UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

PEDRO JOSÉ TOMASELLI

Avaliação das causas genéticas em pacientes com
neuropatia hereditária utilizando técnicas de
sequenciamento de nova geração (NGS)

RIBEIRÃO PRETO
2018

PEDRO JOSÉ TOMASELLI

**Avaliação das causas genéticas em pacientes com
neuropatia hereditária utilizando técnicas de
sequenciamento de nova geração (NGS)**

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Neurologia da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto Universidade de
São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de concentração: Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Wilson Marques Júnior

Ribeirão Preto
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Assinatura: _____ Data ____/____/____

FICHA CATALOGRÁFICA

Tomaselli, Pedro José

Avaliação das causas genéticas em pacientes com neuropatia hereditária utilizando técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS) / Pedro José Tomaselli / Orientador: Wilson Marques Júnior. Ribeirão Preto, 2018.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Neurologia

1. CMT; 2. Neuropatias periféricas hereditárias; 3. Sequenciamento de nova geração; 3. Sequenciamento de todo exoma.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Pedro José Tomaselli

Título: Avaliação das causas genéticas em pacientes com neuropatia hereditária utilizando técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS)

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Neurologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Neurologia.

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora:

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

TOMASELLI, PJ. *Avaliação das causas genéticas em pacientes com neuropatia hereditária utilizando técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS)*. 2018. Tese [Doutorado]: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2018.

RESUMO

As neuropatias periféricas hereditárias são um grupo heterogêneo de doenças relacionadas que afetam o sistema nervoso periférico. Elas podem ser classificadas de acordo com a velocidade de condução motora nos membros superiores (tipo 1 – CMT1, tipo 2 – CMT2 ou intermediário - iCMT), de acordo com o padrão de herança (autossômicas dominantes, autossômicas recessivas ou ligadas ao X) e quanto ao fenótipo de apresentação (neuropatias hereditária sensitivo e motora - CMT, neuropatia hereditária sensitiva - HSN ou neuropatia motora hereditária distal - dHMN). O uso das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) para diagnóstico de pacientes com neuropatia hereditária é particularmente eficiente uma vez que representa uma doença Mendeliana com mais de 90 genes diferentes relacionados. Foram avaliados 30 pacientes com diferentes subtipos de neuropatia hereditária (3 CMT1, 12 CMT2, 8 iCMT, 4 dHMN e 3 HSN). Foram identificadas 6 mutações (*SH3TC2*, *GDAP1*, *MME*, *IGHMBP2*, 2 *AARS*) e 7 variantes provavelmente patogênicas (*KIF1A*, *DRP2*, *MME*, *MPZ*, *VRK1*, *SIGMAR1*, *FLVCR1*). Com uma taxa de positividade de 43.3%. As variantes provavelmente patogênicas foram consideradas como a causa da apresentação fenotípica apresentada pelos pacientes baseado na frequência de variantes nos bancos de população normal, no efeito bioquímico das variantes sobre a estrutura proteica e pela análise *in silico*. No entanto, essas variantes necessitam de evidências adicionais que confirmem sua patogenicidade. Foram identificadas variantes novas nos genes *MPZ*, *KIF1A*, *DRP2*, *IGHMBP2*, *VRK1*, *SIGMAR1* e *FLVCR1* ampliando a variabilidade genotípica desses genes. A associação das mutações identificadas nos genes *VRK1*, *KIF1A*, *IGHMBP2* e *FLVCR1* permitiu a expansão dos fenótipos relacionados a esses genes. Mutações no gene *VRK1* podem causar uma dHMN com sinais de liberação piramidal e envolvimento preferencial do compartimento posterior da perna. Transtorno do espectro autista pode ser observado em associação a mutações no gene *KIF1A* e mutações no gene *FLVCR1* podem causar um fenótipo grave caracterizado por insensibilidade congênita a dor e acromutilações. Mutações no gene *IGHMBP2* podem causar uma sobreposição entre os fenótipos SMARD1/CMT2S com disautonomia restrita ao trato gastro intestinal. Esse estudo demonstra que o uso de WES para o diagnóstico molecular de doenças geneticamente heterogêneas como as neuropatias hereditárias é uma ferramenta útil.

Palavras-chave: CMT, neuropatias periféricas hereditárias, sequenciamento de nova geração, sequenciamento de todo exoma.

Tomaselli, P.J. *Next generation sequencing in patients with hereditary neuropathy*. Tese [Doutorado]: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2018.

ABSTRACT

The hereditary peripheral neuropathies are a heterogeneous group of genetic disorders in which peripheral nervous system degeneration leads to weakness, atrophy and loss of sensation. It can be classified according motor conduction velocities in the upper limbs (type 1 - CMT1, type 2 - CMT2 or intermediate - iCMT), according to inheritance pattern (autosomal dominant, autosomal recessive or X linked) and according to the mainly group of fibres clinically involved (hereditary sensory and motor neuropathy - CMT, hereditary sensory neuropathy - HSN or distal hereditary motor neuropathy - dHMN). The use of next generation sequencing technologies (NGS) for the diagnosis of patients with genetic diseases is well established, as CMT is a Mendelian disease with more than 90 different related genes already reported. We evaluated 30 patients with all subtypes of hereditary neuropathy (3 CMT1, 12 CMT2, 8 iCMT, 4 dHMN and 3 HSN). Six mutations (SH3TC2, GDAP1, MME, IGHMBP2, 2 AARS) and 7 likely pathogenic variants (KIF1A, DRP2, MME, MPZ, VRK1, SIGMAR1, FLVCR1) were detected, leading to a positive rate of 43.3%. Likely pathogenic variants were considered based on their frequency in normal population, in silico analysis and segregation with phenotype. Despite they have strong evidences to support their causative status further evidence of their pathogenicity is required. New variants were identified in the genes *MPZ*, *KIF1A*, *DRP2*, *IGHMBP2*, *VRK1*, *SIGMAR1* and *FLVCR1* amplifying their genotypic variability. The mutations identified in *VRK1*, *KIF1A*, *IGHMBP2* and *FLVCR1* expanded their phenotype spectrum. Mutations in the *VRK1* gene may cause dHMN with upper motor neuron signs. Autistic spectrum disorder may be observed in association with mutations in the *KIF1A* gene and mutations in the *FLVCR1* gene may cause a severe phenotype characterized by congenital insensitivity to pain and acromutilations. Mutations in the *IGHMBP2* gene may cause an overlap between SMARD1 and CMT2S phenotypes with organ specific dysautonomia. This study demonstrates that WES is a powerful tool for molecular diagnosis of hereditary neuropathies. Additionally, this study provides new information on the mutations in the *VRK1*, *KIF1A* and *FLVCR1* genes by adding new mutations and increasing the phenotypic variability of the neuropathies associated with these genes. This study demonstrates WES is a powerful tool for molecular diagnosis of hereditary neuropathies.

Keywords: CMT, hereditary peripheral neuropathies, next generation sequencing, whole exome sequencing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 – As bases genéticas das doenças	18
Figura 1.2 – Métodos para descobrimento de novos genes baseado na hipótese natural da arquitetura genética das doenças	19
Figura 1.3 – Árvore genealógica de uma família com CMT1A, demonstrando claramente transmissão de homem para homem	20
Figura 1.4 – Mapa de homozigose usando arrays.	21
Figura 1.5 – Hipótese de variantes comuns-doenças comuns e conceito de de estudo de associação genômica	22
Figura 1.6 – Correlação fenótipo-genótipo. a. Concordância clássica entre fenótipo e genótipo; b. Heterogeneidade genérica e c. Pleiotropia	25
Figura 1.7 – Classe das mutações genéticas e tamanho da variantes estruturais que afetam a arquitetura do DNA	35
Figura 1.8 Algoritmo de investigação das neuropatias hereditárias	39
Figura 2.1 – Esquema do pipeline utilizado para análise das sequências obtidas no <i>John P. Hussman Institute for Human Genomics</i>	47
Figura 2.2 – Esquema do pipeline utilizado para análise das sequências obtidas no CMG e no ION	48
Figura 2.3 – Etapas utilizadas para filtragem de mutações relacionadas a neuropatia hereditária	52
Figura 3.1.– Organograma mostrando o número total de amostras e sua distribuição conforme o local em que cada amostra foi sequenciada e o fenótipo	57
Figura 3.2 – Heredograma da família CMT1_3	58
Figura 3.3 – Potencial de ação muscular	60
Figura 3.4 – Heredograma da família CMT2_F3.	61
Figura 3.5 –Heredograma da família CMT2_F5.	63
Figura 3.6 –Mapa de conservação do aminoácido entre diferentes espécies	66
Figura 3.7 – Heredograma da família CMT2_F8	67
Figura 3.8 – Heredograma da família CMT2_F9	70
Figura 3.9 – Heredograma da família CMT2_F10	73
Figura 3.10 – Heredograma da família CMT2_F12.	76
Figura 3.11 – Características clínicas e estudo de imagem do paciente CMT2_F12	77
Figura 3.12 – Biópsia do nervo sural do paciente índice da família CMT2_F12	79
Figura 3.13 – Heredograma da família iCMT_F2.	81
Figura 3.14 – Heredograma família iCMT_F4.	85
Figura 3.15 – Heredograma da família iCMT_F7	88
Figura 3.16 – Heredograma da família iCMT_F8.	90
Figura 3.17 – Heredograma da família dHMN_F1	92
Figura 3.18 – Aspectos clínicos, e achados de RM de neuroeixo e de membros inferiores do paciente índice da família dHMN_F1	98
Figura 3.19 – Estrutura do gene VRK1 A e	96
Figura 3.20 – Heredograma da família dHMN_F3	97
Figura 3.21 – Heredograma da família HSN_F2.	98
Figura 3.22 – Figura mostrando a absorção dos dedos das mãos e dos pés e a presença de lesões em pele	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-1 – Variações genômicas e a melhor técnica para sua detecção	17
Tabela 1-2 – Lista de genes sabidamente relacionados a CMT e fenótipo correspondente. Traduzido e adaptado de Rossor, 2016, com permissão	27
Tabela 2-1 – Número médio de variantes nas regiões codificadoras. Modificado de Bamshad, 2011	49
Tabela 3-1 – Sumário das características clínicas	55
Tabela 3-2 – Estudo da condução sensitiva e motora do paciente CMT1_F3	59
Tabela 3-3 – Estudo da condução sensitivo e motora do paciente CMT2_F5	65
Tabela 3-4 – Estudo da condução sensitivo e motora do paciente CMT2_F8	69
Tabela 3-5 – Estudo da condução sensitivo e motora do caso índice da família CMT2-F9	71
Tabela 3-6 – Estudo da condução sensitivo e motora do paciente CMT2_F10	73
Tabela 3-7 – Estudo da condução sensitivo e motora e eletromiografia do caso índice (II – 3) da família iCMT_F2.	81
Tabela 3-8 – Estudo da condução sensitivo e motora da irmã (II – 6) da família iCMT_F2,	82
Tabela 3-9 – Estudo da condução sensitivo e motora da família iCMT_F4	86
Tabela 3-10 – Eletromiografia do paciente índice (II – 7) da família iCMT_F4	87
Tabela 3-11 – Estudo da condução sensitiva e motora e eletromiografia iCMT_F7	89
Tabela 3-12 – Estudo da condução sensitivo e motora do caso índice da família iCMT_F8	90
Tabela 3-13 – Estudo da condução sensitiva e motora e eletromiografia do caso índice da família dHMN_F1	93
Tabela 3-14 – Estudo da condução sensitivo e motora e eletromiografia do caso índice da família dHMN_F3	97

