



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

GABRIELA ROLDÃO CORREIA COSTA

**ANÁLISE DO EXOMA EM INDIVÍDUOS COM DEFICIÊNCIA INTELECTUAL E  
(OU) ANOMALIAS CONGÊNITAS MÚLTIPLAS COM REGIÕES DE HOMOZIGOSE  
NO GENOMA DETECTADAS PELA ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR  
MICROARRAY**

CAMPINAS

2021

GABRIELA ROLDÃO CORREIA COSTA

ANÁLISE DO EXOMA EM INDIVÍDUOS COM DEFICIÊNCIA INTELECTUAL E (OU)  
ANOMALIAS CONGÊNITAS MÚLTIPLAS COM REGIÕES DE HOMOZIGOSE NO  
GENOMA DETECTADAS PELA ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRAY

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos  
exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências,  
Área de Concentração Genética Médica.

**Orientador:** Prof. Dr. Tárzis Antonio Paiva Vieira

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela  
aluna Gabriela Roldão Correia Costa, e orientada pelo  
Prof. Dr. Tárzis Antonio Paiva Vieira.

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

C817a Correia-Costa, Gabriela Roldão, 1993-  
Análise do exoma em indivíduos com deficiência intelectual e (ou) anomalias congênitas múltiplas com regiões de homozigose no genoma detectadas pela análise cromossômica por *microarray* / Gabriela Roldão Correia Costa. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Társis Antônio Paiva Vieira.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Microarray* cromossômico. 2. Sequenciamento completo do exoma. 3. Homozigose. 4. Deficiência intelectual. 5. Malformações congênitas. I. Vieira, Tarsis Antonio Paiva, 1981-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Whole exome sequencing from individuals with intellectual disability and (or) multiple congenital abnormalities with regions of homozygosity previously detected by chromosomal *microarray* analysis

**Palavras-chave em inglês:**

Chromosomal *microarray*

Whole exome sequencing

Homozygosity

Intellectual disability

Congenital abnormalities

**Área de concentração:** Genética Médica

**Titulação:** Mestra em Ciências

**Banca examinadora:**

Társis Antônio Paiva Vieira [Orientador]

Ana Cristina Victorino Krepischi

Antonia Paula Marques de Faria

**Data de defesa:** 26-02-2021

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências Médicas

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-7277-8522>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4922097593871224>

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO**

**GABRIELA ROLDÃO CORREIA COSTA**

**ORIENTADOR: PROF. DR. TÁRSIS ANTONIO PAIVA VIEIRA**

**MEMBROS TITULARES:**

**1. PROF. DR. TÁRSIS ANTONIO PAIVA VIEIRA**

**2. PROFA. DRA. ANA CRISTINA VICTORINO KREPISCHI**

**3. PROFA. DRA. ANTONIA PAULA MARQUES DE FARIA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências  
Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no  
SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

**Data de Defesa: 26/02/2021**

*Dedico este trabalho à minha mãe, Valéria, que é o alicerce de todas as coisas que eu construí até aqui. Ao meu pai, Geraldo, e aos meus irmãos, Victor e Bento, que são amores incondicionais em minha vida. E ao meu companheiro, Bruno, que é fonte constante de inspiração e incentivo.*

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio das agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Nº do processo: 2018/08890-9), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Nº do processo: 132494/2019-1) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Código de Financiamento 001), aos quais solenemente agradeço por meio deste.

Agradeço também ao meu orientador, Prof. Dr. Társis Paiva Vieira, pela mentoria, pelos inúmeros ensinamentos e pela oportunidade em desenvolver esta pesquisa no Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica da FCM/Unicamp.

A todos os meus colegas de laboratório, incluindo os ex-funcionários, pelo acolhimento e pela troca de experiências e conhecimentos, que foram imensos e fundamentais para a conclusão do presente trabalho.

À minha colega de profissão e amiga, Samira Spineli, que esteve ao meu lado não somente na bancada de trabalho, me auxiliando em diversos experimentos, como também fora do laboratório, em minha vida pessoal.

À Prof. Dra. Iscia Lopes Cendes por disponibilizar o Laboratório de Genética Molecular da FCM/Unicamp, para a realização de parte dos experimentos durante o meu mestrado, mesmo com todas as dificuldades impostas por uma pandemia.

À bióloga Luciana Cardoso Bonadia, que atua no Laboratório de Genética Molecular da FCM/Unicamp, pela diligência e todo o auxílio na reta final de elaboração deste trabalho.

À Banca Examinadora por sua participação e pela contribuição na elaboração desta dissertação.

À Marcinha, secretária da pós-graduação, pela paciência, generosidade e disponibilidade de sempre.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a todos os pacientes e às suas famílias, que se disponibilizaram prontamente a participar desta pesquisa, fornecendo todos os dados necessários, bem como as amostras para extração de DNA.

*“Um cientista dedica à ciência toda a sua vida, em todas as suas horas.  
Tempo integral significa 24 horas por dia e 7 dias por semana.  
Dedicação exclusiva quer dizer amor.”  
(Newton Freire-Maia)*

## RESUMO

Técnicas advindas do sequenciamento do genoma humano, tal qual a Análise Cromossômica por *Microarray* (*Chromosomal Microarray Analysis – CMA*), melhoraram o diagnóstico de indivíduos com atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (ADNMP), deficiência intelectual (DI) e (ou) malformações congênitas. A CMA, quando inclui oligonucleotídeos com polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), permite a detecção tanto de variações no número de cópias, quanto o aumento de regiões de homozigose no genoma (*Regions of Homozygosity - ROH*). As ROH ocorrem em decorrência de dois eventos principais: identidade por descendência e a dissomia uniparental (UPD). Porém, quando detectadas por CMA, é necessária a análise complementar para a identificação de UPD ou variantes de sequência em genes de herança recessiva. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a causa da deficiência intelectual e (ou) anomalias congênitas múltiplas, em indivíduos nos quais se identificou aumento de ROH no genoma autossômico pela CMA. Chamadas de homozigose de 265 pacientes e 289 controles testados por CMA foram analisados utilizando o programa *Chromosome Analysis Suite - ChAS* (Affymetrix®) (hg19) com filtros de no mínimo 500 marcadores e 1.500kb. Detectou-se uma única ROH  $\geq 10\text{Mb}$  em 1,9% dos pacientes e 0,3% no grupo controle. Além disso, ROH  $> 1\%$  no genoma autossômico foram detectadas em 7,2% dos pacientes e 1,4% no grupo controle. Foi realizado o sequenciamento do exoma de sete indivíduos com porcentagem de ROH aumentada no genoma. Foram detectadas sete variantes de sequência em cinco indivíduos, e cinco dessas apresentam compatibilidade com os fenótipos dos indivíduos. Entre essas, quatro são variantes novas. Com isso, reforçamos a importância da análise e do relato das regiões de homozigose em resultados de CMA, além de demonstrarmos que as análises complementares por meio do sequenciamento do exoma são altamente eficazes para o esclarecimento de fenótipos heterogêneos de causa não esclarecida.

**Palavras-chave:** *Microarray* cromossômico; Sequenciamento Completo do Exoma; Homozigose; Deficiência Intelectual; Malformações Congênitas.

## ABSTRACT

The sequencing of the human genome has brought new technologies, such as Chromosomal Microarray Analysis (CMA), which has improved the diagnosis of neurodevelopmental delay (NDD), intellectual disability (ID) and multiple congenital malformations. The CMA, when includes oligonucleotides with single nucleotide polymorphism (SNP), allows the detection of both copy number variations and regions of homozygosity (ROH) in the genome. These regions can occur due to two main events: identity by descent, mainly when there is parental consanguinity, and uniparental disomy (UPD). However, the detection of these regions by CMA, demand further analysis for UPD characterization or detection of sequence variants in genes of recessive inheritance. Thus, the aim of this study was to investigate the etiology in individuals with intellectual disabilities and (or) multiple congenital anomalies, in which increased ROH was identified in the autosomal genome by CMA. Homozygosity calls from 265 patients and 289 controls tested with CMA were analyzed using the Chromosome Analysis Suite - ChAS (Affymetrix®) (hg19) with filters set as a minimum of 500 markers and 1,500kb. Single ROH  $\geq 10$ Mb were detected in 1.9% of patients, compared with 0.3% of the control group. In addition, ROH achieving  $>1\%$  of the autosomal genome were detected in 7.2% of patients, compared with 1.4% of the control group. The Whole exome sequencing (WES) was performed for seven individuals with increased percentage of ROH in the genome. Seven sequence variants were detected by WES, in five patients, and five of these variants were compatible with the patients' phenotypes. Among them, four were novel variants. Thus, we reinforce the importance of analyzing and reporting homozygous regions in CMA results, besides demonstrating that complementary analyzes by WES are highly effective in clarifying heterogeneous phenotypes of unclear etiology.

**Keywords:** Chromosomal microarray; Whole Exome Sequencing; Homozygosity; Intellectual Disability; Congenital Abnormalities.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma para a investigação etiológica de ADNPM/DI .....	20
Figura 2: Visualização de uma deleção em um resultado de <i>microarray</i> realizado em <i>chip</i> com sondas com e sem SNPs, no <i>software Chromosome Analysis Suite – ChAS</i> .....	23
Figura 3: Visualização de uma duplicação em um resultado de <i>microarray</i> realizado em <i>chip</i> com sondas com e sem SNPs, no <i>software Chromosome Analysis Suite – ChAS</i> .....	24
Figura 4: Visualização de uma região de homozigose (ROH) em um resultado de <i>microarray</i> realizado em <i>chip</i> com sondas com e sem SNPs, no <i>software Chromosome Analysis Suite – ChAS</i> .....	24
Figura 5: Idiogramas visualizados com a ferramenta <i>Karyoview</i> do <i>Chromosome Analysis Suit (Affymetrix®)</i> .....	27
Figura 6: Principais mecanismos de formação de uma UPD de cromossomo inteiro, de acordo com Niida e colaboradores (2018) .....	30
Figura 7: Mecanismo de formação de uma UPD segmentar, de acordo com R.J.M Gardner, Grant R Sutherland e Lisa G. Shaffer, no livro <i>Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling - 4th ed. [126]</i> .....	30
Figura 8: Fluxograma de critérios para análise de ROH em resultados de CMA .....	37
Figura 9: Técnica de sequenciamento por síntese.....	40
Figura 10: Gráfico da frequência de regiões de homozigose no grupo de pacientes, em comparação com os controles.....	45
Figura 11: Heredograma representativo da genealogia do indivíduo ID01.....	52
Figura 12: Gráficos gerados a partir dos dados provenientes da análise de segregação alélica por meio de Sequenciamento de Sanger do paciente ID01.....	54
Figura 13: Heredograma representativo da genealogia do indivíduo ID02.....	55

Figura 14: Heredograma representativo da genealogia do indivíduo ID03.....	56
Figura 15: Gráficos gerados a partir dos dados provenientes da análise de segregação alélica por meio de Sequenciamento de Sanger da paciente ID03.....	58
Figura 16: Gráficos gerados a partir dos dados provenientes da análise de segregação alélica por meio de Sequenciamento de Sanger da paciente ID03.....	60
Figura 17: Gráficos gerados a partir dos dados provenientes da análise de segregação alélica por meio de Sequenciamento de Sanger da paciente ID03.....	62
Figura 18: Heredograma representativo da genealogia do indivíduo ID04.....	64
Figura 19: Heredograma representativo da genealogia dos indivíduos ID05 e ID06.....	65
Figura 20: Gráficos gerados a partir dos dados provenientes da análise de segregação alélica por meio de Sequenciamento de Sanger, para os pacientes ID05 (A) e ID06 (B) .....	66
Figura 21: Gráficos gerados a partir dos dados provenientes da análise de segregação alélica por meio de Sequenciamento de Sanger, para os pacientes ID05 (A) e ID06 (B) .....	69
Figura 22: Heredograma representativo da genealogia do indivíduo ID07.....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da DI com base no QI e frequência de cada subtipo.....	21
Tabela 2: Correlação entre o grau de consanguinidade e a porcentagem de homozigose teórica encontrada no genoma autossômico, com base no coeficiente de endogamia.....	28
Tabela 3: Percentuais teóricos, admitidos e encontrados de homozigose para cada indivíduo com ROH >1% no grupo de pacientes.....	46
Tabela 4: Descrição das ROHs detectadas em cromossomos únicos em pacientes e controles.....	47
Tabela 5: Caracterização do grupo selecionado para realização do WES.....	50
Tabela 6: Correlação genótipo-fenótipo para o paciente ID01.....	53
Tabela 7: Correlação genótipo-fenótipo para o paciente ID03.....	63
Tabela 8: Correlação genótipo-fenótipo para os pacientes ID05 e ID06.....	69
Tabela 9: Correlação genótipo-fenótipo para o paciente ID07.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADNPM – Atraso do Desenvolvimento Neuropsicomotor

DI – Deficiência Intelectual

CMA – do inglês, *Chromosomal Microarray Analysis*

DNA – do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*

WES – do inglês, *Whole Exome Sequencing*

ROH – do inglês, *Regions Of Homozygosity*

DD – do inglês, *Developmental Disorders*

NDD – do inglês, *Neurodevelopmental Disorders*

OMS – Organização Mundial de Saúde

QI – Quociente de Inteligência

BD – do inglês, *Birth Defects*

MCA – do inglês, *Multiple Congenital Anomalies*

ISCA – do inglês, *International Standard Cytogenomic Array Consortium*

Kb – Kilobase

SNP – do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*

CNV – do inglês, *Copy Number Variation*

VOUS – do inglês, *Variant of Uncertain Clinical Significance*

Mb – Megabase

UPD – do inglês, *Uniparental Disomy*

LD – do inglês, *Linkage Disequilibrium*

hUPD – do inglês, *Uniparental Heterodisomy*

iUPD – do inglês, *Uniparental Isodisomy*

NGS – do inglês, *Next Generation Sequencing*

SNV – do inglês, *Single Nucleotide Variant*

HPO – do inglês, *Human Phenotype Ontology*

SNC – Sistema Nervoso Central

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>18</b>
1.1 Atraso do Desenvolvimento Neuropsicomotor/Deficiência intelectual e Malformações Congênitas.....	18
1.2 Análise Cromossômica por <i>Microarray</i> .....	22
1.3 Regiões de Homozigose no Genoma Autossômico.....	26
1.4 Sequenciamento Completo do Exoma.....	32
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>34</b>
2.1 Objetivos Gerais.....	34
2.2 Objetivos Específicos.....	34
<b>3. Aspectos Éticos.....</b>	<b>35</b>
<b>4. Material e Métodos.....</b>	<b>36</b>
4.1 Análise e comparação da frequência de regiões de homozigose detectadas no genoma autossômico de pacientes e controles da população brasileira.....	36
4.1.1 Seleção da casuística.....	36
4.1.2 Reanálise dos dados de CMA como enfoque nas regiões de homozigose do genoma autossômico.....	36
4.2 Sequenciamento completo do exoma de indivíduos com aumento das regiões de homozigose no genoma autossômico.....	38
4.2.1 Seleção da casuística.....	38
4.2.2 Obtenção das amostras de DNA.....	39
4.2.3 Técnica de sequenciamento do exoma.....	39
4.2.4 Análise dos dados e classificação das variantes encontradas....	41
4.3 Confirmação, via Sequenciamento de Sanger, das variantes detectadas pelo WES.....	42

<b>5. Resultados e Discussão.....</b>	<b>44</b>
5.1 Da análise das regiões de homozigose previamente detectadas por CMA no grupo de pacientes e da comparação com os dados do grupo controle da população brasileira.....	44
5.2 Do sequenciamento completo do exoma dos indivíduos com aumento das regiões de homozigose no genoma autossômico.....	50
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>73</b>
<b>7. Referência Bibliográficas.....</b>	<b>74</b>
<b>8. Anexos.....</b>	<b>82</b>
8.1 Aprovação do Comitê de Ética.....	82
8.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) .....	91
8.3 Protocolo Sequenciamento Automático de Sanger.....	95

## 1. INTRODUÇÃO

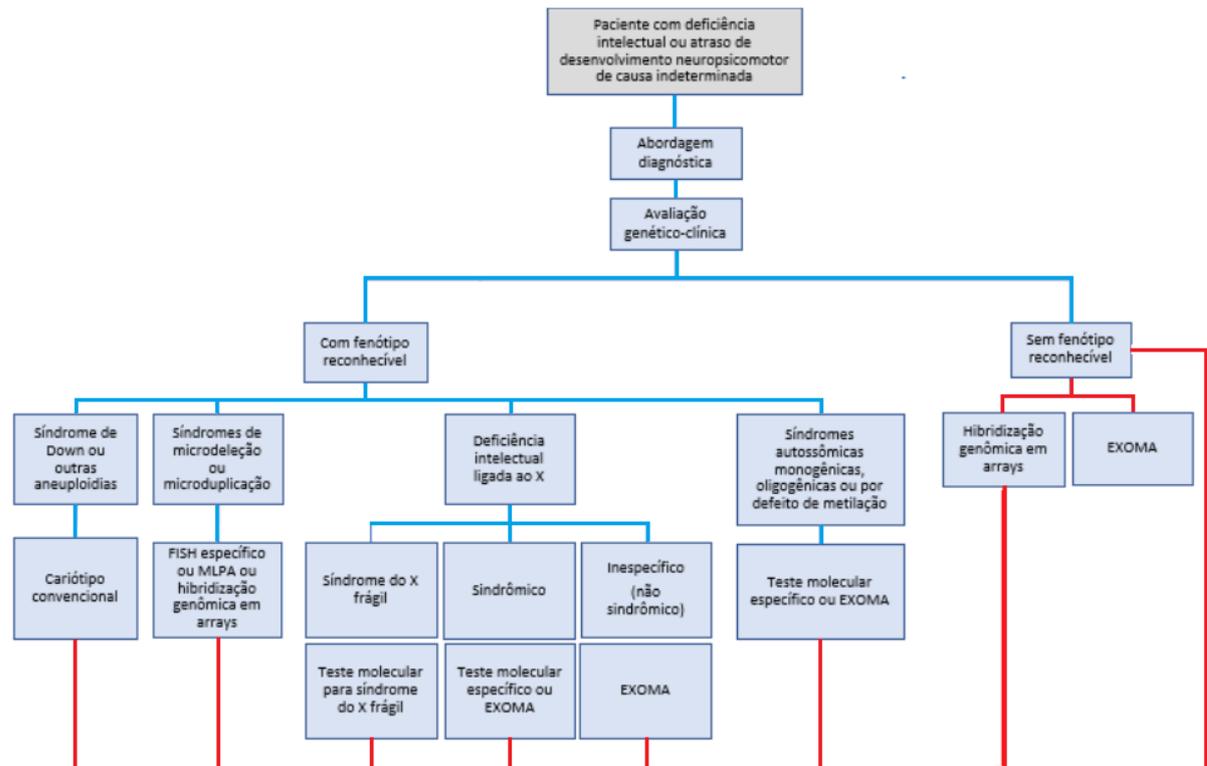
### 1.1 Atraso do Desenvolvimento Neuropsicomotor/Deficiência intelectual e Malformações Congênitas

Os chamados transtornos do desenvolvimento (do inglês, *Developmental Disorders* – DD) compreendem todos os transtornos crônicos que acometem indivíduos, especialmente na fase anterior à vida adulta (18 anos), e que provocam prejuízo substancial em pelo menos três das seguintes áreas: da linguagem, da aprendizagem, da mobilidade, do autocuidado, da autodireção e da autossuficiência. Neste contexto, os transtornos do neurodesenvolvimento (do inglês, *Neurodevelopmental Disorders* – NDD) compreendem as DDs que acometem especificamente o Sistema Nervoso Central na fase do desenvolvimento cognitivo, motor, de comunicação e/ou comportamento. Dentre as diversas condições que se enquadram no conjunto de transtornos do neurodesenvolvimento estão algumas tais como: os transtornos do espectro autista, de hiperatividade e o atraso do desenvolvimento neuropsicomotor/deficiência intelectual (1–5).

O atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) é definido pela Organização Mundial de Saúde – OMS como uma “deficiência de competências manifestada durante o período de desenvolvimento, que contribuem para o nível global de inteligência, ou seja, capacidades cognitivas, linguísticas, motoras e sociais”. Constitui o primeiro sinal de Deficiência Intelectual (DI) em um indivíduo, condição que provoca redução substancial das funções intelectuais, habilidades sociais e práticas cotidianas do mesmo (6). Na população adulta, a DI apresenta uma prevalência global de 1-3% e, no Brasil, segundo dados do Censo Demográfico (2010), estima-se que haja cerca de 2,6 milhões de pessoas acometidas por tal condição, dentre as quais se observa causa genética em ao menos 30% dos casos (5–7). Embora seja uma deficiência descrita como rara na sua forma isolada, ela representa o tipo mais frequente dentre as formas de deficiência congênita e é também considerada uma das mais incapacitantes, já que afeta o indivíduo não somente no âmbito do desempenho intelectual, mas também no âmbito da capacidade adaptativa e psicossocial (8).

De maneira geral, o ADNPM/DI pode ser provocado tanto por fatores genéticos, quanto por fatores ambientais ou mistos. Dentre as causas genéticas, destacam-se as síndromes cromossômicas, síndromes de microdeleção e microduplicação, além das síndromes monogênicas e os erros inatos do metabolismo. Apesar de representar uma condição para a qual o diagnóstico genético não implica na reversão do quadro, a elucidação de sua causa é extremamente importante no que diz respeito ao aconselhamento genético e ao seguimento dos casos. Além disso, faz-se fundamental realizar o diagnóstico clínico da DI propriamente dita, mesmo quando não há elucidação da causa, visando uma intervenção mais acertada e de forma antecipada na vida deste indivíduo (8).

Como demonstrado no fluxograma a seguir, muitos são os caminhos para o diagnóstico genético de um paciente com ADNPM/DI, dada a heterogeneidade de fenótipos correlatos que esta condição comumente apresenta. Vale observar que, para todos aqueles casos sem fenótipo reconhecível (linha vermelha do fluxograma), a análise cromossômica por *microarray* e/ou o sequenciamento completo do exoma são os únicos testes indicados, por razões que serão discutidas detalhadamente mais adiante. No entanto, mesmo com o uso das tecnologias mais modernas disponíveis, estima-se que 50 a 60% dos indivíduos permaneçam com a causa de sua condição não esclarecida (8–13).



**Figura 1: Fluxograma da investigação genético-clínica em indivíduos com ADNPM/DI.** (Fonte: adaptado do *Protocolo para o Diagnóstico Etiológico da Deficiência Intelectual*, aprovado pelo Ministério da Saúde por meio da PORTARIA CONJUNTA Nº21, de 25 de Novembro de 2020 – disponível em <http://conitec.gov.br/>).

O diagnóstico clínico da DI, por sua vez, é presumível a partir dos cinco anos de idade, através de testes de avaliação psicométrica e da capacidade cognitiva, tal como o teste de Quociente de Inteligência – QI (6,8). Antes desta idade, crianças que não atingem os marcos do desenvolvimento neurológico dentro da escala de Denver, são diagnosticadas com o que chamamos de atraso do desenvolvimento global. A Tabela 1 traz a classificação da DI segundo o QI, bem como a frequência de cada um dos subtipos, com base na literatura (3,6,8,14).

**Tabela 1: Classificação da DI com base no QI e frequência de cada subtipo**

<b>Classificação</b>	<b>QI</b>	<b>Frequência</b>
Leve	50-70	85%
Moderada	35-49	10%
Grave	20-34	3-4%
Profunda	<20	1-2%

(\*) Tabela extraída do Módulo I da CARTILHA PARA EDUCAÇÃO CONTINUADA EM GENÉTICA MÉDICA (Marques-de-Faria, 2017)

No tocante às malformações congênitas, também chamadas de defeitos do nascimento (do inglês, *Birth Defects – BD*) ou defeitos congênitos, tratam-se de defeitos estruturais que se desenvolvem no período pré-natal e que podem provocar desde o funcionamento anormal da estrutura acometida até a perda de função e/ou o óbito neonatal. Representam, ainda, a causa de aproximadamente 20% dos abortos espontâneos ao redor do mundo e acometem cerca de 7,9 milhões de crianças nascidas vivas anualmente, das quais cerca de 3,3 milhões vão a óbito antes do 5º ano de idade. Dentre os que sobrevivem, ao menos 3,2 milhões ( $\cong$  42%) terão problemas irreversíveis durante toda a vida (15,16).

Existem, atualmente, mais de 7.000 tipos de defeitos congênitos conhecidos, dos quais os mais comumente observados são os defeitos congênitos cardíacos, os de formação do tubo neural e os relacionados à Síndrome de Down (16). A causa, por sua vez, é altamente heterogênea e, em grande parte, desconhecida. De maneira geral, as causas genéticas podem ser variantes de sequência e aberrações cromossômicas diversas; ao passo que dentre as causas não genéticas, observa-se o efeito dos agentes teratogênicos e as deficiências nutricionais (15–17).

Na grande maioria dos casos, os defeitos congênitos isolados resultam de interações genético-ambientais diversas, demonstrando causa multifatorial. Apesar disso, em cerca de 20 a 30% das crianças com algum defeito congênito, observa-se o que denominamos Anomalias Congênitas Múltiplas (do inglês, *Multiple Congenital Anomalies – MCA*), que é a associação de dois ou mais defeitos congênitos, e, nestes casos, destaca-se a prevalência de fatores genéticos como causa, frequentemente compondo quadros sindrômicos (18–22).

Junto ao ADNPM/DI, as malformações congênitas constituem um grupo de alta prevalência na população em geral, motivo pelo qual são responsáveis por boa parte dos testes citogenômicos realizados ao redor do mundo. Neste sentido, vale destacar que, em 2010, um consenso internacional recomendou a utilização da Análise Cromossômica por *Microarray* como primeiro teste diagnóstico para a elucidação da causa genética destas condições, bem como dos transtornos do espectro do autismo (23). Ainda que atualmente a recomendação internacional seja utilizar o sequenciamento completo do exoma como primeiro teste diagnóstico para indivíduos com transtornos do desenvolvimento (24), visto sua capacidade de aumentar o rendimento diagnóstico para tais condições, a CMA não perdeu a sua importância e continua sendo indicada quando há suspeita de um desequilíbrio genômico como causa do fenótipo (25).

