxysmal neurological disorders: a gene with remarkable pleiotropy. *J Med Genet.* 2013;50(3):133-9. doi: 10.1136/jmedgenet-2012-101406.
203. Nashabat M, Al Qahtani XS, Almakdub S, Altwaijri W, Ba-Armah DM, Hundallah K, et al. The landscape of early infantile epileptic encephalopathy in a consanguineous population. *Seizure.* 2019;69:154-172. doi: 10.1016/j.seizure.2019.04.018.
204. Hector RD, Kalscheuer VM, Hennig F, Leonard H, Downs J, Clarke A, et al. *CDKL5* variants: Improving our understanding of a rare neurologic disorder. *Neurol Genet.* 2017;3(6):e200. doi: 10.1212/NXG.0000000000000200.
205. Widowati EW, Ernst S, Hausmann R, Müller-Newen G, Becker W. Functional characterization of *DYRK1A* missense variants associated with a syndromic form of intellectual deficiency and autism. *Biol Open.* 2018;7(4):bio032862. doi: 10.1242/bio.032862.
206. Lotte J, Bast T, Borusiak P, Coppola A, Cross JH, Dimova P, et al. Effectiveness of antiepileptic therapy in patients with *PCDH19* mutations. *Seizure.* 2016;35:106-10. doi: 10.1016/j.seizure.2016.01.006.
207. Kurian M, Korff CM, Ranza E, Bernasconi A, Lübbig A, Nangia S, et al. Focal cortical malformations in children with early infantile epilepsy and *PCDH19* mutations: case report. *Dev Med Child Neurol.* 2018 Jan;60(1):100-105. doi: 10.1111/dmcn.13595.
208. Smith L, Singhal N, El Achkar CM, Truglio G, Rosen Sheidley B, Sullivan J, et al. *PCDH19*-related epilepsy is associated with a broad neurodevelopmental spectrum. *Epilepsia.* 2018;59(3):679-689. doi: 10.1111/epi.14003.
209. Marzo MG, Griswold JM, Ruff KM, Buchmeier RE, Fees CP, Markus SM. Molecular basis for dyneinopathies reveals insight into dynein regulation and dysfunction. *Elife.* 2019;8:e47246. doi: 10.7554/eLife.47246.

210. Di Donato N, Timms AE, Aldinger KA, Mirzaa GM, Bennett JT, Collins S, et al. Analysis of 17 genes detects mutations in 81% of 811 patients with lissencephaly. *Genet Med*. 2018 Nov;20(11):1354-1364. doi: 10.1038/gim.2018.8.
211. van Dijk T, van Ruissen F, Jaeger B, Rodenburg RJ, Tamminga S, van Maarle M, et al. RARS2 mutations: is pontocerebellar hypoplasia type 6 a mitochondrial encephalopathy? *JIMD Rep*. 2017;33:87–92.
212. Sharpe AJ, McKenzie M. Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Disorders Associated with Short-Chain Enoyl-CoA Hydratase (ECHS1) Deficiency. *Cells*. 2018;7(6):46. doi: 10.3390/cells7060046.
213. Wright CF, Quaipe NM, Ramos-Hernandez L, Danecek P, Ferla MP, Samocha KE, et al. Non-coding region variants upstream of MEF2C cause severe developmental disorder through three distinct loss-of-function mechanisms. *Am. J. Hum. Genet*. 2021;108:1083-94.
214. Faergeman SL, Bojesen AB, Rasmussen M, Becher N, Andreasen L, Andersen BN, et al. Phenotypic heterogeneity and mosaicism in Xia-Gibbs syndrome: Five Danish patients with novel variants in AHDC1. *Eur J Med Genet*. 2021;64(9):104280. doi: 10.1016/j.ejmg.2021.104280.
215. Khayat MM, Li H, Chander V, Hu J, Hansen AW, Li S, et al. Phenotypic and protein localization heterogeneity associated with AHDC1 pathogenic protein-truncating alleles in Xia-Gibbs syndrome. *Hum Mutat*. 2021;42(5):577-591. doi: 10.1002/humu.24190
216. Johannesen KM, Gardella E, Gjerulfsen CE, Bayat A, Rouhl RPW, Reijnders M, et al. *PURA*-Related Developmental and Epileptic Encephalopathy: Phenotypic and Genotypic Spectrum. *Neurol Genet*. 2021;7(6):e613. doi: 10.1212/NXG.0000000000000613.
217. Posey JE, Rosenfeld JA, James RA, Bainbridge M, Niu Z, Wang X, et al. Molecular diagnostic experience of whole-exome sequencing in adult patients. *Genet Med*. 2016 Jul;18(7):678-85. doi: 10.1038/gim.2015.142.
218. Wang QH, Zou LP, Zhang MN, Wang YY, Lu Q, Shen YW, et al. Phenotypic characterization of COL4A1-related West syndrome. *Epilepsy Res*. 2020;164:106349. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2020.106349.
219. Dymont DA, Tétreault M, Beaulieu CL, Hartley T, Ferreira P, Chardon JW, et al. Whole-exome sequencing broadens the phenotypic spectrum of rare pediatric epilepsy: a retrospective study. *Clin Genet*. 2015;88(1):34-40. doi: 10.1111/cge.12464.
220. Retterer K, Juusola J, Cho MT, Vitazka P, Millan F, Gibellini F, et al. Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. *Genet Med*. 2016;18(7):696-704. doi: 10.1038/gim.2015.148.

221. Roctus A, Olson HE, Smith L, Keith LG, El Achkar C, Taylor A, et al. Genetic diagnoses in epilepsy: The impact of dynamic exome analysis in a pediatric cohort. *Epilepsia*. 2020;61(2):249-258. doi: 10.1111/epi.16427.
222. SoRelle JA, Pascual JM, Gotway G, Park JY. Assessment of Interlaboratory Variation in the Interpretation of Genomic Test Results in Patients with Epilepsy. *JAMA Netw Open*. 2020;3(4):e203812. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.381.
223. Sands TT, Choi H. Genetic Testing in Pediatric Epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2017;17(5):45. doi: 10.1007/s11910-017-0753-y.
224. Manickam K, McClain MR, Demmer LA, Biswas S, Kearney HM, Malinowski J, et al. Exome and genome sequencing for pediatric patients with congenital anomalies or intellectual disability: an evidence-based clinical guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med*. 2021 Nov;23(11):2029-2037. doi: 10.1038/s41436-021-01242-6.

## Anexo I: Aprovação no Comitê de Ética do Instituto Fernandes Figueira

INSTITUTO FERNANDES  
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/  
MS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Caracterização fenotípica das epilepsias geneticamente determinadas diagnosticadas pelo sequenciamento de nova geração.

