



**Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP**

**Liga Internacional Contra La Epilepsia – ILAE**

**Comisión de Asuntos Latinoamericanos**

**Subcomisión de Genética de las Epilepsias para América Latina**

**PROYECTO MULTICENTRICO**

**“ANÁLISIS MOLECULAR POR SECUENCIACIÓN DEL EXOMA (WHOLE EXOME SEQUENCING) PARA IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES POTENCIALMENTE PATOGENICAS EN ENCEFALOPATÍAS EPILÉPTICAS EN LA INFANCIA (EEI) EN AMÉRICA LATINA”**

**Autores:**

**Iscia Lopes-Cendes<sup>1</sup>, Fernando Cendes<sup>2</sup>, Hebel Urquia-Osorio<sup>2</sup>, Autores Centros Colaboradores<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Genética Médica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo Brasil.

<sup>2</sup> Instituto Brasileiro de Neurociencias e Neurotecnología (BRAINN), Facultad de Ciencias Médicas, Departamento de Neurologia, Campinas SP, Brasil.

<sup>3</sup> Filiación de autores de centros colaboradores que deseen participar del estudio.

## **Equipo Coordinador del Proyecto**

- **Dra. ISCIA LOPES-CENDES**

Posee graduación en Medicina (1987) por la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Estadual de Campinas, Residencia Médica en Pediatría (1990) por la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Campinas, Maestrado (1993) y Doctorado (1999) en Neurociencias por la Universidad McGill, Canadá. Actualmente es profesora titular y jefa del Departamento de Genética Médica, coordinadora del Laboratorio de Genética Molecular, jefa de la clínica ambulatoria de neurogenética en el Hospital Universitario de la Universidad de Campinas (UNICAMP) y jefa de la Iniciativa Brasileira de Medicina de Precisión (BIPMed).

Dirección electrónica Curriculum Vitae: <http://lattes.cnpq.br/3944020856408245>

- **Dr. FERNANDO CENDES**

Posee graduación en Medicina (1985) por la Universidad Federal de Goiás, Residencia en Neurología (1989) por la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Campinas, Maestrado (1993), Especialización en Neurofisiología Clínica y Epileptología por la Universidad de McGill (1989), Doctorado en Neurociencias por la Universidad de McGill, Canadá (1996). Actualmente es profesor titular del departamento de Neurología, Coordinador del programa de cirugía de epilepsia del Hospital Universitario de la Universidad de Campinas (UNICAMP) y Director del Instituto Brasileiro de Neurociencia y Neurotecnología (BRAINN).

Dirección electrónica Curriculum Vitae: <http://lattes.cnpq.br/4754944655427183>

- **Dr. HEBEL URQUIA-OSORIO**

Posee graduación en Medicina (2014) por la Universidad Nacional Autónoma de Honduras – UNAH. Actualmente estudiante de Doctorado en Fisiopatología Médica con Orientación en Neurociencias en la Universidad de Campinas.

Dirección electrónica Curriculum Vitae: <http://lattes.cnpq.br/5525056379818288>

---

**Dirección/contactos:**

Rua Tessália Vieira de Camargo, 126. Cidade Universitária "Zeferino Vaz".

Campinas – SP – Brasil.

Coordinación general: **Iscia Lopes-Cendes, MD, PhD**

Telefone: +55 (19) 35218907.

Correo electrónico: [icendes@unicamp.br](mailto:icendes@unicamp.br)

CC// **Hebel Urquia-Osorio MD, PhD Student**

Telefone: +55 (19) 991650946

Correo electrónico: [hebelozielu@gmail.com](mailto:hebelozielu@gmail.com)

## **ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN**

Este proyecto está aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Campinas "FCM-UNICAMP", donde se llevará a cabo el análisis molecular para la identificación de variantes potencialmente patogénicas en EEI, y deberá ser aprobado por los comités de ética locales en cada uno de los países de las instituciones participantes del estudio.

Todos los pacientes y familiares que acepten participar de la investigación se les brindará la información necesaria del proyecto y se les solicitará de forma libre proporcionar el Consentimiento Informado, firmando el formulario apropiado (Anexo 1).

Los individuos participantes de este proyecto serán seleccionados de las consultas externas de los centros de atención médica participantes. Los datos clínicos de esos pacientes serán revisados y discutidos por los neurólogos, epileptólogos y/o genetistas coautores y responsables del estudio en cada uno de los centros reconocidos por la coordinación para participar del proyecto. Es importante mencionar que nuevos pacientes de nuevos centros colaboradores podrán ser incorporados en el estudio siempre y cuando no vaya en detrimento de la fiabilidad de los datos de las publicaciones que deriven de este proyecto, y solo previa aprobación por el equipo coordinador del mismo.

