

ANNA KAROLINA SILVA RAMOS

**BUSCA DA ETIOLOGIA GENÉTICA DA DEFICIÊNCIA INTELECTUAL  
PELO SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO**

BRASÍLIA  
2022

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANNA KAROLINA SILVA RAMOS

**BUSCA DA ETIOLOGIA GENÉTICA DA DEFICIÊNCIA INTELLECTUAL PELO  
SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana Forte Mazzeu de Araújo

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Érica Carine C. Caldas Rosa

BRASÍLIA

2022

ANNA KAROLINA SILVA RAMOS

**BUSCA DA ETIOLOGIA GENÉTICA DA DEFICIÊNCIA INTELECTUAL PELO  
SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. Aprovada em 28 abril 2022.

**BANCA EXAMINADORA**

Juliana Forte Mazzeu de Araújo (presidente)  
Universidade de Brasília - UnB

Rosângela Vieira de Andrade  
Universidade Católica de Brasília - UCB

Pollyanna Almeida da Costa dos Santos  
Universidade Estadual de Alagoas

Rolando André Rios Villacis (suplente)  
Universidade de Brasília - UnB

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser minha base e por me capacitar em todos os momentos independente das adversidades.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana Mazzeu toda gratidão. Obrigada pela oportunidade, ensinamentos, dedicação e paciência durante a realização deste projeto. Seus conhecimentos fizeram grande diferença no resultado deste trabalho. Obrigada pela confiança e por acreditar em meu potencial.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Erica C. Rosa por toda ajuda e orientação para a realização deste trabalho, por sua dedicação, que o fez, por muitas vezes, deixar de lado seus momentos de descanso para me ajudar e me orientar. E, principalmente, obrigada por sempre ter acreditado e depositado sua confiança em mim ao longo de todos esses anos de trabalho que se iniciaram ainda na graduação.

À minha família, por todo suporte e amor. Aos meus pais e irmãos, que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho. Aos meus avós, obrigada pelo amor, carinho e compreensão.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Íris Ferrari (*in memorian*) pela ajuda e conselhos, gratidão.

À Dr<sup>a</sup> Mara Córdoba e à Dra. Beatriz Versiani pela ajuda e colaboração neste trabalho.

Aos colaboradores da UnB do Laboratório de Genética Clínica: Aluizio, Nilza, Lídia e Renata por toda ajuda e contribuição.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silviene e ao Me. Raphael Bonnadio pela ajuda e colaboração ao permitir usar o Laboratório de Genética Humana do IB da UnB.

Às amigas Vanessa Sodr e e B rbara Merfort pela ajuda e contribui o.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UnB e a CAPES pela bolsa concedida, por ter me permitido realizar este trabalho. A FAP/DF, pelo suporte financeiro.

Aos pacientes com DI pela colaboração. Sem vocês essa Dissertação não teria acontecido.

Muito obrigada.

## RESUMO

A Deficiência Intelectual (DI) é classificada como transtorno do neurodesenvolvimento, tipicamente se manifestando no começo do desenvolvimento, antes mesmo da criança iniciar os estudos, interferindo em todo o seu desenvolvimento pessoal, social, no meio acadêmico e profissional. A Deficiência intelectual atinge 1-3% da população mundial e sua etiologia é heterogênea e, na maioria das vezes tem causa genética. Usualmente as variantes genéticas que causam a DI são divididas em anormalidades cromossômicas numéricas, deleções/duplicações também conhecidas como variantes de número de cópias, variantes monogênicas, ou ainda ter causa multifatorial. O presente trabalho teve como objetivo buscar a causa genética da deficiência intelectual em 6 pacientes com DI sindrômica utilizando métodos citogenéticos e moleculares. Foram realizadas a análise do cariótipo, pesquisa da mutação da síndrome do X-frágil, análise cromossômica por microarray e Exoma. Em três dos seis casos avaliados as variantes responsáveis pela deficiência intelectual foram identificadas, sendo elas: ZDHHC9:c.777+1G>T (relacionada à síndrome de Raymond, forma de DI ligada ao X), HNRNPU:c.16delG (relacionado à encefalopatia, atraso do desenvolvimento e epilepsia), e uma deleção de 61 kb (ChrX, del: *AVPR2*, *L1CAM*, *CEP290*, *ARHGAP4*), sendo o gene *AVPR2* relacionado ao Diabetes insipidus nefrogênico, ligado ao X e o gene *L1CAM* relacionado à síndrome L1. Em um dos casos não foi identificada uma variante causadora da DI, porém um achado incidental de variante patogênica no gene *COL4A3*:c.4421T>C relacionada a síndrome de Alport. Em dois casos não foram identificadas variantes patogênicas ou candidatas para explicar a DI. Nesses casos, a reanálise futura ou análise de outros familiares pode permitir a identificação da etiologia da DI. **Conclusão:** Os resultados deste trabalho sugerem que o Sequenciamento de Exoma é uma técnica essencial para a determinação da etiologia da DI, pois contribuiu para o aumento do aproveitamento diagnóstico, por ser capaz de identificar variantes raras, variantes presentes em mais de um gene e por possibilitar a reanálise futura dos dados resultantes dessa técnica para identificação da etiologia.

**Palavras-chave:** Deficiência Intelectual; Exoma; sequenciamento de nova geração; Variantes patogênicas; *ZDHHC9*, *HNRNPU*; *L1CAM*

## ABSTRACT

Intellectual Disability (ID) is classified as a neurodevelopmental disorder, typically manifesting itself at the beginning of development, even before the child begins their studies, interfering with all their personal, social, academic and professional development. Intellectual disability affects 1-3% of the world population and its etiology is heterogeneous and most often has a genetic cause. Usually, the genetic variants that cause ID are divided into numerical chromosomal abnormalities, deletions/duplications, also known as copy number variants, monogenic variants, or even having a multifactorial cause. The present study aimed to search for the genetic cause of intellectual disability in 6 patients with syndromic ID using cytogenetic and molecular methods. Karyotype analysis, fragile X syndrome mutation research, chromosomal analysis by microarray and Exome were performed. In three of the six cases evaluated, the variants responsible for the intellectual disability were identified, namely: *ZDHHC9*:c.777+1G>T (related to Raymond syndrome, X-linked form of DI), *HNRNPU*:c.16delG (related to encephalopathy, developmental delay and epilepsy), and a 61 kb deletion (ChrX, del: *AVPR2*, *L1CAM*, *CEP290*, *ARHGAP4*), with the *AVPR2* gene related to nephrogenic, X-linked Diabetes insipidus and the *L1CAM* gene related to the L1 syndrome . In one of the cases, a variant causing ID was not identified, but an incidental finding of a pathogenic variant in the *COL4A3*:c.4421T>C gene related to Alport's syndrome. In two cases, no pathogenic variants or candidates to explain ID were identified. In these cases, future reanalysis or analysis of other family members may allow the identification of the ID etiology. Conclusion: The results of this work suggest that Exome Sequencing is an essential technique for determining the etiology of ID, as it has contributed to the increase in diagnostic use, as it is able to identify rare variants, variants present in more than one gene, and for to enable the future reanalysis of the data resulting from this technique to identify the etiology.

**Keywords:** Intellectual Disability; Exome; Next generation sequencing pathogenic variants; *ZDHHC9*, *HNRNPU*; *L1CAM*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organograma da metodologia de estudo

Figura 2 - Heredograma do paciente 1

Figura 3 - Variante no gene *MEF2C*:c.412dupA, presente no cromossomo 5 e representado em roxo na figura

Figura 4 - Variante no gene *COL4A3*:c.4421T>C em heterozigose presente no cromossomo 2, representada em azul.

Figura 5 - Heredograma do paciente 2

Figura 6 - Heredograma do paciente 3

Figura 7 - Variante no gene *ZDHHC9*:c.777+1G>T presente no chr X e representado em verde na figura.

Figura 8 - Variantes patogênicas de *ZDHHC9*. Localização das variantes descritas no presente estudo e em relatos anteriores em relação à sua posição nos éxons (A) e domínios proteicos (B).

Figura 9 - Heredograma do paciente 4

Figura 10 - Variante no gene *HNRNPU*:c.16delG presente no cromossomo 1 e representada como o espaço em branco na imagem.

Figura 11 - Heredograma do paciente 5 com padrão de herança Autossômica Dominante.

Figura 12 - Heredograma do paciente 6 com padrão de herança ligada ao X.

Figura 13 - Região do Chr X (153.126.965-153.191.714). O retângulo delimita a região deletada.



## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1- Sequências de oligonucleotídeos utilizados

Quadro 2- Metodologia de Análise Bioinformática do Exoma

Quadro 3- Análise individual no sequenciamento de Exoma

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tipos de variantes de gene único

Tabela 2- Modificações epigenéticas e seus efeitos no ambiente da cromatina e na transcrição.

Tabela 3- Alelos do gene *FMR1* e os seus números de repetições dos trinucleotídeos CGG

Tabela 4- Resultados gerais encontrados no estudo

Tabela 5- Correlações de genótipo e fenótipo na deficiência intelectual ligada ao cromossomo X com variantes patogênicas de *ZDHHC9*.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl- microlitro

ACC- Agenesia do corpo caloso

ACMG- American College of Medical Genetics

AD- Autossômica Dominante

ADH- hormônio vasopressina ou hormônio antidiurético

ADNPM- Atraso no Desenvolvimento Neuro Psico Motor

ADP- Difosfato de Adenosina

AGD- atraso global do desenvolvimento

AR- Autossômico Recessivo

*ARHGAP4- Rho GTPase Activating Protein 4*

*ARID1B- AT-Rich Interaction Domain 1B*

*ASPM- Active-State Power Management*

*ATRX- Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-linked*

*AVPR2- Arginine Vasopressin Receptor 2*

EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético

CGG- Citosina, Guanina, Guanina

chr- Cromossomo

cm- centímetros

CMA- Análise cromossômica por microarranjo

CNVs- do inglês, Copy Number Variation

del- deleção

DI - Deficiência Intelectual

DMH- Doenças Metabólicas Hereditárias

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

dup- duplicação

FISH- Hibridização in situ por Fluorescência

FXPOI- Insuficiência Ovariana Primária Precoce

FXTAS- Síndrome do Tremor e Ataxia associados ao X-frágil

GRCh37- padrão com o conjunto do genoma humano hg19

hnRNA- RNA nuclear heterogêneo

HSAS-hidrocefalia ligada ao X com estenose do aqueduto de Sylvius

HUB- Hospital Universitário de Brasília  
Kb- quilobases  
Mb- Mega bases  
ml- mililitro  
MLPA- Amplificação de Sonda Dependente de Ligação  
mm- milímetros  
mMol/L- milimol  
ng- nanograma  
NGS- sequenciamento de nova geração  
NspI- tipo de enzima de restrição  
°C- graus celsius  
Pac- Paciente  
Pb- Pares de bases  
PC- Perímetro cefálico  
PCR- *polimerase chain reaction*  
PH- Potencial hidrogeniônico  
PM2- Provavelmente patogênico  
PVS1- Patogênico muito forte  
PWS- Prader-Willi  
QF-PCR- Reação em cadeia da polimerase fluorescente quantitativa  
QI- Quociente de Inteligência  
RM- Ressonância magnética  
RNA- Ácido Ribonucleico  
RNAm- Ácido Ribonucleico Mensageiro  
rpm- rotação por minuto  
RPMI- *Roswell Park Memorial Institute*  
RTT- Síndrome de Rett  
SNC- sistema nervoso central  
SNG- sequenciamento de nova geração  
KCL- O Cloreto de Potássio  
SP-1- Paraplegia Espástica complicada tipo 1  
SXF- Síndrome do X Frágil  
TBE- Tris/Borato/EDTA  
TC- Tomografia computadorizada

TDAH- Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade

TEA- transtornos do espectro autista

UTR- untranslated region

V/cm- Volume por centímetro

VE- Ventrículo esquerdo

XLID- do inglês *X-linked intellectual disability*

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1 DEFICIÊNCIA INTELECTUAL.....	13
1.2 CAUSAS GENÉTICAS DA DEFICIÊNCIA INTELECTUAL.....	14
<b>1.2.1 Alterações Cromossômicas</b> .....	<b>14</b>
1.2.1.1 Anomalias Cromossômicas Numéricas.....	15
1.2.1.2 Rearranjos Cromossômicos Estruturais.....	15
1.2.1.3 Análise Cromossômica por Microarranjo (CMA).....	15
<b>1.2.2 Gene Único</b> .....	<b>16</b>
1.2.2.1 Padrão de Herança Autossômica Dominante (AD).....	19
1.2.2.2 Padrão Autossômico Recessivo.....	19
1.2.2.3 DI Ligada ao Cromossomo X (XLID).....	21
1.2.2.4 Herança Multifatorial.....	21
1.2.2.5 Mudanças Epigenéticas.....	22
1.2.2.5.1 <i>Síndrome do X-Frágil</i> .....	23
1.3 DIFICULDADE DIAGNÓSTICA DA ETIOLOGIA DA DEFICIÊNCIA INTELECTUAL.....	25
1.4 OBJETIVOS.....	28
<b>CAPÍTULO 2 PACIENTES E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
2.1 PACIENTES.....	30
2.2 MÉTODOS.....	30
<b>2.2.1 Cultura de Leucócitos e Exame de Cariótipo</b> .....	<b>31</b>
<b>2.2.2 Extração de DNA</b> .....	<b>32</b>
<b>2.2.3 PCR X-Frágil</b> .....	<b>33</b>
<b>2.2.4 Análise cromossômica por Microarray (CMA)</b> .....	<b>34</b>
<b>2.2.5 Sequenciamento de Exoma</b> .....	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
3.1 PACIENTE 1.....	42
3.2 PACIENTE 2.....	47
3.3 PACIENTE 3.....	48

3.4 PACIENTE 4.....	56
3.5 PACIENTE 5.....	50
3.6 PACIENTE 6.....	62
3.7 DISCUSSÃO.....	67
3.8 CONCLUSÃO.....	70
<b>4 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>71</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DEFICIÊNCIA INTELECTUAL

A Deficiência Intelectual (DI) é um transtorno do neurodesenvolvimento, com a classificação em leve, moderada ou severa de acordo com o grau de comprometimento do indivíduo (1).

Tipicamente, os Transtornos do Neurodesenvolvimento, interferem em todo o desenvolvimento pessoal, social, no meio acadêmico e profissional do indivíduo afetado, ainda no início do seu crescimento. Os transtornos do neurodesenvolvimento podem ocorrer de forma independente ou associados. É comum que a DI curse junto com autismo, hiperatividade, depressão, epilepsia, Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) entre outros (1,2).

A Deficiência intelectual atinge 1-3% da população mundial, se caracterizando como o transtorno do desenvolvimento mais comum e atendendo a duas características básicas para diagnóstico: limitações significativas em funções intelectuais e adaptativas (3).

Os déficits em funções intelectuais são ligados ao raciocínio, resolução de problemas, juízo, capacidade de planejar, pensar abstratamente, ao aprendizado acadêmico e aprender com experiências. Esses déficits podem ser confirmados utilizando testes padrões ou individuais. Em relação aos déficits em funções adaptativas, ocorre uma carência na capacidade do indivíduo de alcançar certos padrões de desenvolvimento e socioculturais, tanto em relação a independência quanto responsabilidade social, sendo necessária assistência contínua para que não ocorra limitação funcional de atividades diárias, como se comunicar, ser ativo socialmente e viver independentemente nos ambientes em geral (1,4,5).

Segundo a *American Association on Intellectual and Developmental Disabilities* é importante que os fatores externos sejam considerados ao avaliar a deficiência intelectual, como o ambiente comunitário típico, a cultura dos indivíduos, a diversidade linguística e as diferenças culturais na forma de comunicação e do comportamento. Em uma avaliação é importante assumir que



limitações coexistem com outros fatores, então é importante apoiar de forma personalizada o indivíduo para que ocorra uma melhora no funcionamento da sua vida (5).

A determinação da causa genética da Deficiência Intelectual é desafiadora, principalmente em casos esporádicos, sem história familiar explícita, tornando o diagnóstico preciso importante para o aconselhamento genético do indivíduo e da família. Por isso torna-se cada vez mais necessário considerar um conjunto completo de métodos para diagnósticos moleculares, como cariotipagem e microarranjos cromossômicos, sequenciamento de Exoma e o sequenciamento de genoma.

## 1.2 CAUSAS GENÉTICAS DA DEFICIÊNCIA INTELECTUAL

Os fatores etiológicos da DI são heterogêneos incluindo eventos perinatais (asfixia perinatal, infecções pré-natais), condições maternas (diabetes ou fenilcetonúria), parto pré-maturo, fatores ambientais (exemplo: deficiência de iodo, desnutrição, privação cultural, radiação UV), causas metabólicas e teratógenos (por exemplo, exposição intrauterina ao álcool, drogas, produtos químicos ambientais), porém em países desenvolvidos, as principais causas de DI são de origem genética (1,3,6).

Usualmente as variantes genéticas que causam a DI são divididas em anormalidades cromossômicas numéricas, deleções/duplicações (também conhecidas como variantes de número de cópias), variantes monogênicas, ou ainda ter causa multifatorial (7).