## **1.2 Análise Cromossômica por *Microarray***

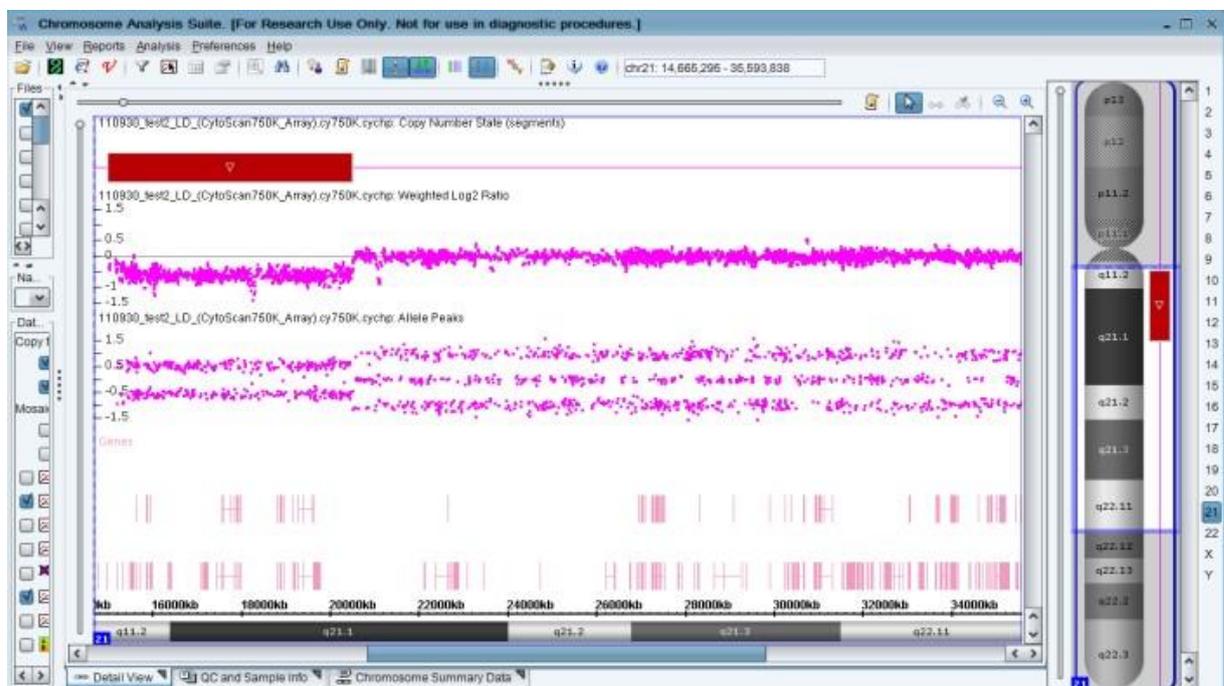
A partir da descoberta de que os transtornos do desenvolvimento poderiam estar associados a alterações cromossômicas, as investigações etiológicas por meio de análises do cariótipo tornaram-se rotina dentro dos laboratórios de genética. Por muitos anos, a cariotipagem com bandamento G foi utilizada como padrão ouro para estes diagnósticos, mas suas limitações fizeram com que ela fosse gradualmente substituída por tecnologias mais modernas e com maior rendimento diagnóstico (26).

Neste contexto, a Análise Cromossômica por *Microarray* mostrou-se uma alternativa poderosa, por permitir a detecção de variações do número de cópias no genoma em resoluções até então sem precedentes e com um nível de automação considerável. Desta forma, a introdução das plataformas de CMA no âmbito do diagnóstico citogenômico permitiu a descoberta de variações submicroscópicas no genoma de pacientes com ADNPM/DI e malformações congênitas (26,27). Assim, foi estabelecido pelo ISCA (do inglês, *International Standard Cytogenomic Array Consortium*) e pelo *American College of Medical Genetics*, em 2010, o consenso internacional que definiu o uso de CMA como primeiro teste para o diagnóstico das condições supracitadas (23).

Com o advento da tecnologia dos *microarrays*, diversas plataformas de análise passaram a ser comercializadas. Destacam-se, dentre os tipos existentes, a

hibridização genômica comparativa em *array* (em inglês, *Comparative Genomic Hybridization array* ou *CGH-array*) e a detecção de polimorfismo de nucleotídeo único em *array* (em inglês, *Single Nucleotide Polymorphism array* ou *SNP-array*). O primeiro apresenta sensibilidade suficiente para detectar desequilíbrios genômicos a partir de um kilobase (Kb), abrangendo todo o genoma, com algumas variações de resolução e cobertura, de acordo com o chip utilizado (23,28). Já o segundo, por conter sondas para variantes de nucleotídeos únicos, além de permitir a detecção de desequilíbrios genômicos, é especialmente capaz de detectar regiões de homozigose (em inglês, *Regions of Homozygosity – ROH*) ao longo do genoma (28–31).

A utilização de *chips* com SNPs tornou possível analisar as variações de números de cópias (do inglês, *Copy Number Variations – CNVs*) e as variações neutras em número de cópia (do inglês, *Copy-neutral Variations*) do genoma, em um único experimento. As figuras 1, 2 e 3 demonstram como se dá a visualização dessas variações no genoma, quando detectadas via CMA, com base nos gráficos gerados pelo *Chromosome Analysis Suite – ChAS*, *software* desenvolvido pela Affymetrix® e utilizado para análise no presente trabalho.



**Figura 2:** Visualização de uma deleção em um resultado de *microarray* realizado em *chip* com sondas com e sem SNPs, no software *Chromosome Analysis Suite – ChAS*. (Fonte: *CytoScan Arrays sample data files - Educational Examples of Different Aberration Types*, disponível em <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/microarray-analysis/microarray-dataanalysis/microarray-analysis-sample-data/copy-number-cytogenetics-sample-data.html>)

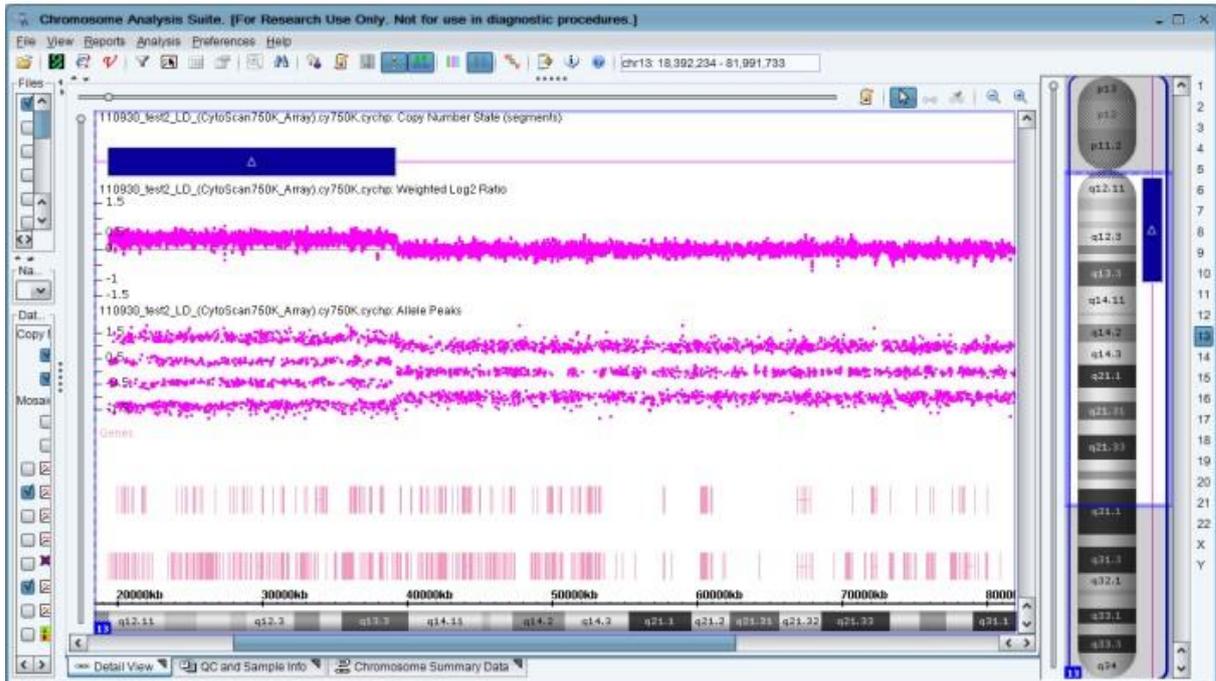


Figura 3: Visualização de uma duplicação em um resultado de *microarray* realizado em *chip* com sondas com e sem SNPs, no software Chromosome Analysis Suite – ChAS. (Fonte: *CytoScan Arrays sample data files - Educational Examples of Different Aberration Types*, disponível em <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/microarray-analysis/microarray-dataanalysis/microarray-analysis-sample-data/copy-number-cytogenetics-sample-data.html> )

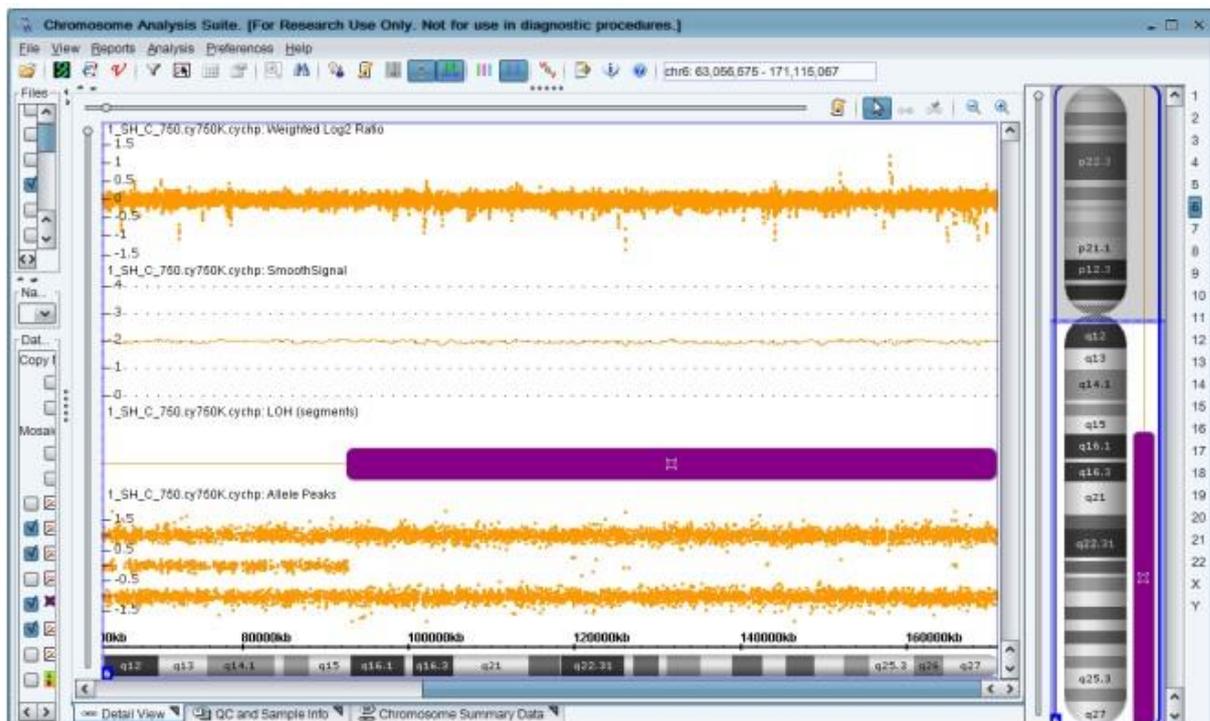


Figura 4: Visualização de uma região de homozigose (ROH) em um resultado de *microarray* realizado em *chip* com sondas com e sem SNPs, no software Chromosome Analysis Suite – ChAS. (Fonte: *CytoScan Arrays sample data files - Educational Examples of Different Aberration Types*, disponível em <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/microarrayanalysis/microarray-data-analysis/microarray-analysis-sample-data/copy-number-cytogenetics-sample-data.html>)

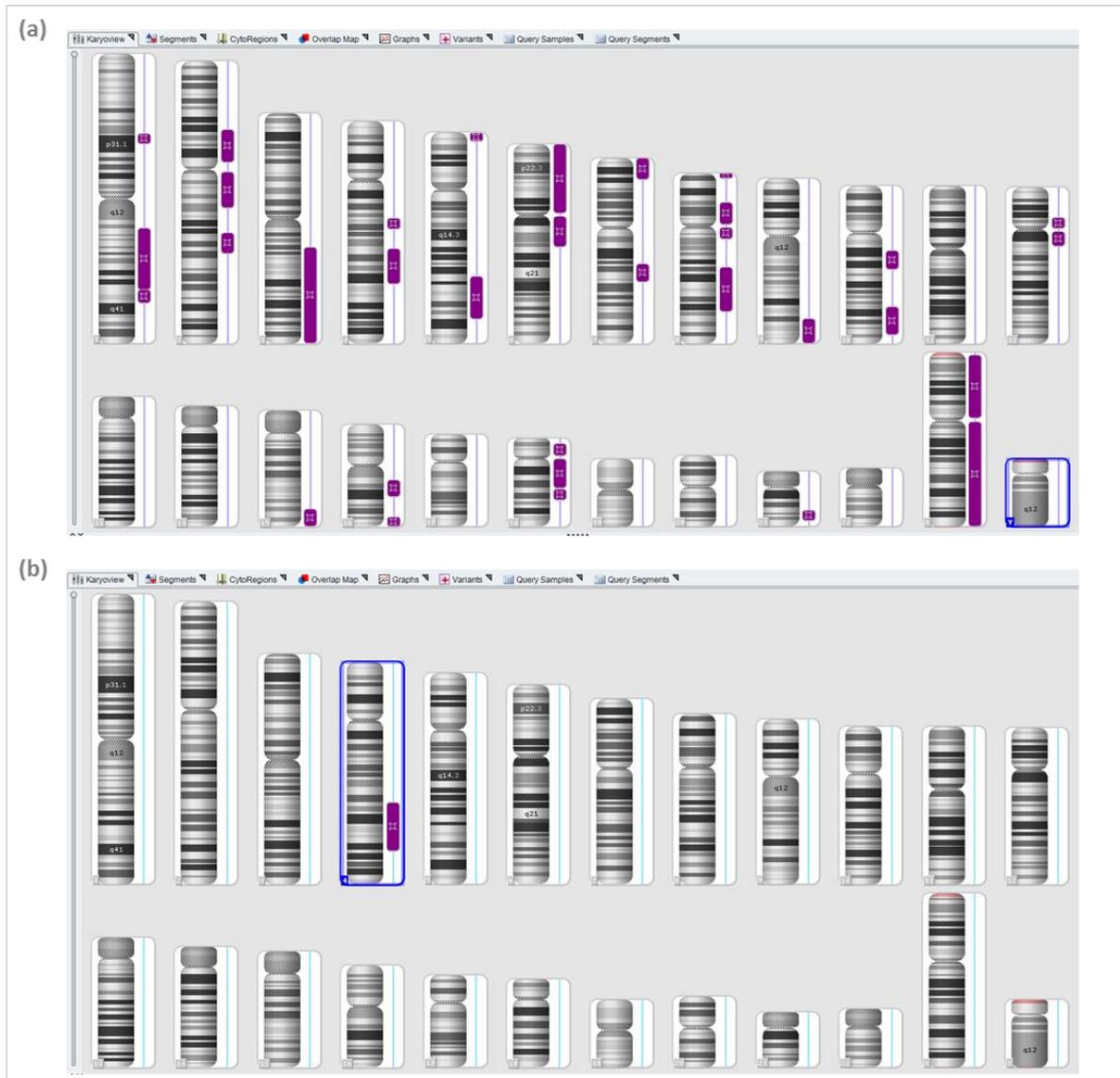
As CNVs (Figuras 2 e 3) consistem em deleções ou duplicações de sequências genômicas iguais ou maiores a 50 pares de bases (32,33). Com a finalidade de diagnóstico, as CNVs são classificadas em cinco categorias: (1) patogênicas, que são clinicamente relevantes; (2) provavelmente patogênicas, que são clinicamente relevantes, mas cuja relação direta com o fenótipo ainda não é comprovada; (3) de significado clínico incerto; (4) provavelmente benignas; e (5) benignas, as quais são observáveis em mais de 1% da população. Dentre as categorias descritas, vale destacar a categoria 3, que designa as variantes de significado clínico incerto (em inglês, *Variant Of Uncertain Clinical Significance – VOUS*), as quais constituem o grupo mais raro de variantes e que, não por acaso, representam um dos maiores desafios para os geneticistas. Trata-se de variantes que ainda não foram relatadas na população ou em indivíduos com fenótipo semelhante, ou, se relatadas, não apresentaram evidências capazes de correlacioná-las ao quadro clínico, tornando sua classificação complexa e imprecisa (26,34). As *copy-neutral variations*, por sua vez (Figura 4), compreendem as regiões de homozigose que, apesar de não serem alterações em número de cópias no genoma, podem conter variantes de sequência em genes de condições recessivas responsáveis pelo fenótipo de condições diversas ou compreender regiões de *imprinting* genômico, como discutiremos mais adiante (32).

Com a utilização rotineira de CMA nos laboratórios, tornou-se necessário estabelecer critérios de avaliação e para o relato dos achados por meio da técnica. No Brasil, até bem pouco tempo atrás, não existia nenhum *guideline* oficial que padronizasse as interpretações de CMA e a emissão de laudos diagnósticos. Desta forma, o presente estudo utilizou como referência as diretrizes europeias e do Colégio Americano de Genética Médica para a análise citogenômica constitucional (35), as quais são referência internacional e já vêm sendo amplamente utilizadas por diversos laboratórios há vários anos. Assim, no que diz respeito às regiões de homozigose, que são alvo deste estudo, de acordo com as recomendações do grupo europeu, só devem ser relatadas, em laudos diagnósticos, ROH única  $\geq 10$  Mb e/ou porcentagens de ROH superiores à 1% no genoma autossômico (36). Como o propósito aqui é encontrar a causa de condições ainda não esclarecidas para possibilitar um diagnóstico preciso, esses foram os critérios para a seleção das ROH as quais seriam alvo da presente investigação.

### 1.3 Regiões de Homozigose no Genoma Autossômico

As *copy-neutral variants*, como descrito na seção anterior, são variações em determinadas regiões do genoma nas quais se identifica homozigose alélica. Tais regiões, denominadas regiões de homozigose, são frequentemente identificadas em análises por *microarray* utilizando sondas para polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP-*array*) e, usualmente, dois mecanismos são responsáveis pela presença das mesmas no genoma: (1) a identidade por descendência, devido à ancestralidade comum, especialmente quando na ocorrência de casamentos consanguíneos em uma família; e (2) a dissomia uniparental (em inglês, *Uniparental Disomy* – UPD) (37–39).

De maneira geral, regiões de homozigose de até 5 Mb são passíveis de ser encontradas comumente em indivíduos advindos de populações exogâmicas. Do contrário, quando se tratam de ROH múltiplas, extensas em Mb e distribuídas ao longo de diversos cromossomos (Figura 5-A), observa-se o que chamamos de identidade por descendência e pode-se sugerir a ocorrência de consanguinidade na família, especialmente quando essas regiões, somadas, ultrapassam 1% do genoma. Ainda, quando se detectam ROH  $\geq 10$  Mb localizadas em um único cromossomo (Figura 5-B), especialmente quando abrangendo a região telomérica, a ocorrência de UPD deve ser considerada (39–41).



**Figura 5: Idiogramas visualizados com a ferramenta *Karyoview* do *Chromosome Analysis Suit* (*Affymetrix*®). Barras roxas representam regiões de homozigose. (a) um padrão típico de ROH múltiplas em todo o genoma de um paciente do sexo masculino, sugestivo de identidade por descendência, com ocorrência de consanguinidade na família; (b) uma ROH >10 Mb em um único cromossomo de uma paciente do sexo feminino, sugerindo a ocorrência de dissomia uniparental segmentar.**

No que diz respeito à identidade por descendência, quanto maior o grau de parentesco entre os indivíduos relacionados em uma comunidade, maior será a quantidade de ROH observadas no genoma autossômico dos mesmos, bem como a porcentagem do genoma que elas compartilham. Faz-se possível, inclusive, estimar

o grau de parentesco dos pais, a depender da porcentagem de homozigose detectada no caso índice (Tabela 2) (40,42).

**Tabela 2: Correlação entre o grau de consanguinidade e a porcentagem de homozigose teórica encontrada no genoma autossômico, com base no coeficiente de endogamia.**

Parentesco entre os pais do caso índice	Grau de parentesco	Coeficiente de endogamia	% de ROH prevista no genoma do caso índice
Pais/filhos	1º	0,25	25
Irmãos	1º	0,25	25
Meio irmãos	2º	0,125	12,5
Tio(a)/Sobrinho(a)	2º	0,125	12,5
Avós/netos	2º	0,125	12,5
Primos em 1º grau	3º	0,0625	6
Primos em 2º grau	4º	0,0315	3
Primos em 3º grau	5º	0,015625	1,5

\*adaptada de Kearney et al, 2011.

Não obstante ao fato de que longos trechos de homozigose sejam menos comuns em indivíduos advindos de populações exogâmicas, não é raro encontrar tais achados, e isto se explica por dois mecanismos. Primeiro, existe a possibilidade de que um casal tenha algum antepassado comum, próximo o suficiente para que não tenha havido tempo, ainda, de que a ROH fosse “perdida” em eventos de recombinação através das gerações. Por outro lado, é possível que determinadas regiões do genoma, por apresentarem uma baixa taxa de recombinação, apresentem uma alta taxa do que chamamos de desequilíbrio de ligação (do inglês, *Linkage Disequilibrium* – LD), que é a tendência para que os alelos sejam herdados em conjunto mais frequentemente do que se esperaria sob condições normais de segregação aleatória (43,44). Desta forma, é admissível que se encontre uma certa quantidade, ainda que pequena, de regiões de homozigose maiores de 5Mb no genoma de indivíduos advindos de populações sabidamente exogâmicas.

No que concerne à ocorrência de UPD, a compreensão atual dos mecanismos que levam à sua ocorrência limita-se a cerca de 3.300 casos, sendo a sua prevalência na população e as suas consequências fenotípicas ainda pouco conhecidas (45,46). Recentemente, em um estudo que utilizou dados do *23andMe Research Team (23andMe, Inc. - Sunnyvale, California)*, Nakka e colaboradores sugeriram que a ocorrência de UPD pode ser ainda mais comum e bem menos nociva do que se imaginava até pouco tempo atrás.

De modo geral, a dissomia uniparental consiste na herança de duas cópias de um mesmo cromossomo provenientes de um único genitor, ao invés de uma cópia de cada genitor. Isto pode ocorrer envolvendo ambos os homólogos daquele cromossomo, configurando o que denominamos heterodissomia ( $hUPD$ ); ou ainda envolvendo o mesmo homólogo em duplicata, configurando a isodissomia ( $iUPD$ ) (31,38,45). Ainda, a ocorrência de UPD pode acometer todo o cromossomo, sendo caracterizada como dissomia do cromossomo inteiro ou abranger somente uma ou algumas partes do cromossomo, sendo caracterizada como dissomia uniparental segmentar (42).

É sabido que a UPD de cromossomos inteiros ocorre, majoritariamente, devido a erros de não-disjunção seguidos de resgates trissômicos. Em menores proporções, ela pode ainda resultar de erros pós-fertilização, complementação gamética ou de não disjunções seguidas de resgate monossômico (Figura 6). Já as dissomias uniparentais segmentares ocorrem, essencialmente, devido a erros somáticos de recombinação pós-zigótica entre os homólogos materno e paterno (Figura 7).

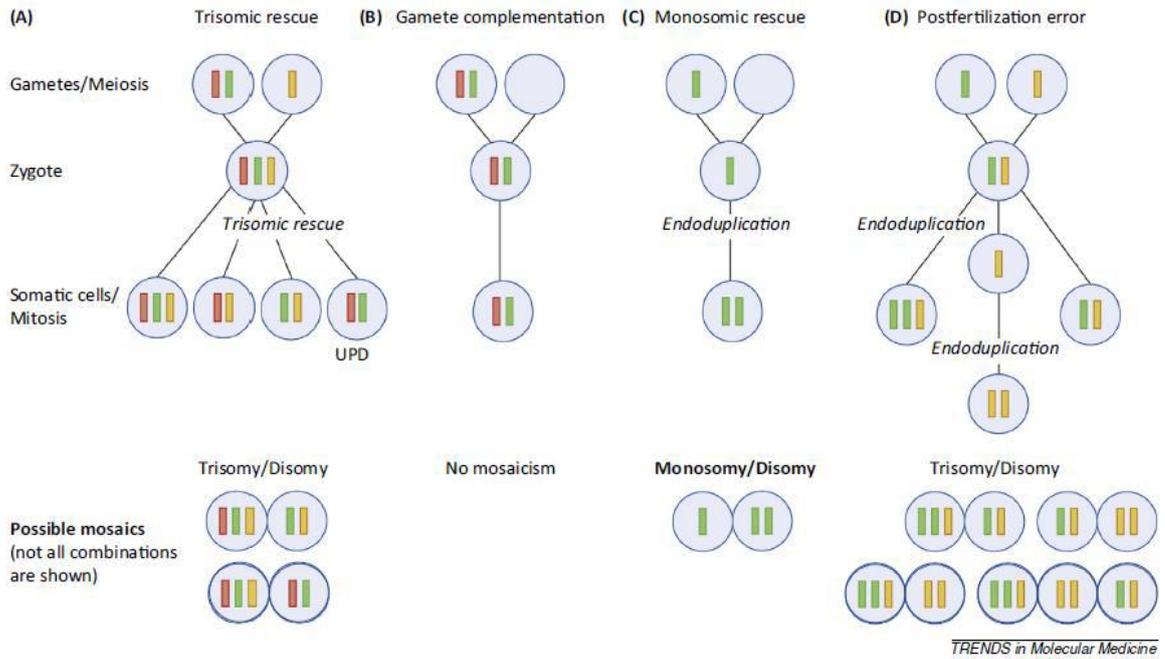


Figura 6: Principais mecanismos de formação de uma UPD de cromossomo inteiro, de acordo com Niida e colaboradores (2018).

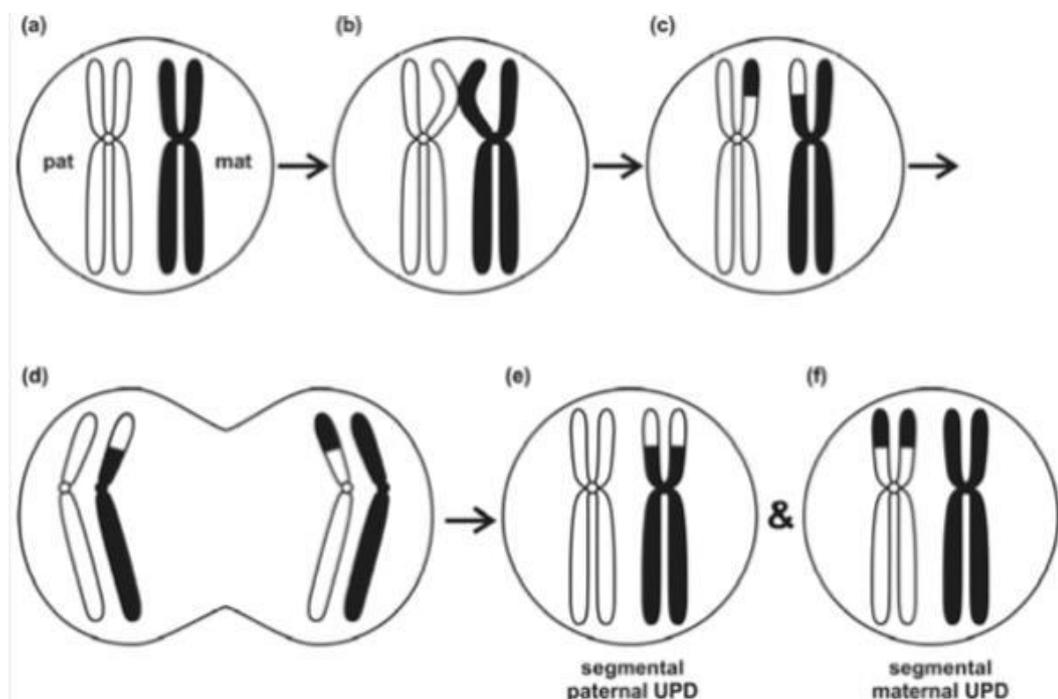


Figura 7: Mecanismo de formação de uma UPD segmentar, de acordo com R.J.M Gardner, Grant R Sutherland e Lisa G. Shaffer, no livro *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling* - 4th ed. [126].

