

IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES GERMINATIVAS ASSOCIADAS ÀS DISPLASIAS CORTICAIS FOCAIS

Palavras-Chave: EPILEPSIA, DISPLASIA CORTICAL FOCAL, VARIANTES GENÉTICAS.

Autores:

FLÁVIA PANIZA MARCONE, FCM – UNICAMP

Prof^a. Dr^a. LUCIANA CARDOSO BONADIA, FCM - UNICAMP

Prof. Dr. FABIO ROGÉRIO, FCM - UNICAMP

Prof. Dr. FERNANDO CENDES, FCM - UNICAMP

Prof^a. Dr^a. ISCIA TERESINHA LOPES CENDES (orientadora), FCM - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A Displasia Cortical Focal (DCF) é um tipo de malformação do desenvolvimento do córtex cerebral que geralmente se apresenta como uma epilepsia resistente ao tratamento com medicamentos. O início das crises de epilepsia acontece comumente na infância e o tratamento cirúrgico, com a retirada do tecido anormal, chamado de tecido displásico, pode ser indicada como uma forma de tratamento das crises. O termo “displasia cortical focal” foi inicialmente proposto por Taylor (TAYLOR et al., 1971) com base em seus estudos histológicos da lesão displásica presente no córtex cerebral de pacientes falecidos com epilepsia refratária ao tratamento. Essas lesões contêm alterações microscópicas bem características, tais como a presença de neurônios dismórficos, células de aparência anormal, também conhecidas como células em balão, e uma desorganização das camadas do córtex cerebral (NAJM et al., 2022). A DCF pode ser classificada em diferentes subtipos (DCFI, DCFII e DCFIII), de acordo com as características histopatológicas da lesão. Em geral, as DCFs podem ser identificadas por exames de ressonância magnética realizados no contexto da investigação de pacientes com epilepsia refratária ao tratamento clínico.

As malformações do desenvolvimento cortical ocorrem quando alguma das etapas do desenvolvimento do córtex é impactada. Essas etapas são: a proliferação, em que as células neuroepiteliais da zona ventricular se multiplicam; a diferenciação, em que as células progenitoras começam a se diferenciar em neurônios e células gliais radiais; e a migração neuronal, quando os neurônios recém-formados deixam a zona ventricular e migram, formando a placa cortical (SUBRAMANIAN et al., 2020). Alterações em qualquer um desses processos biológicos pode levar às malformações do desenvolvimento cortical.

A via de sinalização conhecida como mTOR tem sido relacionada às DCFs, essa via pode ser subdividida em mTORC1 e mTORC2. A via mTORC1 participa principalmente da proliferação e sobrevivência celular, e a via mTORC2 se relaciona com metabolismo, síntese de proteínas e lipídios, crescimento, proliferação celular e autofagia (KIM e LEE, 2019). Variantes localizadas em genes que codificam proteínas da via mTOR foram identificadas em pacientes com DCF, tanto na forma de variantes germinativas quanto somáticas. Desse modo, postula-se que a hipótese dos dois *hits* possa estar envolvida na etiologia das DCFs. Genes envolvidos nesse fenômeno são principalmente *TSC1*, *TSC2* e *DEPDC5*. De acordo com essa hipótese, para que a DCF ocorra seriam necessárias duas variantes genéticas causais: uma germinativa, presente em todas as células do organismo, e outra somática, presente nas células originadas a partir daquela que sofreu a mutação somática. Portanto, para que o fenótipo apareça, seria necessário ter um primeiro *hit* germinativo e um segundo *hit* somático, levando então a presença de duas variantes causais no tecido displásico (XU et al., 2022).

Muitas técnicas têm sido utilizadas para a identificação de variantes genéticas associadas a doenças. Uma das técnicas moleculares de melhor custo-benefício atualmente é o sequenciamento de exoma completo (do inglês *whole exome sequence*, WES), em que são sequenciadas as regiões dos éxons e adjacências (regiões de consenso de *splice*) de todos os genes humanos, possibilitando identificar variantes nas regiões codificadoras e de processamento do RNA mensageiro. Tais regiões concentram a grande maioria das variantes associadas a fenótipos de doenças monogênicas identificados na atualidade (BARTHA e GYÖRFFY, 2019).

