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

IVAN AUGUSTO DE LORENA

**Análise mutacional das regiões não codificantes 5'UTR e Promotora P2 do
gene GJB1 em indivíduos acometidos por CMTX do tipo 1**

**Ribeirão Preto
2018**

IVAN AUGUSTO DE LORENA

Análise mutacional das regiões não codificantes 5'UTR e Promotora P2 do gene GJB1 em indivíduos acometidos por CMTX do tipo 1

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurologia, do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da 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
2018**

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.

Lorena, Ivan Augusto

Análise mutacional das regiões não codificantes 5'UTR e promotora P2 do gene GJB1 em indivíduos acometidos por CMTX do tipo 1. Ribeirão Preto, 2018.

75 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Neurologia.

Orientador: Marques Júnior, Wilson.

1. GJB1 (Gap junction beta 1). 2. Regiões não codificantes. 3. Mutação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Ivan Augusto de Lorena

Título: Análise mutacional das regiões não codificantes 5'UTR e promotora P2 do gene GJB1 em indivíduos acometidos por CMTX do tipo 1

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

Primeiramente a Deus pela dádiva da vida e por ter me proporcionado saúde e força para superar as adversidades.

Aos meus pais por sempre acreditarem em mim e o apoio incondicional as minhas decisões, além é claro do investimento em minha formação acadêmica, o que me permitiu chegar até aqui. As minhas queridas avós Dulce e Ana Maria pelo carinho e todas as orações. A minha amada esposa pelo apoio e companheirismo no dia a dia, sempre disposta a se sacrificar para que eu pudesse brilhar e claro por ter me dado este ano o mais belo dos presentes, nosso filho Valentim. Aos meus tios, tias, primos, primas e irmão por me ensinarem o verdadeiro valor da família e que nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo superior, sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente.

Ao meu orientador Prof. Dr. Wilson Marques Jr. pela oportunidade e pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções e incentivo. Obrigado pela confiança.

A professora Silmara pela amizade e apoio e por desde os tempos da graduação ter acompanhado os meus passos e olhado por mim.

As técnicas do laboratório de neurogenética Sandra, Daiana e Sylvia pela paciência e dedicação ao me ensinar sobre os procedimentos técnicos necessários para que eu completasse meu estudo.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela concessão da bolsa de mestrado para a realização deste trabalho

Enfim, a todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa conquista, o meu muito obrigado.

RESUMO

LORENA, I. A. **Análise mutacional das regiões não codificantes 5'UTR e promotora P2 do gene GJB1 em indivíduos acometidos por CMTX do tipo 1.** 2018. 75 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Introdução: Até bem pouco tempo atrás a análise mutacional de regiões gênicas não codificantes raramente eram reportadas em estudos genéticos sobre doenças hereditárias. Geralmente, o enfoque desses estudos recaía sobre as regiões ditas codificantes, também conhecidas como regiões exônicas. Com o progresso da tecnologia em biologia molecular, especialmente após o desenvolvimento do sequenciamento em larga escala, temos observado um avanço jamais visto antes no entendimento de como opera o genoma humano e consequentemente uma mudança de paradigmas. Estudos mais recentes tem abrangido consistentemente a análise mutacional de regiões não codificantes ou regulatórias. No caso da neuropatia de “*Charcot-Marie-Tooth*” (CMT), pouco ainda se sabe sobre os fenótipos resultantes de mutações localizadas em sequências regulatórias dos genes relacionados a doença. Por exemplo, na CMT ligada ao cromossomo X do tipo 1 (CMTX1), que é causada por mutações no gene GJB1 que codifica para a proteína canal conexina 32, apenas 0.01% das mutações já detectadas no gene estão presentes na região 5' UTR (Untranslated Region) (KABZINSKA et al., 2011).

Objetivos: Em vista disso, o propósito deste estudo foi a análise mutacional da região não codificante 5' UTR e região promotora P2 do gene GJB1. Mais precisamente, 600 pares de bases *upstream* a *open Reading frame* (ORF) do transcrito do gene GJB1 expresso no sistema nervoso. **Métodos:** Foram investigados 100 pacientes em andamento no ambulatório de neurologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de medicina de Ribeirão preto USP (FMRP – USP) com sintomas sugestivo de CMTX do tipo 1 e que não apresentaram mutação alguma na região codificadora do mesmo gene em triagens posteriores. Para tanto foram realizadas as técnicas de PCR (para amplificação do DNA) e posteriormente o sequenciamento do produto amplificado por meio do sequenciamento de Sanger.

Resultados: Três variantes foram detectadas em 4 pacientes não relacionados, duas alterações intrônicas (já descritas) e uma nova alteração, encontrada no exon 1B (não codificante) do gene GJB1. **Conclusão:** Os resultados obtidos em nosso estudo sugerem que mutações na região 5' UTR do gene GJB1 na população brasileira são incomuns e aparentemente não são responsáveis por casos sugestivos de CMTX1 sem causa genética atribuída.

Palavras chaves: GJB1 (Gap junction beta 1); Regiões não codificantes; Mutação.

ABSTRACT

LORENA, I. A. **Mutational analysis of non-coding 5'UTR and promoter region P2 of GJB1 gene in individuals affected by CMTX type 1.** 2018. 75 p. Dissertation (Master degree) - Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Introduction: Until recently mutational analysis of non-coding regions of the DNA were rarely reported on genetic studies about inherited disorders. Usually, the approach of those studies relied primarily on the analysis of the coding regions of the DNA, also known as exonic regions. However, with the progress of science in molecular biology, especially after the development of the high throughput sequencing technology, we have observed an advance never seen before regarding of how the human genome operates and consequently a paradigm shift. New studies have consistently covered these regulatory or non-coding regions of the DNA. In the case of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT), little is known about the phenotypes resulting from mutations in the regulatory sequences of the genes related to the disease. For example, in the X linked CMT type 1 (CMTX1), caused by alterations in the GJB1 gene that encodes for the Channel like protein connexin32 (CX32), only 0.01% of the mutations ever found in the gene were actually localized in its 5' untranslated region (5'UTR) (KABZINSKA et al., 2011). **Objectives:** Considering it, the purpose of this study was the mutational analysis of the 5' non-coding region and promoter region P2 of GJB1 gene. More specifically, 600 base pairs (bp) upstream of the open reading frame (ORF) of the transcript expressed in the nervous system (NS). **Methods:** 100 patients in progress in the Clinical Hospital of the Medical School at University of São Paulo presenting suggestive clinical diagnoses of CMTX1 were screened for mutations in the region of interest, after mutations in the coding region of GJB1 gene were excluded in previous analysis. Therefore, we performed a Polimerase Chain Reaction (to amplify the DNA) followed by sequencing of the amplified material via Sanger sequencing. **Results:** We detected 3 alterations in 4 unrelated patients, 2 intronic variants (already described) and a novel mutation in the non-coding exon 1B of the GJB1 gene. **Conclusion:** The obtained results in our study suggest that mutations in the 5'UTR of the GJB1 gene in the Brazilian population are uncommon and apparently they are not a major cause of CMTX1 in genetic unassigned patients with a suggestive clinical diagnosis of CMTX1.

Keywords: GJB1 (Gap junction beta 1); non-coding regions; mutation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: DIAGRAMA DO GENE GJB1	18
FIGURA 2: ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS CONEXINAS	21
FIGURA 3: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO GENE GJB1	24
FIGURA 4: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO QUE ILUSTRA O MECANISMO DE REGULAÇÃO Cx32	24
FIGURA 5: PERFIL TÉRMICO EMPREGADO NA PCR.	37
FIGURA 6: PERFIL TÉRMICO EMPREGADO NA PCR DE SEQUENCIAMENTO.	38
FIGURA 7: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO GENE GJB1	45
FIGURA 8: HEREDOGRAMA FAMÍLIA CMTX1 C.-39C>T.	53
FIGURA 9: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS SEQUÊNCIAS CONSENSOS DO SPLICING	57
FIGURA 10: OS CRITÉRIOS ADOTADOS PARA CLASSIFICAÇÃO DE VSIs	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO GERAL DAS CMTs	16
TABELA 2 - SEQUÊNCIA DOS PRIMERS EMPREGADOS NO ESTUDO.	36
TABELA 3 - PROTOCOLO DA PCR (REAGENTES).	37
TABELA 4 - PROTOCOLO PCR DE SEQUENCIAMENTO.	38
TABELA 5 - PARÂMETROS SUGERIDOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DE UMA VSI.	40
TABELA 6 - BASE DE DADOS CONSULTADA.....	41
TABELA 7 - ALGORÍTMOS PARA DETECÇÃO DE SÍTIO DE SPLICING ALTERNATIVO	42
TABELA 8 - CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS VARIANTES DETECTADAS.....	45
TABELA 9 - FREQUÊNCIA ALÉLICA DA VARIANTE C.-17+116C>T	46
TABELA 10 - FREQUÊNCIA ALÉLICA DA VARIANTE C.-17+116C>T	47
TABELA 11 - FREQUÊNCIA ALÉLICA DA VARIANTE C.-16-139CA>G	48
TABELA 12 - FREQUÊNCIA ALÉLICA DA VARIANTE C.-16-139CA>G.	48
TABELA 13 - SINAIS DE SÍTIO DE SPLICE PARA A VARIANTE C.-39C>T.	49
TABELA 14 - SINAIS DE SÍTIO DE SPLICE PARA A VARIANTE C.-16-139A>G.....	50
TABELA 15 - SINAIS DE SÍTIO DE SPLICE ALTERNATIVO PARA A VARIANTE C.-17+116C>T...51	
TABELA 16 - NÍVEL DE CONSERVAÇÃO DAS VARIANTES DETECTADAS.	52
TABELA 17 - SÍNTESE DAS INFORMAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DOS PARÂMETROS UTILIZADOS PARA O ESTUDO DAS VARIANTES DETECTADAS NESTE TRABALHO.	65

LISTA DE ABREVIATURAS

5'UTR	5' Untranslated Region
ACMG	American College of Medical Genetics
AMP	Association for Molecular Pathology
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CMT	Charcot Marie Tooth
CMTX1	X Linked Charcot Marie Tooth
Cx32	Connexin 32
EGR2	Early Growth Response 2
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GJ	Gap Junctions
GJB1	Gap Junction Beta 1
JC	Junções Comunicantes
LITAF	Lipopolysaccharide Induced TNF Factor
MPZ	Myelin Protein Zero
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
ORF	Open Reading Frame
PHAST	Phylogenetic Analysis with Space/Time models
PMP22	Peripheral Myelin Protein 22
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
UCSC	University of Clifornia, Santa Cruz
USP	Universidade de São Paulo

VCN	Velocidade de Condução do nervo
VSI	Variante de significância Incerta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 CHARCOT-MARIE-TOOTH LIGADA AO CROMOSSOMO X (CMTX)	18
1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS CMTXs	19
1.3 CMTX1	19
1.4 JUNÇÕES COMUNICANTES E AS CONEXINAS	20
1.4.1 Expressão e função da conexina 32 em células mielinizantes	21
1.5 MECANISMOS DE PATOGÊNESE PROPOSTOS PARA CMTX1	22
1.6 GAP JUNCTION BETA 1 (GJB1)	23
1.6.1 Regulação da expressão da Cx32 pelo gene GJB1	24
1.7 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ASSOCIADAS A CMTX1	25
1.7.1 Manifestações da CMTX 1 no Sistema nervoso Central	26
1.8 DIAGNÓSTICO DA CMTX1	27
1.9 TRATAMENTO	28
1.9.1 Terapia experimental para CMTX1	28
2. OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.1.1 Objetivos Específicos	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 PACIENTES	33
3.2 GRUPO CONTROLE	33
3.3 OBTENÇÃO DA AMOSTRA	34
3.4 EXTRAÇÃO DO DNA	34
3.4.1 Lise celular	34
3.4.2 Precipitação de Proteína	35
3.4.3 Precipitação do DNA	35
3.4.4 Hidratação do DNA	36
3.5 DESENHO DOS PRIMERS	36
3.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	37
3.7 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO DNA	38
3.7.1 Precipitação e purificação da PCR de sequenciamento	39
3.7.2 Sequenciamento	39
3.8 ANÁLISE DOS DADOS GERADOS POR SEQUENCIAMENTO	39
3.9 CLASSIFICAÇÃO DAS VARIANTS DETECTADAS	40

