**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E
CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO**

**Investigação mutacional do gene *GDAP1* em pacientes
brasileiros acometidos com a doença de Charcot-Marie-
Tooth axonal e desmielinizante**

Fernanda Barbosa Figueiredo

**Ribeirão Preto
2016**

Fernanda Barbosa Figueiredo

**Investigação mutacional do gene *GDAP1* em pacientes
brasileiros acometidos com a doença de Charcot-Marie-
Tooth axonal e desmielinizante**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurologia, do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Neurologia
Sub-área: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Wilson Marques Júnior

**Ribeirão Preto
2016**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da publicação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

Figueiredo, Fernanda Barbosa.

Investigação mutacional do gene *GDAP1* em pacientes brasileiros acometidos com a doença de Charcot-Marie-Tooth axonal e desmielinizante.

85 f. : il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Neurologia, Sub-área: Neurociências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto, 2016.

Orientador: Wilson Marques Júnior.

1. Charcot-Marie-Tooth.
2. *GDAP1* (Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1).
3. Mutações.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Fernanda Barbosa Figueiredo

Título: Investigação mutacional do gene GDAP1 em pacientes brasileiros acometidos com a doença de Charcot-Marie-Tooth axonal e desmielinizante.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurologia, do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Neurologia.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

“Agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém; é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser autossuficiente. Ninguém se faz sozinho. Sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor”.

Primeiramente, agradeço a Deus por iluminar meu caminho possibilitando a conclusão de mais essa etapa na minha formação profissional.

Aos meus pais Luciane e Matusalém pelo amor, dedicação e esforço despendido na minha formação tanto profissional quanto pessoal. Aos meus familiares pelo carinho, educação exemplar e apoio incondicional que sempre me deram. Em especial meus avós Armando, Lúcia e Amélia, minha tia Titi e minha irmã Amanda. Ao meu companheiro Maurício, por todo amor, cumplicidade, paciência e incentivo. Obrigada por entenderem minha ausência e mesmo assim se fazerem presentes de todas as formas possíveis. Nada seria possível sem vocês. Meu eterno amor e gratidão!

Ao professor Dr. Wilson Marques Júnior, pela oportunidade e por todos os ensinamentos que me proporcionou. Muito obrigada pela confiança!

A todos os colegas do laboratório de Neurogenética, principalmente à Sandra e Daiana, pelos ensinamentos técnicos e pela disponibilidade e empenho em me ajudar sempre que se fez necessário.

À Silmara, que além de colega de trabalho se tornou uma amiga. Muito obrigada por acreditar em mim desde o começo, por todos os ensinamentos que tem me passado, por toda a ajuda profissional e pela sincera e valiosa amizade.

Às amigas que tive a sorte de conhecer nesses anos em Ribeirão Preto, Marlusa Karlen, Luciana Kuntze, e Aline Marubayashi, a vocês gostaria de agradecer por tornar meus dias mais felizes. Levarei sempre uma lembrança comigo de cada momento que passamos juntas.

Às queridas amigas, Diandra Bosi e Mariana Benício, que apesar do pouco tempo de convivência, se tornaram mais que especiais. A vocês agradeço pelos lindos momentos vividos, pelas inúmeras risadas sem motivos e por sempre me apoiarem nos momentos em que precisei. Vocês são um presente na minha vida.

Às minhas amigas-irmãs, que mesmo longe, sempre estão presentes: Helena, Renata, Giovana e Camila. Obrigada por toda amizade, amor e apoio de sempre, vocês são indispensáveis.

À Silvana Loturco, secretária da pós-graduação da Neurologia, que muito me auxiliou durante toda a trajetória do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado para a realização da pesquisa.

Agradeço também à todas as outras pessoas que aqui eu não citei o nome, mas não menos importantes, que direta ou indiretamente, participaram desse momento.

RESUMO

FIGUEIREDO, F.B. **Investigação mutacional do gene *GDAP1* em pacientes brasileiros acometidos com a doença de Charcot-Marie-Tooth axonal e desmielinizante.** 2016. 85 páginas. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Introdução: Dentre as neuropatias hereditárias, as neuropatias hereditárias motoras e sensitivas (HMSN), também conhecidas como Doença de Charcot-Marie-Tooth (CMT) são as mais comuns, podendo acometer 1:2500 pessoas. Elas podem ser classificadas com base nas características clínicas, eletrofisiológicas, padrão de herança e mutação em localização gênica/mutação. Atualmente, mais de 80 genes estão relacionados à CMT, dentre eles o *GDAP1* que é responsável pelas formas CMT4A, AR-CMT2, CMTRIA e CMT2K. O gene codifica a proteína GDAP1 que é expressa pelos neurônios do sistema nervoso periférico e central e também pelas células de Schwann. Mutações no *GDAP1* geralmente estão relacionados com CMT de herança recessiva, mas autossômica dominante também pode ocorrer. Geralmente, as neuropatias recessivas são de diagnóstico molecular mais difíceis, são mais graves e tem rápida progressão. É necessário que haja um maior número de casos de pacientes com CMT envolvendo mutações no *GDAP1*, juntamente com os dados clínicos, patológicos e de eletrofisiologia detalhados, para estabelecer uma relação de confiança entre o genótipo e o fenótipo das diferentes formas da doença. O objetivo do trabalho foi investigar mutações no gene *GDAP1* em uma amostra da população brasileira com quadro clínico de CMT tanto axonal quanto desmielinizantes.

Métodos: *Screening* mutacional do gene *GDAP1* por sequenciamento direto em 100 pacientes com diagnóstico clínico sugestivo de CMT4, CMT2, CMTi e CMT esporádico, onde mutações nos genes MPZ, MFN2 e GJB1 foram previamente excluídos.

Resultados: Foram encontradas alterações no *GDAP1* em 6 pacientes índices não relacionados, sendo que 1 deles foi homozigoto para a alteração Q163*, 1 heterozigoto composto para as alterações N64S e R125*, dois pacientes não relacionados foram heterozigotos compostos para as alterações P119T e Q163*, 1 paciente em heterozigose para a alteração P119T e 1 paciente em heterozigose para alteração K207T. Dentre essas alterações, as variantes N64S, P119T, K207T ainda

não foram descritas na literatura. **Conclusão:** Os resultados obtidos mostraram que mutações no gene *GDAP1* estão presentes em pacientes da população brasileira com fenótipo de CMT2, AR-CMT2 e CMT esporádico. A frequência de ocorrência pode ser considerada alta (3,88%). Ademais, foram encontradas na população de estudo, duas mutações conhecidamente patogênicas (Gln163Ter e Arg125Ter) e três novas variantes (Asn64Ser, Pro119Thr, Lys207Thr) que ainda não haviam sido relacionadas ao fenótipo de CMT.

Palavras chaves: Charcot-Marie-Tooth; *GDAP1* (Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1); Mutações.

ABSTRACT

FIGUEIREDO, F.B. **Mutational investigation of the *GDAP1* gene in brazilian patients with axonal-demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease.** 2016. 85 pages. Dissertation (Master). Ribeirão Preto School of Medicine, University of Sao Paulo.

Introduction: Among the inherited neuropathies, the hereditary motor and sensory neuropathies (HMSN), also known as Charcot-Marie-Tooth disease, are the most common ones and may affect 1:2500 people. They can be classified based on their clinical features, electrophysiology, inheritance pattern and mutation on a gene location/mutation. Today, more than 80 genes have been related to the CMT disease and among them the *GDAP1* gene, responsible for the CMT4A, AR-CMT2, CMTR1A and CMT2K forms. This gene codes the GDAP1 protein, which is expressed by neurons from the peripheral and central nervous system and also by Schwann cells. *GDAP1* mutations are usually related to recessive inheritance, although autosomal dominant cases can also occur. Most of the times, recessive neuropathies tend to have a more difficult molecular diagnosis, besides being more severe and presenting fast progression. A larger number of patients with CMT related to *GDAP1* mutations, along with detailed clinical, pathological and electrophysiological data, is necessary in order to establish a trustful relation between genotype and phenotype in the different forms of this disease. The objective of this research was to investigate mutations in the *GDAP1* gene in a brazilian sample of patients with clinical picture of both axonal and demyelinating CMT. **Methods:** Mutational screening of the *GDAP1* gene by direct sequencing of 100 patients presenting suggestive clinical diagnosis of CMT4, CMT2, CMTi and sporadic CMT, where mutations in the *MPZ*, *MFN2* and *GJB1* genes have been previously excluded. **Results:** Alterations in the *GDAP1* were found in 6 unrelated index patients, including 1 homozygous for the Q163* alteration, 1 compound heterozygous for the N64S and R125* alterations, 2 compound heterozygous for the P119T and Q163* alterations, 1 heterozygous for the P119T alteration alone and 1 heterozygous for the K207T alteration. Among these alterations, the variants N64S, P119T, K207T haven't been described in the literature yet. **Conclusion:** The results obtained showed that mutations in *GDAP1* gene are present

in patients of brazilian population with phenotype of CMT2, AR-CMT2 and sporadic CMT. The occurrence frequency can be considered high (3,88%). Furthermore, were found in the studied population two mutations known as pathogenic (Gln163Ter and Arg125Ter) and three news variants (Asn64Ser, Pro119Thr, Lys207Thr), that had not been related to the CMT phenotype.

Keywords: Charcot-Marie-Tooth; *GDAP1* (Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1); Mutations.

FIGURAS

Figura 1-1:	Representação esquemática da proteína GDAP1	26
Figura 4-1:	Eletroferograma da paciente CMT8594 mostrando a alteração K207T em heterozigose no éxon 5.	45
Figura 4-2:	Eletroferograma da mãe da paciente CMT8594 mostrando a alteração K207T em heterozigose no éxon 5.	45
Figura 4-3:	Eletroferograma do éxon 5 da amostra controle.	45
Figura 4-4:	Eletroferograma do paciente CMT9379 mostrando a alteração N64S em heterozigose no éxon 2.	47
Figura 4-5:	Eletroferograma éxon 2 da amostra controle.	47
Figura 4-6:	Eletroferograma do paciente CMT9379 mostrando a alteração R125* em heterozigose no éxon3.	47
Figura 4-7:	Eletroferograma do éxon 3 da amostra controle.	47
Figura 4-8:	Eletroferograma do pai do paciente CMT9379 mostrando a alteração N64S em heterozigose no éxon 2.	47
Figura 4-9:	Eletroferograma da mãe do paciente CMT9379 mostrando a alteração R125* em heterozigose no éxon 3.	48
Figura 4-10:	Eletroferograma da paciente CMT9671 mostrando a alteração P119T em heterozigose no éxon 3.	49
Figura 4-11:	Eletroferograma do éxon 3 da amostra controle.	49
Figura 4-12:	Eletroferograma da paciente CMT9671 mostrando a alteração Q163* em heterozigose no éxon 4.	49
Figura 4-13:	Eletroferograma éxon 4 da amostra controle.	49
Figura 4-14:	Eletroferograma da paciente CMT10286 mostrando a alteração Q163* em homozigose no éxon 4.	51
Figura 4-15:	Eletroferograma da mãe da paciente CMT10286 mostrando a alteração Q163* em heterozigose no éxon 4.	51
Figura 4-16:	Eletroferograma do pai da paciente CMT10286 mostrando a alteração Q163* em heterozigose no éxon 4.	51
Figura 4-17:	Eletroferograma éxon 4 da amostra controle.	51

Figura 4-18: Eletroferograma da paciente CMT11317 mostrando a alteração P119T em heterozigose no éxon 3. _____	53
Figura 4-19: Eletroferograma do pai da paciente CMT11317, mostrando a alteração P119T em heterozigose no éxon 3. _____	54
Figura 4-20: Eletroferograma éxon 3 da amostra controle. _____	54
Figura 4-21: Eletroferograma da paciente CMT11317 mostrando a alteração Q163* em heterozigose no éxon 4. _____	54
Figura 4-22: Eletroferograma da mãe da paciente CMT11317, mostrando a alteração Q163* em heterozigose no éxon 4 _____	54
Figura 4-23: Eletroferograma éxon 4 da amostra controle. _____	54
Figura 4-24: Eletroferograma do paciente CMT11473 mostrando a alteração P119T em heterozigose no éxon 3. _____	55
Figura 4-25: Representação esquemática da proteína GDAP1. _____	56
Figura 5-1: Conservação do nucleotídeo C mutado em R125* para diferentes espécies. _____	60
Figura 5-2: Conservação do nucleotídeo C mutado em Q163* para diferentes espécies. _____	60
Figura 5-3: Conservação do nucleotídeo A mutado em N64S para diferentes espécies. _____	62
Figura 5-4: Conservação do nucleotídeo C mutado em P119T para diferentes espécies. _____	63
Figura 5-5: Conservação do nucleotídeo A mutado em K207T para diferentes espécies. _____	64
Figura 5-6: Modelo esquemático para a classificação de novas variantes. _____	67
Figura 5-7: <i>GDAP1</i> e mutações <i>nonsense</i> . _____	71
Figura 5-8: <i>GDAP1</i> e mutações <i>missense</i> . _____	72
Figura 5-9: Frequência de mutações no <i>GDAP1</i> . _____	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-1: Classificação geral da CMT	21
Tabela 3-1: Sequência de primers do GDAP1.	36
Tabela 3-2: Protocolo de PCR.	37
Tabela 3-3: Perfil térmico da PCR.	37
Tabela 3-4: Protocolo da PCR de sequenciamento.	38
Tabela 3-5: Perfil térmico da PCR de sequenciamento.	38
Tabela 3-6: Sites utilizados.	41
Tabela 4-1: Classificação dos pacientes com CMT na população de estudo.	43
Tabela 4-2: Características gerais das alterações encontradas.	56
Tabela 5-1: Resumo das informações utilizadas para a classificação das novas variantes encontradas neste trabalho.	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACMG	<i>American College of Medical Genetics</i>
ADM	<i>Abductor digit minimi</i>
AMP	<i>Association for Molecular Pathology</i>
ANGE	Ambulatório de doenças Neurogenéticas
APB	<i>Abductor pollicis brevis</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CMT	Charcot-Marie-Tooth
DRP1	Dynamin related protein 1
EIP	Extensor indicis proprius
ENMG	Eletroneuromiografia
FIS1	Fission, mitochondrial 1
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GDAP1	Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1
GST	Glutathione – S – Transferase
HC	Hospital das Clínicas
HMN	Neuropatia hereditária motora
HMSN	Neuropatia hereditária motora e sensitiva
HN	Neuropatia hereditária
HSAN	Neuropatia hereditária sensitiva e autonômica
HSN	Neuropatia hereditária sensitiva
MMII	Membros inferiores
MMSS	Membros superiores
MNCV	Velocidade de condução do nervo motor

PAMC	Potencial de ação muscular composto
PAS	Potencial de ação sensitivo
T.A.	Temperatura de <i>annealing</i>
USP	Universidade de São Paulo
VC	Velocidade de condução
A	Adenosina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina
* ou Ter	<i>Stop codon</i>
K ou Lys	Lisina
N ou Asn	Asparagina
P ou Pro	Prolina
Q ou Gln	Glutamina
R ou Arg	Arginina
S ou Ser	Serina
T ou Thr	Treonina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
1.1	CHARCOT-MARIE-TOOTH	19
1.1.1	Classificação	20
1.1.2	Epidemiologia	23
1.1.3	Genética molecular e CMT	24
1.2	<i>GDAP1</i> - GANGLIOSIDE-INDUCED DIFFERENTIATION-ASSOCIATED PROTEIN 1	26
1.3	<i>GDAP1</i> E A DOENÇA DE CHARCOT-MARIE-TOOTH	28
2.	OBJETIVOS	31
3.	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	34
3.2	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	34
3.2.1	Pacientes	34
3.2.2	Grupo controle	34
3.3	MÉTODOS	35
3.3.1	Coleta de Sangue	35
3.3.2	Extração do DNA	35
3.3.3	Seleção dos Primers	36
3.3.4	Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	37
3.3.5	Reação de Sequenciamento	37
3.3.6	Precipitação e purificação da Reação de Sequenciamento	38
3.3.7	Análise das sequências	39
3.3.8	Nomenclatura	39
3.3.9	Bioinformática	39
3.3.9.1	Estudo in silico	39
3.3.9.2	Estudo de Frequência em bancos de dados populacionais	40
3.3.9.3	Banco de dados e sites utilizados	41
4.	RESULTADOS	42

4.1	PACIENTE CMT8594	44
4.2	PACIENTE CMT9379	46
4.3	PACIENTE CMT9671	48
4.4	PACIENTE CMT10286	50
4.5	PACIENTE CMT11317	52
4.6	PACIENTE CMT11473	55
4.7	POLIMORFISMO SER169SER	56
5.	DISCUSSÃO	57
5.1	MUTAÇÕES	58
5.1.1	Arg125Ter e Gln163Ter	58
5.1.2	Novas variantes	61
5.1.3	Polimorfismo Ser169Ser	66
5.2	GENOTIPAGEM DOS PACIENTES	68
5.2.1	Alteração em homozigose (Q163*/Q163*)	68
5.2.2	Heterozigose composta	70
5.2.2.1	CMT11317 e CMT9671 (P119T/Q163*)	70
5.2.2.2	CMT9379 (N64S/R125*)	72
5.2.3	Alterações em heterozigose	74
5.3	FREQUÊNCIA DE ALTERAÇÕES NO GENE <i>GDAP1</i> NA POPULAÇÃO BRASILEIRA	76
6.	CONCLUSÃO	78
7.	BIBLIOGRAFIA	80

1. INTRODUÇÃO

1.1 CHARCOT-MARIE-TOOTH

As neuropatias hereditárias (HN) são um grupo complexo e heterogêneo de doenças do sistema nervoso periférico que incluem três grandes subtipos: (i) as neuropatias hereditárias motoras e sensitivas (HMSN); (ii) as neuropatias hereditárias motoras (HMN); (iii) e as neuropatias hereditárias sensitivas (HSN), também conhecidas como neuropatias hereditárias sensitivas e autonômicas (HSAN). Apesar dessa heterogeneidade, as HN compartilham características clínicas em comum, tais como um curso crônico e lentamente progressivo (TAZIR et al., 2014). Dentre as HN, o tipo mais frequente é a HMSN, atualmente mais conhecida como doença de Charcot-Marie-Tooth (CMT), que é um grupo heterogêneo de neuropatias classificadas com base em suas características clínicas, neurofisiológicas, patológicas e genéticas (TAZIR et al., 2014).