Pela herança de cópias homólogas de segmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros provenientes de um mesmo genitor, a ocorrência de UPDs culmina na presença de regiões de homozigose no genoma autossômico. Para muitos cromossomos, nos quais sabidamente ocorre o fenômeno de *imprinting* genômico, a presença destes trechos de homozigose resulta em síndromes conhecidas, tais como as síndromes de Prader-Willi e de Angelman. Nestes casos, o resultado da CMA e a confirmação da UPD utilizando marcadores de DNA microssatélite ou análise de metilação são suficientes para confirmar a causa do fenótipo. Entretanto, em alguns casos, as ROH relacionadas à UPD não abrangem sequências gênicas que sofrem *imprinting*, o que dificulta o estabelecimento de uma correlação genótipo-fenótipo e torna necessária uma investigação complementar, além da confirmação da UPD detectada por CMA (31,38,42,47,48).

Quando uma UPD ocorre, além da preocupação com genes que sofrem *imprinting* nas regiões de homozigose geradas, é preciso dar atenção à possibilidade de existirem variantes de sequência de condições de herança recessiva nestas regiões. Predominantemente, as condições recessivas se manifestam em indivíduos cujos genitores possuem alelos em heterozigose para a condição que, quando combinados, geram zigotos homozigotos recessivos. Contudo, quando a isodissomia ocorre, basta que um genitor (aquele cujo cromossomo está envolvido na UPD) seja portador do alelo recessivo, para que a prole seja afetada (49). Neste sentido, indivíduos com fenótipos tais como ADNPM/DI e malformações congênitas múltiplas de causa inexplicada, nos quais ROH sugestivas de UPD foram detectadas no genoma, tornam-se elegíveis para a realização de análises complementares tal como o sequenciamento do exoma. Situação análoga a dos indivíduos acometidos pelas condições supracitadas e que apresentam ROH múltiplas no genoma autossômico.

Em resumo, a detecção de ROH nas análises via CMA, por si só, não é capaz de fornecer informações suficientes para o estabelecimento de um diagnóstico etiológico. Por esta razão, em situações nas quais o exame não detecta nenhum desequilíbrio genômico que justifique o fenótipo do paciente, mas, em contrapartida, revela aumento de regiões de homozigose, o estudo dessas regiões específicas por meio de outros métodos moleculares torna-se necessário. Neste contexto, o sequenciamento do exoma representa uma excelente alternativa na busca por

variantes de sequência dentro dessas regiões, que sejam compatíveis com o quadro clínico, possibilitando uma conclusão diagnóstica.

#### 1.4 Sequenciamento Completo do Exoma

O sequenciamento completo do exoma (do inglês, *Whole Exome Sequencing* – WES) corresponde a uma das tecnologias mais modernas no que diz respeito ao diagnóstico de condições genéticas. Consiste, como o próprio nome diz, no sequenciamento da porção codificadora do DNA, que é o exoma. Enquanto os *microarrays* modernizaram drasticamente a análise de CNVs, técnicas de sequenciamento de nova geração (do inglês, *Next Generation Sequencing* – NGS), tais como o WES, revolucionaram a detecção de variantes de sequência no genoma humano (50).

Originalmente, a técnica de sequenciamento do exoma tem como alvo a identificação de variantes de sequência, tais como as variantes de nucleotídeo único (do inglês, *Single Nucleotide Variants* – SNVs) e as pequenas inserções ou deleções ( $\leq 50$  pares de base). Apesar de esses permanecerem sendo os principais alvos em estudos que utilizam a técnica, cada vez mais ela vem sendo empregada também na investigação de CNVs (24,50,51).

Com o baixo custo relativo que apresenta, a realização de WES vem demonstrando ser mais eficaz do que a realização de painéis gênicos na busca de variantes em sequências alvo do genoma. Quando não se detecta, por meio da CMA, qualquer desequilíbrio genômico compatível com o fenótipo, variantes de sequência de herança recessiva nas regiões de homozigose são facilmente identificáveis via WES e, ainda, detectam-se variantes autossômicas em heterozigose e outras ligadas ao cromossomo X, com a mesma facilidade. Isso aumenta de maneira significativa o rendimento diagnóstico (52).

Estudos recentes demonstram que o WES pode superar o rendimento diagnóstico do CMA em até 28%, atingindo 30-43% em casos com causa inexplicada envolvendo transtornos do neurodesenvolvimento. Por conseguinte, já se considera adequada a realização da análise do exoma como primeiro teste diagnóstico nesse tipo de condição, de preferência, incluindo pais e irmãos do caso

índice. Assim, amplia-se consideravelmente o potencial diagnóstico, o que sabidamente gera impactos positivos sobre o processo do aconselhamento genético e sobre a gestão clínica dos casos (24,53).

Assim, no que diz respeito a condições com fenótipos inespecíficos, nas quais o quadro clínico apresenta elevada heterogeneidade, tais como as condições estudadas no presente trabalho, o sequenciamento do exoma têm demonstrado excelente rendimento diagnóstico, em especial quando combinado com outras técnicas, tal qual o CMA.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral:

Investigar a causa da deficiência intelectual e (ou) anomalias congênitas múltiplas, em indivíduos nos quais foram identificadas regiões de homozigose no genoma pela análise cromossômica por *microarray*.

### 2.2 Objetivos específicos:

- Relatar a frequência de ROH  $\geq 10$  Mb ou  $>1\%$  no genoma autossômico de indivíduos brasileiros com deficiência intelectual e (ou) anomalias congênitas múltiplas e comparar esses dados com um grupo controle da população brasileira;
- Identificar mutações em genes com herança recessiva em indivíduos com aumento de regiões de homozigose no genoma autossômico, por meio do sequenciamento do exoma, e estabelecer a correlação genótipo-fenótipo;
- Caracterizar a dissomia uniparental em indivíduos com regiões de homozigose em um único cromossomo e realizar a correlação genótipo-fenótipo.

### **3. ASPECTOS ÉTICOS**

A inclusão dos indivíduos neste estudo esteve condicionada à aprovação desta pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP (Anexo I – seção 8.1) e à assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Anexo II – seção 8.2).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Análise e comparação da frequência de regiões de homozigose detectadas no genoma autossômico de pacientes e controles da população brasileira

#### 4.1.1 Seleção da casuística:

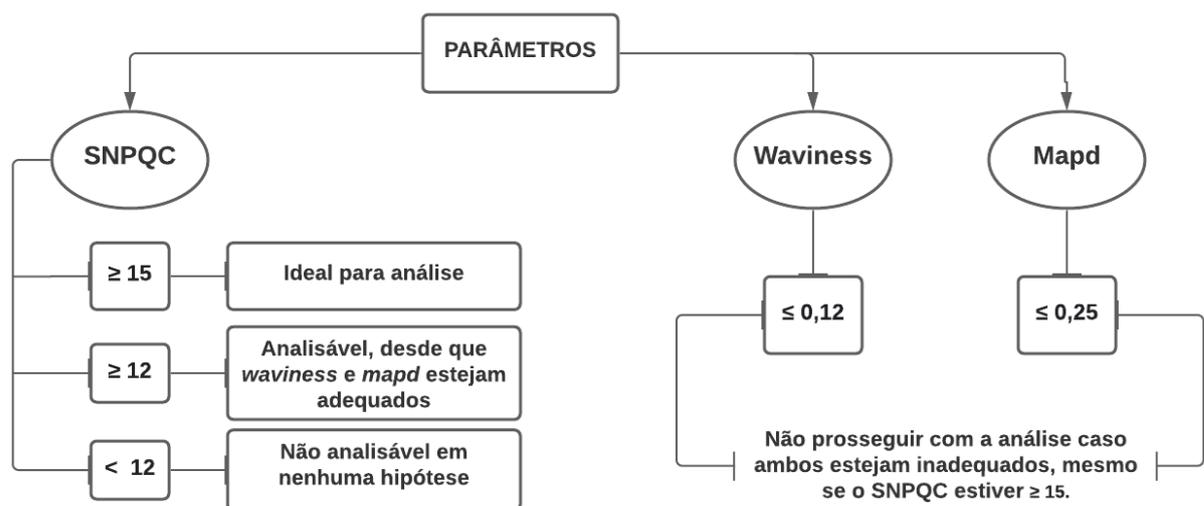
Para o estudo da frequência de ROH  $\geq 10$  Mb ou  $>1\%$  no genoma autossômico de brasileiros com deficiência intelectual e (ou) anomalias congênitas múltiplas, foram selecionados 265 indivíduos, os quais haviam sido encaminhados para realização de CMA em projetos de pesquisa anteriores do Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica (LCHC) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, entre os anos de 2010 e 2018. A maior parte desses indivíduos eram pacientes pediátricos para os quais as principais indicações clínicas para a realização de CMA eram o atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) / deficiência intelectual (DI), a presença de dimorfismos craniofaciais e (ou) anomalias congênitas múltiplas (MCA). Para a comparação com o grupo controle, foram selecionados dados de CMA de 289 indivíduos da população brasileira, os quais não apresentavam nenhuma característica fenotípica clinicamente relevante. Destes indivíduos, 130 compunham o grupo controle rotineiramente utilizado no LCHC e os 159 restantes advinham do repositório do *Brazilian Initiative on Precision Medicine - BipMed* ([www.bipmed.org](http://www.bipmed.org)).

#### 4.1.2 Reanálise dos dados de CMA com enfoque nas regiões de homozigose do genoma autossômico:

Os dados de CMA dos 265 pacientes e 289 controles foram reanalisados para o presente estudo, com foco nas chamadas de homozigose no genoma autossômico e utilizando o protocolo de interpretação de CMA vigente no Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica da FCM/Unicamp, o qual foi adaptado a partir de uma revisão prévia da literatura, seguindo as recomendações do *American College of Medical Genetics – ACMG* e do Grupo Europeu de Citogenética Humana (26,27,35,40,54–57). Dentre os indivíduos, 169 pacientes e 110 controles haviam sido testados com o chip *CytoScan™ HD* (Affymetrix®); 79 pacientes com o chip

*CytoScan*<sup>™</sup> 750K (Affymetrix<sup>®</sup>); e 17 pacientes e 179 controles com o chip SNP 6.0<sup>™</sup> (Affymetrix<sup>®</sup>). Durante a reanálise, para a checagem individual de cada uma das chamadas de ROH, foi utilizado o programa *Chromosome Analysis Suite - ChAS* (versão 4.0.0.385 (r28959) - Affymetrix<sup>®</sup>) (hg19), com filtros de no mínimo 500 marcadores e tamanho de 1.500 kb. Quanto aos parâmetros de qualidade dos experimentos de CMA, necessários para a análise de regiões de homozigose, o fluxograma da Figura 8 traz, de forma sucinta, os critérios de qualidade do protocolo utilizado.

Após a aplicação dos filtros e a checagem dos parâmetros, foram avaliados visualmente todos os gráficos de *Allele\_Difference*, fornecidos pelo ChAS, para julgar as ROH como verdadeiras ou falsas. A exemplo do que foi demonstrado anteriormente, na Figura 03 da seção 3.2 do presente trabalho, considerou-se verdadeiras as chamadas de ROH nas quais o gráfico apresentava apenas as duas linhas externas (que representam sondas para alelos em homozigose), com nenhum ou quase nenhum vestígio da linha central (que representa sondas para alelos em heterozigose). Além disso, foi utilizado o banco de dados *Geneimprint* (<http://www.geneimprint.com/>) para verificar a existência de genes que conhecidamente sofrem *imprinting* genômico dentro das regiões de homozigose detectadas em cromossomos únicos, que sugeriam ocorrência de dissomia uniparental.



**Figura 8: Fluxograma de critérios para análise de ROH em resultados de CMA.**

Fonte: Protocolo de Análise de CMA do Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica da FCM/Unicamp.

O cálculo da porcentagem de homozigose detectada em cada um dos indivíduos se deu através da soma de todas as ROHs consideradas verdadeiras no genoma autossômico dos indivíduos, dividido por 3.020Mb – que corresponde ao tamanho total do genoma autossômico de referência (*Human Genome Assembly GRCh37.p13* - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc/human/data?asm=GRCh37.p13>) multiplicado por 100, como demonstrado abaixo (40,42):

$$\% \text{ DE HOMOZIGOSE} = \frac{\text{TOTAL DE ROHs DETECTADAS NO GENOMA AUTOSSÔMICO}}{3.020\text{Mb}} \times 100$$

A análise estatística para comparação das frequências de ROH nos dois grupos foi realizada usando o teste Qui-quadrado de Pearson ( $\chi^2$ ). Cada uma das três variantes (ROH  $\geq 10$ Mb, ROH  $> 1\%$  e ROH  $< 1\%$ ) foi calculada de forma independente, sempre em comparação com o grupo controle. Por esta razão, os valores de  $p$  foram multiplicados por três ao final de cada análise. Os cálculos foram feitos utilizando a ferramenta Microsoft Excel 2016 (versão 1.0) e a os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## **4.2 Sequenciamento completo do exoma de indivíduos com aumento das regiões de homozigose no genoma autossômico**

### **4.2.1 Seleção da casuística:**

Entre os indivíduos incluídos na reanálise das ROH, cinco foram contatados e compareceram para assinatura de novo TCLE e coleta de novas amostras para sequenciamento do exoma. Além desses, outros dois indivíduos atendidos no Serviço de Genética Clínica do Departamento de Genética Médica da FCM – UNICAMP, com resultado de CMA externo, com regiões aumentadas de homozigose no genoma autossômico, também foram incluídos para o sequenciamento do exoma. No total, foram selecionados sete indivíduos, os quais apresentavam idades entre 08

e 38 anos, três eram do sexo masculino e quatro do sexo feminino. Todos apresentavam, dentre outros sinais clínicos, ADNPM/DI e/ou malformações congênitas múltiplas. Nenhuma CNV patogênica ou provavelmente patogênica que justificasse o fenótipo foi detectada. Os dados referentes a cada um desses indivíduos estão descritos detalhadamente na seção 5.2 do presente trabalho.

#### **4.2.2 Obtenção das amostras de DNA:**

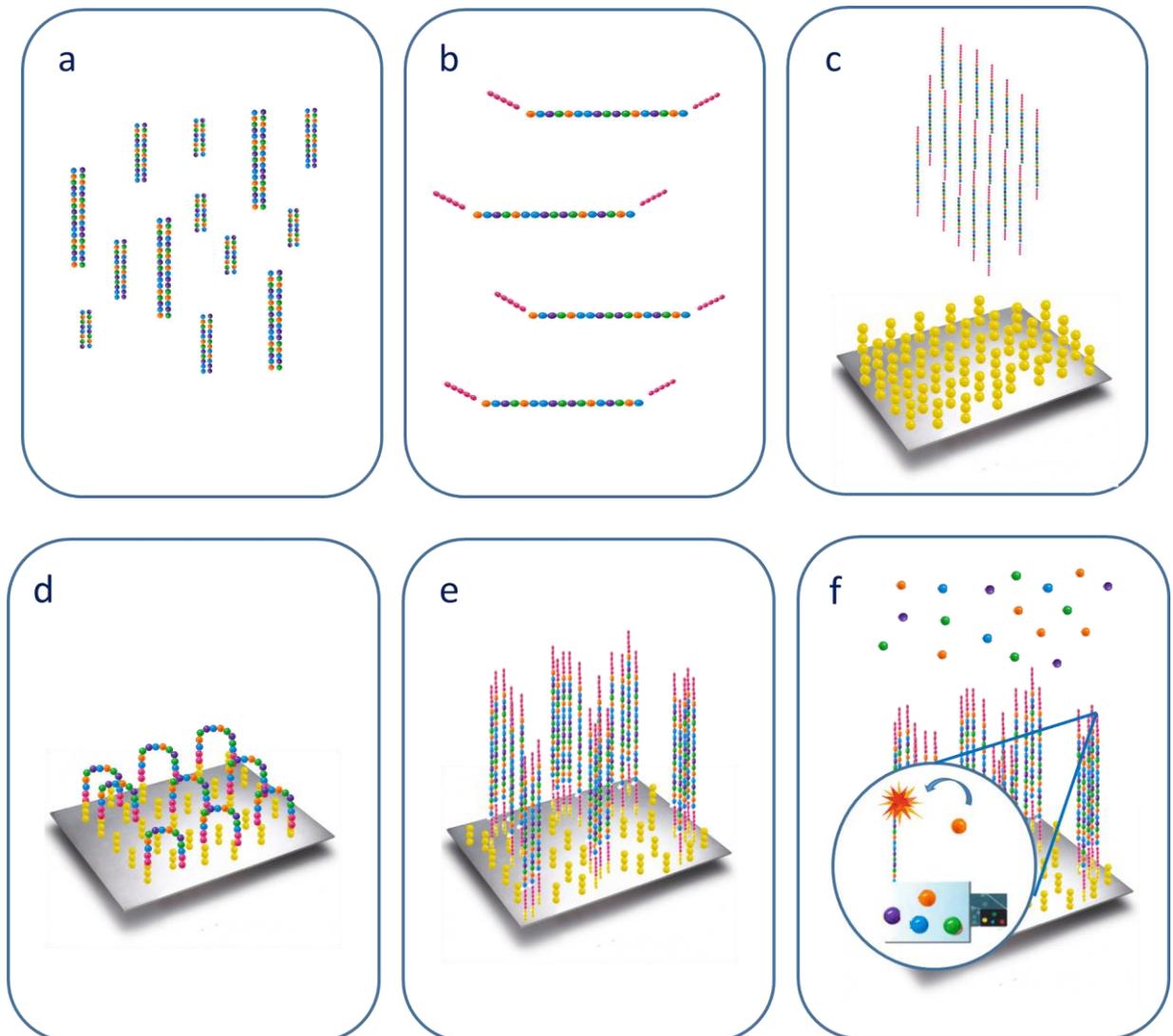
Após a seleção dos indivíduos, foram coletadas amostras de sangue periférico e (ou) saliva dos indivíduos e alíquotas de DNA foram extraídas utilizando kits *NucleoSpin® Blood* (MACHEREY-NAGEL) e/ou *ORC-100® ORAcollect.DNA* (DNA Genotek Inc.) para sangue periférico e saliva, respectivamente. Todas as extrações utilizando kits foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras de DNA foram padronizadas segundo as exigências da empresa que realizou o sequenciamento (mínimo de 10 µg de DNA a uma concentração de 100 ng/µl; OD 260/280 ratio  $\geq 1,8$  e  $\leq 2,0$ ; OD 320 ratio  $< 0,1$ ).

Com o objetivo de confirmar as possíveis variantes encontradas após o sequenciamento do exoma, e realizar a análise de segregação das variantes, foram coletadas amostras de sangue periférico dos genitores, das quais foram extraídas alíquotas de DNA por meio da técnica de fenol-clorofórmio, previamente padronizada no Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica da FCM/ Unicamp (58). Para todos os casos em que se fez necessário, foi realizada a purificação das amostras utilizando o kit de purificação Amicon Ultra – 0,5 ml (*Millipore®*).

#### **4.2.3 Técnica de sequenciamento do exoma:**

O exoma dos 07 indivíduos selecionados foi realizado pela empresa *BGI Genomics*, na filial europeia (*BGI Europe A/S*), em Copenhaga, na Dinamarca. Para o sequenciamento, foi utilizada a plataforma *Illumina HiSeq™ 2000* (© 2010 Illumina, Inc.), em conjunto com o kit de captura *Agilent SureSelect Human All Exon V5* (Agilent Technologies®). A plataforma baseia-se na técnica de sequenciamento por síntese (do inglês, *Sequencing by Synthesis*), a qual permite o sequenciamento paralelo maciço de milhões de fragmentos usando um método baseado no uso de marcadores fluorescentes reversíveis. Assim, é possível detectar base a base, à

medida que elas são incorporadas ao DNA que está sendo sintetizado (59,60). A demonstração da técnica, em síntese, pode ser vista na figura abaixo.



**Figura 9: Técnica de sequenciamento por síntese. (a) preparação da biblioteca genômica por meio de fragmentação da molécula de DNA; (b) captura e ligação dos fragmentos de interesse aos adaptadores; (c) ligação dos fragmentos à *flowcell* por meio dos adaptadores e suas seqüências complementares (já fixas na placa); (d) amplificação dos fragmentos por meio de PCR em ponte; (e) linearização dos fragmentos amplificados em clusters; (f) adição dos deoxinucleotídeos contendo os marcadores fluorescentes cliváveis, síntese das novas fitas de DNA a partir daquelas já existentes e sequenciamento da molécula a partir da leitura individual dos feixes luminosos liberados pela incorporação das bases. (Fonte: da autora, adaptado do *Technology Spotlight: Illumina® Sequencing*, disponível em [https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight\\_sequencing.pdf](https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf))**

Como demonstrado, a primeira etapa do sequenciamento consiste na preparação das bibliotecas genômicas com os fragmentos alvo. É realizada a

fragmentação da molécula de DNA, com posterior captura dos fragmentos e ligação a adaptadores presentes em uma placa (*Flowcell*) (Figura 9A-C), onde ocorre sua amplificação clonal por meio de PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) em ponte (Figura 9D). Este tipo de PCR mantém as fitas de DNA clonadas em posições próximas, permitindo a criação de *clusters* que conterão, em média, 10 milhões de cópias do mesmo fragmento de DNA. Na sequência, ocorre a linearização dos fragmentos em *clusters* por ação de uma enzima específica e a separação das fitas de DNA recém-sintetizadas (Figura 9E), permitindo a ligação de deoxinucleotídeos contendo os marcadores fluorescentes cliváveis. Estes, por sua vez, são adicionados à fase sólida da PCR, na qual a síntese de novas fitas de DNA continuará a ocorrer (Figura 9F). A cada deoxinucleotídeo adicionado às moléculas de DNA, um fluoróforo é liberado e, por meio de um sensor, identifica-se qual base foi adicionada, sendo realizado, assim, o sequenciamento propriamente dito (Figura 9F) (59–61).

#### **4.2.4 Análise dos dados e classificação das variantes encontradas**

As análises de bioinformática, que incluíram a verificação da qualidade com a retirada de *reads* com duplicatas ou com baixa qualidade, o alinhamento com o genoma de referência (GRCh37), verificação da cobertura e profundidade, e as análises de bioinformática que geraram os arquivos VCF (do inglês, *Variant Call Format*), foram realizadas pelo grupo de bioinformática da Divisão de Diagnósticos Genômicos do Departamento de Genética Humana do *Radboud University Medical Center* – Radboud UMC, de Nijmegen, na Holanda.

A interpretação das variantes geradas pelo sequenciamento do exoma foi realizada de acordo com o *pipeline* desenvolvido pelo mesmo laboratório do RadboudUMC, da seguinte maneira: a primeira fase utilizando um painel de genes para anomalias congênitas múltiplas (3025 genes) ou deficiência intelectual (1034 genes); nos casos em que não foram encontradas mutações nos genes desses painéis, realizou-se a busca por variantes patogênicas em genes OMIM em todo o exoma. Toda esta etapa se deu sob a supervisão da Dra. Nicole de Leeuw, que é chefe do grupo de Deficiência Intelectual e Anomalias Congênitas Múltiplas da Divisão de Diagnósticos Genômicos do Departamento de Genética Humana do *Radboud University Medical Center*, o qual se trata de um grupo de pesquisa com

mais de 10 anos de experiência na análise de dados gerados pelo sequenciamento do exoma (62,63).

A classificação das variantes seguiu as recomendações do *American College of Medical Genetics - ACMG*, da seguinte forma: classe 1 - variante benigna; classe 2 – variante provavelmente benigna; classe 3 - variante de significado incerto; classe 4 - variante provavelmente patogênica; classe 5 - variante patogênica (66). De forma análoga, a nomenclatura para cada uma das variantes de sequência citadas no presente trabalho seguiu o *guideline* proposto pela *Human Genome Variation Society – HGVS* e amplamente recomendado pela ACMG (64,65).

#### **4.3 Confirmação, via Sequenciamento de Sanger, das variantes detectadas pelo WES**

A confirmação das variantes patogênicas detectadas pelo sequenciamento do exoma e a investigação dos genitores foram realizadas pelo método de sequenciamento de Sanger. Para cada variante, foram desenhados *primers* específicos com o auxílio do programa *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) e do *NCBI PrimerBlast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), sendo posteriormente encomendados à empresa especializada.

Para a realização desta técnica, primeiramente foi executada a etapa de amplificação dos fragmentos de DNA de interesse por Reação em Cadeia da Polimerase – PCR. Os produtos da PCR foram então purificados com enzima *Exo-Sap* (GETM, em uma nova reação no termociclador: 37°C por 15 minutos + 80°C por 15 minutos; 4°C hold), para eliminar os reagentes e os nucleotídeos não incorporados. Em seguida, estes produtos purificados foram preparados em um *mix* contendo *BigDye*, água de injeção, os *primers* (*forward* e *reverse* separadamente) e um tampão, e foram levados ao termociclador por um período de 5 minutos (96°C por 1 minuto + 35 ciclos de 10 segundos a 96°C + 05 segundos na temperatura de anelamento escolhida para o *primer* + 04 minutos a 60°C). Depois, os produtos da reação foram novamente purificados, desta vez utilizando EDTA + etanol, e ressuspensos com 10µl de formamida Hi-Di, que garante maior especificidade

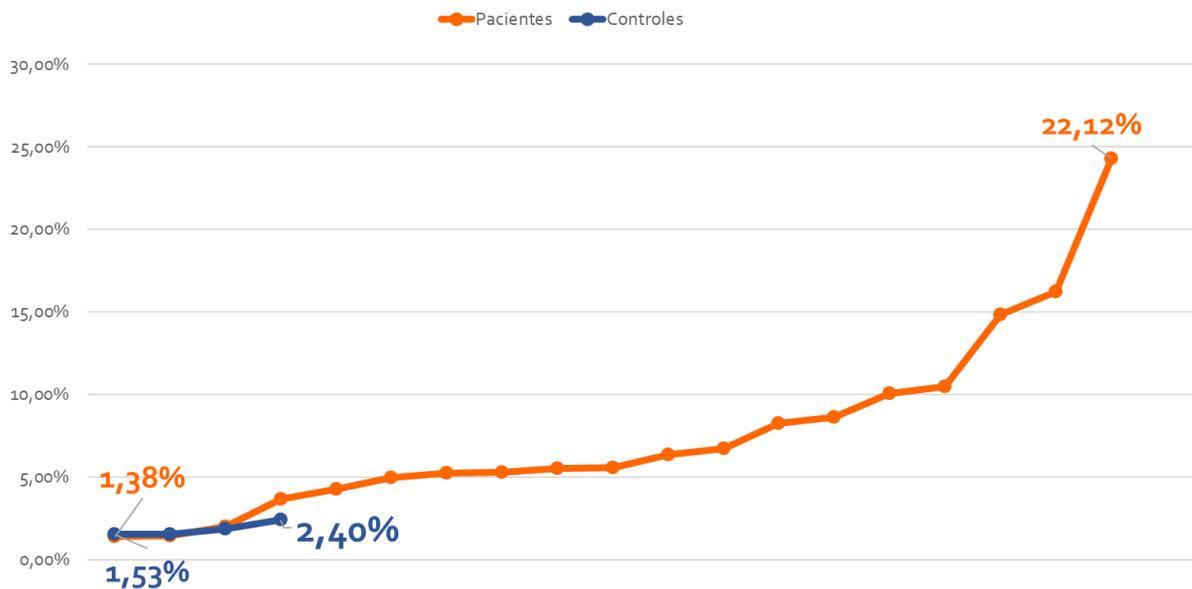
durante o anelamento dos *primers*, aumentando a eficiência da reação. Por fim, foram inseridos no sequenciador automático de eletroforese capilar *ABI 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems®). A reação de sequenciamento detalhada está descrita no Anexo III (seção 8.3).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Da análise das regiões de homozigose previamente detectadas por CMA no grupo de pacientes e da comparação com os dados do grupo controle da população brasileira:

Entre os 265 indivíduos do grupo de pacientes com ADNPM/DI e (ou) malformações congênitas múltiplas para os quais a CMA foi reanalisada, 19 (7,2%) apresentaram ROH múltiplas que ultrapassaram 1% do genoma autossômico total, enquanto no grupo controle foram detectados ROH múltiplas >1% em quatro dos 289 indivíduos (1,4%) ( $p = 0,0018$ ). ROH  $\geq 10$  Mb em cromossomos únicos foram detectadas em cinco casos (1,9%) no grupo de pacientes e em um (0,3%) indivíduo do grupo controle ( $p = 0,2403$ ). Além disso, 81 pacientes (30,6%) e 121 controles (41,8%) apresentaram ROH múltiplas que, quando somadas, não ultrapassavam 1% do genoma autossômico ( $p = 0,0174$ ). Em 160 pacientes (60,3%) e 163 controles (56,5%) nenhuma ROH no genoma autossômico foi encontrada.