Para asegurar que toda la manipulación de la información clínica y molecular sea confidencial, cuestionarios clínicos (Anexo 2) y muestras de sangre de DNA serán identificadas por un código común designado en el momento en que el individuo entre en el estudio. Las informaciones generadas durante este proyecto que puedan tener implicaciones en la confirmación diagnóstica de individuos sintomáticos serán comunicadas a los profesionales responsables por el acompañamiento de los pacientes. Datos que puedan ser utilizados en el diagnóstico pre-sintomático no serán generados en este proyecto.

## RESUMEN

Las encefalopatías epilépticas son disturbios cerebrales graves en los cuales descargas eléctricas epilépticas pueden contribuir al desarrollo progresivo de disfunción psicomotor. Se cree que la actividad eléctrica epileptógena durante la maduración cerebral es la principal causa de retraso o deterioro cognitivo y neuropsicológico progresivo, provocando déficit cognitivos, comportamentales y neurológicos intratables que pueden llevar a la muerte precoz. Las encefalopatías epilépticas más comunes son: síndrome de West, síndrome de Lennox-Gastaut, síndrome de Otahara, síndrome de Doose y síndrome de Dravet. La etiología de la mayoría de las encefalopatías epilépticas no ha sido establecida. En los últimos años, una serie de nuevas mutaciones asociadas a encefalopatías epilépticas fueron descritas, sin embargo, una buena parte de estos pacientes permanecen sin alteraciones identificadas. Por esta razón, los principales objetivos de este trabajo serán la caracterización de las bases moleculares de diferentes formas de encefalopatías epilépticas y la evaluación de los potenciales genes identificados como candidatos para su utilización en test genéticos para fines clínicos, utilizando como estrategia principal la identificación de mutaciones en los pacientes reclutados para participar en este estudio, a través de secuenciación del exoma; una de las más nuevas y principales herramientas para el estudio de las causas de las enfermedades genéticas Mendelianas. Los resultados de este trabajo permitirán correlacionar los datos moleculares encontrados con los datos clínicos, que puedan auxiliar en el esclarecimiento de algunos de los mecanismos de la etiología de las encefalopatías epilépticas.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7-14</b>
• Encefalopatías epilépticas en la infancia.....	7-9
• Bases genéticas.....	10-11
• Gen SCN1A.....	11-12
• Avances Moleculares.....	13-14
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>16-19</b>
• <i>Casuística</i> .....	16
• <i>Extracción de ADN genómico</i> .....	16-17
• <i>Captura y Enriquecimiento del Exoma</i> .....	17-18
• <i>Clusterización y Secuenciación de Nueva Generación</i> .....	19
• <i>Confirmación de las Variantes por la Técnica de Sanger</i> .....	19
<b>ANÁLISIS DE DATOS.....</b>	<b>20-21</b>
• Bioinformática.....	20
• Análisis de los resultados de secuenciación Sanger.....	21
<b>FINANCIAMIENTO.....</b>	<b>21</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>22-25</b>

## INTRODUCCIÓN

### Encefalopatías epilépticas en la infancia

Las encefalopatías epilépticas son disturbios cerebrales graves en los cuales descargas eléctricas epilépticas pueden contribuir al desarrollo progresivo de disfunción psicomotora (Berg 2010). Se cree que la actividad eléctrica epileptógena durante la maduración cerebral es la principal causa de retraso o deterioro cognitivo y neuropsicológico progresivo (Panayiotopoulos 2005). El deterioro cognitivo y comportamental es acompañado por cambios en la conectividad del cerebro, provocando disminución de la neurogénesis, en otras palabras, existe un efecto perjudicial de fondo de la actividad eléctrica epiléptica sobre la función normal del cerebro en desarrollo. Ese efecto deletéreo de descargas anormales está relacionado con la edad, siendo peculiar en el cerebro inmaduro, y varía significativamente de acuerdo con el estadio de maduración del cerebro en el momento que ocurre, provocando déficits cognitivos, comportamentales y neurológicos intratables que pueden llevar incluso a la muerte precoz (Panayiotopoulos 2005). Las principales encefalopatías epilépticas con inicio en el periodo neonatal, infancia y primera infancia son: síndrome de Dravet, síndrome de Doose, síndrome de West, síndrome de Ohtahara, encefalopatía mioclónica precoz, síndrome de West y síndrome de Landau-Kleffner, que merecen mención especial y serán descritos a continuación.

El síndrome de Dravet representa el fenotipo más grave del espectro de las epilepsias generalizadas con crisis febriles plus (*generalized epilepsy with febrile seizures plus*, conocida por sus siglas en inglés: GEFS +) y su incidencia estimada es de por lo menos uno en cada 40,000 niños menores de 7 años (Dravet 1978). El inicio de las crisis se da en el primer año de vida, cuando ocurren crisis tónico-clónicas inducidas por fiebre. En los años siguientes, pueden presentarse también crisis mioclónicas y de ausencia. El desenvolvimiento neurológico es normal antes del inicio de las crisis, pero

los pacientes presentan retraso y ataxia alrededor del segundo año de vida, después del inicio de las mismas y, además, una alta resistencia al tratamiento con fármacos antiepilépticas (Dravet 1992).