A descrição inicial da CMT é atribuída ao neurologista francês Jean Martin Charcot e seu estudante Pierre Marie e, de forma independente, ao neurologista inglês Howard Tooth ambos em 1886 (DYCK; LAMBERT, 1968). Charcot e Marie atribuíram a doença a uma mielopatia (apud KAZAMEL; BOES, 2015) enquanto Tooth corretamente a topografou como sendo uma doença dos nervos periféricos (apud EL-ABASSI; ENGLAND; CARTER, 2014). No ano de 1960, Dyck e Lambert usaram a eletrofisiologia e a biópsia de nervo para a identificação dos dois grandes subtipos da doença, CMT1 e CMT2 (DYCK; LAMBERT, 1968), onde CMT1 denomina as formas desmielinizantes, com velocidade de condução reduzida, enquanto a CMT2 corresponde ao tipo axonal, que cursa com preservação da velocidade de condução (TAZIR et al., 2014).

Sabe-se que hoje, a CMT (MIM 118300), embora seja considerada fenotipicamente e genotipicamente heterogênea (KAZAMEL; BOES, 2015), apresenta um quadro clínico nuclear. Este quadro é caracterizado por fraqueza e atrofia distais dos membros, iniciando nos membros inferiores, onde envolve especialmente o compartimento peroneiro, geralmente associada com leve a moderada perda sensitiva, deformidades esqueléticas (pés cavus, dedos em martelo, mãos em garra e cifoescoliose) e diminuição ou ausência dos reflexos miotáticos (MARQUES et al., 2005; PAREYSON; SCAIOLI; M., 2006; THOMAS et al., 1997). Os sintomas motores

são comumente mais marcantes que os sensitivos, que se manifestam predominantemente por sintomas negativos, embora 20 a 30% dos pacientes com CMT1 relatem dor, frequentemente musculoesquelética e raramente neuropática (TAZIR et al., 2014). As exceções a estas regras são raras e podem sugerir mutações específicas (PAREYSON; SCAIOLI; M., 2006).

1.1.1 Classificação

Atualmente, a CMT é classificada com base nas características clínicas, eletrofisiológicas, padrão de herança e mutação/localização gênica (JOHNSON et al., 2014).

Através da velocidade de condução dos nervos motores (MNCV), ulnar ou mediano, são reconhecidos atualmente três grandes grupos de CMT: (i) as formas mielínicas onde a VC é menor que 35 m/s; (ii) as formas intermediárias (VC entre 35m/s e 45m/s); (iii) e as formas axonais (VC $\geq$ 45 m/s) (HARDING; THOMAS, 1980; SAPORTA et al., 2011).

Todos os padrões de herança mendelianas são encontradas na CMT: autossômica dominante, autossômica recessiva e ligada ao cromossomo X (de caráter recessivo ou dominante) (PAREYSON; MARCHESI, 2009). Mais recentemente, um fenótipo de CMT foi associado com um defeito no MT-ATP6A, um gene que é codificado pelo DNA mitocondrial (TIMMERMAN; STRICKLAND; ZÜCHNER, 2014).

Embora não exista um consenso, a classificação mais aceita, que será aqui utilizada neste trabalho, é aquela proposta pelos grupos de Reilly e Shy (2009). Esta classifica as formas autossômicas dominantes e mielínicas como CMT1, as formas autossômicas dominantes e axonais como CMT2, as formas autossômicas recessivas e mielínicas como CMT4, as formas autossômicas recessivas e axonais como AR-CMT2, as formas com velocidade de condução intermediária como CMTI e as formas ligadas ao X como CMTX. As letras que seguem os números identificam o gene ou o *locus* específico para aquela forma de CMT. Por exemplo, CMT1A identifica uma forma de CMT1 causada pela duplicação do gene *PMP22*. Já a CMT1B identifica a

forma de CMT1 causada por mutações de ponto no gene *MPZ* (REILLY; SHY, 2009; SAPORTA; SHY, 2014). Até o presente momento, mais de 85 genes foram identificados como causa de CMT e neuropatias correlatas (TIMMERMAN; STRICKLAND; ZÜCHNER, 2014). A Tabela 1-1 apresenta a classificação atual da CMT e seus respectivos genes.

Muitos autores consideram que esta classificação de AR-CMT pode causar confusão (TAZIR et al., 2014; VALLAT; MATHIS; FUNALOT, 2013). Se assim fosse estipulado, a CMT desmielinizante autossômico recessivo deveria ser denominado como AR-CMT1 ao invés de CMT4 de tal modo que a classificação de “Dyck e Lambert” em CMT tipo 1 (desmielinizante) e CMT tipo 2 (axonal) seria respeitado também para as formas recessivas de CMT (TAZIR et al., 2014). No entanto, historicamente, a primeira localização genética de uma forma autossômica recessiva de CMT no cromossomo 8q13-q21.1 recebeu a denominação de CMT4. A razão para essa escolha foi que apenas CMT1, CMT2 e CMT3, na época, utilizada para identificar os casos de síndrome de Dejerine-Sottás (DSD), já tinham sido atribuídas. A identificação de outros *loci* genéticos e genes para AR-CMT1 foram sucessivamente denominados de CMT4B, CMT4C, CMT4D e assim por diante, perdendo-se a logicidade inicialmente prevista (MATHIS et al., 2015; VALLAT; MATHIS; FUNALOT, 2013).

As formas recessivas geralmente são mais graves que as formas dominantes e normalmente tem um início mais precoce (PAREYSON; MARCHESI, 2009). Dentre os genes envolvidos nesse subtipo, encontra-se o *GDAP1*, onde mutações podem implicar tanto nas formas axonais, AR-CMT2 quanto nas formas desmielinizantes CMT4 (TAZIR et al., 2013).

Tabela 1-1 - Classificação geral da CMT

TIPO	GENE	LOCUS
<i>FORMAS DESMIELINIZANTES - Autossômica dominante (AD CMT1)</i>		
CMT 1A	Duplicação / mutação de ponto PMP22	17p11.2
CMT 1B / 1E	MPZ	1q22
CMT 1C	LITAF	16p13.3-p12
CMT 1D	EGR2	10q21.1-q22.1
CMT 1F	NEFL	8p21

CMT1	ARHGEF10	8p23
CMT 1+	FBLN5	14q32.12
<i>FORMAS DESMIELINIZANTES - Autossômica recessiva (CMT4)</i>		
CMT 4A	GDAP1	8q13-q21.1
CMT 4B1	MTMR2	11q22
CMT 4B2	MTMR13/SBF2	11p15
CMT 4B3	SBF1 ^a	22q13.33
CMT 4C	KIAA1985/SH3TC2	5q32
CMT 4D (HMSNL)	NDRG1	8q24.3
CMT 4E	EGR2	10q21.1-q22.1
CMT 4F	PRX	19q13.1-q13.2
CMT 4G (Russe)	HK1	10q22
CMT 4H	FGD4	12p11.2
CMT 4J	FIG4	6q21
CCFDN	CTDP1	18q23
<i>FORMAS AXONAIS - Autossômica dominante (AD CMT2)</i>		
CMT 2A1	KIF1B	1p36.2
CMT 2A2	MFN2	1p36.2
CMT 2B	RAB7	3q21
CMT 2C	TPRV4	12q24
CMT 2D	GARS	7p15
CMT 2E	NEFL	8p21
CMT 2F	HSP27/HSPB1	7q11.23
CMT 2G	12q12-q13.3	12q12-q13.3
CMT 2L	HSP22/HSPB8	12q24
CMT 2K	GDAP1	8q13-q21.1
CMT 2N	AARS	16q22
CMT 2	MPZ	1q22
CMT 2P	LRSAM1	9q33.3
CMT 2Q	DHTKD1	10p14
CMT 2R	TRIM2	4q31.3
CMT 2	MT-ATP6	Mitochondrial
<i>FORMAS AXONAIS - Autossômica recessiva (AR-CMT2)</i>		
AR CMT 2A	LMNA	1q21.2
AR CMT 2B	19q13.1-13.3	19q13.1-13.3
AR CMT 2	GDAP1	8q13-q21.1
ARAN-NM	HINT1	5q31.1
AR CMT2	GAN	16q24.1
<i>FORMAS INTERMEDIÁRIAS - Autossômica Dominante (DI-CMT)</i>		
DI-CMT A	10q24.1-25.1	10q24.1-25.1
DI-CMT B	DNM2	19p12/19p13.2
DI-CMT C	YARS	1p35

<i>DI-CMT E</i>	INF2	14q32.33
<i>DI-CMT F</i>	GNB4	3q26.33
<i>FORMAS INTERMEDIÁRIAS - Autossômica recessiva (RI-CMT)</i>		
<i>RI-CMT B</i>	KARS	16q23.1
<i>RI-CMT C</i>	PLEKHG5	1p36.31
<i>FORMAS LIAGADA AO X (CMT 1X)</i>		
<i>CMT 1X</i>	GJB1	Xq13.1
<i>CMT 4X</i>	AIFM1	Xq26.1
<i>CMT 5X</i>	PRPS1	Xq22-q24
<i>CMT 6X</i>	PDK3	Xp22.11
<i>NEUROPATIA HEREDITÁRIA SENSÍVEL À COMPRESSÃO</i>		
<i>HNPP</i>	Deleção / mutações de ponto PMP22	17p11.2

Fonte: Adaptado de (Baets et al., 2014; Reilly e Shy 2009).

1.1.2 Epidemiologia

A prevalência da CMT foi estudada na Noruega ocidental onde foi estimada em 1/2.500 habitantes. Além disso, foram distinguidos 3 tipos de herança: (i) CMT autossômica dominante com uma prevalência estimada de 36/100.000; (ii) CMT ligada ao X com uma prevalência de 3,6/100.000; (iii) e CMT autossômica recessiva com uma prevalência de 1,4/100.000 (SKRE, 1974). Braathen (2012) em um estudo de base populacional realizado no leste de Akershus, na Noruega, relatou uma prevalência de 1/1214 onde CMT1 e CMT2 seriam igualmente frequentes.

Embora estes dados sejam os mais frequentemente referenciados, parece haver uma grande variabilidade de acordo com a população geográfica estudada, podendo variar de 1 para 1.200 a 9.200 (MCCORQUODALE; PUCILLO; JOHNSON, 2016). Com relação aos subtipos de CMT, CMT1 é o subtipo mais comum, representando aproximadamente 60% de todas as formas de CMT (BRAATHEN, 2012; DIVINCENZO et al., 2014). Em algumas populações, como Japão, ou quando os casos esporádicos são incluídos, evidencia-se uma maior prevalência de CMT2. Já as formas intermediárias, representam menos de 4% dos casos de CMT (MCCORQUODALE; PUCILLO; JOHNSON, 2016)

Na Europa ocidental e na América do Norte, as formas dominantes são as mais frequentes (TAZIR et al., 2014). Em contrapartida, em outras regiões, como no Norte

da África, onde há alta prevalência de casamentos consanguíneos, os tipos autossômico recessivos correspondem mais de 40% de todas as formas (DUBOURG et al., 2006; SISKIND; SHY, 2011).

Estima-se que um total de 2,6 milhões de pessoas tenham CMT em todo o mundo (HOWCROFT; KUMAR; MAKWANA, 2009; SAPORTA et al., 2011). Frequentemente, esta doença está ligada a um componente genético onde o histórico familiar pode ser de grande ajuda para o diagnóstico (HOWCROFT; KUMAR; MAKWANA, 2009).

1.1.3 Genética molecular e CMT

O primeiro *locus* relacionado à CMT foi mapeado em 1982 no cromossomo 1 por Bird et al. (1982) mas o grande avanço molecular se iniciou em 1991 com a descoberta de uma duplicação no braço curto do cromossomo 17 (17p11.2-12). Este cromossomo contém o gene que codifica a proteína da mielina periférica 22 (*PMP22*), responsável por causar CMT1A, o subtipo mais comum da doença (ROSSOR et al., 2013; TIMMERMAN; STRICKLAND; ZÜCHNER, 2014).

Após o término do projeto genoma humano, em 2001, e o desenvolvimento de novas tecnologias, o número de genes associados à CMT passou a aumentar significativamente, sendo conhecidos atualmente mais de 85 genes (ROSSOR et al., 2013; TIMMERMAN; STRICKLAND; ZÜCHNER, 2014).

A disponibilidade do Genoma Humano e as técnicas de sequenciamento de nova geração também contribuíram para a identificação de mutações em genes que não eram candidatos à CMT, como por exemplo, mutações encontradas em genes que codificam aminoacil-tRNA sintetase (*GARS*, *YARS*, *HARS*, *MARS*, *AARS*), proteínas de choque térmico (*HSPB1*, *HSPB3*, *HSPB8*) e enzimas envolvidas no metabolismo de transporte e de membrana (*SPTLC1*, *SPTLC2*, *MTMR2*, *SBF1*, *SBF2*). É interessante observar que, genes associados à CMT são expressos em diferentes compartimentos celulares e participam de diferentes funções das células de Schwann e dos axônios. Por exemplo, alguns destes genes têm função nuclear como fatores de transcrição (*EGR2*, *SOX10*, *DNMT1*), outros no transporte de vesículas (*RAB7A*), no complexo de Golgi (*FAM134B*), no retículo endoplasmático (*SPTLC1*, *REEP1*, *ATL1*) ou na mitocôndria (*MFN2*, *GDAP1*) (TIMMERMAN; STRICKLAND; ZÜCHNER,

2014). Não importa se o problema afeta primeiramente a mielina ou o axônio, a via final comum é um processo de degeneração axonal comprimento-dependente, onde as regiões distais das fibras mais longas são comprometidas mais precocemente, e assim por diante (PAREYSON; SCAIOLI; M., 2006). Para a maioria destes genes, se não para todos, os mecanismos moleculares deste processo ainda permanecem desconhecidos (TIMMERMAN; STRICKLAND; ZÜCHNER, 2014).

Além disso, é importante ressaltar que a heterogeneidade fenotípica, isto é, diferentes fenótipos de CMT podem ser causados por mutações em um mesmo gene e heterogeneidade genotípica, isto é, mutações em diferentes genes podem resultar num mesmo fenótipo, aumentam a complexidade da doença. Apesar disso, alguns estudos mostraram que rearranjos ou mutações nos genes *PMP22*, *GJB1*, *MFN2* e *MPZ* são responsáveis por aproximadamente 90% dos diagnósticos moleculares. Os outros genes, inclusive o *GDAP1*, representam menos de 3% dos casos da doença, exceto em um estudo, realizado por Sivera et al. (2013), na região de Valencia, Espanha, onde ele encontrou uma taxa de mutação no *GDAP1* de 11,5%. (DIVINCENZO et al., 2014; MURPHY et al., 2012; SAPORTA et al., 2011).