**Pesquisador:** Fernanda Veiga de Góes

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 4

**CAAE:** 09609319.1.0000.5269

**Instituição Proponente:** Instituto Fernandes Figueira - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.280.944

#### Apresentação do Projeto:

Resposta à pendência do parecer 3.273.142 de 18 de Abril de 2019.

#### Objetivo da Pesquisa:

Responder à pendência para retirar do TCLE a frase "Faremos perguntas que podem deixar você ou seu filho sem graça" sem prejuízo da descrição do risco à participação na pesquisa.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Aprovados no referido parecer.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

-

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE foi ajustado conforme recomendação do CEP-IFF.

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Encaminhar ao CEP relatórios semestrais ao longo do desenvolvimento da pesquisa e ao término encaminhar relatório final.

Endereço: RUI BARBOSA, 716  
Bairro: FLAMENGO CEP: 22.250-020  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)2554-1730 Fax: (21)2552-8491 E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br

**INSTITUTO FERNANDES  
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/  
MS**



Continuação do Parecer: 3.280.944

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1310200.pdf	22/04/2019 11:53:56		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_encefalopatia_epileptica_3v.pdf	22/04/2019 11:53:16	Fernanda Veiga de Góes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_EPILEPSIA.pdf	22/03/2019 21:22:45	Fernanda Veiga de Góes	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	14/03/2019 15:49:53	Fernanda Veiga de Góes	Aceito
Outros	Carta_Chefia_Pediatria.pdf	14/03/2019 15:45:41	Fernanda Veiga de Góes	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_Pesquisa.pdf	14/03/2019 15:43:54	Fernanda Veiga de Góes	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

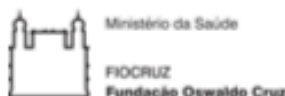
RIO DE JANEIRO, 24 de Abril de 2019

---

**Assinado por:  
Ana Maria Aranha Magalhães Costa  
(Coordenador(a))**



## Apêndice I – Termo de consentimento livre e esclarecido



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com as normas da Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466 de 12/12/2012)

**Título do Projeto: Caracterização fenotípica das epilepsias geneticamente determinadas diagnosticadas pelo sequenciamento de nova geração.**

**Investigador responsável: Fernanda Veiga de Góes**

**Co-investigadores: Dafne Dain Gandelman Horovitz**

Participante: \_\_\_\_\_ Prontuário: \_\_\_\_\_

#### 1- Apresentação

Você / seu(sua) filho(a) está sendo convidado para participar da pesquisa "*Caracterização fenotípica das epilepsias geneticamente determinadas diagnosticadas pelo sequenciamento de nova geração*", pois você / seu(sua) filho(a) apresenta um tipo de epilepsia de causa genética. Os genes são estruturas das células que determinam a maior parte das características das pessoas, como cor dos olhos, tipo de cabelo, etc. Nessas epilepsias há uma alteração em determinados genes causando defeitos nas células do cérebro e a epilepsia. Descobrimos essas alterações genéticas através de exames especiais, como o "*sequenciamento de nova geração*", que estudam os genes verificando se eles estão alterados.

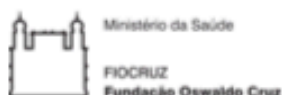
A maioria dessas epilepsias genéticas é grave e está relacionada a outros problemas cerebrais que comprometem o desenvolvimento normal da criança desde bem pequena. Essas epilepsias genéticas são condições muito raras e pouco conhecidas. Os poucos estudos a respeito são de outros países, com crianças muito diferentes das brasileiras. Ou seja, não sabemos nada sobre essas epilepsias na nossa população. O objetivo desse trabalho é descrever as alterações genéticas encontradas nessas epilepsias em crianças atendidas por médicos Neurologistas, Neurologistas Infantil ou Geneticistas, que ajudarão o conhecimento sobre essas doenças no Brasil e o desenvolvimento de tratamentos mais adequados, ajudando as pessoas que sofrem desse grave problema. O resultado desse estudo deverá ser divulgado em artigos científicos (nacionais e internacionais) ou divulgados em congressos, simpósios, reuniões científicas, conferências, mesas redondas (nacionais e internacionais), salas de aula e etc.

A participação sua e de seu filho(a) consistirá de fornecer mais informações clínicas a respeito da saúde do seu filho(a) através de perguntas que iremos fazer e informações e exames que iremos analisar

TCLE versão 3\_abril2019

\_\_\_\_\_  
Rubrica Paciente / Responsável

\_\_\_\_\_  
Rubrica Pesquisador



do prontuário. Os pacientes deste estudo não serão submetidos a nenhum novo exame, além daqueles já tenham sido realizados.

*A participação deve ser inteiramente voluntária.*

## **2. Riscos e Benefícios**

Os possíveis desconfortos envolvidos no estudo podem ser relacionados ao ato da entrevista e o questionamento sobre a história clínica, avaliações clínicas neurológicas e avaliação dos exames já realizados. Faremos perguntas e vocês tem a liberdade de não responder caso não se sintam a vontade. Da mesma forma, caso se sintam desconfortáveis durante o exame físico, poderemos interromper conforme seu desejo.

Um risco deste tipo de pesquisa é a quebra de confidencialidade e anonimato. Você e seu filho(a) tem direito a confidencialidade e anonimato. Nenhuma informação que identifique vocês será divulgada. Para evitar esse risco, iremos manter os documentos em lugar seguro, somente os pesquisadores irão manusear esses documentos e os prontuários. E os pesquisadores são obrigados por lei a guardar total sigilo a respeito de todas informações. Os dados colhidos serão transcritos para planilhas sem identificação dos participantes, onde cada um deles recebe um código sem relação com sua identidade.

Os benefícios com a sua participação / de seu(sua) filho(a) são relacionados ao avanço do conhecimento científico e médico sobre as epilepsias de causa genética na população brasileira. O estudo pormenorizado do caso do seu filho(a) pode melhorar nosso entendimento sobre o problema específico dele melhorando o tratamento que estamos oferecendo neste momento.

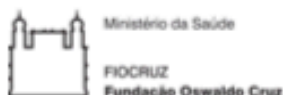
## **2. Garantias e Direitos**

Além do direito a confidencialidade e anonimato, você tem direito a se negar a participar do estudo ou deixa-lo a qualquer momento, e as informações colhidas sobre seu filho(a) não serão mais usadas. Você tem a garantia de que sua negativa não irá prejudicar a assistência ao seu filho por nossa equipe. Você tem direito a acesso aos resultados e conclusões desse trabalho, bem como aos resultados apurados com a participação do seu filho. Você tem direito ao ressarcimento a despesas relativas a sua participação nessa pesquisa. Porém, não haverá nenhuma forma de remuneração por sua participação / de seu(sua) filho(a). Você tem direito a indenização por danos comprovadamente causados por essa pesquisa.