O percentual de homozigose observado nos indivíduos com ROH >1% no grupo de pacientes variou de 1,38% a 22,12%, enquanto no grupo controle variou de 1,53% a 2,40% (Figura 10). Tal achado já era esperado, visto que 15 (5,66%) indivíduos do grupo de pacientes eram sabidamente filhos de pais consanguíneos. Ainda, reforçamos que o presente estudo teve enfoque nas regiões de homozigose em cromossomos autossômicos. No entanto, vale destacar que 11 dos 19 pacientes com múltiplos ROH eram do sexo feminino e três destas apresentavam pelo menos uma ROH no cromossomo X. Ademais, para todos os 24 pacientes com ROH >1% ou  $\geq 10$  Mb, nenhuma CNV classificada como patogênica ou provavelmente patogênica foi encontrada.



**Figura 10: Gráfico da frequência de regiões de homozigose no grupo de pacientes, em comparação com os controles.**

Quanto ao relato de consanguinidade por parte das famílias, bem como os percentuais de homozigose esperados (teóricos e admitidos) e detectados nos pacientes, nossos achados encontram-se descritos na Tabela 3. Considerando a margem de erro proposta por Sund e colaboradores (2013), verificamos que os percentuais de ROH admitidos e encontrados, de acordo com o grau de parentesco entre os genitores relatado pelas famílias, foi compatível para 11 dos 15 casos, conforme mostra a Tabela 3. Em quatro casos o percentual de ROH encontrado não correspondeu ao percentual admitido. Dois deles (P009 e P011) eram de pequenos municípios das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil, ambos com menos de 35.000 habitantes; e dois (P012 e P013) relatavam casamentos consanguíneos em gerações anteriores na família. Dentre os quatro pacientes que apresentaram ROH >1%, mas nenhum grau de consanguinidade foi relatado pelas famílias, os percentuais variaram de 1,38% a 10,05%, indicando diferentes graus de identidade por descendência. Dois deles (P016 e P017) são de pequenos municípios da região Nordeste do Brasil, que não ultrapassam 26.000 habitantes e podem ser consideradas comunidades com maior probabilidade de aumento da taxa de endogamia. Os outros dois casos (P018 e P019), com percentuais de homozigose

de 7,92% e 10,05%, provavelmente são filhos de pais aparentados, que não desejaram relatar essa informação por motivos desconhecidos.

**Tabela 3: Percentuais teóricos, admitidos e encontrados de homozigose para cada indivíduo com ROH >1% no grupo de pacientes.**

ID	Parentesco relatado	Porcentagens de homozigose:		
		Teórica	Admitida <sup>1</sup>	Encontrada
P001	Tio/sobrinha	12.5%	9.7 – 15.3%	16.24%
P002	Primos em primeiro grau	6.25%	4.6 – 8.3%	5.28%
P003	Primos em primeiro grau	6.25%	4.6 – 8.3%	6.34%
P004	Primos em primeiro grau	6.25%	4.6 – 8.3%	6.74%
P005	Primos em primeiro grau	6.25%	4.6 – 8.3%	7.92%
P006	Primos em primeiro grau	6.25%	4.6 – 8.3%	8.64%
P007	Primos em primeiro grau	6.25%	4.6 – 8.3%	5.23%
P008	Primos em primeiro grau	6.25%	4.6 – 8.3%	5.56%
P009	Primos em primeiro grau	6.25%	4.6 – 8.3%	9.73%
P010	Primos em segundo grau	3.125%	2.6 – 4.2%	1.88%
P011	Primos em segundo grau	3.125%	2.6 – 4.2%	4.98%
P012	Primos em segundo grau	3.125%	2.6 – 4.2%	22.12%
P013	Primos em terceiro grau	1.5625%	0.5 - 1.6%	11.86%
P014	Grau indeterminado <sup>2</sup>	-	-	1.44%
P015	Grau indeterminado <sup>2</sup>	-	-	5.51%
P016	Não relatado	-	-	1.38%

P017	Não relatado	-	-	3.06%
P018	Não relatado	-	-	7.92%
P019	Não relatado	-	-	10.05%

<sup>1</sup>Porcentagens de homozigose admitidas, segundo Sund et al. (2013). Porcentagens de homozigose intermediárias a esses valores devem ser relacionadas ao grau de parentesco ao qual o valor está mais próximo. Ex: uma porcentagem de 16,24% está mais próxima de 15,3% (limítrofe para o 2º grau) do que de 21,3% (limite para o 1º grau). Portanto, é considerado parentesco em 2º grau. <sup>2</sup>Pais relataram consanguinidade, mas não sabem o grau de parentesco.

Para os indivíduos com ROH  $\geq 10$  Mb em um único cromossomo (Tabela 4), nenhum gene com *imprinting* está mapeado nessas regiões. Além disso, casamentos consanguíneos não foram relatados pelas famílias dos mesmos. Todos eles apresentavam apenas uma ROH em um único cromossomo, as quais variaram de 10,077 Mb a 46,269 Mb em tamanho. Em quatro casos, a ROH estava localizada em regiões cromossômicas intersticiais e em apenas um (P024) foi detectada ROH em uma região cromossômica terminal. O único indivíduo do grupo controle para o qual uma ROH única  $\geq 10$  Mb foi detectada encontra-se também na Tabela 4, destacado em azul.

**Tabela 4: Descrição das ROHs detectadas em cromossomos únicos em pacientes e controles.**

ID	Chromosome	Genomic position	Lenght (Mb)
P020	12	arr[GRCh37] 12q14.3q21.2(66001610_76078947) hmz	10.077.337
P021	3	arr[GRCh37] 3q27.3q29(187631077_197851260) hmz	10.211.100
P022	6	arr[GRCh37] 6q21q23.2(109263688_132108398) hmz	22.844.773
P023	4	arr[GRCh37] 4q27q32.2(121450632_162682338) hmz	41.232.833
P024	5	arr[GRCh37] 5p15.33p11(113576_46383335) hmz	46.269.772
<b>BMS0009</b>	<b>11</b>	<b>arr[GRCh37] 11p13q12.3(31000001_63400000) hmz</b>	<b>26.292.157</b>

A presença de regiões de homozigose aumentadas no genoma humano é considerada um achado importante, seja devido à identidade por descendência ou pela ocorrência de dissomia uniparental. Ainda, a descrição de ROH aumentadas no laudo de CMA de indivíduos que apresentam ADNPM/DI e ou malformações congênitas múltiplas pode auxiliar na investigação diagnóstica, ao alertar para a presença de variantes em genes de doenças recessivas candidatos a justificar os fenótipos destes indivíduos (37,40).

Um estudo anterior com 430 indivíduos brasileiros acometidos por transtornos do neurodesenvolvimento (41) revelou que 95% desses indivíduos tinham pelo menos uma região de homozigose no genoma autossômico. Cerca de 2,6% dessas ROH eram sugestivas de UPD e 8,5% eram casos com múltiplas ROH atingindo 1% do genoma. Contudo, nenhuma comparação foi feita com um grupo controle. Até onde sabemos, o presente estudo é o primeiro envolvendo indivíduos brasileiros com ADNPM/DI e (ou) malformações congênitas múltiplas que comparou a frequência e a porcentagem de ROH com um grupo controle. Os resultados encontrados demonstram que a ocorrência de ROH no grupo de pacientes é significativamente maior quando comparada ao grupo controle. As regiões de homozigose aumentadas foram encontradas em 24 de 265 (9%) dos pacientes e em cinco de 289 (1,7%) nos indivíduos controle. Essa maior proporção de ROH no grupo de pacientes já era esperada, dado que 5,66% dos indivíduos do grupo de pacientes relatavam casamentos consanguíneos em suas famílias. No entanto, mesmo quando excluídos os casos com relato de consanguinidade, a proporção de ROH no grupo de pacientes se mantém elevada, sendo de nove em 250 (3,4%) em comparação com cinco em 289 (1,7%) no grupo controle.

Quanto às ROH múltiplas que, quando somadas, ultrapassavam 1% do genoma autossômico total, a proporção foi significativamente maior no grupo de pacientes ( $p = 0,0018$ ). Além disso, o percentual de ROH foi maior entre os pacientes (1,38% a 22,12%) do que nos controles (1,53% a 2,40%). Outro resultado interessante foi a diferença significativa entre pacientes e controles com múltiplas ROH que não atingiam 1% do genoma autossômico quando somadas. No grupo de pacientes, este grupo representou 30,6% da amostra, ao passo que nos controles eram 41,8% ( $p = 0,0174$ ). Esses resultados reforçam a ideia de que ROH <1% são menos prováveis de serem clinicamente significativas, ao contrário do que observamos para ROH >

1%. Não por acaso, este fato se apresenta em concordância com as diretrizes atuais para relato de regiões de homozigose em resultados de CMA (36).

Com relação às ROH  $\geq 10$  Mb em um único cromossomo, elas foram detectadas em cinco de 265 pacientes e em um de 289 indivíduos do grupo controle ( $p = 0,2403$ ). Todas eram sugestivas de UPD segmentar ou do compartilhamento, por parte dos genitores destes indivíduos, de um ancestral comum distante. O fato de não terem sido encontradas ROH em cromossomos únicos que sugerissem ocorrência de UPD de cromossomo inteiro em nenhum indivíduo no grupo de pacientes pode ser devido a duas razões principais: (1) as síndromes mais comuns que podem ser causadas por UPD de cromossomos inteiros, como *Beckwith-Wiedemann*, *Russell-Silver*, *Angelman* e *Prader-Willi*, apresentam fenótipos muito característicos, para os quais a suspeita clínica conduz a exames diagnósticos específicos, ao invés do CMA. Assim, casos como esses provavelmente foram excluídos da amostra selecionada para a análise; e (2) porque a UPD de cromossomos inteiros é um evento muito raro e a casuística deste estudo é relativamente pequena.

Assim, considerando os resultados anteriormente discutidos e diante da não detecção de nenhuma CNV patogênica ou provavelmente patogênica entre os 24 indivíduos aqui descritos, levantou-se a hipótese de que variantes patogênicas em genes de condições recessivas pudessem estar contidas em regiões de homozigose no genoma desses indivíduos, permitindo o esclarecimento etiológico das condições nos mesmos. Dado o seu elevado rendimento diagnóstico (30-43%) já amplamente documentado em estudos anteriores envolvendo pacientes com transtornos do neurodesenvolvimento (24,52,53), o sequenciamento completo do exoma foi o teste escolhido para a realização desta análise complementar.

## 5.2 Do sequenciamento completo do exoma dos indivíduos com aumento das regiões de homozigose no genoma autossômico:

As informações referentes aos sete indivíduos selecionados para a realização de WES (sexo, idade, histórico familiar de consanguinidade, achados de homozigose no genoma autossômico e achados do WES) encontram-se sucintamente descritas na Tabela 5. Na sequência, todos os dados se encontram separados em tópicos, um indivíduo por vez, com o detalhamento das informações e a discussão individual de cada caso. Todas as nomenclaturas referentes aos fenótipos estão devidamente codificadas segundo o *Human Phenotype Ontology* (HPO).

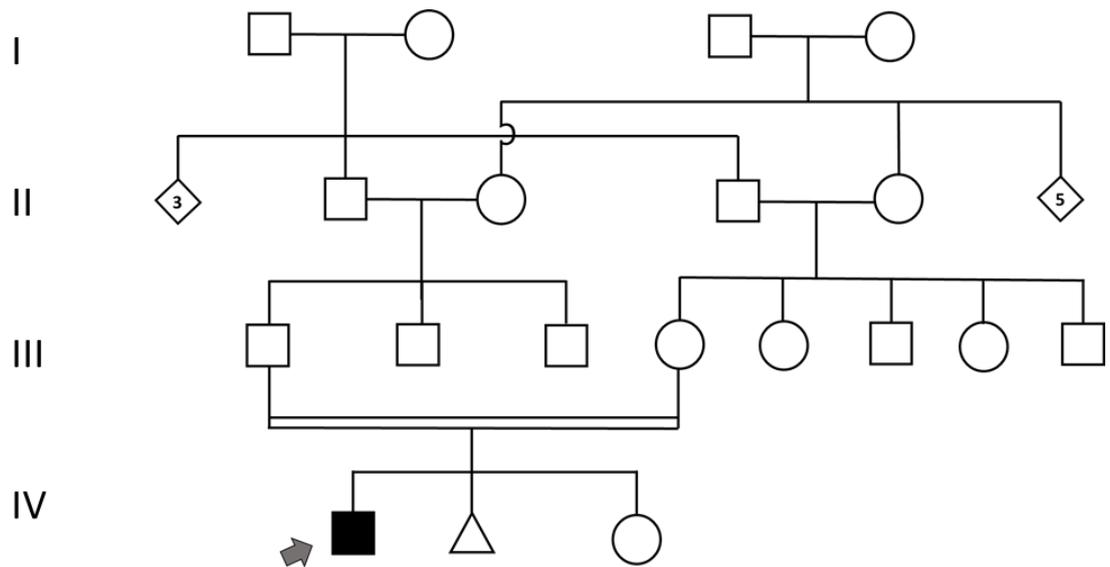
**Tabela 5 – Caracterização do grupo selecionado para realização do WES.**

ID	Idade	Sexo	% de ROHs detectadas por CMA	Há relato de consanguinidade entre os genitores?	WES detectou variantes? Em quais genes?	Variante encontrase em uma das ROHs?
01	14	M	13,71%	SIM	SIM (PACS1)	NÃO
02	8	F	1,88%	SIM	NÃO	-
03	8	F	5,56%	SIM	SIM (ASPM; CTNS; DHCR7)	APENAS AS VARIANTES ASPME CTNS.
04	21	F	1,36%	NÃO	NÃO	-
05	26	M	9,73%	SIM	SIM (MYO9A; TBC1D2B)	SIM
06	38	M	7,02%	SIM	SIM (MYO9A; TBC1D2B)	SIM
07	13	F	10,09%	SIM	SIM (INTS1)	SIM

Como observado, o sequenciamento do exoma dos indivíduos aqui descritos revelou sete variantes em cinco destes indivíduos (ID01, ID03, ID05, ID06 e ID07), todas de classe 3, 4 ou 5, e sendo uma em um gene relacionado a uma condição autossômica dominante e as outras seis em genes de condições recessivas. Cada uma das variantes reveladas encontra-se detalhada no tópico correspondente, bem como a correlação genótipo-fenótipo, que se deu a partir de informações retiradas dos bancos de dados OMIM (do inglês, *Online Mendelian Inheritance in Man*) e *Ensembl Genome Browser*, além de artigos científicos já publicados sobre o assunto. O genoma de referência utilizado para a descrição de todas as variantes foi o *Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37)*.

As variantes supracitadas foram confirmadas por meio de Sequenciamento de Sanger para todos aqueles pacientes cujos genitores compareceram à consulta médica e tiveram suas amostras de sangue periférico coletadas para extração de DNA até a data da redação do presente trabalho. Ademais, a caracterização de dissomia uniparental segmentar na paciente ID04 por meio de genotipagem com marcadores de DNA microssatélite não se fez possível devido à escassez da amostra de DNA e a impossibilidade de se coletar nova amostra de sangue periférico para extração. Apesar disso, a correlação genótipo-fenótipo foi realizada e está descrita no tópico correspondente a seguir, bem como os outros dados referentes às análises dos outros seis pacientes.

✚ **ID01:** indivíduo do sexo masculino, 14 anos. Apresenta ROH múltiplas que somam 414,1 Mb no genoma autossômico, correspondendo a 13,71% deste. Os pais relatam ser primos em primeiro grau (Figura 11). O quadro clínico é composto por: atraso do neurodesenvolvimento (HP:0012758); deficiência intelectual (HP:0001249); comportamento agressivo (HP:0006919); occipital plano (HP:0005469); plagiocefalia (HP:0001357); ptose bilateral (HP:0001488); sobrelhas grossas (HP:0011229); orelhas rodadas posteriormente e de baixa implantação (HP:0000358/HP:0000369); narinas antevertidas (HP:0000463); hipoplasia malar (HP:0000272); palato alto (HP:0000218); implantação baixa de cabelos na nuca e na frente (HP:0000294/HP:0002162); pescoço curto (HP:0000470); mamilos invertidos e distantes (HP:0003186/HP:0006610); abdômen distendido (HP:0003270) e clinodactilia (HP:0030084).



**Figura 11: Heredograma representativo da genealogia do indivíduo ID01.** (Legenda: □ = indivíduo do sexo masculino; ○ = indivíduo do sexo feminino; △ = aborto espontâneo; ◇ = sexo não especificado; ■ = indivíduo afetado do sexo masculino; ● = indivíduo afetado do sexo feminino; linhas de união duplas indicam casamentos consanguíneos; a seta indica o caso índice).

O sequenciamento do exoma revelou uma variante em heterozigose (g.65998362C>T; NM\_018026.3:c.1577C>T) no éxon 13 do gene *PACS1*, localizado na região q13.1-q13.2 (65.837.834 - 66.012.218) do cromossomo 11. Trata-se de uma variante do tipo *missense*, que provoca a troca de uma Treonina por uma Isoleucina na posição 526 do produto proteico (p.(Thr526Ile)). Ela foi classificada como uma variante de significado incerto (Classe 3), foi encontrada em heterozigose e não se encontra contida em nenhuma das ROH detectadas no paciente.

O gene *PACS1* é responsável por codificar uma proteína de revestimento que direciona a conexão da enzima furina ao complexo trans-Golgi, responsável pela triagem ácida de fosfofurina nas células. A ausência ou a deficiência funcional desta proteína culmina na formação de agregados citoplasmáticos que provocam a degeneração gradativa de neurônios e astrócitos (células da neurógli) (66). Diversos estudos já relataram a correlação entre variantes em heterozigose no gene *PACS1* e a Síndrome de *Schuurs-Hoeijmakers* (OMIM #615009) (66–70), mas nenhum deles havia ainda descrito a variante *missense* encontrada em nosso paciente.

A síndrome, que se caracteriza, dentre outras características, por ADNPM/DI associado a crises convulsivas, problemas de comportamento (agressividade; acessos de raiva), aversão oral e anomalias estruturais do cérebro (67,68), apesar de apresentar alguns traços fenotípicos compatíveis com o quadro do paciente, não o explica por completo (Tabela 6). Ainda, essa variante está presente em heterozigose. Contudo, vale destacar que a presença da mesma foi confirmada através de sequenciamento de Sanger, tal qual demonstram os gráficos da Figura 12. A análise dos genitores mostrou que se trata de uma mutação herdada de sua mãe e, portanto, é improvável que essa variante esteja relacionada ao fenótipo deste paciente.

**Tabela 6: Correlação genótipo-fenótipo para o paciente ID01.**

<i><b>DADOS CLÍNICOS (HPO)</b></i>	<i><b>VARIANTE JUSTIFICA O FENÓTIPO?</b></i>
DEFICIÊNCIA INTELECTUAL (HP:0001249)	SIM
ADNPM (HP:0012758)	SIM
COMPORTAMENTO AGRESSIVO ANORMAL (HP:0006919)	SIM
PLAGIOCEFALIA (HP:0001357)	
OCCIPITAL PLANO (HP:0005469)	
PTOSE BILATERAL (HP:0001488)	SIM
SOBRANCELHAS GROSSAS (HP:0011229)	SIM
ORELHAS PORTERIORMENTE ROTACIONADAS (HP:0000358)	
ORELHAS DE BAIXA IMPLANTAÇÃO (HP:0000369)	SIM
NARINAS ANTEVERTIDAS (HP:0000463)	
PALATO ALTO (HP:0000218)	
HIPOPLASIA MALAR (HP:0000272)	
PESCOÇO CURTO (HP:0000470)	
IMPLANTAÇÃO BAIXA DE CABELOS NA FRONTE (HP:0000294)	
IMPLANTAÇÃO BAIXA DE CABELOS NA NUCA (HP:0002162)	
MAMILOS INVERTIDOS (HP:0003186)	
DISTÂNCIA INTERMAMILAR AUMENTADA (HP:0006610)	

DISTENÇÃO ABDOMINAL (HP:0003270)

CLINODACTILIA (HP:0030084)

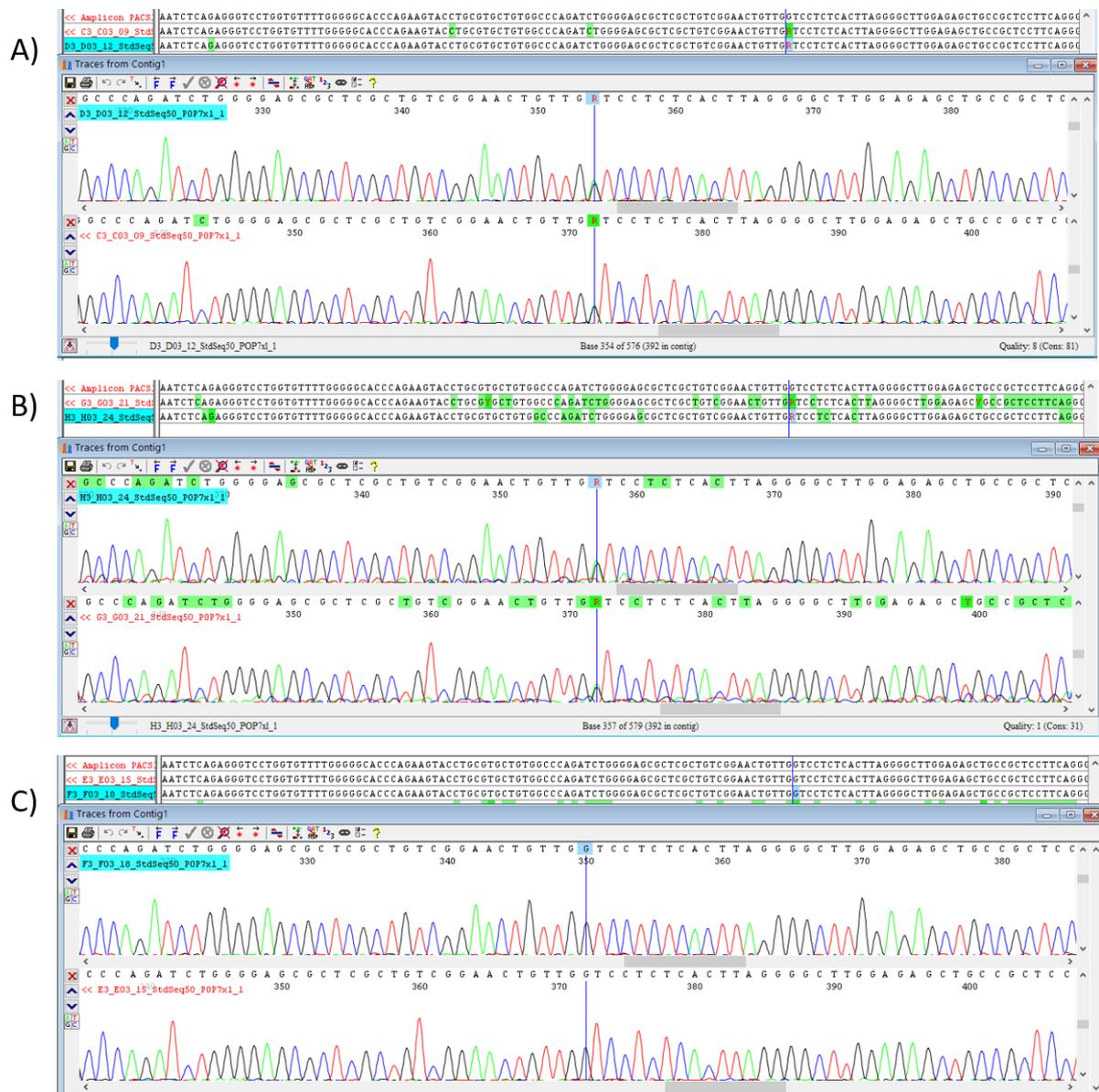
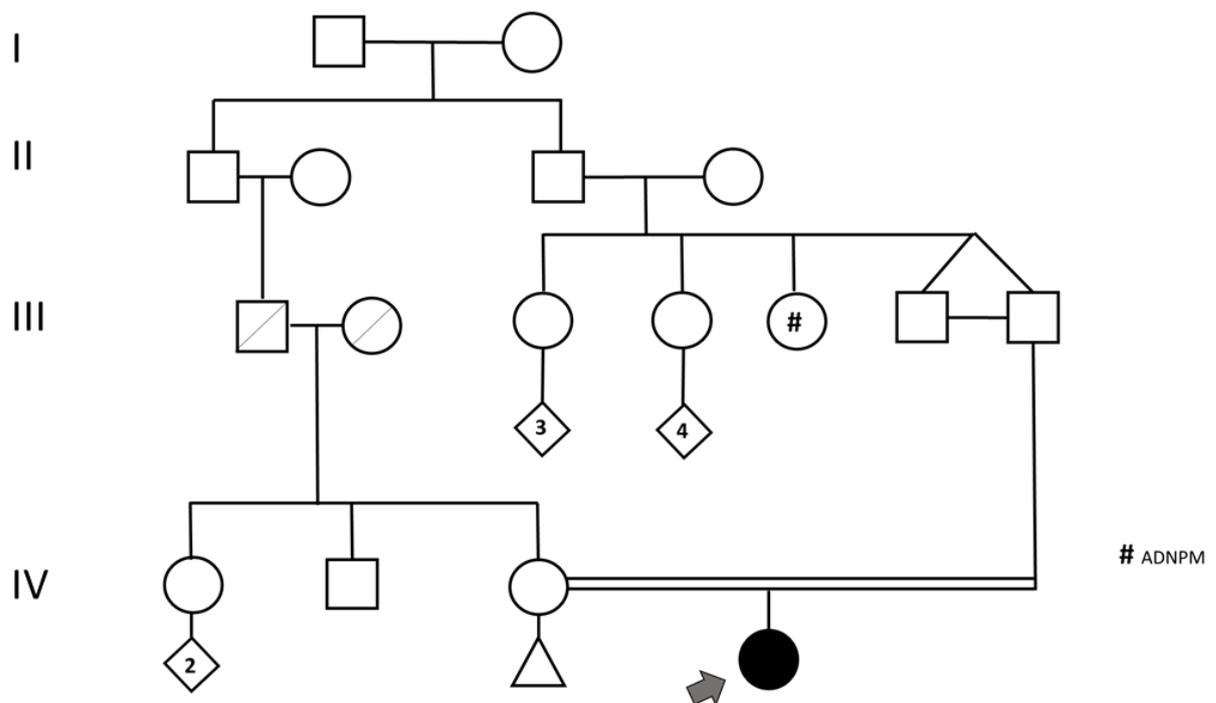


Figura 12: Gráficos gerados a partir dos dados provenientes da análise de segregação alélica por meio de Sequenciamento de Sanger, para o paciente ID01. As linhas verdes representam o nucleotídeo Adenina, as azuis representam Citosina, pretas representam Guanina e vermelhas representam Timina. O traço vertical (cor azul) localizado no centro dos gráficos indica a posição da variante. O paciente é portador da variante em heterozigose (A) e o alelo foi herdado da mãe (B), igualmente heterozigota. O pai, por sua vez, não possui a variante aqui apresentada e é homozigoto para o alelo selvagem (C).