### 1.2.1 Alterações Cromossômicas

As alterações cromossômicas representam 15% de todos os casos de DI se dividindo em alterações numéricas ou estruturais, e podem envolver um ou mais cromossomos autossômicos, sexuais ou até mesmo os dois de forma

simultânea, com incidência de um em cada 154 nativos. Podem ser visualizadas pelo cariótipo, ou pelas técnicas de Hibridização in situ por Fluorescência (FISH), Amplificação de Sonda Dependente de Ligação (MLPA), Reação em cadeia da polimerase fluorescente quantitativa (QF-PCR) e análise cromossômica por microarray (8).

Outras estratégias podem ser utilizadas para refinar ou otimizar os resultados de genoma com o sequenciamento de genoma e o mapeamento ótico (6,9).

#### 1.2.1.1 Alterações Cromossômicas Numéricas

O distúrbio cromossômico mais comum e com maior significado clínico é a aneuploidia, ocorrendo em mais ou menos (cerca de 5% de todas as gestações reconhecidas). As consequências dessa variação do número de cópias de um cromossomo inteiro dependem dos genes afetados e seu mecanismo cromossômico mais comum é a não disjunção meiótica, podendo ocorrer na meiose I, meiose II ou até mesmo na mitose. A maioria dos pacientes apresenta ou trissomia ou monossomia levando sempre a fenótipos graves (7,8).

A maior causa de DI de origem cromossômica é a trissomia do cromossomo 21 (Síndrome de Down) com cariótipo (47, XX, +21) ou (47, XY, +21). A Síndrome de Down também pode ocorrer por translocação com outros cromossomos acrocêntricos, porém de forma mais rara (8).

#### 1.2.1.2 Rearranjos Cromossômicos Estruturais

As alterações cromossômicas estruturais podem estar presentes em todas as células de uma pessoa ou em mosaico (8). Duas classificações são dadas para as variantes estruturais: balanceadas (genoma com complemento normal de material cromossômico) e desbalanceadas (genoma com material

adicional ou ausente) sendo as desbalanceadas também chamadas de CNVs, que correspondem a deleções e duplicações com >50 pb (7).

### 1.2.1.3 Análise cromossômica por microarranjo (CMA)

A tecnologia da análise cromossômica por microarranjo permitiu a visualização de microdeleções e duplicações que o cariótipo não conseguia detectar (10). O CMA tem a capacidade de detectar CNVs a partir de 10 Kb de acordo com a plataforma utilizada (11).

Com a introdução das estratégias e análise cromossômica por microarray houve um acréscimo significativo no diagnóstico da DI e a identificação de diversas novas síndromes genéticas como as Síndromes de Koolen-de-Vries e Potocki-Lupski, por exemplo (12,13). A detecção de CNVs em pacientes com DI usando metodologias de CMA varia de 10-25% (14).

### 1.2.2 Gene único

Estimativas mostram que as desordens de origem monogênica sejam responsáveis por cerca de 40% dos casos de DI (7). Variantes pontuais em genes podem ser classificadas em *missense*, *nonsense*, *splicing*, *frameshift* e mutações dinâmicas (Tabela 1) (8).

Segundo a literatura, cerca de 40% dos pacientes com DI são afetados por distúrbios monogênicos, sendo a maioria desses de herança autossômica dominante, 5-10% de herança ligada ao X e 2-4% com herança autossômica recessiva (7). Na herança autossômica a idade paterna avançada tem grande peso no aumento nas mutações pontuais de novo e a idade materna avançada possui um peso maior nas aberrações cromossômicas de herança autossômica (6).

Tabela 1- Tipos de variantes de gene único

Tipo de variante	
<i>Missense</i> (variante de sentido trocado)	Ocorre quando uma única substituição (mutação pontual) em uma sequência gênica, altera o código em uma trinca de bases causando a substituição não sinônima de um aminoácido por outro no produto gênico, isso faz com que o sentido da codificação seja alterado podendo causar na proteína um mal funcionamento, instabilidade com rápida degradação ou falha em localizar sua posição dentro da célula.
<i>Nonsense</i> (variante sem sentido)	Ocorre em duas situações (i) quando uma mutação pontual em uma sequência gênica realiza a troca de um códon normal por um dos três códons de término (ou parada), promovendo a parada da tradução no meio da sequência codificante do RNAm ou (ii) quando o códon de parada é destruído, fazendo assim com que a tradução continue até que o próximo códon de parada do RNAm seja alcançado, criando assim um produto proteico anormal com aminoácidos extras, podendo perturbar as funções reguladoras da região 3'.
<i>Splicing</i>	As variantes de <i>splicing</i> são divididas em duas classes: (i) as que afetam o processo de excisão dos introns, alterando as bases necessárias presentes no exon-intron (sítio doador -região 5') ou intron-exon (sítio acceptor- região 3'), interferindo ou anulando o <i>splicing</i> normal e (ii) que criam sítios doadores ou aceptores alternativos que competem com os sítios normais durante o processamento do RNA.
<i>Frameshift</i> (mudança no quadro de leitura)	Variantes do tipo <i>frameshift</i> : são deleções ou inserções que afetam apenas uma ou poucas bases, onde o número de bases envolvidas não é um múltiplo de três (número completo de códons), o quadro de leitura será alterado, começando no ponto de deleção ou inserção. A partir desse ponto, uma sequência diferente de códons é gerada, codificando aminoácidos incorretos seguidos por um códon de término na matriz alterada, o que levará à um produto proteico funcionalmente alterado. Em contraste se o número de pares de bases inserido ou deletado for um múltiplo de três, não ocorrerão mudanças na matriz de leitura e haverá uma simples inserção ou deleção de aminoácidos correspondentes no produto gênico normalmente traduzido. Inserções ou deleções maiores, que variam de cerca de 100 a mais de 1.000 pb, são tipicamente referidas como "indels".

## Mutações Dinâmicas

Essas mutações ocorrem quando à amplificação de uma sequência de repetição de nucleotídeos simples, em uma região não traduzida de um éxon ou em um intron, que se expande durante a gametogênese, interferindo com a expressão gênica normal ou com a função proteica. Uma repetição expandida na região codificante irá gerar um produto proteico anormal, enquanto a expansão da repetição em regiões não traduzidas ou introns de um gene pode interferir com a transcrição, o processamento de RNA ou a tradução. Não se sabe plenamente como as mutações dinâmicas ocorrem; elas são conceitualmente semelhantes aos polimorfismos de microssatélites, mas expandem-se a uma taxa muito maior que aquelas observadas para os loci de microssatélites.

---

Fonte: Mcinnes et al., 2016 (8)

### 1.2.2.1 Padrão de Herança Autossômica Dominante (AD)

O padrão de herança de DI autossômico dominante é responsável pelas formas mais graves de DI (6) e ocorre quando o indivíduo é portador de pelo menos um alelo com alterações e um alelo normal em um gene (heterozigose), a probabilidade de ser afetado é a mesma para homens e mulheres e no geral o distúrbio é herdado, mas pode surgir como uma mutação *de novo* (8). São exemplos de Síndromes com DI de origem AD: esclerose tuberosa, neurofibromatose e distrofia miotônica (3).

Apesar de cerca de 400 genes serem identificados envolvidos com DI de herança AD, os genes mais frequentemente mutados são: *ARID1B*, *SYNGAP1*, *DYRK1A*, *MED13L*, *KCNQ2*, *CTNNB1*, *STXB1*, *KMT2A*, *PACS1*, *FOXP1* e *SMARCA2*. Alguns desses genes estão relacionados à diferenciação dos neurônios e à transmissão sináptica (3,6).

Um exemplo de DI com padrão AD é a Síndrome de Coffin Siris, relacionada a variantes no gene *ARID1B*, que afeta múltiplos sistemas causando dismorfias, anormalidades de membros, e tendência à microcefalia. A DI na síndrome varia de DI leve a grave (15).

### 1.2.2.2 Padrão Autossômico Recessivo

O padrão Autossômico Recessivo (AR) quando o indivíduo é portador de dois alelos de um gene apresentando variantes patogênicas seja em homozigose ou como heterozigose composta. O risco de DI AR é de 2 a 3 vezes maior na prole de casais consanguíneos (16) e a recorrência em irmãos é estimada em 25% (9).

Cerca de 15-20% dos casos de DI não resolvido possuem suspeita de herança AR, isso ocorre porque estima-se que 2.000 genes estejam envolvidos (16), porém apenas 399 genes foram identificados (3). Os principais genes relacionados à DI de herança AR são *GALT*, *VPS13B*, *ASPM*, *SPG11*, *MUT*,

*GLDC, CEP290, POLG, LAMA2 e SMPD1*, vários desses genes possuem apresentação leve da DI associada a outras manifestações (16).

Um exemplo de DI de origem AR é a microcefalia primária autossômica recessiva causada por variantes no gene *ASPM*, as características incluem cabeça e cérebro muito pequenos, DI e AGD (17). Dentro desse grupo de doenças que causam DI de herança autossômica recessiva destacam-se também os erros inatos do metabolismo (18).

Os erros inatos do metabolismo ou Doenças Metabólicas Hereditárias (DMH) correspondem a mais ou menos 10% das doenças genéticas. Fazem parte de um importante quadro de sinais neurológicos em recém-nascidos, de forma individual são raros, porém coletivamente são comuns (19,20).

As investigações metabólicas de rotina em pacientes com DI/DD têm rendimento de 0,8 a 2,5% e a reavaliação metabólica detalhada demonstrou que 14% dos casos de DMH possuíam erros inatos do metabolismo desconhecidos previamente, ressaltando a importância da correta identificação diagnóstica para evitar que diagnósticos tratáveis sejam perdidos (21).

As DMH frequentemente estão relacionadas a interrupção de uma via metabólica, podendo comprometer processos celulares, causada por um defeito enzimático. Os defeitos enzimáticos podem ser relacionados a falhas na síntese, na degradação, no armazenamento ou no transporte molecular no organismo afetado. Vários casos são tratáveis através da recuperação do equilíbrio de uma via metabólica que foi interrompida (19,20).

O sequenciamento de nova geração (SNG) revelou muitos distúrbios do sistema nervoso, em casos que a clínica não apontava suspeita de distúrbio de metabolismo, como por exemplo em distúrbios mitocondriais, distúrbios congênitos da glicosilação. Porém os sintomas neurológicos são comuns incluindo retardo psicomotor progressivo, convulsões, diversas anormalidades neurológicas do sistema nervoso central e periférico, defeitos neurosensoriais e sintomas psiquiátricos (22).

Alguns exemplos de DI relacionada com erros inatos do metabolismo são: a galactosemia que através de uma dieta livre de galactose é possível prevenir apenas a insuficiência hepática, e a maioria dos pacientes desenvolve atraso na fala, baixo Quociente de Inteligência (QI) e ataxia; e a fenilcetonúria onde a restrição na ingestão de fenilalanina previne o quadro de DI (23).

### 1.2.2.3 DI Ligada ao Cromossomo X

A deficiência intelectual ou XLID (do inglês *X-linked intellectual disability*) descreve um amplo conjunto de alterações no desenvolvimento sendo responsável por 10% das deficiências intelectuais em homens (24). Mais de 100 genes no cromossomo X já foram associados com quadros de DI sindrômica e não sindrômica, na maioria das vezes responsáveis pela DI em poucas famílias o que dificulta o diagnóstico clínico e triagens moleculares direcionadas (25).

O cromossomo X está presente em hemizigose nos homens, fazendo com que os genes contidos nesse cromossomo tenham características recessivas no sexo masculino e resultando em um número desproporcional de homens afetados, enquanto mulheres podem ser afetadas de forma leve. Essas diferenças sexuais encontradas em doenças do neurodesenvolvimento se devem pela inativação do cromossomo X, um método que garante que os genes encontrados nesse cromossomo tenham expressão normal em mulheres (26).

A forma mais comum de DI ligada ao X é a síndrome do cromossomo X frágil que será discutida em detalhes posteriormente.

### 1.2.2.4 Herança multifatorial

Além da herança monogênica, a DI pode ter ainda origem multifatorial, sendo que esse mecanismo ainda é pouco caracterizado e os genes contribuintes ainda não foram elucidados. Acredita-se que a herança multifatorial seja a principal causa das formas mais leves de DI (27). Da mesma forma que a inteligência varia na população, indivíduos que possuam um maior acúmulo de variantes desfavoráveis ao aprendizado podem ter uma inteligência limítrofe ou DI pelo somatório dessas variantes. Além disso, fatores ambientais podem também influenciar dificultando ainda mais a caracterização (3,6).



### 1.2.2.5 Mudanças epigenéticas

A epigenética é responsável pela atividade regulatória de vários processos biológicos, sem alterar a sequência do DNA (28). As alterações epigenéticas na estrutura da cromatina oferecem um processo que estabelece onde e quando os genes são expressos, pois a estrutura da cromatina responde a estímulos da célula e a estímulos ambientais, porém é mitoticamente preservada, podendo ser hereditária. Ao menos 55 genes ligados a DI e transtornos do espectro autista (TEA) são responsáveis por regular a cromatina. Dentre as alterações covalentes tem-se a metilação de DNA e as modificações pós-traducionais de histonas (acetilação de lisinas, metilação de lisinas e argininas, fosforilação de serinas e treoninas, ubiquitinação, sumoilação e ADP-ribosilação, as modificações e seus efeitos na cromatina e na transcrição estão citados no Tabela 2 (29).

A regulação epigenética tem papel na atividade da função neural normal, então qualquer alteração que relacione a regulação epigenética, pode alterar a atividade sináptica, por exemplo (30,31) conseqüentemente o acúmulo de alterações epigenéticas e em genes tem forte relação com processos celulares de distúrbios neurológicos (28).

Um exemplo de doença monogênica herdada que gera inativação do gene através de métodos epigenéticos é a Síndrome do X-frágil, que representa 25% dos pacientes com XLID, sendo a principal causa de DI herdada (25, 31). A repetição da trinca de bases CGG acima de 200 vezes está relacionada à hipermetilação da região repetida com conseqüente inativação do gene FMR1 (32).

Tabela 2- Modificações epigenéticas e seus efeitos no ambiente da cromatina e na transcrição.

Modificação epigenética	Efeitos moleculares	Efeito no ambiente de cromatina	Efeito na transcrição
Metilação do DNA	Dinucleotídeos CpG	Heterocromatina	Repressão
Acetilação da histona	H2A, H2B, H3, H4c	Eucromatina	Ativação
Metilação de histona lisina	H3K9	Heterocromatina	Repressão
	H3K27	Heterocromatina	Repressão
	H3K4	Eucromatina	Ativação
	H3K36	Eucromatina	Ativação
	H4K20	Heterocromatina	Repressão
Fosforilação de histonas	H3S10	Eucromatina	Ativação
Ubiquitinação de histonas]	H2AK119	Eucromatina	Repressão

(fonte: Kramer e Bokhoven 2008) (29).

A Síndrome de Rett (RTT; OMIM #312750), é outro exemplo de alteração epigenética neural, caracterizada como uma das principais causas de DI em meninas, esse distúrbio neurológico vezes está ligado ao cromossomo X e ao gene *MECP2*. Esse distúrbio é caracterizado pela perda de marcos de desenvolvimento neurológicos, habilidades motoras e de linguagem adquiridas (31).

Outro exemplo é a síndrome de deficiência intelectual  $\alpha$ -talassemia (ATR-X; OMIM #301040), ligada ao X em que o gene *ATRX* sofre mutações, as mulheres são portadoras e os homens são mutados. Os sintomas incluem DI, microcefalia, desmielinização, convulsões, comportamento autista, microcefalia,  $\alpha$ -talassemia, dismorfia facial, baixa estatura, defeitos esqueléticos e anormalidades urogenitais (33).

#### 1.2.2.5.1 Síndrome do X-Frágil

A Síndrome do X Frágil (SXF) é composta por um conjunto de características físicas, comportamentais e neurológicas, das quais se destaca a

Deficiência Intelectual (DI). A SXF é a principal causa de DI de origem herdada (31). Por possuir muitos traços característicos no comportamento, é possível observar uma taxa de 50% a 70% de indivíduos com Transtorno do Espectro Autista (TEA) presentes dentre os que possuem SXF (35).

A prevalência mundial da SXF acaba sendo maior em homens 1:4000 do que a prevalência em mulheres 1:8000, devido ao fato desses apresentarem hemizigose em relação ao cromossomo X. Já as mulheres apresentam expressividade variável e a penetrância reduzida da SXF, relacionadas a (i)possuírem dois cromossomos X e (ii) devido à inativação do X, esses dois fatores contribuem para que elas possuam mais chances de não manifestar a síndrome ou manifestá-la de forma mais branda que a observada nos homens (36).

As principais características clínicas da SXF são a face e fissuras palpebrais alongados, o filtro longo, a testa ampla, orelhas proeminentes, o palato muito arqueado, com apinhamento dental, hiperextensão das articulações dos dedos e polegares, macrorquidismo pós-puberal e hipotonia. Na parte comportamental pouco ou nenhum contato visual, bater as mãos, morder, desajustes de linguagem que vão desde fala confusa a ausência de fala, deficiência intelectual leve a profunda. Em alguns casos é possível observar um fenótipo semelhante ao da síndrome de Prader-Willi (PWS) com sobrepeso, hiperfagia e hipogonadismo, se diferenciando por não apresentar a hipotonia característica e a dificuldade de alimentação na infância (36).