El síndrome de Doose, otro fenotipo grave del espectro de GEFS+. Posee pronóstico variable, dado que la mayoría de los pacientes presentan deficiencia cognitiva y atraso en el desarrollo psicomotor, y en otros casos pueden ocurrir remisión de las crisis. Ocurre en el 0,2 % de los niños con epilepsia (Doose 1970). El inicio de las crisis ocurre durante los primeros 5 años de vida, con crisis febriles y desarrollo psicomotor normal, ocurriendo posteriormente otros tipos de crisis, como las mioclónicas-astáticas y las de ausencia (Guerrini 2012).

El síndrome de West es caracterizado por la ocurrencia de espasmos infantiles y retraso o regresión del desarrollo psicomotor (Lux 2004). Los espasmos ocurren normalmente entre los 3 y 12 años de edad, y consisten en contracciones tónicas de los músculos de los miembros, típicamente relacionados al ciclo sueño-vigilia, cuando los niños despiertan del sueño o están yendo a dormir. La etiología de este síndrome es diversa, y en alrededor del 30% de los niños afectados ninguna causa puede ser identificada, por lo cual, la investigación genética por mutaciones patogénicas es importante (Sharma 2013).

En recién nacidos, dos síndromes están bien caracterizados: encefalopatía mioclónica precoz y el síndrome de Ohtahara (también conocido como encefalopatía epiléptica infantil precoz) (Yamamoto 2011). La encefalopatía mioclónica precoz normalmente se presenta en los primeros días de vida. Los pacientes presentan crisis epilépticas mixtas, irregulares, crisis focales y crisis tónicas (Yamamoto 2011). El electroencefalograma (EEG) muestra un patrón de brote supresión que es prominente durante el sueño, sin embargo, puede aparecer en estado de vigilia, disturbios

metabólicos son frecuentemente descritos (Ohtahara 2003), la etiología de este síndrome aun no ha sido esclarecida, y no han sido descritos genes asociados a ella.

El síndrome de Ohtahara normalmente tiene su inicio en los primeros días o semanas de vida, con espasmos tónicos predominantes, que ocurren tanto en el sueño como en estado de vigilia. Alrededor del 30% al 50% de los pacientes también presentan convulsiones focales (Ohtahara 2003). El EEG muestra un patrón de brotes supresión que es persistente a lo largo de los ciclos de sueño-vigilia, y frecuentemente el cuadro evoluciona para el síndrome de West (Yamamoto 2011).

Los síndromes de epilepsia-afasia (EAS) también son un grupo de encefalopatías epilépticas graves de etiología desconocida, con un patrón característico de EEG, y regresión del desarrollo que afecta particularmente el lenguaje. En el síndrome de Landau-Kleffner (*Landau-Kleffner syndrome*, conocida por sus siglas en ingles: LKS), niños antes normales, o que tenían un aislado retraso del lenguaje, presentan afasia epiléptica adquirida, con crisis focales motoras en 70% de los casos. En contraste, el síndrome de encefalopatía epiléptica con punta-onda continua durante el sueño lento (*epilepsy with continuous spikes and waves during slow wave sleep*, conocida por sus siglas en ingles: ECSWS), el desarrollo previo ya es retrasado en la mitad de los niños afectados, también es común que presenten epilepsia refractaria con varios tipos de crisis, y la regresión del desarrollo es global, afectando lenguaje, comportamiento y comprometimiento motor (Carvill 2013<sup>a</sup>).

La epilepsia migratoria en la infancia (*migrating epilepsy of childhood*) presenta crisis focales o parciales, siendo caracterizada por desarrollo psicomotor inicial normal, crisis focales refractarias que surgen de forma independiente y ambos hemisferios, pudiendo evolucionar hacia crisis generalizadas y retardo psicomotor grave con pronóstico desfavorable, su etiología es desconocida (Coppola 2009).

## **Bases genéticas**

El diagnóstico de las EEI aun está basado en criterios clínicos y hallazgos en el EEG, y dado que la mayoría de los pacientes no presentan lesiones estructurales (Ferrie 1996, Dulcan 1996), el diagnóstico por imagen (MRI) no es recomendado. Solamente en el siglo XXI fueron realizados avances significativos en genética molecular, que permitieron el descubrimiento de alteraciones en genes específicos en muchos pacientes con EEI (Harkin 2007, Marini 2007). Sin embargo, la etiología de las EEI en gran parte de los pacientes permanece aún desconocida, lo que lleva a la recomendación de realizar análisis molecular para la identificación de mutaciones en esos pacientes.