LISTA DE SIGLAS

Adol.	adolescente	MAF	frequência alélica mínima
Amp.	amplitude	Mb	Megabase
bp	pares de base	Min	minuto
BRA	Brasil	MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
BWA	<i>Burrows-Wheeler Aligner</i>	mm	milímetro
CMT	Charcot-Marie-Tooth	MMII	membros inferiores
CM	Condução motora	MMSS	membros superiores
CMG	Centro de Medicina Genômica	MOE	motilidade ocular extrínseca
CNV	<i>Copy number variation</i>	N	normal
Cons	Consanguinidade	NGS	<i>Next generation sequencing</i>
CPK	Creatina Fosfoquinase	NHNN	<i>National Hospital for Neurology and Neurosurgery</i>
dH2O	água destilada	PAMC	Potencial de ação
D	direito		muscular composto
dHMN	neuropatia motora hereditária distal	PCR	reação em cadeia polimerase
DI	declínio cognitivo	PH	Padrão de herança
Dup	duplicação	qPCR	reação em cadeia polimerase quantitativo
E	esquerdo	RM	ressonância magnética
Etbr	<i>etidium bromide</i>	RU	Reino Unido
F	feminino	s	segundo
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>	SB	substância branca
Gb	gigabase	SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
Gen	gênero	SNV	<i>single nucleotide variation</i>
GWAs	<i>Genome wide association study</i>	TBE	Tris-borato-EDTA
gr	grama	TDAH	Transtorno do déficit de atenção hiperatividade
HCRP	Hospital das Clinicas de Ribeirão Preto	TEA	Transtorno do espectro autista
HSN	neuropatia sensitiva hereditária	TGI	trato gastrointestinal
HSP	Paraparesia espástica hereditária	UCL	<i>University College London</i>
ID	identificação	USP	Universidade de São Paulo
Indel	inserção ou deleção	UV	ultravioleta
ION	<i>Institute of Neurology</i>	VC	velocidade de condução
Kb	Kilobase	VUS	variante de significado indeterminado
L	litro	VE	variantes estruturais
Lab	laboratório	xg	unidade de gravidade
LMD	latência motora distal	WGS	<i>whole genome sequencing</i>
M	masculino		

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
1. MÉTODOS PARA DESCOBERTA DE NOVOS GENES	13
1.1 GENOMA HUMANO E VARIABILIDADE GENÉTICA	13
1.2 BASES GENÉTICAS E ESTRATÉGIAS PARA INVESTIGAÇÃO DE DOENÇAS HEREDITÁRIAS	17
1.2.1 Doenças mendelianas	19
1.2.2 Hipótese de variantes comuns-doenças comuns (VCDC)	21
1.2.3 Hipótese da heterogeneidade das doenças ou Doença Comum-Variante Rara (DCVR)	22
1.2.4 Correlação fenótipo-genótipo	23
1.3 NEUROPATIAS HEREDITÁRIAS	25
1.3.1 Classificação	31
1.3.2 Epidemiologia	33
1.3.3 Diagnóstico molecular	34
2. OBJETIVO	40
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 PACIENTES	41
3.1.1 Critérios de inclusão	41
3.1.2 Critérios de não inclusão	41
3.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA	42
3.3 LABORATÓRIO	43
3.3.1 Triagem laboratorial	43
3.3.2 Extração e quantificação de DNA	44
3.3.3 Desenho dos primers e reação em cadeia polimerase (PCR)	44
3.3.4 Eletroforese em gel de agarose	44
3.3.5 Purificação do produto obtido com a PCR	44
3.3.6 Reação de sequenciamento	45
3.3.7 Purificação do material para Sequenciamento	45
3.4 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO	45
3.4.1 Pipeline para preparação dos dados para análise	46
3.5 FILTRO DAS VARIANTES	48
3.5.1 Avaliação da Patogenicidade das variantes	50
3.6 ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO	52
3.7 BIÓPSIA DE NERVO	53
3.8 COMITÊ DE ÉTICA	53
3.9 FINANCIAMENTO	53
4. RESULTADOS	54
4.1 PACIENTES	54
4.1.1 CMT1	58
4.1.1.1 Caso CMT1_F3	58
4.1.2 CMT2	60
4.1.2.1 Caso CMT2_F3	60
4.1.2.2 Caso CMT2_F5	62
4.1.2.3 Caso CMT2_F8	66
4.1.2.4 CMT2_F9	69
4.1.2.5 CASO CMT2_F10	72
4.1.2.6 Caso CMT2_F12	75
4.1.3 iCMT	80
4.1.3.1 Caso iCMT_F2	80
4.1.3.2 Caso iCMT_F4	83
4.1.3.3 Caso iCMT_F7	88
4.1.4 Caso iCMT_F8	89

4.1.5 dHMN	91
4.1.5.1 Caso dHMN_F1	91
4.1.5.2 Caso dHMN_F3	96
4.1.6 HSN	98
4.1.6.1 HSN_F2	98
5 DISCUSSÃO	101
5.1 CASO CMT1_F3	103
5.2 CMT2	104
5.2.1 Caso CMT2_F3	104
5.2.2 Caso CMT2_F5	105
5.2.3 CMT2_F9	106
5.2.4 CMT2_F10	108
5.2.5 CMT2_F12	109
5.3 iCMT_F2 e iCMT_F7	110
5.4 iCMT_F4 e CMT2_F8	111
5.5 iCMT_F8	113
5.6 dHMN_F1	114
5.7 dHMN_F3	116
5.8 HSN_F2	117
6. CONCLUSÕES	123
APÊNDICE A	124
APÊNDICE B	129
APÊNDICE C	135
APÊNDICE D	138
ANEXO A	143
ANEXO B	145
ANEXO C	147
REFERÊNCIAS	149

INTRODUÇÃO

A genética é a ciência que se dedica ao estudo da hereditariedade e das variações (constitucionais e de desempenho) observadas em diferentes organismos, espécies ou grupos, bem como ao estudo dos mecanismos pelos quais essas características são afetadas (PASSARGE, 2018). Um ser humano adulto é constituído por aproximadamente dez trilhões de células de 200 tipos diferentes, cada qual (exceto os eritrócitos) contém em seu núcleo um programa com as informações (genoma) necessárias para manutenção da vida (PASSARGE, 2018).

O genoma é herdado e transmitido de uma célula para suas descendentes e de organismo para organismo. Ele é responsável pela codificação de todas as proteínas envolvidas em centenas de complexas vias moleculares. Embora herdado, o genoma apresenta grande variabilidade que, na maioria das vezes, é tolerada e não produz efeito deletério, permitindo assim o desenvolvimento e a vida normal. O projeto 1000 Genomas já foi capaz de elucidar as propriedades e a distribuição das variantes raras e comuns na população mundial, permitindo a compreensão de parte dos mecanismos envolvidos na variabilidade genética (*The 1000 Genomes Project Consortium*, 2015). O conhecimento e a compreensão desses eventos é fundamental para a adequada interpretação da grande diversidade observada no material genômico com as técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS).

No entanto, um grupo específico de variações no material genômico causa defeitos com impacto funcional nas vias moleculares inter ou intracelulares acarretando modificações estruturais e/ou funcionais que interferem no desenvolvimento, no reparo ou na homeostasia celular (PASSARGE, 2018). Esse grupo de indivíduos apresentam características que os diferem da população geral e que podem determinar desvantagem evolutiva e de sobrevivência.

Nas últimas duas décadas, a pesquisa no campo da genética humana se transformou dramaticamente graças ao desenvolvimento das revolucionárias tecnologias de processamento e análise de dados em larga escala (NGS e os estudos com *microarray*). Essas tecnologias vêm permitindo a análise de todo o material genético de maneira simultânea e em um curto espaço de tempo. Essas técnicas estão disponíveis universalmente a preços progressivamente menores, gerando conseqüentemente um aumento no conhecimento das bases genéticas relacionadas as doenças humanas.

Especificamente, no campo da neurologia, essas tecnologias têm permitido a identificação de um enorme número de genes que, se modificados (pela presença de uma mutação ou até mesmo uma variante rara), predisõem ao desenvolvimento de doenças degenerativas. Embora intrigante a descoberta de cada vez mais novos genes representa apenas o início de um desafio maior, que é o de entender as vias envolvidas na patogenicidade dessas doenças baseado na estrutura genética e seu funcionamento. O entendimento dessas vias possibilitara, quiçá, o desenvolvimento de tratamentos específicos direcionados para resgate ou mesmo regulação dessas vias. No presente estudo, utilizamos tecnologias de NGS para avaliar pacientes com neuropatia hereditária.

1. MÉTODOS PARA DESCOBERTA DE NOVOS GENES

1.1 Genoma humano e variabilidade genética

Não há, no mundo, dois seres humanos geneticamente idênticos. Em média, cada ser humano é 99.9% similar a outro ser humano (CHIAL., 2008). Mesmo gêmeos monozigóticos possuem diferenças genéticas decorrentes a mutações que ocorrem durante o processo de desenvolvimento e a variações no número de cópias, os tornando assim geneticamente diferentes (BRUDER et al, 2008). O genoma humano contém 3.25 bilhões de pares de bases (GRCh38.p12) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc/human>). Ele é dividido entre as porções codificadoras de proteínas e as não-codificadoras. As regiões codificadoras correspondem a aproximadamente 2% do material genômico (ENCODE Project Consortium, 2012), onde estão localizadas cerca de 85% das mutações patogênicas. Ao todo há aproximadamente 22.000 genes no genoma humano, sendo que já foram identificadas doenças relacionadas a cerca de 6100 desses genes (OMIM).

Um genoma típico difere do genoma de referência em 4.1 a 5 milhões de sítios. Como acima mencionado, essa grande variabilidade genética é tolerada na grande maioria das vezes. Todavia, alterações no material genômico, envolvendo *locus* específicos, modificam o DNA e podem estar relacionadas a fenótipos característicos. Independente do tipo de variação gerada o resultado final é a interrupção de alguma etapa na organização ou no funcionamento celular normal. Genes mutados passam a codificar proteínas de maneira defeituosa, sendo assim incapazes de desempenhar sua função (perda de função) ou passando a desempenhar funções não esperadas (ganho de função) (PIERCE, B., 2012).

As modificações observadas no material genômico podem ser decorrentes de alterações pontuais envolvendo um ou uma dezena de nucleotídeos ou mesmo podem ser alterações da estrutura do material genômico (aumento ou diminuição no número de cromossomos ou parte deles). Uma única mudança de base pode ser suficiente para causar uma doença fatal. Mais de 99.9% das variações observadas no genoma humano correspondem a SNPs (polimorfismo de um único nucleotídeo) ou a indels (inserções ou deleções). As variantes estruturais afetam um número maior de bases e ocorrem em cada genoma humano de 2.100 a 2.500 vezes (~1000 deleções grandes, ~160 variação no número de cópias, ~ 915 inserções Alu, ~ 128

inserções L1, ~51 inserções SVA, ~ quatro NUMTs e ~ 10 inversões), afetando mais de 20 milhões de bases (*The 1000 Genomes Project Consortium*, 2015). Elementos Alu, L1 e SVA são elementos ativos no genoma humano que podem ocasionalmente se inserirem nos genes e causarem doenças (OSTERTAG et al., 2003). Os elementos Alu são os fragmentos transponíveis mais frequentes do genoma humano e representam pequenas porções de DNA que se replicam e migram aleatoriamente (genes migratórios) ao longo do genoma sem afetar sua estrutura. (BATZER, DEININGER, 2002). Os elementos L1 são porções de DNA replicado capazes de reproduzir uma cópia de RNA a partir de si mesmo, transcrever o RNA em DNA e integra-lo novamente ao genoma (OSTERTAG et al., 2003).

