

Correlações entre o Genótipo e o Fenótipo na Síndrome de Dravet com Mutações em *SCN1A* Aumentam a Acurácia do Diagnóstico Molecular*

Gonsales MC^a, Preto P^b, Montenegro MA^b, Guerreiro MM^b, Lopes-Cendes I^a

Programa CInAPCe – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP

RESUMO

Objetivos: O propósito deste estudo foi ampliar o conhecimento acerca da aplicabilidade clínica do teste genético em *SCN1A* para fenótipos graves do espectro da epilepsia generalizada com crises febris *plus* por meio de triagem de mutações em pacientes com síndromes de Dravet e de Doose e estabelecimento de correlações genótipo-fenótipo. **Métodos:** A triagem de mutações em *SCN1A* foi realizada em 15 pacientes com síndrome de Dravet e em 13 com síndrome de Doose. Oito algoritmos de predição foram utilizados para analisar o impacto das mutações na provável função proteica. Além disso, todas as mutações em *SCN1A* previamente publicadas foram compiladas e analisadas. A técnica de *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification* (MLPA) também foi usada para detectar variações no número de cópias em *SCN1A*. **Resultados:** Doze mutações foram identificadas em pacientes com síndrome de Dravet, enquanto pacientes com síndrome de Doose não apresentaram mutações. Nossos resultados mostram que mutações *missense* são as mais comuns, e estão localizadas predominantemente nas regiões do poro e porções C- e N-terminal da proteína. Não foram identificadas alterações no número de cópias de *SCN1A* em nossa casuística. **Conclusões:** O teste genético em *SCN1A* é de utilidade clínica para pacientes com síndrome de Dravet, mas não para os com síndrome de Doose, pois ambas as síndromes parecem não compartilhar a mesma base genética. Nossos resultados indicam que mutações *missense* podem causar fenótipos graves dependendo da localização e do tipo da substituição do aminoácido. Além disso, a análise de predição utilizando múltiplos algoritmos computacionais foi eficaz para a maioria das mutações.

Unitermos: teste genético, mutações, canal de sódio.

ABSTRACT

Genotype-Phenotype correlation in Dravet Syndrome with SCN1A mutation increase efficiency of molecular diagnosis

Objectives: The purpose of this study was to advance the knowledge on the clinical use of *SCN1A* testing for severe epilepsies within the spectrum of generalized epilepsy with febrile seizures *plus* by performing genetic screening in patients with Dravet and Doose syndromes and establishing genotype-phenotype correlations. **Methods:** Mutation screening in *SCN1A* was performed in 15 patients with Dravet syndrome and 13 with Doose syndrome. Eight prediction algorithms were used to analyze the impact of the mutations in putative protein function. Furthermore, all *SCN1A* mutations previously published were compiled and analyzed. In addition, *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification* (MLPA) technique was used to detect possible copy number variations within *SCN1A*. **Results:** Twelve mutations were identified in patients with Dravet syndrome, while patients with Doose syndrome showed no mutations. Our results show that the most common type of mutation found is *missense*, and that they are mostly located in the pore region and the N- and C-terminal of the protein. No copy number variants in *SCN1A* were identified in our cohort. **Conclusions:** *SCN1A* testing is clinically useful for patients with Dravet syndrome, but not for those with Doose syndrome, since both syndromes do not seem to share the same genetic basis. Our results indicate that indeed *missense* mutations can cause severe phenotypes depending on its location and the type of amino-acid substitution. Moreover, our strategy for predicting deleterious effect of mutations using multiple computation algorithms was efficient for most of the mutations identified.

Keywords: genetic testing, mutations, sodium channel.

*Trabalho concorrente ao Prêmio Aristides Leão no XXXIV Congresso Brasileiro de Epilepsia – 06-09 de junho de 2012, Ribeirão Preto, SP.

^aDepartamento de Genética Médica, FCM-UNICAMP.

^bDepartamento de Neurologia, FCM-UNICAMP.

Received Apr. 28, 2012; accepted Apr. 30, 2012.

INTRODUÇÃO

A epilepsia generalizada com crises febris *plus* compreende um espectro clínico de fenótipos que inclui síndromes mais graves como as de Dravet e de Doose¹. Estudos moleculares permitiram a identificação de mutações no gene que codifica a subunidade $\alpha 1$ do canal de sódio voltagem-dependente neuronal (*SCN1A*) em pacientes com fenótipos desse espectro^{2,3}.