3.10 BASES DE DADOS UTILIZADAS	41
3.11 BIOINFORMÁTICA.....	42
3.11.1 Ferramentas de predição de splicing alternativo.....	42
3.11.2 Índice de conservação dos nucleotídeos alterados	42
4. RESULTADOS	44
4.1 ANÁLISE GENÉTICA POR SEQUENCIAMENTO DE SANGER	45
4.2 CONSULTA EM BANCOS DE DADOS	46
4.2.1 Variante c.-17+116C>T (íntron 2).....	46
4.2.2 Variante c.-16-139A>G (íntron 2).....	47
4.2.3 Variante c.-39C>T (exon 1b).....	48
4.3 BIOINFORMÁTICA.....	49
4.3.1 Ferramentas de predição de sítio de splicing alternativo	49
4.3.2 Índice de conservação dos nucleotídeos alterados	51
4.4 CONTROLE INTERNO	52
4.5 ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO.....	53
5. DISCUSSÃO	55
5.1 ANÁLISE IN SILICO	57
5.1.1 Conservação dos nucleotídeos.....	59
5.2 BANCOS DE DADOS E GRUPO CONTROLE	60
5.3 CO-OCORRÊNCIA	61
5.4 ESTUDOS FUNCIONAIS	61
5.5 UTILIZAÇÃO DO FENÓTIPO COMO EVIDÊNCIA.....	62
5.6 ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO.....	63
5.7 CLASSIFICAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DETECTADAS.....	63
5.8 FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES EM COMPARAÇÃO A OUTROS ESTUDOS SIMILARES	66
6. CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	70

1. INTRODUÇÃO

A doença de Charcot-Marie-Tooth (CMT) pode ser definida como um conjunto variado de desordens neurológicas progressiva e hereditária que acometem o sistema nervoso periférico (SNP), sendo caracterizada principalmente por fraqueza, atrofia muscular e perda sensitiva com um padrão de distribuição comprimento-dependente (BERGOFFEN et al., 1993). Estima-se que a CMT tenha uma prevalência de 1 caso a cada 1200 nascimentos, o que a torna uma das neuropatias hereditárias de maior importância em todo o mundo (BRAATHEN et al., 2012). De maneira geral, a CMT é dividida em dois grupos principais de acordo com o tipo de célula do SNP que é primariamente acometida. Em sua forma mielínica (ou desmielinizante - CMT1), há acometimento primário das células formadoras de glia do SNP, as células de Schwann. Em sua forma axônica (ou axonal - CMT2), ocorre a degeneração dos axônios dos neurônios do SNP (ABRAMS et al., 2000; REILLY et al., 2011). Ambos os grupos se diferenciam pelo padrão de velocidade de condução do nervo (VCN) nos membros superiores (nervo mediano ou ulnar), onde o tipo 1 é definido como tendo $VCN < 38\text{m/s}$ e o tipo 2 $VCN > 38\text{m/s}$. Uma terceira forma de CMT no entanto possui VCNs entre 25 e 45m/s e a este grupo foi dado o nome de CMT intermediária (CMTI) (HARDING; THOMAS, 1980). Todavia, a forma de se classificar as CMTs é ainda mais variada e complexa e leva em consideração diversos parâmetros clínicos, neurofisiológicos e tipo de herança (KLEOPA et al., 2006). A doença é, atualmente, dividida em 6 grandes grupos de acordo com as características acima descritas. CMT1 denomina as formas autossômicas dominantes e desmielinizantes, CMT2 as formas autossômicas dominantes axonais, AR-CMT2 as formas autossômicas recessivas axonais, CMT4 as formas autossômicas recessivas desmielinizantes, CMTX as formas de herança ligadas ao X e CMTI as formas com redução intermediária da velocidade de condução. Em cada um destes tipos de CMT foram sendo adicionados subtipos que identificam os genes que foram sendo identificados com a utilização de diversas técnicas e ferramentas da biologia molecular. Por exemplo, CMT1A caracteriza uma neuropatia autossômica dominante, desmielinizante, causada pela duplicação do gene PMP22. São conhecidos atualmente pelo menos 90 diferentes tipos de CMT que variam não só de acordo com características físicas dos indivíduos acometidos, mas também com o tipo de herança associada e o gene ou genes afetados (Tabela 1) (BRAATHEN et al., 2012; EGGERMANN et al., 2018; REILLY et al., 2011).

Tabela 1 - Classificação geral das CMTs

TIPO	FREQUÊNCIA	HERANÇA/FORMA	SUBTIPO	GENE
CMT1	50 - 80 %	Autossômica dominante Desmielinizante	CMT 1A	PMP22
			CMT 1B / 1E	MPZ
			CMT 1C	LITAF
			CMT 1D	EGR2
			CMT 1F	NEFL
			CMT1	ARHGEF10
			CMT 1+	FBLN5
CMT2	10 - 15 %	Autossômica dominante Axonal	CMT 2A1	KIF1B
			CMT 2A2	MFN2
			CMT 2B	RAB7
			CMT 2C	TPRV4
			CMT 2D	GARS
			CMT 2E	NEFL
			CMT 2F	HSP27/HSPB1
			CMT 2G	12q12-q13.3
			CMT 2L	HSP22/HSPB8
			CMT 2K	GDAP1
			CMT 2N	AARS
			CMT 2	MPZ
			CMT 2P	LRSAM1
			CMT 2Q	DHTKD1
			CMT 2R	TRIM2
			CMT 2	MT-ATP6
		Autossômica recessiva Axonal	AR CMT 2A	LMNA
			AR CMT 2B	19q13.1-13.3
			AR CMT 2	GDAP1
			ARAN-NM	HINT1
			AR CMT2	GAN
CMT Intermediário	< 4 %	Autossômica dominante	DI-CMT A	10q24.1-25.1
			DI-CMT B	DNM2
			DI-CMT C	YARS
			DI-CMT E	INF2
			DI-CMT F	GNB4
		Autossômica recessiva	RI-CMT B	KARS
			RI-CMT C	PLEKHG5
CMT4	Raro	Autossômica recessiva Desmielinizante	CMT 4A	GDAP1
			CMT 4B1	MTMR2
			CMT 4B2	MTMR13/SBF2
			CMT 4B3	SBF1a
			CMT 4C	KIAA1985/SH3TC2
			CMT 4D (HMSN1)	NDRG1
			CMT 4E	EGR2

			CMT 4F	PRX
			CMT 4G	HK1
			CMT 4H	FGD4
			CMT 4J	FIG4
			CCFDN	CTDP1
CMT Ligado ao X	10 - 15 %	Ligada ao cromossomo X	CMTX1	GJB1
			CMTX2	Xp22.2
			CMTX3	Desconhecido
			CMTX4	AIFM1
			CMTX5	PRPS1
			CMTX6	PDK3

Fonte: Adaptado de Bird (2016) e Reilly et al. (2011).

Não obstante, mesmo diante de tantos avanços na classificação das CMTs, a abordagem molecular da doença no âmbito clínico cotidiano ainda é limitada e abrange em sua grande maioria apenas a análise mutacional de regiões codificantes dos genes envolvidos na manifestação da CMT. Há muito já se sabe que o DNA é uma molécula altamente versátil, composta de diversas estruturas e segmentos de nucleotídeos envolvidos nas mais complexas funções fisiológicas de regulação e expressão de proteínas, enzimas, RNAs, fatores de transcrição, etc (ALBERTS et al., 2002). Portanto, a falta da análise sistemática de regiões regulatórias do DNA em genes relacionados a CMT torna impossível de precisar com exatidão qual a real extensão do impacto destas regiões não codificadoras na etiologia desta que é uma das neuropatias de maior importância clínica no mundo (MURPHY et al., 2011).

Dentre as diversas formas de manifestação da CMT, a forma ligada ao X do tipo 1 (CMTX1), que é o foco de estudo neste trabalho, representa a segunda forma de CMT com maior frequência em praticamente todas as regiões do mundo (MURPHY et al., 2011). Apesar de sua elevada incidência em comparação as demais formas de CMT (com exceção da CMT 1A) muitos pacientes com diagnóstico fortemente sugestivo de CMTX1, baseado nas clínicas, neurofisiologia e história familiar sugestiva de herança ligada ao X, como já mencionado anteriormente, permanecem ainda sem uma confirmação genética de sua condição (MURPHY et al., 2011; TSAI et al., 2013). Recentemente, no estudo conduzido por Tomaselli et al. (2017) foi demonstrado que mutações situadas em regiões não codificadoras do gene GJB1, usualmente não testadas nos sequenciamentos

diagnósticos de rotina deste gene, estavam associadas à CMTX1 em até 11% dos casos.

Baseando-se no acima descrito, o presente estudo foi desenvolvido para verificar se pacientes seguidos no ambulatório de Neurogenética do Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP (HCFMRP-USP) com diagnóstico clínico presuntivo de CMTX1, com base na avaliação clínica, neurofisiológica e padrão de herança, que não apresentaram anormalidades na análise da região codificadora do gene GJB1, poderiam apresentar anormalidades na região regulatória 5' UTR não codificante e da região promotora P2 (nervo-específica) deste gene.

Figura 1 - Diagrama do gene GJB1. Abaixo a indicação da região de interesse em nosso estudo.

Fonte: Adaptado de Tomaselli et al. (2017).

1.1 CHARCOT-MARIE-TOOTH LIGADA AO CROMOSSOMO X (CMTX)

A CMTX é definida como uma neuropatia hereditária sensitiva e motora de herança mendeliana ligada ao cromossomo X, caracterizada por fraqueza, atrofia muscular distal progressiva, deformidades esqueléticas (“*pes cavus*” e dedos em martelo), arreflexia e anormalidades sensitivas variáveis. Geralmente os sinais e sintomas se iniciam nas 2 primeiras décadas de vida. Ao contrário das formas clássicas de CMT, alguns pacientes de CMTX podem desenvolver sintomas transientes no sistema nervoso central (SNC) e lesões reversíveis da matéria branca cerebral (KLEOPA et al., 2006; WANG; YIN, 2016). A CMTX é a segunda variante mais comum de CMT, possui uma frequência que varia de 7 a 15% entre todos os pacientes da doença. Por se tratar de uma doença ligada ao cromossomo X, os homens serão sempre mais severamente afetados (WANG; YIN, 2016).

1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS CMTXs

Até o momento 6 tipos de CMTX foram descritas (Tabela 1). Os tipos 1 e 6 possuem padrões de herança ligado ao X dominante, enquanto que os outros 4 tipos possuem padrão de herança ligado ao X recessivo. Os tipos 1 e 2 foram mapeados para os loci Xp22.2 e Xq26.3-27.1 respectivamente. Em estudo conduzido por Ionasescu (1995), um caso de retardo mental foi relatado em uma das famílias estudadas que foram mapeadas para o locus da CMTX2. No mesmo estudo, um caso de paraparesia espástica foi observado em uma família mapeada para o locus da CMTX3. A CMTX4, também conhecida como Síndrome de “Cowchock” foi mapeada no locus Xq24-26.1 e é caracterizada por início precoce logo na infância de uma neuropatia sensitivo-motora axonal de progressão lenta associada a perda de audição e diminuição da capacidade cognitiva. A CMTX5 compreende a tríade atrofia óptica, surdez e polineuropatia e é causada por mutações no gene da fosforribosil pirofosfato sintase 1 (PRPS1) no cromossomo Xq21.32-q24. Por fim a CMTX6 é causada por mutações no gene da piruvato desidrogenase quinase isoenzima 3 mapeado para o locus Xp22.11. Leve tremor postural das mãos foram relatados em pacientes de CMTX6 (WANG; YIN, 2016).

1.3 CMTX1

A CMTX1 (OMIM 302800) é responsável por 90% das ocorrências de CMTX e portanto é considerada o subtipo mais relevante ligado ao sexo. Ao contrário da CMTX1, as demais formas de CMTX são muito raras e pouco ainda se sabe sobre elas. Aproximadamente 10% dos casos de CMT existentes são ligadas ao cromossomo X e do tipo 1, o que representa a segunda forma de CMT com maior prevalência no mundo. Em um estudo clínico recente de 245 pacientes em 116 famílias, a CMTX1 teve uma prevalência de 4,8% em todos os pacientes com CMT, ficando atrás apenas da CMT1A (prevalência de 19.6%) (BRAATHEN, 2012; WANG; YIN, 2016). Estudos patológicos e eletrofisiológicos classificam a CMTX1 como uma forma predominantemente desmielinizante de CMT (TSAI et al., 2013).