Atualmente o diagnóstico molecular é obtido em aproximadamente 60% dos pacientes com CMT, sendo que 80% dos pacientes com CMT1 recebem este diagnóstico contra apenas 50% dos pacientes com CMT2, indicando que a maioria dos genes ou mutações para esse subtipo ainda permanecem desconhecidos (MURPHY et al., 2012).

O *GDAP1* foi inicialmente descrito em famílias da Tunísia com CMT4A por Ben Othmane (1993), e foi associado com baixo MNCV e hipomielinização, detectado na biópsia de nervo. Logo após sua descrição, houve um crescente interesse pelo gene e vários estudos clínicos foram desenvolvidos, principalmente em países do mediterrâneo (AZZEDINE et al., 2003; BAXTER et al., 2002; CLARAMUNT et al., 2005; CUESTA et al., 2002; SENDEREK et al., 2003).

1.2 GDAP1 - GANGLIOSIDE-INDUCED DIFFERENTIATION-ASSOCIATED PROTEIN 1

Responsável por codificar a proteína 1 associada à diferenciação por gangliosídeo (GDAP1), este gene localiza-se no cromossomo 8q21.11, possui 23.728 pares de base, tem tamanho de 13,9 kb de DNA genômico, contém 6 éxons, 5 íntrons e possui dois transcritos identificados. A Variante 1, o maior deles, codifica a Isoforma A com 358 aminoácidos e a variante 2 que codifica a Isoforma B com 290 aminoácidos (CASSEREAU et al., 2011a; CUESTA et al., 2002).

Análises filogenéticas e estruturais sugerem que a proteína GDAP1 pertence a uma nova classe da subfamília das enzimas Glutathione-S-Transferase (GSTs), por possuir dois domínios GSTs típicos, o domínio I (GST-N) na região N-terminal e o domínio II (GST-C) na região C-terminal. Estes domínios foram preditos através de ferramentas de bioinformática (CUESTA et al., 2002; MARCO et al., 2004; SHIELD; MURRAY; BOARD, 2006). Foi demonstrado também que GDAP1 tem um único domínio transmembranar (TMD) na extremidade do C-terminal, e um domínio hidrofóbico (HD) na região flangeadora do C-terminal (MARCO et al., 2004; WAGNER et al., 2009). Além disso, GDAP1 tem duas regiões adicionais entre os aminoácidos 152 a 164 e 169 a 195 que representam duas hélices, $\alpha 4$ e $\alpha 5$, constituindo o $\alpha 4$ - $\alpha 5$ loop (CASSEREAU et al., 2011b). Esses domínios estão demonstrados na Figura 1-1 que mostra uma representação esquemática da proteína, onde é possível observar a demarcação dos aminoácidos de cada domínio estrutural (numeração indicada acima da figura) juntamente com os limites dos aminoácidos de cada éxon (numeração indicada abaixo) (CASSEREAU et al., 2011b).

Figura 1-1: Representação esquemática da proteína GDAP1
Fonte: Adaptado de (CASSEREAU et al., 2011b).

A proteína GDAP1 está localizada na membrana externa da mitocôndria e tem papel na fissão mitocondrial por interagir com DRP1 e FIS1, proteínas que estão envolvidas nesse processo de uma forma ainda desconhecida (BERTHOLET et al., 2016; NIEMANN et al., 2005). Shield et al. (2006), sugere que GDAP1 também tem um papel na proteção da mitocôndria contra danos oxidativos, como ROS, que podem ser gerados pela própria respiração mitocondrial.

As mitocôndrias são organelas dinâmicas que estão em constante movimento dentro das células, e sofrendo fusão e fissão. Esses dois mecanismos são fundamentais na regulação do formato, tamanho, número, transporte ao longo dos axônios e interação das mitocôndrias com outras organelas, como por exemplo, o retículo endoplasmático (PAREYSON et al., 2015). Estudos genéticos realizados nas leveduras e em células de mamíferos mostraram que quando este equilíbrio é perturbado experimentalmente, mudanças drásticas na forma mitocondrial podem ocorrer. Foi demonstrado que quando as células possuem uma elevada taxa de fusão em relação à fissão elas consequentemente têm poucas mitocôndrias, e que estas mitocôndrias são alongadas e altamente interligadas. Por outro lado, as células com uma baixa taxa de fusão em relação à fissão tem numerosas mitocôndrias, que são pequenas esferas ou hastes curtas que são muitas vezes chamadas de "mitocôndrias fragmentadas" (DETMER; CHAN, 2007).

Além disso, seu posicionamento na célula é de extrema importância, pois elas precisam estar em locais onde há um maior consumo de ATP (BERTHOLET et al., 2016; PAREYSON et al., 2015). Os neurônios são células altamente energéticas, possuem alta quantidade de mitocôndrias, principalmente ao longo dos axônios e seu correto funcionamento e distribuição são fundamentais para o sistema nervoso periférico (PAREYSON et al., 2015). Anormalidades na dinâmica mitocondrial produzidas por mutações em proteínas envolvidas na fusão mitocondrial (*MFN2*), fissão (*GDAP1*) e transporte axonal (*NEFL*) das mitocôndrias são causas de CMT (NIEMANN et al., 2005; PAREYSON et al., 2015; SHIELD; MURRAY; BOARD, 2006). Porém, o mecanismo pelo qual *GDAP1* regula a morfologia mitocondrial ainda não está claro (SHIELD; MURRAY; BOARD, 2006).

GDAP1 é expresso por neurônios motores e sensitivos do sistema nervoso periférico bem como pelas células de Schwann, sugerindo que ambos os tipos celulares são diretamente afetados quando há alterações na proteína. Ele também é

expresso no sistema nervoso central, mas até o momento não foi descrito nenhum fenótipo característico de envolvimento do mesmo (NIEMANN et al., 2005).

Mutações no *GDAP1* são responsáveis por várias formas de CMT, incluindo: (i) CMT4A, o subtipo desmielinizante recessivo mais frequente (BAXTER et al., 2002); (ii) AR-CMT2, um subtipo axonal recessivo (CUESTA et al., 2002); (iii) CMTRIA, um subtipo recessivo intermediário (SENDEREK et al., 2003); (iv) e CMT2K, um subtipo dominante e raro (CASSEREAU et al., 2009).

1.3 *GDAP1* E A DOENÇA DE CHARCOT-MARIE-TOOTH

Como mencionado anteriormente, mutações no *GDAP1* são responsáveis tanto por formas desmielinizantes de CMT quanto por formas axonais e intermediárias, podendo possuir tanto herança autossômica dominante como autossômica recessiva.

Atualmente, são conhecidas mais de 61 mutações neste gene sendo que, 61% são *missense*, 15% *nonsense*, 18% *frameshift* e 6% são mutações em regiões de *splicing*, que se distribuem ao longo de toda a sequência do gene/proteína e em diferentes éxons e/ou domínios funcionais (STENSON et al., 2014).

As formas recessivas de CMT envolvendo mutações em *GDAP1* são severas, com um início precoce, geralmente durante a primeira década de vida. A progressão da doença é rápida, levando os pacientes a uma incapacidade funcional, podendo perder completamente os movimentos distais e fazer uso de cadeiras de rodas antes da segunda década de vida. Outras características clínicas sugestivas de mutação no *GDAP1* são a presença de rouquidão na voz, devido a paresia das cordas vocais, paralisia do diafragma e fraqueza facial. (BERTHOLET et al., 2016; CASSEREAU et al., 2011b; PAREYSON et al., 2015).

Alguns estudos mostraram que 80% dos pacientes que apresentam paresia de cordas vocais carregam pelo menos uma mutação truncada e que a mutação Q163* está presente em 40% dos casos. Mutações *missense* que foram, até então, relacionadas a paresia de corda vocal são P78L, R120Q, P153L, Y279C e R310Q (CASSEREAU et al., 2011b).

A herança dominante é mais rara, e foi relatada em alguns casos como por exemplo, as mutações R120W, T157P, Q218E e C240Y. Estas formas dominantes, que são mais brandas que as recessivas, são associadas com um início mais tardio (depois da segunda década) e tem progressão lenta. Nestes casos os pacientes podem ser capazes de andar, mesmo após a quarta década de vida. Entretanto, a mutação T157P que afeta o $\alpha 4$ - $\alpha 5$ loop, está associada a um fenótipo severo, caracterizada por um início precoce e pela presença de atrofia óptica, sugerindo um defeito mitocondrial adicional (CASSEREAU et al., 2011b).

No entanto, existe, uma grande variabilidade clínica entre os pacientes que possuem as mesmas mutações, incluindo pacientes de uma mesma família (BERTHOLET et al., 2016; CASSEREAU et al., 2011b).

Na tentativa de estabelecer uma relação genótipo-fenótipo estudos mostraram que algumas mutações *missense* estão associadas a casos mais graves da doença, onde há necessidade precoce do uso de cadeiras de rodas, em geral antes da segunda década de vida, sendo elas: P78L, P153L, R161H e Y279C. Curiosamente, duas das mutações, isto é, P153L e R161H, afetam o domínio $\alpha 4$ - $\alpha 5$ loop que parece ter um papel importante na função de GDAP1. Os aminoácidos P78 e Y279 estão localizados nos domínios GST-N e GST-C respectivamente (CASSEREAU et al., 2011b).

Recentemente, dois grupos relataram a caracterização de camundongos nocaute para *GDAP1* contando com a exclusão dos éxons 1 ou 5, onde se observou neuropatias com diferentes características. A deleção do éxon 5 provocou uma neuropatia de início tardio e desmielinizante, caracterizada por uma redução da velocidade de condução nervosa e hipomielinização e sem perda axonal detectável (NIEMANN et al., 2014). Em contraste, a deleção do éxon 1 provocou uma neuropatia de início precoce com características eletrofisiológicas e histopatológicas de CMT axonal semelhantes a AR-CMT2 (BARNEO-MUÑOZ et al., 2015).

Mutações no *GDAP1* são frequentemente relacionadas a herança recessiva, axonal ou desmielinizante (AR-CMT2 ou CMT4) e mais raramente às formas dominantes (CMT2K) ou intermediárias (CMTI) (CASSEREAU et al., 2011b).

Ademais, como mencionado anteriormente, as neuropatias recessivas são de diagnóstico molecular mais desafiadores, são mais graves e tem rápida progressão.

Os diagnósticos moleculares são de extrema importância para a prática clínica pois estabelece um diagnóstico de certeza permitindo uma melhor discussão da evolução clínica da doença, a realização de um aconselhamento genético para o paciente e familiares, informação prognóstica, auxilia na determinação de melhores correlações entre genótipo e fenótipo e futuras opções terapêuticas (JANI-ACSADI; KRAJEWSKI; SHY, 2008; KRAJEWSKI; SHY, 2004; SZIGETI; NELIS; LUPSKI, 2006).

Neste contexto, faz-se necessário estudar um maior número de casos de pacientes com CMT envolvendo mutações em *GDAP1*, juntamente com os dados clínicos, patológicos e de eletrofisiologia detalhados, para estabelecer uma relação de confiança entre o genótipo e o fenótipo das diferentes formas da doença.

2. OBJETIVOS

Investigação mutacional do gene *GDAP1* em uma amostra da população brasileira com quadro clínico de CMT, classificados nas seguintes subcategorias da doença: (i) desmielinizante recessivo (CMT4A); (ii) axonal recessivo (AR-CMT2); (iii) axonal dominante (CMT2K); (iv) CMT intermediário (CMTI); (v) e casos esporádicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo passou por análise e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP), de acordo com o processo de HCRP nº 12219/2004.

3.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

3.2.1 Pacientes

Foram estudados 103 pacientes com diagnóstico clínico de CMT, que estavam em seguimento no Ambulatório de Doenças Neurogenéticas (ANGE) do HC-FMRP - USP. Mutações nos genes *PMP22*, *MPZ*, *MFN2* e *GJB1* foram previamente excluídas.

3.2.2 Grupo controle

Para o grupo controle foram utilizados 100 DNAs de indivíduos brasileiros não acometidos por neuropatia, cuja família não apresentou histórico de doença neuromuscular.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Coleta de Sangue

Após a assinatura do termo de consentimento informado, foram coletados aproximadamente 10 mL de sangue dos pacientes para o estudo, utilizando-se o sistema de coleta a vácuo em tubos Vacutainer™ com anticoagulante EDTA.

3.3.2 Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído no Centro de Medicina Genômica localizado no HC-FMRP, utilizando-se o seguinte protocolo recomendado pelo Maxwell® 16 Blood DNA Purification Kit (Promega):

As amostras de sangue total foram centrifugadas 2.000 g, durante 20 minutos, originando a separação do material em três camadas: (i) uma camada inferior contendo principalmente glóbulos vermelhos; (ii) uma camada superior de plasma; (iii) e uma camada branca fina na interface, conhecida por camada leucoplaquetária, a qual foi colhida cuidadosamente e utilizada como protocolo de processamento.

O DNA foi extraído da camada leucoplaquetária de forma automatizada, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. O método foi utilizado em conjunto com o equipamento Maxwell® 16 Instrument, o que automatiza o processo de purificação de ácidos nucleicos de até 16 amostras, utilizando lise celular com subsequente ligação de partículas de sílica magnetizadas a ácidos nucleicos como princípio de separação primário.

Após essa etapa, é feita a seleção do protocolo de processamento. Conforme solicitado no instrumento Maxwell® 16, as amostras são colocadas nos cartuchos de reagente que, logo após, são colocados na plataforma do instrumento Maxwell® 16. Em seguida, o instrumento foi inicializado, efetuando automaticamente todos os procedimentos do protocolo. Os passos automatizados efetuados pelo sistema Maxwell® 16 incluem: i) lise da amostra na presença de um agente caotrópico e detergente; (ii) ligação dos ácidos nucleicos a partículas de sílica magnetizadas; (iii)

lavagem das partículas ligadas, isolando-as dos outros componentes celulares; (iv) e eluição de ácidos nucleicos.

3.3.3 Seleção dos Primers

Os *primers* utilizados na análise para pesquisa de mutações no gene *GDAP1* foram os mesmos descritos por Cuesta e col. (2002), como mostrados na Tabela 3-1. Posteriormente, as sequências foram conferidas usando-se uma ferramenta de PCR *in silico* através do site University of California, Santa Cruz (UCSC) (KENT et al., 2002).

Tabela 3-1: Sequência de primers do *GDAP1*.

		Primers	Temperatura de <i>Anneling</i>
ÉXON 1	1F*	CGC CCT CCT TCC GGC AGG TAC C	59°C
	1R*	GCC CGA TCC GCG CCA CCC TCC G	59°C
ÉXON 2	2F	GGC TGC TTA GCG GTG TCC AGG G	60°C
	2R	GGG AAC ACA TAG TTG TGT TG	60°C
ÉXON 3	3F	GCT TTT GAG TGT AAC AAC TCA TG	62°C
	3R	GAC CAT GAG ACA TGC TAG GTC	62°C
ÉXON 4	4F	CAG GGT AAG CCC AAG GCA GAG	61°C
	4R	GTA GAA CAT TTA CTC CGT GCA G	61°C
ÉXON 5	5F	GGC TGA ACT CTG TAA GAG TTT G	51,5°C
	5R	GAC CTA AGA ATG TTC CCA TG	51,5°C
ÉXON 6	6F	GAG ACC ACT GAT ACC AGC TGG	62°C
	6R	CAG AGA GCC ACG GGC AAT CAC	62°C

*F (forward); R (reverse).

3.3.4 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Para realização da PCR foi utilizado o kit da enzima HotStart® DNA Polymerase (Quiagen) e o protocolo utilizado para sua realização está representado na Tabela 3-2, seguido do perfil térmico (Tabela 3-3) que foi utilizado para todos os 6 éxons do gene *GDAP1*.

Tabela 3-2: Protocolo de PCR.

Éxon / Reagentes	1	2	3	4	5	6
H2O free Dnase (μL)	12,75	12,75	12,75	12,75	12,75	12,75
10 x PCR Buffer (μL)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
5x Q – Solution (μL)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
dNTPs (μL/200 mM)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Primer F (10 μM/μL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Primer R (10 μM/μL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
MgCl2 (μL/50mM)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
HotStarTaq DNA Polymerase (5U/μL)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5	0,25
DNA (20ng/μL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Tabela 3-3: Perfil térmico da PCR.

Temperatura	Tempo	Ciclos
95°C	5'	30X
95°C	30"	
T.A*	30"	
72°C	30"	
72°C	7'	
4°C	∞	

*T.A. Temperatura de *Anneling*. Está representada na Tabela 3-1.

