

# IDENTIFICAÇÃO DO LOCUS RESPONSÁVEL PELA EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL MESIAL FAMILIAR ASSOCIADA A ATROFIA HIPOCAMPAL ATRAVÉS DE ESTUDOS DE LIGAÇÃO GENÉTICA

**PESQUISADORA RESPONSÁVEL:** Cláudia Vianna Maurer Morelli

## INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma condição neurológica comum que afeta 1,5%-2% da população geral (Hauser et al., 1996), sendo considerada um problema de saúde pública pela Organização Mundial de Saúde. Dentre as diferentes classificações das síndromes epilépticas, a epilepsia de lobo temporal mesial (ELTM) é reconhecidamente uma síndrome de grande importância clínica não somente por sua alta incidência (Hauser et al., 1996), mas também, por ser freqüentemente refratária ao tratamento medicamentoso (Engel, 1989), visto que o controle completo das crises a penas com o tratamento clínico, ocorre em menos de 50% desses pacientes (Sander, 1993). A ELTM está freqüentemente associada com achados histopatológicos de esclerose mesial temporal (EMT), que é caracterizada por perda neuronal na amígdala, uncus e giro parahipocampal, mas o achado mais acentuado é a esclerose hipocampal (EH; Engel, 1987; Luders, 1991). A EH é caracterizada por perda neuronal seletiva nas áreas CA1, CA3 e hilus acompanhada de gliose em graus variados. Já a região de CA2 tem se mostrado mais resistente a esse tipo de insulto (Luders, 1991; Blümcke et al., 1999). Nos últimos anos, as imagens por ressonância magnética (IRM) de alta resolução permitiram a identificação da atrofia hipocampal (AH) e outros sinais indicativos de esclerose hipocampal (EH) em pacientes com ELTM (Berkovic et al., 1991; Cendes et al., 1993a). Esses achados de IRM apresentam uma grande correlação com os achados histopatológicos da EMT (Cendes et al., 1993<sup>a</sup>; Bernasconi et al., 2003) permitindo que a presença da AH seja considerada um marcador *in vivo* da EMT. Apesar destas observações, ainda não estão bem esclarecidas as relações entre esses achados e os mecanismos epileptogênicos. Entretanto, esses eventos têm sido freqüentemente relacionados com insultos precoces de causas ambientais, como as crises epilépticas febris prolongadas na infância (Abou-Khalil et al., 1993; Cendes et al., 1993b).

A presença de fatores genéticos contribuindo na etiologia das epilepsias é estimada em torno de 40% dos pacientes (Robinson & Gardiner, 2004). Em 2001, Kobayashi et al. identificaram um tipo distinto de ELTM com recorrência familiar, mas baixa freqüência de crises febris na infância conhecida como ELTM familiar (ELTMF;

Kobayashi *et al.*, 2001) que desde então, vem sendo intensamente investigada tanto no que se refere à apresentação clínica quanto às alterações em IRM (Kobayashi *et al.*, 2002; 2003). Na ELTMF, apesar da maior parte dos indivíduos afetados apresentarem bom controle de crises, alguns pacientes apresentavam quadro clínico, eletroencefalográfico e de neuroimagem indistinto daqueles pacientes com a forma clássica de ELTM refratária dita “esporádica” ou não familiar. A AH determinada por IRM foi identificada em 70% dos pacientes com ELTMF (Kobayashi *et al.*, 2003), sendo mais severa e mais freqüente nos pacientes com crises refratárias. Além disso, foram encontrados sinais indicativos de AH em 34% dos familiares assintomáticos submetidos à investigação por IRM (Kobayashi *et al.*, 2002). A análise dos heredogramas evidenciou um padrão de herança autossômica dominante com penetrância incompleta (Kobayashi *et al.*, 2001). Estes dados sugerem a presença de um forte fator genético determinando as alterações hipocâmpais nessas famílias. Diante destas observações, o objetivo deste estudo foi identificar o *locus* responsável pela ELTMF associada a AH, através do estudo de ligação genômico.