A patogênese da CMTX1 está associada a alterações no gene GJB1 (“Gap junction beta 1”) que codifica a proteína conexina 32 (Cx32), uma importante proteína formadora de junções comunicantes, relacionadas com a regulação da função normal das células mielinizadas do SNP (células de Schwann) e em menor extensão do sistema nervoso central (oligodendrócitos) (WU et al., 2004). Por se tratar de uma doença ligada ao sexo, homens e mulheres serão acometidos de maneira distinta. Indivíduos do sexo masculino com CMTX1 geralmente apresentam neuropatia mais severa, enquanto que em mulheres os sintomas são em geral mais brandos e mais tardios podendo até mesmo serem imperceptíveis (BONE et al., 1997; KABZINSKA et al., 2011). Isto provavelmente ocorre devido ao fenômeno da lionização, na qual um dos cromossomos X da mulher é inativado aleatoriamente durante o desenvolvimento embrionário (ALBERTS et al., 2002). Esta inativação variável do cromossomo X reduz, de certa forma, a expressividade da cópia mutante presente em um dos cromossomos sexuais feminino (TSAI et al., 2013).

1.4 JUNÇÕES COMUNICANTES E AS CONEXINAS

As junções comunicantes (JC) ou GJ (do Inglês “gap junctions”) são canais transmembranares encontrados em grande parte dos tecidos de conexão em células adjacentes. No caso das células Schwann, as GJs também conectam diferentes compartimentos dentro da mesma célula (KLEOPA; SARGIANNIDOU, 2015). Cada GJ é formada pela interação de dois semicanais ou conexons que se dispõem de forma oposta em relação ao outro, formados por hexâmeros de moléculas individuais de conexina arranjadas em torno de um poro central (BERGOFFEN, 1993). Os poros que constituem uma GJ medem em torno de 1,2 nm de diâmetro, restringindo o fluxo de moléculas de peso molecular acima de 1000 Da, incluindo íons e segundos mensageiros. As GJs estão envolvidas na manutenção de uma variedade de funções vitais, que incluem a cooperação metabólica, tamponamento espacial, acoplamento elétrico, controle de crescimento e diferenciação celular além da formação de padrões durante o desenvolvimento celular (BERGOFFEN, 1993).

Figura 2: Ilustração esquemática das conexinas e como se relacionam para a formação das junções comunicantes

Fonte: Adaptado de wikimediacommons.org (2018).

1.4.1 Expressão e função da conexina 32 em células mielinizantes

Isto provavelmente ocorre devido ao fenômeno da lionização, na qual um dos cromossomos X da mulher é inativado aleatoriamente durante o desenvolvimento embrionário onde elas formam as GJs entre as camadas das células de Schwann que formam a bainha de mielina (BERGOFFEN et al., 1993; SCHERER et al., 1995). As GJs formadas a partir da Cx32 criam uma importante via de comunicação através das diversas camadas da bainha de mielina, que permitem a difusão de moléculas de baixo peso molecular contidas no citoplasma perinuclear das células de Schwann (KLEOPA; SARGIANNIDOU, 2015).

Mutações no gene GJB1, que codifica a proteína Cx32, em geral causam apenas neuropatias periféricas (CMTX1) e ocasionalmente podem vir a produzir fenótipos no sistema nervoso central (SNC) (KLEOPA, 2015). Todavia, a Cx32 é expressa em diversos tipos de células além das células de Schwann e oligodendrócitos. De fato, ela se apresenta de forma mais abundante no fígado. Aceita-se, de modo geral, que a co-expressão de outras conexinas, além da 32, em tecidos não neurais que expressam a Cx32 seria o suficiente para manter uma função parcial daquele tecido, protegendo o mesmo da perda ou diminuição da

função da Cx32 (KLEOPA, 2015). Em contraste, as células de Schwann expressam a conexina 29 (Cx29) além da Cx32, entretanto isso parece não ser o suficiente para prevenir o desenvolvimento da CMTX1 em caso de diminuição ou perda da função da Cx32, indicando que a ela teria uma função preponderante no SNP (BERGOFFEN, 1997; KLEOPA; SARGIANNIDOU, 2015). Por outro lado, os oligodendrócitos, que expressam a Cx47 em adição a Cx32, conseguem manter uma função estável das GJs, sugerindo que a Cx47 no SNC consegue compensar a perda ou diminuição da função da Cx32. Apesar disso, pacientes com CMTX1 chegam a apresentar fenótipos no SNC, indicando uma certa vulnerabilidade destas células quando há algum impedimento da função normal da Cx32, embora estes sintomas sejam mais brandos ou na maioria dos casos mesmo ausente (KLEOPA; SARGIANNIDOU, 2015).

1.5 MECANISMOS DE PATOGÊNESE PROPOSTOS PARA CMTX1

Muito antes de se descobrirem mutações no gene da Cx32 e relacionarem essas mutações a CMTX1, neurocientistas já haviam percebido a possível importância das GJ nas células de Schwann (BONE et al., 1997). As impressões iniciais se confirmaram após os estudos conduzidos por Bergoffen et al. (1993) e Scherer et al. (1995) que utilizaram imunomarcadores para determinar a localização precisa das GJ nas regiões não compactas da bainha de mielina das células de Schwann, chamadas de incisuras. Esta descoberta demonstrou que a região não compacta da bainha de mielina é funcionalmente e estruturalmente distinta da região compacta da mesma e munida de seu próprio conjunto de proteínas (entre elas a Cx32), diferente da ideia que se tinha da bainha de mielina na época como sendo uma estrutura cilíndrica constituída de mielina compactada (BONE et al., 1997).

Devido à localização e às características morfológicas da Cx32, sugeriu-se que as GJ agiriam como uma via direta para a difusão de íons e pequenas moléculas através da bainha de mielina e que a interrupção ou diminuição desta função seria a raiz da desmielinização desencadeada na CMTX1 (SCHERER et al., 1995). Estudos conduzidos por Bone et al. (1997), confirmaram a função das GJ como via para a difusão de íons e pequenas moléculas através da bainha de mielina

das células de Schwann. Em concordância com esta descoberta, inúmeros estudos genéticos de linkage e análises mutacionais correlacionaram alterações no gene da Cx32 (GJB1) a CMTX1. A partir deste conceito inúmeros mecanismos de patogênese para a CMTX1 foram elucubrados (WANG; YIN, 2016). Por exemplo, inúmeras mutações na região codificadora do gene GJB1 levam a formação de canais de GJ não funcionais, perda da habilidade da Cx32 em formar GJ, acúmulo de Cx32 no citoplasma da célula (particularmente no aparelho de Golgi) e ao mesmo tempo a ausência do mesmo na membrana plasmática, sugerindo o que diversos autores interpretam como sendo uma “interferência do tráfego de proteínas celulares”. Outros estudos, que relataram mutações em regiões reguladoras não codificantes do gene GJB1, como é o caso da região promotora P2 do referido gene, bloqueiam a transcrição da Cx32 levando a deficiência na produção da proteína ou até mesmo a ausência da mesma, desencadeando o processo de desmielinização das fibras do SNP como já descrito anteriormente (KLEOPA; SARGIANNIDOU, 2015; WANG; YIN, 2016).

1.6 GAP JUNCTION BETA 1 (GJB1)

O gene envolvido diretamente na patogênese da CMTX1 (o gene GJB1) está localizado precisamente no braço longo do cromossomo X na região 13.1 (Xq13.1) e possui extensão total, em termos de bases nitrogenadas, de 10.3Kbp que se dividem em duas regiões exônicas e uma região intrônica variável (CORCOS et al., 1991; MURPHY et al., 2011). O gene GJB1 possui uma única região codificadora que está totalmente contida no exon 2, enquanto que a região não codificadora ou regulatória está presente no exon 1, que se subdivide em exon 1A e 1B. Cada porção não codificante do exon 1 (exon 1A e exon 1B) compreende uma região 5' UTR (“5' Untranslated Region”) do gene da Cx32 e a cada uma delas cabe uma região promotora responsável pela regulação da expressão da Cx32 em diversos tecidos do corpo humano (KABZINSKA et al. 2011; MURPHY et al., 2011). A região promotora P1, responsável pela regulação do exon 1A e a região promotora P2, responsável pela regulação do exon 1B.

Figura 3: Diagrama esquemático do gene GJB1. Região codificadora no exon 2 e demais regiões não codificadoras exon 1A, exon 1B e regiões promotoras P2 e P1

Fonte: Adaptado de Kabzinska et al. (2011).

1.6.1 Regulação da expressão da Cx32 pelo gene GJB1

Pelo fato de possuir duas regiões promotoras o gene GJB1 é capaz de codificar duas variantes da mesma proteína (Cx32). O transcrito da variante 2 é regulado pela região promotora P1 e está presente em células do fígado, pâncreas, oócitos e células tronco embrionárias (KABZINSKA et al., 2011). No sistema nervoso periférico, mais especificamente nas células de Schwann, o transcrito da Cx32 expresso é o da variante 1, iniciado principalmente pela região promotora P2. Por outro lado, no sistema nervoso central, mais especificamente nos oligodendrócitos, a regulação da expressão da Cx32 ocorre por ambas as regiões promotoras P1 e P2. Fato este que poderia explicar, em tese, porque os sintomas relacionados ao SNC nos pacientes de CMTX1 vão de leves a moderados e até mesmo ausentes (KABZINSKA et al., 2011; MURPHY et al., 2011).

A atividade da região promotora P2 do gene GJB1 dentro do SNP é modulada pelos fatores de transcrição SOX10 e EGR2, os quais são atribuídos a função de regular a eficiência da transcrição da Cx32, sendo que o mais proeminente desses fatores transcripcionais é o SOX10 que se associa ao gene em sítios específicos de ligação (S2 ou S1) na região promotora P2 e inicia a transcrição do mRNA. Mutações contidas na região do sítio de ligação S2 do fator de transcrição SOX10 estão relacionadas com casos de CMTX1 (KABZINSKA et al., 2011).

Figura 4: Diagrama esquemático que ilustra o mecanismo de regulação da Cx32 pelo fator transcrricional SOX10 na região promotora P2 e o sítio de ligação específico S2

Fonte: Adaptado de Kabzinska et al. (2011).

Registros recentes relatam que mais de 400 mutações já foram identificadas no gene GJB1. Entre elas, mutações missense e nonsense, inserções, deleções, frameshift etc. Todavia, a investigação das regiões ditas não codificantes, ainda não são muito exploradas no cotidiano da prática clínica, embora estudos recentes, como os citados anteriormente, correlacionem mutações encontradas em regiões reguladoras não codificantes do gene GJB1 a CMTX1 (WANG; YIN, 2016). Este ainda é um campo vasto de estudo dentro da neurociência e abre um leque vasto de possibilidades no entendimento da manifestação e evolução de doenças neurológicas hereditárias como a CMT.

1.7 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ASSOCIADAS A CMTX1

As manifestações clínicas da CMT1X, assim como a gravidade de seus sinais e sintomas, variam de acordo com o sexo do paciente e a idade de início dos primeiros sintomas. Nos homens a idade de início da manifestação dos sintomas é por volta dos 5 até os 20 anos de idade e os sintomas iniciais são tipicamente dificuldade para correr, tornozelos tortos, pés levemente caídos e perda da sensibilidade na porção distal dos membros, que ocorre um pouco mais tardiamente

(KLEOPA et al., 2006). Dependendo da gravidade da doença a fraqueza nos membros pode progredir e envolver os músculos gastrocnêmio e sóleo até o ponto onde equipamentos ortopédicos são necessários para a locomoção do paciente. Os sintomas de fraqueza, atrofia muscular e perda sensitiva também se desenvolvem na porção distal dos membros superiores, acometendo particularmente os músculos tenares na palma das mãos. Estas manifestações clínicas são o resultado da degeneração axonal comprimento-dependente que é decorrente da lesão primária da mielina (KLEOPA et al., 2006).

Por outro lado, nas mulheres, a idade de início da manifestação da doença ocorre mais tardiamente, por volta do final da segunda década de vida. Como já citado anteriormente, em alguns casos, são até mesmo assintomáticas, devido ao fenômeno de inativação do cromossomo X (KLEOPA et al., 2006; SCHERER et al., 1995).