A variante que resulta na SXF consiste na repetição da trinca de bases CGG na região 5'UTR não traduzida do gene *Fragile Mental Retardation 1 (FMR1)*, presente na extremidade do braço longo do cromossomo X (Xq27.3). Esse gene é responsável pela expressão da *Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP)*, que regula a plasticidade e funções sinápticas dos neurônios, assegurando o desenvolvimento de conexões neuronais (sinapses). Por esse motivo a ausência ou baixa presença da FMRP, está diretamente ligada aos problemas cognitivos e de comportamentos encontrados na SXF, pois essa proteína atua na morfologia e função do cérebro (3,36,37).

O diagnóstico da SXF é feito molecularmente, através da contagem de repetições das trincas de bases CGG presentes no gene FMR1. O alelo é

determinado pela quantidade de repetições encontradas no teste molecular (36), como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3- Alelos do gene *FMR1* e os seus números de repetições dos trinucleotídeos CGG

Alelos do gene <i>FMR1</i>	Nº de repetições dos trinucleotídeos CGG
Normal	5 a 40
Zona cinza	45 a 54
Pré-mutação	55 a 200
Mutação completa	>200

Fonte: Hunter et al., 2019 (35)

O Alelo normal possui entre 5 e 40 repetições. O alelo intermediário, ou Zona Cinza, possui entre 45 e 54 repetições, mesmo não apresentando um fenótipo característico esse alelo ajuda na observação do deslocamento da mutação numérica entre as gerações (34,36). O alelo da Pré-mutação está presente em pacientes portadores da mutação que em grande parte são responsáveis por passar a mutação completa para a próxima geração. Os indivíduos pré-mutados possuem entre 55 e 200 repetições da trinca de bases, os quadros fenotípicos relacionados são: a Síndrome do Tremor e Ataxia associados ao X-frágil (FXTAS) e Insuficiência Ovariana Primária Precoce (FXPOI) (35). Porém no estudo feito por Kim et al, em 2019 apontou que se o número de repetições presentes no alelo do paciente for próximo de 200, é possível que ocorra a hipermetilação dessas bases, causando uma diminuição da porcentagem de FMRP presente e podendo sim gerar algum grau de DI nesse paciente. O estudo também relacionou o Autismo e o TEA com a baixa presença de FMRP (37).

O distúrbio da FXTAS tem característica neurodegenerativa que se inicia entre os 60 e 65 anos, incluindo tremor, ataxia, declínio na cognição e algumas

características neuropatológicas, além disso transtornos psiquiátricos são comuns. Esse distúrbio costuma ser mais frequente em homens com pré-mutação afetando apenas cerca de 17% das mulheres com pré-mutação (35,37).

O distúrbio da FXPOI afeta 20% das mulheres portadoras da pré-mutação e tem como característica uma menopausa precoce, desbalanços hormonais e infertilidade, que tem como definição hipogonadismo hiper gonadotrópico quando ocorre antes dos 40 anos (35,37).

O paciente só vai ser considerado mutado para SXF quando for portador do alelo da mutação completa, acima de 200 repetições da trinca de bases CGG. Nesse caso, os trinucleotídeos acabam sendo hipermetilados e quanto mais hipermetilados estão, maior é a deficiência de FMRP (36).

Por se tratar de uma Síndrome herdada com herança ligada ao X, o aconselhamento genético visa testar as mães dos indivíduos com mutação completa, pois no geral elas são heterozigotas para a pré-mutação tornando importante identificar a quantidade de repetições que ela apresenta, além de identificar outros possíveis indivíduos portadores de pré-mutação na família, para advertir sobre o risco de prole afetada, também para acompanhamento para possíveis FXTAS e FXPOI, sendo o último presente apenas em mulheres. Os homens com pré-mutações transmitem o alelo da pré-mutação para todas as suas filhas, o que as torna heterozigotas para mutação da SXF. A identificação de mutações no FMR1 pode ser feita no pré-natal de gestantes que apresentam risco aumentado, pela identificação prévia de um membro mutado na família (36).

O exame de PCR para SXF é um recurso muito utilizado para triagem de DI de origem genética desconhecida, por ter uma grande prevalência, e um diagnóstico estabelecido (38).

### 1.3 DIFICULDADE DIAGNÓSTICA DA ETIOLOGIA DA DEFICIÊNCIA INTELECTUAL

A DI possui causas muito heterogêneas, sendo necessárias diferentes técnicas para a correta identificação da causa. A anamnese e exame físico detalhados podem ajudar a direcionar a escolha dos testes e análise dos dados gerados, fornecendo informações clínicas e sobre o padrão provável de segregação da DI na família (38).

Os exames de triagem servem para direcionar a investigação para suspeitas diagnósticas, observando fenótipos e características clínicas é possível realizar um fluxograma de exames. No geral os exames genéticos realizados, são: (i) Para alterações cromossômicas: cariótipo (capaz de detectar alterações >5Mb), CMA (alterações a partir de 10Kb) detecta microduplicações e microdeleções cromossômicas não visualizadas no cariótipo, (ii) Teste de triagem para SXF - por se tratar da maior causa de DI de origem herdada; (iii) Suspeita de distúrbio monogênico específico- sequenciamento de Sanger e análise do número de cópias e Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação (MLPA); (iv) Sequenciamento de Exoma (v) Sequenciamento completo de genoma (34,38,39,40).

O exame de imagem mais recomendado para complementar a análise diagnóstica é a Ressonância magnética cerebral (RM) (em casos de circunferência da cabeça anormal (microcefalia ou macrocefalia), convulsões, sinais neurológicos focais ou regressão do desenvolvimento) (38,39).

Exames de triagem que podem ser realizados para suspeitas metabólicas, são: Triagem metabólica da urina combinada com a análise de aminoácidos, ácidos orgânicos e glicosaminoglicanos (para distúrbios metabólicos) + testes de sangue auxiliares que compreendem a função da tireoide, creatinina quinase, hematologia de base e bioquímica (38,39).

O Sequenciamento de Exoma é uma tecnologia que ajuda a identificar novas variantes patogênicas, e vem sendo muito utilizada para identificar alterações relacionadas a DI (3,25,31). Dentre as vantagens dessa técnica destacam-se a identificação e descoberta de muitas variantes, a identificação de

DI causada por variantes em mais de um gene, o aumentando do rendimento diagnóstico (6).

Muitas vezes, mesmo com toda avaliação clínica e exames citogenéticos, não é possível encontrar a causa genética relacionada ao quadro clínico do paciente, tanto que mesmo em pacientes estudados pelas metodologias disponíveis e rastreio de mutações em 50% dos casos as causas da DI permanecem não identificadas (3).

#### 1.4 OBJETIVOS

Buscar a causa da deficiência intelectual em pacientes atendidos no HUB utilizando métodos citogenéticos para diagnóstico e Sequenciamento de Exoma.

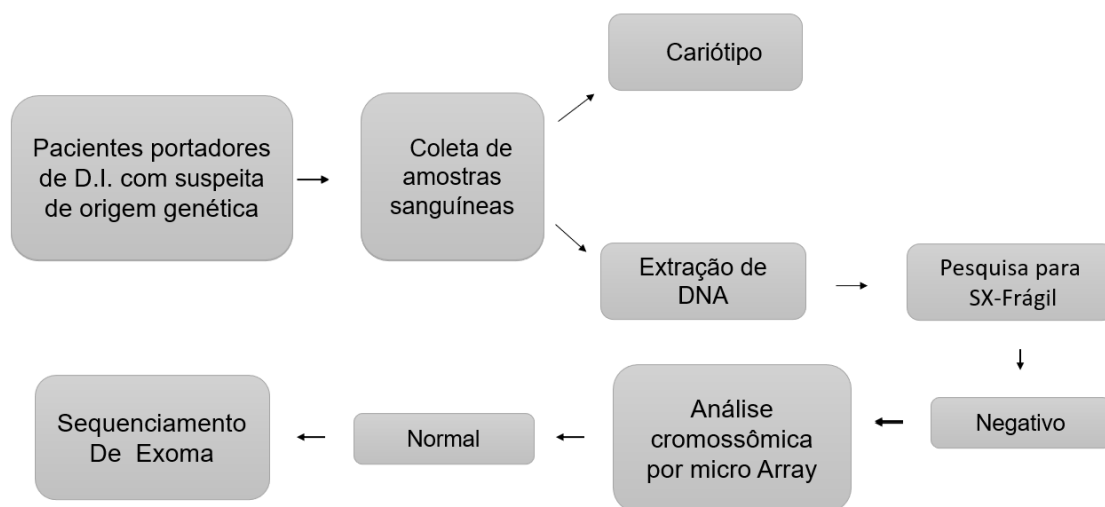


## **MÉTODOLOGIA**

## 2.MÉTODOLOGIA

A metodologia empregada no trabalho foi realizada como ilustrado no organograma abaixo (Figura 1).

Figura 1- Organograma da metodologia de estudo.



Modelo de organograma utilizado no estudo, com dois tipos de amostras coletadas, uma para o cariótipo e outra extração de DNA

### 2.1 PACIENTES

Para esse estudo foram selecionados seis pacientes com quadro de deficiência intelectual atendidos no Ambulatório de Genética do Hospital Universitário de Brasília. As idades dos pacientes analisados variaram entre 3 e 23 anos. Além da deficiência intelectual, todos apresentavam quadro sindrômico sendo que 3/6 apresentavam microcefalia, 2/6 apresentou macrocefalia e 1/6 não apresentou alteração no perímetro cefálico.

Os pais assinaram termo de consentimento livre e esclarecido e o trabalho faz parte de projeto aprovado no Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília sob o número CAAE: 84001517.8.0000.5558.

## 2.2 CULTURA DE LEUCÓCITOS E EXAME DE CARIÓTIPO

Com o sangue heparinizado foi realizada cultura de sangue total para realização do exame de cariótipo. O protocolo utilizado foi desenvolvido por Moorhead et al. em 1960 (41) (com modificações) e dura cerca 72h após incubação das amostras. Para o crescimento dos leucócitos misturamos 1mL de sangue total fresco a 8mL de meio de cultura (RPMI), 1,5mL de soro fetal bovino, 300µL de Fitohemaglutinina, 100µL de antibiótico penicilina/ estreptomicina e 100µL de L-Glutamina. Após cerca de 71h na estufa a 37°C adicionamos 100 µL de Colchicina e retornamos para a estufa por mais 45min a 37°C. Terminado o período de crescimento e feita a parada das células na metáfase realizamos a fase de hipotonização. Nesta transferimos o material da estufa para dois tubos do tipo falcon deixando cada um com 5,5mL que foram centrifugados por 6 min a 2000 rotações por minuto (rpm). Após, retiramos o sobrenadante e acrescentamos aos poucos a solução de KCL a 37°C até completar 12mL. Depois de bem homogeneizado deixamos 15 min na estufa a 37°C e centrifugamos por 6 min a 2000 rpm. Depois retiramos o sobrenadante deixando mais ou menos 2mL. Para a Fixação utilizamos a solução 1:3 de ácido acético e metanol, nessa fase colocamos com auxílio de vórtex o fixador aos poucos até completar 10mL. Após homogeneização foi centrifugado por 6 min a 2000 rpm. Retiramos o sobrenadante e repetimos o processo de fixação por mais 4 vezes. O material foi pingado nas lâminas e tratado para bandeamento G utilizando tripsina em solução salina e corado com Giemsa. O cariótipo foi analisado pela Professora Doutora Iris Ferrari do Laboratório de Genética Clínica da UnB e feito com auxílio de microscópio.

## 2.3 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada com o método Puregene adaptado. Este método é dividido em etapas, se iniciando pela lise celular, onde foi utilizado 5 mMol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mMol/L EDTA pH 8,0 em uma reação e, 10 mMol/L Tris pH 7,5, 1 mMol/L EDTA pH 8,0 e 1% SDS em outra. Para cada reação a solução foi centrifugada a 3400 rpm por 10 minutos. Na etapa seguinte utilizou-se 1 mL da solução de precipitação de proteína (7,5 Mol/L de Acetato de amônia) ao lisado celular, que foi centrifugado a 3400 rpm por 10 minutos. As proteínas precipitadas formam um pellet marrom escuro e compacto, e o sobrenadante foi transferido para um tubo cônico contendo 3 mL de isopropanol. O tubo foi invertido lentamente até que se formasse um novelo de DNA. A reação foi centrifugada a 3400 rpm por 3 minutos. Retirou-se o sobrenadante, e adicionou-se 3 mL de etanol 70%. A reação foi novamente centrifugada. Depois disso, drenou-se o tubo e deixou-se o DNA secar a temperatura ambiente por 15 minutos. Na última etapa da extração, acrescentou-se ao tubo com o DNA 200-250 µl de TE. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (ThermoFisher) e armazenadas em freezer.

## 2.4 PCR X-FRÁGIL

Considerando que a Síndrome do cromossomo X frágil é a forma mais prevalente de deficiência intelectual herdada todas as amostras foram triadas para mutações no gene *FMR1*, as amostras foram testadas, utilizando a PCR para X-frágil. Os testes moleculares são mais recomendados pois representam mais precisão diagnóstica para SXF que um cariótipo (42). Em todas as seis amostras foi realizada Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) para amplificação da região CGG do gene *FMR1*, o cariótipo para SXF não é mais um método utilizado. Na reação de PCR foi utilizado primer descrito no (Quadro 1). A amplificação foi realizada num volume total de 25µl contendo entre 50-100 ng de DNA genômico, 0.75 pmol de cada primer, mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (DNTP) 200µM, 10 µl de 5x Q-solution (Qiagen), 2.5 µl de 10x PCR Buffer e 1ul de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen). A amplificação consistiu na desnaturação a 94°C por 4 minutos, 34 ciclos de desnaturação a 98 °C por 45 segundos, anelamento a 64°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 10 minutos. As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose para verificação da amplificação ou não do produto. Se após o processo de migração no gel for visualizada banda na mesma altura ou abaixo da banda de amostra controle (com 49 repetições CGG), este paciente foi considerado como apresentando alelo de tamanho normal. Se a amostra não apresentar nenhuma banda ou possuir banda superior a amostra controle, este paciente será considerado provável portador de pré-mutação ou mutação completa do gene *FMR1*.

Quadro 1 – Sequências de oligonucleotídeos utilizados.

Gene	Direto 5'-----3'	Reverso 5'-----3'
<b>FRM1</b>	AGC CCC GCA CTT ACC ACC CC	CGT CAG CTG CGT TTC GGT TTC ACT TCC GGT

Oligo utilizado como marcador, primer c.

## 2.5 ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRAY (CMA)

A investigação da presença de alterações cromossômicas submicroscópicas por Análise Cromossômica por MicroArray (CMA) é uma técnica que permite investigar simultaneamente milhares de sequências genômicas para a detecção de ganhos (microduplicações), perdas (microdeleções) e regiões de ausência de heterozigose de segmentos cromossômicos. A análise cromossômica por MicroArray foi realizada utilizando DNA genômico extraído de sangue periférico utilizando a plataforma CytoScan® 750K Array (produzida pela Affymetrix, contendo cerca de 750.000 oligonucleotídeos distribuídos pelo genoma humano, sendo cerca de 200.000 correspondentes a SNPs- polimorfismos de base única) e as configurações disponíveis no GeneChip® Scanner 3000 7G System (Affymetrix, EUA). São consideradas na análise apenas perdas ou ganhos de segmentos cromossômicos que abrangem no mínimo 25 oligonucleotídeos consecutivos e maiores que 200 quilobases (Kb)- resolução aproximadamente 20 vezes maior que a das técnicas tradicionais de bandeamento cromossômico. Para as regiões de ausência de heterozigose são considerados apenas segmentos maiores que 10 Mb. Variações no número de cópias de sequências de DNA encontradas comumente na população geral não são consideradas (de acordo com o banco de dados *Database of Genomic Variants*). A análise cromossômica por microarray não detecta alterações cromossômicas equilibradas (translocações recíprocas, inversões ou inserções), alterações do DNA mitocondrial ou mutações de ponto. Alterações cromossômicas em mosaico com frequência inferior a 30% podem não ser identificadas (43).