## SUJEITOS E MÉTODOS:

**Famílias:** Os critérios diagnósticos de ELTM seguiram os critérios definidos pela *International League Against Epilepsy* (ILAE; Commission Report, 1989). Dados sobre as famílias selecionadas estão descritos previamente (Kobayashi *et al.*, 2001). Entre as famílias identificadas com ELTM foram selecionadas duas suficientemente informativas para a análise de ligação, nomeadas de F10 e F26. Um total de 57 indivíduos, incluindo 25 pacientes foram genotipados. Os membros das famílias foram divididos em 3 classes fenotípicas: **afetado** (indivíduos com AH e/ou ELTM), **não afetado** (indivíduos sem crise ou crise única, mas com IRM normal) e **desconhecido** (indivíduos sem informação fenotípica, principalmente indivíduos casados com membros da família). Todo o procedimento foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa da FCM - Unicamp.

**Genotipagem:** Para este estudo foram selecionados 332 marcadores escolhidos a partir do *Marshfield Human Genetic Map* ([www.research.marshfieldclinic.org/genetics](http://www.research.marshfieldclinic.org/genetics)) com uma porcentagem de heterozigose  $\geq 75\%$ . A distância entre dois marcadores adjacentes foi de aproximadamente 12cM. A genotipagem foi realizada através de sequenciador automático MegaBACE™ 1000, utilizando-se primers marcados com FAM™, VIC™ ou NED™ (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). As sequências de DNA foram amplificadas por PCR e misturadas de acordo com a marcação em volume final de 40µl de H<sub>2</sub>O (1:20 FAM™, 1:20 VIC™ e 1:10 NED™).

Foram transferidos 2µl desta solução para cada um dos poços de uma placa de 96 poços para MegaBACE e misturadas a 8 µl de solução de corrida (para cada reação: 7.75µl de Tween 20 0,1% em H<sub>2</sub>O + 0.25 µl de *size standard* marcado com ROX™, ET-550R da GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). As amostras foram desnaturadas a 95°C por 3 min. Os parâmetros de injeção foram 45 segundos a 3 kV e as amostras correram por 65 minutos a 10 kV. A definição dos picos dos alelos e a leitura foram realizadas com o emprego do *Software Fragment Profiler* v1.2 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Treze marcadores adicionais foram usados para o refinamento da região candidata no cromossomo 18p: telômero, D18S476, D18S1098, D18S481, D18S1154, D18S52, D18S1132, D18S976, D18S1376, D18S967, D18S1163, D18S464, D18S1150 e D18S1158.

**Análise de Ligação:** A análise de ligação foi realizada assumindo-se um modo de herança com penetrância incompleta (80% de penetrância). Evidência para um padrão de herança com transmissão Mendeliana foi obtido a partir da análise de segregação complexa (Secolin *et al.*, 2004). O LOD score de dois pontos foi calculado pelo programa MLINK, versão 5.1 do pacote de programas LINKAGE (Ott,1974) para cada família separadamente. Para o cálculo do LOD score de múltiplos pontos foi usado o programa LINKMAP, também do programa LINKAGE.

## RESULTADOS

Os resultados do estudo genômico estão resumidos na Figura 1 para a F10 e na Figura 2 para a F26. Um único significativo LOD score foi obtido no cromossomo 18p 11.3-11.2 para a F10. O refinamento da região identificou um Z<sub>max</sub> de 3,63 em  $\theta = 0,0$  para o marcador no *locus* D18S976 (Tabela 1). A análise de múltiplos pontos e de haplótipo evidenciam eventos de recombinação que localizam uma região crítica de 6 CM entre D18S976 e D18S452 (Figura 3). Nenhuma região mostrou resultado significativamente positivo para a F26 em todo o genoma, nem tão pouco a região candidata no cromossomo 18p foi informativa para esta mesma família.