Com o avanço no diagnóstico molecular e a identificação de genes e variantes associadas a doenças raras, o *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) criou uma ferramenta que classifica as variantes em cinco níveis de certeza da associação com o fenótipo: patogênica, provavelmente patogênica, variante de significado incerto (do inglês, *variant of unknown significance*, VUS), provavelmente benigna e benigna. Essa classificação se baseia na avaliação de vários critérios, incluindo estudos funcionais, segregação em famílias, algoritmos de predição do efeito da variante na função proteica e frequência na população referência de onde vem o paciente (RICHARDS et al., 2015).

OBJETIVO:

Este trabalho tem o objetivo de identificar variantes germinativas putativamente associadas com o fenótipo de displasia cortical focal (DCF).

METODOLOGIA:

Os pacientes foram cuidadosamente estudados pela equipe clínica dos ambulatórios de Neurologia do HC-UNICAMP e a confirmação de DCF foi realizada através do exame histopatológico dos espécimens cirúrgicos obtidos de pacientes submetidos a cirurgia de epilepsia para o controle das crises refratárias ao tratamento medicamentoso. A coleta e a extração do DNA do sangue periférico de 18 pacientes foram realizadas após a obtenção do consentimento livre e esclarecido que foi aprovado pelo CEP-UNICAMP. O sequenciamento do exoma pela técnica de WES e o processamento inicial de

bioinformática foi realizado seguido protocolos padrão. Posteriormente, os arquivos de variantes (do inglês *variant calling file*, VCF) de cada paciente foram inseridos na plataforma Franklin by Genoox, onde é possível adicionar filtros e priorizar variantes candidatas de interesse.

Primeiramente, foram adicionados: filtro de classificação do Franklin segundo os critérios da ACMG, para listar apenas variantes patogênicas, possivelmente patogênicas e VUS; filtro de zigosidade, para listar apenas variantes em homozigose e heterozigose, excluindo variantes iguais ao genoma de referência; filtro de frequência (frequência populacional menor ou igual a 1%); e filtro de confiança, para listar variantes com nível de qualidade entre médio e alto, excluindo assim aquelas que pudessem ser geradas por artefatos técnicos durante o sequenciamento ou processamento de bioinformática. Com esses filtros aplicados, foram adicionados também filtros de painéis gênicos, incluindo genes relacionados na literatura com a DCF (JESUS-RIBEIRO et al., 2021) e genes relacionados à epilepsia associada ao neurodesenvolvimento (ZHANG et al., 2023). Depois de selecionadas as variantes em genes já associados de alguma forma às DCF, os filtros de painéis gênicos foram retirados e uma nova avaliação foi realizada com o intuito de buscar variantes de interesse além das já descritas na literatura.

As variantes selecionadas foram classificadas de acordo com os critérios da ACMG (Richards et al., 2015), bem como com as recomendações posteriores da base de dados ClinGen (<https://clinicalgenome.org/working-groups/sequence-variant-interpretation/>). Para essas análises utilizamos também diversas ferramentas e bases de dados disponíveis, tais como: GnomAD, *Genome Aggregation Database*, (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) para avaliar frequência populacional global e BIPMED, *Brazilian Initiative on Precision Medicine*, (<https://www.bipmed.org/>) para avaliar frequência das variantes na população brasileira; GenCC, *The Gene Curation Coalition*, (<https://thegencc.org/>) para verificar a força da associação entre gene e condição; MobiDetails (<https://mobidetails.chu-montpellier.fr/>), que mostra de forma gráfica o efeito de alterações no sítio de splice; Decipher (<https://www.deciphergenomics.org/>), para a visualização das variantes já descritas em um gene e possíveis pontos quentes de mutação; ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), um banco de variantes associadas a doenças que traz informações sobre quantas vezes a variante foi descrita em pacientes e controles, como foi classificada e com qual fenótipo foi associada; além do UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>) e do OMIM (<https://www.omim.org/>), consultados para complementar as análises.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Foram identificadas 22 variantes de interesse, presentes em 21 genes diferentes, nos 18 pacientes, listadas na tabela 1:

Tabela 1. Variantes germinativas dos pacientes com FCD.