Para a realização deste experimento, o DNA genômico (250 ng) extraído dos pacientes foi digerido pela enzima de restrição NspI, seguindo as recomendações do fabricante (Affymetrix, EUA). Depois de digeridas, as amostras foram ligadas a adaptadores e em seguida, um iniciador universal que reconhece a sequência do adaptador ligado ao DNA genômico foi utilizado para amplificar as sequências obtidas por meio de PCR (Polymerase Chain Reaction). As condições da PCR foram otimizadas para amplificar preferencialmente fragmentos de 150 a 2.000 pb de comprimento, que foram confirmados posteriormente em gel de agarose a 2% em TBE 1X corado com brometo de

etídio, a um campo elétrico com voltagem constante de 10V/cm por 1h. Na sequência estes produtos foram purificados utilizando nanopartículas magnéticas e quantificados no espectrofotômetro Nanodrop™ 2000c (Thermo Scientific, EUA). O passo seguinte foi a fragmentação das amostras purificadas 37 em 50-200 pb, que em seguida foram confirmados em um gel de agarose a 4% em TBE 1X a um campo elétrico com voltagem constante de 10V/cm, por 1h. Os fragmentos de DNA com 50-200 pb foram revelados pela coloração do gel em solução de brometo de etídio (5mg/mL). Posteriormente, a imagem foi capturada utilizando o sistema de vídeo-documentação ImageMaster®VDS – Video-documentation System (Pharmacia Biotech, EUA). Seguindo o protocolo, os fragmentos de DNA foram marcados por Terminal Deoxynucleotidyl Transferase e então aplicados no AffymetrixGeneChip® e hibridados por 16-18 horas a 50°C e 60 rpm no GeneChip® HybridizationOven 645 (Affymetrix, EUA). Os chips foram então, lavados e corados na GeneChip® Fluidic tation 450 (Affymetrix, EUA) onde as sondas hibridadas são ligadas a elementos essenciais (estreptavidina, ficoeritrina – SAPE e anticorpo biotinilado antiestreptavidina) para a formação da fluorescência durante a leitura dos GeneChip® com o laser. Os chips são então escaneados no GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix, EUA) operados pelo AffymetrixGeneChip® Command Console (AGCC, Versão 4.1.2). A partir daí são gerados arquivos “.CEL” que são convertidos em arquivos “CYCHP” pelo software de análise Affymetrix® ChromosomeAnalysisSuite v2.1 (ChAS) Software combinando os dados das fluorescências de cada sonda, representando cada região do genoma humano, com os disponíveis no banco de dados NetAffx® GenomicAnnotation file NA33.1 (Hg19). Este sistema de comparação de hibridização contém informações atualizadas dos bancos de dados genômicos Database of GenomicVariants (DGV), OMIM® e RefSeq e tornam possível visualizar e analisar as alterações cromossômicas ao longo do genoma de cada amostra. Todo este procedimento leva de 4 a 5 dias para ser concluído e foram corridas 16 amostras por reação.

A análise cromossômica por microarray foi realizada nos pacientes de 1 a 5. O paciente 6 realizou o exame em outro laboratório por indicação de outro médico simultaneamente a realização do Exoma.



## 2.6 SEQUENCIAMENTO DE EXOMA

Para a busca de variantes pontuais causativas dos quadros clínicos foi utilizada Análise do Exoma. Esta metodologia de sequenciamento de nova geração (NGS), permite sequenciar toda a porção codificante (éxons) do genoma de um indivíduo. Dessa forma é possível comparar as sequências do indivíduo afetado com bancos de dados e com o genoma de referência. Esse método é constituído de três etapas: 1) preparo da biblioteca onde são selecionadas e amplificadas as regiões codificantes, 2) sequenciamento em alta escala e 3) análise de bioinformática.

O Sequenciamento do Exoma foi realizado em empresa especializada (Macrogen Inc, Coréia do Sul). A captura de regiões alvo foi feita utilizando o método Sureselect V6 seguido de sequenciamento de nova geração na plataforma Illumina.

O alinhamento de leitura e a chamada de variantes foram realizados na plataforma Franklin (Genoox, Israel) usando parâmetros padrão com o conjunto do genoma humano hg19 (GRCh37) como referência.

As variantes foram classificadas segundo os critérios do ACMG, as estratégias de análise e filtragem estão descritas no Quadro 2 e o resumo da análise individual de cada paciente está demonstrada no Quadro 3.

Quadro 2- Metodologia de Análise Bioinformática do Exoma

Sequência de análise	Ações executadas na plataforma Franklin by Genoox
Passo 1	O controle de qualidade foi observado
Passo 2	O filtro de análise inicial foi ativado + filtros (Classificação: patogênico, provavelmente patogênico, Incerto- inclinado para patogênico; Região: Exônico, <i>Splice donor</i> , <i>Splice Acceptor</i> , <i>Splice Region</i> ; Efeito: <i>Missense</i> , <i>Stop Gain</i> , <i>Stop Loss</i> , <i>Start Loss</i> , <i>Start Gain</i> , <i>Frameshift</i> , <i>Non Frameshift</i> , Outros; Frequência: Frequência Interna-N/A, Muito raro, Raro. Frequência Agregada-N/A, Muito Raro; Confiança: Média, alta;
Passo 3	O filtro de Fenótipos foi ativado (de acordo com os fenótipos do prontuário de cada paciente).
Passo 4	Os resultados foram ordenados por prioridade

Passo 5	Foi realizada relacionando a Classificação da ACMG, se o indivíduo é heterozigoto ou homozigoto, o tipo de variante, o tipo de herança, condições associadas, e os dados do prontuário.
---------	---

Quadro 3 – Análise individual no Sequenciamento de Exoma

Paciente1	Analísado utilizando os fenótipos – Deficiência intelectual (HP:0001249), Artrogripose multiplex congênita (HP:0002804), microcefalia primária, cabelo ralo.
Paciente 2	Analísado utilizando – 1º Procurar por padrão de herança autossômica recessiva ligada aos fenótipos: Deficiência Intelectual, Ossos Wormianos e macrocefalia.  Filtros ativos: Filtro de análise inicial, Filtro de fenótipo, Filtro de herança genética Autossômica Recessiva: (nenhum resultado relevante encontrado). Um gene foi encontrado em homozigose (com significado VUS), porém ele não tinha relação com os fenótipos. Filtros de fenótipo: Deficiência Intelectual, Ossos Wormianos e Macrocefalia. 2º Mudança de filtros: retirada do filtro – Propriedades genéticas: herança genética- Autossômica Recessiva. (não foram encontradas alterações relacionadas com os fenótipos)
Paciente 3	Analísado utilizando filtros de fenótipo: Baixa estatura + microcefalia de início pré-natal + DI (nesse caso é ADNPM) mas o filtro utilizado foi o de DI.
Paciente 4	Analísado com e sem o filtro do fenótipo por serem muitos fenótipos, os fenótipos são: Deficiência Intelectual (HP: 0001249), Obesidade (HP:0001513), Morfologia anormal do coração (HP: 0001627), Convulsão (HP:0001250), Vermelhão do lábio inferior espesso (HP:0000179), Ventrículo esquerdo não compactado, foi encontrada a variante relacionada ao fenótipo
Paciente 5	Analísado com os Fenótipos: DI, microcefalia e sem os filtros de fenótipo. Mesmo assim não foram encontradas variantes.
Paciente 6	Analísado com os fenótipos: macrocefalia, Hidrocefalia, Diabetes insípidos, assimetria facial, DI. Uma variante relacionada a deleção foi encontrada.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Todos os seis pacientes apresentaram cariótipo normal e triagem para a síndrome de cromossomo X frágil negativa. Cinco dos seis pacientes realizaram a análise cromossômica por microarray com resultado normal.

O sequenciamento de Exoma permitiu a identificação de variantes causais em 3 dos 6 pacientes. Um paciente apresenta variante patogênica que explica apenas parte de suas manifestações clínicas e em dois casos não foram identificadas variantes candidatas que expliquem o quadro clínico. Os resultados gerais obtidos durante a pesquisa estão presentes na Tabela 4.

**Tabela 4- Resultados gerais encontrados no estudo**

	<b>Pac 1</b>	<b>Pac 2</b>	<b>Pac 3</b>	<b>Pac 4</b>	<b>Pac 5</b>	<b>Pac 6</b>
<b>Consanguinidade parental</b>	-	+	-	-	-	-
<b>Dismorfias faciais</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Dismorfias corporais</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Alteração no PC</b>	Microcef.	Macrocef.	Microcef.	-	Microcef.	Macrocef.
<b>Baixa estatura</b>	+	-	+	-	-	-
<b>Convulsões</b>	-	-	-	+	-	-
<b>Dif.de aprendizado</b>	+		+		+	
<b>Dependência para realizar atividades cotidianas</b>	+	-	+	+	+	+
<b>DI</b>	+	+	+	+	+	+
<b>ADNPM</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Outros achados</b>	Artrogipose distal Síndrome de Alport	Ossos wormianos	Cifose torácica	Anormalidade cardíaca, hipotireoidismo pós doença de Graves	Ginecomastia, DI familiar	Hidrocefalia congênita, diabetes insipidus
<b>Variantes</b>	MEF2C:c.412dupA, COL4A3:c.4421T>C	-	ZDHHC9:c.777+1G>T	HNRNPU:c.16delG	-	chrX, Del: AVPR2, L1CAM, CEP290, ARHGAP4, com 61 kb

### 3.1 PACIENTE 1

Trata-se de único filho de um casal jovem e não consanguíneo, com 10 anos e 5 meses. Nasceu de parto cesárea a termo, com peso 2,340g, estatura 50,5 cm, PC 32 cm. Encaminhado por ADNPM e dismorfias. Tem uma prima com Síndrome de Down (Figura 2).

Evolução neuromotora: sustentou a cabeça com 5 meses, ficou em pé com 9 meses, engatinhou com 12 meses, andou com 18 meses. Apresenta quadro de artrogripose distal em membros superiores, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e pequenas dismorfias craniofaciais. Evoluiu com baixo peso, mas sem baixa estatura. Apresentou melhora importante no seu desenvolvimento neuropsicomotor, mas ainda é evidente o atraso, principalmente de linguagem.

Avaliação física com 10 anos: peso 34500g (p50-p75) estatura 154 cm (>p97), exame dismorfológico: fronte ampla, fendas palpebrais retas e longas, raiz nasal baixa, dorso bulboso, filtro curto e marcado, hipertrofia gengival, palato alto e ogival, orelhas normoimplantadas. Longilíneo, aparente desproporção de segmentos (pernas longas), perna direita maior que esquerda; camptodactilia bilateral, prega palmar única a direita e pregas apagadas a esquerda, pés sem alterações.

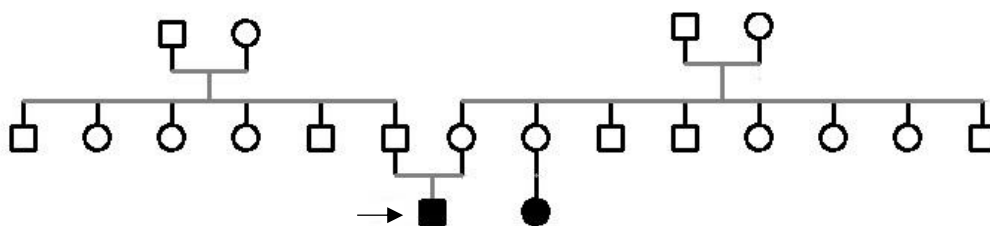
**Exame oftalmológico:** Lenticone anterior e catarata.

**Exames de imagem:** Tomografia de encéfalo (2012) sem anormalidades significativas e apontou um espessamento mucoso dos seios paranasais.

RM de encéfalo sob privação do sono: focos puntiformes de hipersinal de substância branca dos hemisférios cerebrais, nos lobos frontais de aspecto pouco específico que podem estar relacionados a microangiopatia.

Ultrassom renal: normal.

Figura 2- Heredograma do paciente 1



Heredograma paciente 1, com dois pacientes afetados com deficiência intelectual (o paciente estudado e sua prima).

**Exames genéticos:** Cariótipo Normal, 46, XY; Triagem para a síndrome do cromossomo X frágil negativa, Análise cromossômica por microarray sem alterações.

**Sequenciamento de Exoma:** Não foi possível identificar variantes patogênicas/possivelmente patogênicas em genes que expliquem o quadro de Deficiência Intelectual do paciente. No entanto, a análise do sequenciamento de Exoma revelou uma variante provavelmente patogênica candidata em heterozigose no gene MEF2C no cromossomo 5, MEF2C:c.412dupA (Figura 3), que causa deficiência intelectual de herança autossômica dominante. A variante foi classificada como provavelmente patogênica segundo os critérios do ACMG (PVS1- Patogênico muito forte, onde a variante em um gene onde a perda de função é um mecanismo conhecido da doença, ou seja, a proteína não é produzida a partir dessa variante. PM2-Provavelmente patogênico: devido a frequência extremamente baixa nos bancos de dados populacionais). A cobertura da variante foi de 16 vezes, A: 8 (50%), AT: 8 (50%).

As condições relacionadas a haploinsuficiência do gene MEF2C são DI grave e transtorno do espectro autista, comprometimento grave da linguagem e atraso motor (MIM# 613443) (44). Porém o paciente 1 apresenta um quadro de deficiência intelectual moderada, diferente do descrito na literatura em pacientes com variantes nesse gene.

O paciente 1 desse estudo, apresentou um fenótipo relacionado ao gene MEF2C mais brando, que os pacientes relatados na literatura (revisão em Coleman et al., 2021). Os principais fenótipos relacionados a variantes

encontradas no gene MEF2C, são: DI grave, ADNPM, convulsões, ausência de fala, hipotonia, incapacidade de andar, movimentos estereotipados e anormalidades na RM (45). Dentre as características que diferem o paciente 1 de outros pacientes citados na literatura com variantes em MEF2C, se destacam o grau de DI, que no paciente 1 que é mais leve, e a ausência de convulsões. Em relação as dismorfias faciais, nessa síndrome não há descrição completa do exame dismorfológico em muitos dos artigos publicados. Apesar de possuir atraso na fala, anormalidades da RM e DI, o fenótipo do paciente 1 é diferente do relatado em outros estudos por se tratar de quadro mais leve. Por isso, não é possível confirmar ou descartar esse gene como a causa do quadro clínico.

A revisão realizada por Coleman et al., 2021 contendo 117 pacientes com distúrbio relacionado a variantes em MEF2C demonstrou que 59,8% dos indivíduos apresentaram deleções completas do gene MEF2C ou de uma região próxima do gene com possível efeito regulatório, 29,9% dos casos são mutações pontuais (missense, nonsense, splicing e frameshift), e em menor frequência: duplicações, inserções e translocações. Esses diferentes tipos de variantes podem explicar a diferença fenotípica entre os pacientes (45).

Outras variantes com significado clínico: A análise do sequenciamento de Exoma revelou uma variante de significado clínico incerto em heterozigose no gene COL4A3 no cromossomo 2, COL4A3:c4421T>C (Figura 4). A variante é missense e foi classificada como de significado incerto segundo os critérios do ACMG (PP3- Suporte Patogênico: Para uma variante de sentido errado ou de splicing, as ferramentas de previsão computacional suportam unanimemente um efeito deletério no gene; PP2- Suporte Patogênico: Variante missense em um gene com baixa taxa de mutações missense benignas e para o qual a mutação missense é um mecanismo comum de uma doença; BS1-Benigno Forte: A frequência alélica é maior do que o esperado para o transtorno; PP5- Suporte Patogênico: Fonte respeitável recentemente relata variante como patogênica, mas a evidência não está disponível para o laboratório realizar uma avaliação independente). A cobertura da variante foi de 52 x, T: 27 (51,92%), C:25 (48,08%).

Segundo a ACMG as condições relacionadas à variante são: Síndrome de Alport que cursa com defeitos renais, visuais e auditivos, porém essa variante já foi descrita em indivíduos normais e em indivíduos afetados.



A síndrome de Alport é uma doença renal hereditária causada por variantes nos genes relacionados com a estrutura da membrana basal glomerular, como genes para colágeno tipo IV ocorre em COL 4<sup>a</sup>3/4/5, essa síndrome também apresenta comprometimento ocular e auditivo. Por possuir curso progressivo, a presença de lenticone (achado patognomônico da Síndrome de Alport), catarata e a alteração genética encontrada permite confirmar que se trata de uma variante patogênica, confirmando o diagnóstico de Síndrome de Alport, mesmo que o paciente ainda não apresente alterações renais ou auditivas (46).

Figura 3- Variante no gene MEF2C:c.412dupA.

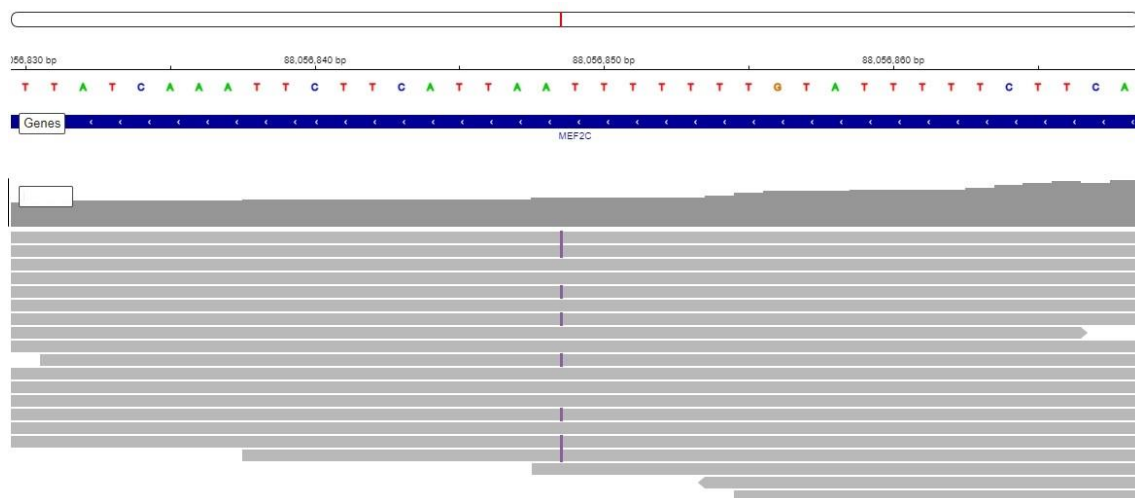


Figura da análise de Exoma, mostrando a variante MED2C:c.412dupA, presente no cromossomo 5 e representada em roxo na figura.