O teste genético em *SCN1A* é considerado o de maior aplicabilidade clínica dentre os genes identificados nas diferentes síndromes epiléticas⁴. No entanto, ainda há controvérsias quanto ao uso clínico desse teste molecular e à possível correlação das mutações encontradas e os diferentes fenótipos⁵.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi ampliar o conhecimento acerca da aplicabilidade clínica do teste genético em *SCN1A* para fenótipos graves do espectro de GEFS+ por meio de triagem de mutações em pacientes com síndromes de Dravet e de Doose. Além disso, pretendemos estabelecer correlação genótipo-fenótipo, utilizando múltiplos algoritmos para predição de mutações deletérias e análise comparativa com mutações previamente descritas na literatura, para fins de validação do método computacional de análise escolhido.

MÉTODOS

Pacientes

Foram incluídos neste estudo 15 pacientes diagnosticados com síndrome de Dravet e 13 com síndrome de Doose, todos não aparentados. A caracterização clínica dos pacientes estudados foi realizada de acordo com as diretrizes propostas pela *International League Against Epilepsy* (ILAE), por meio de exames neurológicos, avaliação do histórico de crises, registros eletroencefalográficos (EEG) e neuroimagem. Todos os responsáveis pelos pacientes assinaram o termo de consentimento esclarecido aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Triagem de mutações

O DNA utilizado nas análises moleculares foi obtido a partir de amostras de sangue periférico, utilizando-se o protocolo de extração com fenol-clorofórmio. Os 26 éxons codificantes do gene *SCN1A* foram amplificados por meio da reação da cadeia da polimerase (PCR) e submetidos à triagem pela técnica de *denaturing high-performance liquid chromatography* (DHPLC) ou sequenciados diretamente no aparelho ABI 3500xL. As amostras analisadas por DHPLC que apresentaram perfis cromatográficos alterados foram submetidas ao sequenciador automático no equipamento MegaBACE 1000.

Análises computacionais

Foram utilizados oito algoritmos computacionais para estimar o potencial deletério das alterações que resultam em troca de resíduo de aminoácido na proteína codificada: SIFT⁶, Polyphen 1⁷ and 2⁸, Pmut⁹, MutPred¹⁰, PhD-SNP¹¹, SNAP¹² and SNP&GO¹³. Essas análises levam em consideração as diferenças físico-químicas entre o aminoácido original e o alterado, além da posição da alteração na proteína e o nível de conservação entre sequências homólogas.

Compilação e análise de mutações previamente descritas

Todas as mutações previamente descritas na literatura no gene *SCN1A* para ambos os fenótipos estudados foram compiladas e analisadas quanto a sua provável localização na proteína e submetidas à predição de efeito deletério utilizando os algoritmos descritos acima.

Detecção de variações em número de cópias

Análises por *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification* (MLPA) foram realizadas para detectar variações no número de cópias de segmentos maiores que 1Kb envolvendo o gene *SCN1A*. Foi utilizado o kit SALSA MLPA P137-2, e as amostras foram submetidas a eletroforese capilar nos equipamentos MegaBACE 1000 e ABI 3500xL.

RESULTADOS

A triagem de mutações no gene *SCN1A* revelou doze alterações potencialmente deletérias em nosso estudo, perfazendo 80% dos pacientes com síndrome de Dravet (12/15). Em contraste, nenhuma mutação foi encontrada em pacientes com síndrome de Doose (0/13). Nossos resultados mostraram que seis mutações são do tipo *missense* (50%), três estão em sítios de *splice* (25%), duas são do tipo *frameshift* (17%) e uma é a deleção de um tripleto (8%). Segundo a predição de efeito deletério utilizando os oito algoritmos, todas as seis mutações que resultam em troca de aminoácido (c.829T>C, c.971A>C, c.2360T>G, c.4093G>T, c.5178G>T e c.5434T>C) foram consideradas patogênicas. As três alterações localizadas em sítios doadores de *splice* (IVS2+1A>G, IVS4+1G>A e IVS8+3G>T) podem induzir ao processamento aberrante do RNA mensageiro, comprometendo a estrutura e função da proteína. A inserção c.3719_3720insGATA e a deleção c.1242delA promovem alteração na matriz de leitura e geração de um códon prematuro na sequência proteica, o que resultaria em uma proteína truncada, caso seja codificada. Por fim, a deleção c.5489_5491delAGT promove a substituição de dois resíduos de aminoácidos por outro distinto. Não foram identificadas alterações no número de cópias de *SCN1A* em nossa casuística.