1.7.1 Manifestações da CMTX1 no Sistema nervoso Central

O envolvimento do SNC, pelo menos em graus subclínicos, é de certa forma comum em pacientes com CMTX1. Diversas mutações no gene da Cx32 (GJB1) parecem estar associados a sinais e sintomas no SNC (KLEOPA et al., 2006). Por exemplo, em grande parte destes pacientes a latência da resposta evocada pelo tronco cerebral auditivo é atrasada, mesmo na ausência de sintomas clínicos (NICHOLSON et al., 1998; SENDEREK et al., 1999). Além do mais, há relatos de perda auditiva relacionados a diversas mutações no gene GJB1 em famílias acometidas por CMTX1. Na maioria dos casos, o início do déficit auditivo ocorre na infância, independentemente do sexo do paciente. Todavia, faltam provas de causalidade quanto a esta característica, porque outras famílias de CMTX1 que apresentam as mesmas mutações acabam não desenvolvendo o mesmo fenótipo (KLEOPA et al., 2006).

Outros exemplos de manifestações clínicas associadas à CMTX1 no SNC são a presença de espasticidade, sinal de Babinski e hiperreflexia. Embora o verdadeiro grau de acometimento desses achados clínicos podem estar sendo mascarados

pela neuropatia. Em adição, crises de encefalopatia aguda transiente associada a alterações na imagem por ressonância magnética sugerem uma disfunção da mielina no SNC provavelmente resultante de alterações na Cx32. O desencadeamento do déficit agudo em questão parece relacionar-se com viagens a grandes altitudes, intensa atividade física ou infecção aguda (HANEMANN et al., 2003; KLEOPA et al., 2006; PAULSON et al., 2002; SCHELHAAS et al., 2002; TAYLOR et al., 2003).

1.8 DIAGNÓSTICO DA CMTX1

A CMTX1 é uma neuropatia hereditária sensitivo-motora que apresenta algumas características que podem ser sugestivas, embora o diagnóstico definitivo tenha seja dependente do teste genético. Clinicamente, pode haver uma discreta assimetria da neuropatia, que não é comum na maior parte das CMT e um comprometimento mais acentuado na região tenar. Nos homens o quadro costuma se iniciar mais precocemente, ser mais intensa e evoluir mais rapidamente, enquanto nas mulheres o início é mais tardio e a neuropatia costuma ser menos intensa (DE JONGHE et al., 1999).

No estudo da condução, os pacientes do sexo masculino tem uma redução intermediária da velocidade de condução (30 a 40 m/s) enquanto nas mulheres a velocidade de condução é mais elevada, dentro dos níveis considerados axonais (40 50 m/s). Além dos perfis clínico e eletrofisiológico, o heredograma deve ser típico ou, pelo menos, compatível com uma herança ligada ao X. O pai acometido transmite a doença somente para as filhas e nunca para os filhos, enquanto a mãe acometida transmite a doença tanto para filhas como para filhos. Além disso, o quadro clínico das mulheres costuma ser mais brando. O diagnóstico definitivo, como já dito anteriormente, depende do sequenciamento do gene GJB1 (DE JONGHE et al., 1999; KLEOPA et al., 2006; NICHOLSON et al., 1998).

1.9 TRATAMENTO

Até o momento não existem relatos de tratamento genético ou a base de drogas para a CMT1 X ou para qualquer outro tipo de CMT que seja realmente efetivo, embora nos últimos 30 anos inúmeros experimentos tenham sido conduzidos neste sentido. O que existe de fato são procedimentos paliativos para a amenização dos sintomas da doença e com isso melhorar ao máximo a qualidade de vida dos pacientes. Por exemplo, a utilização de órteses e/ou procedimentos cirúrgicos que visam amenizar a dor e corrigir problemas posturais desencadeados pelos defeitos ósseos produzidos pela doença; a prática de exercícios físicos leves a moderados, especialmente aqueles focados no fortalecimento dos membros inferiores (no intuito de melhorar a caminhada do paciente); utilização de calçados adaptados; fisioterapia; etc (PAREYSON; MARCHESE, 2009).

Determinados tipos de pacientes com CMTX1 são mais susceptíveis a desenvolverem sintomas transientes relacionados ao SNC em situações de estresse como quadro de hipóxia, que pode ser desencadeado por exercício extenuante ou viagens a lugares que se localizam em grandes altitudes e febre, proveniente de infecções (KLEOPAS et al., 2006). Portanto é aconselhável a esse tipo de paciente que evite tais situações. Uma outra forma de auxiliar no tratamento dos sintomas desencadeados pela CMT e de importância vital para pacientes de CMT1 X é com o controle da dieta. Como trata-se de uma doença que debilita a movimentação, deve-se existir todo um cuidado para não favorecer o ganho de peso pelos pacientes, o que agravaria os quadros relacionados a dor, postura e movimentação. Portanto, uma dieta balanceada é fundamental para a saúde e bem-estar destes pacientes (PAREYSON; MARCHESE, 2009).

1.9.1 Terapia experimental para CMTX1

Um estudo recente conduzido por Sargiannidou et al. (2015) fez uso de um vetor lentiviral (LV.Mpz-GJB1) que carregava o gene GJB1 sob o promotor da proteína mielínica zero (MPZ) específica das células de Schwann. A transferência do

vetor, via injeção intraneural, a grupos de camundongos Knock out para Cx32 com 2 meses de idade (antes do início da desmielinização), reduziu significativamente a taxa de fibras mielinizadas anormais e inflamações secundárias em comparação ao grupo que não foi tratado. A transferência do gene GJB1 utilizando um vetor lentiviral levou a expressão eficiente do gene, especificamente nas células de Schwann. A restauração da expressão da Cx32 melhorou a patologia do nervo em um modelo doente e forneceu uma abordagem promissora para tratamentos futuros da CMTX1 e outras neuropatias hereditárias.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

A identificação de mutações genéticas nas regiões regulatórias 5' UTR e promotora P2 (nervo específico) do gene GJB1 em um grupo de 100 pacientes acometidos por neuropatia hereditária sugestiva de CMTX1 e que não apresentaram mutações na região codificadora do gene em questão em uma análise prévia.

2.1.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a frequência e o tipo das alterações possivelmente encontradas nessas regiões ditas regulatórias ou não codificadoras do gene GJB1.
- Validar por meio de programas de bioinformática e estudo em grupo controle, composto por pelo menos 100 indivíduos não acometidos por CMTX1, as alterações encontradas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PACIENTES

Foram estudados 100 pacientes em seguimento no ambulatório de neurologia do Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP que foram clinicamente diagnosticados como tendo uma neuropatia periférica sensitivo motora muito sugestiva de CMTX1 que caracteriza-se por fraqueza, distrofia muscular distal progressiva, arreflexia e anormalidades sensitivas variáveis (Kleopas, 2005). Os pacientes selecionados foram previamente triados para as alterações genéticas mais comuns nos casos de CMT. Uma vez que trata-se de uma doença de características clínicas bastante heterogêneas, não é incomum que possa haver sobreposição entre os tipos de CMT que se assemelham clinicamente. Os pacientes foram testados para duplicação ou deleção da região 17p11.2 e para o sequenciamento dos genes GJB1, PMP22, MPZ, EGR2 e LITAF. Somadas, as alterações nestes cinco genes são responsáveis por cerca de 90% dos casos de CMT (JURATH; SHY, 2015). Nos pacientes selecionados todavia, nenhuma alteração fora encontrada na região codificadora destes genes. Antes da obtenção da amostra os pacientes leram e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido a respeito do estudo desenvolvido.

3.2 GRUPO CONTROLE

O grupo controle foi constituído por pelo menos 100 indivíduos, maiores de idade e que não sejam acometidos por CMTX1 ou que não apresentem qualquer sintomas que sugere ou caracterizem a presença de CMTX1 e em cujas famílias não haja histórico da doença em estudo. Antes da obtenção da amostra os indivíduos que se dispuseram a participar leram e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido a respeito do estudo desenvolvido.

O tamanho amostral ($n = 100$) foi definido com base no número de pacientes em seguimento no ambulatório de neurologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto que atenderam aos requisitos do desenho do estudo. Logo, o tamanho amostral do grupo controle também foi definido como sendo 100, pois se trata de um estudo com dados não pareados (comparativo).

3.3 OBTENÇÃO DA AMOSTRA

Aproximadamente 10 mL de sangue foram colhidos de todos os participantes do estudo (após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido) utilizando-se o sistema de coleta a vácuo “Accu cheque” com anticoagulante EDTA. As amostras então foram encaminhadas para o Centro De Medicina Genômica da FMRP – USP, onde os DNAs dos indivíduos participantes foram extraídos. Após a extração, os DNAs foram encaminhados diretamente para o laboratório de neurogenética da FMRP – USP, onde enfim, estas amostras foram processadas e analisadas de acordo com a metodologia que será descrita a seguir.

3.4 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA genômico foi extraído seguindo-se as recomendações descritas pelo fabricante PureGene (Gentra).

3.4.1 Lise celular

1. Adicionar a 300ul de sangue, 900ul de RBC Lysis Solution (tampão de lise de glóbulos vermelhos), vórtex por 15 segundos, encubar 1 minuto a temperatura ambiente, invertendo gentilmente 10 vezes durante a incubação.
2. Centrifugar por 20 minutos a 13.000-16.000 rpm. Remover o sobrenadante com uma pipeta deixando apenas o pellet visível de células brancas, deixando um líquido residual de 10-20 ul.
3. Vórtex o tubo vigorosamente por 10s para ressuspender as células brancas no líquido residual.
4. Adicionar 300ul de Cell Lysis Solution (Solução de Lise de células brancas). Homogeneizar lentamente com a pipeta.

3.4.2 Precipitação de Proteína

1. Adicionar 100ul de Protein Precipitation Solution na célula lisada.
2. Vórtex vigorosamente na maior velocidade por 20 segundos para misturar uniformemente a proteína com as células lisadas.
3. Centrifugar de 13,000-16,000 por 1 minuto. As proteínas precipitadas ficarão ao fundo como um botão marrom. Se o pellet de proteína não estiver nessa cor escura repita o passo.
4. deixe a amostra encubada no gelo por 5 minutos e repita o passo 3.

3.4.3 Precipitação do DNA

1. Pegar o sobrenadante contendo DNA, deixando o pellet de proteína (marrom), colocar em um microtubo de 1,5 ml e adicionar 300 ul de isopropanol (2-propanol) 100%.
2. Misture a amostra invertendo gentilmente 50 vezes. (Nesse momento vê-se a nuvem de DNA)
3. Centrifugar à 13.000-16.000 rpm por 1 minuto.
4. Descartar o sobrenadante cuidadosamente, o DNA poderá estar visível como um pequeno pellet esbranquiçado ou transparente, e muitas vezes invisível.
5. Adicionar 300ul de etanol 70%, inverter o tubo várias vezes para lavar o pellet de DNA.
6. Centrifugar à 13.000-16.000 rpm por 1 minuto. Descartar o sobrenadante e permanecerá apenas o pellet de DNA.

Obs.: Deixar os microtubos abertos até que o etanol evapore.

3.4.4 Hidratação do DNA

1. Adicionar 30 ul de DNA Hidratation Solution (ou água milliQ autoclavada).
2. Encubar por 5 minutos à 65°C para acelerar a hidratação. Estocar o DNA a 4°C. Quando for estocá-lo por longo tempo, armazenar em freezer -20°C ou -80°C.

3.5 DESENHO DOS PRIMERS

A sequência dos pares de “primers” (tanto o “forward” quanto o “reverse”) que foram empregados na análise das regiões regulatórias 5’ UTR e região promotora P2 do gene GJB1 foram desenhados e conferidos por programa de bioinformática (<http://genome.ucsc.edu>).

Tabela 2 - Sequência dos primers empregados no estudo

PRIMERS		TEMPERATURA DE ANNELING
GJB1 Fg1 upstream	FF TGGGACACAAGTGCTCTGTG	64°C
	RV ACTCTTCCAAGAGCCAGTAG	64°C
GJB1 Fg2 upstream	FF GAGGTCAAGTCAAGTGAGTG	58°C
	RV TTCACCTCCTCCAGGTGTAG	58°C

3.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para a realização da PCR foi utilizado o kit da enzima Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen). A reação foi montada à temperatura de aproximadamente 4°C (os reagentes foram mantidos em gelo). O protocolo utilizado é especificado na tabela 3-2, seguido do perfil térmico empregado (figura 3-1).

Tabela 3 - Protocolo da PCR (reagentes)

REAGENTES	FRAGMENTOS	
	1	2
H2O Milli-Q (uL)	33,2	33,2
10X Buffer	5,0	5,0
MgCl2 (50mM)	3,3	3,3
dNTPs (200mM)	5,0	5,0
Primer foward (20uM)	1,0	1,0
Primer reverse (20uM)	1,0	1,0
Taq Platinum Invitrogen (5U/uL)	0,6	0,6
DNA Template (25ng/uL)	1,0	1,0

Figura 5 - Perfil térmico empregado na PCR

3.7 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO DNA

As amostras foram preparadas com o kit de reação ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready (Applied Biosystems). A reação foi montada à temperatura de aproximadamente 4°C (os reagentes foram mantidos em gelo). O protocolo utilizado é especificado na tabela 3-3 seguido do perfil térmico empregado (figura 3-2).