## DISCUSSÃO

Mapeamento genético por análise de ligação é uma poderosa ferramenta para a localização de genes responsáveis por doenças. No entanto, para se obter resultados confiáveis é crucial o levantamento de famílias informativas com um grande número de indivíduos afetados, um modo de herança bem definido e uma correta classificação fenotípica de cada indivíduo. Este estudo realizou uma busca genômica randômica em duas grandes famílias (F10 e F26) segregando um fenótipo bem estabelecido (Kobayashi

*et al.*, 2001) e com forte evidência para uma herança autossômica dominante (Secolin *et al.*, 2004). Além disso, foi estabelecido um marcador fenotípico, a AH, que foi usada para classificar o status de afetado para a maioria dos membros estudados independentemente da presença de crises, desde que ficou claro a existência de indivíduos com AH sem crises (Kobayashi *et al.*, 2001; 2002; 2003). Neste cenário, foi estabelecida ligação para uma região candidata de 6 cM no cromossomo 18p 11.3-11.2. Pelo fato da AH ser usada como um marcador fenotípico para a EMT nos indivíduos afetados é correto assumir que a ligação foi encontrada para um *locus* predispondo a EMT, independentemente de crises.

Pelo fato de existir heterogeneidade genética na maioria das síndromes epiléticas monogênicas, a análise de ligação foi realizada separadamente para as duas famílias. De fato, não houve qualquer evidência de ligação em todo o genoma para a F26 (Figura 2). O resultado negativo para a F26 não causou surpresa, pois embora frequente, este tipo de resultado é pouco divulgado. Várias razões podem ter contribuído para a falta de ligação genética em todo o genoma da F26, entre elas, a presença de herança bilineal de epilepsia em um ramo da família (Figura 4), o qual pode estar contribuindo para um decréscimo no poder estatístico para detecção de ligação (Terwilliger & Ott, 1994). Além disso, diferenças na apresentação fenotípica das duas famílias podem estar gerando este resultado (Kobayashi *et al.*, 2001). Na F10, todos os afetados possuem um curso benigno da doença com bom controle das crises e nenhuma história de crise febril. Já na F26, embora a maioria dos indivíduos possua bom controle das crises, há um indivíduo com refratariedade medicamentosa e quatro com antecedentes de crise febril. Ainda não está claro se essas características fenotípicas poderão se correlacionar com a heterogeneidade genética, no entanto a análise de mutação direta poderá futuramente resolver esta questão.

É interessante ressaltar que durante a busca genômica randômica, houve a oportunidade para a realização da análise de ligação para genes candidatos com funções biológicas significantes na fisiologia da ELTM ou em modelos animais descritos previamente (Maurer-Morelli *et al.*, 2006; 2007). Muito embora esses estudos não tenham evidenciado qualquer ligação entre genes candidatos e ELTMF, eles mostram que o emprego da análise de ligação genética na investigação direta de genes candidatos pode ser uma ferramenta bastante eficiente, especialmente quando estes genes são bem localizados, quando mais de um gene de interesse estão na mesma região e, principalmente quando possuem extensas regiões codificadoras, o que torna a triagem de mutações uma tarefa longa e dispendiosa.

Em conclusão, um *locus* candidato para a AH associada com a ELTMF foi identificado no cromossomo 18p 11.3-11.2 sugerindo que existe um gene principal predispondo o desenvolvimento da EMT nos pacientes da F10. Este resultado demonstra pela primeira vez, de forma conclusiva, que a EMT pode ter um forte componente genético para o seu desenvolvimento, abrindo novos caminhos para o estudo dos mecanismos fisiopatológicos que permeiam a EMT e sua relação com a ELTM. A triagem de mutação em genes candidatos nesta região será necessária para a identificação do gene maior responsável por esta síndrome, contribuindo assim, para uma melhor compreensão da relação entre as alterações estruturais e funcionais encontradas *in vivo* e a manifestação da atividade epiléptica, além de criar a possibilidade do diagnóstico molecular para esses pacientes.

#### **BIBLIOGRAFIA:**

Abou-Khalil B, Andermann E, Andermann F, Olivier A, Quesney L F (1993) Temporal lobe epilepsy after prolonged febrile convulsions: excellent outcome after surgical treatment. *Epilepsia* 34: 878-83.