Embora esse grande número de variações aconteça sistematicamente e no mais das vezes não tenham relevância clínica, variantes localizadas em locais funcionalmente importantes podem determinar o aparecimento de uma doença ou então predispor o indivíduo ao desenvolvimento de condições médicas (PIERCE, B., 2012).

As alterações observadas no genoma humano variam significativamente em tamanho, assim, para cada tipo de alteração haverá uma técnica mais adequada para o diagnóstico (Tabela 1.1). Sabe-se que há uma correlação direta entre a patogenicidade de uma variante com seu tamanho e com sua frequência em populações normais: variantes raras e grandes tem maior probabilidade de serem patogênicas (GIRIRAJAN, CAMPBELL, EICHLER, 2011; BENNETT et al., 2017). O tamanho do material genômico é medido em pares de bases (uma unidade consiste de um par de nucleotídeos que são complementares e estão localizados nas fitas opostas do DNA) (PASSARGE, 2018). Deleções ou duplicações de milhões de pares de bases (Megabases - Mb), por exemplo, são mais prováveis de serem patogênicas que deleções de algumas milhares de pares de bases (kilobases - Kb) (SILVEIRA-MORIYAMA, PACIORKOWSKI, 2018). Algumas regiões cromossômicas podem estar duplicadas ou deletadas em grande número de alelos em populações normais, o que sugere que mesmo grandes alterações do material genético são toleradas quando muito frequentes (SILVEIRA-MORIYAMA, PACIORKOWSKI, 2018).

As variações estruturais (VE) englobam os rearranjos genômicos que alteram a arquitetura e a organização cromossômica. Dentre as quais podemos incluir

duplicações e deleções de regiões cromossômicas específicas (variações no número de cópias – CNV), inserções, inversões e translocações. Esses eventos são parte integrante da biologia normal dos cromossomos e podem ocorrer em qualquer parte do genoma e podem variar de milhares a milhões de pares de bases (GU, ZHANG, LUPSKI, 2008). Conforme dito anteriormente a técnica utilizada para detectar variações genômicas dependera do tamanho dessa variação. A técnica de *microarray* é utilizada para dosar os níveis de material genético de uma região específica do genoma (superior a 100Kb), permitindo a análise concomitante de milhares de regiões.

No entanto, quando uma deleção ou uma duplicação é apenas uma parte de um rearranjo cromossômico mais complexo a técnica de *microarray* pode não ser eficaz. Exemplos dessas situações são a associação de deleções ou duplicações com translocações balanceadas ou inversões (BREWER et al., 2016; BARBER, et al., 2004; KOSTINER, et al., 2002).

As translocações representam a migração de parte de um cromossomo que se desprende e acabou se incorporando a outro cromossomo. Quando essa migração do material genômico não está associada a perda de material genômico, ela é denominada de translocação cromossômica balanceada (PASSARGE, 2018). As translocações balanceadas podem ser detectadas com teste de cariótipo, pois a mudança na posição de porções de um cromossomo podem ser detectadas visualmente, mas como nessa situação não observamos uma variação no número de cópias, e sim apenas uma modificação em suas coordenadas a técnica de *microarray* não é efetiva. Ao passo que quando há perda de material genômico durante o evento de translocação (translocação não balanceada) ambas as técnicas, *microarray* e teste de cariótipo são efetivas para sua detecção (PASSARGE, 2018; SILVEIRA-MORIYAMA, PACIORKOWSKI, 2018).

Em indivíduos normais são identificadas também milhares de regiões com três, quadro ou mais repetições nucleotídicas, conhecidas como repetições curtas em tandem. Expansões anormais dessas regiões podem causar doenças, como distrofia miotônica, doença de Huntington e ataxia espinocerebelar do tipo 3 (CINTRA et al., 2014; RODRIGUES et al., 2011; SHELBOURNE, JOHNSON, 1992; BROOK et al., 1992). Essas variações não são detectadas pelos testes de cariótipo, *microarray* ou mesmo FISH, mas sim pela técnica de *Southern blot* (SILVEIRA-MORIYAMA, PACIORKOWSKI, 2018). Outro interessante mecanismo de variação

do material genômico é a metilação. A metilação é um mecanismo epigenético usado para controle da expressão gênica. Nesse processo as regiões de DNA acabam sendo silenciadas, causando a inativação de um dos alelos (*imprinting*). O padrão de metilação é herdado, sendo considerado um processo epigenético uma vez que não modifica a sequência de DNA referência (BIRD, 2007).

Um ou mais nucleotídeos podem ser perdidos ou inseridos de maneira aleatória ao longo de todo material genômico, estes eventos são conhecidos como indels. As indels são eventos comuns e ocorrem cerca de 500 mil vezes no genoma de uma pessoa normal. Quando o número dessas alterações nucleotídicas ocorrem em número de três ou múltiplos de três, elas acabam gerando alterações que afetam apenas os resíduos codificados pela indel sem alterar a matriz de leitura e são mais comumente toleradas (variantes *non-frameshift*), ao passo que quando o número de nucleotídeos da indel não é um múltiplo de três acaba ocorrendo um erro de enquadramento com um deslocamento da matriz de leitura abaixo da localização da indel (variante *frameshift*) (PASSARGE, 2018). Indels podem ser detectadas por sequenciamento Sanger ou por NGS. Quando menores que 100 bp são detectadas pelas técnicas de NGS e Sanger, e quando menores que 700 a 1000 bp são detectadas pela técnica Sanger.

Finalmente, mudança de uma única base na sequência de DNA é denominada como variante de um único nucleotídeo (*single-nucleotide variant* – SNV). As SNVs podem corresponder a variantes benignas, patogênicas ou mesmo serem de significância desconhecida (*variant of uncertain significance* – VUS). Quando demonstrado de maneira sistemática que uma variante não está relacionada a qualquer fenótipo clínico e que ela está presente em um número significativo de indivíduos normais (>1%) ela é considerada uma variante benigna e pode ser designada como polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism*). Quando se demonstra cientificamente que uma variante é patogênica o termo mutação passa a ser utilizado. E quando não há evidências suficientes para que se defina uma variante como benigna ou patogênica a definimos como VUS. Adicionalmente as SNVs localizadas nas regiões codificadoras podem alterar o resíduo correspondente (variantes não-sinônimo, *missense*) ou mantê-lo inalterado (variantes sinônimo). Quando a troca do nucleotídeo gera um códon de parada gerando a não codificação proteica ou mesmo a produção de uma proteína truncada que afete sua função a variante é chamada de *nonsense*. Outro

grupo relevante de variantes, são as localizadas nos sítios de *splicing*, que representam as zonas de ligação entre os éxons e íntrons e podem acarretar perda ou inserção não esperada de todo um éxon. A Tabela 1-1 sumariza os tipos de variação genômica e a melhor metodologia para seu diagnóstico. Desconhecemos casos de CMT decorrentes de aneuploidias, expansões ou mesmo por *imprinting* parental.

Tabela 1-1 – Variações genômicas e a melhor técnica para sua detecção

Variação Genômica	Definição	Teste utilizado para detecção
Aneuploidia	Anormalidade cromossômica estrutural	Cariótipo <i>Microarray</i>
Translocação balanceadas	Rearranjo levando a ganho ou perda de material genético	Cariótipo
Translocação não-balanceadas	Rearranjo levando a ganho ou perda de material genético	<i>Microarray</i>
CNV	Uma região de um cromossomo que esteja duplicada ou deletada	<i>Microarray</i> (< 5 Mb a 100 Kb) Cariótipo (se > 5Mb)
Metilação	Adição de um grupo metil a citosina, mecanismo de imprinting	Análise de metilação
Deleções e duplicações de gene e exons	Deleções ou duplicações de um gene inteiro ou de exons	MLPA qPCR FISH
Repetições de microssatélites	Repetições de pequenas sequências de 1 a 4 nucleotídeos	<i>Southern blot</i>
Mutação de ponto	Mutação em um único nucleotídeo	Sequenciamento Sanger NGS
Indel	Inserção ou deleção de 1 ou mais nucleotídeos na sequência de DNA	Sequenciamento Sanger (< 700-1000 bp) NGS (< 100 bp)

Modificado e traduzido de Silveira-Moriyama L e Paciorkowski, 2018. CNV = variação no número de cópias, MLPA = amplificação de múltiplas, sondas dependentes de ligação, qPCR = reação em cadeia polimerase quantitativa, FISH = hibridação *in situ* fluorescente.

1.2 BASES GENÉTICAS E ESTRATÉGIAS PARA INVESTIGAÇÃO DE DOENÇAS HEREDITÁRIAS

Conceitualmente há três modelos que descrevem a base genética das doenças (SCHORK et al., 2009) (Figura 1.1), sobre as quais foram desenvolvidas diversas estratégias para descoberta de genes (SINGLETON et al., 2010) (Figura 1.2). Figura 1.1 – As bases genéticas das doenças. Variantes raras (MAF<0.5%) e

variantes com frequência alélica baixa ($0.5\% > \text{MAF} < 5\%$) não são suficientemente frequentes para serem capturadas nos estudos de haplótipo (*GWA array*), não possuem grande impacto para serem detectadas nos estudos de *linkage* em grandes famílias. Traduzido de Manolio, 2009, com permissão.

1.1 – As bases genéticas das doenças

Figura 1.2 – Métodos para descobrimento de novos genes baseado na hipótese natural da arquitetura genética das doenças

Métodos para descobrimento de novos genes baseado na hipótese natural da arquitetura genética das doenças. Traduzido de Singleton et al. 2010, com permissão.

1.2.1 Doenças mendelianas

estudo dos traços Mendelianos levou ao descobrimento de milhares de genes causadores de doença. As doenças conhecidas como Mendelianas englobam um grupo de desordens causadas por mutações em genes que possuem penetrância completa ou alta penetrância e cujo padrão de herança obedeça as leis

de Mendel. As neuropatias periféricas hereditárias (Charcot-Marie-Tooth – CMT) são um exemplo clássico desse grupo de doenças (TIMMERMAN, STRICKLAND, ZÜCHNER, 2014). Na investigação molecular das doenças Mendelianas, a abordagem mais efetiva são os estudos baseados em famílias, nos quais se avalia a segregação de variantes específicas de acordo com o fenótipo em vários indivíduos de diferentes gerações (YAMAMOTO, et al., 2014) (Figura 1.3).

Figura 1.3 – Árvore genealógica de uma família com CMT1A, demonstrando claramente transmissão de homem para homem

Fonte: elaborado pelo autor.

Adicionalmente, estudos de *linkage* e mapa de homozigose são utilizados na identificação de genes causadores de doenças com padrão de herança autossômica dominante e recessiva, respectivamente. Ambas as abordagens são bastante efetivas e se beneficiam do uso do sequenciamento de todo exoma (WES) (BENTLEY et al., 2008, NG et al., 2010). Essa metodologia é capaz de gerar uma lista de variantes em regiões do genoma que foram relacionadas a uma doença em um grupo/família específico (BRAS, GUERREIRO, HARDY, 2012) (Figura 1.4).