TCLE versão 3\_abril2019

Rubrica Paciente / Responsável

Rubrica Pesquisador



As suas dúvidas serão respondidas a qualquer momento. Para isto você pode entrar em contato com os médicos responsáveis pelo estudo, pessoalmente (Instituto Nacional de Saúde de Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira – Av. Rui Barbosa 716 – Flamengo – Rio de Janeiro), por correio eletrônico (e-mail: [fevegoes@iff.fiocruz.com.br](mailto:fevegoes@iff.fiocruz.com.br) ou [fernanda.veiga@terra.com.br](mailto:fernanda.veiga@terra.com.br)) ou pelo telefone (XX) (21) 2554-1805. Você revisou plenamente os conteúdos deste consentimento e os teve descritos para você.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Fernandes Figueira se encontra a disposição para eventuais esclarecimentos éticos e outras providências que se façam necessárias. **CEP IFF:** Avenida Rui Barbosa 716 – Flamengo - Rio de Janeiro – RJ. Telefone: 21 2554-1730 / fax 2552-8491; e-mail: [cepiff@iff.fiocruz.br](mailto:cepiff@iff.fiocruz.br)

Este Termo foi redigido em duas vias originais de igual teor, sendo uma para o participante / responsável e outra para o pesquisador. Ambos devem assinar e rubricar as duas vias.

Eu, \_\_\_\_\_ ou na qualidade de responsável legal por \_\_\_\_\_, como \_\_\_\_\_ (grau de parentesco) autorizo voluntariamente minha participação / de meu(minha) filho(a) nesta pesquisa e concordo com os termos. Declaro que li e entendi todo o conteúdo deste documento, bem como os objetivos e condições de participação.

Assinatura \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_\_

## 2 – Testemunha

Nome \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_

## 3 – Investigador que obteve o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nome \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_

TCLE versão 3\_abril2019

\_\_\_\_\_  
Rubrica Paciente / Responsável

\_\_\_\_\_  
Rubrica Pesquisador

## Apêndice II – Termo de assentimento informado



### Termo de Assentimento informado – crianças/ adolescentes entre 12 e 18 anos

**Título do projeto: Caracterização fenotípica das epilepsias geneticamente determinadas diagnosticadas pelo sequenciamento de nova geração.**

**Instituição:** Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira.

**Pesquisador responsável:** Fernanda Veiga de Góes

**Assentimento informado para** \_\_\_\_\_

Olá!

Você sabe que toma remédios para um problema chamado epilepsia.

A epilepsia muda o jeito do seu cérebro funcionar.

O que é cérebro? É uma parte de você, que fica dentro da cabeça e comanda o seu corpo. É por causa da epilepsia que seu corpo faz movimentos e coisas estranhas, contra a sua vontade. Os remédios ajudam o seu cérebro a funcionar direitinho!



A gente consegue ver o seu cérebro funcionando com aquele exame que liga um monte de fios na sua cabeça. E podemos ver se os remédios estão fazendo efeito.

Aqui no IFF nós somos cientistas! E estamos fazendo uma pesquisa científica! Nós médicos queremos conhecer melhor a epilepsia, para ajudar você e outras crianças que também tem esse problema. A gente quer saber o que está fazendo seu cérebro funcionar diferente.

Por isso, precisamos que você ajude a gente! Vamos lá? Sua mãe ou o seu pai já deixaram você participar e eles vão ficar o tempo todo perto de você.

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_ Rubrica do voluntário \_\_\_\_\_

Tudo que você vai fazer é responder algumas perguntas. Iguais aquelas que os médicos fazem quando você está na consulta. Não vamos tirar sangue, nem precisar fazer o exame dos fios na cabeça. A gente só vai conversar, mesmo!

Depois da nossa conversa, a gente vai olhar os exames que você já fez. Tudo isso pra entender um monte de coisas que os médicos ainda não conhecem sobre a epilepsia. Não é legal?

Veja só: ninguém vai ficar sabendo que você participou (só se você contar!), e tudo que você falar pra gente fica em segredo! Se você já tiver 12 anos, nem seus pais vão ficar sabendo dos segredos que você falar pra gente (a não ser que você conte!). Essa é a regra que chamamos de "anonimato" e "confidencialidade".

Se você não estiver gostando de participar, você pode parar a qualquer hora, ok? Mas a gente pede que você se esforce, pois essa pesquisa é muito importante.

Quando terminarmos a pesquisa, iremos falar com mais cientistas sobre o que encontramos. Iremos também escrever artigos para revistas contando o que descobrimos sobre a epilepsia. Mas fica tranquilo: seu nome não vai aparecer nem contaremos seus segredos! Lembre-se do "anonimato" e da "confidencialidade"

Se você concorda em ajudar a gente, escreve seu nome na linha abaixo.

Um abração!

Assinatura da criança/adolescente: \_\_\_\_\_

Assinatura dos pais/responsáveis: \_\_\_\_\_

Ass. Pesquisador: \_\_\_\_\_

Dia/mês/ano: \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_ Rubrica do voluntário \_\_\_\_\_

## Apêndice III - Ficha de coleta de dados

### FICHA DE COLETA DE DADOS DOS PACIENTES COM EPILEPSIA GENETICAMENTE DETERMINADA

Número da ficha: \_\_\_\_\_

Paciente: \_\_\_\_\_

DN: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Naturalidade: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_anos \_\_\_meses Dia da coleta de dados: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Município: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

Médico: \_\_\_\_\_

TCLE: ( ) sim ( ) não. Plano de saúde suplementar: ( ) sim ( ) não

#### Diagnóstico da epilepsia de origem genética:

GENE: \_\_\_\_\_

Variante encontrada: \_\_\_\_\_

Classificação da variante segundo a ACMG:

- a) Patogênica c) VUS (variante de significado incerto)  
 b) Provavelmente patogênica

Tipo de exame realizado:

- a) Exoma b) Painel genético c) Genoma

Teste de Trio: ( ) sim ( ) não

Data da solicitação do exame: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_; Data da realização: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Intervalo de tempo entre a solicitação e a realização do exame: \_\_\_ meses

Financiamento do exame: a) particular b) SUS c) plano de saúde suplementar

#### Epilepsia

Idade do início das crises epilépticas: \_\_\_anos \_\_\_meses

Idade do diagnóstico da epilepsia: \_\_\_anos \_\_\_meses

Padrão de crises segundo a Classificação de ILAE 2017:

##### 1. Início focal ( ) sim ( ) não

1.1 Perceptivas ( ) sim ( ) não	1.2 disperceptivas ( ) sim ( ) não
1.3 Início motor ( ) sim ( ) não	1.4 Início não motor ( ) sim ( ) não
1.5 Focal evoluindo para tônico-clônica bilateral ( ) sim ( ) não	