Hasta la fecha más de 80 genes han sido identificados en el estudio de las EEI, observándose una acentuada heterogeneidad genética y una alta frecuencia de mutaciones de *novo*, existiendo una compleja relación genotipo/fenotipo (diferentes mutaciones causales en diversos pacientes y mutaciones en el mismo gen que causan diversos síndromes). Por lo tanto, existe la necesidad de evaluar más a fondo el impacto de estos, y realizar nuevos hallazgos genéticos moleculares que puedan ser de utilidad en la práctica clínica. (Gonsales 2015).

Actualmente, uno de los genes más relevantes en la etiología de las epilepsias es el SCN1A, cuyas mutaciones fueron inicialmente identificadas en familias con el espectro de GEFS+. Posteriormente, se observó que la mayoría de las mutaciones identificadas estaban asociadas con el gen SCN1A. El equipo de trabajo sede, en la Universidad de Campinas, Brasil (UNICAMP), mostró que esta mutación es altamente frecuente en pacientes con síndrome de Dravet, revelando alteraciones potencialmente deletéreas en el 81% de los pacientes estudiados, confirmándose los datos encontrados en la literatura, que relatan mutaciones en el 70 a 80% de los pacientes estudiados (Claes 2001).



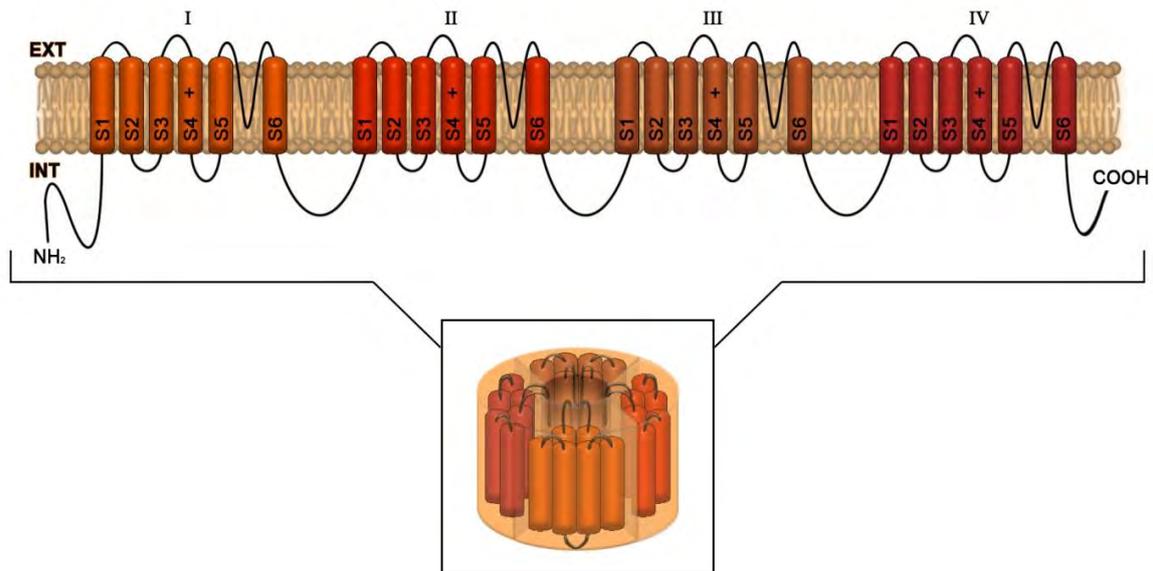


Figura 2. Representación esquemática de la subunidad  $\alpha$ -1 del canal de sodio voltaje-dependiente neuronal (Nav1.1) (Gonsales, 2013).

Los canales de sodio voltaje-dependientes desempeñan un importante papel en la generación de potenciales de acción, una vez que estos son estimulados por la despolarización de la membrana celular, como resultado del flujo de sodio hacia la célula.

La expresión del gen SCN1A ocurre predominantemente en las interneuronas inhibitorias GABAérgicas, o sea, aquellas que secretan el neurotransmisor GABA (Steinlein 2002), de esta forma, se cree que la hiperexcitabilidad neuronal observada en los casos de pérdida de función de los canales de sodio, como es observado en el síndrome de Dravet y en algunos de los casos de GEFS+, sería resultado de una disfunción en los circuitos inhibitorios neuronales (Duflocq 2008). Sin embargo, también son observadas alteraciones que resultan en una ganancia de función de los canales de sodio en individuos con GEFS+, y se cree que en estos casos ocurre pérdida de la capacidad de inactivación del canal iónico, prolongando la despolarización neuronal (Yu 2006). Siendo así, las bases de la hiperexcitabilidad neuronal en GEFS+ aun no están claramente definidas.

## **Avances Moleculares.**

Aunque los métodos tradicionales de análisis molecular nos han llevado a un mayor entendimiento sobre las bases moleculares de las enfermedades Mendelianas en las últimas décadas, estos son incapaces de detectar todas las formas de variación genética.