3.3.5 Reação de Sequenciamento

As amostras foram preparadas com o kit de reação BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) na placa MicroAmp® Optical 96-Well. O protocolo e

o perfil térmico utilizado para realização da reação encontram-se nas Tabelas 3-4 e 3-5.

Tabela 3-4: Protocolo da PCR de sequenciamento.

Reagentes	Volume
H ₂ O	5,5 µl
Buffer	2,0 µL
BigDye Terminator v3.1	1,0 µL
Primer F/R	0,5 µL
Produto PCR	1,0 µL
Volume final	10,0 µL

Tabela 3-5: Perfil térmico da PCR de sequenciamento.

Temperatura	Tempo	Ciclos
96°C	2'	
96°C	30"	33X
50°C	15"	
60°C	4'	
72°C	7'	
4°C	∞	

3.3.6 Precipitação e purificação da Reação de Sequenciamento

O produto da reação de PCR de sequenciamento foi precipitado adicionando-se a cada poço uma mistura de 1,5 µl de EDTA mais 1,0 µl de acetato de sódio. Após leve homogeneização adicionou-se 30 µl de etanol 100% e, em seguida a placa foi levemente agitada no vórtex e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente sob proteção da luz. Após centrifugação por 30 minutos a 3.000 RPM (Centrífuga Sigma 2-6), o sobrenadante foi descartado em papel limpo e, posteriormente, o precipitado foi lavado com 35 µl de etanol 70% a 4°C. Imediatamente após essa etapa, a placa foi submetida a centrifugação de 2.500 RPM por 15 minutos para precipitação dos fragmentos. O etanol foi removido por um leve *spin* em papel limpo e depois submetido a evaporação no termociclador a 95°C por 5 minutos. O precipitado foi ressuspendido com 10 µL de formamida, em seguida desnaturado a 95°C por 5 minutos e logo depois,

colocado no gelo por no mínimo 2 minutos. Em seguida a placa era colocada no equipamento ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems).

3.3.7 Análise das sequências

As imagens dos eletroferogramas e a sequência dos nucleotídeos foram analisadas através de dois programas, o Software v5.3.1 Sequencing Analysis (Applied Biosystems) e do SeqMan (Lasergene – DNASTar®).

3.3.8 Nomenclatura

Todas as alterações encontradas no presente trabalho, foram nomeadas de acordo com as diretrizes da Human Genome Variation Society (HGVS) (DEN DUNNEN; ANTONARAKIS, 2000). A numeração dos nucleotídeos foi baseada na sequência de referência NM_018972.2 (RefSeq: NM_018972.2).

Além disso, foi utilizada uma ferramenta de bioinformática, disponível online, que foi projetada para confirmar as descrições das variantes levando em consideração as normas da HGVS chamada Mutalyzer (WILDEMAN et al., 2008).

3.3.9 Bioinformática

3.3.9.1 Estudo *in silico*

Para todas as alterações encontradas no trabalho, mesmo para aquelas que já haviam sido descritas na literatura, foram realizados estudos *in silico*, utilizando-se de ferramentas de bioinformática para a predição de patogenicidade.

Os programas utilizados foram SIFT, Polyphen2 e Mutationtaster que se utilizam de diferentes algoritmos para fazer essa predição.

O SIFT (Sorting Tolerant From Intolerant) baseia-se na conservação evolutiva dos aminoácidos dentro da família de proteínas, utilizando-se da homologia de sequências

em bancos de dados. Posições altamente conservadas tendem a ser intolerantes a substituição, ao passo que aqueles com baixo grau de conservação tolerariam mais essas substituições. Com base nisso, desenvolveu-se um algoritmo, onde resultados quanto mais próximos de zero, mais deletério será a alteração encontrada (KUMAR; HENIKOFF; NG, 2009).

PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) utiliza-se de informações estruturais da proteína e faz comparações evolutivas. Com base nisso, desenvolveu-se um algoritmo, que ao contrário do SIFT, resultados quanto mais próximos de um (1), mais deletério será a alteração encontrada (ADZHUBEI; JORDAN; SUNYAEV, 2013).

Mutationtaster integra informações de diferentes bancos de dados biomédicos e se utiliza de ferramentas de análises estabelecidas. A análise baseia-se na conservação evolutiva, alterações em regiões de *splicing*, perda de função da proteína e mudanças na expressão gênica (SCHWARZ et al., 2010).

3.3.9.2 *Estudo de Frequência em bancos de dados populacionais*

O ExAC (*Exome Aggregation Consortium*) é uma coligação de pesquisadores que buscam consolidar os dados de vários projetos de sequenciamento de exomas, e torna-los públicos para toda a comunidade científica. O conjunto de dados envolvidos nesse site abrange 60.706 indivíduos não relacionados que foram sequenciados como parte de vários estudos genéticos de doenças específicas na população. Foram removidos indivíduos afetados por doença pediátrica grave pois acreditam que assim estariam excluindo indivíduos afetados por doenças mendelianas de início na infância (LEK et al., 2016).

Também foram realizadas pesquisas nos bancos de dados, como o 1000 *Genomes* e NHLBI *Exome Sequencing Project* (ESP) do *National Heart, Lung, and Blood Institute*. Ambos são projetos de exoma, que já foram finalizados e que contribuíram com dados para a realização do projeto ExAC. O 1000 *Genomes* sequenciou 2.504 indivíduos de 26 diferentes populações, e os dados podem ser obtidos através do site do *European Bioinformatics Institute* (EBI)/Ensembl (YATES et al., 2015). Já o projeto ESP, sequenciou 6.503 indivíduos e os dados podem ser obtidos através do site do *Exome Variant Server*, NHLBI (EXOME VARIANT SERVER, 2011)

3.3.9.3 Banco de dados e sites utilizados

A Tabela 3-6 mostra os bancos de dados e sites de bioinformática utilizados nesse trabalho para consulta e análise das informações obtidas no estudo.

Tabela 3-6: Sites utilizados.

BANCOS DE DADOS / PROGRAMAS PARA ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	
SEQUÊNCIA	https://genome.ucsc.edu/ http://www.genatlas.org/ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/ http://www.ensembl.org/index.html
NOMENCLATURA	http://varnomen.hgvs.org/ https://mutalyzer.nl/
POPULACIONAIS	http://exac.broadinstitute.org/ http://evs.gs.washington.edu/EVS
DOENÇA/MUTAÇÃO	http://www.omim.org/ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/ http://www.hgmd.org https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=54332 http://mitodyn.org/home.php?select_db=GDAP1 http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/Mutations/Mutations.cfm?Context=20
PROTEÍNA	http://www.uniprot.org/
PROGRAMAS DE PREDIÇÃO	http://www.mutationtaster.org - Mutationtaster http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2 - Polyphen2 http://sift.jcvi.org - SIFT

4. RESULTADOS

Foi feito um *screening* mutacional para o gene *GDAP1* em 103 pacientes com diagnóstico clínico sugestivo de CMT, classificados nos diferentes subtipos da doença, como mostrado na Tabela 4-1, que estavam em seguimento no ANGE do HC-FMRP, onde alterações nos genes *PMP22*, *MFN2*, *MPZ* e *GJB1* já haviam sido previamente excluídas.

Tabela 4-1: Classificação dos pacientes com CMT na população de estudo.

<i>Classificação</i>	<i>Quantidade de Pacientes</i>
CMT AR	13
CMT Esporádico	6
CMT2	41
CMT2 AR	16
CMT4	20
CMTi	7
Total	103

Dos 103 pacientes sequenciados, 13 indivíduos, incluindo pacientes e familiares apresentaram alterações no gene *GDAP1*, perfazendo um total de 6 pacientes índices, com os seguintes códigos: CMT8594, CMT9379, CMT9671, CMT10286, CMT11317 e CMT11473.

Foram encontradas um total de 5 diferentes alterações sendo elas: c.191A>G (p.N64S), c.355C>A (p.P119T), c.373C>T (p.R125*), c.487C>T (p.Q163*) e c.620A>C (p.K207T). Três delas ainda não foram descritas na literatura e duas já haviam sido descritas anteriormente. Além disso, um polimorfismo silencioso bem comum c.507T>G (p.S169S) foi detecta com alta frequência tanto nos pacientes quanto na população controle.

Para a interpretação e classificação das novas variantes, seguimos alguns dos critérios recomendados pelo *American College of Medical Genetics* (ACMG) e a *Association for Molecular Pathology* (AMP).

4.1 PACIENTE CMT8594

A paciente CMT8594 é do sexo feminino, filha de pais normais e não consanguíneos, nasceu de parto normal, a termo, sem intercorrências na gravidez. Iniciou um quadro de vômito frequente por volta dos 3 meses, falou na idade esperada e andou por volta de 1 ano e 4 meses. Desde o início da marcha, os pais notaram uma certa dificuldade e que os pés eram tortos. Fez uso de botas ortopédicas. A piora da marcha foi progressiva e acentuada, estando atualmente limitada a uma cadeira de rodas. Veio apresentando declínio progressivo da cognição.

Ao exame: Restrita à cadeira de rodas. Pés cavos. Sensibilidades tátil e dolorosa diminuídas até próximo ao joelho e porção média do antebraço, estando a vibratória diminuída até os joelhos, e punho.

Ao exame da motricidade, observa-se acentuada atrofia distal nos membros inferiores (MMII) e superiores (MMSS); extensão e flexão das pernas 3/5 e flexão dos quadris 4/5; enquanto nos membros superiores os músculos ADM e extensor indicis proprius são 0/5, o APB é 1/5, a flexão e extensão dos punhos 4-/5 e os músculos proximais são 4/5. Flexão e extensão do pescoço são normais. Abolição dos reflexos profundos e ausência do reflexo de Babinski e do sinal de Hoffmann.

O estudo da coordenação é prejudicado nos membros inferiores e é normal nos superiores. Nenhuma alteração foi observada nos nervos cranianos e nem na fala. Sudorese excessiva nas mãos e nos pés.

O exame clínico dos pais é normal, enquanto a eletroneuromiografia (ENMG) da mãe também é normal e a do pai não foi realizada.

A eletroneuromiografia mostrou uma neuropatia axonal sensitivo motora grave, sendo os potenciais de ação sensitivos (PAS) ausentes nos membros superiores e inferiores, enquanto o potencial de ação muscular composto (PAMC) estavam ausentes nos membros inferiores e apresentavam acentuada redução da amplitude nos membros superiores, com preservação das respectivas velocidades de condução (nervo mediano: amplitude = 290 μ V, VC = 56 m/s; nervo ulnar: amplitude = 320 μ V, VC = 58.9 m/s). Tem uma prova de função pulmonar normal.

Após sequenciamento do gene *GDAP1*, foi detectada uma alteração *missense* em heterozigose no éxon 5 onde há a transversão do nucleotídeo A para C na posição 620 (c.620A>C), resultando na troca do aminoácido Lisina para Treonina na posição 207 (p.K207T). Sua mãe foi positiva para a mesma mutação em heterozigose, como mostrado nos eletroferogramas abaixo. A alteração localiza-se na região GST-C terminal da proteína (CASSEREAU et al., 2011c). Essa alteração ainda não foi descrita na literatura e através da análise *in silico*, essa variante mostrou-se como possivelmente patogênica nos três programas, apresentando os seguintes resultados: Polyphen2 (0,999), SIFT (0,99) e Mutationtaster (*disease causing*).

Figura 4-1: Eletroferograma da paciente CMT8594 mostrando a alteração K207T em heterozigose no éxon 5.

Figura 4-2: Eletroferograma da mãe da paciente CMT8594 mostrando a alteração K207T em heterozigose no éxon 5.

Figura 4-3: Eletroferograma do éxon 5 da amostra controle.

4.2 PACIENTE CMT9379

O paciente CMT9379 é do sexo masculino, filho de pais normais e não consanguíneos. Ele apresentou desenvolvimento motor normal até 1 ano de idade, quando começou a arrastar os pés que também foram ficando invertidos. Começou a apresentar dificuldades progressiva para deambular e a ter quedas frequentes. Seu quadro clínico vem piorando gradativamente.

Ao exame: Marcha escarvante, sendo impossível andar nos calcanhares. Sensibilidade aparentemente preservada. Fraqueza distal nos membros inferiores (3/5) e superiores (4/5), sendo normal proximalmente. Reflexos aquileus ausentes, sendo os demais normais. Atrofia distal nos MMII e mãos. Coordenação e equilíbrio preservados. Cognição normal.

A eletroneuromiografia mostrou uma neuropatia axonal sensitivo motora com preservação da velocidade de condução (nervo mediano: amplitude = 2300 μ V; VC = 50 m/s).

Após o sequenciamento do gene *GDAP1*, foram identificadas duas alterações *missense* em heterozigose composta no paciente, uma localizada no éxon 2, onde há a transição na posição 191 do nucleotídeo A para G (c.191A>G) resultando na troca do aminoácido Asparagina por Serina na posição 64 (p.N64S) e outra localizada no éxon 3 onde há a transição do nucleotídeo C para T na posição 373 (c.373C>T), que resulta em um prematuro *stop codon* substituindo o aminoácido Arginina na posição 125 (p.R125*). A alteração N64S encontra-se localizada na porção GST-N terminal da proteína GDAP1, enquanto que a alteração R125* está localizada entre a região GST-N terminal e o domínio α 4- α 5 *loop* (CASSEREAU et al., 2011c).

O DNA dos pais também foi sequenciado, eles eram saudáveis, porém cada um era portador em heterozigose de uma das alterações presentes na paciente. A alteração R125* estava presente no DNA da mãe e a alteração N64S estava presente no DNA do pai, como mostrado nos eletroferogramas abaixo.

A variante N64S, ainda não foi descrita na literatura e os resultados das análises *in silico*, mostraram que ela comportou-se como possivelmente patogênica nos programas Polyphen2 (0,785) e Mutationtaster (*disease causing*) e tolerada no

programa SIFT (0,46). Já a mutação R125* foi descrita como sendo uma mutação patogênica que causa Charcot-Marie-Tooth do tipo axonal autossômica recessiva (AR-CMT2).

Figura 4-4: Eletroferograma do paciente CMT9379 mostrando a alteração N64S em heterozigose no éxon 2.

Figura 4-5: Eletroferograma éxon 2 da amostra controle.

Figura 4-6: Eletroferograma do paciente CMT9379 mostrando a alteração R125* em heterozigose no éxon3.

Figura 4-7: Eletroferograma do éxon 3 da amostra controle.

Figura 4-8: Eletroferograma do pai do paciente CMT9379 mostrando a alteração N64S em heterozigose no éxon 2.

Figura 4-9: Eletroferograma da mãe do paciente CMT9379 mostrando a alteração R125* em heterozigose no éxon 3.

4.3 PACIENTE CMT9671

A paciente CMT9671 é do sexo feminino e têm 28 anos. Filha de pais normais e não consanguíneos, têm uma irmã normal e não há relato de casos semelhantes na família. Os primeiros sintomas se iniciaram aos 3 anos. A eletroneuromiografia mostrou uma neuropatia axonal sensitivo motora grave, sendo os PAS ausentes nos membros superiores, enquanto os PAMC têm acentuada redução da amplitude nos membros superiores, com redução das respectivas velocidades de condução (nervo mediano: amplitude = 138 μ V, VC = 38.1 m/s; nervo ulnar: amplitude = 529 μ V, VC = 33.3 m/s).

Após o sequenciamento do gene *GDAP1*, foram identificadas duas alterações de ponto em heterozigose composta, uma localizada no éxon 3 onde há a transversão do nucleotídeo C para A na posição 355 (c.355C>A), resultando na troca do aminoácido Prolina na posição 119 por Treonina (p.P119T) e a outra localizada no éxon 4, que resulta em um prematuro *stop codon* na posição 163 da proteína substituindo o aminoácido selvagem Glutamina (p.Q163*) onde há a transição do nucleotídeo C para T na posição 487 (c.487C>T), como mostrado nos eletroferogramas abaixo. A alteração P119T está localizada na região GST-N terminal e a alteração Q163* está localizada no domínio α 4- α 5 *loop* de GDAP1.

Não foi possível fazer o estudo de segregação das mutações nesta família.

A alteração P119T ainda não foi relacionada ao fenótipo de CMT na literatura e os resultados das análises *in silico* mostraram que essa variante comportou-se como patogênica apenas no programa Mutationtaster (*disease causing*) e tolerada nos

programas SIFT (0,61) e Polyphen2 (0,003). Já a mutação Q163* foi descrita anteriormente como patogênica e relacionada à CMT.