Berkovic SF, Andermann F, Olivier A, Ethier R, Melanson D, Robitaille Y, et al.(1991) Hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy demonstrated by magnetic resonance imaging. *Ann Neurol* 29:175-82.

Bernasconi N, Bernasconi A, Caramanos Z, Antel SB, Andermann F, Arnold DL (2003) Mesial temporal damage in temporal lobe epilepsy: a volumetric MRI study of the hippocampus, amygdala and parahippocampal region. *Brain* 126(Pt 2):462-469.

Blümcke I, Beck H, Lie AA, Wiestler OD (1999) Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 36(2-3):205-23.

Cendes F, Andermann F, Gloor P, Evans A, Jones-Gotman M, Watson C, et al. (1993a) MRI volumetric measurement of amygdala and hippocampus in temporal lobe epilepsy. *Neurology* 43: 719-725.

Cendes F, Andermann F, Dubeau F, Gloor P, Evans A, Jones -Gotman M, et al.(1993b) Early childhood prolonged febrile convulsions, atrophy and sclerosis of mesial structures and temporal lobe epilepsy: an MRI volumetric study. *Neurology* 43: 1083 -1087.

Commission on Classification and Terminology of the International League against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes (1989) *Epilepsia* 30:389-399.

Engel J, Jr (1987) Surgical treatment of the epilepsies. Raven Press, New York, 511pp.

Engel Jr J. (1989) Seizures and Epilepsy Epileptic syndromes. Davis Company, Philadelphia, 195pp.

Hauser WA, Annegers JF, Rocca WA (1996) Descriptive epidemiology of epilepsy - contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota. Mayo Clinic Proceedings 71: 576-586.

Kobayashi E, Lopes-Cendes I, Guerreiro CAM, Sousa SC, Guerreiro MM, Cendes F(2001) Seizure outcome and hippocampal atrophy in familial mesial temporal lobe epilepsy. Neurology 56: 166-172.

Kobayashi E, Li M Li, Lopes-Cendes I, Cendes F(2002) MRI evidence of hippocampal sclerosis in asymptomatic first degree relatives of patients with familial mesial temporal lobe epilepsy. Arch Neurol 59(12):1891-1894.

Kobayashi E, D'Agostino MD, Lopes-Cendes I, Berkovic SF, Li LM, Andermann E, et al. (2003) Hippocampal atrophy and T2 weighted signal changes in familial mesial temporal lobe epilepsy. Neurology 60(3):405-409.

Luders H (1991) Epilepsy surgery. Raven Press, New York, 689pp.

Maurer-Morelli CV, Secolin R, Marchesini RB, Santos NF, Kobayashi E, Cendes F, Lopes - Cendes I (2006) The SCN2A gene is not a likely candidate for familial mesial temporal lobe epilepsy. Epilepsy Res 71(2-3):233-236.

Maurer-Morelli CV, Marchesini RB, Secolin R, Santos NF, Kobayashi E, Cendes F, Lopes - Cendes I (2007) Linkage study of voltage-gated potassium channels in familial mesial temporal lobe epilepsy. Arq Neuropsiquiatr 65(1):20-23.

Ott J (1974) Estimation of the recombination fraction in human pedigrees: efficient computation of the likelihood for human linkage studies. Am J Hum Genet 26:588-597.

Robinson R, Gardiner M (2004) Molecular basis of Mendelian idiopathic epilepsies. Ann Med 36, 89-97.

Sander JW (1993) Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review. Epilepsia 34(6):1007-1016.

Secolin R, Maurer-Morelli CV, Ferreira RGM, Santos NF, Kobayashi E, Marchesini RB, Cendes F, Kriger H, Lopes-Cendes I (2004) Complex Segregation Analysis in Familial Mesial Temporal Lobe Epilepsy. Epilepsia 45: 224-224, Supp.7 (Abstract).