Recientemente, métodos de secuenciación a gran escala han marcado el inicio en la reducción de los costos económicos de las reacciones de secuenciación (Shendure 2005; Margulies 2005). Nuevos métodos para captura y enriquecimiento de muestras genómicas humanas y complejas a un costo y escala compatibles con el poder de las nuevas tecnologías de secuenciación han sido desarrolladas (Mamanova 2010). Estos métodos facilitan la secuenciación a larga escala de muestras genómicas específicas de varios individuos por el mismo costo de la secuenciación del genoma completo de un individuo. Los avances en este tipo de tecnologías acabaran resultando en la "secuenciación de exomas" que es la captura y la secuenciación de aproximadamente 1% del genoma humano, o más precisamente de la porción responsable de la codificación de las proteínas (Ng, et al., 2009; Hodges et al. 2007).

Siendo así, la secuenciación de exomas necesita de una cantidad mucho menor de datos para que la cobertura necesaria para la identificación de variantes sea alcanzada en comparación con la secuenciación del genoma completo. La secuenciación de exomas se convirtió rápidamente en una de las principales herramientas para el estudio de las causas de las enfermedades genéticas Mendelianas (Terr and Mullikin, 2010), llevando al descubrimiento de más de 30 nuevos genes implicados en este tipo de enfermedades (Ng, et al., 2010<sup>a</sup>; Ng, et al. 2010<sup>b</sup>). La identificación de mutaciones responsables de las enfermedades Mendelianas permite hacer un diagnóstico molecular y también la búsqueda del portador del alelo mutante, tanto en el paciente como en los individuos de su familia.

Este hecho es de importancia tanto para el planeamiento de la conducta de tratamiento para el paciente como para la consejería genética de la familia, además de servir como un punto de partida para las intervenciones terapéuticas (Antonarakis and Beckmann, 2006).

## **JUSTIFICACIÓN**

Las epilepsias no poseen barreras socioeconómicas, étnicas, geográficas o etarias, y son el trastorno neurológico grave más común. Las epilepsias de la infancia constituyen un grupo que requiere especial atención, pues además de las crisis debemos tener en cuenta el impacto negativo de la actividad eléctrica anormal en el desarrollo. Por tanto, identificar mutaciones en genes candidatos en estos pacientes es de gran importancia, ya que en algunos casos eso puede modificar de manera significativa el tratamiento. Además de eso, a medida que nuestro conocimiento sobre la etiología de las encefalopatías epilépticas avance podemos también avanzar en el conocimiento de los mecanismos básicos de esas condiciones.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivos Generales:**

- Caracterización de las bases moleculares de las diferentes formas de las encefalopatías epiléptica.
- Identificación de genes candidatos para diferentes formas de Encefalopatías Epilépticas.
- Evaluación del potencial de los genes identificados para la utilización en exámenes genéticos para fines clínicos.

### **Objetivos específicos:**

- Investigación de la presencia de mutaciones en los pacientes con Encefalopatías Epilépticas.
- Análisis del impacto molecular de las mutaciones encontradas.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Casuística**

Serán parte de este proyecto los pacientes con diferentes formas de encefalopatías epilépticas, seleccionados de los servicios de neurología de cada uno de los centros colaboradores al interior de Brasil y resto de América Latina. Los pacientes, primero serán evaluados a través de la secuenciación por panel, en MiSeq, para investigar alteraciones genéticas ya descritas como el gen SCN1A y otros genes. Los pacientes que no presenten las mutaciones deletéreas en esos genes, serán sometidos a un análisis de toda la porción codificante del ADN: el exoma, realizándose el mismo análisis en los padres, de ser necesario, para averiguar la heredabilidad de las mutaciones. Los datos clínicos de esos pacientes serán revisados y discutidos por los expertos en el manejo de epilepsias en la infancia (epileptólogos y/o neurólogos capacitados en el tratamiento de epilepsias en la infancia), responsables en cada uno de los centros colaboradores, quienes deberán verificar los siguientes criterios clínicos para incluir los pacientes en el estudio "casos": a) reunir los criterios electro clínicos de alguna de las EEI, b) desarrollo normal previo al inicio de las crisis y con evidencia de detención o involución posterior a las mismas. Excepto las EEI de inicio precoz, c) IRM sin evidencia de lesión cerebral que explique la alteración en el desarrollo del niño.

### **Extracción del ADN genómico**

La extracción del ADN será realizada a partir de las muestras de sangre periférica recolectadas de los pacientes y familiares, utilizando el protocolo de extracción con fenol-cloroformo (Anexo 3) descrito a continuación:

Apropiadamente 12 mL de sangre venosa será extraída de cada individuo reclutado para el estudio. Las muestras serán centrifugadas por 10 minutos a