Tabela 4 - Protocolo PCR de sequenciamento.

REAGENTES	VOLUME
H2O Milli-Q	5,5
Buffer	2,0
BigDye Terminator v3.1	1,0
Primer F/R	0,5
Produto PCR	1,0

Figura 6 - Perfil térmico empregado na PCR de sequenciamento

3.7.1 Precipitação e purificação da PCR de sequenciamento

O produto das reações de PCR de sequenciamento serão precipitados com 80 µl de isopropanol 75% e, após leve agitação no vórtex, serão incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 45 minutos, a 4.000 rpm (Centrífuga Eppendorf 5804 R), o sobrenadante será descartado e, em seguida, o precipitado será seco a temperatura ambiente. Este precipitado então será lavado com 200 µl de etanol 70% e a seguir, submetido a centrifuga a 3.000 rpm por 10 minutos para precipitação dos fragmentos. O etanol será removido completamente por centrifugação a 4.000 rpm e inversão do tubo em papel limpo. O precipitado será então incubado a temperatura ambiente por 1 hora e ressuspendido em 2 µl de Loading Buffer (5µl de formamida deionizada e 1µl de Blue Dextran), em seguida será desnaturado a 96°C por 5 minutos e por fim colocado no gelo por 2 minutos antes de ser submetido ao sequenciador.

3.7.2 Sequenciamento

Após terem sido devidamente precipitados e purificados, os produtos da PCR de sequenciamento foram submetidos à eletroforese por microcapilaridade no sequenciador automático ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

3.8 ANÁLISE DOS DADOS GERADOS POR SEQUENCIAMENTO

Os dados gerados a partir do sequenciamento da região 5'UTR e promotora P2 do gene GJB1 de cada indivíduo foram analisados utilizando-se o programa "Sequencing Analysis V6.0" da "Applied Biosystems". Posteriormente os dados foram reanalisados em um segundo programa "Lasergene SeqMan 3.1" para confirmação ou não das alterações quando encontradas. Em ambos os softwares a sequência de referência utilizada para a análise foi o transcrito GJB1-201: Ensembl no: ENST00000361726; RefSeq: NM_000166.5.

3.9 CLASSIFICAÇÃO DAS VARIANTS DETECTADAS

Em ordem de se tentar elucidar o papel clínico das alterações encontrada em nosso estudo, utilizamos como base o conjunto de regras para a interpretação de sequencias variantes preconizados pelo “American College of Medical Genetics” (ACMG) em conjunto com a “Association for Molecular Pathology” (AMP) (RICHARDS et al., 2015).

Os critério dentro do conjunto de classificação das variantes patogênicas, aplicando-se o modelo recomendado pelo ACMG juntamente com a AMP, podem ser categorizados como: patogênica muito forte (PVS), patogênica forte (PS), patogênica moderada (PM) ou comprovante de patogenicidade (PP) e os critérios dentro do conjunto que classifica as variantes benignas podem ser categorizados como: forte indício de benignidade (BS) ou comprovante de benignidade (BP) (RICHARDS et.al, 2015). Os parâmetros estão detalhados na tabela a seguir.

Tabela 5 - Parâmetros sugeridos para a classificação de uma VSI

	PARÂMETROS UTILIZADOS PARA A CLASSIFICAÇÃO
VARIANTES DE SIGNIFICADO INCERTO (VSI)	Bancos de dados e literatura
	Análise <i>in silico</i>
	Conservação da base
	Controle interno
	Co-ocorrência
	Análise de segregação na família
	Utilização do fenótipo como evidência
	Estudos funcionais

3.10 BASES DE DADOS UTILIZADAS

O passo inicial no processo de classificação das variantes detectadas em nosso estudo foi a pesquisa em bancos de dados de população e artigos científicos por informações que ajudassem a atribuir algum significado biológico às mesmas. Em adição, bancos de dados de doenças que correlacionam as alterações no DNA humano a fenótipos clínicos específicos foram consultados na tentativa encontrar registros populacionais mais relevantes para o propósito do nosso estudo.

Tabela 6 - Base de dados consultada

BANCOS DE DADOS	
POPULACIONAIS	Genome Aggregation Database (GenomAD) http://gnomad.broadinstitute.org/
	Exome Variant Server http://evs.gs.washington.edu/EVS/
	1000 Genomes Project http://browser.1000genomes.org
	dbSNP http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp
DOENÇAS	ClinVar http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar
	OMIM http://www.omim.org
	Human Gene Mutation Database http://www.hgmd.org
	Human Genome Variation Society http://www.hgvs.org/dblist/dblist.html
	Inherited Peripheral Neuropathies Mutation Database http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/

3.11 BIOINFORMÁTICA

3.11.1 Ferramentas de predição de splicing alternativo

Por se tratar de mutações na região “*upstream*” a ORF (“*Open Reading Frame*”), os programas de predição basicamente avaliaram modificações na regulação do *splicing* do mRNA. Os softwares utilizados foram:

Tabela 7 - Algoritmos para detecção de sítio de splicing alternativo utilizados

PROGRAMAS	
MaxEntScan	http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html
SpliceSiteFinder-Like (SSF)	http://www.umd.be/HSF/
Gene Splicer	http://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml
NNSPLICE	http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html

Basicamente, esses modelos computacionais de identificação de sítio de splice (MaxEntScan por exemplo) especificam um “*log-odd ratio*” para uma sequência de 9 pb (5’ splice site) ou de 23 pb (3’ splice site), onde, quanto maior a pontuação maior a probabilidade da sequência ser um sítio de splice verdadeiro (HOUDAYER *et.al*, 2012).

3.11.2 Índice de conservação dos nucleotídeos alterados

Em adição aos programas de predição de sítio de splice, dois algoritmos que medem o nível de conservação das bases alteradas foram empregados: *PhastCons* e *PhyloP*. Ambos os programas se baseiam em modelos de análise por alinhamentos múltiplos e fazem parte do pacote PHAST (“*Phylogenetic Analysis with Space/Time models*”) disponível gratuitamente via UCSC genome browse

(<https://genome.ucsc.edu/>). PhastCons mede a probabilidade de cada nucleotídeo pertencer a um elemento conservado dentro da sequência analisada, levando em consideração não apenas cada coluna de alinhamento, mas as colunas vizinhas também (Mitchel et.al, 2004). Por outro lado, o sistema de pontuação *PhyloP* $-\log(p\text{-value})$ trabalha sobre a hipótese nula de evolução neutra, onde um sinal negativo indica evolução mais rápida que o esperado e sinal positivo implica em conservação. Ainda em contraste ao *PhastCons*, *PhyloP* mede separadamente a conservação em cada coluna de alinhamento, ignorando o efeito das colunas vizinhas (GRIMM et.al, 2015).

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE GENÉTICA POR SEQUENCIAMENTO DE SANGER

Através da análise da região de interesse por sequenciamento direto foram detectadas três alterações em 4 dos 100 indivíduos estudados. Duas variantes intrônicas (íntron2), sendo uma delas já descrita e a outra não e uma nova variante presente no exon 1b não codificante (região 5’UTR) (tabela 8). As posições das variantes encontradas seguem representadas no diagrama do gene GJB1 a seguir (figura 7). A nomenclatura utilizada para a identificação das alterações seguem as recomendações da “*Human Genome Variation Society*” (HGVS).

Tabela 8 - Características gerais das variantes detectadas

Localização da alteração	Posição em relação ao códon de iniciação (ATG)	Nomenclatura HGVS	Patogenicidade	Referência
Íntron2	c.-257 C>T	NM_000166.5 c.-17+116C>T	Benigna	ClinVar
Íntron2	c.-155 A>G	NM_000166.5 c.-16-139A>G	Significado incerto	–
5'UTR (exon1b)	c.-395 C>T	NM_000166.5:c.-39C>T	Significado incerto	–

Figura 7 - Diagrama esquemático do gene GJB1. Abaixo as posições das variantes detectadas

Fonte: Adaptado de Tomaselli et al. (2017).

4.2 CONSULTA EM BANCOS DE DADOS

4.2.1 Variante c.-17+116C>T (íntron 2)

A variante intrônica c.-17+116C>T foi encontrada em 2 dos 100 indivíduos pesquisados (2% da população estudada), o que é condizente com a frequência alélica esperada para essa variante segundo os bancos de dados de populações “*Single Nucleotide Polymorphism Database*” (dbSNP) e “*Genome Aggregation Database*” (gnomAD) (tabelas 5-3 e 5-4). Levando-se em consideração a média da frequência da variante em todas as populações estudadas pelos referidos bancos de dados.

Tabela 9 - Frequência alélica da variante c.-17+116C>T em várias populações (GenomAD)

População	Contagem Alélica		Frequência Alélica
	C	T	
Sul da Ásia	0	02	—
Latinos	619	5	0.008078
Europeus	10255	217	0.02116
Europeus (Finlândia)	2634	23	0.008732
Leste da Ásia	1006	0	0.000
Judeus	182	11	0.06044
Africanos	5723	209	0.03652
Outros	711	15	0.02110
Total	21230	480	0.02272

Tabela 10 - Frequência alélica da variante c.-17+116C>T em várias populações (dbSNP)

Determinação da amostra			Frequência alélica	
SNP ID	População	Número de cromossomos	C	T
ChrX_1583301	Leste asiático	1008	1,00000000	—
	Europa	1006	0,97710001	0,02290000
	África	1322	0,97049999	0,02950000
	América	694	0,98850000	0,01150000
	Sul da Ásia	978	0,99800003	0,00200000

Em adição, fora encontrada uma entrada para a variante c.-17+116C>T na base de dados do *ClinVar* (número de acesso: rs111853447), submetida por GeneDx, que a classificou como sendo uma variante benigna.

Detalhes de estudo populacional como número de indivíduos, famílias, grupo(s) étnico(s) investigado(s), região geográfica, etc não foram especificados pelo órgão divulgador GenomeDx. Maiores detalhes sobre os critérios de avaliação utilizados para a classificação <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/380814/#clinical-assertions>>.

4.2.2 Variante c.-16-139A>G (íntron 2)

A outra variante intrônica detectada em nosso estudo (c.-16-139A>G), ainda de acordo com os bancos de dados dbSNP e GenomeAD, ocorre em frequências bem menores em relação à alteração previamente citada (tabela 5-5). Além do mais, a ela não foi atribuída nenhuma definição quanto a sua patogenicidade até o momento e portanto, não há informações suficiente que possam prover uma inferência sobre o papel clínico dessa mutação.

Tabela 11 - Frequência alélica da variante c.-16-139CA>G em várias populações (GenomAD)

População	Contagem Alélica		Frequência Alélica
	C	T	
Sul da Ásia	0	0	—
Latinos	619	0	0.000
Europeus	10304	3	0.0002911
Europeus (Finlândia)	2653	0	0.000
Leste da Ásia	1008	0	0.000
Judeus	183	0	0.000
Africanos	5697	8	0.001404
Outros	714	0	0.000
Total	21178	11	0.0005194

Tabela 12 - Frequência alélica da variante c.-16-139CA>G em várias populações (dbSNP)

Determinação da amostra			Frequência alélica	
SNP ID	População	Número de cromossomos	C	T
ChrX_1583301	Leste asiático	1008	1,00000000	—
	Europa	1006	0.99799997	0.00200000
	África	1322	0.99849999	0.00150000
	América	694	0.99859995	0.00140000
	Sul da Ásia	978	1,00000000	—

4.2.3 Variante c.-39C>T (exon 1b)

Além das variantes intrônicas encontradas, detectamos uma nova mutação (c.-39C>T) em um de nossos pacientes, encontrada no exon 1b (não codificante) do gene GJB1 na região 5'UTR, como já ilustrado no diagrama acima (figura 5-1). Não foram encontrados registros sobre a nova alteração em nenhuma base de dados consultada em nosso estudo.