##### 2. Início generalizado ( ) sim ( ) não

- 2.1. Motoras ( ) sim ( ) não

2.1.1 tônico-clônicas ( ) sim ( ) não	2.1.2 clônicas ( ) sim ( ) não
2.1.3 tônicas ( ) sim ( ) não	2.1.4 mioclônicas ( ) sim ( ) não
2.1.5 mioclônica-tônico-clônicas ( ) sim ( ) não	2.1.6 mioclônica-atônica ( ) sim ( ) não
2.1.7 atônicas ( ) sim ( ) não	2.1.8 espasmo epiléptico ( ) sim ( ) não

## 2.2 Não motoras ( ) sim ( ) não

2.2.1 típicas ( ) sim ( ) não	2.2.2 atípicas ( ) sim ( ) não
2.2.3 mioclônicas ( ) sim ( ) não	
2.2.4 mioclônicas palpebrais ( ) sim ( ) não	

## 2 Início desconhecido ( ) sim ( ) não

3.1 motoras ( ) sim ( ) não	3.2 não motoras ( ) sim ( ) não
3.1.1 tônico-clônicas ( ) sim ( ) não	3.1.2 espasmos epilépticos ( ) sim ( ) não

## 3 Não classificada ( ) sim ( ) não



Tipo de epilepsia: ( ) focal ( ) generalizada ( ) combinada ( ) desconhecida

Síndrome epiléptica determinada: ( ) sim ( ) não ( ) ignorado

Idade do diagnóstico da síndrome epiléptica: \_\_\_ anos \_\_\_ meses / Qual: \_\_\_\_\_

Idade do diagnóstico da síndrome epiléptica: \_\_\_ anos \_\_\_ meses / Qual: \_\_\_\_\_

Idade do diagnóstico da síndrome epiléptica: \_\_\_ anos \_\_\_ meses / Qual: \_\_\_\_\_

Diagnóstico de encefalopatia epiléptica: ( ) sim ( ) não ( ) ignorado

Idade do diagnóstico de encefalopatia epiléptica: \_\_\_ anos \_\_\_ meses

**Tipo de síndrome epiléptica:**

A. Epilepsia mioclônica precoce	B. Síndrome de Ohtahara (EEIE)
C. Epilepsia com crises focais migratórias	D. Epilepsia neonatais autolimitadas
E. Síndrome de West	F. Síndrome Lennox-Gastaut
G. Síndrome Landau Kleffner	H. Síndrome Doose (mioclônica-atônica)
I. Ausência da infância	J. Epilepsia Ausência juvenil
K. Ausência mioclônica	L. Síndrome de Dravet
M. Epilepsia centro temporal autolimitada	N. Epilepsia centro temporal autolimitada atípica
O. Epilepsia occipital (Panaytopolus)	P. Epilepsia occipital (Gastaut)
Q. Epilepsia mioclônica juvenil	R. Epilepsia com crises TCG
S. ESES/ CSWS	T. Epilepsia reflexa

**Eletroencefalogramas realizados: ( ) sim ( ) não**

Resultados: Padrão focal ( ) sim ( ) não / generalizado ( ) sim ( ) não / multifocal ( ) sim ( ) não; Ausência de ritmo de base ( ) sim ( ) não / lentificação do ritmo de base ( ) sim ( ) não

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ laudo conclusivo: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ laudo conclusivo: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ laudo conclusivo: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ laudo conclusivo: \_\_\_\_\_

**Tomografia de crânio: ( ) sim ( ) não**

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ laudo: \_\_\_\_\_

**Ressonâncias de crânio: ( ) sim ( ) não**

Malformação do desenvolvimento cortical ( ) sim ( ) não / EHI ( ) sim ( ) não

Alteração de substância branca – leucopatia ( ) sim ( ) não

Hidrocefalia ( ) sim ( ) não / Alteração vascular ( ) sim ( ) não / Alt. cerebelares ( ) sim ( ) não

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ laudo: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ laudo: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ laudo: \_\_\_\_\_

Rnm de medula ( ) sim ( ) não ( ) ignorado



**Outros exames: Caso alterado anotar (SIM) / NA (Não realizado) / Não (normal)**

Triagem de EIM: ( ) sim ( ) não / amônia ( ) sim ( ) não / lactato ( ) sim ( ) não

Cromatografia de aminoácidos sangue ( ) sim ( ) não / Pesquisa de ácidos orgânicos urina ( ) sim ( ) não;

Perfil de acilcarnitina sangue ( ) sim ( ) não / Pesquisa de oligo e glicosaminoglicanos ( ) sim ( ) não;

Isofocalização da transferrina ( ) sim ( ) não / Dosagem enzimática: ( ) sim ( ) não

BERA ( ) sim ( ) não / Fundo de olho ( ) sim ( ) não / USG de abdome ( ) sim ( ) não

Avaliação cardiológica ( ) sim ( ) não / Acidose metabólica ( ) sim ( ) não

ENMG ( ) sim ( ) não / Polissonografia ( ) sim ( ) não

Exame alterado: \_\_\_\_\_ data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Exame alterado: \_\_\_\_\_ data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Outros exames: \_\_\_\_\_ data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Exames genéticos realizados**

a) Cariótipo banda G: ( ) sim ( ) não ( ) ignorado

a. Resultado: ( ) normal ( ) anormal \_\_\_\_\_

b) CGH-array ou SNP-array: ( ) sim ( ) não ( ) ignorado

a. Resultado: ( ) normal ( ) anormal \_\_\_\_\_

c) Exoma: ( ) sim ( ) não

a. Resultado: ( ) normal ( ) anormal \_\_\_\_\_

d) Painel genético: ( ) sim ( ) não

a. Resultado: ( ) normal ( ) anormal \_\_\_\_\_

**Antiepilépticos (DAE) já utilizados:**

1. Fenobarbital ( ) sim ( ) não	2. Fenitoína ( ) sim ( ) não	3. Ac valpróico ( ) sim ( ) não
4. Carbamazepina ( ) sim ( ) não	5. Oxcarbazepina ( ) sim ( ) não	6. Lamotrigina ( ) sim ( ) não
7. Topiramato ( ) sim ( ) não	8. Levetiracetan ( ) sim ( ) não	9. Lacosamida ( ) sim ( ) não
1. Vigabatrina ( ) sim ( ) não	2. Gabapentina ( ) sim ( ) não	3. Pregabalina ( ) sim ( ) não
4. Clobazam ( ) sim ( ) não	5. Clonazepam ( ) sim ( ) não	6. diazepam ( ) sim ( ) não
7. Nitrazepan ( ) sim ( ) não	8. Piridoxina ( ) sim ( ) não	9. Rufinamida ( ) sim ( ) não
10. Felbamato ( ) sim ( ) não	11. Canabidiol ( ) sim ( ) não	12. Sulthiame ( ) sim ( ) não