Figura 1.4 – Mapa de homozigose usando arrays

Mapa de homozigose de três indivíduos de uma família com demência fronto temporal (dois afetados e um não afetado). Cada ponto azul representa um polimorfismo (SNP) de um único indivíduo. Para cada SNP, uma baixa frequência para o alelo B indica que o indivíduo seja homozigoto para o alelo A, valores intermediários indicam que o indivíduo seja heterozigoto e alta frequência do alelo B significa que o indivíduo seja homozigoto para o alelo B. Nesse exemplo, foi identificada uma região no cromossomo 6 (rosa) na qual os dois indivíduos afetados apresentam uma grande região de homozigozidade que não foi identificada no indivíduo não afetado, sugerindo que a mutação causadora do fenótipo nessa família esteja localizada nessa região genômica.

1.2.2 Hipótese de variantes comuns-doenças comuns (VCDC)

São consideradas variantes comuns as que apresentam uma frequência alélica superior a 5% na população normal (frequência alélica mínima, $MAF > 5\%$) (MANOLIO et al., 2009). Essa hipótese considera que variantes comuns com pequeno a moderado efeito podem aumentar o risco de desenvolvimento de doenças (Figura 1.5). Essas variantes podem ser codificadoras ou apresentar efeitos regulatórios (SINGLETON et al., 2010). Doença de Parkinson e Alzheimer são exemplos de doenças com esse comportamento, em que embora haja pacientes que possuam mutações Mendelianas, a maioria dos casos ocorrem devido a presença de fatores de risco e são então considerados esporádicos (BRAS, GUERREIRO, HARDY, 2012). Nesse contexto, os estudos de associação genômica (GWAS) são adequados para investigar as bases genéticas de doenças comuns.

Figura 1.5 – Hipótese de variantes comuns-doenças comuns e conceito de estudo de associação genômica

SNP = polimorfismo de nucleotídeo único é a posição com variabilidade normal no genoma humano, onde indivíduos podem carrear dois ou mais alelos diferentes.

Essas diferentes sequências de DNA são chamadas alelos. Modificado de <https://www.broadinstitute.org/education/glossary/snp>. Fonte: elaborado pelo autor.

Teoricamente, alelos que aumentam o risco do desenvolvimento de uma doença específica serão encontrados mais frequentemente em pacientes afetados do que em controles. Essa hipótese pode ser analisada através de comparação estatística da frequência alélica de milhares de locus entre controles e afetados. Este tipo de análise se beneficia de um grande número de amostras.

1.2.3 Hipótese da heterogeneidade das doenças ou Doença Comum-Variante Rara (DCVR)

De acordo com essa hipótese, doenças complexas podem ser causadas por variantes raras de baixo a moderado impacto (WANG et al., 2005). Nesse contexto, se acredita que variantes de moderado impacto tendem a ser variantes em regiões codificadoras enquanto as de baixo impacto regulem a expressão gênica (SINGLETON et al., 2010). Um exemplo deste tipo de doença é o autismo uma vez

que raras variações nos números de cópias podem aumentar o risco de desenvolver a doença (PINTO et al., 2010). A determinação das causas moleculares para DCVR é extremamente difícil. A técnica do GWAS não pode detectar essas variantes de maneira eficaz por três razões diferentes. Primeiro, pelo baixo poder estatístico diante dos números limitados das amostras disponíveis para alguns fenótipos (SINGLETON et al., 2010). Segundo, essas doenças se caracterizam por apresentar heterogeneidade genotípica na qual há múltiplas variantes em um mesmo locus. Terceiro, variantes raras geralmente não podem ser eficientemente detectadas pois elas são extremamente raras e não estão presentes no bancos de dados de populações normais. A técnica de *linkage* não é eficaz pois essas variantes apresentam penetrância incompleta.

1.2.4 Correlação fenótipo-genótipo

A partir do momento em que as descrições iniciais relacionadas a doenças hereditárias passaram a ser correlacionadas a mutações específicas, houve um acúmulo crescente de informações que permitiram um entendimento das bases genéticas e também uma ampliação da correlação entre genótipos a fenótipos específicos. O doença de Charcot-Marie-Tooth tipo 1A (CMT1A) é um exemplo perfeito de uma doença genética com correlação fenótipo-genótipo clássica. Nesse caso, pacientes apresentam uma mesma mutação apresentando um mesmo fenótipo (Figura 1.6.a).

No entanto, para alguns fenótipos são identificadas mutações patogênicas em diferentes *locus*, caracterizando a chamada heterogeneidade genética (SILVEIRA-MORIYAMA, PACIORKOWSKI, 2018). Um excelente exemplo desse fenômeno é a neuropatia motora hereditária distal (dHMN) com envolvimento preferencial do compartimento posterior da perna. Mutações em vários genes codificam este fenótipo específico, incluindo alguns dos genes que codificam as proteínas da família *heat shock* (HSPB1, HSPB3 e HSPB8) (EVGTAFOV et al., 2004; IROBI et al., 2004; KOLB et al., 2010), mutações no gene FBXO38 (SUMNER et al., 2013) e, mais recentemente, como mostraremos a seguir, mutações no gene VRK1 (Figura 1.6.b).

Como dito anteriormente, as técnicas de NGS permitem o sequenciamento de um grande número de genes simultaneamente o que tem permitido a definição do

diagnóstico molecular em um número considerável de pacientes com fenótipos que antes acreditávamos não estarem relacionados (SILVEIRA-MORIYAMA, PACIORKOWSKI, 2018). Por exemplo, mutações no gene KIF1A já foram correlacionadas a fenótipos completamente divergentes: paraparesia espástica hereditária pura (HSP), HSP complexa (com neuropatia e/ou ataxia cerebelar), deficiência intelectual, neuropatia sensitiva hereditária tipo 2C e a fenótipos complexos caracterizados por neuropatia axonal, piramidalismo e comprometimento cognitivo (Figura 1.6.c) (RIVIÈRE et al., 2011; YLIKALLIO et al., 2015; LEE et al., 2015; TOMASELLI et al., 2017). A este fenômeno dasse o nome de heterogeneidade clínica.

Figura 1.6 – Correlação fenótipo-genótipo. a. Concordância clássica entre fenótipo e genótipo; b. Heterogeneidade genérica e c. Pleiotropia

Correlação fenótipo-genótipo. a. Concordância clássica entre fenótipo e genótipo; b. Heterogeneidade genérica e c. Pleiotropia. Heterogeneidade genérica, quando um fenótipo pode ser causado por mutações em genes diferentes; c. Pleiotropia, quando mutações em um mesmo gene podem causar fenótipos diferentes. CMT1A = Charcot-Marie-Tooth tipo 1A, Dup. = duplicação, dHMN = neuropatia motora hereditária distal, HSPp = paraparésia espástica pura, HSPc = paraparesia espástica complicada, HSN2C = neuropatia sensitiva hereditária tipo 2C, DI = declínio intelectual.

Fonte: elaborado pelo autor.

1.3 NEUROPATIAS HEREDITÁRIAS

As neuropatias hereditárias (CMT) representam um grupo clínico e geneticamente heterogêneo de doenças determinadas que afetam exclusiva ou preferencialmente o sistema nervoso periférico (SNP) (ROSSOR et al., 2017). O

CMT causa uma degeneração axonal com padrão de distribuição comprimento-dependente afetando as fibras sensitivas e/ou motoras. Adicionalmente, há um número crescente de doenças complexas que afetam múltiplos sistemas em que a neuropatia é parte do fenótipo, como por exemplo a ataxia de Friedreich, a doença de Krabbe, a adrenomieloneuropatia, as mitocondriopatias e algumas formas de ataxias espinocerebelares (SCAs) (MORRAL, 2010; CANTUTI-CASTELVETRI, 2015; ENGELEN, 2014; MENDONÇA, 2018).

Mutações de ponto (nonsense ou missense), indels e VE (inserções, translocações, CNV) já foram associadas com CMT. Essas alterações do material genômico afetam genes que codificam proteínas com funções estratégicas para o desenvolvimento, manutenção e funcionamento das células de *Schwann* e/ou do axônio do nervo periférico. Esses genes estão relacionados a codificação de proteínas estruturais da bainha de mielina, a fatores controladores do processo de transcrição proteica, a componentes do citoesqueleto e a proteínas mitocondriais (SAPORTA, 2014). Atualmente há mais de 90 genes já identificados e relacionados ao CMT (ROSSOR, TOMASELLI, REILLY, 2016) (tabela 2).

As técnicas de NGS têm permitido a identificação de um número cada vez maior de genes, incluindo genes que foram originalmente descritos como causadores de outras síndromes neurológicas como por exemplo a atlastina-1 foi originalmente identificada como causadora de HSP, mas pode também causar HSN (IVANOVA et al. 2007, GUELLY et al., 2011) e a doença de Krabbe que pode se apresentar como um quadro CMT-like em que a neuropatia permanece a única manifestação da doença (ADACHI et al., 2016).

O fenótipo clássico de CMT inclui um quadro de fraqueza, atrofia e perda de sensibilidade com padrão de distribuição comprimento-dependente, associado a hiporeflexia. O início dos sintomas geralmente ocorre nas primeiras décadas de vida e a evolução costuma ser lenta ao longo de décadas (ROSSOR, et al., 2016). A maioria dos pacientes mantém a capacidade de deambulação ao longo da vida e sua expectativa de vida não é afetada. Algumas características clínicas podem se sobrepor ao quadro clássico permitindo uma correlação fenótipo-genótipo e a inferência de possíveis genes causais.