Paciente	Variante	Cobertura	Frequência do alelo	Classificação ACMG
----------	----------	-----------	---------------------	--------------------

			variante	
			(VAF)	(critérios)
1	<i>KEAP1: c.1061G>A, p.Arg354Gln</i>	1030	0,53	VUS (PM2_P)
2	<i>PDGFRA: c.1283C>G, p.Thr428Ser</i>	625	0,5	VUS (PM2_P, BP4)
3	<i>ABCA8: c.3664T>C, p.Trp1222Arg</i>	130	0,54	VUS (PM2_P)
4	<i>EZR: c.425A>T, p.His142Leu</i>	411	0,53	VUS (PM2_P, PP3_M)
	<i>IQSEC1: c.122C>T, p.Pro41Leu</i>	280	0,54	VUS (PM2_P, BP4_M)
5	<i>NEDD4L: c.1031C>G, p.Thr344Ser</i>	752	0,46	VUS (PM2_P, BP4_M, PP2)
6	<i>TSC2: c.1343T>C, p.Leu448Pro</i>	367	0,35	VUS (PM2_P, PP3_M)
7	<i>SNIP1: c.331C>T, p.Arg111Cys</i>	632	0,51	VUS (PM2_P, BP4)
8	<i>FMN2: c.3026_3027insTCCTCCACCCCTCTACCCGGAGCGGGCATACC, p.Ala1094_Gly1104dup</i>	48	0,33	VUS (PM2_P)
9	<i>SCN1A: c.5117A>G, p.Asn1706Ser</i>	1923	0,52	VUS (PM2_P, PP3_M)
	<i>TSC2: c.600-222G>T</i>	219	0,53	VUS (PM2_P)
	<i>WDR73: c.710dup, p.Gly238Trpfs*17</i>	2118	0,50	LP(PM2_P, PVS1)
10	<i>ASPM: c.6788A>G, p.His2263Arg</i>	1061	0,49	VUS (PM2_P)
11	<i>DEPTOR: c.767G>A, p.Arg256Gln</i>	708	0,47	VUS (PM2_P, BP4_M)
	<i>CHD8: c.1315C>T, p.His439Tyr</i>	1043	0,48	VUS (PM2_P, PP2)
12	<i>KIF26A: c.4097C>T, p.Thr1366Met</i>	260	0,47	VUS (PM2_P, BP4_M)
13	<i>ZC3H14: c.71G>A, p.Gly24Asp</i>	583	0,53	VUS (PM2_P, BP4)
14	<i>KIF2A: c.1031G>A, p.Arg344Gln</i>	108	0,63	VUS (PM2_P)
15	<i>MACF1: c.14867G>A, p.Arg4956His</i>	631	0,50	VUS (PM2_P, PP2)
16	<i>PTPN23: c.4796G>A, p.Arg1599Gln</i>	1867	0,50	VUS (PM2_P)
17	<i>COL4A2: c.4G>C, p.Gly2Arg</i>	752	0,48	VUS (PM2_P)
18	<i>EIF2B4: c.1192-4A>G</i>	684	0,46	VUS (PM2_P)

Onde, LP= provavelmente patogênico; VUS= variante de significado incerto; _P= critério modulado com força suporte; _M= critério modulado com força moderada.

Como mostra a Tabela 1, uma variante foi classificada como provavelmente patogênica (*WDR73*), enquanto as outras variantes foram classificadas como variantes de significado incerto (VUS). Algumas variantes estão em genes relacionados à proliferação, diferenciação ou apoptose, como *PDGFRA*, *NEDD4L* (LEE et al., 2020), *SNIP1* e *CHD8*. Outras foram selecionadas por se localizarem em genes relacionados à migração celular, por meio de mecanismos estruturais, como os genes *EZR*, *FMN2*, *WDR73*, *ASPM*, *KIF26A* (QIAN et al., 2022), *KIF2A* e *MACF1*. Finalmente algumas variantes foram selecionadas por estarem em genes que apresentam alguma associação com DCF na literatura, mesmo que seus mecanismos não estejam bem definidos, como o gene *SCN1A* (SKJEI et al., 2015).