Quantidade de DAE utilizadas: \_\_\_\_\_

**Medicações anticrises utilizadas****Resposta clínica (considerada com redução de > 50% das crises e por mais de 6 meses)**

1. _____ 1.1. Resposta clínica ( ) sim ( ) não 1.2. Efeito colateral ( ) sim ( ) não 1.2.1. Qual: _____	2. _____ 2.1. Resposta clínica ( ) sim ( ) não 2.2. Efeito colateral ( ) sim ( ) não 2.2.1. Qual: _____
3. _____ 3.1. Resposta clínica ( ) sim ( ) não 3.2. Efeito colateral ( ) sim ( ) não Qual: _____	4. _____ 4.1. Resposta clínica ( ) sim ( ) não 4.2. Efeito colateral ( ) sim ( ) não Qual: _____
5. _____ 5.1. Resposta clínica ( ) sim ( ) não 5.2. Efeito colateral ( ) sim ( ) não Qual: _____	6. _____ 6.1. Resposta clínica ( ) sim ( ) não 6.2. Efeito colateral ( ) sim ( ) não Qual: _____
7. _____ 7.1. Resposta clínica ( ) sim ( ) não 7.2. Efeito colateral ( ) sim ( ) não Qual: _____	8. _____ 8.1. Resposta clínica ( ) sim ( ) não 8.2. Efeito colateral ( ) sim ( ) não Qual: _____

**Medicações atuais / dose:**

- 1) \_\_\_\_\_
- 2) \_\_\_\_\_
- 3) \_\_\_\_\_
- 4) \_\_\_\_\_
- 5) \_\_\_\_\_

1) **Imunoterapia:** ( ) sim ( ) não ( ) ignorado

Resposta clínica ( ) sim ( ) não ( ) ignorado / Efeito colateral ( ) sim ( ) não ( ) ignorado

Qual corticoterapia: ACTH: ( ) sim ( ) não / Corticoterapia oral: ( ) sim ( ) não

Pulsoterapia: ( ) sim ( ) não / IG: ( ) sim ( ) não

2) **Tratamento dietético para epilepsia:** ( ) sim ( ) não ( ) ignorado

Resposta clínica ( ) sim ( ) não ( ) ignorado / Efeito colateral ( ) sim ( ) não ( ) ignorado

Qual tratamento dietético:

Dieta cetogênica clássica: ( ) sim ( ) não

Dieta de baixo índice glicêmico: ( ) sim ( ) não

Dieta de Atkins modificada: ( ) sim ( ) não

3) **Estimulador do nervo vago:** ( ) sim ( ) não ( ) ignorado

Resposta clínica ( ) sim ( ) não / Parcial (<30%): ( ) sim ( ) não

Piora clínica ( ) sim ( ) não

Efeito colateral ( ) sim ( ) não / qual: \_\_\_\_\_

4) Canabidiol: ( ) sim ( ) não ( ) ignorado

Resposta clínica ( ) sim ( ) não / Piora clínica ( ) sim ( ) não

Efeito colateral ( ) sim ( ) não / qual: \_\_\_\_\_

**Características fenotípicas:**

• Atraso global do desenvolvimento: ( ) sim ( ) não Regressão: ( ) sim ( ) não

• Achados neurológicos: TEA ( ) sim ( ) não / DI: ( ) sim ( ) não

hipotonia ( ) sim ( ) não; hipertonia ( ) sim ( ) não; movimentos anormais ( ) sim ( ) não; nistagmo ( )

sim ( ) não; ataxia ( ) sim ( ) não; síndrome piramidal ( ) sim ( ) não; síndrome extrapiramidal ( ) sim

( ) não; Microcefalia: ( ) sim ( ) não; macrocefalia: ( ) sim ( ) não

• Achados extra-neurológicos: \_\_\_\_\_

• Dismorfismos: ( ) sim ( ) não

Quais: \_\_\_\_\_

HGP: \_\_\_\_\_

Internações prévias: \_\_\_\_\_

Cirurgias: \_\_\_\_\_

H Familiar: Epilepsia ( ) sim ( ) não / Consanguinidade ( ) sim ( ) não

O diagnóstico genético mudou a terapêutica: ( ) sim ( ) não

Se sim, assinale o motivo:

a) Adequação das medicações antiepilépticas ( ) sim ( ) não

b) Aconselhamento genético ( ) sim ( ) não

c) Interrupção de realizações de exames diagnósticos desnecessários ( ) sim ( ) não

d) Justificativa para gravidade clínica ( ) sim ( ) não

**Resumo da história epiléptica:**

## Apêndice IV – Artigo

1874-205X/22

Send Orders for Reprints to [reprints@benthamscience.net](mailto:reprints@benthamscience.net)

1



## The Open Neurology Journal

Content list available at: <http://dx.doi.org/10.1089/neurologyjournal.com>

## CASE REPORT

Cannabidiol Successful Therapy for Developmental and Epileptic Encephalopathy Related to *CYFIP2*Fernanda Veiga de Góes<sup>1\*</sup>, Jessyca Thays Melo de Andrade Ramos<sup>1</sup>, Rosiane da Silva Fontana<sup>2</sup>, Cassio Luiz de Carvalho Serão<sup>3</sup>, Fernando Kok<sup>4</sup> and Dafne Dain Gandelman Horovitz<sup>5</sup><sup>1</sup>Department of Pediatrics, Child Neurology Service, Fernandes Figueira Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil<sup>2</sup>Department of Epilepsy, Paulo Niemeyer Brain State Institute, Rio de Janeiro, Brazil<sup>3</sup>Department of Genetics, Petrópolis Medical School – Rio de Janeiro, Brazil<sup>4</sup>University of São Paulo of School of Medicine, São Paulo, Brazil<sup>5</sup>Department of Medical Genetics, Fernandes Figueira Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil

## Abstract:

## Background:

The knowledge about the molecular basis of epilepsies has increased enormously with the advent of next-generation sequencing (NGS) technology, and *CYFIP2* is one of the many genes recently recognized and associated with epilepsy. Pathogenic variants in *CYFIP2* cause Developmental and Epileptic Encephalopathy 65 (DEE65), which is characterized by hypotonia, profound developmental delay, and epilepsy.

## Case Presentation:

Herein, we report a 3-year-old male with an early onset epileptic encephalopathy (Ohtahara syndrome) evolving to Lennox-Gastaut syndrome refractory to several antiepileptic medications. Whole exome sequencing (WES) disclosed a heterozygous pathogenic variant p.(Arg87Cys) in *CYFIP2*, which occurred as a *de novo* event. After the introduction of cannabidiol, the patient remained seizure-free for 16 months and had a marked electroencephalographic improvement.