✚ **ID02:** indivíduo do sexo feminino, 08 anos. Apresenta ROH múltiplas que somam 57,06 Mb no genoma autossômico, correspondendo a 1,88% deste. Os pais relatam ser primos em segundo grau (Figura 13). O quadro clínico é composto por: atraso do neurodesenvolvimento (HP:0012758); baixa estatura (HP:0004322); hipotonia (HP:0001290); occipital plano (HP:0005469); testa estreita (HP:0000341); implantação alta dos cabelos na frente (HP:0009890); orelhas rodadas posteriormente (HP:0000358); face achatada (HP:0012368); blefarofimose (HP:0000581); fissura palpebral oblíqua (HP:0000582); epicanto (HP:0031770); cílios longos (HP:0000527); filtro apagado (HP:0000319); lábios finos (HP:0000233); comissuras bucais desviadas para baixo (HP:0002714); retrognatia (HP:0000278) e pés planos (HP:0001763).

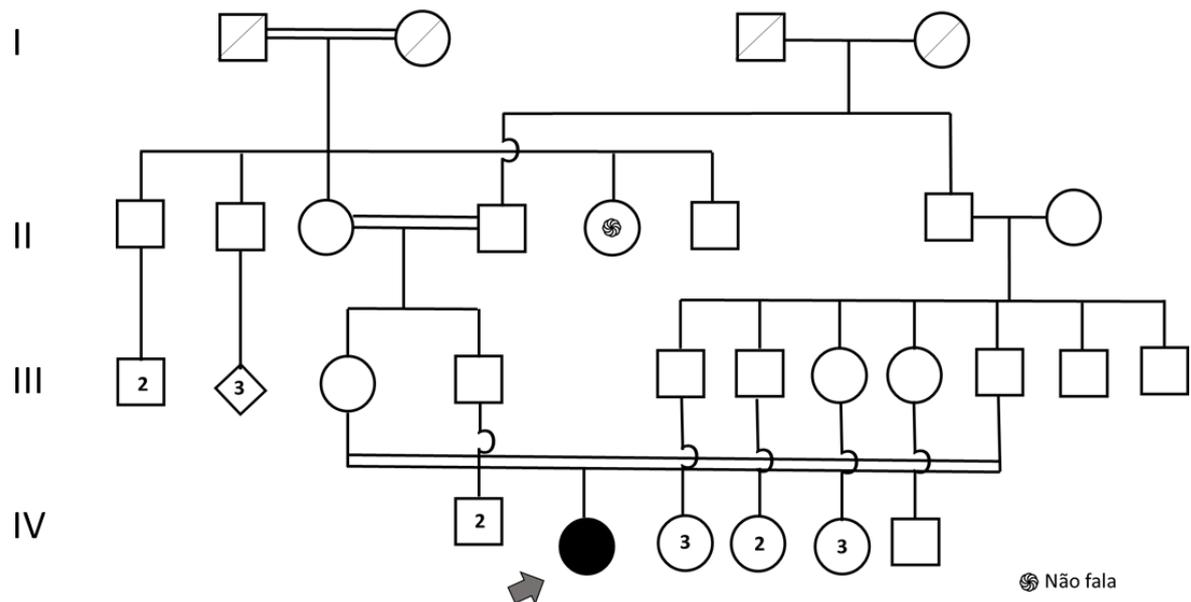


**Figura 13: Heredograma representativo da genealogia do indivíduo ID02.**

(Legenda: □ = indivíduo do sexo masculino; ○ = indivíduo do sexo feminino; △ = aborto espontâneo; ◇ = sexo não especificado; ■ = indivíduo afetado do sexo masculino; ● = indivíduo afetado do sexo feminino; linhas de união duplas indicam casamentos consanguíneos; a seta indica o caso índice).

O sequenciamento do exoma não detectou nenhuma variante passível de justificar o fenótipo desta paciente. Assim, a causa de sua condição permanece não esclarecida.

✚ **ID03:** indivíduo do sexo feminino, 08 anos. Apresenta ROH múltiplas que somam 168,13 Mb no genoma autossômico, correspondendo a 5,56% deste. Os pais relatam ser primos em primeiro grau (Figura 14). O quadro clínico é composto por: retardo do crescimento intrauterino (HP:0001511); atraso do neurodesenvolvimento (HP:0012758); retardo do crescimento pós-natal (HP:0008897); baixa estatura importante (HP:0003510); microcefalia (HP:0000252); migração neuronal anormal (HP:0002269); lisencefalia (HP:0001339); hiperparatireoidismo secundário (HP:0000867); doença renal crônica (HP:0012622); acidose tubular renal (HP:0001947); displasia esquelética (HP:0002652); deformidade de *Madelung* (HP:0003067); *Genu valgum* (HP:0002857). Além disso, o quadro evoluiu com fotofobia aos 06 anos, quando exames oftalmológicos detectaram cristais de cistina na córnea, e com a necessidade de hemodiálise devido ao dano glomerular renal acentuado.



**Figura 14: Heredograma representativo da genealogia do indivíduo ID03.** (Legenda: □ = indivíduo do sexo masculino; ○ = indivíduo do sexo feminino; △ = aborto espontâneo; ◇ = sexo não especificado; ■ = indivíduo afetado do sexo masculino; ● = indivíduo afetado do sexo feminino; linhas de união duplas indicam casamentos consanguíneos; a seta indica o caso índice).

O sequenciamento do exoma revelou três variantes em genes de condições recessivas na paciente, todas elas em homozigose, sendo duas compreendidas em ROH previamente detectadas por meio de CMA no genoma da mesma.

A primeira variante foi detectada em homozigose, contida em uma das ROHs detectadas na paciente via CMA, mais especificamente no gene *ASPM* (g.197074207G>A; NM\_018136.4:c.4174C>T), em seu éxon 18, que está localizado na região q31.3 do cromossomo 1 (197.053.258 – 197.115.824). A variante, do tipo *nonsense*, é responsável pela troca de uma Arginina por um códon de parada na posição 1392 do produto proteico, o que provoca a formação de uma proteína truncada, a qual não apresenta uma estrutura funcional. Outras variantes semelhantes já haviam sido descritas por diversos estudos no gene *ASPM* (71–77), entretanto, nenhuma delas na posição exata da variante detectada em nossa paciente. Esta foi classificada como patogênica (Classe 5).

Todas as variantes já descritas no gene supracitado estão correlacionadas à microcefalia primária recessiva (MCPH), um transtorno do neurodesenvolvimento que apresenta elevada heterogeneidade genética, estando associado a variantes em pelo menos 20 loci recessivos (78). Destas variantes, aquelas no loci MCHP5, que está localizado no cromossomo 1q31 e codifica o gene *ASPM*, demonstraram ser a causa mais prevalente de MCHP (OMIM # 608716) em famílias consanguíneas (76). Em geral, a MCPH está relacionada à microcefalia congênita com circunferência occipitofrontal igual ou abaixo de -2 DPs ao nascimento e abaixo de -3,5 DPs antes da idade de um ano, restrição de crescimento intrauterino leve com recuperação pós-natal, desenvolvimento motor normal ou subnormal, funcionamento intelectual que pode variar de normal a DI grave e problemas de comportamento (74). Além disso, é comum se observar volume cerebral reduzido, displasia/hipoplasia de corpo caloso, anomalias no padrão de migração, padrão giratório com índice de girificação reduzido (72,79,80).

Tendo em vista a compatibilidade do quadro clínico da paciente com os efeitos fenotípicos das variantes *nonsense* já descritas no gene *ASPM* (Tabela 6), considerando a confirmação da presença da variante na paciente e da detecção da mesma em heterozigose nos genitores, por meio de sequenciamento de Sanger (Figura 15), e levando em conta as recomendações do *American College of Medical*

*Genetics* – ACMG para a classificação de variantes de sequência, nossas análises confirmaram se tratar de uma variante patogênica. A troca de um aminoácido por um códon de parada é sabidamente prejudicial à função da proteína a ser sintetizada, especialmente neste caso, em que diversas outras variantes *nonsense* envolvendo o mesmo aminoácido já demonstraram ser comprovadamente prejudiciais ao seu funcionamento (75). Desta forma, apesar de ainda não ter sido descrita na posição em que foi encontrada em nossa paciente, a variante pode ser correlacionada ao fenótipo.



**Figura 15: Gráficos gerados a partir dos dados provenientes da análise de segregação alélica por meio de Sequenciamento de Sanger, para a paciente ID03. As linhas verdes representam o nucleotídeo Adenina, as azuis representam Citosina, pretas representam Guanina e vermelhas representam Timina. O traço vertical (cor azul) localizado no centro dos gráficos indica a posição da variante. A paciente é portadora da variante em homozigose (A) e os alelos foram herdados de ambos os genitores (B e C), os quais são heterozigotos para a variante.**

A segunda variante detectada na paciente, também em homozigose (g.3558567C>T;NM\_001031681.2:c.382C>T) e contida em uma das ROHs detectadas por CMA, consiste em uma substituição de um aminoácido por um códon de parada, desta vez envolvendo o aminoácido Glicina na posição 128, no éxon 7 do gene *CTNS*. Esta foi classificada como patogênica. O gene está localizado na região p13.2 do cromossomo 17 e sua principal função é a codificação de uma proteína de membrana responsável pelo transporte de cistina. O *Human Gene Mutation Database* (HGMD®) contém pelo menos 71 variantes patogênicas deste gene, incluindo a variante aqui descrita, que já foram relacionadas à chamada cistinose nefropática, causa hereditária mais comum da síndrome de Fanconi renal em crianças (81,82). Conforme relatado por Town et al. (1998), a variante detectada em nossa paciente é responsável pelo transporte lisossômico defeituoso de cistina, cujo achado patológico predominante é a presença de cristais de cistina em quase todas as células e tecidos, especialmente na córnea e nos rins, onde o acúmulo de cristais aumenta com a idade (83,84). Os primeiros sintomas da cistinose nefropática (OMIM #219800) incluem: desidratação, acidose, desequilíbrio eletrolítico, raquitismo hipofosfatêmico e consequente falta de crescimento, genu valgo, fotofobia e hipotireoidismo. O dano glomerular renal progride de forma implacável, levando as crianças com essa condição à diálise ou transplante, geralmente antes de completarem 12 anos (84–87). Assim como a variante do gene *ASPM*, esta variante é compatível com o fenótipo da paciente (Tabela 06), foi confirmada na paciente e detectada em heterozigose nos genitores por meio de sequenciamento de Sanger, como demonstra a Figura 16.



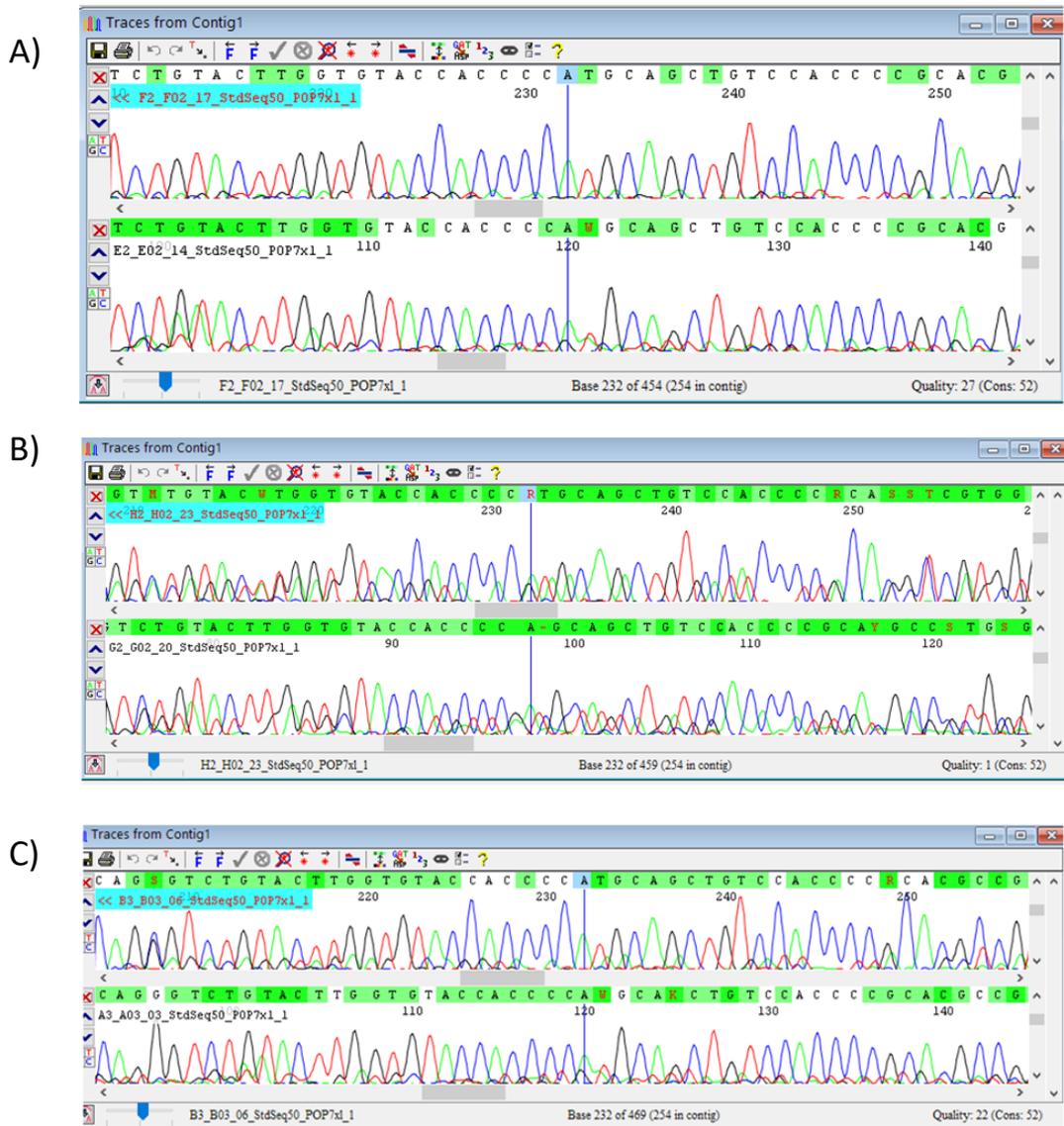
**Figura 16: Gráficos gerados a partir dos dados provenientes da análise de segregação alélica por meio de Sequenciamento de Sanger, para a paciente ID03. As linhas verdes representam o nucleotídeo Adenina, as azuis representam Citosina, pretas representam Guanina e vermelhas representam Timina. O traço vertical (cor azul) localizado no centro dos gráficos indica a posição da variante. A paciente é portadora da variante em homozigose (A) e os alelos foram herdados de ambos os genitores (B e C), os quais são heterozigotos para a variante.**

Por fim, a terceira variante detectada na paciente consiste em uma variante do tipo *missense*, localizada fora das ROHs detectadas pelo CMA, e que é responsável pela troca do aminoácido Valina por uma Metionina na posição 330, no éxon 9 do gene *DHCR7* (g.71146861C>T; NM\_001163817.1:c.988G>A). A variante, descrita pela primeira vez em 2002 (88), interfere em cinco transcritos no *DHCR7*, prejudicando a atividade da última enzima da via de biossíntese do colesterol, a 7-desidrocolesterol-A7-redutase. A incapacidade das células de sintetizar o colesterol com eficácia e, em vez disso, acumular 7-dehidrocolesterol e 8-dehidrocolesterol no plasma e nos tecidos, dá origem a um grande espectro de malformações. Nesse

sentido, vale destacar que, apesar da deficiência de colesterol ser sabidamente prejudicial em muitos aspectos, a maneira como a sua deficiência leva à uma malformação ainda não foi completamente elucidada (89–91).

Diversos estudos relatam a ocorrência de retardo de crescimento pré e pós-natal, deficiência intelectual, microcefalia, nariz com base larga, micrognatia, ptose, terceiro dedo curto, fenda palatina, sindactilia, malformações viscerais, anomalias estruturais variáveis do coração, dentre outros dismorfismos (92–95). Os mesmos aspectos clínicos, por sua vez, são tipicamente observados em pacientes com a Síndrome de *Smith-Lemli-Opitz* (OMIM # 270400), que foi a primeira síndrome metabólica relacionada a malformações descrita na literatura (88,93,95,96). Entretanto, o quadro clínico da paciente aqui descrita apresenta pouca compatibilidade com o quadro tipicamente observado da Síndrome de *Smith-Lemli-Opitz* (Tabela 06) e a dosagem sérica de 7-dehidrocolesterol e 8-dehidrocolesterol revelou níveis normais destas substâncias no plasma. A variante, por sua vez, foi confirmada pelo sequenciamento de Sanger e também foi encontrada em homozigose em sua mãe (Figura 17), que é fenotipicamente normal. A confirmação da presença da variante no pai da paciente foi realizada, mas não se encaixou nos parâmetros para a análise futuramente não foi possível confirmar se o mesmo apresenta essa variante em heterozigose.

A base de dados *ClinVar* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) classifica a variante aqui apresentada como de significado incerto, com base em mais de 390 submissões de seu acervo que detectaram a variante em pacientes com a Síndrome de *Smith Lemli-Opitz* mas não conseguiram estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo que permitisse a comprovação da patogenicidade da mesma (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000420113.6> - acesso em 5 de Fev. de 2021). Apesar disso, o *ClinVar* não apresenta nenhum estudo funcional que corrobore com a atual classificação da variante. Diante da pouca compatibilidade do fenótipo, do resultado das análises bioquímicas realizadas e da presença da variante em homozigose na mãe da paciente, que é fenotipicamente normal, acreditamos tratar-se de uma variante, de fato, de significado incerto.

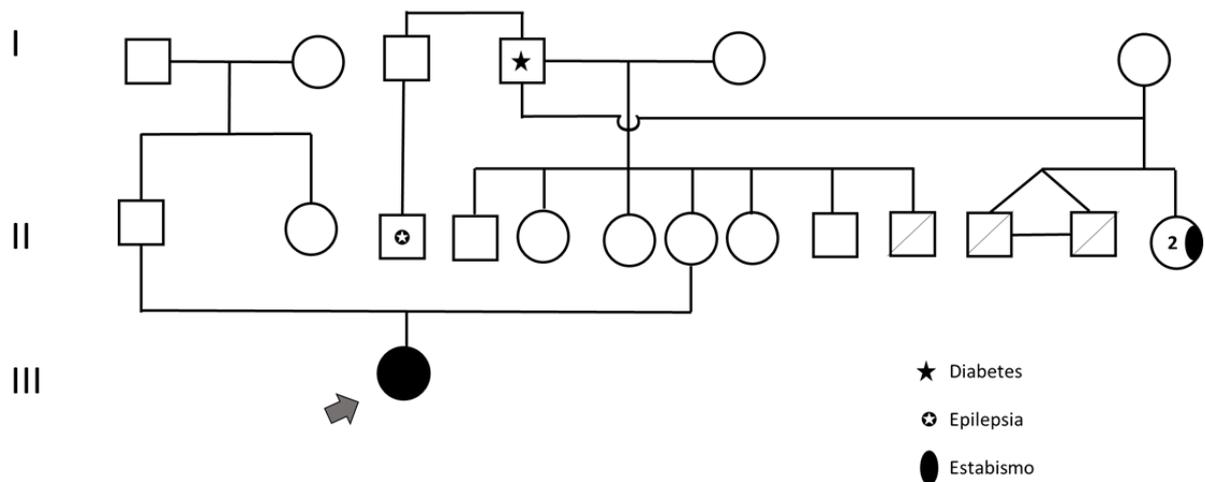


**Figura 17: Gráficos gerados a partir dos dados provenientes da análise de segregação alélica por meio de Sequenciamento de Sanger, para a paciente ID03. As linhas verdes representam o nucleotídeo Adenina, as azuis representam Citosina, pretas representam Guanina e vermelhas representam Timina. O traço vertical (cor azul) localizado no centro dos gráficos indica a posição da variante. A paciente é portadora da variante em homozigose (A), bem como sua mãe (C). O pai (B), que provavelmente é heterozigoto, deverá ter o sequenciamento refeito já que os gráficos gerados estão fora do parâmetro para análise.**

**Tabela 7: Correlação genótipo-fenótipo para o paciente ID03**

DADOS CLÍNICOS (HPO)	VARIANTE JUSTIFICARIA O FENÓTIPO?		
	<i>ASPM</i>	<i>DHCR7</i>	<i>CTNS</i>
ADNPM (HP:0012758)	SIM	SIM	SIM
RETARDO DO CRESCIMENTO INTRAUTERINO (HP:0001511)			SIM
RETARDO DO CRESCIMENTO PÓS-NATAL (HP:0008897)		SIM	SIM
BAIXA ESTATURA SEVERA (HP:0003510)		SIM	SIM
MICROCEFALIA (HP:0000252)	SIM		SIM
MIGRAÇÃO NEURONAL ANORMAL (HP:0002269)	SIM		
LISENCEFALIA (HP:0001339)	SIM		
HIPERPARATIROIDISMO SECUNDÁRIO (HP:0000867)			
DOENÇA RENAL CRÔNICA (HP:0012622)		SIM	SIM
DISPLASIA ESQUELÉTICA (HP:0002652)		SIM	SIM
DEFORMIDADE DE MADELUNG (HP:0003067)			SIM
GENU VALGUM (HP:0002857)			SIM

✚ **ID04:** indivíduo do sexo feminino, 21 anos. Apresenta ROH única no cromossomo 4 com extensão de 41,23 Mb (arr[GRCh37]4q27q32.2), correspondendo a 1,36% do genoma autossômico. Os pais não relatam consanguinidade (Figura 18). O quadro clínico é composto por: deficiência intelectual (HP:0001249); atraso do neurodesenvolvimento (HP:0012758); sinofre (HP:0000664); estrabismo (HP:0020045); ponte nasal baixa (HP:0005280); fenda palatina (HP:0000175); úvula bifida (HP:0000193); *Cubitus valgus* (HP:0002967); hirsurtismo (HP:0001007); diabetes mellitus tipo 2 (HP:0005978).

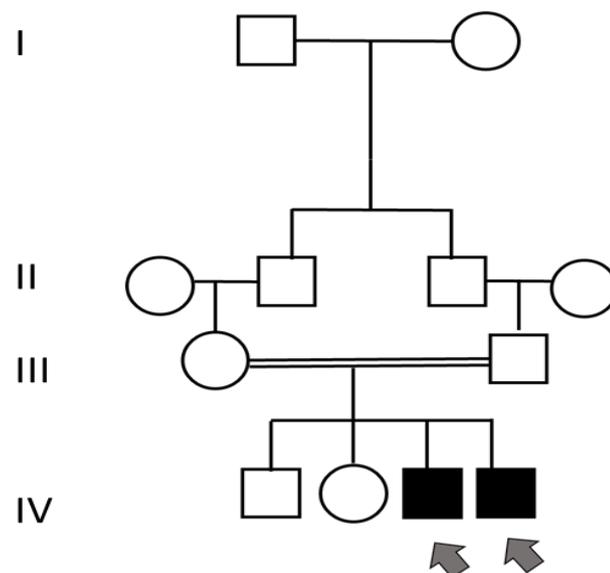


**Figura 18: Heredograma representativo da genealogia do indivíduo ID04.** (Legenda: □ = indivíduo do sexo masculino; ○ = indivíduo do sexo feminino; △ = aborto espontâneo; ◇ = sexo não especificado; ■ = indivíduo afetado do sexo masculino; ● = indivíduo afetado do sexo feminino; linhas de união duplas indicam casamentos consanguíneos; a seta indica o caso índice).

O sequenciamento do exoma não detectou nenhuma variante passível de justificar o fenótipo desta paciente. A base de dados *Geneimprint* (<https://www.geneimprint.com/> - acesso em 5 de Fev. de 2021) relata somente um gene que sabidamente sofre *imprinting* genômico no cromossomo 4 (*NAP1L5*), o qual está localizado em outra região do cromossomo e não está contido na ROH da paciente. Assim, a ocorrência de dissomia uniparental segmentar no cromossomo 4, quando não envolve a região do gene supracitado, somente trará consequências fenotípicas se houver variantes em homozigose em genes de doença recessiva.

A maioria dos estudos de UPD do cromossomo 4 encontrados na literatura relatam a ocorrência de dissomia uniparental materna, especialmente na forma segmentar. Dentre outras condições, a ocorrência de UPD 4 está associada à herança de variantes relacionadas à síndrome mielodisplásica (97), mucopolisacaridose tipo I (98), distrofia muscular de cintura escapular (99) e acidemia metilmalônica (100). Nenhuma variante em homozigose em genes de doença foi encontrada na região em homozigose do cromossomo 4 nessa paciente. Assim, sua condição permanece sem explicação de sua causa.

✚ **ID05 e ID06:** indivíduos do sexo masculino, irmãos, 26 e 38 anos. Apresentam ROH múltiplas que somam 293,98Mb (9,73%) e 212Mb (7,02%) no genoma autossômico, respectivamente. Os pais relatam ser primos em primeiro grau (Figura 19). O quadro clínico é composto por: retardo do crescimento intrauterino (HP:0001511); cisterna magna proeminente (HP:0002280); hipertelorismo (HP:0000316); eversão de pálpebras inferiores (HP:0007651); deformidade da órbita ocular (HP:0000315) com alargamento e lateralização do globo ocular; hiperplasia maxilar (HP:0430028); esclerose de mandíbula e maxila (HP:0011001); supercrescimento gengival (HP:0000212); displasia fibrosa nos ossos da face, causando deformidade (HP:0010734/HP:0001999); osteoma (HP:0100246) em seio esfenoidal; tremor constante nos membros (HP:0200085); ataxia (HP:0001251). Ambos os irmãos tinham desenvolvimento normal até aproximadamente cinco anos de idade, quando se iniciaram os sintomas. Atualmente deixaram de deambular e encontram-se acamados, ID09 está traqueostomizado e ID10 está em uso de respirador.