Terwilliger JD, Ott J (1994) Handbook of Human Genetic Linkage. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

FIGURA 1

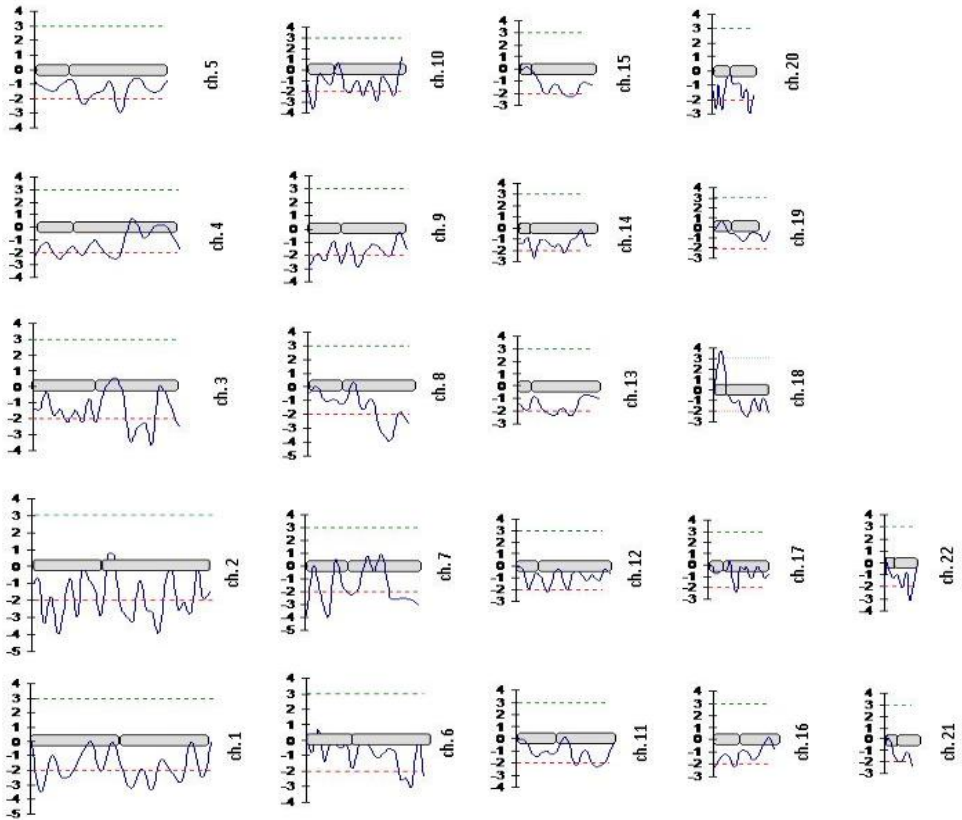
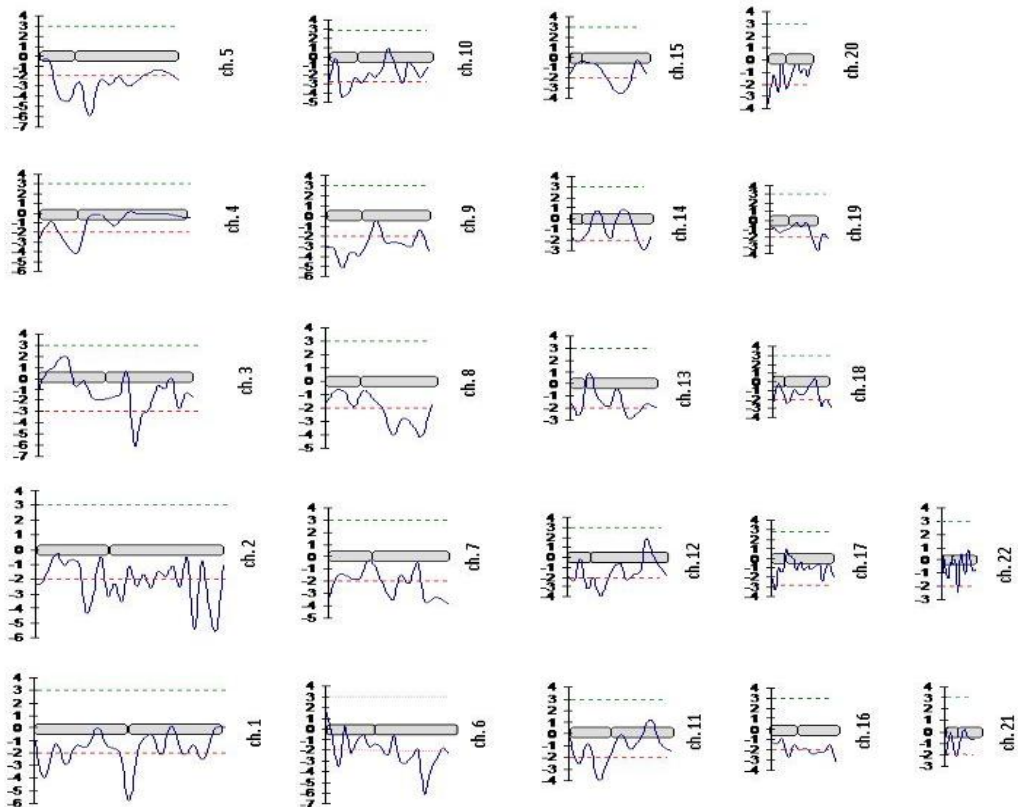