## Conclusion:

Cannabidiol might be a therapeutic option for *CYFIP2*-related epilepsy

Keywords: *CYFIP2*, Epilepsy, Epileptic encephalopathy, Cannabidiol, Lennox-Gastaut Syndrome, Pathogenic variants.

## Article History

Received: August 19, 2021

Revised: November 2, 2021

Accepted: January 11, 2022

## 1. INTRODUCTION

For many decades, the etiology of infantile-onset severe epilepsies remained obscure, and most of them were attributed to acquired injuries [1]. In the last two decades, advancements in molecular genetics allowed the identification of close to a hundred genes associated with what is now collectively known as developmental and epileptic encephalopathies [2, 3].

*CYFIP2* (Cytoplasmic FMRP-interacting protein 2, OMIM # 606323) is one of the many genes that were recognized to be associated with infantile-onset severe epilepsy, leading to a

condition named developmental and epileptic encephalopathy 65 (DEE65, OMIM # 618008). *CYFIP2* gene encodes a component of the WASP-family verprolin-homologous protein (WAVE) regulatory complex (WRC) that, in combination with other proteins, have a crucial role in important neurodevelopmental processes, such as axon guidance and regulation of synapse morphology involved in actin dynamics, axon elongation, dendritic spine morphogenesis, and synaptic plasticity [4, 5].

The first individuals who have been reported involving the *CYFIP2* gene had a *de novo* 5q33.3 to q35.1 deletion, 16Mb-long, and showed developmental delay, mild intellectual disability, minor facial abnormalities, seizures, and behavior problems [6 - 8].

\* Address correspondence to this author at the Department of Pediatrics, Child Neurology Service, Fernandes Figueira Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil; Tel: +552125541805; E-mail: fernandavgoes@gmail.com

In 2018, Nakashima *et al.* discovered four patients with *de novo* missense pathogenic mutations in *CYFIP2* and early-onset epileptic encephalopathy, significant developmental delay, acquired microcephaly, facial morphological abnormalities, and hypotonia using trio-based whole-exome sequencing (WES) [5]. Initial interictal EEGs showed a burst suppression pattern, characteristic of Ohtahara syndrome and/or hypsarrhythmia typical of West syndrome. Brain MRI disclosed diffuse cerebral atrophy, especially of the frontal lobes [5]. These four patients had a *de novo* substitution at codon 87, replacing arginine for cysteine, proline, or leucine. The authors suggested that variants in this position may disrupt hydrogen bonding, leading to structural instability of WAVE regulatory complex with a gain-of-function, modified signaling pathway, and correlated with severe neurological disorders [5].

Zweier *et al.* (2019) reported 12 patients carrying a total of eight distinct *de novo* variants in *CYFIP2* with a shared phenotype of intellectual disability, seizures, and hypotonia [9]. Morphological features shared among patients included high forehead, narrow, mildly up-slanting eyelid fissures, apparent hypertelorism, bulbous nasal tip, full cheeks, everted lip vermillion, and retrognathia [9]. Most of the patients showed generalized or truncal hypotonia, limb spasticity, visual impairment and/or strabismus. Brain MRI showed unspecific structural anomalies ranging from atrophy and hypomyelination. Epilepsy was untreatable in 6 of 12 patients, and many types of seizures were reported, including absences, myoclonic, generalized tonic or tonic-clonic, and epileptic spasms. Electroencephalogram disclosed variable epileptiform discharges, including focal, multifocal, and generalized, as well as burst-suppression and hypsarrhythmia [9].

Begemann *et al.* (2021) added 19 more patients with *de novo* *CYFIP2* variants, eight of whom had epilepsy, six were refractory, and two were seizure-free with antiseizure medications (ASM) [10]. The electroencephalogram findings were mixed, with four individuals experiencing hypsarrhythmia [10]. The 16 individuals identified with likely disease-associated missense variants harbored 11 novels and two recurrent substitutions in *CYFIP2*. Three individuals had putative loss-of-function (LoF) variants of unknown significance. Missense variants of *CYFIP2* are spatially clustered in the tertiary structure and are predicted to weaken the interaction with WASF1 or NCKAP1, leading to increased WASF1 activation [9, 10].

Some developmental and epileptic encephalopathies could be associated with pattern electro-clinical characteristics syndromes, such as Ohtahara syndrome, West syndrome, or Lennox-Gastaut syndrome (LGS) [3]. LGS is an electroclinical syndrome that includes multiple seizure types, intellectual disability and/or behavior disorders, and electroencephalogram with interictal diffuse 1.5 to 2.5 Hz slow spike-and-wave discharges during the awake state and paroxysmal fast activity during sleep. Optimal treatment for LGS remains uncertain, and studies have shown no drug to be highly efficacious [11]. For patients with newly diagnosed LGS, sodium valproate is

the first-line treatment, but if it is ineffective, lamotrigine, rufinamide, topiramate, cannabidiol, and felbamate may also be useful as adjunctive treatment; clobazam might be useful for drop attacks. Nonpharmacological therapies, including the ketogenic diet, vagus nerve stimulation, and callosotomy, should be considered in children and young adults with pharmaco-resistant epilepsies LGS syndrome [12, 13].

Cannabidiol (CBD) is a non-psychoactive compound derived from the marijuana plant, which has been approved for the treatment of Dravet syndrome and Lennox-Gastaut syndrome and is thought to have broad antiseizure properties that might be beneficial for other types of intractable epilepsy or developmental and epileptic encephalopathy [14].

We describe a patient with a *de novo* pathogenic variant of *CYFIP2* who had an early-onset epileptic encephalopathy (Ohtahara syndrome) that progressed to Lennox-Gastaut syndrome and became seizures free after using cannabidiol.

## 2. CASE REPORT

This 3-year-old male was born after an uneventful pregnancy and at full term, and he was discharged from the maternity ward in good health three days later. Parents were first-cousins. Epileptic spasms with a generalized onset were found at 20 days of birth, and an electroencephalogram showed a burst suppression pattern with high amplitude epileptiform discharges followed by diffuse flattening of the recording, which is characteristic of Ohtahara's syndrome. Many anti-seizure medications, such as phenobarbital 5 mg/kg/day, clobazam 1.0 mg/kg/day, valproate 50 mg/kg/day, and levetiracetam 40 mg/kg/day, had no therapeutic response. Additionally, a trial with pyridoxine (100/day) and pyridoxal phosphate (40 mg/kg/day for one week) was not effective. After the introduction of vigabatrin (increased until 180 mg/kg/day), there was a clinically significant reduction of epileptic spasms that was not accompanied by development or EEG improvement.