Figura 4- Variante no gene COL4A3:c4421T>C

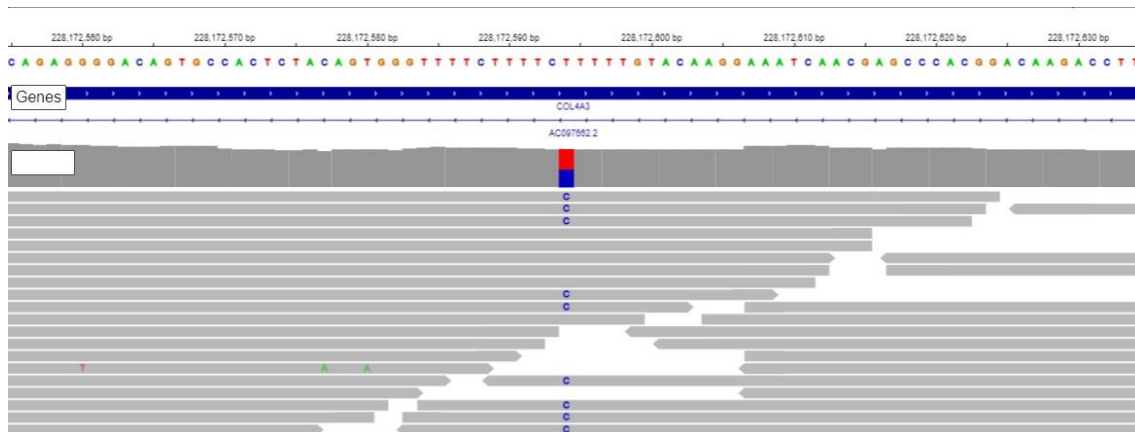


Figura na análise de Exoma, mostrando a variante COL4A3:c4421T>C em heterozigose presente no cromossomo 2, representada em azul.

### 3.2 PACIENTE 2

Trata-se do segundo filho de casal consanguíneo (primos em primeiro grau), paciente tem 23 anos e 8 meses. A mãe relata que a gravidez foi diferente das outras, fez acompanhamento pré-natal, o início dos movimentos fetais ocorreu aos 5 meses, com forte intensidade. A gravidez durou 9 meses, o parto foi realizado por cesárea, com peso 3,650g, comprimento 50 cm, PC 38 cm.

Evolução neuromotora: sustentou a cabeça com 5 meses, ficou em pé e andou por volta dos 2 anos e meio. Apresentou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) que evoluiu para DI, além de distorções craniofaciais. É agressivo, se envolve em brigas, não mede as consequências dos seus atos. Frequentou aulas de recursos, é parcialmente independente e sai desacompanhado, possui irmã afetada com DI (Figura 5).

Exame dismorfológico: sinofre, crânio achatado, olhos fundos, estrabismo discreto, raiz nasal achatada, ponta bulbosa, filtro curto, lábios grossos, queixo alto, implantação de cabelo baixa na nuca, dedos longos, presença de coxins digitais, deformidade da postura, pés estreitos. Dedos do pé longos, grande afastamento entre o primeiro e o segundo pododáctilos. Aos 20 anos: Altura: 178 cm (p50-p75), peso: 79,600 kg (p90-p97), PC: 62 cm (>> p97),

**Exames de imagem:** Ecografia transfontanela (1997) aumento discreto dos ventrículos que tem configuração normal.

TC de crânio (2005): sistema ventricular de morfologia e dimensões normais, cisternas e sulcos corticais preservados, encéfalo com morfologia e densidade normais. Alargamento do espaço liquórico da fossa posterior, assimetria dos ossos parietais notando-se maior proeminência a esquerda, (todas as suturas foram identificadas e não há evidência tomográfica de fusão precoce de suturas. Conclusão: discreta atrofia cerebelar, assimetria craniana, sem sinais de craniossinostose, pois as folias cerebelares não são visíveis como acontece nas atrofias.

Figura 5 – Heredograma paciente 2

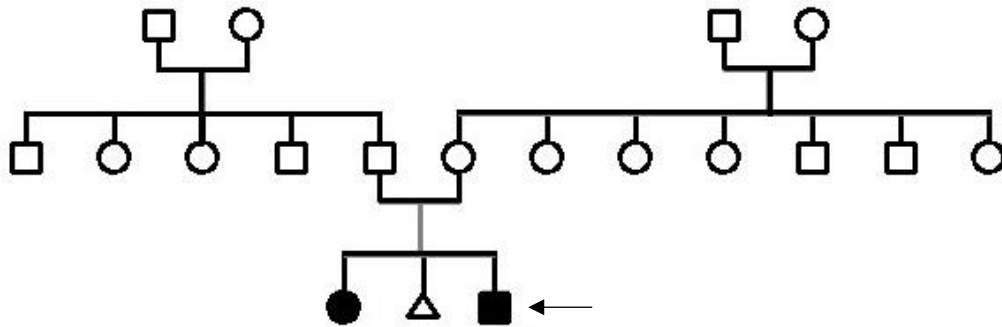


Imagem representando o heredograma do paciente 2, com dois pacientes afetados (paciente afetado e sua irmã).

**Exames genéticos:** Cariótipo Normal, 46, XY; Triagem para a síndrome do cromossomo X frágil negativa, Análise cromossômica por microarray sem alterações.

**Análise de Exoma:** Não foi possível encontrar variante candidata.

### 3.3 PACIENTE 3

Paciente de 13 anos, filho único de casal não-consanguíneo. A mãe não fez acompanhamento pré-natal no total teve 5 gestações sendo 2 abortos. Ele nasceu de parto normal e trabalho de parto sem intercorrências na 37ª semana de gestação com peso de nascimento de 2.200 g (<3º percentil) e com a circunferência da cabeça de 30 cm (<3º percentil) e hipotonia.

Com 1 ano e 7 meses apresentou importante quadro de desnutrição, hipotonia, não emitia sons, não se sentava e nem controlava a cabeça, pesava 6.000g, sua estatura era 48 cm, passou por estimulação precoce, se sentou com 1 ano e 10 meses, engatinhou com 2 anos, andou com 2 anos e 4 meses, formou palavras com 2 anos e 4 meses, controle anal com 5 anos.

Probando com quadro de Deficiência Intelectual sindrômica associada ao transtorno do espectro autista, dismorfias, e distúrbio do comportamento. Obedece a comandos, responde a perguntas por monossílabos e com a cabeça baixa, evita contato ocular. Atualmente o paciente apresenta atenuação da face alongada, já entrou na curva normal de altura e PC, mantém dismorfias e déficit intelectual, sofre de alergia e rinite.

O paciente prefere ficar em casa sozinho com os pais adotivos, não gosta de visitas. O paciente evita o contato visual (traço autista) e tem dificuldade para falar, além de parecer não entender o que é dito, evita o contato visual (traço autista) e tem dificuldade para falar, a agressividade comportamental melhorou com o uso de medicamentos.

Diante da baixa estatura, realizou tratamento com hormônio de crescimento (GH) com ótimos resultados, iniciando o tratamento com 6 anos e 8 meses, sua altura era de 99,5 cm (abaixo do 3º percentil) com GH e sua altura atual é de 149,5 cm. (entre 10º e 25º percentis).

Na atual idade de 13 anos, apresenta exame físico com peso, altura e perímetro cefálico dentro dos limites da normalidade. Fendas palpebrais retas, olhos profundamente situados, raiz nasal média, dorso de altura média, narinas antevertidas, asas do nariz grossas, filtro naso-labial curto, palato ogival. Orelhas normo-implantadas, sendo que a direita apresenta planificação da anti-hélice. Testículos tópicos, G4P4. Cifose torácica. Prega palmar de transição à

esquerda. As palmas das mãos são “fofas”, os pés são cavos, Genu valgum e recurvatum.

Possui histórico familiar de dificuldade de aprendizado por parte da mãe que estudou até a segunda série e só escreve o próprio nome, refere também que os irmãos do paciente 3 tem ADNPM, sendo que o de 3 anos não fala e a meia-irmã não anda. O pai apresenta baixa estatura, anda mancando de uma perna, lê pouco e trabalha na roça. Infelizmente nenhum dos genitores está disponível para investigação.

**Exames de imagem:**

Ressonância Magnética de sela túrcica (2013) com resultado normal;

Ecocardiograma (2015) tem resultado normal;

Ultrassonografia abdominal (2019) com resultado normal;

Raio-X de coluna vertebral de (2020) apresenta cifose torácica com acunhamento leve de dois corpos vertebrais, pequena escoliose torácica alta com convexidade à direita, desvio leve do eixo toracolombar com convexidade à esquerda.

Figura 6 – Heredograma do paciente 3

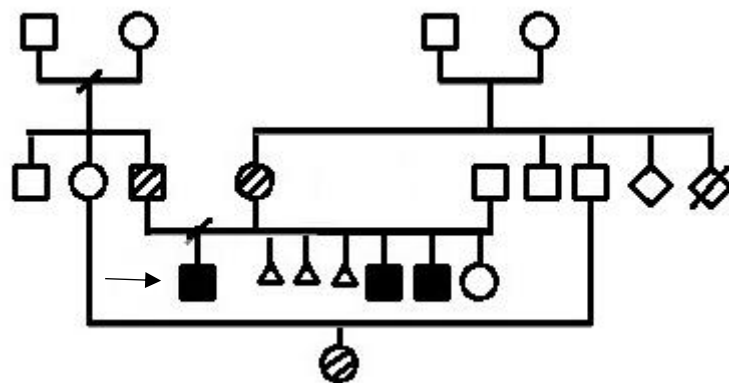


Figura representando o heredograma do paciente 3, onde os pacientes marcados por hachuras são portadores de baixa estatura, e os pacientes em preto são afetados com deficiência intelectual.

**Exames genéticos:** Cariótipo: 46, XY; Pesquisa para Síndrome do X frágil: negativa; Análise cromossômica por microarray: sem anormalidades cromossômicas;

**Análise de Exoma:** O sequenciamento de Exoma revelou uma variante patogênica em hemizigose no gene *ZDHHC9* no cromossomo X, *ZDHHC9* c.777+1G>T (Figura 7). A variante altera o *splicing* e foi classificada como patogênica segundo os critérios do ACMG (PVS1- Patogênico muito forte: variante nula em um gene em que a perda de função é um mecanismo conhecido de doença; PM2- Provavelmente patogênico: frequência extremamente baixa nos bancos de dados populacionais). A cobertura da variante foi de 39 vezes. Não foram identificadas outras variantes patogênicas na amostra.

Esse gene já foi descrito como causa de deficiência intelectual ligada ao X sintromico tipo Raymond. Uma variante da mesma posição foi descrita por Retterer et al. em 2016. Não foi possível realizar o sequenciamento da mãe do paciente para confirmar se ela é portadora ou não da alteração (47).

Figura 7 – Variante no gene *ZDHHC9*:c.777+1G>T



Figura da análise de Exoma do paciente 3, com a variante no gene *ZDHHC9*:c.777+1G>T presente no chr X e representado em verde.

A perda da função de *ZDHHC9* tem sido associada a distúrbios intelectuais ligados ao X. Fenótipos relacionados foram relatados anteriormente à DI, tais como: dismorfia facial, problemas esqueléticos, palato alto, hipotonia (na infância), raiva, fobia social e dificuldade de fala foram encontrados, outros sinais como epilepsia, hábitos marfanóide e alterações em exames de ressonância magnética de crânio não foram encontrados no paciente (48).

Embora a síndrome já tenha sido relatada em um número maior de pacientes, alguns relatos não detalham o fenótipo clínico, tornando mais difícil delinear o espectro clínico da síndrome. O atraso psicomotor foi observado no início do desenvolvimento e a idade de emissão das primeiras frases foi significativamente atrasada, como em estudos anteriores (49, 50).

Na figura 8 é possível ver as variantes patogênicas descritas no gene *ZDHHC9* em relação à sua posição nos éxons e domínios da proteína. A maioria das variantes está nos domínios intracelulares da proteína, apenas a variante c.145T>C descoberta por Hu (2016) possui domínio proteico transmembranar, o que sugere que a localização da variante possa ser importante para a determinação do fenótipo, porém não foram informados dados o suficiente para confirmar essa informação, já que os pacientes do estudo de Hu (2016) foram descritos coletivamente como contendo DI, sem dados muito específicos para realizar essa correlação (51).

A característica do *habitus marfanóide* (alta estatura com braços longos e dedos das mãos longos e finos) está presente apenas no estudo de Raymond et al., 2007 (52) na família 031 com variante c.442C>T do tipo missense, família 576 com variante c.448C>T do tipo missense, família 602 com variante c.167.5G>C do tipo *Frameshift* e após esse estudo vem sendo muito relacionada com essa síndrome, porém uma análise dos estudos anteriores referentes a variantes em *ZDHHC9* demonstram que esse não é um achado comum nos pacientes afetados por essa síndrome, podendo ser um achado relacionado a região ou ancestralidade dos pacientes citados por Raymond et al., (2007) (49). O paciente 3 desse estudo apresentou baixa estatura, realizando tratamento com hormônio do crescimento (com bons resultados), o que confirma que o achado de hábito marfanóide realmente não pode ser diretamente relacionado a DI do tipo Raymond.

O paciente 3 não apresenta episódios de epilepsia e não foram observadas alterações no cérebro, características presentes nos estudos de Massuel-Paulet et al. (2014), Schirwani (2018) (Tabela 5) (48,52).

Observando a tabela 5, é possível notar que paciente 3 não apresenta a característica de extensão limitada das articulações do cotovelo e metacarpofalângicas sugerida pelo estudo de Massuel-Paulet et al. (48) como possivelmente relacionada às variantes em *ZDHHC9*. Outras características

possivelmente relacionadas às variantes em *ZDHHC9* e que não foram apresentadas pelo paciente 3: o corpo caloso displásico (48,52) e hiper mobilidade articular (51).

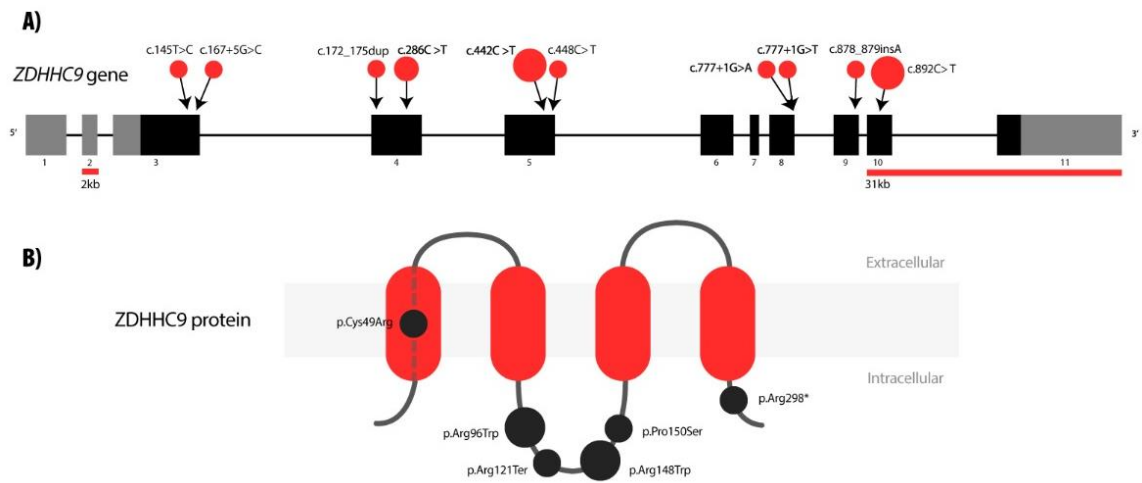
Todas as mulheres portadoras testadas foram relatadas como não afetadas, porém no paciente 3 a mãe também possui deficiência intelectual. Como ela não foi testada ou examinada clinicamente, não podemos determinar se seu fenótipo é causado pela variante em *ZDHHC9*. A inativação do X foi avaliada em duas mulheres portadoras com resultados inconclusivos (48).

Variantes patogênicas independentes em *ZDDHC9* incluem variantes *missense* (7 famílias), *nonsense* (3 famílias), *frameshift* (2 famílias), variantes de *splicing* (3 famílias) ou grandes deleções (2 famílias) (Figura 8) provavelmente causando a síndrome através de uma perda de função. A maioria das variantes *missense/nonsense* afetam os domínios intracelulares com apenas uma variante afetando o domínio transmembranar (Figura 8). As variantes c.442C>T e c.892C>T foram relatadas independentemente 3 vezes e c.286C<T foi descrito duas vezes, sugerindo possíveis hotspots mutacionais. Estas três variantes afetam resíduos de Arginina altamente conservados. Toda a proteína *ZDHHC9* tem apenas 19 resíduos de arginina não agrupados. A variante de *splicing* identificada em nosso paciente localiza-se no final do exon 7 (c.777+1G>T) e altera a mesma base da variante relatada por Retterer et al. (2016) (c.777+1G>A). Outra variante de *splicing* foi relatada por Raymond et al., (2007) após o exon 3 (47,49).

Em conclusão, um paciente foi relatado com uma variante de *splicing* no gene *ZDHHC9* e revisamos dados moleculares e clínicos de pacientes relatados anteriormente na literatura, fornecendo novas perspectivas sobre a base molecular dessa síndrome. A descrição desse caso clínico resultou em artigo submetido ao American Journal of Medical Genetics.



Figura 8- Variantes patogênicas de *ZDHHC9*.