Tabela 1-2 – Lista de genes sabidamente relacionados a CMT e fenótipo correspondente.
Traduzido e adaptado de Rossor, 2016, com permissão

Tipo (Número OMIM)	Gene	Fenótipo
CMT1 Autossômico dominante		
CMT1A (118220)	17p dup. (PMP22) PMP22 mutação de ponto	CMT1 clássico CMT1 clássico; DSD; CHN (raramente recessiva)
CMT1B (118200)	MPZ	CMT1; DSD; CHN; CMT2 (raramente recessiva)
CMT1C (601098)	LITAF	CMT1 clássico
CMT1D (607678)	EGR2	CMT1 clássico; DSD; CHN
CMT1F (607734)	NEFL	CMT2, pode apresentar VC baixa (<38 m/s) (raramente recessiva)
CMT1 complicado (614434)	FBLN5	Degeneração macular; cútis laxa; HMN; alentecimento da VC
SNCV / CMT1 (608236)	ARHGEF10	Alentecimento da velocidade de condução, assintomático
Neuropatia hereditária com susceptibilidade a compressão		
HNPP (162500)	17p del. (PMP22) PMP22 mutação de ponto	HNPP Típico HNPP Típico
CMT1 Autossômico recessivo		
CMT4A (214400)	GDAP1	CMT2, geralmente início precoce Paralisia de pregas vocais e diafragma
CMT4B1 (601382)	MTMR2	CMT1 grave; envolvimento precoce da face; fraqueza bulbar; dobramento focal da mielina
CMT4B2 (604563)	SBF2 (MTMR13)	CMT1 grave; glaucoma; dobramento focal da mielina
CMT4B3 (615284)	SBF1 (MTMR5)	CMT1; dobramento focal da mielina
CMT4C (601596)	SH3TC2	CMT1 grave; escoliose; inclusão citoplasmática
CMT4D (601455)	NDRG1	CMT1 grave; comum em populações de ciganos; surdez; atrofia de língua
CMT4E (605253)	EGR2	CMT1; DSD; CHN
CMT4F (614895)	PRX	CMT1; predomínio sensitivo; dobramento focal da mielina
CMT4G ou HMSN de Russe (605285)	HK1	CMT1 grave de início na infância; comum em populações de ciganos
CMT4H (609311)	FGD4 (Frabin)	CMT1 clássico
CMT4J (611228)	FIG4	CMT1; envolvimento predominantemente motor
CCFDN (604168)	CTDP1	CMT1; comum em populações de ciganos; catarata, dismorfias
CMT4	SURF-1	CMT1; encefalopatia, ataxia, síndrome de Leigh

CMT2 Autossômico dominante		
CMT2A (609260)	MFN2	CMT2; atrofia ótica (raramente recessiva)
CMT2B ou HSAN1B (600882)	RAB7	CMT2 com complicações relacionadas a funções sensitivas (ulceras mutilantes)
CMT2C (606071)	TRPV4	CMT2; paralisia de prega vocal
CMT2D (601472)	GARS	CMT2 com predomínio em membros superiores
CMT2E (607684)	NEFL	CMT2 mas pode ter VC nos membros superiores baixa (<38 m/s) (raramente recessiva)
CMT2F (606595)	HSPB1	CMT2, envolvimento predominantemente motor
CMT2I (607677)	MPZ	CMT2 de início tardio
CMT2J (607736)	MPZ	CMT2 com perda auditiva e anormalidades pupilares
CMT2K (607831)	GDAP1	CMT2 de início tardio (dominante); CMT2 grave de início precoce (recessiva)
CMT2L (608673)	HSPB8	CMT2, envolvimento predominantemente motor
CMTDIB ou CMT2M (606482)	DNM2	iCMT ou CMT2; catarata; oftalmoparesia; ptose
CMT2N (613287)	AARS	CMT2 clássico
CMT2P (614436)	LRSAM1	CMT2 de predomínio sensitivo de leve intensidade (dominante ou recessivo)
CMT2Q (615025)	DHTKD1	CMT2
HMSNP (604484)	TFG	CMT2 com envolvimento da musculatura proximal
CMT2V (616491)	NAGLU	CMT2 de predomínio sensitivo
CMT2	MARS	CMT2 de início tardio
CMT2	HARS	CMT2
CMT2	VCP	CMT2
SPG10 (604187)	KIF5A	CMT; HSP
CMT2	MT-ATP6	CMT2; sinais de liberação piramidal, recidivante
CMT2 com axônios gigantes	DCAF8	CMT2 início na infância, com acúmulo de neurofilamento observado na biópsia de nervo
CMT2	TUBB3	CMT2 / CFEOM3
CMT2	MORC2	CMT2 com sinais piramidais
CMT2 Autossômico recessivo		
CMT2B1 (605588)	LMNA	CMT2 rápida progressão
CMT2B2 (605589)	MED25	CMT2 clássico
NMAN (137200)	HINT1	CMT2, predomínio motor associado a neuromiotonia
CMT2R (615490)	TRIM2	CMT2 início na infância
AR-CMT2	IGHMBP2	CMT2

AR-CMT2	HSJ1	CMT2
CMT Ligado ao cromossomo X		
CMTX1 (302800)	GJB1	Homens com CMT1 (redução assimétrica da VC); mulheres com CMT2
CMTX4 ou Síndrome Cowchock (310490)	AIFM1	CMT2; início na infância; atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, surdez, dificuldade de alfabetização
CMTX5 (311070)	PRPS1	CMT2; surdez; atrofia ótica
CMTX6 (300905)	PDK3	CMT2
CMTX	DRP2	iCMT
iCMT Autossômico dominante		
CMTDIB ou CMT2M (606482)	DNM2	iCMT ou CMT2; catarata; oftalmoparesia, ptose
CMTDIC (608323)	YARS	iCMT
CMTDID (607791)	MPZ	iCMT
CMTDIE (614455)	IFN2	iCMT; glomeruloesclerose segmentar focal
CMTD1F (615185)	GNB4	iCMT
iCMT Autossômico recessivo		
CMTRIA (608340)	GDAP1	iCMT
CMTRIB (613641)	KARS	iCMT; dificuldade de aprendizado; schwannoma vestibular
CMTRIC (615376)	PLEKHG5	iCMT; SMA
CMTRID (616039)	COX6A1	iCMT; início na primeira década de vida
Neuropatia motora hereditária		
HMN2A (158590)	HSPB8	dHMN; dominante, envolvimento mais acentuado do compartimento posterior da perna
HMN2B (608634)	HSPB1	dHMN; dominante, envolvimento mais acentuado do compartimento posterior da perna
HMN2C (613376)	HSPB3	dHMN; dominante, envolvimento mais acentuado do compartimento posterior da perna
HMN2D (615575)	FBXO38	dHMN; dominante
HMN com sinais piramidais ou ELAf4 (602433)	SETX	dHMN com sinais piramidais; dominante
DSMA4 (611067)	PLEKHG5	SMA; CMTRIC
DSMA5 (614881)	DNAJB2 (HSJ1)	dHMN; recessivo
HMN5A (600794) ou SPG17 (270685)	BSCL2	Envolvimento preferencial das mãos; síndrome Silver, porém pode haver envolvimento sensitivo como observado no CMT2D
HMN5A (600794)	GARS	Envolvimento preferencial das mãos; dominante
HMN5B (614751) ou	REEP1	Envolvimento preferencial das

SPG31 (610250)		mãos; sinais piramidais; dominante
HMN6 ou SMARD1 (604320)	IGHMBP2	Início na infância; distúrbio ventilatório, autossômico recessivo
SMARD2 ou SMAX	LAS1L	Início na infância; distúrbio ventilatório, ligado ao X
HMN7A (158580)	SLC5A7	HMN; paralisia de prega vocal; dominante
HMN7B (607641)	DCTN1	HMN; fraqueza em fazer e musculatura bulbar; dominante
SMAX3 (300489)	ATP7A	HMN; ligada ao X
SMALED (158600)	DYNC1H1	Congênita; contraturas; predomínio em membros inferiores; sinais piramidais; defeitos de migração cortical; dificuldade de aprendizado; dominante
SMALED2 (615290)	BICD2	Congênita; contraturas; predomínio em membros inferiores; sinais piramidais; dominante
PNMHH (614369)	MYH14	dHMN; miopatia distal; rouquidão; surdez; dominante
SPSMA (181405)	TRPV4	dHMN; escapula alada; paralisia de corda vocal; dominante
HMN	AARS	dHMN; dominante
HMN	HARS	dHMN; dominante
HMN	HINT1	HMN com neuromiotonia; recessiva
dHMN com sinais piramidais	SIGMAR1	HMN com sinais piramidais; síndrome Silver-Like, recessiva, ELA juvenil
SMAJ (615048)	CHCHD10	SMAJ; CMT2; início tardio; Finlândia; dominante

Neuropatia Hereditária Sensitiva (Neuropatia Sensitivo Autônoma Hereditária (HSAN))

HSN1A (162400)	SPTLC1	HSN com complicações sensitivas (úlceras mutilantes); dominante
HSN1C (613640)	SPTLC2	HSN com complicações sensitivas (úlceras mutilantes); dominante
CMT2B (600882)	RAB7	HSN com complicações sensitivas (úlceras mutilantes); dominante
HSN1D (613708) ou SPG3A (182600)	ATL1	HSN com complicações sensitivas (úlceras mutilantes); espasticidade; dominante
HSN1E (614116)	DNMT1	HSN; surdez; demência; dominante
HSN1F (615632)	ATL3	HSN; destruição óssea; dominante
HSN2A (201300)	WNK1	HSN com complicações sensitivas (úlceras mutilantes); recessiva
HSN2B ou HSN1B (613115)	FAM134B	HSN com complicações sensitivas (úlceras mutilantes); recessiva
HSN2C (614213) ou SPG30 (610357)	KIF1A	HSN com complicações sensitivas (úlceras mutilantes); recessiva
HSN3, disautonomia	IKBKAP	Comum em populações de judeus

familiar ou síndrome de Riley–Day (223900)		Ashkenazi; disautonomia; HSN; agenesia de papilas fungiformes; recessiva
Insensibilidade congênita a dor (24300), dor paroxística (167400), eritromeralgia primária (133020), polineuropatia de fibras finas	SCN9A	Recessiva: insensibilidade congênita a dor Dominante: dor paroxística, eritromeralgia primária, polineuropatia de fibras finas
CIPA ou HSN4 (256800)	NTRK1	Insensibilidade congênita a dor com anidrose; recessiva
CIP	PRDM12	Insensibilidade congênita a dor; recessiva
CIP	CLTCL1	Insensibilidade congênita a dor e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor grave, distúrbios e hipomielinização do sistema nervoso central na RM
HSN5 (608654)	NGF-B	Insensibilidade congênita a dor; recessiva
HSN6 (614653)	DST	Comum em populações de judeus Ashkenazi; disautonomia; HSN; agenesia de papilas fungiformes; óbito até 2 anos de vida; recessiva
HSN7 (615548)	SCN11A	Insensibilidade congênita a dor com hiperhidrose e disfunção do trato gastrointestinal, polineuropatia dolorosa, dominante
HSN e demência	PRNP	Disautonomia; hipoestesia/anestesia; demência; dominante
HSN com paraparesia espástica (256840)	CCT5	HSN com complicações sensitivas (úlceras mutilantes) e paraplegia espástica; recessiva
Ataxia cordonal posterior e retinite pigmentosa (PCARP)	FLVCR1	Retinite pigmentosa, ganglionopatia sensitiva e alteração da coluna posterior na RM, recessiva.

Fonte: elaborado pelo autor.

1.3.1 Classificação

A observação clínica de grupos distintos de pacientes com envolvimento preferencial ou exclusivo das fibras sensitivas e/ou motoras levou à criação de subgrupos que são amplamente conhecidos: as neuropatias sensitivas e motoras hereditárias (HSMN ou CMT), as neuropatias motoras hereditárias distais (dHMN) e

as neuropatias sensitivas hereditárias (HSN) (BAETS et al., 2011). Embora essa classificação seja didática e útil na prática clínica, há uma tendência a se considerar que elas representem polos opostos de um amplo espectro de uma mesma doença, em que de um lado há indivíduos com degeneração exclusiva ou preferencial das fibras motoras, do lado oposto há indivíduos com degeneração exclusiva ou preferencial das fibras sensitivas e no centro temos um grupo numericamente mais significativo de indivíduos em que se observa o envolvimento clínico e eletrofisiológico de ambas as fibras (sensitivas e motoras). Os fatores comuns observados nesses grupos são o envolvimento do SNP e a hereditariedade.