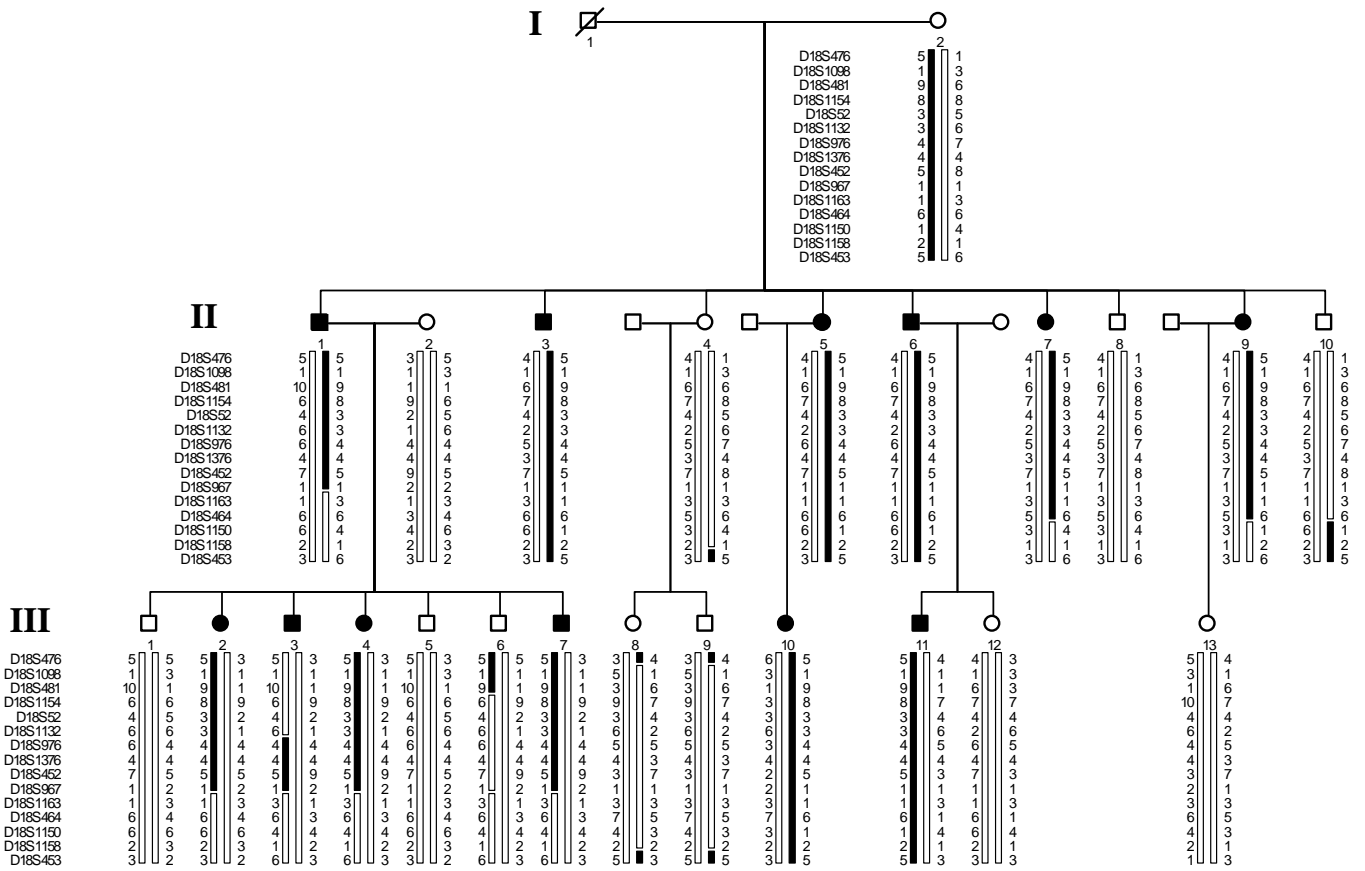
FIGURA 2



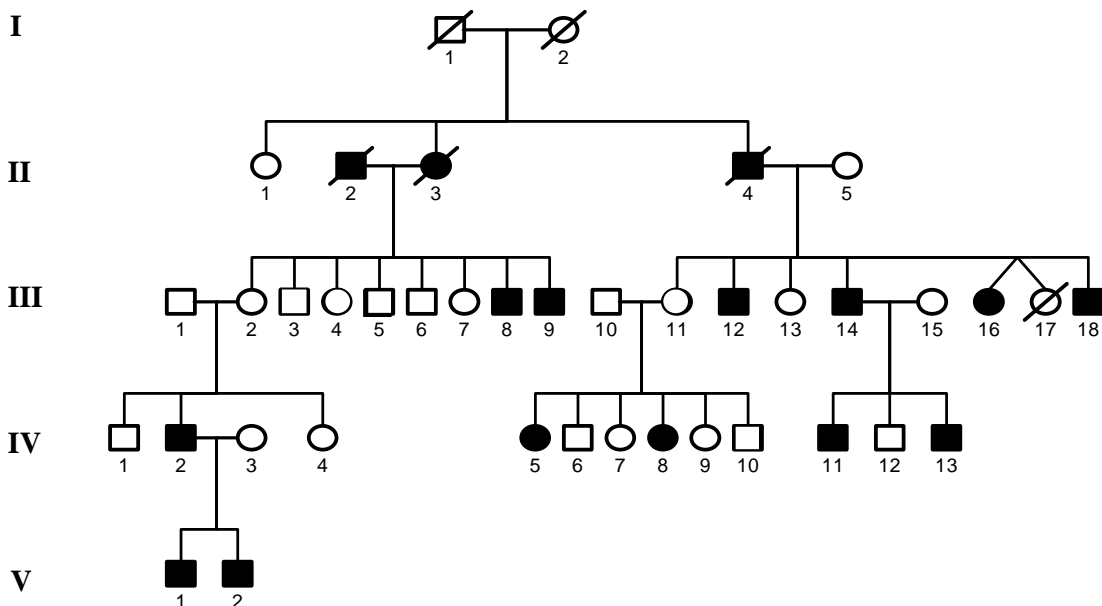
**TABELA 1:** LOD scores de dois pontos para os marcadores genotipados na região candidate para a epilepsia de lobo temporal mesial familiar, nas famílias F10 e F26.