Localização das variantes descritas no presente estudo e em relatos anteriores em relação à sua posição nos éxons (A) e domínios proteicos (B) (Anna Karolina Silva Ramos, 2022).

**Tabela 5** – Correlações de genótipo e fenótipo na deficiência intelectual ligada ao cromossomo X com variantes patogênicas de *ZDHHC9*.

Referência	Variante em <i>ZDHHC9</i>	Alteração de proteína prevista	Tipo de variante	Descrição clínica
Raymond (2007)	c.172_175dup	p.(Tyr59Serfs*33)	Frameshift	Família 152: Tio – Deficiência intelectual profunda, lesão de nascimento Irmão mais velho. Deficiência intelectual moderada, atraso no desenvolvimento, atraso na fala, hipotonia, testa alta, queda de cabelo frontal, normocefalia, xantogranuloma juvenil solitário. Irmão mais novo – Deficiência intelectual moderada, atraso no desenvolvimento, atraso na fala normocefalia
	c.442C> T	p.(Arg148Trp)	Missense	Família 031: Irmão mais velho – Deficiência intelectual, habitus marfanóide, (altura normal e relação envergadura/altura) normocefalia deformidade em flexão fixa leve nos cotovelos. Irmão mais novo – Deficiência intelectual, hábito marfanóide, (altura normal e relação envergadura/altura) normocefalia orelhas grandes, dedos das mãos e pés longos e pé plano.
	c.448C> T	p.(Pro150Ser)	Missense	Família 576: Deficiência intelectual, atraso no desenvolvimento, atraso na fala, estatura alta, normocefalia, face longa, estrabismo, orelhas proeminentes, pectus excavatum, membros longos e finos com dedos longos, camptodactilia do 5º dedo e dedos longos com camptodactilia. Outros membros da família afetados de forma semelhante.

Cont.

Referência	Variante ZDHHC9	Alteração de proteína prevista	Tipo de variante	Descrição clínica
	c.167+5G>C	p. (Thr11fs*33) #	Splicing	Família 602: Irmão mais velho – Deficiência intelectual, atraso no desenvolvimento, atraso na fala, macrocefalia, hábito marfanóide, pectus carinatum, pé plano e aracnodactilia Irmão mais novo – Deficiência intelectual, atraso no desenvolvimento, atraso na fala, esquizofrenia, estatura alta, relação envergadura/altura normal, pectus carinatum, pé chato, traços faciais finos.
Boone (2010)	31kb perda exons 10–11	-	Grande deleção	Atraso no desenvolvimento, atraso na fala, problemas comportamentais, incluindo agressividade, dificuldades de sono, crescimento normal. RM do cérebro com escassez de substância branca, bem como hiperintensidades irregulares de substância branca em imagens ponderadas em T2.
Masurel-Paulet et al. (2014)	c.892C>T	p.(Arg298*)	Nonsense	Paciente IV.2- Deficiência intelectual, atraso no desenvolvimento, atraso na fala, hipotonia, distúrbios do sono, problemas comportamentais com agressividade, convulsões, parâmetros de crescimento normais, aparência magra, fasciculação lingual, extensão limitada dos cotovelos e articulações metacarpofalângicas, corpo caloso displásico. Paciente III.3 – Deficiência intelectual, atraso no desenvolvimento, atraso na fala, hipotonia, distúrbio do sono, problemas comportamentais com agressividade, parâmetros de crescimento normal com envergadura de 175 cm e estatura de 167 cm e FO = 58 cm (percentil 97). Estrabismo,

Cont.

---

				fasciculação lingual, extensão limitada dos cotovelos e articulações metacarpofalângicas, corpo caloso displásico. Paciente III.4 – Identificação grave. Não avaliado clinicamente.
Grozeva (2015)	c.892C>T	p.(Arg298*)	Nonsense	
	c.878_879insA	p.(Ser294Glnfs*26)	Frameshift	Deficiência intelectual. Nenhum outro dado clínico disponível.
	c.442C>T	p.(Arg148Trp)	Missense	
Tzschach (2015)	c.286C>T	p.(Arg96Trp)	Missense	Deficiência intelectual moderada, parâmetros de crescimento normais, obstrução da junção ureteropélvica, outros membros da família afetados.
Hu (2016)	c.145T>C	p.(Cys49Arg)	Missense	Famílias AU13/P148 – Sete pacientes descritos coletivamente, apresentando deficiência intelectual. Cinco tinham um rosto relativamente longo, rosto médio plano, lábios finos e boca pequena. Outros sinais clínicos observados em um ou dois pacientes.
	c.892C>T	p.(Arg298*)	Nonsense	

Cont.

Retterer et al. (2016)	c.777+1G>A	-	Splicing	Anormalidade do sistema nervoso. Nenhum outro dado clínico disponível.
Han (2018)	c.286C > T	p.(Arg96Trp)	Missense	Deficiência intelectual, atraso no desenvolvimento, parâmetros normais de crescimento.
Schirwani (2018)	2kb loss exon 2 arr[hg19] Xq26.1 (128,946,967–128,948,896)x0	-	Large deletion	Família 1: Paciente IV.4 – Deficiência intelectual, atraso no desenvolvimento, atraso na fala, problemas comportamentais com agressividade, parâmetros normais de crescimento, fissuras palpebrais alongadas e inclinadas para baixo. Paciente IV.3 -, deficiência intelectual, atraso no desenvolvimento, atraso na fala, parâmetros normais de crescimento. Paciente III.3 – Deficiência intelectual, parâmetros normais de crescimento
	c.442C >T	p.(Arg148Trp)	Missense	Família 2 – Paciente 4 – Deficiência intelectual, hipotonia de atraso no desenvolvimento, refluxo gastroesofágico, problemas comportamentais. Protuberância frontal, penteado frontal para cima, olhos profundos, hélices dobradas, nariz comprido, frouxidão articular confinada aos dedos. Corpo caloso fino.
Paciente 3- desse estudo	c.777+1G>T	-	Splicing	Deficiência intelectual, atraso no desenvolvimento, atraso na fala, hipotonia. Olhos profundos, narinas antevertidas, asa nasal espessa, filtro curto, cifose torácica do palato altamente arqueado, genu valgum e pé cavo.

# como demonstrado pelo sequenciamento de cDNA, um local de junção a montante é usado, resultando em uma proteína truncada. Referência: Raymond et al., 2007 (51).

### 3.4 PACIENTE 4

Primeiro filho de casal não consanguíneo, 23 anos. A mãe teve 3 gestações, sem abortos, fez acompanhamento pré-natal, paciente nasceu a termo, pesando 3110 g, com estatura de 53 cm, com permanência de 8 dias na maternidade. Encaminhado por DI e epilepsia.

A evolução neuromotora foi significativamente atrasada, ADNPM- andou com 2 anos, primeiras palavras com 1 ano e meio, com 3 anos formou frases, frequentou estimulação precoce, nunca foi alfabetizado, obteve controle vesical diurno e noturno com 5 anos. Já teve sarampo, e possui hipostenúria diurna.

Apresenta dificuldade de aprendizado, comportamento sociável. Previamente diagnosticado com cardiopatia congênita (não compactação do Ventrículo Esquerdo), dismorfias, epilepsia controlada, hipotireoidismo pós doença de Graves (faz uso de Puran T4), foi submetido a cirurgia de orquipexia unilateral somente aos 10 anos de idade.

Na sua última avaliação com 18 anos e 11 meses, peso 85,100 g (percentil 75°-90°), estatura de 182,5 cm (percentil 75°-90°), perímetro cefálico 55,6 cm (percentil 2°-↓50°), perímetro torácico 95,2 cm (percentil ↑ 97°), comprimento do dedo médio 8,3 mm (percentil 75°-97°), distância intercantal interna 3,3mm (percentil 9,5°-97°), distância intercantal externa 8,8 mm (50°), distância intermamilar 23,4 cm (percentil ↑ 97°). Aparente diminuição de diâmetro lateral de crânio, fendas palpebrais retas, epicanto bilateral, raiz nasal média, lábios grossos, orelhas normo-implantadas, com desdobramento de hélices verticais, assimetria em face e dorso/tórax, G5P5, testículos tópicos, mãos grandes e largas, quirodáctilos com pontas quadradas, pés grandes (calça 44), tumoração de aproximadamente 2x2cm em joelho direito (suspeita de cisto).

**Exames de imagem:** US renal (2018): normal; Ecocardiograma (2018): remodelamento concêntrico do VE, imagem sugestiva de trabeculações proeminentes em região apical de VE (não compactação do VE). Escape mitral. Insuficiência aórtica e tricúspide leve. Ecocardiograma (2019): presença de hipertrabeculações em paredes lateral e apical do ventrículo esquerdo, preenchidas pelo Doppler colorido de difícil definição ao ecocardiograma torácico.

Figura 9- Heredograma do paciente 4

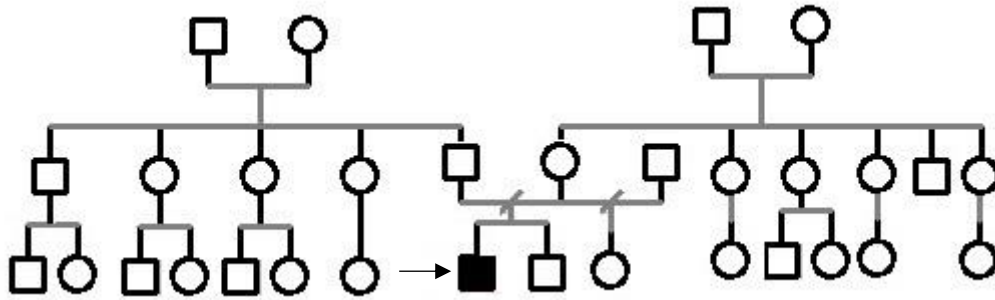


Imagem representando heredograma do paciente 4, que demonstra apenas o paciente 4 afetado com deficiência intelectual.

**Exames genéticos:** Cariótipo: 46, XY; Pesquisa para Síndrome do X frágil: negativa; Análise cromossômica por microarray: sem anormalidades cromossômicas;

**Sequenciamento de Exoma:** O sequenciamento de Exoma revelou uma variante patogênica em heterozigose no gene *HNRNPU* no cromossomo 1, **HNRNPU:c.16delG** (Figura 10). A variante é do tipo Frameshift e foi classificada como provavelmente patogênica segundo os critérios do ACMG (PVS1- efeito na proteína muito forte (Variante nula em um gene onde a perda de função é um mecanismo conhecido da doença); PM2- Patogênico Muito forte por ter frequência extremamente baixa nos bancos de dados populacionais). A cobertura da variante foi de 56 vezes, AC: 25 (44.64%), A: 30 (53.57%). Não foram identificadas outras variantes patogênicas na amostra.

Esse gene já foi descrito como relacionado à encefalopatia, atraso do desenvolvimento e epilepsia (53).

Figura 10 – Variante no gene *HNRNPU*:c.16delG

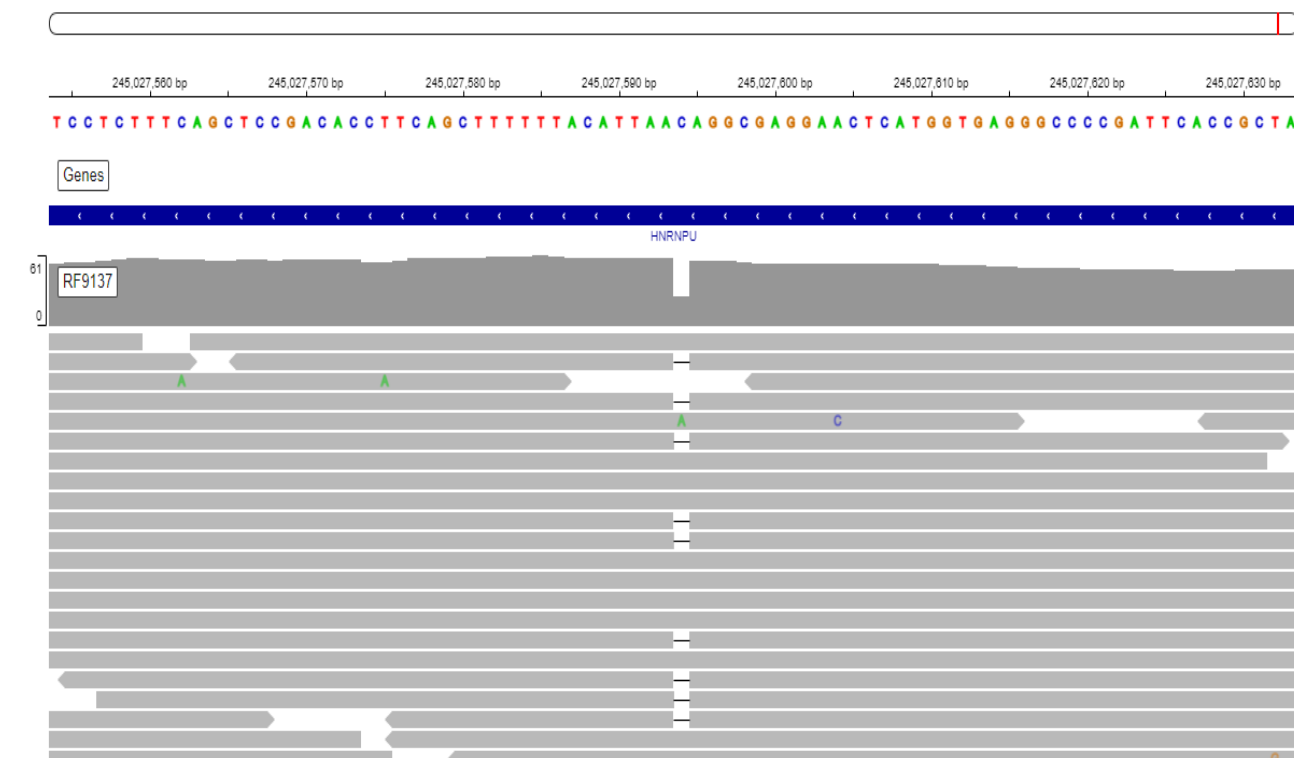


Imagem com análise de Exoma do paciente 4 com a variante no gene *HNRNPU*:c.16delG presente no cromossomo 1 e representada como o espaço em branco na imagem.

O gene da ribonucleoproteína U nuclear heterogênea (*HNRNPU*) (OMIM\*602869) causa fenótipo comumente associado a deficiência intelectual (54) dismorfismo craniofacial e Encefalopatia Epilética Infantil Precoce (54,55). O gene *HNRNPU* possui 14 éxons e codifica um membro de uma família de proteínas que se ligam a ácidos nucléicos que atuam formando complexos ribonucleoproteicos no núcleo com RNA nuclear heterogêneo (hnRNA). Essa proteína codificada tem afinidade tanto para RNA quanto para DNA, se ligando a scaffold-attached region (SAR) DNA (54,55). Esse gene age na regulação do DNA topoisomerase, diferenciando os neurônios cerebelares e age também como proteína de ligação ao RNA no cerebelo, coração, rim e fígado (53).

O paciente 4 desse estudo apresenta características frequentes na síndrome como anormalidades da pálpebra presente em 24% dos casos, microcefalia presente em 19% dos casos, atraso de desenvolvimento presente em 95%, atraso de fala 66% (55) além de epilepsia (53).



O ecocardiograma do paciente 4 revelou não compactação do VE, escape mitral, insuficiência aórtica e tricúspide leve. A anormalidade cardíaca não é tão relacionada à síndrome, presente em apenas cerca 14% dos casos de Durkin et al. (2020) (55) porém o fato do gene HNRNPU também ser expresso no coração sugere que possa estar relacionado às alterações cardíacas (56).

### 3.5 PACIENTE 5

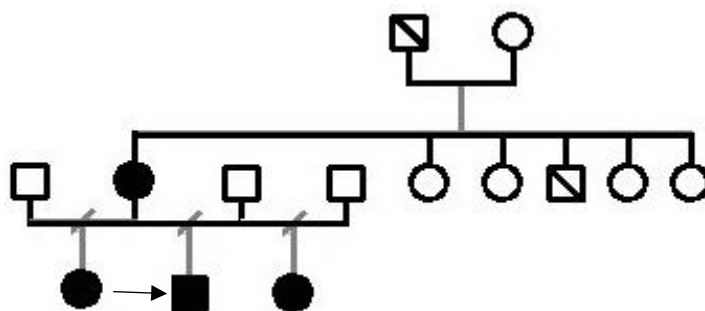
Trata-se de filho de casal não consanguíneo, com 17 anos e 4 meses. Mãe nega histórico de aborto, não fez pré-natal e o parto foi normal. Nasceu com peso 3.145g, comprimento 48cm, PC 33 cm (< p3). Encaminhado da neuropediatria devido a deficiência intelectual familiar.

Evolução neuromotora: sustentou a cabeça aos 3 meses, sentou-se com 7 meses, engatinhou com 10 meses, andou com 12 meses, primeiras palavras aos 2 anos, falou frases aos 5 anos. Aos 5 anos iniciou controle vesical e anal, mas não se higieniza.