A tendência de considerarmos que essas apresentações representem um continuum de uma mesma doença é baseada em algumas observações. Primeiro, há um grande número de pacientes com sintomas exclusivamente motores (dHMN) que, no entanto, apresentam alterações discretas identificadas apenas com exame físico minucioso ou no estudo eletrofisiológico dos potenciais de ação sensitivo (PAS), da mesma forma em que há um grande número de pacientes com sintomas sensitivos exclusivos (HSN) que apresentam alterações motoras evidenciadas clínica, eletrofisiologicamente e/ou mesmo apenas por estudo com ressonância magnética (RM). Segundo, em alguns pacientes com longo período de seguimento, podemos observar nitidamente a evolução fenotípica. Pacientes que inicialmente apresentavam fenótipo clínico e eletrofisiológico de dHMN progrediram ao longo dos anos para CMT2, sugerindo um possível envolvimento de ambos os grupos de fibras (sensitivas e motoras) que não era evidente nas fases iniciais. Isso fica ainda mais claro, quando indivíduos jovens de uma mesma família com mesmo genótipo, são classificados com fenótipo dHMN ao passo que os indivíduos idosos com CMT2. Finalmente, a utilização das NGS permitiu o reconhecimento de inúmeros genes envolvidos em fenótipos variáveis ou mesmo indivíduos com sobreposição de fenótipos. Assim, mutações em um mesmo gene pode apresentar fenótipos distintos (figura 6.c).

No entanto, clinicamente a diferenciação entre o mecanismo fisiopatológico subjacente é, na maioria das vezes, impossível. A determinação de quais estruturas estão primariamente afetadas auxilia no processo de priorização dos testes a serem realizados. Para tal, o estudo da condução tem sido utilizado uma vez permite a subdivisão dos pacientes em grupos distintos. Nessa classificação a divisão se baseia na velocidade de condução observada nos membros superiores: CMT1, uma

neuropatia desmielinizante com redução uniforme da velocidade de condução (<38 m/s) e CMT2, uma neuropatia axonal com velocidades de condução normais ou quase normais (>38 m/s), nesse último grupo observamos amplitudes reduzidas dos potenciais de ação sensitivo e potencial de ação muscular composto (PAMC) (SAPORTA, 2014). Mais recentemente, reduções das velocidades de condução na faixa intermediária (35 a 45 m/s) têm sido reconhecidas e associadas a genes específicos. A combinação desses três padrões eletrofisiológicos ao padrão de herança definem os principais grupos de CMT (SAPORTA, 2014): desmielinizante autossômica dominante (CMT1), axonal autossômica dominante (CMT2), ligada ao cromossomo X (CMTX), com redução da velocidade de condução na faixa intermediária autossômica dominante (CMTID) ou autossômica recessiva (CMTIR). As formas recessivas de CMT são o tipo 4 (CMT4), no qual a maioria apresenta características demielinizantes.

Um grupo de pacientes pode apresentar início precoce dos sintomas ainda no primeiro ano de vida, evoluindo com atraso no desenvolvimento motor e reduções acentuadas nas velocidades de condução (<15 m/s), esses casos são classificados como síndrome de hipomielinização congênita e podem ser decorrentes de alterações na dosagem do gene PMP22, mutações de ponto no gene PMP22 ou mesmo no gene MPZ.

1.3.2 Epidemiologia

O CMT representa a causa mais frequente de doenças neuromusculares geneticamente determinadas em todo o mundo, acometendo um em cada 2.500 nascidos vivos (Skre, 1974). Nos países ocidentais em que há uma multipluralidade étnica as formas autossômicas dominantes ou ligadas ao X são as mais frequentemente identificadas, ao passo que em países isolados com população homogênea ou em países em que casamentos consanguíneos sejam normais sociais, doenças com padrão de herança autossômica recessiva são observadas mais frequentemente (SAPORTA, 2014).

Embora haja variações no perfil epidemiológico de CMT em diferentes populações (GUESS et al., 2013; ROSSOR et al. 2015), de maneira global, cerca de 90% dos resultados positivos se deve a alterações em quatro genes (*PMP22*, *GJB1*, *MPZ* e *MFN2*) (Di VINCENZO et al., 2014; SAPORTA et al., 2011), todos os outros

genes relacionados a CMT são responsáveis por cerca de 2% dos casos (SAPORTA, 2014).

A forma mais comum de CMT é o CMT1A, responsável por 60% dos casos com diagnóstico molecular definido (MURPHY et al., 2012). Mutações no gene *GJB1*, que codifica a proteína conexina 32, são responsáveis por aproximadamente 20% dos casos, sendo a segunda causa mais frequente de CMT. A terceira causa mais comum de CMT, são as mutações no gene *MPZ*.

As formas axonais de CMT (CMT2) correspondem a cerca de 30% dos casos de CMT. Mutações no gene *MFN2* são responsáveis por aproximadamente 20% dos casos de CMT2.

1.3.3 Diagnóstico molecular

Como acima mencionado, o CMT1A é o subtipo mais comum de neuropatia hereditária em todo o mundo, sendo causada pela duplicação de 1.4 Mb no cromossomo 17p11.2 (LUPSKI et al., 1991), que resulta em uma trissomia do gene que codifica a proteína da mielina periférica 22 (*PMP22*) (LUPSKI et al., 1992). Reciprocamente, uma deleção desta mesma região cromossômica causa neuropatia hereditária com susceptibilidade a compressão (HNPP) (CHANCE et al., 1993). Rearranjos cromossômicos atípicos já foram identificados para o locus CMT1A/HNPP incluindo duplicações com tamanho diferente de 1.4 Mb, deleções restritas a alguns éxons do gene *PMP22*, duplicações localizadas na região 3' (*upstream*) (VALENTIJN et al., 1993; ZHANG et al., 2010; WETERMAN et al., 2010). Variações na dosagem (duplicação ou deleção de alguns ou todos os éxons) de outros genes CMT-relacionados já foram reportadas como patogênicas e incluem *MPZ*, *MFN2*, *GJB1* e *NDRG1* (HOYER et al., 2011; CARR et al., 2015; AINSWORTH et al., 1998; OKAMOTO et al., 2014). Mais recentemente, mutações localizadas nas regiões não codificadoras foram identificadas como causa frequente de CMTX1 (TOMASELLI et al., 2016).

Por fim, VE complexas têm sido descritas como a alteração da arquitetura cromossômica do locus CMTX1 e a translocação recíproca t(16;17)q(12;p11.2) causando HNPP (ROUGER et al., 1997; NADAL et al., 2000). Mais recentemente, duas inserções complexas foram descritas em associação a CMTX3 e a dHMN1, para os casos de CMTX3 havia uma duplicação de 78 Kb do cromossomo 8q24.3

inserida dentro do locus CMTX3 no cromossomo Xq27.1. Para os pacientes com dHMN1 havia uma duplicação de 1.35 Mb do cromossomo 7q36.3 (2.3 Mb distal ao locus dHMN1) inserida no locus da dHMN no cromossomo 7q36.2 com orientação reversa (Figura 1.7)(DREW et al., 2016; BREWER et al., 2016).

Figura 1.7 – Classe das mutações genéticas e tamanho da variantes estruturais que afetam a arquitetura do DNA

Fonte: elaborado pelo autor.

Conforme discutido anteriormente, a confirmação diagnóstica das doenças genéticas depende da identificação de uma variação patogênica em um dos genes sabidamente causadores de CMT. No entanto, a ausência de uma variante patogênica não exclui o diagnóstico, pois a alteração do material genético pode estar em um *locus* com função e patogenicidade desconhecidas. (BIRD, 2016), ou mesmo o método utilizado para investigação não foi adequado.

Tradicionalmente, a investigação das neuropatias hereditárias é realizada através da análise seriada, na qual genes são testados individualmente e de maneira sequencial. O gene candidato é selecionado com base no fenótipo e no

perfil genético epidemiológico local. A caracterização fenotípica é determinada pela combinação entre os achados clínicos, o padrão de herança e os achados eletrofisiológicos (CMT1, CMT2, iCMT, dHMN, HSN).

Epidemiologicamente como dito o subtipo 1A é o mais comum (MURPHY et al., 2012), sendo que mais de 95% dos casos são causados pela duplicação de uma região com aproximadamente 1.4 milhões de pares de base localizada no cromossomo 17 (17p.11.1-p12) (THOMAS et al., 1997). O gene PMP22 está localizado nessa região e esse rearranjo causa efeito em sua dosagem levando a uma expressão aumentada da proteína codificada por esse gene (RAEYMAEKERS P et al., 1991). Assim, todo caso em que se suspeita de uma neuropatia hereditária em que a velocidade de condução nos membros superiores seja inferior a 38m/s, com padrão de herança autossômico dominante ou mesmo em casos em que a história familiar seja desconhecida o primeiro teste a ser realizado é a dosagem do cromossomo 17p. O restante dos casos (<5%) de CMT1A são decorrentes de mutações de ponto no gene PMP22, o que é denominado em algumas classificações como CMT1E. A alta taxa de positividade nesses genes justifica a abordagem realizada e sugerida por alguns autores de testar inicialmente esses genes (SAPORTA, 2014). No entanto, quando nenhuma mutação é identificada nesses genes o processo de investigação pode ser demorado e de custo elevado.

O próximo passo na investigação das neuropatias hereditárias desmielinizantes, após excluídas alterações de dosagem do cromossomo 17 e mutações de ponto no gene PMP22, deve ser a análise direta dos genes GJB1 e MPZ. Todavia, esses genes apresentam peculiaridades que podem dificultar o diagnóstico. Mutações na região promotora 2 do *GJB1* têm sido reportadas como causa frequente de CMTX1 (TOMASELLI et al., 2017). Como o sequenciamento direto geralmente inclui apenas a região codificadora, a região promotora não é avaliada e mutações patogênicas nessa região não são detectadas. Assim, em casos com fenótipo clássico e padrão de herança ligado ao X, deve-se assegurar que a região promotora tenha sido analisada. Com relação ao gene MPZ há duas situações que exigem atenção. A primeira delas reside no fato de mutações sinônimo serem potencialmente patogênicas a medida que podem alterar a expressão proteica por efeito direto nos sítios de ligação exônica (*splicing sites*) (CORRADO et al., 2016). Classicamente, as variantes sinônimo são consideradas benignas e não predizem alterações com impacto funcional significativo e são

excluídas precocemente nos processos de filtragem. Nos casos em que variantes sinônimo sejam identificadas uma análise cuidadosa com ferramentas de predição computacional devem ser utilizadas. A segunda se deve ao fato de que efeitos de dosagem terem sido relatados como causa de CMT1B (MAEDA et al., 2012). Como o sequenciamento direto não é capaz de identificar essas alterações, algum dos testes acima mencionados, como MLPA, deve ser realizado para análise completa desse gene.

Embora essa abordagem seja atrativa e relativamente eficaz, principalmente para as formas desmielizantes ela acaba sendo desvantajosa quando nenhuma alteração nesses genes é detectada. A introdução à prática clínica das técnicas de sequenciamento de nova geração (painéis multigênicos específicos, sequenciamento de todo exoma e sequenciamento de todo o genoma) causou um grande avanço na investigação das doenças genéticas, permitindo uma análise simultânea de parte ou todo material genômico. Houve uma impressionante redução no tempo necessário para definição diagnóstica e um aumento na eficácia dos testes moleculares disponíveis. Essas técnicas reduziram os custos diretos e indiretos com a investigação molecular. Os custos indiretos estão relacionados ao número de consultas, ao número de exames, aos gastos com transporte e dias perdidos de trabalho pelos pacientes e/ou acompanhantes em acompanhamento.