Marcador	Fração de Recombinação ( )								
	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40
<b>F10</b>									
D18S476	-0.27	0.21	0.38	0.43	0.43	0.38	0.30	0.21	0.11
D18S1098	1.54	1.38	1.22	1.05	0.87	0.69	0.50	0.32	0.16
D18S481	0.19	1.19	1.37	1.36	1.24	1.06	0.83	0.58	0.31
D18S1154	-1.32	-0.28	0.04	0.19	0.25	0.26	0.23	0.18	0.12
D18S52	0.31	1.18	1.36	1.35	1.24	1.07	0.84	0.59	0.33
D18S1132	0.14	1.10	1.28	1.27	1.16	0.98	0.76	0.51	0.27
D18S976	<b>3.63</b>	3.31	2.97	2.62	2.25	1.85	1.43	1.00	0.56
D18S1376	0.02	0.01	0.01	0.00	-0.00	0.00	0.00	0.01	0.01
D18S452	2.20	2.39	2.29	2.10	1.84	1.54	1.20	0.84	0.47
D18S967	0.74	0.65	0.56	0.46	0.37	0.28	0.19	0.11	0.05
D18S1163	-0.53	-0.23	-0.10	-0.04	-0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
D18S464	-0.08	-0.06	-0.05	-0.04	-0.03	-0.02	-0.01	-0.00	0.00
D18S1150	-2.88	-1.52	-0.99	-0.64	-0.39	-0.23	-0.11	-0.04	-0.00
D18S1158	-0.61	-0.52	-0.41	-0.30	-0.20	-0.12	-0.06	-0.02	-0.00
<b>F26</b>									
D18S476	-1.91	-1.17	-0.83	-0.60	-0.44	-0.31	-0.22	-0.15	-0.10
D18S1098	-1.68	-1.13	-0.73	-0.45	-0.26	-0.14	-0.07	-0.04	-0.03
D18S481	-2.67	-1.82	-1.29	-0.91	-0.63	-0.42	-0.28	-0.18	-0.11
D18S1154	-2.26	-0.58	-0.12	0.10	0.20	0.23	0.22	0.17	0.10
D18S52	-2.39	-1.51	-1.03	-0.71	-0.48	-0.31	-0.19	-0.10	-0.04
D18S1132	-2.70	-1.63	-1.15	-0.84	-0.61	-0.43	-0.29	-0.19	-0.11
D18S976	-0.99	-0.85	-0.70	-0.57	-0.45	-0.34	-0.25	-0.17	-0.10
D18S1376	-0.45	-0.30	-0.21	-0.16	-0.13	-0.11	-0.08	-0.06	-0.04
D18S452	-1.31	-1.06	-0.81	-0.61	-0.45	-0.32	-0.22	-0.15	-0.09
D18S967	-0.10	-0.07	-0.04	-0.02	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01
D18S1163	-0.96	-0.66	-0.50	-0.39	-0.29	-0.21	-0.13	-0.08	-0.04
D18S464	-0.49	-0.44	-0.35	-0.25	-0.18	-0.12	-0.08	-0.05	-0.02
D18S1150	-1.10	-0.18	-0.05	-0.03	-0.04	-0.05	-0.06	-0.06	-0.04
D18S1158	-0.64	-0.39	-0.26	-0.19	-0.14	-0.11	-0.08	-0.06	-0.04

**FIGURA 3**



**FIGURA 4**



## Legendas das figuras

**Figura 1:** Diagrama representando os resultados do LOD score de dois pontos para 332 marcadores microssatélites genotipados na análise de ligação genômica para a família F10 segregando epilepsia de lobo temporal mesial familiar.

**Figura 2:** Diagrama representando os resultados do LOD score de dois pontos para 332 marcadores microssatélites genotipados na análise de ligação genômica para a família F26 segregando epilepsia de lobo temporal mesial familiar.

**Figura 3:** Análise de haplótipo da F10 para 14 marcadores microssatélites localizados no cromossomo 18p. O haplótipo herdado dos indivíduos afetados está representado nas barras verticais em preto. Membros da família que não participaram do estudo não são mostrados. Todos os indivíduos afetados carregam o haplótipo pressuposto a conter o gene para a ELTMF. O mesmo haplótipo está presente em um indivíduo (I-2), mas que não foi considerado afetado porque não realizou a IRM.

**Figura 4:** Heredograma da família F26 segregando epilepsia de lobo temporal mesial familiar.