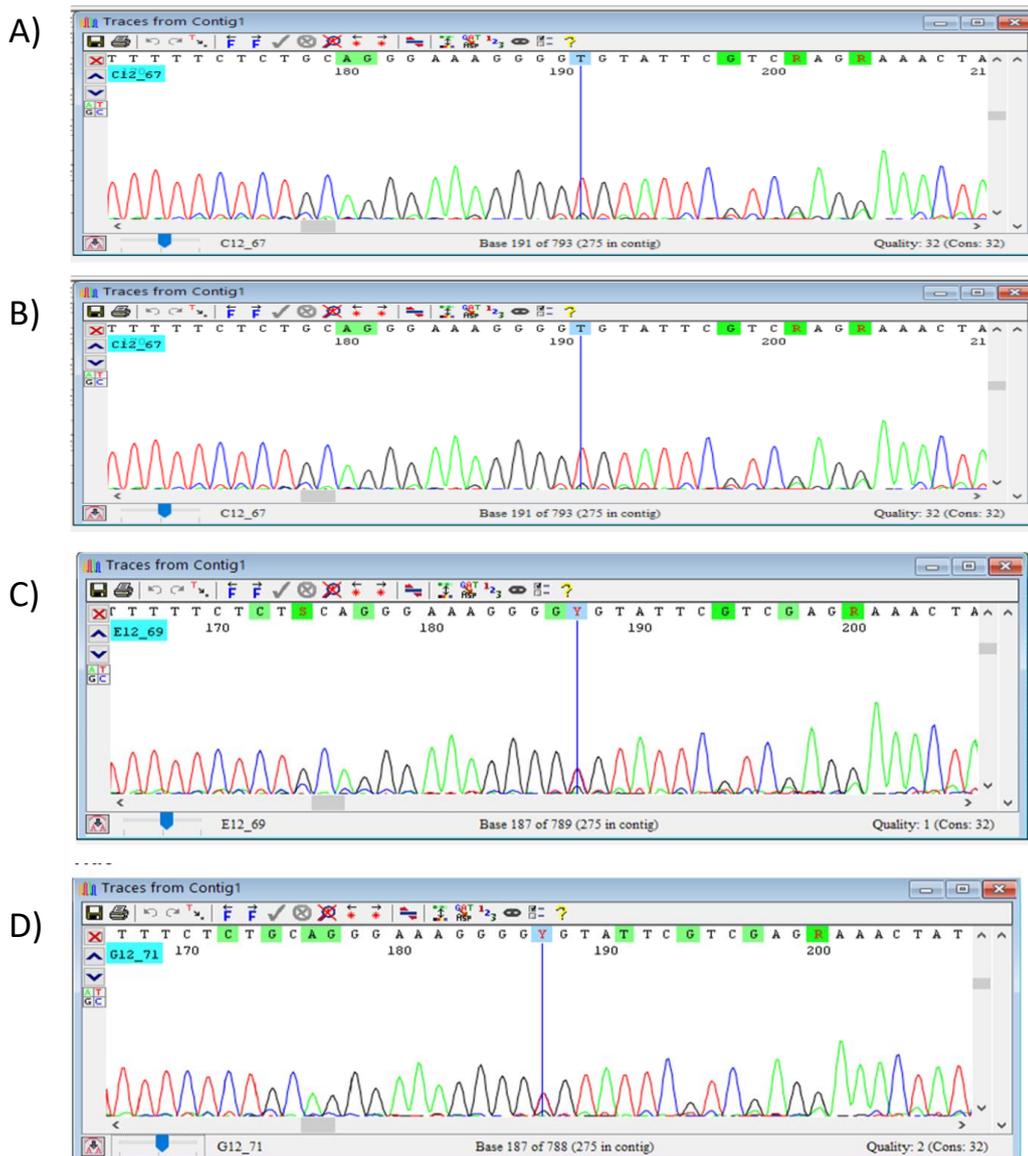


**Figura 19: Heredograma representativo da genealogia dos indivíduos ID05 e ID06.**

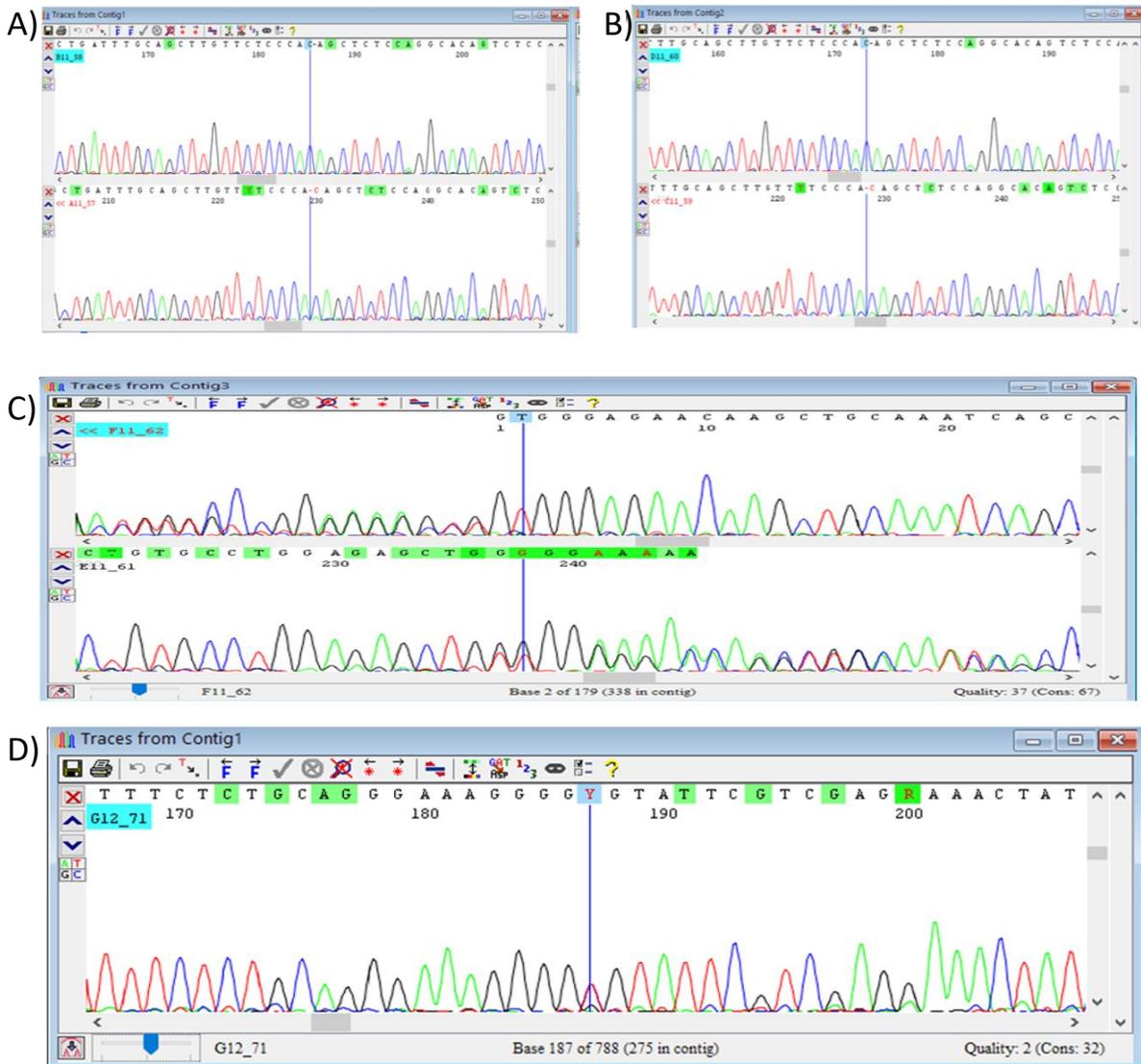
(Legenda: □ = indivíduo do sexo masculino; ○ = indivíduo do sexo feminino; △ = aborto espontâneo; ◇ = sexo não especificado; ■ = indivíduo afetado do sexo masculino; ● = indivíduo afetado do sexo feminino; linhas de união duplas indicam casamentos consanguíneos; a seta indica o caso índice).

O sequenciamento do exoma detectou as mesmas variantes em homozigose e em ambos os irmãos. A primeira delas (Figura 20), detectada no éxon 40 do gene *MYO9A*, localizado na região q23 do cromossomo 15, corresponde a uma variante do tipo *missense* que provoca a substituição do aminoácido Arginina por uma

Cistina, na posição 2283 do transcrito (g.72122643G>A; NM\_006901.3: c.6847C>T). A segunda variante (Figura 21) consiste na deleção de 1pb no éxon 3 do gene *TBC1D2B*, localizado na região q24.3q25.1, também no cromossomo 15. Essa deleção provoca uma mudança na matriz de leitura que se inicia no códon Val199 e termina com um códon de parada na posição 22 (Trpfs\*22). As duas variantes estão compreendidas em ROH detectadas previamente por CMA em ambos os pacientes.



**Figura 20 - Gráficos gerados a partir dos dados provenientes da análise de segregação alélica por meio de Sequenciamento de Sanger, para os pacientes ID05 (A) e ID06 (B). As linhas verdes representam o nucleotídeo Adenina, as azuis representam Citosina, pretas representam Guanina e vermelhas representam Timina. O traço vertical (cor azul) localizado no centro dos gráficos indica a posição da variante. Os irmãos são portadores da variante em homozigose (A e B) e seus pais são heterozigotos (C e D).**



**Figura 21 - Gráficos gerados a partir dos dados provenientes da análise de segregação alélica por meio de Sequenciamento de Sanger, para os pacientes ID05 (A) e ID06 (B). As linhas verdes representam o nucleotídeo Adenina, as azuis representam Citosina, pretas representam Guanina e vermelhas representam Timina. O traço vertical (cor azul) localizado no centro dos gráficos indica a posição da variante. Os irmãos são portadores da variante em homozigose (A e B) e seus pais são heterozigotos (C e D).**

A variante do gene *MYO9A* ainda não foi descrita na posição em que foi detectada em nossos pacientes e, segundo o banco de dados *HumVar* (<https://www.iitm.ac.in/bioinfo/huvarbase/index.php>), trata-se de uma variante classe 2, ou seja, provavelmente benigna (score 0.011). No entanto, uma variante envolvendo a troca do mesmo aminoácido (Arg2283) por uma Histidina foi descrita por O'Connor e colaboradores (2016) em pacientes portadores de síndrome

miastênica congênita. As síndromes miastênicas congênitas (do inglês, *Congenital myasthenic syndromes* - CMS) compreendem um grupo bastante heterogêneo de doenças raras caracterizadas pelo comprometimento da transmissão neuromuscular na placa motora, que pode resultar de diversos mecanismos genéticos e fisiopatológicos distintos, além de variar no padrão de herança e na junção neuromuscular (pré-sináptica, sináptica ou pós-sináptica) envolvida com a disfunção (101,102). O gene *MYO9A* codifica uma miosina dita não convencional, que faz parte do grupo de miosinas relacionado ao crescimento e à migração neuronal (103). A variante patogênica descrita por O'Connor e colaboradores, envolvendo o mesmo aminoácido aqui descrito, revelou prejudicar a produção da proteína, afetando o axônio motor pré-sináptico e provocando um quadro de CMS nos pacientes nos quais foi detectada. Considerando estes achados e o quadro clínico dos irmãos, anteriormente descrito, nossas análises classificaram a variante como de significado incerto (classe 3), já que não há evidências suficientes para confirmar uma possível patogenicidade para a mesma.

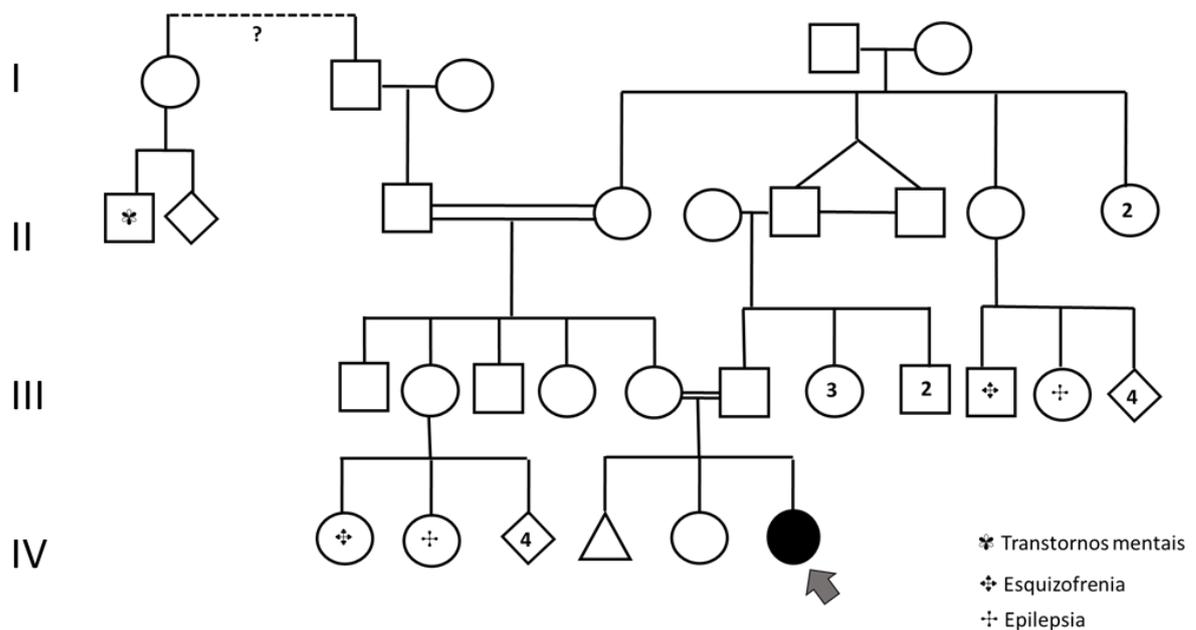
Em contrapartida, a deleção detectada no éxon 3 do gene *TBC1D2B*, demonstra ser uma variante que, além de compatível com o fenótipo, apresenta provável patogenicidade. Até o momento, somente um estudo foi publicado na literatura a respeito de variantes patogênicas nesse gene (104). Harms e colaboradores descreveram, em Janeiro de 2020, o caso de uma família com um irmão saudável e dois irmãos significativamente afetados, os quais apresentaram desenvolvimento normal até os cinco anos de idade, época em que os primeiros sintomas começaram a aparecer. Os referidos irmãos desenvolveram supercrescimento gengival, acompanhado de hipertrofia progressiva e dificuldades na fala. Com cerca de 15 anos, ambos desenvolveram tremores involuntários nos membros superiores, além de contratura em flexão nos dedos das mãos e dos pés, com perda visual e dismorfismos importantes na face que conferiam aparência querubínica (*cherubism like*). O quadro descrito por Harms e colaboradores se assemelha de forma expressiva ao quadro dos irmãos ID09 e ID10, desde a idade de manifestação do fenótipo até a evolução do quadro clínico, com supercrescimento gengival, contraturas, tremores e face com características de Querubismo.

A Tabela 07 traz a correlação genótipo-fenótipo entre as variantes detectadas por meio de WES nos irmãos e suas características clínicas comuns.

**Tabela 8: Correlação genótipo-fenótipo para os pacientes ID05 e ID06.**

DADOS CLÍNICOS (HPO)	VARIANTE JUSTIFICARIA O FENÓTIPO?	
	<i>MYO9A</i>	<i>TBC1D2B</i>
RETARDO DO CRESCIMENTO INTRAUTERINO (HP:0001511)		SIM
CISTERNA MAGNA PROEMINENTE (HP:0002280)		SIM
HIPERTELORISMO (HP:0000316)		SIM
EVERSÃO DE PÁLPEBRAS INFERIORES (HP:0007651)		SIM
DEFORMIDADE DA ÓRBITA OCULAR ( HP:0000315)		SIM
HIPERPLASIA MAXILAR (HP:0430028)		SIM
ESCLEROSE DE MANDÍBULA E MAXILA (HP:0011001)		SIM
SUPERCRESCEMENTO GENGIVAL (HP:0000212)		SIM
DISPLASIA FIBROSA NOS OSSOS DA FACE (HP:0010734)		SIM
DEFORMIDADE DA FACE (HP:0001999)		SIM
OSTEOMA (HP:0100246) EM SEIO ESFENOIDAL		SIM
TREMOR CONSTANTE NOS MEMBROS (HP:0200085)	SIM	SIM
ATAXIA (HP:0001251)	SIM	SIM

✚ **ID07:** indivíduo do sexo feminino, 13 anos. Apresenta ROH múltiplas que somam 304,8 Mb do genoma autossômico, correspondendo a 10,09% deste. Os pais relatam ser primos em segundo grau (Figura 20). O quadro clínico é composto por: atraso do neurodesenvolvimento (HP:0012758); epicanto (HP:0000286); nistagmo (HP:0000639); ponte nasal estreita (HP:0000446); orelhas de implantação baixa (HP:0000369); prega palmar transversal única em ambas as mãos (HP:0000954); falanges distais alargadas (HP:0100759); hipertricose (HP:0000998).



**Figura 22: Heredograma representativo da genealogia do indivíduo ID07.**

(Legenda: □ = indivíduo do sexo masculino; ○ = indivíduo do sexo feminino; △ = aborto espontâneo; ◇ = sexo não especificado; ■ = indivíduo afetado do sexo masculino; ● = indivíduo afetado do sexo feminino; linhas de união duplas indicam casamentos consanguíneos; a seta indica o caso índice).

O sequenciamento do exoma da paciente ID11 revelou uma variante em homozigose contida em uma de suas ROHs, do tipo *missense* no gene *INTS1*, localizado na região p22.3 do cromossomo 7, e que é responsável por codificar uma das subunidades do complexo integrador da rede transcricional de pequenas subunidades de RNA (chamados de *small RNAs*), que têm como função o processamento de pré-RNAs mensageiros no núcleo das células (105).

A variante (g.1520518C>T; NM\_001080453.2:c.3902G>A), detectada no éxon 29 do transcrito e responsável pela substituição de uma Glicina na posição 1301 por

um Aspartato, ainda não foi descrita na literatura envolvendo este mesmo aminoácido. No entanto, outras nove variantes semelhantes no mesmo gene já foram correlacionadas a um quadro raro de atraso do neurodesenvolvimento e anomalias craniofaciais (106,107). As variantes descritas por Krall e colaboradores em 2018 e por Zhang e colaboradores no ano seguinte, demonstraram ser a causa de um quadro clínico composto por ausência de fala ou fala severamente limitada, padrão de marcha anormal, hipotonia e catarata. Além disso, foram relatadas características tais como face dismórfica, deficiência intelectual, atraso no crescimento e hipertelorismo.

As características clínicas relacionadas às variantes já descritas do gene *INTS1* apresentam compatibilidade com o fenótipo da paciente ID07, aqui representada (Tabela 08). No entanto, a mesma difere daquelas já descritas na literatura. Assim, esta foi classificada como de significado incerto (classe 3), de acordo com os critérios propostos pelo *American College of Medical Genetics – ACMG*.

**Tabela 9: Correlação genótipo-fenótipo para a paciente ID07.**

<b>DADOS CLÍNICOS (HPO)</b>	<b>VARIANTE JUSTIFICA O FENÓTIPO?</b>
ADNPM (HP:0012758)	SIM
EPICANTO (HP:0000286)	SIM
NISTAGMUS (HP:0000639).	
PONTE NASAL ESTREITA (HP:0000446)	SIM
ORELHAS DE IMPLANTAÇÃO BAIXA (HP:0000369)	SIM
PREGA PALMAR TRANSVERSAL ÚNICA BILATERAL (HP:0000954)	
FALANGES DISTAIS ALARGADAS (HP:0100759)	
HIPERTRICOSE (HP:0000998)	

Dos 07 indivíduos incluídos para análise do exoma, quatro tiveram variantes em genes de condições recessivas detectados no exoma. Ainda, o exame detectou uma variante em um gene de caráter dominante em um quinto paciente. No total, sete

variantes foram detectadas pelo sequenciamento do exoma em cinco indivíduos, e cinco destas variantes apresentam compatibilidade com os fenótipos dos pacientes, total ou parcialmente. Destas últimas, três constituem variantes novas.

Diante dos resultados das análises complementares realizadas no presente estudo por meio do WES, reforçamos o que propuseram estudos recentes a respeito da utilização do sequenciamento do exoma como forma de aumentar o rendimento diagnóstico em condições complexas, tais como o ADNPM/DI e as malformações congênitas (24,52). Além disso, reforçamos a ideia de que a análise e a investigação de regiões de homozigose, em indivíduos com tais condições, podem contribuir para a conclusão diagnóstica em casos de fenótipo heterogêneo com causa não esclarecida.

## 6. CONCLUSÕES

- Encontrou-se uma proporção significativamente elevada de ROH em pacientes com ADNPM/DI e(ou) malformações congênicas múltiplas, quando em comparação com indivíduos saudáveis da população geral, o que reforça a importância da análise e do relato das regiões de homozigose em indivíduos encaminhados para CMA;
- O sequenciamento do exoma nos indivíduos com aumento de ROH no genoma autossômico revelou seis variantes de sequência em genes de doença com herança recessiva, em quatro dos sete indivíduos estudados. Entre essas, cinco variantes foram compatíveis com o fenótipo dos pacientes, total ou parcialmente, nos quatro casos. A caracterização dos casos com suspeita de dissomia uniparental não pode ser realizada, pois não obtivemos sucesso na reconvocação dos pacientes para coleta de DNA dos genitores.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Karam SM, Riegel M, Segal SL, Félix TM, Barros AJD, Santos IS, et al. Genetic causes of intellectual disability in a birth cohort: A population-based study. *Am J Med Genet Part A*. 2015;167(6):1204–14.
2. Ismail FY, Shapiro BK. What are neurodevelopmental disorders? *Curr Opin Neurol*. 2019;32(4):611–6.
3. Maulik PK, Mascarenhas MN, Mathers CD, Dua T, Saxena S. Prevalence of intellectual disability: A meta-analysis of population-based studies. *Res Dev Disabil*. 2011;32(2):419–36.
4. Harris JC. *Intellectual disability: Understanding its development, causes, classification, evaluation, and treatment*. New York, USA: Oxford University Press, USA; 2006. 42-98. p.
5. Shevell M, Ashwal S, Donley D, Flint J, Gingold M, Hirtz D, et al. Practice parameter: Evaluation of the child with global developmental delay: Report of the quality standards subcommittee of the American Academy of Neurology and The Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology*. 2003;
6. World Health Organisation. *ICD-10 guide for mental retardation*. *Ment Retard*. 2004;82.
7. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. *Características Gerais da População, Religião e Pessoas Com Deficiência*. Censo Demográfico 2010. 2010;1–215.
8. Marques-de-Faria. *Cartilha para educação continuada em genética médica*. 2017;
9. Melo DG, Pilotto RF, Rodrigues SA, De Avó LR da S, Germano CMR. Investigação etiológica nas situações de deficiência intelectual ou atraso global do desenvolvimento. *Saúde e Desenvolv Hum*. 2018;6(3):73.
10. Yanes T, Humphreys L, McInerney-Leo A, Biesecker B. Factors Associated with Parental Adaptation to Children with an Undiagnosed Medical Condition. *J Genet Couns*. 2017;26(4):829–40.
11. Topper S, Ober C, Das S. Exome sequencing and the genetics of intellectual disability. *Clin Genet*. 2011;80(2):117–26.
12. Verloes A, Héron D, Billette de Villemeur T, Afenjar A, Baumann C, Bahi-Buisson N, et al. Stratégie d'exploration d'une déficience intellectuelle inexplicquée. *Arch Pediatr*. 2012;19(2):194–207.
13. Makela NL, Birch PH, Friedman JM, Marra CA. Parental perceived value of a diagnosis for Intellectual Disability (ID): A qualitative comparison of families with and without a diagnosis for their child's ID. *Am J Med Genet Part A*. 2009;149(11):2393–402.
14. King, B. H., Toth, K. E., Hodapp, R. M., & Dykens EM. *Intellectual disability*. B.

- J. Sadock, V. A. Sadock & PR, organizador. Vol. 9th ed., Comprehensive textbook of psychiatry. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009. 3444–3474 p.
15. Christianson A, Howson CP, Modell B. March of Dimes releases premature birth report card: Kentucky receives “F”--KMA joins healthy babies coalition.” J Ky Med Assoc. 2008;106(12):557–8.
  16. Sarmah S, Muralidharan P, Marrs JA. Common congenital anomalies: Environmental causes and prevention with folic acid containing multivitamins. Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev. 2016;108(3):274–86.
  17. World Health Organisation. Birth defects: report by the Secretariat. 2009.
  18. Källén B. Epidemiology of human reproduction. 2th. CRC Press I, organizador. Boca Raton, FL; 1988.
  19. Jarvik GP, Amendola LM, Berg JS, Brothers K, Clayton EW, Chung W, et al. Return of genomic results to research participants: The floor, the ceiling, and the choices in between. Am J Hum Genet. 2014;
  20. Agopian AJ, Evans JA, Lupo PJ. Analytic Methods for Evaluating Patterns of Multiple Congenital Anomalies in Birth Defect Registries. Birth Defects Res. 2018;110(1):5–11.
  21. Calzolari E, Barisic I, Loane M, Morris J, Wellesley D, Dolk H, et al. Epidemiology of multiple congenital anomalies in Europe: A EUROCAT population-based registry study. Birth Defects Res Part A - Clin Mol Teratol. 2014;100(4):270–6.
  22. Garne E, Dolk H, Loane M, Wellesley D, Barisic I, Calzolari E, et al. Paper 5: Surveillance of multiple congenital anomalies: Implementation of a computer algorithm in European registers for classification of cases. Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology. 2011.
  23. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. Am J Hum Genet. 2010;86(5):749–64.
  24. Srivastava S, Love-Nichols JA, Dies KA, Ledbetter DH, Martin CL, Chung WK, et al. Meta-analysis and multidisciplinary consensus statement: exome sequencing is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with neurodevelopmental disorders. Genet Med. 2019;21(11):2413–21.
  25. Waggoner D, Wain KE, Dubuc AM, Conlin L, Hickey SE, Lamb AN, et al. Yield of additional genetic testing after chromosomal microarray for diagnosis of neurodevelopmental disability and congenital anomalies: a clinical practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genet Med. 2018;20(10):1105–13.
  26. Vermeesch JR, Brady PD, Sanlaville D, Kok K, Hastings RJ. Genome-wide arrays: Quality criteria and platforms to be used in routine diagnostics. Hum Mutat. 2012;33(6):906–15.