4.3 BIOINFORMÁTICA

4.3.1 Ferramentas de predição de sítio de splicing alternativo

Nas tabelas de 5-8 a 5-10 é possível visualizar o efeito das variantes encontradas nos sinais detectados pelos programas de predição de sítio de splice alternativo em nucleotídeos vizinhos. Para facilitar a interpretação os resultados foram dados em relação a variação (em porcentagem) do tipo selvagem para o tipo mutado. Sendo assim, recomenda-se que a pontuação da forma mutante seja pelo menos 10% menor que a pontuação da variante selvagem para se considerar a predição positiva, no sentido de romper ou quebrar o sítio de splice natural. Além do mais, deve haver consenso entre três ou mais ferramentas de predição (RICHARDS et al., 2015; TANG; PROSSER; LOVE; 2016).

Legenda:

▣: sítio natural de splice
→: tipo selvagem para o mutado
_: ausente ou abaixo do valor limiar

Tabela 13 - Sinais de sítio de splice para a variante c.-39C>T.

Variante NM_000166.5: c.-39 C>T	Programa de predição			
	MaxEntScan (0 - 12)	SpliceSiteFinder- Like (0 - 100)	Gene splicer (0 - 24)	NNSPLICE (0 - 1)
Valor limiar	0	≥ 70	0	≥ 0.4
Exon 1b: c.-17 ▣ (Donor site)	10.57	94.36	10.59 → 10.13 (-4.3%)	1.00
Exon 1b: c.-34 (Acceptor site)	7.3 → 7.11 (-2.6%)	73.22 → 76.76 (+4.8%)	—	—

Nota-se uma diminuição não significativa no sinal do programa Gene Splicer, na posição c.-17, onde ocorre um sítio natural de splice (GT) bem na interseção do exon 1b com o íntron 2. O Resultado não é corroborado pelos demais programas. Ocorre também a ativação leve de um sítio críptico de splice (acceptor) na posição c.-34, detectado pelo programa SSF. Na mesma posição (c.-34) o programa MaxEnt Scan registrou uma redução do sinal, gerando resultado conflitante entre os algoritmos dos programas.

Tabela 14 - Sinais de sítio de splice para a variante c.-16-139A>G

Variante NM_000166.5: c.-16-139A>G	Programa de predição			
	MaxEntScan (0 - 12)	SpliceSiteFinder- Like (0 - 100)	Gene splicer (0 - 24)	NNSPLICE (0 - 1)
Valor limiar	0	≥ 70	0	≥ 0.4
Íntron 2: c.-16-143 (Donor site)	0.37 → _	_	_	_
Íntron 2: c.-17+176 (Donor site)	_	_	5.69 → 6.26 (+10.2%)	_

Sinal de sítio de splice críptico (doador) fracamente ativado na posição c.-16-143 desaparece após inserção da mutação (programa MaxEntScan). Resultado não corroborado pelos demais programas. Nota-se ainda o aumento do sinal de ativação de sítio críptico de splice (doador) na posição c.-17+176 em 10.2% após inserção da mutação. Resultado também não corroborado pelos demais programas.

Tabela 15 - Sinais de sítio de splice alternativo para a variante c.-17+116C>T.

Variante NM_000166.5: c.-17+116C>T	Programa de predição			
	MaxEntScan (0 - 12)	SpliceSiteFinder -Like (0 - 100)	Gene splicer (0 - 24)	NNSPLICE (0 - 1)
Valor limiar	0	≥ 70	0	≥ 0.4
íntron 2: c.-17+114 (Donor site)	— → 3.33	— → 71.72	—	—
íntron 2: c.-17+176 (Donor site)	—	—	5.69 → 4.96 (-12.9%)	—

Sinal de sítio de splice alternativo (doador) fortemente ativado próximo a base onde ocorre a alteração c.-17+116C>T. Evidenciado por dois dos programas utilizados (MaxEntScan e SSFL). Todavia, o resultado não foi corroborado pelos demais programas. Nota-se ainda uma redução na ativação de um sítio de splice alternativo na posição c.-117+176. Curiosamente, na mesma posição a alteração c.-16-139A>G resultou em aumento do sinal para ativação de sítio de splice alternativo. Em ambos os casos apenas um dos programas de predição utilizados foi capaz de detectar esta alteração.

4.3.2 Índice de conservação dos nucleotídeos alterados

Em adição aos programas de predição de sítio de splice, dois algoritmos que medem o nível de conservação das bases alteradas foram empregados: *PhastCons* e *PhyloP*.

A recomendação neste caso é que haja consenso entre os dois índices para se considerar um nível confiável de conservação (RICHARDS et.al, 2015). O valor de corte definido em nosso estudo ($_ > 1.6$ para *PhyloP*) foi estipulado como sendo a média dos valores de $-\log(\text{p-value})$ das 595 bases que compreendem a região estudada, como sugerido por Houdayer (2011).

Tabela 16 - Nível de conservação das variantes detectadas.

Variante	Programa de predição	
	PhastCons (0 – 1)	PhyloP (≥ 1.6)
NM_000166.5:c.-39C>T	1.00	3.35
NM_000166.5:c.-16-139A>G	0.00	1.34
NM_000166.5:c.-17+116C>T	0.00	0.04

Nota-se uma pontuação consistente de ambos os algoritmos para a base na posição c.-39, denotando conservação da base ao longo da evolução. O mesmo já não se pode dizer dos nucleotídeos nas posições c.-16-139A e c.-17+116C. O programa PhyloP registrou um sinal abaixo do número de corte (1.6), apesar do valor positivo tender a conservação. Em adição, o programa PhastCons interpretou ambas as base como sendo elementos não conservado na sequência analisada.

4.4 CONTROLE INTERNO

Em ordem de se tentar estabelecer um dado populacional mais relevante e que refletisse melhor o perfil étnico do nosso grupo de pacientes, em contraste aos vastos bancos de dados de populações e de doenças que foram consultados, realizamos o screening mutacional para a região de interesse em um grupo controle constituído de 100 indivíduos não acometidos por CMTX1 e em cujas famílias não há histórico da doença. Foram detectados 3 indivíduos portando a variante c.-17+116C>T (3% da população controle). Para a avaliação da relação genótipo/fenótipo utilizamos a medida de associação Odds Ratio (OR). Onde OD igual a 1.0 significa que a variante não afeta a probabilidade de se ter a doença, valores de OR acima de 1.0 significa que existe uma associação entre a variante e o risco da doença e valores abaixo de 1.0 significa que existe uma associação

negativa entre a variante e o risco de manifestação da doença (RICHARDS et al., 2015).

Calculo OR:

	PACIENTES	CONTROLE
ALTERAÇÃO PRESENTE	2	3
ALTERAÇÃO AUSENTE	98	97

Resultado:

OR= 0.6599

Intervalo de confiança 95%= 0.1079 a 4.0366

As demais alterações relatadas não foram observadas em nosso controle interno.

4.5 ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO

Em nosso estudo fizemos o screening da família da paciente que apresentou a alteração no exon 1b (c.-39C>T) e como pode-se observar no heredograma da figura 5-2 existem membros da família que não herdaram a alteração e mesmo assim apresentam sinais e sintomas característicos de CMTX1.

Figura 8: Heredograma família CMTX1 c.-39C>T.

Neste caso, a falta de segregação da variante com o fenótipo evidentemente resulta em forte evidência contra patogenicidade.

5. DISCUSSÃO

A CMT ligada ao X do tipo 1 é a segunda forma de CMT mais prevalente no mundo, com uma frequência que varia de 7% a 15% entre os pacientes de CMT e é desencadeada por alterações no gene GJB1. Desde os primeiros relatos sobre mutações no gene GJB1 feito por Bergoffen et al. (1990) até o presente momento, mais de 400 mutações no gene da conexina 32 humana já foram descritas. (WANG; YIN, 2016). Em contraste as mutações na região codificadora do gene, estima-se que apenas 0,01% de todas as mutações detectadas no gene estejam presentes na região regulatória 5'. (KABZINSKA et al., 2011). A falta da análise sistemática de regiões regulatórias do DNA em genes relacionados a CMT torna impossível de precisar com exatidão qual a real extensão do impacto destas regiões não codificadoras na etiologia desta que é uma das neuropatias de maior importância clínica no mundo (MURPHY et al., 2011).

Em nosso estudo identificamos três alterações na região 5'UTR do gene GJB1, uma mutação no exon 1b e duas alterações no íntron 2. Os critérios utilizados para a classificação das variantes encontradas baseiam-se no conjunto de normas e diretrizes para interpretação de novas variantes preconizados pela HGVS em conjunto com a ACMG e consistem no estudo da frequência das variantes em várias populações, ferramentas de predição de sítio de splice alternativo, segregação da variante entre membros da mesma família e controle interno. Todos os pacientes incluídos neste estudo possuem características clínicas muito sugestivas de CMTX1, caracterizada por fraqueza e atrofia muscular progressiva distal lenta (afetando primeiramente as extremidades dos membros inferiores), diminuição ou ausência do reflexo tendinoso profundo, anormalidades sensitivas, deformidades esqueléticas (ie. *pes cavus* e dedos em martelo) e ao contrário da CMT clássica apresenta sintomas transientes no SNC e lesões cerebrais reversíveis na matéria branca (WANG et al., 2016).

Os itens a seguir irão discutir os resultados encontrados neste estudo além de debater as abordagens e os achados de alguns estudos semelhantes relatados na literatura e compará-los ao nosso.

5.1 ANÁLISE IN SILICO

A avaliação do impacto de mutações no mecanismo de splicing é uma questão central em ordem de se determinar a patogenicidade das variantes que ocorrem em regiões regulatórias do DNA. A precisão do splicing no pré-RNA é determinada pelo reconhecimento de sequências consenso bem estabelecidas nas regiões 5' (doadora), 3' (aceptora) e sítios de ramificação. Diversas linhas de evidência sugerem que qualquer tipo de variação em alguma dessas sequências consenso potencialmente irá afetar o splicing normal do pré-RNA, provocando efeitos deletérios via rompimento da sequência de consenso original, criação de uma sequência críptica ou alteração de elementos regulatórios do splicing. Como resultado, cada nucleotídeo alterado deveria ser considerado um candidato potencial para alterações de splicing (SPURDLE et al., 2008; HOUDAYER et al., 2011).

Figura 9: Representação esquemática das sequências consensos do splicing. Os exons são representados pelos retângulos azuis e os íntrons são as linhas entre eles. M significa A ou C, R para G ou A, Y para T ou C e N para qualquer base.

Fonte: Adaptado de Houdayer (2011).

Para prever o impacto dessas variantes e prover uma compreensão sobre o seu papel biológico, uma variedade de ferramentas de bioinformática estão disponíveis. Evidências *in silico* sobre a patogenicidade das variantes encontradas em nosso estudo foram investigadas utilizando-se a plataforma “*Alamut Visual*” (versão 2.11), um software de exploração de variações genômicas que une informação genética e genômica de diferentes fontes em uma única plataforma. O

Alamut Visual 2.11 integra um conjunto variado de algoritmos de predição que auxiliam na interpretação clínica de variantes genômicas (HOUDAYER, 2011).

Embora as alterações por nós detectadas fossem capaz de sensibilizar o sinal de alguns dos programas utilizados, a falta de complementariedade entre os algoritmos foi determinante para se excluir a hipótese de que as variantes encontradas seriam potencialmente patogênicas. Mesmo a mutação c.-39C>T (exon 1b), posicionada a apenas algumas bases de distância de um sítio natural de splice em uma região de intercessão entre exon e íntron (tabela 5-7), foi incapaz de provocar a ruptura da sequência consenso adjacente ou criar uma sequência críptica dando origem a um sítio mutado de splice. Fato é que outros elementos, mais discretos, também compõem a maquinaria de splicing e poderiam ser levados em consideração, como os potencializadores de splicing exônico (ou ESEs - “*exonic splicing enhancers*”). Existem programas capazes de performar estudos sobre RNAs embasados nesses elementos, todavia não são muito apropriados devido a falta de especificidade. De fato, o objetivo destes programas não é detectar a perda de um ESE, mas avaliar a chance desse ESE ser utilizado pela maquinaria de splicing do exon sob estudo (HOUDAYER, 2011).

Variantes intrônicas em regiões não codificantes, como as encontradas em nosso estudo, sempre devem ser levadas em consideração, entretanto raramente elas conseguem causar a ruptura do equilíbrio dos componentes reguladores de splicing. A criação de um sítio críptico de splice deve ser interpretada de forma contextual. Por exemplo, a combinação de sequências consenso 5' e 3', pontos de ramificação e elementos discretos (ESEs por exemplo) é necessária para que haja a o recrutamento de um novo exon a partir de uma região não codificadora. Esse contexto favorável raramente ocorre nos íntrons (HOUDAYER, 2011; SCHMITZ; BROSIUS, 2011).