Figura 4-10: Eletroferograma da paciente CMT9671 mostrando a alteração P119T em heterozigose no éxon 3.

Figura 4-11: Eletroferograma do éxon 3 da amostra controle.

Figura 4-12: Eletroferograma da paciente CMT9671 mostrando a alteração Q163* em heterozigose no éxon 4.

Figura 4-13: Eletroferograma éxon 4 da amostra controle.

4.4 PACIENTE CMT10286

A paciente CMT10286 é do sexo feminino e filha de pais consanguíneos. Nasceu de parto normal, sem intercorrências. Desde o nascimento ela apresentou um certo grau de hipotonia, tendo iniciado a marcha somente aos 10 anos e apresentando frequentes quedas. Ao longo dos anos, foi se instalando fraqueza progressiva, que se iniciou na região distal e progrediu para as regiões proximais, tanto nos membros inferiores como nos membros superiores. Também apresenta atrofia e deformidades nos pés e nas mãos e já foi submetida a cirurgia dos mesmos.

A marcha foi piorando gradativamente, e a partir dos 12 anos tornou-se cadeirante durante a maior parte do tempo. Nesse mesmo período também começou a apresentar fraqueza diafragmática, tendo sido submetida à plicatura do músculo diafragma.

Ao exame: paciente obesa, cadeirante, com muita dificuldade para ficar ereta sem auxílio. Sensibilidade vibratória ausente distalmente nos membros inferiores e diminuída nos membros superiores, enquanto a tátil e a dor está diminuída tanto nos MMII como nos MMSS.

A força muscular, nos MMII é de 0/5 para flexão/extensão dos pés, 1/5 para flexão/extensão das pernas e 3/5 proximalmente; nos MMSS, APB e ADM = 0/5, flexão/extensão punho = 0/5, pronação e supinação = 3/5, sendo 4/5 proximalmente. Os reflexos profundos estão todos abolidos.

A eletroneuromiografia mostrou uma neuropatia axonal sendo que os PAMC estavam todos ausentes, enquanto os PAS, nos membros superiores apresentam acentuada redução das respectivas amplitudes, com velocidades de condução discreta a moderadamente reduzidas (N. Mediano: 0,9 μ V, 36,0 m/s; n. Ulnar: 1,0 μ V, 42,0 m/s; n. Radial: 2,2 μ V, 39,5 m/s).

Após o sequenciamento do gene *GDAP1*, foi identificada uma alteração em homozigose no éxon 4, onde há a transição do nucleotídeo C para T na posição 487 (c.487C>T), que resulta em um prematuro *stop codon* na posição 163 da proteína substituindo o aminoácido selvagem Glutamina (p.Q163*). O DNA dos pais também foram sequenciados, e cada um era portador em heterozigose da alteração presente

na paciente. Segue abaixo as imagens dos eletroferogramas. A alteração Q163* está localizado no domínio $\alpha 4$ - $\alpha 5$ loop de GDAP1.

A mutações encontrada, em homozigose, é considerada como responsável pela neuropatia desta paciente.

Figura 4-14: Eletroferograma da paciente CMT10286 mostrando a alteração Q163* em homozigose no éxon 4.

Figura 4-15: Eletroferograma da mãe da paciente CMT10286 mostrando a alteração Q163* em heterozigose no éxon 4.

Figura 4-16: Eletroferograma do pai da paciente CMT10286 mostrando a alteração Q163* em heterozigose no éxon 4.

Figura 4-17: Eletroferograma éxon 4 da amostra controle.

4.5 PACIENTE CMT11317

A paciente CMT11317 é do sexo feminino, filha de pais normais e não consanguíneos. Nasceu de parto cesárea, a termo de uma gravidez sem intercorrências. Falou com 11 meses, sentou por volta dos 5-6 meses, engatinhou com 10-11 meses e andou com 1 ano e 7 meses. Desde o início da marcha os pais notaram que os pés estavam entortando e que a marcha era diferente. Aos 3 anos e 5 meses foi submetida à cirurgia nos pés e entre os 4-5 anos começou a fazer o uso de órteses. Deambula com grande dificuldade, com o tronco inclinado para a frente. Não tinha alterações esfincterianas de deglutição ou respiratórias. Nega dor neuropática.

O quadro veio piorando gradativamente e aos 6 anos foi observado dificuldade com o uso das mãos. Passou a usar órteses para os membros inferiores, inclusive no período noturno. Mesmo com o uso de órteses, cai muito.

Ao exame: Deambula com o uso de órteses rígidas bilateralmente. Sem as órteses, tem grande dificuldade para deambular, sendo impossível a marcha em tandem. Muita instabilidade. Pés rígidos (cirurgia), cavos, com dedos em martelo e mãos em garra. Sensibilidades tátil e dolorosa diminuídas até próximo ao joelho e porção média do antebraço, estando a vibratória diminuída até os joelhos, e punho.

Ao exame da motricidade, observa-se acentuada atrofia distal nos membros inferiores e superiores; extensão e flexão das pernas 3/5 e flexão dos quadris 4/5; enquanto nos membros superiores os músculos ADM e extensor indicis proprius são 0/5, o APB é 1/5, a flexão e extensão dos punhos 4-/5 e os músculos proximais são 4/5. Flexão e extensão do pescoço são normais. Os reflexos profundos estão todos ausentes, o estudo do reflexo cutâneo plantar está prejudicado pela falta de movimento e o sinal de Hoffmann está ausente.

O estudo da coordenação é prejudicado nos membros inferiores e é normal nos superiores. Nenhuma alteração foi observada nos nervos cranianos e nem na fala. Apresenta sudorese excessiva nas mãos e nos pés. O exame clínico dos pais é normal, sendo que a ENMG da mãe também é normal e a do pai não foi realizada.

A eletroneuromiografia mostrou uma neuropatia axonal sensitivo motora grave, sendo que os PAS estavam ausentes nos membros superiores e inferiores, enquanto os PAMC estavam ausentes nos membros inferiores e apresentavam acentuada redução da amplitude nos membros superiores, com preservação das respectivas velocidades de condução (Nervo mediano: amplitude = 290 μ V, VC = 56 m/s; nervo ulnar: VC = amplitude = 320 μ V, VC = 58.9 m/s).

Tem uma prova de função pulmonar normal.

Após o sequenciamento do gene *GDAP1*, foram identificadas duas alterações de ponto em heterozigose composta, uma localizada no éxon 3 onde há a transversão do nucleotídeo C para A na posição 355 (c.355C>A), resultando na troca do aminoácido Prolina na posição 119 por Treonina (p.P119T) e a outra localizada no éxon 4, que resulta em um prematuro *stop codon* na posição 163 da proteína substituindo o aminoácido selvagem Glutamina (p.Q163*) onde há a transição do nucleotídeo C para T na posição 487 (c.487C>T). A alteração P119T está localizada na região GST-N terminal e a alteração Q163* está localizada no domínio α 4- α 5 *loop* de GDAP1.

O DNA dos pais também foi sequenciado, eles eram saudáveis, porém cada um era portador em heterozigose de uma das alterações presentes na paciente. A alteração P119T estava presente no DNA do pai e a alteração Q163* estava presente no DNA da mãe, como mostrado nos eletroferogramas abaixo.

Como mencionado anteriormente, (paciente CMT9671) a alteração P119T ainda não foi descrita na literatura e os resultados das análises *in silico* sugerem que ela seja tolerada nos programas SIFT e Polyphen2 e patogênica no Mutationtaster. Já a mutação Q163* já foi descrita anteriormente como patogênica e relacionada à CMT.

Figura 4-18: Eletroferograma da paciente CMT11317 mostrando a alteração P119T em heterozigose no éxon 3.

Figura 4-19: Eletroferograma do pai da paciente CMT11317, mostrando a alteração P119T em heterozigose no éxon 3.

Figura 4-20: Eletroferograma éxon 3 da amostra controle.

Figura 4-21: Eletroferograma da paciente CMT11317 mostrando a alteração Q163* em heterozigose no éxon 4.

Figura 4-22: Eletroferograma da mãe da paciente CMT11317, mostrando a alteração Q163* em heterozigose no éxon 4

Figura 4-23: Eletroferograma éxon 4 da amostra controle.

4.7 POLIMORFISMO SER169SER

Após análise molecular do gene *GDAP1* foi detectado um polimorfismo no éxon 4 onde há a transversão do nucleotídeo T para G na posição 507 (c.507T>G), resultando na troca silenciosa do aminoácido Serina na posição 169 (p.S169S). Esse polimorfismo apareceu em 56 dos nossos pacientes, sendo que 53 deles estavam em heterozigose (G/T) para a alteração e em 3 deles estavam em homozigose para a alteração (G/G). Na população controle, 52 pessoas apresentaram a alteração, sendo que 43 eram heterozigotos (G/T) e 9 eram homozigotos (G/G). A alteração, localiza-se no domínio $\alpha 4$ - $\alpha 5$ loop da proteína e já foi anteriormente mencionado na literatura como um polimorfismo não patogênico.

Na Tabela 4-2, estão sumarizadas as alterações encontradas nesse estudo e a Figura 4-25 ilustra a possível localização dessas alterações (em verde) nos domínios/éxons da proteína GDAP1.

Tabela 4-2: Características gerais das alterações encontradas.

Pacientes	Quadro clínico	Velocidade de condução	Idade de início	Mudança de aminoácido		Troca de Nucleotídeo		Descrito na literatura	
CMT8594	CMT2	56 m/s	12 meses?	p.K207T		c. 620A>C		NÃO	
CMT9379	CMT2 esp.	50 m/s	12 meses	p.N64S	p.R125*	c.191A>G	c.373C>T	NÃO	SIM
CMT9671	CMT2	38 m/s	48 meses	p.P119T	p.Q163*	c.355C>A	c.487C>T	NÃO	SIM
CMT10286	CMT2	36 m/s	0 meses	p.Q163*	p.Q163*	c.487C>T	c.487C>T	SIM	
CMT11317	CMT2	56 m/s	17 meses	p.P119T	p.Q163*	c.355C>A	c.487C>T	NÃO	SIM
CMT11473	AR-CMT2	60 m/s	36 meses	p.P119T		c.355C>A		NÃO

Figura 4-25: Representação esquemática da proteína GDAP1. Localização das mutações que causam CMT: intermediário (vermelho), desmielinizante (azul), axonal (preto) e as alterações encontradas nesse trabalho (verde).
Fonte: Adaptada de (NOACK, 2011).

5. DISCUSSÃO

Cerca de 61 alterações no gene *GDAP1* são responsáveis por causar diferentes formas de CMT (STENSON et al., 2014). Mutações nesse gene geralmente estão ligadas às formas recessivas da doença (CMT4 ou AR-CMT2) ou mais raramente às formas dominantes (CMT2K) e às formas intermediárias (CMTI), podendo também estar presente nos casos esporádicos (CASSEREAU et al., 2011b). A herança dominante geralmente causa um fenótipo mais moderado, associado a um início mais tardio da doença e uma progressão mais lenta. Já as formas recessivas de CMT devido a mutações no *GDAP1* têm início precoce, usualmente na primeira década de vida e uma rápida progressão, levando a uma incapacidade significativa antes dos 20 anos de idade. Os pacientes frequentemente necessitam de auxílio para andar e/ou fazem uso de cadeiras de rodas. Além disso, um outro sinal clínico característico de mutações nesse gene é a presença de paresia das cordas vocais e paralisia diafragmática, que não são achados patognomônicos mas sugere um diagnóstico de CMT4A (CASSEREAU et al., 2011b).

Nesta seção serão discutidos os resultados encontrados neste trabalho. Primeiramente, serão discutidas as mutações detectadas, sua localização na proteína, conservação filogenética, análises de bioinformática e prováveis consequências. Logo após, serão apresentados os resultados da genotipagem dos pacientes e correlação com dados apresentados na literatura. Finalmente, será feita uma discussão sobre a frequência das mutações no gene *GDAP1* na população brasileira.

5.1 MUTAÇÕES

5.1.1 Arg125Ter e Gln163Ter

As mutações R125* e Q163* são alterações *nonsense* que ocorrem na sequência de DNA e que resultam em um prematuro *stop codon* na cadeia de aminoácidos. Existem duas possíveis consequências de mutação por terminação prematura. Primeiro o RNAm que carrega a mutação prematura é frequentemente instável e não é possível a tradução ou segundo, mesmo que o RNAm seja estável o bastante para ser traduzido, a proteína truncada é usualmente tão instável que é rapidamente degradada dentro da célula (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2008).

Neste contexto, Cassereau et al. (2011b), baseado em dados da literatura, comparou a descrição de pacientes portadores de duas mutações truncadas em homozigose com pacientes que apresentavam mutações *missense* em homozigose ou a mutação truncada em heterozigose composta. Eles julgaram a gravidade da doença pela habilidade de andar sem suporte, pela necessidade do auxílio de órtese/muleta ou pela necessidade do uso de cadeiras de rodas. Eles observaram que todos pacientes com duas mutações truncadas necessitaram de auxílio para deambular antes dos 10 anos e de cadeira de rodas antes dos 30 anos de idade. Já os pacientes que carregam mutações truncadas em heterozigose, ou duas mutações *missense*, frequentemente eram capazes de deambular até os 30 anos de idade. Assim, dentre as formas recessivas da doença, pacientes que carregam duas mutações truncadas têm um fenótipo muito mais severo e uma progressão mais rápida quando comparados aos pacientes que carregam duas mutações *missense*.

A mutação R125* localiza-se no éxon 3, entre os domínios GST-N terminal e $\alpha 4$ - $\alpha 5$ *loop* enquanto que a Q163* está localizada no éxon 4 no domínio $\alpha 4$ - $\alpha 5$ *loop* da proteína GDAP1. Marco et al. (2004), mostrou que uma mutação *missense* em homozigose, resultante da alteração R161H que afeta o domínio $\alpha 4$ - $\alpha 5$ *loop* se manifesta com um fenótipo de CMT4A. Cassereau et al. (2011b) relatou que outras mutações *missense* que afetam o domínio $\alpha 4$ - $\alpha 5$ *loop* são responsáveis por produzir um fenótipo severo da doença, sugerindo que este domínio possa ter um papel importante na proteína.

A alteração R125* consta no banco de dados de SNPs (dbSNP) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sob referência *rs745663149* e já foi previamente relacionada ao fenótipo de CMT por Moroni et al. (2009) e Fusco et al. (2010). Informações sobre frequência desta variante na população mundial foram obtidas a partir do projeto Exome Aggregation Consortium (ExAC). Neste projeto, descreveu-se a presença de 3 alelos no qual o nucleotídeo T substitui o nucleotídeo selvagem C, num total de 121.390 alelos pesquisados. Isso representa uma frequência alélica de $2,47 \times 10^{-5}$ da variante na população geral, que é considerada muito baixa. Por meio de análises filogenéticas, foi possível confirmar que esta região é altamente conservada em diferentes espécies, como apresentado na Figura 5-1.

				R125		
	V	R	RY	SYR	S	K
Human	A	C	A	C	T	C
Chimpanzee	A	C	A	C	T	C
Gorilla	A	C	A	C	T	C
Orangutan	A	C	A	C	T	C
Vervet-AGM	A	C	A	C	T	C
Macaque	A	C	A	C	T	C
Olive baboon	A	C	A	C	T	C
Marmoset	A	C	A	C	T	C
Mouse	G	C	A	C	T	C
Rat	G	C	A	C	T	C
Rabbit	A	C	A	C	T	C
Cow	C	A	C	A	T	C
Zebra Finch	G	C	A	C	T	C

Figura 5-1: Conservação do nucleotídeo C mutado em R125* para diferentes espécies.

Fonte: Adaptado de Ensembl (2015).

A alteração Q163* também consta no banco de dados de SNPs (dbSNP) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sob referência *rs104894077*. Esta também já foi previamente relacionada ao fenótipo de CMT pelos autores (BOERKOEL et al., 2003; CLARAMUNT et al., 2005; CUESTA et al., 2002; MARTIN; MARADEI; VELASCO, 2015). Informações sobre frequência na população mundial foram obtidas a partir do projeto Exome Aggregation Consortium (ExAC), onde foi descrito a presença de 2 alelos no qual o nucleotídeo T substituindo o nucleotídeo selvagem C num total de 120.828 alelos pesquisados. Isso representa uma frequência alélica muito baixa de $1,65 \times 10^{-5}$ da variante na população geral. Através de análises filogenéticas, foi possível observar que a região onde houve a troca de nucleotídeos é uma região altamente conservada em diferentes espécies, como apresentado na Figura 5-2.