As variantes selecionadas estão localizadas em 21 genes candidatos, sendo que em quatro desses não há fenótipos associados descritos na base de dados OMIM, ainda que suas funções biológicas se relacionem a processos biológicos fundamentais na formação do córtex (*KEAP1*, *ABCA8*, *EZR*, *DEPTOR*). Além disso, variantes em cinco outros genes poderiam explicar o fenótipo mesmo em heterozigose (*NEDD4L*, *CHD8*, *KIF2A*, *MACF1* e *COL4A2*). Já as variantes restantes poderiam funcionar como um primeiro *hit* germinativo contribuindo para a etiologia da DCF.

CONCLUSÕES:

Neste estudo foram identificadas 21 variantes genéticas de interesse, sendo uma classificada como provavelmente patogênica, enquanto as demais foram classificadas como VUS.

Embora as variantes selecionadas necessitem estudos adicionais para que possam ser inequivocamente ligadas à etiologia das DCFs, nossos resultados já sugerem a importância de investigar a linhagem germinativa de pacientes com DCF. Os resultados também enfatizam a complexidade da base genética da DCFs demonstrando claramente que a condição pode não se associar apenas a variantes genéticas na via mTOR. Desse modo, nossos resultados contribuem para um melhor entendimento da arquitetura genética das FCDs, abrindo a possibilidade de uso de estratégias de medicina de precisão para esses pacientes no futuro.

BIBLIOGRAFIA

- TAYLOR, D. C. et al. Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 34, n. 4, p. 369–387, 1 ago. 1971.
- NAJM, I. et al. The ILAE consensus classification of focal cortical dysplasia: An update proposed by an ad hoc task force of the ILAE diagnostic methods commission. **Epilepsia**, v. 63, n. 8, p. 1899–1919, 15 jun. 2022.
- JESUS-RIBEIRO, J. et al. Genomic and Epigenetic Advances in Focal Cortical Dysplasia Types I and II: A Scoping Review. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, 22 jan. 2021.
- KIM, J. K; LEE, J. M. Mechanistic Target of Rapamycin Pathway in Epileptic Disorders. **Journal of Korean Neurosurgical Society**, v. 62, n. 3, p. 272–287, 1 maio 2019.
- RICHARDS, S. et al. 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. **Genetics in Medicine**, v. 17, n. 5, p. 405-24, 2015.
- XU, Y. et al. Identification of genetic characteristics in pediatric epilepsy with focal cortical dysplasia type 2 using deep whole-exome sequencing. **Molecular Genetics & Genomic Medicine**, v. 10, n. 12, 7 nov. 2022.
- ZHANG, M.-W. et al. Epilepsy-associated genes: an update. **Seizure: European Journal of Epilepsy**, 23 set. 2023.
- SUBRAMANIAN, L.; CALCAGNOTTO, M. E.; PAREDES, M. F. Cortical Malformations: Lessons in Human Brain Development. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, 24 jan. 2020.
- BARTHA, Á.; GYÖRFFY, B. Comprehensive Outline of Whole Exome Sequencing Data Analysis Tools Available in Clinical Oncology. **Cancers**, v. 11, n. 11, p. 1725, 4 nov. 2019.
- LEE, D.-E. et al. NEDD4L downregulates autophagy and cell growth by modulating ULK1 and a glutamine transporter. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 1, jan. 2020.
- QIAN, X. et al. Loss of non-motor kinesin KIF26A causes congenital brain malformations via dysregulated neuronal migration and axonal growth as well as apoptosis. **Developmental Cell**, v. 57, n. 20, p. 2381-2396.e13, 24 out. 2022.
- SKJEI, K. L. et al. Clinical and histopathological outcomes in patients with SCN1A mutations undergoing surgery for epilepsy. **Journal of Neurosurgery: Pediatrics**, v. 16, n. 6, p. 668–674, dez. 2015.