Infelizmente, quando nenhuma mutação sabidamente patogênica é identificada os resultados necessitam de análise sistemática. Para que se tenha uma idéia do quão desafiador pode ser, cada ser humano possui cerca de 400 variantes potencialmente patogênicas em seu exoma (WRIGHT et al., 2013). Assim, quando se solicita um teste de sequenciamento em larga escala, não raro são encontradas diversas variantes raras e potencialmente patogênicas em mais de um gene. Determinar qual dessas variantes é patogênica é uma nova habilidade que vem sendo necessária aos médicos envolvidos com doenças geneticamente determinadas.

A análise dos dados gerados depende de um conjunto de fatores que incluem: conhecimento e habilidade para determinação fenotípica, conhecimento de bioinformática, acesso a demais integrantes da família do caso índice, compreensão das propriedades moleculares da variante e acesso a registros de sua frequência em controles normais.

O primeira e talvez um dos pontos mais relevantes é a confirmação de que o quadro clínico apresentado pelo paciente corresponde aos fenótipos descritos em associação ao gene em análise (PULST et al, 2017). Por exemplo, uma nova variante missense no gene LITAF (um gene que causa uma forma desmielinizante de neuropatia e possui um número enorme de polimorfismos) é pouco provável que seja causa de uma neuropatia axonal.

Outro ponto, é a análise de segregação de uma variante nova. É importante que indivíduos de diversas gerações, normais e afetados seja examinados e tenham amostras de DNA extraídas. Quando uma variante nova é encontrada no caso índice, e não está presente em um membro da família afetado torna essa variante em um polimorfismo raro (não patogênico). Essa é uma ferramenta extremamente útil e de baixo custo para auxiliar na interpretação de variantes novas. No entanto, é importante manter em mente que alguns genes possuem penetrância incompleta ou ainda são causa de neuropatias com manifestação tardia, podendo assim de ser encontrados em pessoas assintomáticas.

As propriedades moleculares devem ser consideradas. Para tal, existem diversos programas computacionais que simulam o impacto funcional causado pela alteração de um aminoácido na proteína mutada a auxiliam na interpretação. Diversas ferramentas são de uso livre e estão disponíveis na internet como SIFT, Polyphen-2, MutationTaster. Adicionalmente, deve ser considerado o grau de conservação do aminoácido entre diferentes espécies, uma vez que variantes localizadas em resíduos com grande variabilidade entre diferentes espécies tendem a ter pouco ou nenhum impacto funcional e serem benignos.

Finalmente, há diversos bancos de dados que disponibilizam dados referentes ao sequenciamento de todo exoma ou mesmo genoma de pessoas normais (ExAC, EVS, 1000G, GenomAD). A presença de uma variante em algum desses bancos de dados torna pouco provável que essa variante seja a causa de uma neuropatia com padrão de herança autossômico dominante com alta penetrância (BENNETT et al., 2017).

Não há dúvidas de que as técnicas de sequenciamento de nova geração revolucionaram o processo de investigação de CMT e são ferramentas acessíveis na prática clínica. Os painéis multigênicos específicos têm sido as opções que apresentam melhor relação custo-benefício. Com essa técnica um número determinado de genes pode ser sequenciado paralelamente com uma excelente

cobertura. Na Figura 1.8 mostramos o nosso algoritmo de investigação para as neuropatias hereditárias. Pacientes cujo diagnóstico não seja firmado com esse algoritmo são candidatos ao WES.

Figura 1.8 – Algoritmo de investigação das neuropatias hereditárias

VC = velocidade de condução, CMT1 = Charcot-Marie-Tooth tipo 1, CMT2 = Charcot-Marie-Tooth tipo 2, iCMT = Charcot-Marie-Tooth com redução da velocidade de condução na faixa intermediária, NHS = neuropatia hereditária sensitiva, dHMN = neuropatia motora hereditária distal.

Fonte: elaborado pelo autor.

2. OBJETIVO

Avaliar a aplicação de técnicas de sequenciamento de nova geração, especialmente o sequenciamento de todo exoma, para determinação do diagnóstico molecular de famílias com formas Mendelianas de neuropatia hereditária.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PACIENTES

Os pacientes selecionados fazem seguimento ativo no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCRP/USP) no ambulatório de Neurogenética (ANGE) ou na clínica de Neuropatia Periférica do *National Hospital for Neurology and Neurosurgery (NHNN)*, Queen Square, Londres, Reino Unido.

Foram incluídos pacientes com diagnóstico clínico de neuropatia hereditária que foram submetidos a WES ou a painel multigênico específico como estratégia para investigação molecular da causa de sua neuropatia.

3.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos pacientes com diagnóstico clínico de neuropatia hereditária em que:

- a) A neuropatia periférica era pura ou era a manifestação principal;
- b) Não tenha diagnóstico molecular definido;
- c) Tenham concordado em participar do estudo e tenham assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A).

3.1.2 Critérios de não inclusão

Não foram incluídos pacientes que:

- a) Possuíam diagnóstico molecular confirmado;
- b) Casos esporádicos com fenótipo atípico;
- c) Casos esporádicos que apresentassem outras possíveis etiologias para neuropatia, incluindo etilismo crônico (consumo diário de mais de 100 mL de etanol por dia por no mínimo 3 anos) (MELLION et al., 2011); diabetes melitus com controle insatisfatório ($HbA_{1c} \geq 7.5\%$) (JAISWAL et al., 2017), desnutrição, deficiência de vitamina B12, deficiência de ácido fólico, HIV, doenças reumatológicas (ex.: artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, Sjogren, sarcoidose, poliarterite nodosa).
- d) Não concordância com a participação no estudo.

3.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

Todos os pacientes foram submetidos a avaliação neurológica e a estudo eletrofisiológico. As informações obtidas dos pacientes foram extraídas dos prontuários ou coletadas durante a consulta de rotina e incluíam:

- a) Idade no momento da avaliação em anos;
- b) Sexo;
- c) Heredograma;
- d) Queixa inicial;
- e) Idade do início dos sintomas (em anos);
- f) Marcha, (atípica, espástica, com báscula de bacia, com pés caídos);
- g) Sinal de Romberg, (presente, ausente, balanço);
- h) Modalidades sensitivas afetadas (dor, cinético postural e vibratória) e padrão de distribuição (comprimento-dependente x não comprimento-dependente);
- i) Força muscular (Escala MRC – *Medical Research Council Scale*), (<https://mrc.ukri.org/research/facilities-and-resources-for-researchers/mrc-scales/mrc-muscle-scale>);
- j) Trofismo muscular (eutrofico x atrófico);
- k) Tônus, (aumentado, normal, diminuído);
- l) Reflexos osteotendíneos profundos (Aumentados, normais, diminuídos, ausentes);
- m) Reflexo cutâneo plantar (flexão, extensão, indiferente);
- n) Escala de gravidade do CMT, a CMTNS2 (Anexo B).

A queixa inicial do paciente foi considerada como o primeiro sintoma a ser notado pelo paciente ou por familiares e incluíam queixas como dificuldade de marcha, fraqueza, perda da sensibilidade, quedas frequentes e pés tortos.

O padrão de marcha foi avaliado em todos os pacientes capazes de deambular e foram classificadas conforme abaixo:

- a) Atípica quando tida como normal, ou quando nenhuma característica marcante fosse identificada;
- b) Espástica quando apresentava base estreita, passos curtos e cruzados;
- c) Pés caídos (escarvante), quando o paciente erguia a perna acima do esperado e com diminuição da dorsiflexão dos artelhos;

d) Com báscula de bacia, marcha com base alargada associado a rotação exagerada da pélvis.

Ao exame foram avaliadas as seguintes modalidades sensitivas: vibratória, dor e cinético postural. A sensibilidade vibratória foi avaliada com utilização de diapasão de 128Hz e quando alterada foi também avaliada com diapasão quantitativo de Rydel-Seiffer (PANOSYAN, 2016). Os resultados foram registrados nos membros superiores e inferiores, sendo considerado valor de normalidade maior ou igual a 5.

A CMTNS2, escala de graduação da neuropatia relacionada ao CMT segunda versão,  uma escala criada como marcador de severidade e como medida de progressão da doença e foi aplicada a todos os pacientes. Ela é calculada com base no somatório dos pontos obtidos entre os sintomas referidos (CMTSS, *CMT Symptom Score*), os sinais observados (CMTES, *CMT Examination Score*) e os achados eletrofisiológicos (CMTNS2, *CMT Neuropathy Score version 2*). Quanto menor o número menos grave  a doença e vice versa. Nessa escala, pessoas com pontuação no CMTNS2 menor ou igual a 10 são classificados como comprometimento leve, de 11 a 20 com comprometimento moderado e maior que 20 com comprometimento grave (MURPHY, 2011).

3.3 LABORATÓRIO

Foram coletadas amostras de sangue periférico para extração de DNA e para realização de exames para avaliar causas que poderiam causar neuropatia ou poderiam estar modificando o fenótipo.

3.3.1 Triagem laboratorial

Os seguintes exames foram realizados em todos os pacientes: hemograma completo, glicemia, hemoglobina glicosilada, TSH, lipidograma, vitamina B12, cido fólico, velocidade de hemossedimentação e proteína C reativa.

3.3.2 Extração e quantificação de DNA

Todos os pacientes foram submetidos a coleta de sangue periférico para extração de DNA. O DNA foi extraído no laboratório de Neurogenética da FMRP ou no laboratório de Neurogenética do *National Institute for Neurology and Neurosurgery, UCL* (ION). Cada instituto realizou a extração com seu método (Apêndice A). A quantificação do DNA foi realizada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop® com software ND-2000 (Apêndice A).

3.3.3 Desenho dos primers e reação em cadeia polimerase (PCR)

Para desenho dos *primers* foi utilizando o software Primer 3, versão 4.1.0¹. Para os *primers* obtidos foram aplicadas ferramentas adicionais para garantir a eficácia e a especificidade dos *primers* (Apêndice A).

As reações de PCR foram realizadas utilizando AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA), com DNA a uma diluição 10pmol/μL, com uma temperatura de anelamento de 58°C (Apêndice A).

3.3.4 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese do DNA em gel de agarose foi realizada para verificar a qualidade e o tamanho do produto amplificado. O gel foi preparado utilizando agarose ultrapura e solução TBE 1X. Foram homogeneizados 3μL do produto obtido da PCR e 3μL de corante laranja e aplicados a cada célula em uma cuba de eletroforese horizontal. Um marcador de DNA foi corrido paralelamente em uma das células (tamanho médio 100-200 bp). Os fragmentos de DNA foram visualizados utilizando um transiluminador UV (Apêndice A).

3.3.5 Purificação do produto obtido com a PCR

¹ Disponível em: <<http://primer3.ut.ee>>. Acesso entre 2015 e 2018.

² Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/CcidsBrowse.cgi>>. Acesso entre 2015 e 2018.

³ Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq>>. Acesso entre 2015 e 2018.

⁴ Disponível em: <<http://bioinformatics.org>>. Acesso entre 2015 e 2018.

Essa etapa é realizada para limpeza do material amplificado pela PCR. O material amplificado foi purificado pelo método enzimático (*ExoSAP-ITTM Product, Thermo Fisher Scientific*). Essa etapa hidrolisa o excesso de primers e nucleotídeos em uma única etapa, purificando assim as amostras para que sejam utilizadas na etapa de sequenciamento do DNA (Apêndice A).