				Q163		
	Y	W	Y	R	Y	M
Human	A	T	T	A	T	C
Chimpanzee	A	T	T	A	T	C
Gorilla	A	T	T	A	T	C
Orangutan	A	T	T	A	T	C
Vervet-AGM	A	T	T	A	T	C
Macaque	A	T	T	A	T	C
Olive baboon	A	T	T	A	T	C
Marmoset	A	T	T	A	T	C
Mouse	A	T	T	A	T	C
Rat	A	T	T	A	T	C
Rabbit	G	T	T	A	T	C
Cow	A	T	T	A	T	C
Zebra Finch	T	T	T	A	T	C

Figura 5-2: Conservação do nucleotídeo C mutado em Q163* para diferentes espécies.

Fonte: Adaptado de Ensembl (2015).

Não foi possível fazer a predição de patogenicidade em todos os programas citados em materiais e métodos para essas variantes, pois a maioria dos programas *in silico* não conseguem analisar mutações *nonsense*. No entanto, ferramentas mais recentes, estão começando a abordar essas sequências (RICHARDS et al., 2015). Nos programas SIFT e Polyphen2 o *output* é NA (*not available*). Já o programa Mutationtaster consegue analisar esse tipo de mutação. Nos dois casos, ambas alterações R125* e Q163*, o resultado é dado como uma mutação conhecida patogênica, pois além de fazer a predição, o programa consegue fazer uma busca na literatura e identificar quando uma alteração já foi relacionada a uma doença em específico. As análises *in silico* dessas mutações foram feitas apenas para a confirmação da patogenicidade, pois elas já haviam sido descritas na literatura como patogênicas e relacionadas com o fenótipo de CMT.

Ademais, as mutações foram testadas em 100 controles normais e não foram encontradas em nem um dos 200 alelos.

5.1.2 Novas variantes

Foram encontradas um total de 3 novas alterações, sendo elas: N64S, P119T e K207T que ainda não foram descritas na literatura. Essas alterações apareceram na população de estudo em heterozigose ou heterozigose composta.

As alterações N64S e P119T localizam-se no domínio GST-N terminal da proteína enquanto que a alteração K207T localiza-se na região GST-C terminal. Segundo Marco et al. (2004), através de estudos evolutivos e análise estrutural do GDAP1, foi observado que os domínios GSTs são os mais conservados da proteína.

A alteração N64S consta no banco de dados de SNPs (dbSNP) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sob referência *rs769632836* e ainda não foi relacionado a nenhum fenótipo clínico. Informações sobre a frequência da alteração na população mundial estava presente no ExAC (Exome Aggregation Consortium) onde foi descrito a existência de 2 alelos apresentando a troca do nucleotídeo selvagem A pelo mutado G num total de 121.412 alelos pesquisados. Isso representa uma frequência alélica muito baixa de $1,64 \times 10^{-5}$ da variante na população geral.

A comparação da sequência da proteína de GDAP1 humana com outras proteínas ortólogas em bancos de dados mostrou que o aminoácido substituído em N64 é altamente conservado entre um grupo diversificado de espécies, confirmando que essa troca ocorre realmente em uma região conservada da proteína, como mostrado na Figura 5-3. Nas análises *in silico* realizadas a alteração comportou-se como possivelmente patogênica nos programas Polyphen2 e Mutationtaster, e como tolerada no programa SIFT.

Essa alteração ocorre em heterozigose no DNA da paciente em *trans* com outra alteração conhecida patogênica, a R125*. Essa informação foi possível através do estudo de segregação na família, onde N64S também está presente em heterozigose no DNA do pai da paciente e R125* em heterozigose no DNA materno.

	N64
Human	AGTGAGCACAAATGAGCCCTTGG
Chimpanzee	AGTGAGCACAAATGAGCCCTTGG
Gorilla	AGTGAGCACAAATGAGCCCTTGG
Orangutan	AGTGAGCACAAATGAGCCCTTGG
Vervet-AGM	AGTGAGCACAAATGAGCCCTTGG
Macaque	AGTGAGCACAAATGAGCCCTTGG
Olive baboon	AGTGAGCACAAATGAGCCCTTGG
Marmoset	AGTGAGCACAAATGAGCCCTTGG
Mouse	AGTGAGCACAAATGAGCCCTTGG
Rat	AGTGAGCACAAATGAGCCCTTGG
Rabbit	AGTGAGCACAAATGAGCCCTTGG
Cow	AGTGAGCACAAATGAGCCCTTGG
Zebra Finch	AGCGAGCACAAATGAGCCCTTGG

Figura 5-3: Conservação do nucleotídeo A mutado em N64S para diferentes espécies.
Fonte: Adaptado de Ensembl (2015).

A alteração P119T não consta sob nenhuma referência em bancos de dados e, consequentemente não foi relacionada a nenhum fenótipo clínico. Além disso, não encontramos referência à sua existência em bancos de dados de frequência.

Através de análises filogenéticas, foi possível observar que a região onde houve a troca de nucleotídeo é uma região altamente conservada em diferentes espécies, como mostrada na Figura 5-4. As análises *in silico* realizadas mostraram que a alteração se comportou como possivelmente patogênica somente no programa Mutationtaster, e como tolerada nos programas SIFT e Polyphen2.

Essa alteração ocorre em heterozigose composta no genoma de duas pacientes em *trans* com outra alteração sabidamente patogênica a Q163*. Foi possível fazer o estudo de segregação na família apenas de uma paciente, onde a mutação Q163* está presente em heterozigose no DNA materno e P119T está em heterozigose no DNA paterno.

		P119
Human	CATGTATTAC	CACGGGTACA
Chimpanzee	CATGTATTAC	CACGGGTACA
Gorilla	CATGTATTAC	CACGGGTACA
Orangutan	CATGTATTAC	CACGGGTACA
Vervet-AGM	CATGTATTAC	CACGGGTACA
Macaque	CATGTATTAC	CACGGGTACA
Olive baboon	CATGTATTAC	CACGGGTACA
Marmoset	CATGTATTAC	CACGGGTACA
Mouse	CATGTATTAC	CACGGGTGCA
Rat	CATGTATTAC	CACGGGTGCA
Rabbit	CATGTATTAC	CAAGGGTACA
Cow	CATGTATTAC	CACGGGTGCA
Zebra Finch	CATGTATTAT	CAAGGGTGCA

Figura 5-4: Conservação do nucleotídeo C mutado em P119T para diferentes espécies.

Fonte: Adaptado de Ensembl (2015).

A alteração K207T consta no banco de dados de SNPs (dbSNP) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sob referência *rs140384868*, não tendo sido relacionado a nenhum fenótipo clínico. Informações sobre a frequência da alteração na população mundial estavam presentes em dois bancos de dados originados de projetos de exoma, o ExAC e o NHLBI Exome Sequencing Project (ESP). No ExAC foi descrita a existência de 2 alelos nos quais o nucleotídeo mutado C substitui o nucleotídeo selvagem A num total de 121.166 alelos pesquisados, o que representa uma frequência alélica de $1,65 \times 10^{-5}$ da variante na população geral. No NHLBI foi descrito a presença de 1 indivíduo heterozigoto (A/C) em 6.500 indivíduos pesquisados. Ambas as frequências são consideradas baixas.

Através de análises filogenéticas, foi possível observar que a região onde houve a troca de nucleotídeo é uma região altamente conservada em diferentes espécies, como mostrada na Figura 5-5. As análises *in silico* realizadas mostraram que a alteração K207T comportou-se como possivelmente patogênica nos três programas de predição: SIFT, Polyphen2 e Mutationtaster.

Essa alteração ocorreu em heterozigose apenas em uma paciente na nossa população de estudo.

	K207
Human	TATTTGAAGAA A AATTCTTGAT
Chimpanzee	TATTTGAAGAA A AATTCTTGAT
Gorilla	TATTTGAAGAA A AATTCTTGAT
Orangutan	TATTTGAAGAA A AATTCTTGAT
Vervet-AGM	TATTTGAAGAA A AATTCTTGAT
Macaque	TATTTGAAGAA A AATTCTTGAT
Olive baboon	TATTTGAAGAA A AATTCTTGAT
Marmoset	TATTTGAAGAA A AATTCTTGAT
Mouse	TACTTGAAGAA A AATTCTTGAT
Rabbit	TATTTGAA A A AATTCTTGAT
Cow	TATTTGAAGAA A AATTCTTGAT
Zebra Finch	TACCTAAAGAA A AATACTGGAT

Figura 5-5: Conservação do nucleotídeo A mutado em K207T para diferentes espécies.

Fonte: Adaptado de Ensembl (2015).

Além disso, nenhuma das três novas alterações encontradas nesse trabalho, foram observadas em 100 controles normais testados.

A classificação de novas variantes como patogênicas ou não é de extrema importância para a prática clínica. Por esse motivo, alguns estudos têm sido feitos para tentar padronizar a melhor forma de interpretação dessas novas alterações.

Atualmente, principalmente com o desenvolvimento das tecnologias dos sequenciadores de nova geração, onde vêm crescendo consideravelmente o número de novas variantes encontradas no genoma humano, têm sido cada vez mais um desafio classifica-las como causadoras de doença ou não. Por essa razão o *American College of Medical Genetics* (ACMG) e a *Association for Molecular Pathology* (AMP), publicaram em 2015, uma atualização do guia com as normas e diretrizes para interpretação e classificação de novas variantes na prática clínica (RICHARDS et al., 2015). Conforme descrito no manual, existem vários parâmetros que são necessários a se considerar na hora de classificar uma nova variante como patogênica ou benigna. Dentre eles, foram considerados aqui nesse trabalho, os seguintes parâmetros:

- (i) Informações contidas em bancos de dados (incluem dados de frequência na população, conservação do aminoácido em diferentes espécies e localização em domínio funcional da proteína;
- (ii) Análise *in silico* (foram utilizados os programas de predição SIFT, Polyphen2 e Mutationtaster);

- (iii) Estudo molecular (informação obtida dos 100 controles internos, se a variante ocorre em *trans* com outra conhecidamente patogênica, estudo de segregação na família associado ao fenótipo do paciente).

Com base nisso, as três variantes encontradas nesse trabalho, provavelmente se enquadram na classificação de variantes de significância incerta (VUS - *variant of uncertain significance*).

Para chegarmos a esse resultado, levamos em consideração a baixa frequência alélica que as 3 alterações apresentam nos bancos de dados populacionais (menos que 0,1%). Outro dado utilizado, foram as análises *in silico*. Para as variantes N64S e P119T os programas utilizados (SIFT, Polyphen2 e Mutationtaster) foram inconsistentes na predição, pois não houve um consenso entre os três programas. Já para a alteração K207T, os três atribuíram danoso como resultado. Apesar disso, as três estão localizadas em regiões bem conservadas da proteína que são os domínios GSTs, como descrito por Marco et al. (2004) e em todas elas a região onde ocorreu a troca de nucleotídeo é uma região altamente conservada entre as diferentes espécies.

Conforme os testes realizados no laboratório de Neurogenética (HC-FMRP), nenhuma das variantes apareceram em nem um dos 200 alelos analisados. Ademais, segundo ACMG e AMP, quando duas variantes ocorrem em *trans* em uma doença recessiva, e uma das variantes é conhecidamente patogênica pode ser atribuído a outra variante um grau de “patogenicidade moderado 3” (RICHARDS et al., 2015). Foi o caso das variantes N64S e P119T. O estudo de segregação nas famílias e o fenótipo clínico característico de CMT causado por mutações no gene *GDAP1*, são usados como evidência para auxiliar na classificação.

A Tabela 5-1, mostra resumidamente os elementos aqui considerados para cada variante juntamente com a pontuação recomendada pela ACMG e AMP.

A ACMG e AMP preconiza que outros testes sejam realizados, inclusive testes funcionais, para confirmar o verdadeiro impacto dessas alterações (RICHARDS et al., 2015). Além disso, é importante ressaltar que a classificação de uma variante pode mudar com o tempo, à medida que novas descobertas sobre elas vão sendo feitas. A Figura 5-6 demonstra de forma simplificada como uma variante pode modificar de grau. Por exemplo, se eu tenho uma variante classificada como VUS com grau moderado de patogenicidade e, após algum tempo, novas descobertas sobre essa

variante são feitas e acrescentam a ela pontuações que elevem sua patogenicidade sua classificação se desloca para a direita. Embora o contrário também possa ocorrer, e a variante seja reclassificada deslocando para a esquerda.

5.1.3 Polimorfismo Ser169Ser

O termo polimorfismo é utilizado tanto para indicar uma alteração que não causa doença quanto uma alteração que é encontrada com uma frequência maior do que 1% na população, o que pode gerar uma certa confusão (DEN DUNNEN; ANTONARAKIS, 2000). O polimorfismo Ser169Ser encontrado no *GDAP1* apresenta as duas características e por isso, o melhor seria classifica-lo como um polimorfismo não patogênico. Ele localiza-se no domínio $\alpha 4$ - $\alpha 5$ *loop* da proteína GDAP1 (MARCO et al., 2004).

A variante S169S consta no banco de dados de SNPs (dbSNP) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sob referência *rs11554166* e já foi relatada na literatura por alguns autores como Boerkoel et al. (2003) e Claramunt et al. (2005), porém sem muitos detalhes. Por se tratar de um polimorfismo muito recorrente, informações sobre a frequência dessa alteração na população mundial estavam presentes em diversos bancos de dados de frequência como o ExAC, onde 33.603 pessoas apresentavam o alelo G, sendo que em 5.106 ele estava em homozigose. No 1000 *Genomes*, 78% da população estudada apresentou o alelo normal T e 22% o alelo mutado G. No HapMap, de 264 pessoas sequenciadas, 12 eram homozigotas para o polimorfismo e 84 eram heterozigotas para o polimorfismo. No projeto NHLBI dos 6.503 indivíduos analisados, 464 eram homozigotos e 2.372 eram heterozigotos para o polimorfismo. Condizente com isso, na população aqui estudada, a frequência do polimorfismo também foi alta, aparecendo em 54% dos pacientes e em 52% da população controle.

Tabela 5-1: Resumo das informações utilizadas para a classificação das novas variantes encontradas neste trabalho.

VARIANTES ENCONTRADAS/ PACIENTES		N64S	P119T (CMT11317)	P119T (CMT9671)	P119T (CMT11473)	K207T	
BANCOS DE DADOS	Frequência na população	0,00016%	0	0	0	0,00016%	¹ PM2
	Análise filogenética	Conservado	Conservado	Conservado	Conservado	Conservado	² PP3
	Localização na proteína	GST - N terminal	GST - N terminal	GST - N terminal	GST - N terminal	GST - C terminal	¹ PM1
ANÁLISE in silico	SIFT	Tolerada	Tolerada	Tolerada	Tolerada	Patogênica	N64S - Não
	Polyphen2	Patogênica	Tolerada	Tolerada	Tolerada	Patogênica	P119T - Não
	Mutationtaster	Patogênica	Patogênica	Patogênica	Patogênica	Patogênica	K207T - ² PP3
ESTUDO MOLECULAR	100 controles internos	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	¹ PM2
	Trans com outra alteração patogênica	Sim (R125X)	Sim (Q163X)	Sim (Q163X)	Não (Heterozigose)	Não (Heterozigose)	Sim - ¹ PM3
	Estudo de segregação	Sim	Sim	Não	Não	Sim (Heterozigose)	Empregado como evidência
	Fenótipo clássico de mutações no <i>GDAP1</i>	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Empregado como evidência

¹ PM – Patogênico moderado (graus 1 a 6); ² PP – Confirmam patogenicidade (graus 1 a 5).

Figura 5-6: Modelo esquemático para a classificação de novas variantes.
Fonte: (RICHARDS et al., 2015).

5.2 GENOTIPAGEM DOS PACIENTES

5.2.1 Alteração em homozigose (Q163*/Q163*)

A mutação Q163* é uma das mais frequentes no gene *GDAP1* (CASSEREAU et al., 2011b) e está presente na população de estudo em homozigose na paciente CMT10286. É conhecidamente patogênica e já foi relatada, também em homozigose, por diferentes autores em diferentes regiões (BOERKOEL et al., 2003; CLARAMUNT et al., 2005; CUESTA et al., 2002; MARTIN; MARADEI; VELASCO, 2015). Possui uma alta incidência em países do mediterrâneo, principalmente na Espanha, e isso se deve a um efeito fundador que essa alteração possui nessa região (CLARAMUNT et al., 2005).