Em resumo, os algoritmos de predição de sítio de splicing alternativo empregados na análise das variantes não forneceram evidências fortes o suficiente sustentando que as alterações c.-39C>T, c.-17+116C>T e c.-16-139A>G pudessem, de alguma forma, afetar a regulação do *splice* no transcrito em estudo. Importante ressaltar que, predições *in silico* não são o bastante para definir uma variante como sendo neutra ou patológica, mas sim usadas como parte de um processo de tomada de decisões para a definição de potenciais candidatos e a partir daí conduzir outros

experimentos que vão contribuir para uma correta classificação da alteração em estudo.

5.1.1 Conservação dos nucleotídeos

Modelos computacionais de splicing frequentemente dependem da pontuação de conservação dos nucleotídeos que abrangem a sequência de estudo para serem mais precisos. Um estudo prévio em modelos de splicing alternativo descobriu que uma medida de modelo de qualidade aumentou em um terço quando a conservação foi incorporada dentro do modelo. Os modelos de splicing mais confiáveis também contam muito com pontos de conservação. A suposição subjacente seria que a conservação é mais útil para indicar o nível de elementos *cis* em íntrons flanqueados e para determinar quais ocorrências de sequências consenso são relevantes para o splicing (WAINBERG et al., 2016). Portanto, em complementação aos programas de predição de sítio de splice, dois algoritmos que medem o nível de conservação das bases alteradas foram empregados: *PhastCons* e *PhyloP*. Notou-se uma pontuação consistente de ambos os algoritmos para a base na posição c.-39 (exon 1b), denotando conservação da base ao longo da evolução, uma vez que essa se encontra em uma região chave para a regulação expressão da Cx32. O mesmo já não se pode dizer dos nucleotídeos nas posições c.-16-139A e c.-17+116C. O programa *PhyloP* registrou um sinal abaixo do número de corte (1.6), apesar do valor positivo tender a conservação. Em adição, o programa *PhastCons* interpretou ambas as bases como sendo elementos não conservados na sequência analisada. Estes achados sugerem que, apesar da alteração presente no exon 1b não desestabilizar a regulação normal do splicing, segundo as ferramentas de predição, ela compõe uma região bem conservada dentro do transcrito e poderia estar associada a elementos discretos envolvidos no splicing (ESEs por exemplo), que como visto anteriormente necessitam de todo um contexto favorável para atuarem e portanto não são recrutados com muita frequência pela maquinaria de splicing. Muitos estudos ainda serão necessários para se desvendar plenamente esse mecanismo tão complexo. Em relação às variantes intrônicas, baseando-se nos índices de conservação apresentados, pode-se sugerir que não estejam associados ao fenótipo em estudo.

5.2 BANCOS DE DADOS E GRUPO CONTROLE

A definição da frequência de uma variante em um grupo controle, assim como na população em geral, é de suma importância para se avaliar o seu potencial de patogenicidade. Bancos de dados populacionais são extremamente úteis para se obter a frequência de uma variante em grandes populações (MITCHELL et.al, 2004). Conforme especificado no item 5.2, as duas alterações intrônicas detectadas em nosso estudo constam nos bancos de dados de populações dbSNP e GenomeAD. A variante c.-17+116C>T é a mais prevalente, com uma frequência média de 2% e é classificada como um polimorfismo benigno, de acordo com a base de dados ClinVar (número de acesso rs111853447). A variante c.-16-39A>G ocorre em frequências bem menores nas populações onde foi detectada, em torno de 0,05% segundo as mesmas fontes citadas previamente. Apesar de relativamente rara, a variante c.-16-39A>G não foi considerada patogênica pelos programas de predição e não apresentou índices de conservação relevantes

Todavia, há de se ter muita cautela ao considerar esses valores de frequência obtidos nesses bancos populacionais vastos. Em geral, as informações obtidas nestes bancos advêm de múltiplos estudos independentes e muitos deles carecem dos detalhes que originaram os resultados descritos e podem conter variantes patogênicas. Quando se utiliza bancos de dados populacionais com o intuito de se avaliar a patogenicidade de uma variante, o pesquisador deve se certificar se grupos de indivíduos doentes foram utilizados, se indivíduos relacionados (mesma família) foram utilizados e, se possível, a faixa etária dos indivíduos utilizados (MITCHELL et.al, 2004; RICHARDS et.al, 2015). Não há na literatura até o momento uma associação das alterações encontradas com o fenótipo de CMTX1, ao menos não na base de dados que foi pesquisada durante o desenvolvimento deste estudo.

Em relação a pesquisa mutacional feita em nosso controle interno, a variação intrônica c.-17+116C>T foi encontrada em três indivíduo (3%), o que é condizente com a frequência esperada para essa variante quando observada nos bancos de dados de populações (tabelas 5-3 e 5-4). Em geral, se a frequência alélica em uma população controle é maior que o esperado em comparação ao grupo caso, isto é um forte indício de benignidade da variante. Em todo caso, mesmo a variante c.-

17+116C>T apresentando frequência maior no grupo controle do que entre os pacientes, calculamos o OR (medida de associação entre genótipo e fenótipo) e obtemos um valor <1 , que é interpretado como não havendo associação do genótipo com o fenótipo.

5.3 CO-OCORRÊNCIA

O termo co-ocorrência é definido como a presença de duas ou mais variantes que ocorrem simultaneamente no mesmo gene ou em genes diferentes relacionados a mesma doença (KARBASSI et al., 2015). Em nosso estudo os pacientes foram testados para alterações em cinco dos genes mais comumente relacionados a CMT além da região de interesse. Ao menos nestes genes, nenhuma mutação que pudesse justificar o quadro clínico desses pacientes foi encontrada. Obviamente que antes de se afirmar com certeza que não há co-ocorrência das variantes encontradas com qualquer outra alteração relevante para a manifestação de um quadro de CMT, estudos mais abrangentes seriam necessários, por exemplo um painel para CMT ou um estudo de exoma. De qualquer forma, o que permanece no momento é a dúvida.

5.4 ESTUDOS FUNCIONAIS

Dentre todas as linhas de interpretação sugeridas para a classificação de uma variante, o estudo funcional de uma alteração talvez seja uma das principais ferramentas utilizadas para se estabelecer a característica clínica de uma variante. Ensaios que avaliam o impacto de mutações no RNAm podem ser altamente informativos quando avaliam os efeitos das variantes nas junções dos sítios de splice, dentro de sequências codificadoras, UTRs assim como em regiões intrônicas profundas. As abordagens técnicas incluem a análise da estabilidade do RNAm ou derivados de cDNA e ensaios *in vitro* de splicing em minigene. Além do mais, a significância funcional de uma alteração pode se basear em publicações de estudos, feitos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, que mostram se a variante danifica ou não a função normal da proteína (RICHARDS et al., 2015). Todavia, de acordo com

Karbassi et al. (2015), publicações que descrevem ensaios experimentais avaliando erros de splicing geralmente não são consideradas como evidência funcional de patogenicidade, a menos que o erro no splicing leve ao truncamento do mRNA. Em todo caso, não encontramos na literatura nenhum estudo funcional que avaliasse as alterações por nós encontradas. Infelizmente, não foi possível traçar uma estratégia de pesquisa funcional das variantes detectadas em nosso estudo em tempo hábil.

5.5 UTILIZAÇÃO DO FENÓTIPO COMO EVIDÊNCIA

Em geral, o fato de um paciente ter um fenótipo que condiz com o espectro conhecido de características clínicas para um gene não é considerado evidência de patogenicidade dado que quase todos os pacientes testados em um estudo específico de uma determinada doença tem o fenótipo em questão (RICHARDS et al., 2015).

Em nosso estudo nos deparamos com um exemplo prático onde indivíduos de uma família que possuem características clínicas de CMTX1 podem ser divididos em dois grupos: os integrantes que possuem a alteração c.-39C>T e os que não possuem essa alteração. No entanto, todos compartilham características clínicas que são sugestivas de CMTX1. A questão a ser levantada neste caso é, poderia a variante c.-39C>T estar de alguma forma modificando o fenótipo da doença? De fato, não chegamos a um consenso pois os pacientes portadores da alteração em questão são ambos do sexo feminino. Isso nos fez concluir que, independente da variante estar modificando o fenótipo ou não destes pacientes a condição natural de inativação de um dos cromossomos X pode mascarar o real impacto da alteração sobre o fenótipo estudado. Sabe-se que os sintomas da CMTX1 nas mulheres são muito brandos. O ideal seria recrutar mais membros da família com suspeita de CMTX1, que sejam do sexo masculino, para um levantamento mais detalhado do efeito que esta alteração possa ter sobre o fenótipo da CMTX1.

5.6 ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO

Em nosso estudo foi possível pesquisarmos a família da paciente índice que apresentou a mutação c.-39C>T. Curiosamente, 4 dos integrantes da família, com sintomas altamente sugestivo de CMTX1, não apresentaram a alteração contra dois que apresentaram (incluindo a paciente índice). Este achado resulta em forte evidência contra patogenicidade. Entretanto, a segregação de uma determinada variante com o fenótipo de uma doença em uma família é evidência de *linkage* do locus contendo a alteração com a desordem observada, mas não é evidência de patogenicidade da variante propriamente dita (KARBASSI et al., 2015). Abordagens estatísticas tem sido publicadas com a ressalva de que a variante identificada poderia estar em *linkage disequilibrium* com a verdadeira variante patogênica em certas famílias (RICHARDS et al., 2015). Estes modelos estatísticos levam em consideração a idade relacionada a penetrância da doença, taxa de fenocópias, ferramentas de predição *in silico* e co-ocorrência com variantes patogênicas conhecidas, em uma única medida quantitativa de patogenicidade. Parentes distantes são importantes nesses casos porque são menos prováveis de apresentarem ambos, a doença e a variante, em comparação ao núcleo familiar estudado (RICHARDS et al., 2015). Como sugerido no item anterior (6.5), uma alternativa seria o recrutamento de mais membros da família da paciente índice (c.-39C>T) para um estudo mais detalhado e obviamente se possível o incorporação de um modelo estatístico robusto, como o descrito previamente.

5.7 CLASSIFICAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DETECTADAS

Uma quantidade enorme de variantes vem continuamente sendo descobertas no genoma humano e como consequência uma quantidade cada vez maior de bases de dados surgem tentando organizar e dar sentido a toda informação que está sendo produzida. Quando se está classificando uma variante, é de suma importância para o pesquisador a estipulação de um modelo de regras que possa, através de métodos testados e padronizados, auxiliá-lo na difícil tarefa de se determinar o peso da variante que se está estudando (KARBASSI et al., 2015; RICHARDS et al., 2015).

Como já especificado anteriormente, baseamos o estudo das variantes encontradas em nosso trabalho no conjunto de regras para a interpretação de sequências variantes preconizados pelo ACMG em conjunto com a AMP. Nesta seção procuramos sintetizar toda a informação que foi possível extrair a partir dos parâmetros utilizados que vem sendo discutidos até aqui.

Tabela 17 - Síntese das informações obtidas a partir dos parâmetros utilizados para o estudo das variantes detectadas neste trabalho.

VARIANTES DETECTADAS EM NOSSO ESTUDO		c.-39C>T (A)	c.-16-139A>G (B)	c.-17+116C>T (C)	GRAU DE PATOGENICIDADE		
					A	B	C
BANCOS DE DADOS	Frequência em diversas populações	0,00	0,05%	2,00%	PM2	PM2	BS
	Índice de conservação da base alterada	Conservado	não conservado	não conservado	PP3	BP1	BP1
FERRAMENTAS DE PREDIÇÃO IN SILICO	MaxEntScan	Inativação leve de sítio de splice críptico	—	Ativação de sítio de splice críptico	BP1	BP1	BP1
	SpliceSiteFinder-Like	Ativação leve de sítio de splice críptico	—	Ativação de sítio de splice críptico			
	Gene Splicer	Inativação leve de sítio de splice natural	Ativação de sítio de splice críptico	—			
	NNSPLICE	—	—	—	BP1	BP1	BP1
ESTUDO MOLECULAR	Controle interno	Ausente	Ausente	Presente	PM2	PM2	BS
	Estudo de segregação	Sim	Não	Não	BS4	—	—

Figura 10: O Esquema ilustra os critérios adotados para classificação de VSIs assim como a força atribuída a cada critério que varia de forte indício de benignidade (BS) até patogênico muito forte (PVS)

Fonte: Adaptado de Richards et al. (2015).