Exame físico: não chama atenção por dismorfias, normocefálico, implantação baixa dos cabelos na frente, orelhas proeminentes e normo implantadas, fendas palpebrais longas e retas, raiz nasal média com ponta arrebitada, filtro nasolabial longo e pouco marcado, palato íntegro, ginecomastia, genitália masculina com pênis pequeno e testículos tópicos. Na última avaliação aos 14 anos mantinha o quadro de microcefalia PC: 50,5 cm (< p3).

Possui histórico familiar materno de DI, suas meio-irmãs também são afetadas com DI. Apesar de seu pai não ser identificado, a mãe nega consanguinidade (Figura 11). A mãe e as irmãs não estavam disponíveis para realização de exame no momento da avaliação do paciente 5.

Figura 11 – Heredograma paciente 5 com padrão de herança Autossômica Dominante.



Heredograma do paciente 5, demonstrando a mãe, as irmãs e o paciente 5 afetados com deficiência intelectual.

**Exames genéticos:** Cariótipo: 46, XY; Pesquisa para Síndrome do X frágil: negativa; Análise cromossômica por microarray: sem anormalidades cromossômicas;

**Análise de Exoma:** Não foi possível encontrar variante que pudesse explicar o quadro clínico do paciente. Nesse caso está indicada a realização do Exoma de outros afetados para buscar variante que segregue na família.

### 3.6 PACIENTE 6

Trata-se do primeiro filho de casal não consanguíneo, com 3 anos e 5 meses de idade. A mãe informa que fez pré-natal desde o início da gestação. Na ultrassonografia morfológica de 23 semanas foi identificada hidrocefalia, mãe refere que percebia movimentos fetais. Gestação com duração de 37 semanas e 2 dias, recém-nascido com tônus débil, cianose central, macrocefalia, respiração irregular e sem choro, realizado clampeamento precoce do cordão, passou por procedimento de aspiração de vias aéreas superiores. Passou pelo procedimento cirúrgico de DVP à direita para tratamento de hidrocefalia. Possui histórico familiar paterno de DI (Figura 12).

**Desenvolvimento Neuropsicomotor:** Com 6 meses e 7 dias apresentou movimentos mastigatórios, não firmava o pescoço, não rolava. Fez estimulação precoce. Com 6 meses foi diagnosticado com diabetes insipidus. Com 1 ano foi diagnosticado com hidrocefalia congênita devido a estenose do aqueduto de Sylvius.

**Exame físico neurológico:** Crânio assimétrico com deformidade, fontanela anterior desforme, normotensa, tônus adequado em membros, discreta hipotonia central (adequado para idade), reflexos proferidos presentes e adequados. Moro incompleto, reflexos pupilares presentes adequados, polegar aducto bilateral, observado movimentos mastigatórios eventuais.

**Exame dismorfológico:** pele clara, assimetria craniana, depressão temporal à direita, turricefalia posterior, discreta assimetria facial, fendas palpebrais discretamente oblíquas para cima, nariz curto, filtro médio, palato alto, veias superficiais visíveis, membros bem-posicionados, polegares aductos, prega palmar única bilateral, genitália masculina, testículos na bolsa escrotal, escroto em cachecol, pés normais.

**Realizou craniocentese** com saída de 700ml de líquido discretamente róseo.

**Exames de imagem:** Ultrassonografia morfológica de 23 semanas: identificou hidrocefalia.

Ressonância magnética: hidrocefalia congênita devido a estenose do aqueduto de Sylvius de herança ligada ao X.

**Sequenciamento de Exoma:** Por se tratar de possível doença gênica realizamos diretamente o Sequenciamento de Exoma que revelou uma variação de deleção de 64 kb no cromossomo X, incluindo os genes: *L1CAM*, *AVPR2*, *CEP290*, *ARHGAP4* no cromossomo X. (chrX:(153.126.965-153.191.714)x0) (Figura 13), classificada como patogênica segundo os critérios do ACMG (1A- Contém codificação de proteínas ou outros elementos conhecidos funcionalmente importantes; 2A-2E - Sobreposição com genes sensíveis a HI/LOF estabelecidos ou regiões genômicas-2A (+1,00); 3A- O número de genes RefSeq codificadores de proteínas total ou parcialmente incluídos na região CNV está entre 0-24, 3A (0,00)). O número de genes RefSeq codificadores de proteínas total ou parcialmente incluídos na região CNV está entre 0-24.

Segundo o banco de dados do ACMG os genes foram relacionados à: AVPR2- já foi descrito como relacionado à Diabetes insipidus, nefrogênico, ligado ao X (Modelo de herança: XLR, XL) e Deficiência Intelectual; L1CAM- já foi relacionado à síndrome L1. A síndrome L1 é um distúrbio congênito do desenvolvimento ligado ao X, de gravidade variável, caracterizado por hidrocefalia de vários graus de gravidade, déficit intelectual, espasticidade das pernas e polegares aduzidos. A síndrome representa um espectro de distúrbios, incluindo: hidrocefalia ligada ao X com estenose do aqueduto de Sylvius (HSAS), síndrome MASA, paraplegia espástica hereditária complicada do tipo 1 ligada ao X e agenesia complicada do corpo caloso ligada ao X; LCA10- Sem condições associadas.

Figura 12- Heredograma paciente 6 com padrão de herança ligada ao X.

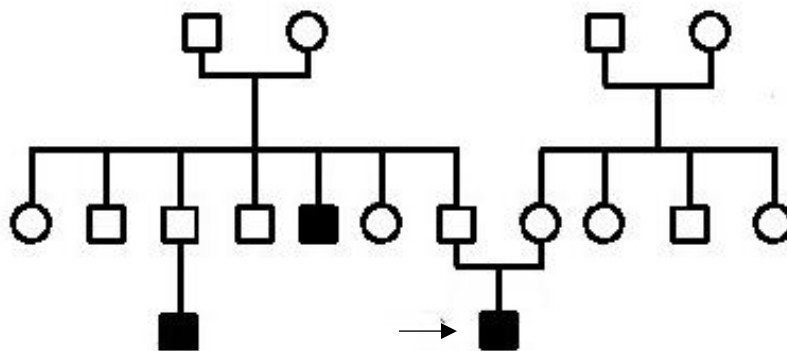


Imagem representando o heredograma do paciente 6 com um tio, um primo e o paciente 6 afetados com deficiência intelectual.

Figura 13- Região do Chr X (153.126.965-153.191.714).

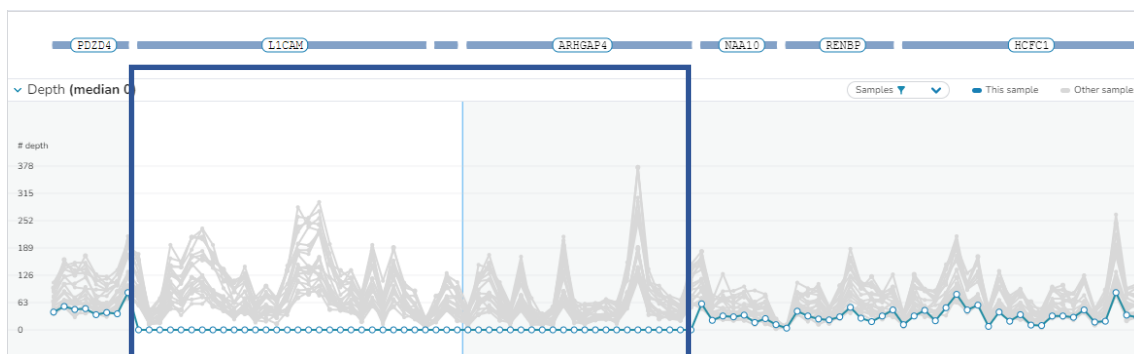


Imagem da análise de exoma do paciente 6, com a região dos genes deletados delimitados pelo retângulo.

No paciente 6, foi encontrada uma deleção de 64 kb englobando os genes *L1CAM* e *AVPR2* e estendendo-se para o gene *ARHGAP4*, que são genes adjacentes em Xq28. Este é o terceiro paciente a ser descrito com síndrome L1 e Diabetes Insipidus Nefrogênica ligada ao X.

A mãe realizou análise cromossômica por microarray em outro laboratório que revelou que ela é portadora da deleção no cromossomo X.

O gene *L1CAM* codifica a proteína L1 que fica na superfície dos neurônios em todo o sistema nervoso central (SNC), essa proteína desempenha papel de migração e organização dos neurônios e no crescimento dos axônios, também contribui na comunicação celular e no desenvolvimento do cérebro (57).

Dentre as condições associadas com variantes na proteína L1, temos a Síndrome L1, onde a proteína L1 formada não consegue facilitar a adesão célula-célula ou participar das funções neurais (gerando um grupo de condições com variação da gravidade afetando o SNC: anormalidades cerebrais, DI e dificuldade para se movimentar, hidrocefalia congênita com estenose aquedutal, e adução e flexão dos polegares, uma forma mais branda a Síndrome MASA (deficiência intelectual, afasia, marcha parkinsoniana, polegares aduzidos; OMIM #303350) e Paraplegia Espástica complicada tipo 1 (SP-1), Agenesia do corpo caloso (ACC) (59,60) e a doença de Hirschsprung (distúrbio intestinal por ausência de nervos em partes do intestino) (57,58).

O gene *AVPR2* codifica a proteína receptor V2 da vasopressina encontrado em pequenos tubos, ele trabalha juntamente com o hormônio

vasopressina ou hormônio antidiurético (ADH) nos rins reabsorvendo a água dos rins para a corrente sanguínea. Quando ocorre a grande perda de água, mais ADH é produzido, este se liga ao receptor V2 reabsorvendo água, quando a ingestão de água é normal, menos ADH fica disponível para interação (57).

Variantes no gene *AVPR2* estão ligados a Síndrome Nefrogênica de antidiurese inapropriada e a 90% dos casos de diabetes insipidus nefrogênico (DIN), que se caracteriza pela perda em excesso de urina diluída, que ocorre pois os túbulos coletores renais são incapazes de responder à vasopressina (58).

O artigo de Knops et al. (2008) relata a primeira descrição de um paciente com uma deleção dos três genes *L1CAM*, *AVPR2* e *ARHGAP4*, que apresenta muitas similaridades fenotípicas com o paciente 6 desse estudo, incluindo a hidrocefalia e a presença de polegares aduzidos que no estudo de Knops et al. (2008) foi relacionada a Síndrome do L1, e pode explicar também parte do fenótipo do paciente 6 que possui hidrocefalia e a presença de polegar aducto bilateral (58).

A deleção de 64 kb, detectada no paciente 6 é semelhante à deleção do paciente anteriormente relatado por Knops et al. (2008) que possuía 61,577 pb. Os fenótipos desses pacientes possuem muitas semelhanças como diabetes insipidus, a capacidade de falar palavras mas não formar frases (58).

Anatomicamente alterações nas fontanelas foram observadas tanto no paciente de Knops et al. (2018) quanto no paciente 6, onde o paciente de Knops et al. (2008) apresentou fontanelas abauladas com suturas separadas e o paciente 6 desse estudo apresentou fontanela anterior desforme e Turricefalia posterior. Outras características anatômica compartilhada por esses pacientes foi a presença de polegares aduzidos bilaterais e prega palmar única bilateral (58).

Apesar da proteína de adesão L1CAM também ser expressa no trato urogenital e sua deleção ser relatada em camundongos relacionada a malformações renais e um paciente com síndrome L1 ter apresentado rins duplex, o paciente de Knops et al. (2008) (58) apresentou anatomia renal normal na RM. Não há relatos de anormalidades anatômicas renais no paciente 6, desse estudo.

O gene Rho GTPase Activating Protein 4 (*ARHGAP4*) codifica uma proteína da família rhoGAP, esta família desempenha papel regulatório de

pequenas proteínas de ligação a GTP da família RAS. Essa proteína (no rato) está presente no complexo de Golgi. Deleções nesse gene e em *AVPR2* foram relacionadas à pacientes com diabetes insípido nefrogênica e diabetes insipidus (59,60). Apesar da predominância de expressão dessa proteína ocorrer em células hematopoiéticas, os pacientes já relatados com as deleções *AVPR2* e *ARHGAP4* foram descritos apenas com sinais de DI, sem a presença de nenhum distúrbio hematopoiético (58).

Concluindo: trata-se de um paciente em que foi detectada uma deleção de 64 kb englobando os genes *L1CAM* e *AVPR2* e estendendo-se para o gene *ARHGAP4*, que são genes adjacentes em Xq28. Este é o terceiro paciente a ser descrito com síndrome L1 e Diabetes Insipidus Nefrogênica ligada ao X.



### 3.7 DISCUSSÃO

Os distúrbios de atraso de neurodesenvolvimento são complexos e heterogêneos, abrangendo muitos tipos de variação genética e mais de 2.000 genes causativos descritos, de modo que torna o diagnóstico genético é muito difícil de ser realizado (61) e exige um fluxo sistemático (40), assim como o realizado nesse estudo.

Para solucionar os casos mais complexos e com clínica não muito característica, é comum utilizar o sequenciamento de Exoma, que possui muitas vantagens como a leitura completa dos éxons, facilitando a identificação de vários tipos de variantes nos genes (6). A introdução do Sequenciamento de Exoma contribuiu para o aumento do aproveitamento diagnóstico, demonstrando a importância do uso dessa metodologia e da reavaliação periódica de casos de DI sem diagnóstico etiológico (62).

Os exames podem falhar na identificação da causa, assim como nos casos do paciente 1 (que obteve uma variante que pode explicar o caso de DI, mas precisa de confirmação), paciente 2 e paciente 5 pois estas variantes podem não terem sido bem capturadas ou bem cobertas pela plataforma de sequenciamento ou ainda terem sido sequenciadas, mas não identificadas como possivelmente causais pela filtragem de variantes. Nessa situação um plano deve ser realizado com a família, para futura revisão do caso, com possível encaminhamento para outros especialistas, a família deve ser notificada sobre possíveis estudos em que o paciente possa participar para ajudar no diagnóstico (38).

Algumas características podem contribuir para a não identificação de uma variante no Exoma, como: (i) este método ser menos sensível para a percepção de mosaicismos (ii) Quando uma variante é laboratorialmente chamada de VUS- significado incerto, deve-se observar a clínica do paciente para decidir se ela se qualifica ou não como explicação; (iii) A variante provavelmente patogênica tem mais ou menos 90% de taxa de verdadeiros positivos, sendo assim, uma chance de 10% de taxa de falsos positivos em resultados laboratoriais, demonstrando que a clínica do paciente nunca pode ser descartada; (iv) Também é importante comentar que variantes patogênicas podem ter penetrância incompleta ou explicar apenas parte do fenótipo apresentado; (v) Algumas variantes não

são identificadas no Exoma pois estão presentes em outras regiões como Introns, ou tem função reguladora; (vi) Muitas variantes ainda não foram identificadas como sendo resultante em fenótipo, assim, o correto estudo e identificação dessas variantes pode contribuir para a resolução de muitos casos ainda sem solução (61).

A análise de variantes depende em grande parte da informação clínica disponível. Para uma melhor interpretação é preciso portanto que estejam disponíveis detalhes do histórico do paciente como dados da gestação, nascimento, evolução motora e de fala, características comportamentais, história familiar completa em pelo menos três gerações, exame físico dismorfológico feito por médico geneticista experiente e dados de exames complementares pertinentes a cada caso. Também é importante que a análise de dados seja feita por equipe multidisciplinar para melhorar a filtragem das variantes (39).

No presente estudo foi possível determinar a etiologia da DI utilizando as metodologias propostas em 3 dos 6 pacientes analisados (50%). Além disso, o paciente 1, com resultado inconclusivo, apresentou uma variante possivelmente patogênica, porém com manifestações clínicas diferentes daquelas descritas em outros pacientes não sendo possível, determinar se é de fato a causa do quadro clínico. Esse mesmo paciente apresenta uma variante patogênica no gene *COL4A3* que causa Síndrome de Alport, achado incidental que explica as alterações oftalmológicas do paciente.

Das variantes identificadas como causais duas estavam em genes no cromossomo X e uma no cromossomo 1. No caso do paciente 5 a variante foi herdada de sua mãe, que não apresenta sintomas por se tratar de doença recessiva ligada ao cromossomo X. Não foi possível realizar os exames genéticos nos familiares dos demais pacientes para confirmar se essas eram variantes *de novo* ou herdadas.

Apenas o paciente 2 era filho de pais consanguíneos, aumentando as chances de variantes recessivas em homozigose como causa do quadro clínico. No entanto, mesmo filtrando as variantes em homozigose não foram encontradas variantes que expliquem o fenótipo do paciente. Sua irmã também apresenta quadro clínico semelhante. A realização do exame da irmã pode permitir comparar os dados e facilitar a identificação da variante.

A taxa diagnóstica por sequenciamento de Exoma é muito variável em diferentes estudos, sendo em torno de 30-50% (63,64). Esses valores dependem principalmente do

tamanho amostral e critérios de seleção dos pacientes além da realização ou não de triagem prévia por outras metodologias. Nossos resultados estão, portanto, de acordo com o esperado na literatura mesmo considerando uma coorte de apenas 6 casos.

Uma forma de otimizar os resultados do Exoma é realizar a técnica não apenas do paciente, mas do trio paciente/ pai/ mãe. Essa estratégia aumenta também a detecção de variantes patogênicas já que permite filtrar aquelas variantes que são *de novo* e, portanto, com maior chance de identificar a causa do quadro clínico (65). No entanto, essa estratégia aumenta os custos e, em países como o Brasil onde os recursos são escassos, pode inviabilizar a realização do exame, sendo mais comum da Europa.