A compilação de mutações descritas na literatura em *SCN1A* revelou um total de 518 alterações nucleotídicas e 32 variações de número de cópias nos pacientes com síndrome de Dravet, enquanto apenas duas alterações foram encontradas em pacientes com síndrome de Doose típica. Mutações que alteram resíduo de aminoácido são as mais frequentes em síndrome de Dravet (44%), com predominância nas regiões de formação do poro e nas porções C- e N-terminal da proteína, como também observado em nossa casuística. A análise de predição utilizando múltiplos algoritmos foi eficaz para a maioria das mutações, embora houvesse um menor consenso entre os programas para substituições presentes em segmentos proteicos extramembrana.

DISCUSSÃO

A alta frequência de alterações potencialmente deletérias em *SCN1A* nos pacientes com síndrome de Dravet (80%) indica que o teste genético para fins clínicos é altamente recomendável em indivíduos com esse fenótipo. No entanto, apesar de fazer parte do mesmo espectro clínico, nossos dados sugerem que a síndrome de Doose não compartilha a mesma base genética da síndrome de Dravet. Sendo assim, o teste não seria indicado para pacientes com síndrome de Doose, visto que apenas duas mutações foram identificadas em casos típicos até o momento mesmo depois de compilada toda a literatura mundial sobre o assunto.

Nossos resultados, consistentes com a análise conjuntas das 518 mutações previamente descritas na literatura, mostram uma predominância de mutações *missense*. Estas foram anteriormente consideradas presentes exclusivamente em fenótipos mais brandos¹⁴, o que não é evidenciado pelos dados apresentados no presente trabalho. Essas substituições envolvem aminoácidos conservados evolutivamente e localizados em regiões funcionalmente cruciais da proteína, enquanto as outras alterações estão distribuídas ao longo da mesma. Esse resultado demonstra claramente que mutações *missense* também podem causar fenótipos graves, dependendo das diferenças físico-químicas entre os aminoácidos trocados e da localização da substituição na proteína codificada.

Nossa estratégia de predição de efeito deletério utilizando múltiplos algoritmos mostrou-se eficiente, especialmente para alterações na região proteica transmembrana, que é altamente conservada.

Agradecemos a colaboração dos pacientes e familiares, além das agências de fomento CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Singh R, Andermann E, Whitehouse WP, Harvey AS, Keene DL, Seni MH, Crossland KM, Andermann F, Berkovic SF, Scheffer IE. Severe myoclonic epilepsy of infancy: extended spectrum of GEFS+? *Epilepsia*. 2001;42:837-44.
2. Escayg A, Heils A, Macdonald BT, Haug K, Sander T, Meisler MH. A novel *SCN1A* mutation associated with generalized epilepsy with febrile seizures plus and prevalence of variants in patients with epilepsy. *Am J Hum Genet*. 2001;68:866-73.
3. Wallace RH, Scheffer IE, Barnett S, Richards M, Dibbens L, Desai RR, Lerman-Sagie T, Lev D, Mazarib A, Brand N, Ben-Zeev B, Goikhman I, Singh R, Kremmidiotis G, Gardner A, Sutherland GR, George Jr AL, Mulley JC, Berkovic SF. Neuronal sodium-channel alpha1-subunit mutations in generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Am J Hum Genet*. 2001;68:859-65.
4. Ottman R, Hirose S, Jain S, Lerche H, Lopes-Cendes I, Noebels JL, Serratos J, Zara F, Scheffer IE. Genetic testing in the epilepsies - Report of the ILAE Genetics Commission. *Epilepsia*. 2010;51(4):655-70.
5. Klassen T, Davis C, Goldman A, Burgess D, Chen T, Wheeler D, McPherson J, Bourquin T, Lewis L, Villasana D, Morgan M, Muzny D, Gibbs R, Noebels J. Exome sequencing of ion channel genes reveals complex profiles confounding personal risk assessment in epilepsy. *Cell*. 2011;145:1036-48.
6. <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>
7. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>
8. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
9. <http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut>
10. <http://mutpred.mutdb.org>
11. <http://gpcr2.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/PhD-SNP/PhD-SNP.cgi>
12. <http://rostlab.org/services/snap>
13. <http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go>
14. Lossin C, Rhodes TH, Desai RR, Vanoye CG, Wang D, Carniciu S, Devinsky O, George Jr AL. Epilepsy-Associated Dysfunction in the Voltage-Gated Neuronal Sodium Channel *SCN1A*. *Journal of Neuroscience*. 2003;23(36):11289-95.

Endereço para correspondência:

Isclia Lopes Cendes
Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 – Cidade Universitária “Zeferino Vaz”
CEP 13083-887, Campinas, SP, Brasil
E-mail: icendes@unicamp.br