Cuesta et al. (2002) e Claramunt et al. (2005), descreveram pacientes com ancestralidade espanhola onde os afetados apresentavam uma neuropatia com padrão axonal. De um modo geral, os pacientes tiveram um início precoce da doença com fraqueza e atrofia dos pés e mãos levando à incapacidade antes da primeira década de vida. Os dois autores relataram presença de paresia das cordas vocais e os três pacientes de Claramunt et al. (2005) faziam uso de cadeiras de rodas.

Boerkoel et al. (2003) relatou 5 pacientes de origem hispânica, sendo 4 deles da Costa Rica e 1 do Peru. Três deles apresentavam um fenótipo de neuropatia axonal, enquanto os outros dois apresentavam uma desmielinização proeminente com perda axonal associada, com um fenótipo muito sugestivo de Dejerine-Sottas à semelhança dos outros pacientes: início precoce dos sintomas, com fraqueza e atrofia muscular levando a incapacidade antes da segunda década de vida e sofrendo de rouquidão da voz e/ou paresia das cordas vocais.

Martin et al. (2015) relatou a mutação em duas pacientes, filhas de pais consanguíneos em uma família da Colômbia. As duas iniciaram os sintomas nos dois primeiros anos de vida com hipotrofia progressiva e simétrica, deformidade nos pés e instabilidade da marcha. A cognição estava preservada e não haviam apresentado

envolvimento das cordas vocais até o momento da publicação. O padrão neurológico era de uma neuropatia axonal.

Consistente com os fenótipos apresentados, nossa paciente, CMT10286, que também carregava a mutação Q163* em homozigose apresentou início precoce da doença e um fenótipo de neuropatia axonal severo. Os sintomas se iniciaram desde o nascimento onde observou-se que ela apresentava um certo grau de hipotonia. Começou a andar somente aos 10 anos e mesmo assim, apresentando frequentes quedas. A progressão da doença foi rápida ao longo dos anos, no qual foi se instalando fraqueza progressiva, que se iniciou na região distal e progrediu para as regiões proximais, tanto nos membros inferiores como nos membros superiores. Também apresenta atrofia e deformidades nos pés e nas mãos, já tendo sido submetida a cirurgia dos mesmos, atualmente faz uso de cadeira de rodas e é obesa. Apresenta um quadro de disautonomia. Além disso, apresentou alteração assimétrica das cordas vocais e fraqueza diafragmática, característica essa que vem sendo atribuída a um quadro mais severo da doença.

A presença de paresia das cordas vocais e fraqueza diafragmática são sintomas comuns nas mutações do gene *GDAP1*, e pode ser um parâmetro indicativo da gravidade da doença (SEVILLA et al., 2008). Em um estudo realizado por Sevilla et al. (2008), foram investigadas as cordas vocais e a função respiratória de 11 pacientes com CMT e mutação no *GDAP1*. A maioria dos pacientes apresentava as mutações, Q163* e S194*.

A alteração da voz começou a aparecer quando os pacientes tinham uma deficiência funcional importante, geralmente se desenvolvendo durante a adolescência. Eles notaram que a mudança na voz foi um sintoma inicial em casos graves da doença. A maioria destes pacientes apresentavam uma forma severa de CMT, com atraso no ganho das funções motoras e início da doença por volta de 1 ano de idade com marcada fraqueza dos músculos proximais durante a primeira década de vida. Todos os pacientes apresentavam perda sensitiva no exame físico, faziam uso de cadeiras de rodas e mostravam um padrão de neuropatia axonal. Outra característica em comum com nossa paciente é que eles notaram que a obesidade, provavelmente contribui para incapacitação dos pacientes (SEVILLA et al., 2008).

Em conclusão, eles mostraram que mutações no *GDAP1* causam uma neuropatia comprimento dependente que se inicia com uma fraqueza muscular progressiva afetando inicialmente os músculos distais, progredindo para o comprometimento dos proximais, dos respiratórios e dos nervos cranianos. O envolvimento inicial do nervo laríngeo recorrente do lado esquerdo, ao invés do lado direito, suporta ser a neuropatia comprimento-dependente. A paralisia de cordas vocais e a insuficiência respiratória podem levar a aspiração e broncopneumonia, diminuindo a expectativa de vida destes pacientes. Assim, estas funções devem ser monitoradas cuidadosamente nestes pacientes com suspeita de mutações no *GDAP1* para demonstrar disfunção laringeal e respiratória (SEVILLA et al., 2008).

5.2.2 Heterozigose composta

Três pacientes índices não relacionados apresentaram alterações em heterozigose composta. O paciente CMT9379 apresentou as alterações N64S com a mutação R125* e as pacientes CMT9671 e CMT11317 apresentaram as alterações P119T com a mutação Q163*.

5.2.2.1 CMT11317 e CMT9671 (P119T/Q163*)

A paciente CMT11317, começou a andar com aproximadamente 1 ano e 7 meses quando os pais notaram que os pés estavam entortando e que a marcha era diferente. Por volta dos 3 anos e 5 meses foi submetida a cirurgia nos pés, entre os 4 e 5 anos passou a usar órteses e aos 5 anos estava deambulando com grande dificuldade, com o tronco inclinado para a frente. O quadro veio piorando gradativamente e aos 6 anos foi observado dificuldade com o uso das mãos. Deambula com grande dificuldade, possui pés cavos, dedos em martelo e mãos em garra. Sensibilidades tátil, dolorosa e vibratória diminuídas até próximo ao joelho e porção média do antebraço. Até o momento, não apresenta alterações esfinterianas de deglutição ou respiratórias. Nega dor neuropática. A eletroneuromiografia mostrou uma neuropatia axonal sensitivo motora grave.

A paciente CMT9671 iniciou os primeiros sintomas com 3 anos de idade. A ENMG mostra uma neuropatia sensitivo motora axonal grave.

Essas duas pacientes expressaram um fenótipo mais brando do que a paciente que apresentou a alteração Q163* em homozigose (vide capítulo 5.2.1). Não encontramos relatos na literatura onde a mutação Q163* aparece em heterozigose composta com uma alteração *missense*. Os relatos encontrados ou descrevem pacientes com esta mutação em homozigose (BOERKOEEL et al., 2003; CLARAMUNT et al., 2005; CUESTA et al., 2002; MARTIN; MARADEI; VELASCO, 2015) ou em heterozigose composta com mutações *nonsense* (S194*) (CLARAMUNT et al., 2005) ou em heterozigose composta com a mutação *frameshift* (T288fs290) (CUESTA et al., 2002).

Uma hipótese para o fato de que a paciente CMT10286 possua um fenótipo mais severo do que as pacientes CMT11317 e CMT9671 seria de que as alterações *nonsense* em homozigose ou heterozigose composta com a mutação *frameshift* descritas no gene *GDAP1*, produzem uma proteína truncada sem o domínio *COOH* terminal (aminoácidos 320 a 358), como mostrado na Figura 5-7.

Figura 5-7: GDAP1 e mutações *nonsense*.
Fonte: Adaptado de NIEMANN et al. (2005).

Pedrola et al. (2005) e Niemann et al. (2005) mostraram que este domínio contém informações importantes para a localização exata da proteína na membrana externa da mitocôndria. Quando ocorre mutações *nonsense* ou *frameshift*, e o GDAP1 perde esse domínio, ele fica retido no citoplasma e núcleo da célula, e por isso, sem funcionalidade. De maneira oposta, eles mostraram que algumas mutações *missense*, relacionadas à CMT (Figura 5-8), não prejudicam a ligação de GDAP1 à membrana da mitocôndria.

Figura 5-8: GDAP1 e mutações *missense*.
Fonte: Adaptado de NIEMANN et al. (2005).

Entretanto Niemann et al. (2005) mostrou que apesar disso as mutações *missense* prejudicam a capacidade de induzir a fragmentação mitocondrial em diferentes níveis, isto é, algumas mutações *missense* como R161H e R310Q diminuem a fissão mitocondrial. Isso demonstra que ambas as características de GDAP1, localização correta na mitocôndria e a adequada modulação da atividade mitocondrial, provavelmente sejam de fundamental importância para o funcionamento dos nervos periféricos mielinizados (NIEMANN et al., 2005).

5.2.2.2 CMT9379 (N64S/R125*)

Moroni et al. (2009) foi quem relatou pela primeira vez a presença da mutação em uma família da Itália, onde ela estava presente em heterozigose composta com a mutação L239F em dois 2 irmãos, filhos de pais não consanguíneos. Os estudos eletrofisiológicos sugeriam uma neuropatia axonal. Os sintomas se manifestaram bem cedo na infância. Logo que começaram a andar sozinhos, por volta dos 12 e 17 meses, arrastavam os pés e apresentavam frequentes quedas. Aproximadamente aos 2 e 3 anos de idade ambos apresentaram perda dos reflexos tendinosos e intensa fraqueza e atrofia nos músculos superiores e inferiores distais, mais tarde evoluindo para paralisia completa dos pés e das mãos.

Consistente com o fenótipo apresentado, nosso paciente que também mostrou uma neuropatia axonal teve um desenvolvimento motor normal até 1 ano de idade, quando começou a arrastar os pés que foram ficando invertidos, passando a ter dificuldades progressiva para deambular e a apresentar frequentes quedas. Ademais apresenta ausência dos reflexos aquileus e fraqueza e atrofia nos membros inferiores e superiores distais. A sensibilidade está aparentemente preservada.

Uma segunda descrição foi feita por Fusco et al. (2010) onde ele descreveu a presença de um caso em homozigose da mutação R125* em uma criança de origem Paquistanesa. Ela apresentou início dos sintomas aos 5 meses de vida com hipotonia de tronco, arreflexia, pés planos bilateral e uma rápida evolução dos sintomas antes da segunda década de vida. O primeiro exame eletrofisiológico realizado aos 5 meses revelou que a velocidade de condução motora era menor que 10 m/s, o que levantou a suspeita clínica de Dejerine - Sottas e Neuropatia Congênita Hipomielinizante. Após a exclusão dos genes geralmente envolvidos nessas neuropatias, encontrou-se a alteração em homozigose no gene *GDAP1* (FUSCO et al., 2010).

As neuropatias hereditárias associadas a mutações no *GDAP1* exibem um fenótipo complexo, geralmente com início precoce, porém com início antes dos 6 meses de vida são infrequentes (BOERKOEL et al., 2003; FUSCO et al., 2010). O paciente relatado por Fusco et al. (2010) apresentou um fenótipo bastante distinto daqueles já previamente relacionados com CMT, especialmente com relação a idade de início. Esse fenótipo mais severo poderia ser explicado pelo fato da paciente possuir a alteração *nonsense* em homozigose, o que produziria uma proteína truncada, sem o domínio *COOH* terminal (aminoácidos 320 a 358) portanto, uma proteína não funcional (PEDROLA et al., 2005).

O fenótipo mais brando do nosso paciente que possui a mutação R125* com uma *missense* N64S, concordante com o descrito por Moroni et al. (2009) que descreveu pacientes com a mesma mutação R125* com uma outra *missense* (L239F), nos faz sustentar a interpretação de que a alteração N64S seja a provável causa da CMT nesse paciente.

A identificação dessa mutação no *GDAP1* do paciente descrito por Fusco et al. (2010) sugere que a análise molecular deste gene deve ser incluída tanto para neuropatias desmielinizantes esporádicas de início muito precoce que apresentam uma característica de Dejerine-Sottas ou Neuropatia Congênita Hipomielinizante (FUSCO et al., 2010) quanto para CMT axonal ou intermediário.

5.2.3 Alterações em heterozigose

Dois pacientes não relacionados apresentaram alterações, que ainda não foram descritas na literatura, em heterozigose, sendo CMT8594 com a alteração Lys207Thr e CMT11473 com a alteração Pro119Thr.

A paciente CMT8594 nasceu de uma gravidez sem intercorrências e após 3 meses iniciou quadro de vômitos depois das mamadas que persistiram até os 5 anos e 5 meses. Falou na idade esperada e andou por volta de 1 ano e 4 meses.

Desde o início da marcha, os pais notaram uma certa dificuldade e que os pés eram tortos sendo necessário o uso de botas ortopédicas estando atualmente limitada a uma cadeira de rodas. Apresenta acentuada atrofia distal nos membros inferiores e superiores, abolição dos reflexos profundos e ausência do reflexo de Babinski e do sinal de Hoffmann. Veio apresentando declínio progressivo da cognição.

Nenhuma alteração foi observada nos nervos cranianos e na fala.

A ENMG mostra uma neuropatia sensitivo-motora axonal grave.

Ainda que, através de análises de bioinformática a alteração K207T tenha sido considerada como de patogenicidade incerta, ela por si só não explica o fenótipo dessa paciente. No estudo de segregação na família, foi possível sequenciar também o DNA materno, que apresentou a mesma alteração (K207T) em heterozigose no *GDAP1*, entretanto, a mãe não possui nenhum fenótipo de neuropatia.

Além disso, essa mesma paciente, apresenta uma alteração no gene *GAN* que causa uma doença neurodegenerativa com envolvimento progressivo do sistema nervoso periférico e central, chamada de neuropatia axonal gigante. Mutações no *GAN* também podem causar alterações na dinâmica mitocondrial, podendo alterar tanto a distribuição quanto a motilidade das mitocôndrias (LOWERY et al., 2015).

Como *GDAP1* tem papel na fissão mitocondrial e esse mecanismo também interfere na dinâmica mitocondrial, segundo Hoyer et al. (2014), se os produtos gênicos de duas variantes de diferentes genes interagem em uma mesma via pode estar ocorrendo uma herança digênica. No entanto, é importante ressaltar que o quadro clínico, é mais sugestivo de *GAN*, e que para saber o verdadeiro efeito da

alteração (K207T) presente no *GDAP1* no fenótipo da paciente mais estudos precisam ser realizados.

O paciente CMT11473, começou a apresentar fraqueza aos 3 anos de idade, iniciando-se nos membros inferiores e progredindo para os membros superiores. Refere ter mialgia aos esforços e apresenta atrofia muscular distal, predominando nos membros inferiores.

Apresentou a alteração P119T em heterozigose, que por si só não explica o fenótipo do paciente.

O gene *GDAP1* que codifica a proteína 1 associada à diferenciação por gangliosídeo (GDAP1), está localizado na membrana externa da mitocôndria como uma proteína integral de membrana e é encontrada principalmente em células neuronais do sistema nervoso periférico e central, mas também é expressa pelas células de Schwann (NIEMANN et al., 2005; PEDROLA et al., 2005). GDAP1 possui um papel importante no equilíbrio entre fusão e fissão mitocondrial, que parece ser essencial para a integridade dos nervos periféricos mielinizados (BERTHOLET et al., 2016).

Um estudo realizado por Boerkoel et al. (2003), mostrou que os pacientes com mutação no *GDAP1* tinham uma neuropatia com proeminente desmielinização e perda axonal associada juntamente com a paresia das cordas vocais, enquanto que aqueles descritos por Sevilla et al. (2003) e Cuesta et. al. (2002) tinham uma neuropatia com proeminente perda axonal e paresia das cordas vocais. Essas observações sugerem que GDAP1 é necessário na manutenção tanto do axônio quanto da mielina, ou para a interação entre mielina e axônio. Se a mielina ou axônio são predominantemente afetados num determinado paciente, isso pode ser determinada por diferenças ambientais ou epigenética. Independentemente disso, estas observações salientam a dificuldade em prever um fenótipo mesmo quando a mutação é conhecida (BOERKOEL et al., 2003).

O mecanismo pelo qual o GDAP1 causa CMT ainda é desconhecida (CASSEREAU et al., 2011b). Várias mutações no *GDAP1* têm sido associadas à doença de CMT, relacionados a diferentes subtipos e padrões de herança, como por exemplo, desmielinizante (R161H), axonal (S194X), intermediário (T117fs), autossômica dominante (R120W) ou autossômica recessiva (Q163*). Além disso, um

amplo espectro de características clínicas é visto, e o decurso da doença é diferente entre cada tipo de mutação no *GDAP1* (MARTIN; MARADEI; VELASCO, 2015).

Todos os pacientes descritos aqui nesse trabalho, tem um padrão de CMT axonal de herança recessiva ou esporádica e um quadro compatível com o descrito na literatura, de início precoce e rápida progressão.

Atualmente, ainda há uma limitação em se estabelecer uma relação genótipo fenótipo, porque a função da proteína codificada pelo *GDAP1* permanece indefinida. Mais estudos são necessários e um maior número de casos envolvendo *GDAP1* e CMT são primordiais para conseguir estabelecer uma relação genótipo – fenótipo das diferentes formas da doença.