### 3.8 CONCLUSÃO

- O Sequenciamento de Exoma mostrou ser uma técnica importante para a identificação da etiologia da DI.

- A técnica de Sequenciamento de Exoma contribuiu para o aumento do aproveitamento diagnóstico, por ser capaz de identificar variantes raras e até mesmo variantes presentes em mais de um gene.

- O Sequenciamento de Exoma permitiu a identificação da etiologia da DI em metade dos pacientes estudados, onde foram encontradas formas raras de DI com variantes nos genes *ZDHHC9* e *HNRPU* e uma deleção significativa que relaciona diabetes insipidus e DI.

- Foi possível pelo sequenciamento de Exoma identificar variante de número de cópias no cromossomo X em um dos pacientes sugerindo assim que o Exoma pode ser realizado como exame de primeira linha.

- Deve-se sempre dar atenção a achados incidentais que podem explicar em parte as manifestações clínicas dos pacientes.

- Mesmo após a realização do Sequenciamento de Exoma e análise cromossômica por microarray alguns pacientes permanecem com a etiologia do quadro indefinido, mostrando que novas análises ainda precisam ser desenvolvidas para otimizar a filtragem de variantes no Exoma ou identificar novos mecanismos que causem DI.

- Os pacientes com DI que tiveram variantes não identificadas devem ser reavaliados periodicamente para descobrir sua etiologia

-É importante que todos os dados de gravidez, nascimento, desenvolvimento, comportamental, físicos, clínicos, familiares e resultados de exames sejam corretamente coletados e divulgados, para facilitar a identificação quando esses casos forem reanalisados.

## 4 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- [1] ASSOCIAÇÃO PSIQUIÁTRICA AMERICANA et al. **DSM-5: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. Artmed Editora, 2014.
- [2] RASHEED, Memoona et al. Exome sequencing identifies novel and known mutations in families with intellectual disability. **BMC Medical Genomics**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 2021.
- [3] ILYAS, Muhammad et al. The genetics of intellectual disability: advancing technology and gene editing. **F1000Research**, v. 9, 2020.
- [4] TASSÉ, Marc J.; LUCKASSON, Ruth; SCHALOCK, Robert L. The relation between intellectual functioning and adaptive behavior in the diagnosis of intellectual disability. **Intellectual and developmental disabilities**, v. 54, n. 6, p. 381-390, 2016.
- [5] AMERICAN ASSOCIATION ON INTELLECTUAL AND DEVELOPMENTAL DISABILITIES. Frequently asked questions on intellectual disability <https://www.aaid.org/intellectual-disability/definition> [Acesso 17 de Janeiro de 2022]
- [6] WIECZOREK, Dagmar. Autosomal dominant intellectual disability. **Medizinische Genetik**, v. 30, n. 3, p. 318-322, 2018.
- [7] KVARNUNG, Malin; NORDGREN, Ann. Intellectual disability & rare disorders: a diagnostic challenge. **Rare Diseases Epidemiology: Update and Overview**, p. 39-54, 2017.
- [8] MCINNES, Roderick R.; WILLARD, Huntington F.; NUSSBAUM, Robert. **Thompson & Thompson genética médica**. Elsevier Brasil, 2016.
- [9] TETTELIN, Herve et al. Optimized multiplex PCR: efficiently closing a whole-genome shotgun sequencing project. **Genomics**, v. 62, n. 3, p. 500-507, 1999.
- [10] ROPERS, H. Hilger. Genetics of intellectual disability. **Current opinion in genetics & development**, v. 18, n. 3, p. 241-250, 2008.

[11] SZUHAI, Károly; VERMEER, Maarten. Microarray techniques to analyze copy-number alterations in genomic DNA: array comparative genomic hybridization and single-nucleotide polymorphism array. **The Journal of investigative dermatology**, v. 135, n. 10, p. e37, 2015.

[12] KOOLEN, David A.; MORGAN, Angela; DE VRIES, Bert BA. Koolen-de Vries syndrome. **GeneReviews®[Internet]**, 2019.

[13] PINTO, Irene Plaza et al. Diagnosis of de novo 17p11. 2 microduplication-potocki-lupski syndrome identified by chromosomal microarray analysis: a case report. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 9, p. 86886-86894, 2021.

[14] SANTOS, Alexsandro dos. **SNP arrays na detecção de alterações estruturais e no número de cópias em pacientes portadores de deficiência intelectual idiopática**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

[15] VERGANO, Samantha Schrier et al. Coffin-siris syndrome. **GeneReviews®[Internet]**, 2021.

[16] JAMRA, Rami. Genetics of autosomal recessive intellectual disability. **medizinische genetik**, v. 30, n. 3, p. 323-327, 2018.

[17] VERLOES A, DRUNAT S, PASSEMARD S. ASPM Primary Microcephaly. 2020 Apr 2. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555474/>

[18] NIJMEIJER, Stephanie CM et al. Attitudes of the general population towards preconception expanded carrier screening for autosomal recessive disorders including inborn errors of metabolism. **Molecular genetics and metabolism**, v. 126, n. 1, p. 14-22, 2019.

[19] HUSNY, Antonette Souto EI; FERNANDES-CALDATO, Milena Coelho. Erros inatos do metabolismo: revisão de literatura. **Revista Paraense de Medicina**, v. 20, n. 2, p. 41-45, 2006.

[20] FERREIRA, Carlos R.; VAN KARNEBEEK, Clara DM. Inborn errors of metabolism. **Handbook of clinical neurology**, v. 162, p. 449-481, 2019.

[21] VAN KARNEBEEK, Clara DM; STOCKLER, Sylvia. Treatable inborn errors of metabolism causing intellectual disability: a systematic literature review. **Molecular genetics and metabolism**, v. 105, n. 3, p. 368-381, 2012.

[22] SAUDUBRAY, Jean-Marie; GARCIA-CAZORLA, Àngels. Inborn errors of metabolism overview: pathophysiology, manifestations, evaluation, and management. **Pediatric Clinics**, v. 65, n. 2, p. 179-208, 2018.

[23] MARRERO-GONZÁLEZ, Nevis et al. Influencia de la edad en los resultados del cribado neonatal de hipotiroidismo congénito, fenilcetonuria y galactosemia. **Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio**, v. 51, n. 4, p. 220-225, 2004.

[24] MITCHELL, David A. et al. Mutations in the X-linked intellectual disability gene, zDHHC9, alter autopalmitoylation activity by distinct mechanisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 26, p. 18582-18592, 2014.

[25] TZSCHACH, Andreas et al. Next-generation sequencing in X-linked intellectual disability. **European Journal of Human Genetics**, v. 23, n. 11, p. 1513-1518, 2015.

[26] BRAND, Boudewien A.; BLESSON, Alyssa E.; SMITH-HICKS, Constance L. The Impact of X-Chromosome Inactivation on Phenotypic Expression of X-Linked Neurodevelopmental Disorders. **Brain Sciences**, v. 11, n. 7, p. 904, 2021.

[27] WILLEMSSEN, Marjolein H.; KLEEFSTRA, Tjitske. Genetic diagnostics in intellectual disability: what is the benefit?. **Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde**, v. 158, p. A8098-A8098, 2014.

[28] ARORA, Itika; TOLLEFSBOL, Trygve O. Computational methods and next-generation sequencing approaches to analyze epigenetics data: profiling of methods and applications. **Methods**, v. 187, p. 92-103, 2021.

[29] KRAMER, Jamie M.; VAN BOKHOVEN, Hans. Genetic and epigenetic defects in mental retardation. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 41, n. 1, p. 96-107, 2009.

[30] BIRD, Adrian. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 396, 2007.

[31] IWASE, Shigeki et al. Epigenetic etiology of intellectual disability. **Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 45, p. 10773-10782, 2017.

[32] TASSONE, Flora; HAGERMAN, Paul J. Expression of the FMR1 gene. **Cytogenetic and genome research**, v. 100, n. 1-4, p. 124-128, 2003.



- [33] FARASHI, Samaneh; HARTEVELD, Cornelis L. Molecular basis of  $\alpha$ -thalassemia. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 70, p. 43-53, 2018.
- [34] LOZANO, Reymundo; ROSERO, Carolina Alba; HAGERMAN, Randi J. Fragile X spectrum disorders. **Intractable & rare diseases research**, v. 3, n. 4, p. 134-146, 2014.
- [35] HUNTER, J.E., BERRY-KRAVIS, E., HIPPI, H., Todd, P.K., Adam, M.P., Ardinger, H.H., Pagon, R.A., Wallace, S.E., Bean, L.J.H, Mirzaa, G., Amemiya, A., editores. FMR1 Disorders (2019). GeneReviews. [access 01/21/2022]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1384/>
- [36] STONE, William L.; BASIT, Hajira; LOS, Evan. Fragile X Syndrome. 2017.
- [37] KIM, Kyoungmi et al. Association between IQ and FMR1 protein (FMRP) across the spectrum of CGG repeat expansions. **PLoS One**, v. 14, n. 12, p. e0226811, 2019.
- [38] VASUDEVAN, Pradeep; SURI, Mohnish. A clinical approach to developmental delay and intellectual disability. **Clinical Medicine**, v. 17, n. 6, p. 558, 2017.
- [39] AMOR, David J. Investigating the child with intellectual disability. **Journal of Pediatrics and Child Health**, v. 54, n. 10, p. 1154-1158, 2018.
- [40] IGENOMIX, MLPA – Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação, Para CNVs em um gene ou região genômica. [acesso 08/04/2022]. Disponível em: <https://www.igenomix.com.br/genomics-precision-diagnostic-2/single-gene-analysis/multiplex-ligation-dependent-probe-amplification/>
- [41] MOORHEAD, Paul Sidney et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Experimental cell research**, v. 20, n. 3, p. 613-616, 1960.
- [42] DB Molecular, EXAMES MOLECULARES PARA SÍNDROME DO X-FRÁGIL, Publicado em: 242019 disponível em: <https://www.dbmolecular.com.br/artigo/exames-moleculares-para-sindrome-do-x-fragil>
- [43] MILLER, David T. et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. **The American Journal of Human Genetics**, v. 86, n. 5, p. 749-764, 2010.
- [44] YAUY, Kevin et al. Disruption of chromatin organisation causes MEF2C gene overexpression in intellectual disability: a case report. **BMC medical genomics**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2019.

- [45] COOLEY COLEMAN, Jessica A. et al. Comprehensive investigation of the phenotype of MEF2C-related disorders in human patients: A systematic review. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 185, n. 12, p. 3884-3894, 2021.
- [46] COURVILLE, Karen et al. Síndrome de Alport: una actualización en fisiopatología, genética, diagnóstico y tratamiento. **Revista de Nefrología, Diálisis y Trasplante**, v. 41, n. 1, p. 62-71, 2021.
- [47] RETTERER, Kyle et al. Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. **Genetics in Medicine**, v. 18, n. 7, p. 696-704, 2016.
- [48] MASUREL-PAULET, Alice et al. Expanding the clinical phenotype of patients with a ZDHHC9 mutation. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 164, n. 3, p. 789-795, 2014.
- [49] RAYMOND, F. Lucy et al. Mutations in ZDHHC9, which encodes a palmitoyltransferase of NRAS and HRAS, cause X-linked mental retardation associated with a Marfanoid habitus. **The American Journal of Human Genetics**, v. 80, n. 5, p. 982-987, 2007.
- [50] BAKER, Kate et al. Epilepsy, cognitive deficits, and neuroanatomy in males with ZDHHC 9 mutations. **Annals of clinical and translational neurology**, v. 2, n. 5, p. 559-569, 2015.
- [51] HU, Hao et al. X-exome sequencing of 405 unresolved families identifies seven novel intellectual disability genes. **Molecular psychiatry**, v. 21, n. 1, p. 133-148, 2016.
- [52] SCHIRWANI, Schaida et al. Expanding the molecular basis and phenotypic spectrum of ZDHHC9-associated X-linked intellectual disability. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 176, n. 5, p. 1238-1244, 2018.
- [53] SONG, Zhenfeng et al. De novo frameshift variants of HNRNPU in patients with early infantile epileptic encephalopathy: Two case reports and literature review. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 81, n. 7, p. 663-668, 2021.
- [54] LEDUC, Magalie S. et al. Clinical and molecular characterization of de novo loss of function variants in HNRNPU. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 173, n. 10, p. 2680-2689, 2017.
- [55] DURKIN, Anna et al. Clinical findings of 21 previously unreported probands with HNRNPU-related syndrome and comprehensive literature review. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 182, n. 7, p. 1637-1654, 2020.

[56] NCBI. HNRNPU heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U [ Homo sapiens (human)]. (Updated March 21, 2022), quoted March 21, 2022. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3192>

[57] MEDLINEPLUS [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (USA);[last updated March 7, 2022]. AVPR2 Gene - Arginine Vasopressin Receptor 2; [last updated August 18, 2020 Revised: April 1, 2010; quoted on 03/14/2022]. Available in:<https://medlineplus.gov/about/using/citation/>

[58] KNOPS, Noël BB et al. Nephrogenic diabetes insipidus in a patient with L1 syndrome: a new report of a contiguous gene deletion syndrome including L1CAM and AVPR2. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 146, n. 14, p. 1853-1858, 2008.

[59] GENE CARDS: the human gene database. Gene *ARHGAP4* - Rho GTPase Activating Protein 4. (citado em 20 de abril de 2022). Available in: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ARHGAP4>

[60] HUANG, Lingli et al. A novel contiguous gene deletion of AVPR2 and ARHGAP4 genes in male dizygotic twins with nephrogenic diabetes insipidus and intellectual disability. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 158, n. 10, p. 2511-2518, 2012.

[61] MARTINEZ-GRANERO, Francisco et al. Comparison of the diagnostic yield of aCGH and genome-wide sequencing across different neurodevelopmental disorders. **NPJ genomic medicine**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2021.

[62] GILISSEN, Christian et al. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. **Nature**, v. 511, n. 7509, p. 344-347, 2014.

[63] SRIVASTAVA, Siddharth et al. Meta-analysis and multidisciplinary consensus statement: exome sequencing is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with neurodevelopmental disorders. **Genetics in Medicine**, v. 21, n. 11, p. 2413-2421, 2019.

[64] ÁLVAREZ-MORA, María Isabel et al. Diagnostic yield of next-generation sequencing in 87 families with neurodevelopmental disorders. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 17, n. 1, p. 1-10, 2022.

[65] TOPPER, Scott; OBER, Carole; DAS, Soma. Exome sequencing and the genetics of intellectual disability. **Clinical genetics**, v. 80, n. 2, p. 117-126, 2011.



**ANEXOS**

## Anexo 1

UNB - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE BRASÍLIA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Investigação da etiologia da deficiência intelectual síndrome

**Pesquisador:** Juliana Forte Mazzeu de Araújo

**Área Temática:** Genética Humana:

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

**Versão:** 4

**CAAE:** 84001517.8.0000.5558

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE APOIO A PESQUISA DO DISTRITO FEDERAL FAPDF

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.739.066

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo genético que visa, por meio de amostras sanguíneas, detectar alterações que justifiquem quadro fenotípico de retardo mental. A presente avaliação trata de emenda para análise mais detalhada das amostras coletadas. A metodologia adicional consiste no sequenciamento do exoma.

#### Objetivo da Pesquisa:

Investigar as causas genéticas da deficiência intelectual em pacientes atendidos em serviços de genética no DF.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

1. Relacionados à punção venosa, já discutidos em pareceres anteriores;
2. Relacionados ao achado de mutações genéticas incidentais que indiquem doença futura.

Benefícios:

Possibilitar tratamento de condições existentes e prevenção de condições futuras.

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900  
UF: DF Município: BRASÍLIA  
Telefone: (61)3107-1918 E-mail: cepfm@unb.br

UNB - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 3.739.066

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Na última avaliação esta colegiado solicitou a inclusão da autorização de consulta das informações caso os indivíduos da pesquisa mudassem de idéia após realização dos exames.

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

AO TCLE foi adicionado o seguinte trecho:

Fica estabelecido que, caso mude de ideia, o participante pode requerer as informações genéticas testadas a qualquer momento, mesmo que tenha consentido em não recebê-las em um primeiro acesso.

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

Após análise do colegiado em reunião ordinária dia 27/10/2019, o parecer foi pela aprovação do projeto

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Após análise do colegiado em reunião ordinária dia 27/10/2019, o parecer foi pela aprovação do projeto

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

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1295019_E1.pdf	30/10/2019 10:55:28		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_emenda_aditiva_v3.pdf	30/10/2019 10:54:56	Juliana Forte Mazzeu de Araújo	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_E1_v3.pdf	26/09/2019 09:40:55	Juliana Forte Mazzeu de Araújo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa_emenda_aditiva_v3.pdf	23/09/2019 16:49:52	Juliana Forte Mazzeu de Araújo	Aceito
Outros	Carta_de_solicitacao_emenda_aditiva.pdf	02/05/2019 16:32:28	Juliana Forte Mazzeu de Araújo	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900  
UF: DF Município: BRASÍLIA  
Telefone: (61)3107-1918 E-mail: cepfm@unb.br

UNB - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 3.739.066

BRASILIA, 02 de Dezembro de 2019

---

**Assinado por:**  
**Antônio Carlos Rodrigues da Cunha**  
**(Coordenador(a))**