2500 rpm, y la capa intermedia que contiene los leucocitos, será transferida para un tubo de propileo con fondo cónico. El próximo paso será la adición de las soluciones RSB 1X hasta completar el volumen de 11 mL y de 60µL de Nonidet®. Después de la homogenización en agitador durante 10 minutos, la solución será centrifugada a 2500 rpm por más de 10 minutos y el sobrante será descartado. Luego, serán adicionados 3mL de solución SDS a 10% y 10µL de proteinasa K (100mg/mL). Posteriormente, las muestras serán incubadas a 37° por 24h. Después de la incubación, serán añadidos 3 mL de fenol, seguido de agitación de los tubos hasta la homogenización y centrifugación por 10 minutos a 2500 rpm. El proceso será repetido con 1,5 mL de fenol y 1,5 mL de solución de cloromórfico-alcohol isoamílico. El ADN genómico será finalmente precipitado con 6 ml de etanol puro y trasferido para tubos cónicos de 1,5 mL y con apropiadamente 200µL de H<sub>2</sub>O. Este protocolo permitirá la obtención de aproximadamente 200µg de ADN genómico, provenientes de 12 mL de sangre venosa (en caso de no extraer la cantidad de sangre y/o ADN ideal, podrá procesarse una cantidad mínima de 6 mL, de la cual pueda obtenerse una masa de ADN mínimo de 5µg y una concentración mínima de 50 ng/UI. Menos de 6 mL de sangre puede ser insuficientes).

Las muestras de ADN deben enviarse por los centros colaboradores al Laboratorio de Genética Molecular de la Universidad de Campinas (UNICAMP), previa planificación con el equipo coordinador del proyecto. Situaciones especiales podrán ser consideradas por separado.

### **Captura y Enriquecimiento del Exoma**

Para la elaboración de la biblioteca de exoma será utilizado el kit SureSelectXT Target Enrichment System for Illumina Paired-End Sequencing Library (Agilent Technologies) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

## **1. Preparación de muestras (3 ug de muestra de ADN)**

Paso 1: Fragmentación del ADN

Paso 2: Purificación de la muestra usando beads Agencourt AMPure XP

Paso 3: Evaluación de la calidad

Paso 4: Reparación de las extremidades

Paso 5: Purificación de las muestras usando beads Agencourt AMPure XP

Paso 6: Adición de bases 'A' en la extremidad 3' del ADN fragmentado

Paso 7: Purificación de la muestra usando beads Agencourt AMPure XP

Paso 8: Ligación de adaptadores en las extremidades de los fragmentos

Paso 9: Purificación de la muestra usando beads Agencourt AMPure XP

Paso 10: Ampliación de la biblioteca con adaptador

Paso 11: Purificación de la muestra usando beads Agencourt AMPure XP

Paso 12: Evaluación de la calidad y cantidad

## **2. Hibridación**

Paso 1: Hibridación de la biblioteca

Paso 2: Preparación de las esferas magnéticas

Paso 3: Selección del híbrido de captura con SureSelect

## **3. Adición de Index Rags para amplificación Pos-hibridación**

Paso 1: Ampliación de la biblioteca de captura para adicionar Index Tags

Paso 2: Purificación de la muestra usando beads Agencourt AMPure XP

Paso 3: Evaluación de la calidad

Paso 4: Evaluación de la cantidad de cada biblioteca marcada con Index por Qpcr

Paso 5: Pool de las muestras para Multiplexed Sequencing

Paso 6: Preparación de las muestras para amplificación con cluster

### **Clusterización y Secuenciación de la Nueva Generación**

#### **MiSeq**

La clusterización será realizada con el TruSeq™ PE Cluster Kit v2 en el equipamiento MiSeq, que integra la clusterización, la secuenciación y el análisis de datos en un único instrumento, en el Laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Ciencias Médicas (FCM) de la UNICAMP.

#### **HiSeq**

La clusterización será realizada con el TruSeq™ PE Cluster Kit v3 en el equipamiento c-Bot en el Laboratorio Central de Tecnologías de Alto Desempeño (LaCTAD de la UNICAMP).

### **Confirmación de las variantes por la técnica de Sanger**

Las variantes probables identificadas por la secuenciación de nueva generación serán todas confirmadas por la técnica de Sanger. Todos los individuos sometidos a la secuenciación del exoma serán incluidos en este análisis. Los parientes afectados y no afectados de los casos sometidos a la secuenciación de larga escala también serán analizados por la técnica de Sanger, con el fin de evaluar si las variantes probables (candidatas) se están presentando solo en los individuos que presentan los signos clínicos.

Serán diseñados *primers* específicos con auxilio de los programas primer-Blast y primer3plus. Los *primers* tendrán como diana las regiones conteniendo las variantes probables. El ADN molde será amplificado por PCR con los primers específicos, Los

productos de PCR serán secuenciados en el aparato ABI 3500 XI (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation).