5.3 FREQUÊNCIA DE ALTERAÇÕES NO GENE *GDAP1* NA POPULAÇÃO BRASILEIRA

Alterações no gene *GDAP1* foram encontradas em um total de 6 pacientes índices não relacionados. Dentre essas alterações, uma foi em homozigose para Gln163Ter, uma em heterozigose composta para as alterações Asn64Ser e Arg125Ter e dois pacientes não relacionados que apresentavam as alterações Pro119Thr e Gln163Ter em heterozigose composta. Adicionalmente nós encontramos alterações em 2 outros pacientes não relacionados, Lys207Thr e Pro119Thr em heterozigose, que não foram descritas na literatura, cujo significado ainda é incerto. Portanto, a frequência de mutações encontradas no gene *GDAP1* na população brasileira foi de 3,88% (4 pacientes com alteração, em 103 pesquisados). Ressaltando que, os dois pacientes que apresentaram apenas as alterações em heterozigose, não foram incluídas na estatística, pois ambas as alterações não explicam os fenótipos dos pacientes.

A frequência de mutações descrita no gene *GDAP1* na população geral é relativamente baixa, exceto em um estudo, realizado por Sivera et al. (2013), na região de Valencia, Espanha, onde ele encontrou uma taxa de mutação no *GDAP1* de 11,5%. Eles acreditam que esse valor tão alto seja devido a um efeito fundador da mutação R120W, que cursa com herança dominante, naquela região.

Outros estudos, realizado por Divicenzo et al. (2014), Murphy et al. (2012) e Saporta et al. (2011) mostram que mutações no gene *GDAP1* em 3 diferentes populações, representam 0,7%, 0,5% e 0,63% respectivamente (Figura 5-9).

Dessa forma, a frequência de mutações no gene *GDAP1*, seguramente causadoras de CMT, encontrada na população brasileira, que foi de 3,88%, poderia ser considerada alta quando comparada aos demais estudos de epidemiologia genética realizados em outras regiões.

Figura 5-9: Frequência de mutações no *GDAP1*.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostraram que mutações no gene *GDAP1* estão presentes em pacientes da população brasileira com fenótipo de CMT2, AR-CMT2 e CMT esporádico. A frequência de ocorrência pode ser considerada alta (3,88%). Ademais, foram encontradas na população de estudo duas mutações conhecidamente patogênicas (Gln163Ter e Arg125Ter) e três novas variantes (Asn64Ser, Pro119Thr, Lys207Thr) que ainda não haviam sido relacionadas ao fenótipo de CMT.

7. BIBLIOGRAFIA

ADZHUBEI, I.; JORDAN, D. M.; SUNYAEV, S. R. **Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2.** [s.l: s.n.].

AMMAR, N. et al. Identification of novel GDAP1 mutations causing autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease. **Neuromuscular Disorders**, v. 13, p. 720–728, 2003.

AZZEDINE, H. et al. Variability of disease progression in a family with autosomal recessive CMT associated with a S194X and new R310Q mutation in the GDAP1 gene. **Neuromuscular Disorders**, v. 13, p. 341–346, 2003.

BAETS, J.; DE JONGHE, P.; TIMMERMAN, V. Recent advances in Charcot-Marie-Tooth disease. **Current Opinion in Neurology**, v. 27, n. 5, p. 532–540, 2014.

BARNEO-MUÑOZ, M. et al. Lack of GDAP1 induces neuronal calcium and mitochondrial defects in a knockout mouse model of charcot-marie-tooth neuropathy. **PLOS Genetics**, v. 11, n. 4, p. 1–27, 2015.

BAXTER, R. V. et al. Ganglioside - induced differentiation -associated protein -1 is mutant in Charco -Marie - Tooth disease type 4A/8q21. **Nature genetics**, v. 30, n. 1, p. 21–22, 2002.

BEN OTHMANE, K. et al. Linkage of a locus (CMT4A) for autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease to chromosome 8q. **Human molecular genetics**, v. 2, n. 10, p. 1625–1628, 1993.

BERTHOLET, A. M. et al. Mitochondrial fusion/fission dynamics in neurodegeneration and neuronal plasticity. **Neurobiology of Disease**, v. 90, p. 3–19, 2016.

BIRD, T. D.; OTT, J.; GIBLETT, E. R. Evidence for Linkage of Charcot - Marie -Tooth Neuropathy to the Duffy Locus on Chromosome 1. **American journal of human genetics**, v. 34, n. 3, p. 388–394, 1982.

BOERKOEL, C. F. et al. CMT4A : Identification of a Hispanic GDAP1 Founder Mutation. **Annals of Neurology**, v. 53, n. 3, p. 400–405, 2003.

BRAATHEN, G. J. Genetic epidemiology of Charcot-Marie-Tooth disease. **Acta neurologica Scandinavica**, v. 126, n. 193, p. 1–22, 2012.

CASSEREAU, J. et al. Mitochondrial complex I deficiency in GDAP1- related autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2K). **Neurogenetics**, v. 10, n. 2, p. 145–150, 2009.

CASSEREAU, J. et al. Simultaneous MFN2 and GDAP1 mutations cause major mitochondrial defects in a patient with CMT. **Neurology**, v. 76, n. 17, p. 1524–1528, 2011a.

CASSEREAU, J. et al. Mitochondrial dysfunction and pathophysiology of Charcot-Marie-Tooth disease involving GDAP1 mutations. **Experimental Neurology**, v. 227, n. 1, p. 31–41, 2011b.

CASSEREAU, J. et al. A locus-specific database for mutations in GDAP1 allows analysis of genotype-phenotype correlations in Charcot-Marie-Tooth diseases type 4A and 2K. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 6, n. 87, p. 1–8, 2011c.

CHUNG, K. W. et al. A novel GDAP1 Q218E mutation in autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease. **Journal of human Genetics**, v. 53, p. 360–364, 2008.

CLARAMUNT, R. et al. Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. **Journal of Medical Genetics**, v. 42, p. 358–366, 2005.

CUESTA, A. et al. The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. **Nature genetics**, v. 30, n. 1, p. 22–25, 2002.

DEN DUNNEN, J. T.; ANTONARAKIS, S. E. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: A discussion. **Human Mutation**, v. 15, n. 1, p. 7–12, 2000.

DETMER, S. A.; CHAN, D. C. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 8, n. 11, p. 870–879, 2007.

DIVINCENZO, C. et al. The allelic spectrum of Charcot – Marie – Tooth disease in over 17,000 individuals with neuropathy. **Molecular Genetics & Genomic Medicine**, v. 2, n. 6, p. 522–529, 2014.

DUBOURG, O. et al. Autosomal-Recessive Forms of Demyelinating Charcot-Marie-Tooth Disease. **Neuromolecular medicine**, v. 8, n. 1–2, p. 75–85, 2006.

DYCK, P. J.; LAMBERT, E. H. Lower Motor and Primary Sensory Neuron Diseases With Peroneal Muscular Atrophy. v. 18, 1968.

EL-ABASSI, R.; ENGLAND, J. D.; CARTER, G. T. Charcot-Marie-Tooth Disease: An Overview of Genotypes, Phenotypes, and Clinical Management Strategies. **PM & R: the journal of injury, function, and rehabilitation**, v. 6, n. 4, p. 342–355, 2014.

EXOME VARIANT SERVER. **NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP)**. Disponível em: <<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>>. Acesso em: 9 maio. 2016.

FUSCO, C. et al. The Homozygous Ganglioside-Induced Differentiation-Associated Protein 1 Mutation c.373C>T Causes a Very Early-Onset Neuropathy: Case Report and Literature Review. **Journal of Child Neurology**, v. 26, n. 1, p. 49–57, 2010.

HARDING, A. E.; THOMAS, P. K. The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. **Brain**, v. 103, p. 259–280, 1980.

HOWCROFT, D. W. J.; KUMAR, S.; MAKWANA, N. Charcot Marie Tooth Disease. **Orthopaedics and Trauma**, v. 23, n. 4, p. 274–277, 2009.

HØYER, H. et al. Genetic Diagnosis of Charcot-Marie-Tooth Disease in a Population by Next-Generation Sequencing. **BioMed research international**, v. 2014, p. 1–13, 2014.

JANI-ACSADI, A.; KRAJEWSKI, K.; SHY, M. E. Charcot-Marie-Tooth Neuropathies: Diagnosis and Management. **Seminars in Neurology**, v. 28, n. 2, p. 185–194, 2008.

JOHNSON, N. E. et al. Quality-of-life in Charcot–Marie–Tooth disease: The patient's

perspective. **Neuromuscular Disorders**, v. 24, n. 11, p. 1018–1023, 2014.

KAZAMEL, M.; BOES, C. J. Charcot Marie Tooth disease (CMT): historical perspectives and evolution. **Journal of Neurology**, v. 262, n. 4, p. 801–805, 2015.

KENT, W. J. et al. The Human Genome Browser at UCSC. **Genome Research**, v. 12, n. 6, p. 996–1006, 2002.

KRAJEWSKI, K. M.; SHY, M. E. Genetic testing in neuromuscular disease. **Neurologic Clinics**, v. 22, n. 3, p. 481–508, 2004.

KUMAR, P.; HENIKOFF, S.; NG, P. C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. **Nature protocols**, v. 4, n. 7, p. 1073–1081, 2009.

LEK, M. et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. **Nature**, v. 536, p. 285–291, 2016.

LOWERY, J. et al. Abnormal intermediate filament organization alters mitochondrial motility in giant axonal neuropathy fibroblasts. **Molecular biology of the cell**, v. 27, n. 4, p. 608–616, 2015.

MARCO, A. et al. Evolutionary and Structural Analyses of GDAP1 , Involved in Charcot-Marie-Tooth Disease , Characterize a Novel Class of Glutathione Transferase-Related Genes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 1, p. 176–187, 2004.

MARQUES, W. J. et al. 17p duplicated Charcot-Marie-Tooth 1A Characteristics of a new population. **Journal of Neurology**, v. 252, n. 8, p. 972–979, 2005.

MARTIN, A. M.; MARADEI, S. J.; VELASCO, H. M. Charcot Marie Tooth disease (CMT4A) due to GDAP1 mutation : report of a colombian family. **Colombia Médica**, v. 46, n. 4, p. 194–198, 2015.

MATHIS, S. et al. Charcot–Marie–Tooth diseases: an update and some new proposals for the classification. **Journal of Medical Genetics**, v. 52, n. 10, p. 681–690, 2015.

MCCORQUODALE, D.; PUCILLO, E. M.; JOHNSON, N. E. Management of Charcot – Marie – Tooth disease: improving long-term care with a multidisciplinary approach. **Journal of Multidisciplinary Healthcare**, v. 9, p. 7–19, 2016.

MORONI, I. et al. Novel mutations in the GDAP1 gene in patients affected with early-onset axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A. **Neuromuscular Disorders**, v. 19, p. 476–480, 2009.

MURPHY, S. M. et al. Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 83, n. 7, p. 706–710, 2012.

NIEMANN, A. et al. Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. **The journal of Cell Biology**, v. 170, n. 7, p. 1067–1078, 2005.

NIEMANN, A. et al. The Gdap1 knockout mouse mechanistically links redox control to

Charcot-Marie-tooth disease. **Brain**, v. 137, n. 3, p. 668–682, 2014.

NOACK, R. **Resistance against oxidative glutamate toxicity: Functional characterization of amino acid antiporter subunit xCT, purinergic ATP receptor P2X3 and mitochondrial fission factor GDAP1.** [s.l.] Heinrich-Heine University Düsseldorf, 2011.

NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R. R.; WILLARD, H. F. **Thompson e Thompson Genética Médica.** 7 edição ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltd, 2008.

PAREYSON, D. et al. Mitochondrial dynamics and inherited peripheral nerve diseases. **Neuroscience Letters**, v. 596, p. 66–77, 2015.

PAREYSON, D.; MARCHESI, C. Diagnosis, natural history, and management of Charcot-Marie-Tooth disease. **The Lancet Neurology**, v. 8, p. 654–667, 2009.

PAREYSON, D.; SCAIOLI, V.; M., L. Clinical and Electrophysiological Aspects of Charcot-Marie-Tooth Disease. **Neuromolecular medicine**, v. 8, p. 3–22, 2006.

PEDROLA, L. et al. GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 8, p. 1087–1094, 2005.

REILLY, M. M.; SHY, M. E. Diagnosis and new treatments in genetic neuropathies. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 80, n. 12, p. 1304–1314, 2009.

RICHARDS, S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants : a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in Medicine**, v. 17, n. 5, p. 405–424, 2015.

ROSSOR, A. M. et al. Clinical implications of genetic advances in Charcot-Marie-Tooth disease. **Nature reviews. Neurology**, v. 9, p. 562–571, 2013.

SAPORTA, A. S. D. et al. Charcot Marie Tooth (CMT) Subtypes and Genetic Testing Strategies. **National Institutes of Health**, v. 69, n. 1, p. 22–33, 2011.

SAPORTA, M. A.; SHY, M. E. Inherited Peripheral Neuropathies. **Neurologic clinics**, v. 31, n. 2, p. 597–619, 2014.

SCHWARZ, J. M. et al. MutationTaster evaluates disease - causing potential of sequence alterations. **Nature Publishing Group**, v. 7, n. 8, p. 575–576, 2010.

SENDEREK, J. et al. Mutations in the ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 (GDAP1) gene in intermediate type autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy. **Brain**, v. 126, n. pt3, p. 642–649, 2003.

SEVILLA, T. et al. Vocal cord paresis and diaphragmatic dysfunction are severe and frequent symptoms of GDAP1-associated neuropathy. **Brain**, v. 131, n. 11, p. 3051–3061, 2008.

SHIELD, A. J.; MURRAY, T. P.; BOARD, P. G. Functional characterisation of ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 as a glutathione transferase.

Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 347, p. 859–866, 2006.

SISKIND, C. E.; SHY, M. E. Genetics of Neuropathies. **Seminars in Neurology**, v. 31, n. 5, p. 494–505, 2011.

SIVERA, R.; SEVILLA, T.; MARTÍNEZ-RUBIO, D. Charcot-Marie-Tooth disease Genetic and clinical spectrum in a Spanish clinical series. **Neurology**, v. 81, p. 1617–1625, 2013.

SKRE, H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. **Clinical genetics**, v. 6, p. 98–118, 1974.

STENSON, P. D. et al. The Human Gene Mutation Database: Building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. **Human Genetics**, v. 133, n. 1, p. 1–9, 2014.

STOJKOVIC, T. et al. Vocal cord and diaphragm paralysis, as clinical features of a French family with autosomal recessive Charot-Marie-Tooth disease, associated with a new mutation in the GDAP1 gene. **Neuromuscular Disorders**, v. 14, n. 4, p. 261–264, 2004.

SZIGETI, K.; NELIS, E.; LUPSKI, J. R. Molecular Diagnostics of Charcot-Marie-Tooth Disease and Related Peripheral Neuropathies. **Neuromolecular medicine**, v. 8, n. 1–2, p. 243–254, 2006.

TAZIR, M. et al. Autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease : from genes to phenotypes. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 18, p. 113–129, 2013.

TAZIR, M. et al. Hereditary motor and sensory neuropathies or Charcot–Marie–Tooth diseases: An update. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 347, n. 1–2, p. 14–22, 2014.

TERESA, S. et al. Clinical, electrophysiological and morphological findings of Charcot-Marie-Tooth neuropathy with vocal cord palsy and mutations in the GDAP1 gene. **Brain**, v. 126, p. 2023–2033, 2003.

THOMAS, P. K. et al. The phenotypic manifestations of chromosome 17p11.2 duplication. **Brain**, v. 120, p. 465–478, 1997.

TIMMERMAN, V.; STRICKLAND, A. V; ZÜCHNER, S. Genetics of Charcot-Marie-Tooth (CMT) Disease within the Frame of the Human Genome Project Success. **Genes**, v. 5, p. 13–32, 2014.

VALLAT, J.-M.; MATHIS, S.; FUNALOT, B. The various Charcot-Marie-Tooth diseases. **Current opinion in neurology**, v. 26, n. 5, p. 473–80, 2013.

WAGNER, K. M. et al. Targeting and function of the mitochondrial fission factor GDAP1 are dependent on its tail-anchor. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, 2009.

WILDEMAN, M. et al. Improving Sequence Variant Descriptions in Mutation Databases and Literature Using the Mutalyzer Sequence Variation Nomenclature Checker. **Human Mutation**, v. 29, p. 6–13, 2008.

YATES, A. et al. Ensembl 2016. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. 710–716, 2015.