He was referred to an epilepsy center for investigation and clinical management at 11 months of age. Physical examination revealed minor facial abnormalities (Fig. 1), normal head circumference (10th percentile), global hypotonia with spastic tetraparesis, hyperreflexia, and ankle clonus. He developed a sleep disturbance that was managed with melatonin.

At the age of 14 months, his epileptic spasms stopped, and he began to experience several generalized tonic seizures, as well as some episodes of decreased awareness in both cephalic and ocular forms. A video-electroencephalogram revealed bitemporal slow spike waves (2-2.5 Hz), as well as electroclinical atypical absences and tonic seizures during sleep, all of which are compatible with LGS (Fig. 2). Topiramate (5 mg/kg/day) and then lamotrigine (6 mg/kg/day) were added to the treatment regimen, along with the gradual withdrawal of other ASM. There was a decrease in the number of atypical absences but no change in the number of tonic seizures.



Fig. (1). Morphological facial features: retrognathia; divergent strabismus; hypertelorism, high forehead, narrow and upslanted eyelid fissures.

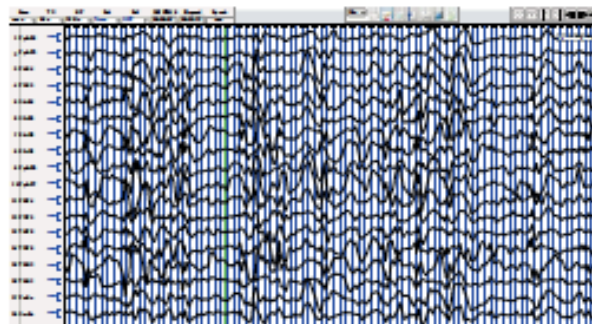


Fig. (2). Before cannabidiol was given, the EEG showed bitemporal slow spike-waves (2-2.5 Hz) and some poly spikes, diffuse pauses after discharges, and electroclinical atypical absence, indicating LGS.

Hundreds of tonic seizures without a trigger occurred daily, requiring re-hospitalization at 20 months of age, which was treated with intravenous phenytoin, phenobarbital, and midazolam, with partial seizure control. After three days, cannabidiol (CBD) (at a dose of 10 mg/kg/day) was related to progressive improvement and seizure-free status. When the EEG was performed three months after cannabidiol was introduced, it was normal when the subjects were awake, but it showed a bifrontal focal abnormality with generalization when they were sleeping. The metabolic workup was normal. Brain MRI at 4 months exhibited enlargement of the frontotemporal CSF space. An MRI a year later revealed diffuse cortical atrophy, especially in the frontotemporal region, as well as

cerebellar white matter hyperintensity (Fig. 3) WES identified a *de novo* pathogenic variant in *CTFIP2* [GRCh37Chr 5:15,6721,843C>T; c.259C>T ENST00000521420; p.(Arg87 Cys)]. Arginine at codon 87 is highly conserved among vertebrates, and its substitution for serine, proline, leucine, and cysteine is known to be pathogenic. Specifically, p.(Arg87Cys) have been reported and submitted to the variants repository many times, and it is a well-established pathogenic variant (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/430807/>).

He remained seizure-free with a severe developmental deficit after 16 months of cannabidiol usage. Currently, he is receiving vigabatrin (150 mg/kg/day), topiramate (9 mg/kg/day), and cannabidiol (10 mg/kg/day).

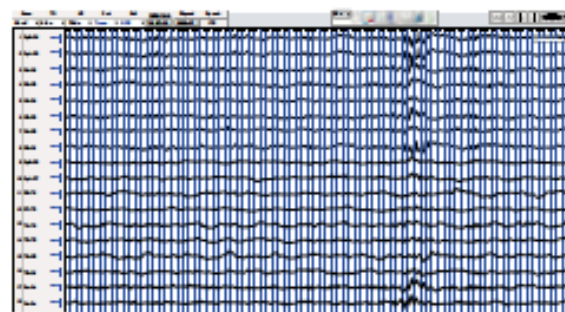


Fig. (3). EEG 3 months after the onset of CBD therapy, showing bifrontal focal abnormality with generalization, without discharges when awake.

### 3. DISCUSSION

Different genes are associated with the etiology of developmental and epileptic encephalopathies, and some intellectual disability (ID) and epilepsy genes converge into common networks and play key roles in neurogenesis, neuronal migration, and synaptic functions [2, 3]. *De novo* variants in *CYFIP2* are a cause of Developmental and Epileptic Encephalopathy 65 (DEE65), which is characterized by severe developmental delay, hypotonia; acquired microcephaly; facial morphological features; brain MRI abnormalities (cerebral and cerebellar atrophy, dysmorphic corpus callosum, hypomyelination or/and enlarged ventricles); epilepsy with many types of seizures and electroencephalogram discharges, including focal, multifocal, burst suppression pattern, and hypsarrhythmia [5, 9, 10]. Variants in *CYFIP2* affecting the arginine at position 87 cause profound ID, early-onset refractory epilepsy, and hypotonia, leading to a severe phenotype [9]. Other *CYFIP2* variants with suspected loss-of-function (LoF) variants show a milder phenotype, indicating that the complete loss of one allele product does not result in the severe neurodevelopmental phenotype seen with pathogenic *de novo* missense *CYFIP2* variants [10].

In this patient, early-onset epilepsy with EEGs showed a burst suppression pattern, which was a characteristic of Ohtahara syndrome and pharmaco-resistant to therapy. Some ASM were used without measurable response, and others, such as vigabatrin and topiramate, were able to promote seizures partial control. However, the patient became seizure-free only after CBD was added-on. Zweier *et al.* described some seizure-free patients, but none met LGS criteria [9]. Zweier *et al.* reported two seizure-free patients, but none who met clinical-electroencephalographic criteria for LGS [9]. One stopped having seizures after taking levetiracetam and then switched to cannabidiol, while the other responded to lacosamide [5]. The majority of patients with a *CYFIP2* variant required a combination of several ASM, including topiramate, levetiracetam, and valproate [5, 9, 10].

In this case, CBD was the most effective therapy for epilepsy. After its introduction, there was a significant clinical and electrographic improvement, which has been maintained for the last 16 months without side effects. Devinsky *et al.* (2018) published the first double-blind, placebo-controlled clinical trial using purified CBD for patients with LGS for drop seizures [15]. Adding 10 or 20 mg/kg/day of CBD to a conventional ASM led to greater reductions in the frequency of drop seizures than the lower doses used in this study. Nevertheless, no patient remained seizure-free throughout the whole study period (28 days) [15]. Cannabinoids' anticonvulsant properties, which act through various receptors and channels, can help control seizures and epilepsy. THC and CBD have been shown to diminish the duration, severity, and incidence of epileptic seizures and remote adverse effects [16]. This patient has a *CYFIP2* gene mutation, which causes pharmacoresistant epilepsy. His clinics and EEG are consistent with LGS, a kind of epilepsy that has recently been shown to respond to cannabinoid therapy.