## **ANÁLISIS DE DATOS**

### **Bioinformática HISEQ**

La primera etapa del análisis de bioinformática será alinear las secuencias (*reads*) generadas por el Illumina Hiseq 2000 con el genoma de referencia (*Homo Sapiens, hg19 - Genome Reference Consortium GRCh37*) utilizando *softwares* que sean compatibles con el formato SAM, con MAQ y Bowtie. Para las identificaciones de SNP (*single nucleotide polymorphisms*) y pequeños indel (*inserções/deleções*) serán utilizados los programas PolyBayes, SOAP e MAQ. Las variantes identificadas serán filtradas por los siguientes criterios:

- 1) Las variantes que presenten *Phred-like variant quality* puntajes menores que 40 (o 30 cuando estuviesen en ambos alelos) y frecuencias alélicas mayores que 15%, serán excluidas.
- 2) El total de *reads* en las bases con variación debe ser igual o mayor que diez,
- 3) Ausencia de las bases de datos del dbSNP132 y 1000 *Human Genome Project*,
- 4) Segregación de las variantes de los padres afectados/portadores para los hijos afectados,
- 5) Efecto en la proteína codificada, si la variante no fuera sinónima las consecuencias serán evaluadas con los algoritmos SIFT, Polyphen-2, SNP&GO e Phanter,
- 6) Información de la conversión de los residuos a través de los valores de phyloP calculados por el alineamiento de más de 40 especies (calculado en la *University of California Genome Browser* - <http://genome.ucsc.edu>),

- 7) Patrón de expresión y función de los genes conteniendo las variantes  
(*Genomics Institute of the Novartis Research Foundation*, NCBI, UNIGENE).

### **Análisis de los resultados de la secuenciación Sanger**

Las secuencias obtenidas en la secuenciación vía Sanger serán alineadas a secuencias de nucleótidos presentes en los bancos de datos (*Ensembl e NCBI - The National Center for Biotechnology Information*), a través del programa *DNABaser*.

Cuando fuesen identificadas alteraciones de tipo sustitución de base única en la secuencia nucleotídica de los pacientes, esa mutación será comparada con los bancos de datos de polimorfismo de base única (*SNP – single nucleotide polymorphisms*).

Las mutaciones que resulten en cambios de aminoácidos en la proteína codificada será sometida a análisis *in silico*, a fin de estimar su efecto en la estructura de la función de la proteína, utilizando los programas *SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant)*, *Polyphen (Polymorphism Phenotyping)* y *Pmut*.

### **FINANCIAMIENTO**

El estudio será financiado por la Fundación de Amparo para Investigación del Estado de Sao Paulo (FAPESP) en el marco de la Iniciativa Brasileira de Medicina de Precisión (Brazilian Initiative on Precision Medicine -BIPMed), como un proyecto de investigación del Instituto Brasileiro de Neurociencias y Neurotecnología (Brazilian Institute of Neuroscience and Neurotechnology – BRAINN). Los gastos previos al envío de las muestras (extracción de ADN) será responsabilidad de cada centro colaborador. Casos particulares podrán ser analizados.

## REFERENCIAS

- Antonarakis SE, Beckmann JS. Mendelian disorders deserve more attention. *Nat Rev Genet* 2006, 7:277-282.
- Berg T 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; 51:676-85.
- Carranza RD, Hamiwka L, McMahon JM, et al. De novo SCN1A mutations in migrating partial seizures of infancy. *Neurology*. 2011; 77: 380-383.
- Carvill GL, Regan BM, Yendle SC, et al. GRIN2A mutations cause epilepsy-aphasia spectrum disorders. *Nat Genet*. 2013a; 45(9):1073-6.
- Carvill GL, Heavin SB, Yendle SC, et al. Targeted resequencing in epileptic encephalopathies identifies de novo mutations in CHD2 and SYNGAP1. *Nature Genetics*. 2013b; 45: 825-831.
- Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B, Lagae L, Van Broeckhoven C, De Jonghe P. De novo mutations in the sodium channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am. J. Hum. Genet*. 2001; 68: 1327–32
- Coppola G. Malignant migrating partial seizures in infancy: epilepsy syndrome of unknown etiology. *Epilepsia*. 2009; 50Suppl 5: 49-51.
- Dimova PS, Yordanova I, Bojinova V, et al. Generalized Epilepsy with Febrile Seizures plus: Novel SCN1A mutation. *Pediatric Neurology*. 2010; 42: 137-140.
- Doose H, Gerken H, Leonhardt R, et al. Centrencephalic myoclonic-astatic petit mal. Clinical and genetic investigations. *Neuropediatric*. 1970; 2: 59-78.
- Dravet C, Bureau M, Guerrini R. et al. Severe myoclonic epilepsy in infants In: J. Roger, C. Dravet M, Bureau FE, Dreifus A, Perret PW. *Epileptic Syndromes in Infancy, Childhood and Adolescence*, 2<sup>a</sup> ed., John Libbey, London. 1992 ; 75–102.
- Dravet C. Les épilepsies graves de l'enfant. *Vie Med*. 1978 ; 8: 543-548.