Diante de todo o exposto e levando-se em consideração as recomendações preconizadas pela HGVS e ACMG temos razões para confirmar o critério de alteração benigna para a variante c. -17+116C>T, já definido em um outro estudo. Em relação a variante c.-16-139A>G, existem fortes indícios apontando para uma forma benigna de alteração, embora alguns parâmetros tenham nos deixado em dúvida. Por fim, a alteração c.-39C>T ainda permanece para nós uma incógnita. Enquanto certos parâmetros são evidentes em descartar a hipótese de patogenicidade, como os programas de predição de splicing alternativo, outros nos dão evidência do contrário, como os bancos de dados populacionais, controle interno e índices de conservação e portanto permanece como uma variante de significância incerta. Não há evidências suficiente para descartarmos qualquer hipótese, sendo necessário mais estudos.

5.8 FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES EM COMPARAÇÃO A OUTROS ESTUDOS SIMILARES

Das centenas de mutações já encontradas no gene GJB1, apenas uma pequena fração delas estão presentes na região não codificante do gene. Em nosso estudo identificamos 3 alterações na região 5'UTR do gene GJB1 em 4 indivíduos não relacionados, de um grupo de 100 pacientes apresentando um fenótipo muito sugestivo de CMTX1, ou seja uma frequência de alterações de 4%. Um Estudo prévio similar, conduzido por Tsai et al. (2011) registrou uma frequência de 2.2% de alterações na região 5'UTR do gene GJB1 em um grupo de 91 indivíduos sem causa genética de CMT atribuída. Bergmann et al. (2002) registraram duas variantes benignas em um grupo de 57 indivíduos de CMT não relacionados, uma frequência em torno 3.5%. Aparentemente, mutações na região não codificadora do gene GJB1 são incomuns. Todavia um estudo recente, realizado na Inglaterra por Tomaselli et al. (2017), investigou a prevalência de alterações na região não codificadora 5' do gene GJB1 em 10 famílias de CMTX1 e registrou uma frequência de 11.4%. Uma porcentagem de alteração bastante expressiva, sobretudo levando-se em consideração o número de alterações patogênicas detectadas, 5 no total. Comparada a frequência registrada em nosso estudo estamos falando de praticamente três vezes mais o número de alterações. Neste caso, uma hipótese

que poderia justificar a alta incidência de mutações nessa região do gene GJB1 na população estudada é o efeito fundador, embora não haja estudos que possam confirmar tal hipótese. Até onde se sabe, nosso estudo foi o primeiro do tipo a ser conduzido em uma população brasileira e a frequência das alterações em nosso grupo de pacientes (CMTX1) se assemelha ao de estudos similares feitos em grupos de CMT em geral, o que no nosso entendimento demonstra que as alterações na região 5' UTR do gene GJB1 são de fato incomuns.

6. CONCLUSÃO

Na abordagem molecular cotidiana das CMTs, a análise de regiões regulatórias em genes envolvidos na doença são pouco exploradas, exceto em casos de grandes estudos que utilizam técnicas de sequenciamento de nova geração. Pelo menos no caso da CMTX1, mutações na região não codificante 5' do gene GJB1 são incomuns, apesar de estudos já terem demonstrado alterações nessa região associadas ao fenótipo da doença. Em nosso estudo estabelecemos uma frequência de alterações na região 5'UTR do gene GJB1 na população brasileira de 4%. Nenhuma das variantes encontradas no entanto apresentaram um perfil de patogenicidade que pudesse justificar o quadro clínico altamente sugestivo de CMTX1 em nosso grupo de pacientes, embora uma das alterações tenha permanecido como de significado incerto, baseado nos parâmetros adotados para a classificação das alterações neste estudo. Os resultados obtidos nos levam a concluir portanto que, provavelmente, mutações na região 5' UTR do gene GJB1 na população brasileira não são responsáveis por casos sugestivos de CMTX1 sem causa genética atribuída.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABRAMS, C. K. et al. Mutations in Connexin 32: the molecular and biophysical bases for the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease. **Brain Research Reviews**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p. 203-214, Mar. 2000.

ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. 4. ed. New York: Garland Science, 2002.

BEAUVAIS, K.; FURBY, A.; LATOUR, P. Clinical, electrophysiological and molecular genetic studies in a family with X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy presenting a novel mutation in GJB1 promoter and a rare polymorphism in LITAF/SIMPLE. **Neuromuscular Disorders**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 14-18, Jan. 2006.

BERGOFFEN, J. et al. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. **Science**, New York, v. 262, n. 5142, p. 2039-2042, Dec. 1993.

BIRD, T. D. Charcot-Marie-Tooth hereditary neuropathy overview. **GeneReviews**, Seattle, Sept. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1358>>. Acesso em: 22 ago. 2017.

BONE, L. J. et al. Connexin32 and X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. **Neurobiology of Diseases**, Oxford, v. 4, n. 3-4, p. 221-230, 1997.

BRAATHEN, G. J. Genetic epidemiology of Charcot-Marie-Tooth disease. **Acta Neurologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 126, n. 193, p. iv-22, Oct. 2012.

BRAATHEN, G. J. et al. Genetic epidemiology of Charcot-Marie-Tooth disease in general population. **European Journal of Neurology**, Copenhagen, v. 18, n. 1, p. 39-48, Jan. 2011.

CORCOS, I. A. et al. Refined localization of human Connexin 32 Gene Locus, GJB1, to Xq13.1. **Genomics**, San Diego, v. 13, n. 2, p. 479-480, June 1992.

CREATIVECOMMONS. Wikimedia Commons. **Wikimedia Commons**, July 2016. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Figure_04_06_05.jpg>. Acesso em: 23 nov. 2016.

DE JONGHE, P. et al. Molecular diagnostic testing in Charcot-Marie-Tooth disease and related disorders: approaches and results. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 883, n. 1, p. 389-396, Oct. 1999.

DUZKALE, H. et al. A systematic approach to assessing the clinical significance of genetic variants. **Clinical Genetics**, Copenhagen, v. 84, n. 5, p. 453-463, Nov. 2013.

EGGERMANN, K. et al. Hereditary neuropathies: clinical presentation and genetic panel diagnosis. **Deutsches Ärzteblatt International**, Giessen, v. 115, n. 6, p. 91-97, 2018.

GRIMM, D. G. et al. The evaluation of tools used to predict the impact of missense variants is hindered by two types of circularity. **Human Mutation**, New York, v. 36, n. 5, p. 513-523, May 2015.

HANEMANN, C. O. et al. Transient, recurrent, white matter lesions in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease with novel Connexin 32 mutation. **Archives of Neurology**, Chicago, v. 60, n. 4, p. 605-609, Apr. 2003.

HARDING, A. E.; THOMAS, P. K. The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. **Brain**, Oxford, v. 103, n. 2, p. 259-280, June 1980.

HOUDAYER, C. In silico prediction of splice-affecting nucleotide variants. In: YU, B.; HINCHCLIFF, M. **In silico tools for gene discovery**. New York: Human Press, 2011. Cap. 17, p. 269-282.

HOUDAYER, C. et al. Guidelines for splicing analysis in molecular diagnosis derived from a set of 327 combined in silico/in vitro studies on BRCA1 and BRCA2 variants. **Human Mutation**, New York, v. 33, n. 8, p. 1228-1238, Aug. 2012.

IONASESCU, V. V. Charcot-Marie-Tooth neuropathies: from clinical description to molecular genetics. **Muscle & Nerve**, New York, v. 18, n. 3, p. 267-275, Mar. 1995.

KABZINSKA, D. et al. Two pathogenic mutations located within the 5' Regulatory Sequence of GJB1 gene affecting initiation of transcription and translation. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 58, n. 3, p. 359-363, Sept. 2011.

KARBASSI, I. et al. A standardized DNA variant scoring system for pathogenicity assessments in mendelian disorders. **Human Mutation**, New York, v. 37, n. 1, p. 127-134, Oct. 2015.

KLEOPA, K. A.; SARGIANNIDOU, I. Connexins, gap junctions and peripheral neuropathy. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 596, p. 27-32, June 2015.

KLEOPA, K. A.; SCHERER, S. S. Molecular genetics of X-Linked Charcot-Marie-Tooth disease. **NeuroMolecular Medicine**, Totowa, v. 8, n. 1-2, p. 107-122, Mar. 2006.

MITCHELL, A. A. et al. Discrepancies in dbSNP confirmation rates and allele frequency distributions from varying genotyping error rates and patterns. **Bioinformatics**, Oxford, v. 20, n. 7, p. 1022-1032, May 2004.

MURPHY, S. M. et al. A novel mutation in the nerve-specific 5' UTR of the GJB1 gene causes X-linked Charcot-Marie-Tooth Disease. **Journal of the Peripheral Nervous System**, New York, v. 16, n. 1, p. 65-70, Mar. 2011.

NICHOLSON, G. A.; YEUNG, L.; CORBETT, A. Efficient neurophysiological selection of X-linked Charcot-Marie-Tooth families: ten novel mutations. **Neurology**, Minneapolis, v. 51, n. 5, p. 1412-1416, Nov. 1998.

PAREYSON, D.; MARCHESI, C. Diagnosis, natural history and management of Charcot-Marie-Tooth disease. **The Lancet Neurology**, London, v. 8, n. 7, p. 654-667, July 2009.

PAULSON, H. L. et al. Transient central nervous system white matter abnormality in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. **Annals of Neurology**, New York, v. 52, n. 4, p. 429-434, Oct. 2002.

REILLY, M. M.; MURPHY, M. S.; LAURÁ, M. Charcot-Marie-Tooth disease. **Journal of the Peripheral Nervous System: The Official Journal of The Peripheral Nerve Society**, London, v. 16, n. 1, p. 1-14, Apr. 2011.

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: Official Journal of the American College of Medical Genetics**, Baltimore, v. 17, n. 5, p. 405-424, May 2015.

SARGIANNIDOU, I. et al. Intraneural GJB1 gene delivery improves nerve pathology in a model of X-linked Charcot-Marie-Tooth Disease. **Annals of Neurology**, Boston, v. 78, n. 2, p. 303-316, Aug. 2015.

SCHELHAAS, H. J. et al. Transient cerebral white matter lesions in a patient with connexin 32 missense mutation. **Neurology**, Minneapolis, v. 59, n. 12, p. 2007-2008, Dec. 2002.

SCHERER, S. S. et al. Connexin32 is a Myelin-related protein in the PNS and CNS. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, Washington, v. 15, n. 12, p. 8281-8294, Dec. 1995.

SCHMITZ, J.; BROSIUS, J. Exonization of transposed elements: a challenge and opportunity for evolution. **Biochimie**, Paris, v. 93, n. 11, p. 1928-1934, Nov. 2011.

SENDEREK, J. et al. X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy: clinical, electrophysiological and morphological phenotype in four families with different Connexin32 Mutations. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 167, n. 2, p. 90-101, Aug. 1999.

SPURDLE, A. B. et al. Prediction and assessment of splicing alterations: implications for clinical testing. **Human Mutation**, New York, v. 29, n. 11, p. 1304-1313, Nov. 2008.

TAYLOR, R. A. et al. The CNS phenotype of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease: more than a peripheral problem. **Neurology**, Minneapolis, v. 61, n. 11, p. 1475-1478, Dec. 2003.

TOMASELLI, P. J. et al. Mutations in noncoding regions of GJB1 are a major cause of X-linked CMT. **Neurology**, Minneapolis, v. 88, n. 15, p. 1445-1453, Apr. 2017.

TSAI, P. C. et al. Mutational analysis of the 5' Non-coding Region of GJB1 in a Taiwanese Cohort with Charcot-Marie-Tooth neuropathy. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 332, n. 1-2, p. 51-55, Sept. 2013.

TSAI, P. C. et al. Mutational analysis of the 5' non-coding region of GJB1 in a Taiwanese cohort with Charcot-Marie-Tooth neuropathy. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 332, n. 1-2, p. 51-55, Sept. 2013.

WAINBERG, M.; ALIPANAHI, B.; FREY, B. Does conservation account for splicing patterns? **BMC Genomics**, Oxford, v. 17, n. 787, p. 1-10, Oct. 2016.

WANG, Y.; YIN, F. A review of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. **Journal of Child Neurology**, Littleton, v. 31, n. 6, p. 761-772, May 2016.

WU, T. et al. Clinical and electrophysiological studies of a family with probable X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy and ptosis. **Chang Gung Medical Journal**, Taipei, v. 27, n. 7, p. 489-500, June 2004.