27. Gijsbers ACJ, Schoumans J, Ruivenkamp CAL. Interpretation of array comparative genome hybridization data: A major challenge. *Cytogenet Genome Res.* 2011;135(3–4):222–7.
28. Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, et al. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet.* 2004;41(4):241–8.
29. Wiszniewska J, Bi W, Shaw C, Stankiewicz P, Kang SHL, Pursley AN, et al. Combined array CGH plus SNP genome analyses in a single assay for optimized clinical testing. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(1):79–87.
30. Bruno DL, White SM, Ganesamoorthy D, Burgess T, Butler K, Corrie S, et al. Pathogenic aberrations revealed exclusively by single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping data in 5000 samples tested by molecular karyotyping. *J Med Genet.* 2011;48(12):831–9.
31. Papenhausen P, Schwartz S, Rishg H, Keitges E, Gadi I, Burnside RD, et al. UPD detection using homozygosity profiling with a SNP genotyping microarray. *Am J Med Genet Part A.* 2011;155(4):757–68.
32. Mason-Suares H, Kim W, Grimmitt L, Williams ES, Horner VL, Kunig D, et al. Density matters: Comparison of array platforms for detection of copy-number variation and copy-neutral abnormalities. *Genet Med.* 2013;15(9):706–12.
33. Haraksingh RR, Abyzov A, Urban AE. Comprehensive performance comparison of high-resolution array platforms for genome-wide Copy Number Variation (CNV) analysis in humans. *BMC Genomics.* 2017;18(1):1–14.
34. Nowakowska B. Clinical interpretation of copy number variants in the human genome. *J Appl Genet.* 2017;58(4):449–57.
35. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med.* 2011;13(7):680–5.
36. Silva M, de Leeuw N, Mann K, Schuring-Blom H, Morgan S, Giardino D, et al. European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. *Eur J Hum Genet.* 2019;27(1).
37. Wang JC, Ross L, Mahon LW, Owen R, Hemmat M, Wang BT, et al. Regions of homozygosity identified by oligonucleotide SNP arrays: Evaluating the incidence and clinical utility. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(5):663–71.
38. Chantot-Bastarud S, Stratmann S, Brioude F, Begemann M, Elbracht M, Graul-Neumann L, et al. Formation of upd(7)mat by trisomic rescue: SNP array typing provides new insights in chromosomal nondisjunction. *Mol Cytogenet.* 2017;10(1):1–7.
39. Alabdullatif MA, Al Dhaibani MA, Khassawneh MY, El-Hattab AW. Chromosomal microarray in a highly consanguineous population: diagnostic yield, utility of regions of homozygosity, and novel mutations. *Clin Genet.*

- 2017;91(4):616–22.
40. Sund KL, Zimmerman SL, Thomas C, Mitchell AL, Prada CE, Grote L, et al. Regions of homozygosity identified by SNP microarray analysis aid in the diagnosis of autosomal recessive disease and incidentally detect parental blood relationships. *Genet Med*. 2013;15(1):70–8.
  41. Chaves TF, Oliveira LF, Ocampos M, Barbato IT, De Luca GR, Barbato Filho JH, et al. Long contiguous stretches of homozygosity detected by chromosomal microarrays (CMA) in patients with neurodevelopmental disorders in the South of Brazil. *BMC Med Genomics*. 2019;12(1):1–13.
  42. Kearney HM, Kearney JB, Conlin LK. Diagnostic implications of excessive homozygosity detected by SNP-Based microarrays: Consanguinity, uniparental disomy, and recessive single-gene mutations. *Clin Lab Med*. 2011;31(4):595–613.
  43. Gibson J, Morton NE, Collins A. Extended tracts of homozygosity in outbred human populations. *Hum Mol Genet*. 2006;15(5):789–95.
  44. Kirin M, McQuillan R, Franklin CS, Campbell H, Mckeigue PM, Wilson JF. Genomic runs of homozygosity record population history and consanguinity. *PLoS One*. 2010;5(11):1–7.
  45. Sasaki K, Mishima H, Miura K, Yoshiura K ichiro. Uniparental disomy analysis in trios using genome-wide SNP array and whole-genome sequencing data imply segmental uniparental isodisomy in general populations. *Gene*. 2013;512(2):267–74.
  46. Nakka P, Pattillo Smith S, O'Donnell-Luria AH, McManus KF, Agee M, Auton A, et al. Characterization of Prevalence and Health Consequences of Uniparental Disomy in Four Million Individuals from the General Population. *Am J Hum Genet*. 2019;105(5):921–32.
  47. Liehr T. Cytogenetic contribution to uniparental disomy (UPD). *Mol Cytogenet*. 2010;3(1):1–7.
  48. Nakamura A, Muroya K, Ogata-Kawata H, Nakabayashi K, Matsubara K, Ogata T, et al. A case of paternal uniparental isodisomy for chromosome 7 associated with overgrowth. *J Med Genet*. 2018;55(8):567–70.
  49. Niida Y, Ozaki M, Shimizu M, Ueno K, Tanaka T. Classification of uniparental isodisomy patterns that cause autosomal recessive disorders: Proposed mechanisms of different proportions and parental origin in each pattern. *Cytogenet Genome Res*. 2018;154(3):137–46.
  50. Hehir-Kwa JY, Pfundt R, Veltman JA. Exome sequencing and whole genome sequencing for the detection of copy number variation. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015;15(8):1023–32.
  51. Kadalayil L, Rafiq S, Rose-Zerilli MJJ, Pengelly RJ, Parker H, Oscier D, et al. Exome sequence read depth methods for identifying copy number changes. *Brief Bioinform*. 2014;16(3):380–92.
  52. Prasad A, Sdano MA, Vanzo RJ, Mowery-Rushton PA, Serrano MA, Hensel

- CH, et al. Clinical utility of exome sequencing in individuals with large homozygous regions detected by chromosomal microarray analysis. *BMC Med Genet.* 2018;19(1):1–11.
53. Dixon-Salazar TJ, Silhavy JL, Udpa N, Schroth J, Bielas S, Schaffer AE, et al. Exome Sequencing Can Improve Diagnosis and Alter Patient Management. *Sci Transl Med.* 2012;4(138).
  54. De Leeuw N, Hehir-Kwa JY, Simons A, Geurts Van Kessel A, Smeets DF, Faas BHW, et al. SNP array analysis in constitutional and cancer genome diagnostics - Copy number variants, genotyping and quality control. *Cytogenet Genome Res.* 2011;135(3–4):212–21.
  55. Hehir-Kwa J, Pfundt R, Veltman J, de Leeuw N. Pathogenic or not? Assessing the clinical relevance of copy number variants. *Clin Genet.* 2013;84(5):415–21.
  56. Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. *Nature Reviews Genetics.* 2015.
  57. de Leeuw N, Dijkhuizen T, Hehir-Kwa JY, Carter NP, Feuk L, Firth H V., et al. Diagnostic interpretation of array data using public databases and internet sources. *Hum Mutat.* 2012;33(6):930–40.
  58. Spineli-Silva S, Bispo LM, Gil-da-Silva-Lopes VL, Vieira TP. Distal deletion at 22q11.2 as differential diagnosis in Craniofacial Microsomia: Case report and literature review. *Eur J Med Genet.* 2018;61(5):262–8.
  59. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012.
  60. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics.* 2016;107(1):1–8.
  61. CARVALHO RA DE. Avaliação do método de sequenciamento de nova geração no diagnóstico genético de neoplasia endócrina múltipla tipo 1. Avaliação do método Seq Nov geração no diagnóstico genético neoplasia endócrina múltipla tipo 1 Diss. 2016;87.
  62. Vissers LELM, Fano V, Martinelli D, Campos-Xavier B, Barbuti D, Cho TJ, et al. Whole-exome sequencing detects somatic mutations of IDH1 in metaphyseal chondromatosis with D-2-hydroxyglutaric aciduria (MC-HGA). *Am J Med Genet Part A.* 2011;
  63. De Ligt J, Willemsen MH, Van Bon BWM, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, et al. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med.* 2012;
  64. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, et al. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat.* 2016;37(6):564–9.
  65. White SJ, Cantsilieris S. Genotyping. *Methods and Protocols.* 2017;1492(February 2020):256.
  66. Wan L, Molloy SS, Thomas L, Liu G, Xiang Y, Rybak SL, et al. PACS-1 defines a novel gene family of cytosolic sorting proteins required for trans-Golgi

- network localization. *Cell*. 1998;94(2):205–16.
67. Schuurs-Hoeijmakers JHM, Oh EC, Vissers LELM, Swinkels MEM, Gilissen C, Willemsen MA, et al. Recurrent de novo mutations in PACS1 cause defective cranial-neural-crest migration and define a recognizable intellectual-disability syndrome. *Am J Hum Genet*. 2012;91(6):1122–7.
  68. Schuurs-Hoeijmakers JHM, Landsverk ML, Foulds N, Kukolich MK, Gavrilova RH, Greville-Heygate S, et al. Clinical delineation of the PACS1-related syndrome-Report on 19 patients. *Am J Med Genet Part A*. 2016;170(3):670–5.
  69. Gadzicki D, Döcker D, Schubach M, Menzel M, Schmorl B, Stellmer F, et al. Expanding the phenotype of a recurrent de novo variant in PACS1 causing intellectual disability. *Clin Genet*. 2015;88(3):300–2.
  70. Martinez-Monseny A, Bolasell M, Arjona C, Martorell L, Yubero D, Arsmtrong J, et al. Mutation of PACS1: The milder end of the spectrum. *Clin Dysmorphol*. 2018;27(4):148–50.
  71. Woods CG, Bond J, Enard W. Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH): A review of clinical, molecular, and evolutionary findings. *Am J Hum Genet*. 2005;76(5):717–28.
  72. Passemard S, Verloes A, Billette de Villemeur T, Boespflug-Tanguy O, Hernandez K, Laurent M, et al. Abnormal spindle-like microcephaly-associated (ASPM) mutations strongly disrupt neocortical structure but spare the hippocampus and long-term memory. *Cortex*. 2016;74:158–76.
  73. Hashmi JA, Al-Harbi KM, Ramzan K, Albalawi AM, Mehmood A, Samman MI, et al. A novel splice-site mutation in the ASPM gene underlies autosomal recessive primary microcephaly. *Ann Saudi Med*. 2016;36(6):391–6.
  74. Verloes A, Drunat S, Passemard S. ASPM Primary Microcephaly [Internet]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet] Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 2020 [citado 2 de abril de 2020]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555474/>
  75. Bond J, Scott S, Hampshire DJ, Springell K, Corry P, Abramowicz MJ, et al. Protein-Truncating Mutations in ASPM Cause Variable Reduction in Brain Size. *Am J Hum Genet*. 2003;73(5):1170–7.
  76. Roberts E, Hampshire DJ, Pattison L, Springell K, Jafri H, Corry P, et al. Autosomal recessive primary microcephaly: An analysis of locus heterogeneity and phenotypic variation. *J Med Genet*. 2002;39(10):718–21.
  77. Bond J, Roberts E, Mochida GH, Hampshire DJ, Scott S, Askham JM, et al. ASPM is a major determinant of cerebral cortical size. *Nat Genet*. 2002;32(2):316–20.
  78. Perez Y, Bar-Yaacov R, Kadir R, Wormser O, Shelef I, Birk OS, et al. Mutations in the microtubule-associated protein MAP11 (C7orf43) cause microcephaly in humans and zebrafish. *Brain*. 2019;142(3):574–85.
  79. Létard P, Drunat S, Vial Y, Duerinckx S, Ernault A, Amram D, et al. Autosomal recessive primary microcephaly due to ASPM mutations: An update. *Hum*

- Mutat. 2018;39(3):319–32.
80. Passemard S, Titomanlio L, Elmaleh M, Afenjar A, Alessandri JL, Andria G, et al. Expanding the clinical and neuroradiologic phenotype of primary microcephaly due to ASPM mutations. *Neurology*. 2009;73(12):962–9.
  81. Cherqui S, Courtoy PJ. The renal Fanconi syndrome in cystinosis: Pathogenic insights and therapeutic perspectives. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13(2):115–31.
  82. Elmonem MA, Veys KR, Soliman NA, Van Dyck M, Van Den Heuvel LP, Levtchenko E. Cystinosis: A review. *Orphanet J Rare Dis*. 2016;11(1):1–17.
  83. Town M, Jean G, Cherqui S, Attard M, Forestier L, Whitmore SA, et al. A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat Genet*. 1998;18(4):319–24.
  84. Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA. CYSTINOSIS - Review Article. *N Engl J Med*. 2002;347(Nº. 2):111–21.
  85. Gahl WA, Dalakas MC, Charnas L, Chen KTK, Pezeshkpour GH, Kuwabara T, et al. Myopathy and Cystine Storage in Muscles in a Patient with Nephropathic Cystinosis. *N Engl J Med*. 1988;319:1461–4.
  86. Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA. Cystinosis: a disorder of lysosomal membrane transport. In: David L. Valle, Stylianos Antonarakis, Andrea Ballabio, Arthur L. Beaudet GAM, organizador. *Online - The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed OMMBID; 2001.
  87. Tsilou ET, Rubin BI, Reed G, Caruso RC, Iwata F, Balog J, et al. Nephropathic Cystinosis. Posterior Segment Manifestations and Effects of Cysteamine Therapy. *Ophthalmology*. 2006;113(6):1002–9.
  88. Patrono C, Dionisi-Vici C, Giannotti A, Bembi B, Digilio MC, Rizzo C, et al. Two novel mutations of the human  $\Delta 7$ -sterol reductase (DHCR7) gene in children with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Mol Cell Probes*. 2002;16(4):315–8.
  89. Ohashi K, Osuga JI, Tozawa R, Kitamine T, Yagyu H, Sekiya M, et al. Early Embryonic Lethality Caused by Targeted Disruption of the 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase Gene. *J Biol Chem*. 2003;278(44):42936–41.
  90. Tozawa RI, Ishibashi S, Osuga JI, Yagyu H, Oka T, Chen Z, et al. Embryonic lethality and defective neural tube closure in mice lacking squalene synthase. *J Biol Chem*. 1999;274(43):30843–8.
  91. Yu H, Patel SB. Recent insights into the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Clin Genet*. 2005;68(5):383–91.
  92. Peng Y, Myers R, Zhang W, Alexov E. Computational investigation of the missense mutations in DHCR7 gene associated with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Int J Mol Sci*. 2018;19(1).
  93. Smith DW, Lemli L, Opitz JM. A newly recognized syndrome of multiple congenital anomalies. *J Pediatr*. 1964;64(2):210–7.
  94. Waterham HR, Hennekam RCM. Mutational spectrum of Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet*. 2012;160 C(4):263–84.

95. Witsch-Baumgartner M, Fitzky BU, Ogorelkova M, Kraft HG, Moebius FF, Glossmann H, et al. Mutational spectrum in the  $\Delta 7$ -sterol reductase gene and genotype- phenotype correlation in 84 patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Hum Genet.* 2000;66(2):402–12.
96. Porter JA, Young KE, Beachy PA. Proteins in Animal Development. *Science* (80- ). 1996;274(October):255–9.
97. Mohamedali AM, Smith AE, Gaken J, Lea NC, Mian SA, Westwood NB, et al. Novel TET2 mutations associated with UPD4q24 in myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol.* 2009;27(24):4002–6.
98. Katja K, Inga V, Ramona L, Almuth C, Maria MN. Mucopolysaccharidosis type I due to maternal uniparental disomy of chromosome 4 with partial isodisomy of 4p16.3p15.2. *Mol Genet Metab Reports.* 2020;25(October):100660.
99. Cottrell CE, Mendell J, Hart-Kothari M, Ell D, Thrush DL, Astbury C, et al. Maternal uniparental disomy of chromosome 4 in a patient with limb-girdle muscular dystrophy 2E confirmed by SNP array technology. *Clin Genet.* 2012;81(6):578–83.
100. Chen M, Hao H, Xiong H, Cai Y, Ma F, Shi C, et al. Segmental uniparental disomy of chromosome 4 in a patient with methylmalonic acidemia. *Mol Genet Genomic Med.* 2020;8(1):1–7.
101. de Souza PVS, Batistella GN de R, Lino VC, Pinto WBV de R, Annes M, Oliveira ASB. Bases clínicas e genéticas das síndromes miastênicas congênitas. *Arq Neuropsiquiatr.* 2016;74(9):750–60.
102. Engel AG, Shen XM, Selcen D, Sine SM. Congenital myasthenic syndromes: Pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Lancet Neurol.* 2015;14(4):420–34.
103. O'Connor E, Töpf A, Müller JS, Cox D, Evangelista T, Colomer J, et al. Identification of mutations in the MYO9A gene in patients with congenital myasthenic syndrome. *Brain.* 2016;139(8):2143–53.
104. Harms FL, Parthasarathy P, Zorndt D, Alawi M, Fuchs S, Halliday BJ, et al. Biallelic loss-of-function variants in TBC1D2B cause a neurodevelopmental disorder with seizures and gingival overgrowth. *Hum Mutat.* 2020;41(9):1645–61.
105. Baillat D, Hakimi MA, Näär AM, Shilatifard A, Cooch N, Shiekhattar R. Integrator, a multiprotein mediator of small nuclear RNA processing, associates with the C-terminal repeat of RNA polymerase II. *Cell.* 2005;123(2):265–76.
106. Krall M, Htun S, Schnur RE, Brooks AS, Baker L, de Alba Campomanes A, et al. Biallelic sequence variants in INTS1 in patients with developmental delays, cataracts, and craniofacial anomalies. *Eur J Hum Genet.* 2019;27(4):582–93.
107. Zhang X, Wang Y, Yang F, Tang J, Xu X, Yang L, et al. Biallelic INTS1 Mutations Cause a Rare Neurodevelopmental Disorder in Two Chinese Siblings. *J Mol Neurosci.* 2020;70(1).

## 8. ANEXOS

### 8.1 Aprovação do Comitê de Ética

<b>ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA</b>	
 MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP <b>PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS</b>	
<p><b>Projeto de Pesquisa:</b> Análise do exoma em indivíduos com deficiência intelectual e (ou) anomalias congênitas múltiplas com regiões de homozigose no genoma detectadas pela análise cromossômica por microarray</p>	
<b>Informações Preliminares</b>	
<b>Responsável Principal</b>	
CPF/Documento: 059.035.596-11	Nome: Társis Antonio Paiva Vieira
Telefone: 1935218903	E-mail: tarsisvieira@gmail.com
<b>Instituição Proponente</b>	
CNPJ:	Nome da Instituição: Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP
É um estudo internacional? Não	
<b>Assistentes</b>	
CPF/Documento	Nome
268.771.318-00	Ilária Cristina Sgardoli
<b>Equipe de Pesquisa</b>	
CPF/Documento	Nome
268.771.318-00	Ilária Cristina Sgardoli
123.729.176-33	GABRIELA ROLDAO CORREIA COSTA
158.182.528-50	Vera Lúcia Gil da Silva Lopes
<b>Área de Estudo</b>	
<b>Área Temática Especial</b>	
Genética Humana: (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;)	
<b>Grandes Áreas do Conhecimento (CNPq)</b>	
● Grande Área 2. Ciências Biológicas	
<b>Título Público da Pesquisa:</b> Análise do exoma em indivíduos com deficiência intelectual e (ou) anomalias congênitas múltiplas com regiões de homozigose no genoma detectadas pela análise cromossômica por microarray	
<b>Desenho de Estudo / Apoio Financeiro</b>	
<b>Desenho:</b>	
<p>Serão selecionados 10 indivíduos com deficiência intelectual e (ou) anomalias congênitas múltiplas, que foram investigados previamente pela técnica de análise cromossômica por microarray (CMA), nos quais não foram encontrados desequilíbrios genômicos patogênicos, mas foram encontradas regiões de homozigose em mais de um 1% do genoma autossômico. Serão incluídos tanto casos com regiões de homozigose em múltiplas regiões do genoma, como em um único cromossomo. Será realizado o sequenciamento do exoma, e serão investigadas mutações patogênicas em homozigose, relacionadas a condições recessivas, em genes localizados dentro das regiões de homozigose previamente identificadas por CMA. Também serão investigadas mutações relacionadas a deficiência intelectual e síndromes de anomalias congênitas múltiplas em genes de outras regiões genômicas. O sequenciamento do exoma será realizado por empresa terceirizada, no exterior, pois é a opção com menor custo. As análises de bioinformática serão realizadas pelo grupo de bioinformática da Divisão de Diagnósticos Genômicos do Departamento de Genética Humana do Radboud University Medical Center, de Nijmegen na Holanda. A análise e interpretação das variantes encontradas, assim como a confirmação dessas, serão realizadas pela aluna de mestrado envolvida no projeto, no Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica do Departamento de Genética Médica da FCM - UNICAMP.</p>	

**Apoio Financeiro**

CNPJ	Nome	E-mail	Telefone	Tipo
43.828.151/0002-26	FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO		1138384047	Institucional Principal

**Palavra Chave**

Palavra-chave
regiões de homozigose
identidade por descendência
análise cromossômica por micorarray
dissomia uniparental
exoma
herança recessiva

**Detalhamento do Estudo****Resumo:**

O sequenciamento do genoma humano trouxe novas tecnologias para auxiliar o diagnóstico de condições genéticas diversas. Tornou-se possível, então, diagnosticar condições complexas as quais não apresentam causa evidente já relatada. Dentre elas, destacam-se o atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (ADNMP), a deficiência intelectual (DI) e as malformações congênitas. A cariotipagem com bandamento G, que por muitos anos foi utilizada como o primeiro teste para o diagnóstico de tais condições, tem sido substituída por novas técnicas, como a Análise Cromossômica por Microarray (Chromosomal Microarray Analysis – CMA) que avalia o número de cópias em todo o genoma por meio dos microarrays. Além disso, as plataformas de CMA que incluem oligonucleotídeos com polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) permitem a detecção tanto de variações no número de cópias, quanto de regiões de perda de heterozigose (Loss Of Heterozygosity – LOH) com um aumento significativo na sensibilidade das análises. As regiões de LOH ocorrem no genoma em decorrência de dois eventos principais: a identidade por descendência, principalmente quando há consanguinidade parental; e a dissomia uniparental. Porém, as regiões de LOH muitas vezes não envolvem sequências de imprinting do DNA, o que impossibilita o estabelecimento de relação direta com o fenótipo do paciente. Assim, o objetivo deste projeto é investigar a etiologia em indivíduos com deficiência intelectual e (ou) anomalias congênitas múltiplas, nos quais foram identificadas regiões de LOH no genoma pela análise cromossômica por microarray. Serão selecionados 10 indivíduos para o sequenciamento do exoma.

**Introdução:**

Com a finalização do sequenciamento do genoma humano no início dos anos 2000, tecnologias promissoras foram desenvolvidas visando auxiliar o diagnóstico de diversas doenças relacionadas às variações no número de cópias ou mutações pontuais no genoma, além de viabilizar o estabelecimento da relação genótipo-fenótipo em algumas condições complexas sem causa evidente. Em relação às condições consideradas complexas, as quais não apresentam causa evidente já relatada, podemos citar ao menos três com alta prevalência na população em geral: (1) o atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (ADNMP); (2) a deficiência intelectual (DI) e (3) as malformações congênitas. Estima-se que cerca de 310% das crianças nascidas vivas apresentem algum tipo de atraso no desenvolvimento, associado ou não à deficiência intelectual. Na população em geral, o índice é de 2-3% para tais condições. As malformações congênitas, por sua vez, são a causa de cerca de 20% dos abortos espontâneos no mundo todo, e apresentam incidência de 3-5% nos recém-nascidos em geral. De todos os casos de malformações congênitas registrados, apenas 40% são relacionados a alguma síndrome conhecida, permanecendo 60% deles com etiologia desconhecida (Jones, 2004; Castro et al, 2006; Miller et al, 2010; Karam et al, 2015; Szczauba et al, 2016). Por várias décadas, a cariotipagem com bandamento G foi considerada o padrão ouro para o diagnóstico de indivíduos com ADNMP/ DI e (ou) anomalias congênitas. Com a melhora significativa na resolução da técnica, tornou-se possível detectar pequenos desequilíbrios cromossômicos, aumentando a qualidade e o rendimento dos diagnósticos. Entretanto, apesar de ainda hoje apresentar sua importância diagnóstica, a cariotipagem apresenta uma série de limitações, dentre as quais podemos citar: (1) a dificuldade em obter qualidade nas resoluções, visto que isto depende da qualidade dos padrões de bandas gerados após a coloração do material; (2) a necessidade de realizar cultura de células da amostra, aumentando o tempo e o risco de contaminação por outras linhagens celulares; e (3) a necessidade de elevada habilidade técnica para a realização e a análise do cariótipo (Vermeesch et al, 2012). Com o desenvolvimento de técnicas inovadoras advindas do sequenciamento genômico, muitas das limitações até então existentes na análise de cariótipo puderam ser superadas, dando destaque à técnica de Análise Cromossômica por Microarray (do inglês, Chromosomal Microarray Analysis – CMA), que permitiu a detecção de desequilíbrios genômicos muito menores e menor tempo para se emitir um laudo diagnóstico. Dessa forma, a adoção de novas técnicas possibilitou um aumento significativo no rendimento diagnóstico para pacientes com condições complexas, como ADNMP/ DI e (ou) malformações congênitas (Miller et al, 2010; Vermeesch et al, 2012). A CMA engloba todos os tipos de análises que avaliam o número de cópias de cromossomos por meio dos microarrays, ou chips de DNA. Dentre eles, temos a hibridização genômica comparativa em array (em inglês, –array-CGH

- array Comparative Genomic Hybridization) e a detecção de polimorfismo de nucleotídeo único em array (em inglês, SNP-array - Single Nucleotide Polymorphism array). O array-CGH apresenta sensibilidade suficiente para detectar desequilíbrios genômicos a partir de um kilobase (Kb),

abrangendo todo o genoma, com algumas variações de resolução e cobertura, de acordo com o “desenho” do chip utilizado (Shaw-Smith et al, 2004; Miller et al, 2010). Os SNP-arrays, por sua vez, além de permitirem a detecção de desequilíbrios genômicos, são capazes também de detectar regiões de perda de heterozigose (do inglês, Loss Of Heterozygosity – LOH) ao longo do genoma, devido à presença de sondas com polimorfismos de nucleotídeos únicos (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs). Atualmente, a maioria dos chips de CMA utilizados para a investigação diagnóstica em indivíduos com ADNMP/ DI e (ou) anomalias congênitas, possuem sondas com SNPs. Diferentes estudos já demonstram a aplicação desses chips com o

objetivo de fornecer testes abrangentes tanto para variações no número de cópias, quanto para regiões de LOH (Bruno et al, 2011; Papenhausen et al, 2011; Wiszniewska et al, 2013). A CMA provou ser uma tecnologia poderosa para a avaliação de pacientes acometidos por condições complexas como as descritas acima, visto que tais técnicas permitem a análise de milhares de regiões gênicas simultaneamente, aumentando de forma considerável o número de diagnósticos para esse grupo de indivíduos (Guindalini C & Tufik S, 2007; Miller et al, 2010; Wiszniewska et al, 2013). Não por acaso, a análise de variações do número de cópias via CMA tornou-se um procedimento padrão nestes casos. Desde 2010 há um consenso de que este deve ser o primeiro teste diagnóstico em indivíduos com ADNPM/ DI, transtorno do espectro autista ou anomalias congênitas múltiplas (Miller et al, 2010). As variações no número de cópias (do inglês, Copy Number Variation - CNV) consistem em deleções ou duplicações de sequências genômicas iguais ou maiores a 50 pares de bases, as quais constituem um importante contribuinte para a diversidade genética humana. Trata-se de variações capazes de modular e direcionar a expressão gênica, tanto em condições normais quanto em condições patogênicas (Itsara et al, 2009; Weischenfeldt et al, 2013). Atualmente, as CNVs são classificadas em cinco categorias: (1) patogênicas ou clinicamente relevantes; (2) provavelmente patogênicas, clinicamente relevantes, porém sua relação direta com o fenótipo apresentado ainda não é comprovada; (3) de significado clínico incerto; (4) provavelmente benignas; ou (5) benignas, quando estão presentes em mais de 1% da população. Dentre essas, as variações que representam um dos maiores desafios para os geneticistas são aquelas mais raras, classificadas como de significado clínico incerto (do inglês, Variant Of Uncertain Clinical Significance – VOUS), e que ainda não foram relatadas na população ou em indivíduos com fenótipo semelhante, ou, se relatadas, não apresentaram evidências capazes de correlacioná-las ao quadro clínico, tornando sua classificação complexa e imprecisa (Vermeesch et al, 2012; Nowakowska, 2017). Uma das alternativas mais modernas no que diz respeito ao diagnóstico de condições genéticas consiste na análise do exoma, que corresponde à porção codificadora de genes do DNA. Cada vez mais, utilizase tal recurso como meio para identificar variantes genéticas raras ou comuns, tais como as variações pequenas de nucleotídeos (do inglês, –Small Nucleotide Variants – SNVs), e pequenas inserções ou deleções ( 50 pares de base), que são os principais alvos destes estudos. Contudo, há um crescente interesse em utilizar o exoma para investigar variações do número de cópias no genoma, além do diagnóstico de condições heterogêneas consideradas complexas, para as quais não se identifica, por meio dos métodos convencionais, variantes que justifiquem o fenótipo (Kadalayil et al, 2014; Hehir-Kwa, Pfundt & Veltman, 2015). Uma das situações em que é possível utilizar a análise do exoma para elucidar a origem genética de determinada condição, é aquela em que são detectadas, através de SNP-arrays, regiões de perda de heterozigose (do inglês, Loss Of Heterozygosity – LOH) que não envolvem regiões de imprinting no DNA e, portanto, não tem correlação direta com o fenótipo do paciente. De maneira geral, as LOHs podem ocorrer devido a dois processos principais: (1) identidade por descendência, principalmente devido à consanguinidade parental; e (2) dissomia uniparental (do inglês, Uniparental Dissomy – UPD) (Wang et al, 2014; Chantot-Bastaraud et al, 2017; Alabdullatif et al, 2017). Sasaki e colaboradores (2013) sugeriram, em um estudo envolvendo 519 indivíduos de seis populações aleatórias distintas, uma estimativa de, em média, um caso de dissomia uniparental para cada 173 nascimentos (~0.6%). Tal condição pode ocorrer a partir de erros somáticos, erros em resgates monossômicos e, mais frequentemente, devido à uma não-disjunção seguida de um resgate trissômico. Estima-se que 1/3 dos resgates trissômicos resulte em dissomia uniparental, dando origem a regiões de perda de heterozigose que podem envolver cromossomos inteiros ou segmentos cromossômicos. Um indicativo clássico de ocorrência de UDP é a detecção de múltiplas LOHs ou regiões de LOH muito extensas em um único cromossomo. Em contrapartida, quando são detectadas múltiplas regiões de LOH, distribuídas em diferentes cromossomos, há indicativo de consanguinidade parental. Já as LOHs menores que cinco megabases (<5Mb) detectadas em indivíduos de uma população exogâmica, indicam homozigose ancestral. Sabe-se que o efeito da ocorrência de tais regiões aumenta as chances de mutações raras se apresentarem em homozigose (Sasaki et al, 2013; Wang et al, 2014; Chantot-Bastaraud et al, 2017; Alabdullatif et al, 2017). Como já citado anteriormente, a Análise Cromossômica por Microarray é frequentemente realizada em indivíduos com condições complexas, na expectativa de detectar algum desequilíbrio genômico que justifique o fenótipo. Entretanto, em muitos dos casos, não é detectado nenhum desequilíbrio genômico que se relacione ao fenótipo, mas o CMA detecta a presença de regiões de LOH no DNA destes pacientes. Quando tais regiões não envolvem genes de imprinting ou genes candidatos para o quadro clínico dos mesmos, o exoma surge como uma alternativa que nos possibilita detectar a presença ou não de variantes nos genes que estão dentro dessas LOHs e, assim, poder estabelecer uma correlação entre a presença da variante com o quadro clínico, possibilitando a conclusão diagnóstica.