### CONCLUSION

Mutations in the *CYFIP2* gene cause a phenotype of the development and epileptic encephalopathy spectrum, which includes intellectual disability, minor facial abnormalities, and epilepsy. We present a patient with a *CYFIP2* p.(Arg87Cys) pathogenic variant who had epilepsy that was resistant to multiple medications and was eventually controlled with cannabidiol.

Our report suggests that cannabidiol is an option for epilepsy treatment in patients with developmental and epileptic encephalopathy 65 (DEE65, OMIM # 618008) and Lennox-Gastaut Syndrome.

### ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

This project was approved by the Institutional Ethical Committee (CAAE 09609319.1.0000.5269, Protocol number 4566159).

### HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No animals were used in this research. All human research procedures were followed in accordance with the ethical standards of the committee responsible for human experimentation (institutional and national), and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2013.

### CONSENT FOR PUBLICATION

Written informed consent was obtained from the parents of the patient for publication of this case report and any accompanying images.

### STANDARDS OF REPORTING

The CARE guidelines and methodology have been followed.

### FUNDING

None.

### AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

Not applicable.

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to the team at the Fernandes Figueira Institute – Fiocruz in Rio de Janeiro, Brazil, for their assistance with patients and procedures.

### REFERENCES

- McTague A, Howell KB, Cross JH, Kurian MA, Scheffer IE. The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *Lancet Neurol* 2016; 15(3): 304-16. [[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00250-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00250-1)] [PMID: 26597089]
- Nieh SE, Sherr EH. Epileptic encephalopathies: New genes and new pathways. *Neurotherapeutics* 2014; 11(4): 796-806.

- [3] [\[http://dx.doi.org/10.1007/s13311-014-0301-2\]](http://dx.doi.org/10.1007/s13311-014-0301-2) [PMID: 25266964]  
Møller RS, Hammer TB, Rubboli G, Lemke JR, Johannesen KM. From next-generation sequencing to targeted treatment of non-acquired epilepsies. *Expert Rev Mol Diagn* 2019; 19(3): 217-28. [<http://dx.doi.org/10.1080/14737159.2019.1573144>] [PMID: 30661434]
- [4] Abekhoukh S, Bardonni B. CYFIP family proteins between autism and intellectual disability: Links with Fragile X syndrome. *Front Cell Neurosci* 2014; 8: 81. [<http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2014.00081>] [PMID: 24733999]
- [5] Nakashima M, Kato M, Aoto K, et al. De novo hotspot variants in *CYFIP2* cause early-onset epileptic encephalopathy. *Ann Neurol* 2018; 83(4): 794-806. [<http://dx.doi.org/10.1002/ana.25208>] [PMID: 29534297]
- [6] Spranger S, Rommel B, Jauch A, Bodammer R, Mehl B, Bullerdiek J. Interstitial deletion of 5q33.3q35.1 in a girl with mild mental retardation. *Am J Med Genet* 2000; 93(2): 107-9. [[http://dx.doi.org/10.1002/1096-8628\(200007\)93:2<107::AID-AJMG5>3.0.CO;2-8](http://dx.doi.org/10.1002/1096-8628(200007)93:2<107::AID-AJMG5>3.0.CO;2-8)] [PMID: 10869111]
- [7] Heubrock D, Spranger S, Lex B, Lepach AC, Petermann F. Interstitial deletion on chromosome 5q33.3q35.1 in a 6-year-old girl -- Neuropsychological findings and follow-up in an extremely rare chromosomal aberration. *Child Neuropsychol* 2003; 9(2): 129-41. [<http://dx.doi.org/10.1076/1369-9.2.129.14502>] [PMID: 12815515]
- [8] Lee JH, Kim HJ, Yoon JM, et al. Interstitial deletion of 5q33.3q35.1 in a boy with severe mental retardation. *Korean J Pediatr* 2016; 59(Suppl. 1): S19-24. [<http://dx.doi.org/10.3345/kjp.2016.59.11.S19>] [PMID: 28018438]
- [9] Zweier M, Begemann A, McWalter K, et al. Spatially clustering de novo variants in *CYFIP2*, encoding the cytoplasmic FMRP interacting protein 2, cause intellectual disability and seizures. *Eur J Hum Genet* 2019; 27(5): 747-59. [<http://dx.doi.org/10.1038/s41431-018-0331-z>] [PMID: 30664714]
- [10] Begemann A, Sticht H, Begtrup A, et al. New insights into the clinical and molecular spectrum of the novel *CYFIP2*-related neurodevelopmental disorder and impairment of the WRC-mediated actin dynamics. *Genet Med* 2021; 23(3): 543-54. [<http://dx.doi.org/10.1038/s41436-020-01011-x>] [PMID: 33149277]
- [11] Mastrangelo M. Lennox-gastaut syndrome: A state of the art review. *Neuropediatrics* 2017; 48(3): 143-51. [<http://dx.doi.org/10.1055/s-0037-1601324>] [PMID: 28346953]
- [12] Cross JH, Auvin S, Falip M, Striano P, Arzimanoglou A. Expert opinion on the management of lennox-gastaut syndrome: Treatment algorithms and practical considerations. *Front Neurol* 2017; 8: 505. [<http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2017.00505>] [PMID: 29085326]
- [13] Strzelczyk A, Schubert-Bast S. Expanding the treatment landscape for lennox-gastaut syndrome: Current and future strategies. *CNS Drugs* 2021; 35(1): 61-83. [<http://dx.doi.org/10.1007/s40263-020-00784-8>] [PMID: 33479851]
- [14] Pietrafusa N, Ferretti A, Trivisano M, et al. Purified cannabidiol for treatment of refractory epilepsies in pediatric patients with developmental and epileptic encephalopathy. *Paediatr Drugs* 2019; 21(4): 283-90. [<http://dx.doi.org/10.1007/s40272-019-00341-x>] [PMID: 31179531]
- [15] Devinsky O, Patel AD, Cross JH, et al. Effect of cannabidiol on drop seizures in the lennox-gastaut syndrome. *N Engl J Med* 2018; 378(20): 1888-97. [<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1714631>] [PMID: 29768152]
- [16] Serni L, Cannazza G, Biagini G. Receptors and channels possibly mediating the effects of phytocannabinoids on seizures and epilepsy. *Pharmaceuticals (Basel)* 2020; 13(8): 174. [<http://dx.doi.org/10.3390/ph13080174>] [PMID: 32751761]

© 2022 de Gooz et al.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International Public License (CC-BY 4.0), a copy of which is available at: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode>. This license permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.