- Duflocq A, Le Bras B, Bullier E, et al. Nav1.1 is predominantly expressed in nodes of Ranvier and axon initial segments. *Mol Cell Neurosci* 2008; 39(2):180-92.
- Dulac OJ, Chiron C. Malignant epileptic encephalopathies in children. *Baillieres Clin Neurol* 1996; 5: 765-81.
- Ferrie CD, Maisey M, Cox T, et al. Focal abnormalities detected by 18FDG PET in epileptic encephalopathies. *Arch Dis Child* 1996; 75: 102-7.
- Freilich ER, Jones JM, Gaillard WD, et al. Novel SCN1A mutation in a proband with malignant migrating partial seizures of infancy. *Arch Neurol*. 2011; 68: 665-671.
- Fujiwara T, Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, et al. Mutations of sodium channel  $\alpha$  subunit type 1 (SCN1A) in intractable childhood epilepsies with frequent generalized tonic-clonic seizures. *Brain*. 2003; 126: 531-546
- Gonsales, M. C. (2013). Estudos moleculares em epilepsias da infância e da adolescência: avaliando o potencial de aplicação clínica dos testes de genética molecular [Tese - Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas.
- Gonsales, MC, Montenegro MA, Soler CV. Recent developments in the genetics of childhood epileptic encephalopathies: impact in clinical practice. *Arq Neuropsiquiatr* 2015; 1-13.
- Guerrini R, Mari F, Dravet C. Idiopathic myoclonic epilepsies in infancy and early childhood. In: Bureau M, Genton P, Dravet C, Delgado-Escueta AV, Tassinari CA, Thomas P, Wolf P (eds). *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence*, 5th edition. Montrouge, France: John Libbey; 2012:157-173.
- Harkin LA, McMahon JM, Iona X, et al. The spectrum of SCN1A-related infantile epileptic encephalopathies. *Brain* 2007; 130:843-52.

- Harkin LA, McMahon JM, Iona X, et al. The spectrum of SCN1A-related infantile epileptic encephalopathies. *Brain*. 2007; 130: 843-852.
- Hu W, Tian C, Li T, et al. Distinct contributions of Na(v)1.6 and Na(v)1.2 in action potential initiation and backpropagation. *Nat Neurosci* 2009; 12(8):996-1002.
- Lent R. Cem bilhoes de neuronios: Conceitos Fundamentais de Neurociencia. Atheneu, 2004. p77, 78, 101, 114.
- Lux AL, Osborne JP. A proposal for case definitions and outcome measures in studies of infantile spasms and West syndrome: consensus statement of the West Delphi group. *Epilepsia*. 2004; 45: 1416-1428.
- Marini C, Mei D, Temudo T, et al. Idiopathic epilepsies with seizures precipitated by fever and SCN1A abnormalities. *Epilepsia*. 2007; 9: 1678-1685.
- Ohtahara S, Yamatogi Y. Epileptic encephalopathies in early infancy with suppression-burst. *J Clin Neurophysiol*. 2003; 20: 398-407.
- Panayiotopoulos CP. *The Epilepsies: Seizures, Syndromes and Management*. Oxfordshire (UK): Bladon Medical Publishing; 2005. Chapter 7: Epileptic Encephalopathies in Infancy and Early Childhood in Which the Epileptiform Abnormalities May Contribute to Progressive Dysfunction.
- Scheffer IE, Berkovic SF. Generalized epilepsy with febrile seizures plus: a genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes. *Brain*. 1997; 120:479–90
- Scheffer IE, Zhang YH, Jansen FE, Dibbens L. Dravet syndrome or genetic (generalized) epilepsy with febrile seizures plus? *Brain Dev*. 2009; 31: 394-400.
- Sharma S, Prasad AN. Genetic Testing of Epileptic Encephalopathies of Infancy: An Approach. *Can J Neurol Sci*. 2013; 40:10-16.
- Steinlein, OK. Channelopathies can cause epilepsy in man. *European Journal of Pain*. 2002; 6: 27-34.

- Tang S, Pal D. Dissecting the genetic basis of myoclonic-astatic epilepsy. *Epilepsia* 2012;53(8):1303–1313.
- Wallace RH, Hodgson BL, Grinton BE, et al. Sodium-channel  $\alpha$ 1-subunit mutations in severe myoclonic epilepsy of infancy and infantile spasms. *Neurology*. 2003; 61: 765-769.
- Wallace RH, Scheffer IE, Barnett S, et al. Neuronal sodium-channel  $\alpha$ 1-subunit mutations in generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Am J Hum Genet*. 2001; 68: 859-865.
- Wallace RH, Wang DW, Singh R et al. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na<sup>+</sup>-channel beta1 subunit gene SCN1B. *Nat Genet*. 1998; 19:366–70.
- Yamamoto H, Okumura A, Fukuda M. Epilepsies and epileptic syndromes starting in the neonatal period. *Brain Dev*. 2011; 33: 213-220.
- Yu FH, Mantegazza M, Westenbroek RE, et al. Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat Neurosci* 2006; 9(9):1142-9.