#### **Hipótese:**

Há mutação em homozigose, relacionadas ao fenótipo dos indivíduos, em genes de herança recessiva localizados dentro das regiões de homozigose identificadas previamente.

#### **Objetivo Primário:**

Investigar a etiologia em indivíduos com deficiência intelectual e (ou) anomalias congênitas múltiplas nos quais foram identificadas regiões de homozigose no genoma pela análise cromossômica por microarray.

#### **Objetivo Secundário:**

- Identificar mutações em genes com herança recessiva em indivíduos com regiões de homozigose em múltiplos cromossomos, através do sequenciamento do exoma;
- Caracterizar a dissomia uniparental em indivíduos com regiões de homozigose em um único cromossomo;
- Realizar correlação genótipo-fenótipo em casos com dissomia uniparental de cromossomos com regiões de imprinting parental;
- Identificar mutações em genes com herança recessiva em indivíduos com regiões de homozigose em um único cromossomo sem regiões de imprinting parental, através do sequenciamento do exoma

#### **Metodologia Proposta:**

a) Sequenciamento do exoma Serão selecionados 10 indivíduos para o sequenciamento do exoma, com regiões de homozigose detectadas previamente pela CMA. O exoma será realizado por empresa terceirizada, no exterior, pois é a opção com menor custo, permitindo a inclusão de um número maior de casos. Será utilizado o kit Agilent SureSelect Human All Exon V5 (Agilent Technologies®). As análises de bioinformática, que irão gerar o arquivo VCF (Variant Call Format) serão realizadas pelo grupo de bioinformática da Divisão de Diagnósticos Genômicos do Departamento de Genética Humana do Radboud University Medical Center, de Nijmegen na Holanda. A interpretação das variantes geradas pelo sequenciamento do exoma será realizada de acordo com o pipeline desenvolvido na Divisão de Diagnósticos Genômicos do Departamento de Genética Humana do Radboud University Medical Center. A classificação das variantes também seguirá as recomendações do

American College of Medical Genetics, sendo que essas serão classificadas em cinco diferentes classes: classe 1 – variante benigna; classe 2 – variante provavelmente benigna; classe 3 – variante de significado incerto; classe 4 – variante provavelmente patogênica; classe 5 – variante patogênica (Richards et al 2015).b) Confirmação das variantes encontradas pelo exoma: Sequenciamento de SangerA confirmação das variantes patogênicas e a investigação dos genitores serão realizadas pelo método de sequenciamento de Sanger, de acordo com protocolo previamente padronizado.c) Genotipagem com marcadores de

DNA microssatélites: para os indivíduos que apresentaram resultados de CMA sugestivo de dissomia uniparental, a genotipagem com marcadores de microssatélite será realizada conforme protocolo padronizado no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética Médica do Departamento de Genética Médica – FCM/ UNICAMP. Será investigado o trio, composto pelo propósito e genitores, que utilizará o DNA genômico dos indivíduos. d) Hibridação in situ fluorescente (FISH): esta técnica será realizada apenas para os indivíduos que possuem suspeita de dissomia uniparental, na tentativa de identificar mosaïcismo oculto, devido a um resgate trissômico. A FISH será realizada de acordo com o protocolo atualmente utilizado no Laboratório de Citogenética Humana do Departamento de Genética Médica da FCM – Unicamp.

**Critério de Inclusão:**

Indivíduos com deficiência intelectual e (ou) anomalias congênitas múltiplas nos quais foram identificadas regiões de homozigose no genoma pela análise cromossômica por microarray.

**Critério de Exclusão:**

Indivíduos com deficiência intelectual e (ou) anomalias congênitas múltiplas nos quais foram identificadas desequilíbrios genômicos patogênicos pela análise cromossômica por microarray. Indivíduos com deficiência intelectual e (ou) anomalias congênitas múltiplas nos quais não foram identificadas regiões de homozigose no genoma pela análise cromossômica por microarray.

**Riscos:**

O único risco previsível até o momento é aquele relacionado à coleta de sangue periférico. A coleta de sangue será realizada por profissional treinado, com material adequado (estéril e descartável). O risco será apenas de dor leve durante o procedimento e possibilidade de formação de manchas rochas na região da coleta.

**Benefícios:**

O único benefício para o participante e sua família é a realização de testes genéticos (com a finalidade de diagnóstico) que ainda não estão disponíveis na rede pública de saúde.

**Metodologia de Análise de Dados:**

As análises de bioinformática serão realizadas pelo grupo de bioinformática da Divisão de Diagnósticos Genômicos do Departamento de Genética Humana do Radboud University Medical Center, de Nijmegen na Holanda. A interpretação das variantes geradas pelo sequenciamento do exoma será realizada pela aluna de doutorado responsável por este projeto, de acordo com o pipeline desenvolvido na Divisão de Diagnósticos Genômicos do Departamento de Genética Humana do Radboud University Medical Center, da seguinte maneira: a primeira fase será realizada utilizando um painel de genes para anomalias congênitas múltiplas (3025 genes) e (ou) deficiência intelectual (1034 genes) priorizando aqueles que se encontram dentro das regiões de homozigose; caso não sejam encontradas mutações nos genes desses painéis, será realizada a busca por variantes patogênicas em todo o exoma. Esta etapa será realizada sob a supervisão da Dra. Nicole de Leeuw, que é chefe do time de Deficiência Intelectual e

Anomalias Congênitas Múltiplas da Divisão de Diagnósticos Genômicos do Departamento de Genética Humana do Radboud University Medical Center. Esse grupo de pesquisa tem quase 10 anos de experiência na análise de dados gerados pelo sequenciamento completo do exoma. A classificação das variantes também seguirá as recomendações do American College of Medical Genetics, sendo que essas serão classificadas em cinco diferentes classes: classe 1 – variante benigna; classe 2 – variante provavelmente benigna; classe 3 – variante de significado incerto; classe 4 – variante provavelmente patogênica; classe 5 – variante patogênica.

**Desfecho Primário:**

Na análise do exoma mutações gênicas poderão ser encontradas e relacionadas ao quadro clínico do indivíduo investigado.

**Tamanho da Amostra no Brasil:** 10

**Data do Primeiro Recrutamento:** 01/03/2019

**Países de Recrutamento**

Pais de Origem do Estudo	Pais	Nº de participantes da pesquisa
Sim	BRASIL	10

**Outras Informações**

**Haverá uso de fontes secundárias de dados (prontuários, dados demográficos, etc)?**

Sim

**Detalhamento:**

Serão consultados os dados clínicos e resultados de exames (radiografias, ecocardiografias, etc) no prontuário do Serviço de Genética Clínica do HC - UNICAMP.

**Informe o número de indivíduos abordados pessoalmente, recrutados, ou que sofrerão algum tipo de intervenção neste centro de pesquisa:** 10

**Grupos em que serão divididos os participantes da pesquisa neste centro**

ID Grupo	Nº de Indivíduos	Intervenções a serem realizadas
Pessoas com deficiência intelectual e ACM	10	Coleta de sangue para extração de DNA e sequenciamento do exoma

**O Estudo é Multicêntrico no Brasil?** Não

**Propõe dispensa do TCLE?** Não

**Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco?** Sim

**Justificativa:** Há a necessidade de confirmação dos resultados do exoma por outras técnicas.

**Cronograma de Execução:**

Identificação da Etapa	Início (DD/MM/AAAA)	Término (DD/MM/AAAA)
Confirmação dos resultados	02/03/2020	18/12/2020
Seleção de indivíduos com ACM e (ou) DI/ADNPM	01/03/2019	30/09/2019
Investigação de mutações nos dados do exoma	01/03/2019	30/09/2020
Redação do artigo e da dissertação	03/08/2020	26/02/2021
Realização do sequenciamento do exoma	01/03/2019	28/02/2020

**Orçamento Financeiro**

Identificação de Orçamento	Tipo	Valor em Reais (R\$)
Custos para realização do exoma	Custeio	R\$ 18.409,00
Material de consumo para extração de DNA, confirmação de resultados do exoma	Custeio	R\$ 8.000,00
<b>Total em R\$</b>		<b>R\$ 26.409,00</b>

**Bibliografia:**

Itsara, G.M. Cooper, C. Baker, S. Girirajan, J. Li, D. Absher, R.M. Krauss, R.M. Myers, P.M. Ridker, D.I. Chasman, et al. Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease; *Am. J. Hum. Genet.*, 84 (2009), pp. 148-161; Alabdullatif MA, Al Dhaibani MA, Khassawneh MY, El-Hattab AW. Chromosomal microarray in a highly consanguineous population: diagnostic yield, utility of regions of homozygosity, and novel mutations. *Clin Genet.* 2017;91(4):616-22; Bruno DL, White SM, Ganesamoorthy D et al: Pathogenic aberrations revealed exclusively by single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping data in 5000 samples tested by molecular karyotyping. *J Med Genet* 2011; 48: 831-839; Castro MLS, Cunha CJ, Moreira PB, Fernández RR, Garcias GL, Martino-Róth MG. Frequência das malformações múltiplas em recém-nascidos na Cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, e fatores sócio-demográficos associados. *Cad Saúde Pública* 2006; 22:1009-15 Chantot-Bastaroud S, et al.

Formation of upd(7)mat by trisomic rescue: SNP array typing provides new insights in chromosomal nondisjunction. *Mol Cytogenet.* 2017;10:28; de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BW, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, et al. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med.* 2012;367(20):1921-9. Guindalini C, Tufik S. Uso de microarrays na busca de perfis de expressão gênica – aplicação no estudo de fenótipos complexos. *Revista Brasileira de Psiquiatria.* 2007;29(4):370-4. [Acessado em 25 de Outubro de 2018]. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-44462007000400014](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462007000400014). Hehir-Kwa J.Y., Pfundt R., Veltman J.A.. Exome sequencing and whole genome sequencing for the detection of copy number variation. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2015; 15:1023-1032. Jones KL. Dysmorphology. In: Berman RE, Kliegman RM, Jenson HB. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 17th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2004. p. 616-23; Kadalayil L, et al. 2014. Exome sequence read depth methods for identifying copy Karam, S. M., Riegel, M., Segal, S. L., Felix, T. M., Barros, A. J., Santos, I. S. et al. Genetic causes of intellectual disability in a birth cohort: a population-based study. *Am. J. Med. Genet. A* 167, 1204-1214 (2015); Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 2010;86:749-764; Nowakowska B. Clinical interpretation of copy number variants in the human genome. *J Appl Genet.* 2017;58:449457; number changes. *Brief Bioinform BBU027*; Papenhausen P, Schwartz S, Risheg H, et al. UPD detection using homozygosity profiling with a SNP genotyping microarray. *Am J Med Genet A.* 2011;155A(4):757-768; Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-24. Sasaki K, Mishima H, Miura K, Yoshiura K: Uniparental disomy analysis in trios using genome-wide SNP array and whole-genome sequencing data imply segmental uniparental isodisomy in general populations. *Gene* 2013; 512: 267-274. Shaw-Smith, C. et al. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J. Med. Genet.* 41, 241-248 (2004); Szczauba K, Nowakowska B, Sobocka K et al (2016) Application of array comparative genomic hybridization in newborns with multiple congenital anomalies. *Adv Exp Med Biol* 912:1-9; Vermeesch JR, Brady PD, Sanlaville D, Kok K, Hastings RJ: Genome-wide arrays: quality criteria and platforms to be used in routine diagnostics. *Hum Mutat* 2012; 33: 906-915; Vissers LE, Fano V, Martinelli D, Campos-Xavier B, Barbuti D, Cho TJ, et al. Whole-exome sequencing detects somatic mutations of IDH1 in metaphyseal chondromatosis with D-2-hydroxyglutaric aciduria (MC-HGA). *Am J Med Genet A.* 2011;155A(11):2609-16. Wang J.C. Ross L. Mahon L.W. Owen R. Hemmat M. Wang B.T. El Naggat M. Kopita K.A. Randolph L.M.

Chase J.M. et al. (2014) Regions of homozygosity identified by oligonucleotide SNP arrays: evaluating the incidence and clinical utility. Eur. J. Hum. Genet. , <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.153>; Weischenfeldt J, Symmons O, Spitz F, Korbel JO. Phenotypic impact of genomic structural variation: insights from and for human disease. Nat Rev Genet. 2013;14(2):125-38; Wiszniewska J, Bi W, Shaw C, Stankiewicz P, Kang S-HL, Pursley AN, Lalani S, Hixson P, Gambin T, Tsai C, et al. 2013. Combined array CGH plus SNP genome analyses in a single assay for optimized clinical testing. Eur J Hum Genet 22:79–87;

---

**Upload de Documentos**

---

**Arquivo Anexos:**

Tipo	Arquivo
Folha de Rosto	folha_de_rosto_assinada.pdf
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_completo.pdf
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Regulamento_Biorrepositorio_Projeto_Exoma_LOH.pdf
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_dispenza_TALE.pdf

---

**Finalizar**

---

Manter sigilo da integra do projeto de pesquisa:  Sim



Continuação do Parecer: 3.054.390

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Análise do exoma em indivíduos com deficiência intelectual e (ou) anomalias congênitas múltiplas com regiões de homozigose no genoma detectadas pela análise cromossômica por microarray **Pesquisador:** Társis Antonio Paiva Vieira

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

**Versão:** 1

**CAAE:** 02179518.4.0000.5404

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.054.390

#### Apresentação do Projeto:

“O sequenciamento do genoma humano trouxe novas tecnologias para auxiliar o diagnóstico de condições genéticas diversas. Tornou-se possível, então, diagnosticar condições complexas as quais não apresentam causa evidente já relatada. Dentre elas, destacam-se o atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (ADNMP), a deficiência intelectual (DI) e as malformações congênitas. A cariotipagem com bandamento G, que por muitos anos foi utilizada como o primeiro teste para o diagnóstico de tais condições, tem sido substituída por novas técnicas, como a Análise Cromossômica por Microarray (Chromosomal Microarray Analysis – CMA) que avalia o número de cópias em todo o genoma por meio dos microarrays. Além disso, as plataformas de CMA que incluem oligonucleotídeos com polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) permitem a detecção tanto de variações no número de cópias, quanto de regiões de perda de heterozigose (Loss Of Heterozygosity – LOH) com um aumento significativo na sensibilidade das análises. As regiões de LOH ocorrem no genoma em decorrência de dois eventos principais: a identidade por descendência, principalmente quando há consanguinidade parental; e a dissomia uniparental. Porém, as regiões de LOH muitas vezes não envolvem sequências de imprinting do DNA, o que impossibilita o estabelecimento de relação direta com o fenótipo do paciente. Assim, o objetivo deste projeto é investigar a etiologia em indivíduos com deficiência intelectual e (ou) anomalias congênitas múltiplas, nos quais foram identificadas regiões de LOH no genoma pela análise cromossômica por microarray. Serão selecionados 10 indivíduos para o sequenciamento do exoma”.

#### Objetivo da Pesquisa:

Investigar a associação etiológica das alterações genômicas de regiões em homozigose com a deficiência intelectual e (ou) anomalias congênitas múltiplas.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

**Riscos:** Os riscos e/ou desconfortos associados aos procedimentos da pesquisa são dor e/ou a possibilidade de equimoses no local da coleta do sangue (punção venosa). Foram identificados, ainda, riscos associados à confidencialidade (manutenção do sigilo da identidade do participante). Os pesquisadores informam o compromisso de preservar a identidade dos participantes.

**Benefícios:** A possibilidade de se identificar alterações genômicas etiológicamente associadas à deficiência intelectual e/ou anomalias congênitas nos participantes da pesquisa.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de uma pesquisa apresentada como trabalho de mestrado da pós-graduanda Gabriela Roldão Correia Costa, com orientação do Prof. Dr. Társis Antônio Paiva Vieira. Nesta pesquisa, pretende-se identificar possíveis mutações em genes com herança recessiva em indivíduos com homozigose em múltiplos genes, por meio de sequenciamento do exoma. Para isso, pretende-se incluir 10 participantes no projeto, indivíduos com deficiência intelectual e (ou) anomalias congênitas múltiplas nos quais foram identificadas regiões de homozigose no genoma pela análise cromossômica por microarray. Os participantes do estudo serão submetidos a coleta de sangue periférico para extração de DNA e ensaios moleculares. Além disso, serão utilizadas informações obtidas a partir de fontes secundárias. Solicita-se dispensa da aplicação do TALE justificando: “Solicitamos a dispensa do uso de Termo de Assentimento (TALE) com a justificativa de ser um estudo com pessoas com deficiência intelectual. Serão incluídas no estudo pessoas de faixas etárias variadas, sendo que a maioria serão crianças. Porém, como essas apresentam deficiência intelectual, solicitamos a dispensa de aplicação do TALE”.

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

Foram apresentados:

1. Folha de rosto assinada pelo pesquisador responsável, Tarsis Antônio Paiva Vieira e pelo Dr. Cláudio S.Rodrigues Coy diretor associado da FCM - Unicamp, instituição indicada como proponente.
2. Termo de consentimento Livre Esclarecido.
3. Formulário da Plataforma Brasil com as informações básicas sobre o projeto.
4. Projeto completo.
5. Regulamento de biorrepositório
6. Justificativa para dispensa do TALE

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:** Não há pendências ou inadequações.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data de parecer de aprovação e ao término do estudo.
- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.
- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

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

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1245807.pdf	30/10/2018 15:58:49		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Regulamento_Biorrepositorio_Projeto_Exoma_LOH.pdf	30/10/2018 15:57:17	Táris Antonio Paiva Vieira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_dispenza_TALE.pdf	30/10/2018 15:56:17	Táris Antonio Paiva Vieira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	30/10/2018 15:56:09	Táris Antonio Paiva Vieira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_completo.pdf	30/10/2018 15:55:58	Táris Antonio Paiva Vieira	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_assinada.pdf	30/10/2018 15:54:03	Táris Antonio Paiva Vieira	Aceito

**Situação do Parecer:** **Aprovado**

**Necessita Apreciação da CONEP:** Não

CAMPINAS, 04 de Dezembro de 2018

---

**Assinado por:**  
**Renata Maria dos Santos Celeghini**  
**(Coordenador(a))**

## 8.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

### ANEXO II – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

**Projeto:** “Análise do exoma em indivíduos com deficiência intelectual e (ou) anomalias congênicas múltiplas com regiões de homozigose no genoma detectadas pela análise cromossômica por *microarray*”

**Nome do responsável:** Társis Antonio Paiva Vieira

**Número do CAAE:** 02179518.4.0000.5404

A pessoa pela qual é responsável está sendo convidada a participar como voluntária de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se você não aceitar participar ou retirar sua autorização em qualquer momento.

#### **Justificativa e objetivos:**

Pessoas com defeitos congênitos múltiplos, atraso no desenvolvimento e deficiência intelectual têm como indicação a investigação de alterações no DNA, para descobrir a causa desses problemas e realizar a orientação da família, com relação aos riscos do mesmo problema se repetir em outras pessoas da família. Portanto, o objetivo deste estudo é investigar a causa da deficiência intelectual e (ou) dos defeitos congênitos através de exames que permitem a identificação de alterações no DNA.

#### **Procedimentos:**

Participando do estudo, a pessoa pela qual é responsável está sendo convidada a: permitir a coleta de sangue periférico (da veia do braço) para a extração do DNA, para a realização do seguinte exame genético: Sequenciamento do exoma, que tem a finalidade de diagnóstico (descobrir a causa do problema). Neste exame todas as partes do DNA que produzem proteínas serão analisadas. Serão investigadas apenas as alterações que possam estar relacionadas à deficiência intelectual e aos defeitos congênitos. Para isso, também serão consultadas as informações que estão no prontuário do serviço de genética clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP e os resultados dos exames que estão neste prontuário.

Nenhuma alteração não relacionada ao motivo da investigação (chamados de achados incidentais) será analisada ou relatada.

**Desconfortos e riscos:**

O único risco previsível até o momento é aquele relacionado à coleta de sangue periférico. A coleta de sangue será realizada por profissional treinado, com material adequado (estéril e descartável). O risco será apenas de dor leve durante o procedimento e possibilidade de formação de manchas rochas na região da coleta.

**Benefícios:**

O único benefício para o participante e sua família é a realização de testes genéticos (com a finalidade de diagnóstico) que ainda não estão disponíveis na rede pública de saúde.

**Acompanhamento e assistência:**

O acompanhamento do participante será realizado pelo geneticista clínico, em consultas regulares junto ao serviço de genética. Os resultados dos exames serão informados por este mesmo profissional.

**Sigilo e privacidade:**

Você tem a garantia de que a identidade da pessoa pela qual é responsável será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado.

**Ressarcimento e indenização:**

Esta pesquisa não prevê ressarcimento de despesas, pois todos os procedimentos serão realizados em consultas de rotina junto ao serviço onde é atendido. O participante terá direito à indenização em caso de danos decorrentes do estudo.

**Aconselhamento genético:**

Os resultados serão transmitidos à família por um médico geneticista clínico experiente em consulta agendada no serviço de genética clínica do HC, onde a família é acompanhada.

O aconselhamento genético poderá ser realizado, se for o desejo da família, por esse mesmo profissional.

Os dados genéticos são confidenciais e não serão repassados a terceiros (como, por exemplo: seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos, entre outros).

**Armazenamento de MATERIAL BIOLÓGICO:**

Todas as amostras de sangue coletadas serão processadas e armazenadas no Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica da Faculdade de Ciências Médicas UNICAMP durante o tempo que a investigação diagnóstica durar, pois pode existir a necessidade de confirmação das variantes por outra técnica ou de investigação dos pais.

Você poderá, também, autorizar a armazenagem do DNA (no Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica da Faculdade de Ciências Médicas UNICAMP) para

pesquisas futuras. No entanto, antes de se realizar qualquer estudo futuro, será solicitada a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa para tal.

Concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

Concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do material biológico, sendo necessário o meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Você, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento da guarda e utilização do seu material biológico armazenado. O descarte do material armazenado será autorizado nas seguintes situações: (detalhar).

**Fotografias:**

Autorizo a tomada de fotografias da pessoa sob minha guarda, para publicação em revista científica, se houver contribuição relevante após a conclusão da investigação.

**Disponibilização de informações em bases de dados científicas nacionais e (ou) mundiais:**

Como a maioria das causas de deficiência intelectual e defeitos congênitos são raras, é importante comparar as características clínicas e genéticas de pessoas no Brasil e em outros países. Para isso, é necessário inserir informações médicas e resultados de testes genéticos em bases de dados públicas nacionais e (ou) mundiais. No compartilhamento dos dados é sempre assegurado que NÃO haverá qualquer identificação dos participantes, ou seja, não aparecerão informações como nome, sobrenome, filiação, endereço, número de registro hospitalar, cartão nacional de saúde ou qualquer outra que permita reconhecer o participante. Em relação a este item, eu:

Autorizo a disponibilização das informações médicas e resultados de testes genéticos em bases de dados públicas.

Não autorizo a disponibilização das informações médicas e resultados de testes genéticos em bases de dados públicas.

**Contato:**

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com os pesquisadores

**Prof. Társis Antonio Paiva Vieira ou Profa. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes**

**Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, andar térreo FCM 01, no Departamento de Genética Médica, CEP 13083-887 Campinas – SP. Telefones: (19) 3521-8906 ou (19) 3521-8909. E-mail: [tvieira@fcm.unicamp.br](mailto:tvieira@fcm.unicamp.br).**

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:30hs às 11:30hs e das 13:00hs as 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187; e-mail: [cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br).

**O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).**

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos nas pesquisas. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas.

**Consentimento livre e esclarecido:**

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar e declaro estar recebendo uma via original deste documento assinada pelo pesquisador e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas:

Nome do(a) participante: \_\_\_\_\_

Contato telefônico: \_\_\_\_\_

Email (opcional): \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(Nome e assinatura do seu RESPONSÁVEL LEGAL)

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**Responsabilidade do Pesquisador:**

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguo, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado e pela CONEP, quando pertinente. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do pesquisador)

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

### 8.3 Protocolo: Sequenciamento Automático de Sanger

#### ANEXO III – Sequenciamento Automático de Sanger

##### Purificação com a enzima Exo-Sap (GE™)

2,0 µl do produto da PCR

0,5 µl de Exosap

Programa no termociclador para a Purificação com a enzima Exo-Sap (GE™):

37°C por 15 minutos

80°C por 15 minutos

4°C hold

##### Reação de Sequenciamento – ABI - BigDye

2,5 µl do produto da PCR purificada

4,5 µl de água

2,0 µl de tampão do BigDye

0,5 µl de BigDye

0,5 µl de *Primer* F ou R (Cuidado!!! Utilizar apenas um sentido do *primer* por tubo)

Programa no termociclador para a Reação do Sequenciamento (ABI):

96°C por 01 minuto

25 ciclos de: 96°C por 10 segundos; temperatura de anelamento do *primer* utilizado por

05 segundos; 60°C por 04 minutos

4°C hold

Observações:

- O programa a ser utilizado pode variar de acordo com as características do fragmento;
- Armazenar a reação de sequenciamento em papel alumínio.

### **Purificação da Placa de Sequenciamento**

1. Transferir todo o conteúdo da reação de sequenciamento para a placa adequada para o ABI
2. Dar spin na placa
3. Colocar 2,5 µl de EDTA (125 mM) em cada pocinho
4. Colocar 25 µl de etanol absoluto 100% (Merck ou Sigma) em cada pocinho
5. Fechar a placa e inverter 10 vezes
6. Deixar em temperatura ambiente por 15 minutos
7. Centrifugar por 30 minutos à 4.000 rpm
8. Descartar o sobrenadante na pia de lavagem e dar spin invertido até atingir 1.000 rpm
9. Colocar a centrífuga para refrigerar à 4°C
10. Colocar 30 µl de etanol 70% (Merck ou Sigma)
11. Centrifugar 1.650 rcf por 15 minutos em centrífuga refrigerada à 4°C
12. Descartar o sobrenadante na pia de lavagem e dar spin invertido 185 rcf por um minuto
13. Secar à 64°C em termociclador por 3 minutos e meio (3,5´)
14. Ressuspender em 10 µl de formamida Hi-Di

#### Observações:

- Se for armazenar, embalar a placa utilizando papel alumínio e armazenar em geladeira.
- Sempre antes de iniciar a purificação da placa, limpar a tampa de silicone a ser utilizada com álcool e água destilada. Enxugar totalmente antes de usar!