3.3.6 Reação de sequenciamento

O objetivo dessa etapa foi sintetizar o DNA complementar do produto da PCR para que fossem confirmadas as variantes identificadas através das NGS (Apêndice A). As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando *BigDye Terminator v3.1, Sequencing Buffer*, primers *forward* ou *reverse* e o produto purificado da PCR (Apêndice A). Os fragmentos de DNA foram separados no sequenciador automático ABI3730XL (*Applied Biosystems*). As sequências resultantes foram analisadas com software *SeqScape v2.5 (Applied Biosystems, Foster, CA, EUA)*.

3.3.7 Purificação do material para Sequenciamento

A purificação do material para sequenciamento foi realizado utilizando solução hidratada de *Sephadex* sobre placas com filtro de fibra de vidro (0.66 mm) (Apêndice A). Essa etapa é realizada para remover pequenas moléculas contaminantes como proteínas e melhorar a qualidade do sequenciamento.

3.4 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

WES foi realizado no (1) centro de Medicina Genômica (CMG) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP), Ribeirão Preto, Brasil, no (2) Instituto John P. Hussman, Faculdade de Medicina Miller, Universidade de Miami, Miami, EUA (*John P. Hussman Institute, Miller School of Medicine, University of Miami, Miami, USA*) no (3) Laboratório de Neurogenética do Instituto Nacional de Neurologia e Neurocirurgia (*National Hospital for Neurology and Neurosurgery, University College London, UCL, Queen Square (ION)*).

Os exomas realizados no CMG foram realizados utilizando o *Nextera Rapid Capture Exome Kit* (Illumina) e sequenciados na plataforma *NextSeq 500 Illumina*.

Os exomas realizados no ION foram realizados utilizando o Nextera (Illumina) e foram sequenciados na plataforma *Illumina HiSeq 2000*.

Os exomas realizados no *John P. Hussman Institute for Human Genomics, University of Miami School of Medicine*, foram realizados utilizando o *SureSelect Human All Exon V5 capture kit (Agilent)* e sequenciados na plataforma *Illumina HiSeq 2000*.

Como regra geral, todos os kits utilizados possuem cobertura superior a 90% dos exons dos genes incluídos na última versão do CCDS (Consenso para identificar as regiões codificadoras do DNA humano e de camundongos)² e no banco de dados das sequências de referência – RefSeq³.

3.4.1 Pipeline para preparação dos dados para análise

Os exomas analisados nessa tese foram organizados com base nos pipelines criados por cada instituição.

As sequências obtidas das leituras (100 bp *paired-end reads*) na plataforma Illumina do CMG e do Instituto John P. Hussman foram mapeadas ao genoma humano de referência hg19 (GRCh37; UCSC *genome browser*) utilizando a ferramenta *Burrows-Wheeler Aligner*⁴ (versão 0.7.10)⁴ (BWA) (LI, 2009). A recalibração das bases e a remoção de PCR duplicatas foi realizada utilizando a ferramenta Picard⁵. A nomeação de variantes e o realinhamento de indels foram realizados utilizando a ferramenta *FreeBayes* (GARRISON, 2012). Todas as variantes foram submetidas ao SeattleSeq⁶ para anotação. Os arquivos VCF foram importados na plataforma Genesis para análises subsequentes e priorização de variantes (Figura 2.1)⁷ (GONZALES, 2015).

As sequências de leitura obtidas (100 bp *paired-end reads*) na plataforma Illumina do ION, Queen Square, Londres e do CMG, HCRP/USP foram mapeados ao genoma humano de referência, hg19 (GRCh37; UCSC *genome browser*) pelo software Novoalign (Novocraft Inc). Após remoção das PCR duplicadas (Picard,

² Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/CcdsBrowse.cgi>>. Acesso entre 2015 e 2018.

³ Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq>>. Acesso entre 2015 e 2018.

⁴ Disponível em: <<http://bio-bwa.sourceforge.net>>. Acesso entre 2015 e 2018.

⁵ Disponível em: <<http://broadinstitute.github.io/picard>>. Acesso entre 2015 e 2018.

⁶ Disponível em: <<http://snp.gs.washington.edu>>. Acesso entre 2015 e 2018.

⁷ Disponível em: <<https://genomics.med.miami.edu>>. Acesso entre 2015 e 2018.

<http://broadinstitute.github.io/picard/>) e das sequências sem nenhum mapeamento. As variantes foram extraídas utilizando a ferramenta Samtools e foram filtradas de acordo com os seguintes critérios CQ >30, Phred > 30 e qualidade de mapeamento > 30. Essas variantes foram então anotadas utilizando o software ANNOVAR. Os arquivos VCF foram convertidos em arquivos excel para análise (Figura 2.2) (Apêndice B).

Figura 2.1 – Esquema do pipeline utilizado para análise das sequências obtidas no *John P. Hussman Institute for Human Genomics*

A coluna da esquerda indica cada programa utilizado na preparação dos dados em cada etapa. A coluna central indica a etapa da análise. A coluna da direita demonstra o formato dos dados obtidos em cada etapa.

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 2.2 – Esquema do pipeline utilizado para análise das sequências obtidas no CMG e no ION

A coluna da esquerda indica o programa utilizado na preparação dos dados em cada etapa. A coluna central indica a etapa da análise. A coluna da direita demonstra o formato dos dados obtidos em cada etapa.

Fonte: elaborado pelo autor.

3.5 FILTRO DAS VARIANTES

Estima-se que 85% das variações patogênicas do genoma humano envolvam as regiões codificadoras. Assim, como os genes codificadores de proteínas constituem aproximadamente 2% do genoma humano e abrigam a maioria das mutações causadoras de doenças eles representam regiões alvo para análise (NG, 2010). Assim, a primeira filtragem realizada foi a de remover variantes localizadas em regiões intrônicas, intergênicas, ncRNA, UTR3' e UTR5' e as variantes com baixa qualidade genotípica.

Após o processamento de bioinformática um WES padrão identifica aproximadamente 20-24 mil SNVs localizados em éxons. Dessas, mais de 95% são polimorfismos conhecidos. (Tabela 2-1) (BAMSHAD, 2011).

Tabela 2-1 – Número médio de variantes nas regiões codificadoras. Modificado de Bamshad, 2011

Tipo de variação	Número médio de variantes na população Afro-Americana	Número médio de variantes na população Europeia
Variantes novas		
<i>Missense</i>	303	192
<i>Nonsense</i>	5	2
Sinônimo	209	109
<i>Splice</i>	2	2
Total	520	307
Variantes conhecidas		
<i>Missense</i>	10.828	9.319
<i>Nonsense</i>	98	89
Sinônimo	12.776	10645
<i>Splice</i>	36	32
Total	23.529	19.976

Fonte: Traduzido de Bamshad, 2011.

Como podemos ver nessa tabela acima, mesmo excluindo as variantes localizadas nas regiões não codificadoras há ainda um enorme número de variantes o que dificulta a identificação de alelos relacionados à doença, uma vez que devemos identificar a variante patogênica em meio a milhares de polimorfismos e erros relacionados ao sequenciamento. Nesse contexto, um dos filtros mais eficientes é o uso de dados disponíveis nos bancos de polimorfismos⁸, pois apenas uma pequena fração (cerca de 2%) dos SNVs identificados em um indivíduo são novos. Utilizando apenas esse critério de filtragem são excluídas aproximadamente 98% das variantes identificadas nas regiões codificadoras (aproximadamente 19.600 variantes).

Entretanto, se deve ter cuidado com esse filtro por dois motivos. Primeiro, embora raro, os bancos de dados possuem um número pequeno de alelos patogênicos, assim uma variante patogênica pode ser classificada como benigna. Segundo a filtragem dos alelos presentes na população normal em uma frequência superior a frequência alélica (MAF) estipulada pode eliminar alelos verdadeiramente patogênicos que segregam na população geral em frequências baixas. Isso é particularmente relevante para transtornos recessivos, nos quais o estado heterozigoto não resultará em um fenótipo que o excluiria de uma população controle (ExAC, GenomAD, EVS, etc). No entanto, para análise de raros distúrbios

⁸ Disponível em: (Genome1000) <<http://www.internationalgenome.org/1000-genomes-browsers/>>; (EVS) <<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>>; (ExAC) <<http://exac.broadinstitute.org/>>; (genomAD) <<http://gnomad.broadinstitute.org/>>. Acesso entre 2015 e 2018.

recessivos e dominantes se define a frequência alélica mínima (MAF) para 1% e 0,1% respectivamente.

3.5.1 Avaliação da Patogenicidade das variantes

Filtros adicionais foram utilizados com intuito de priorizar as variantes com maior probabilidade de justificarem o fenótipo apresentado pelos pacientes.

Tipo de variante – Variantes *nonsense* têm maior probabilidade de serem deletérias uma vez que causam perda da função da proteína codificada pelo gene mutado (BOTSTEIN, 2003). Essa colocação é válida para genes recessivos e para genes haploinsuficientes (MACARTHUR, 2010).

Informações sobre o gene – As informações biológicas ou funcionais existentes sobre o gene como: função em uma via biológica ou suas interações com genes ou proteínas que são conhecidos por causar um fenótipo semelhante, expressão da proteína nos diferentes tecidos, relatos de associação fenotípica (OMIM).

Consevação – Existem diversas ferramentas que quantificam o grau de conservação dos nucleotídeos e dos aminoácidos entre diferentes espécies. Regiões de genes e genomas nos quais as mutações são deletérias tendem a mostrar alto grau conservação. As ferramentas utilizadas para avaliar o grau de conservação das variantes identificadas foram: phastCONS24, phyloP e Genetic Evolutionary Rate Profiling (GERP) (COOPER et al, 2010). Assim, variantes com alto escore de conservação têm maior probabilidade de efeito deletério.

Análise computacional (*in silico*) – Há diversas ferramentas computacionais capazes de prever o impacto funcional de uma SNV não sinônima na função da proteína mutada. Essas ferramentas se baseiam nas alterações bioquímicas geradas pela variante (restrições impostas às mudanças de aminoácidos em diferentes regiões de uma proteína, verificando a extensão da conservação da sequência entre as espécies), sua presença nos bancos de dados de populações normais e o grau de conservação. Essas ferramentas geram um escore que prevê a probabilidade de uma variante ser patogênica ou benigna. SIFT, Polyphen, Polyphen2, MutationTaster (KUMAR et al., 2009; SCHWARTZ et al., 2010; ADZHUBEI et al., 2010; ADZHUBEI et al., 2012), Cada um desses métodos têm uma sensibilidade estimada de 80-90% e especificidade de 70-85% para distinguir

mutações conhecidas de polimorfismos conhecido (TCHERNITCHKO et al., 2004; GONZALEZ-PEREZ et al., 2011).

Padrão de herança – O padrão de herança acrescenta um novo mecanismo de filtragem. Em distúrbios recessivos, se excluem as variantes em heterozigose, deixando conseqüentemente menos variantes candidatas, pois geralmente o genoma humano apresenta 50x menos variantes bialelicas.

Finalmente as listas de variantes filtradas obtidas são analisadas de acordo com os genes associados com neuropatia hereditária ou a neuropatias/neuronopatias complexas (Figura 2.3). As variantes identificadas com confirmadas por sequenciamento Sanger e são testadas quando a segregação nas famílias.

Figura 2.3 – Etapas utilizadas para filtragem de mutações relacionadas a neuropatia hereditária

Fonte: elaborado pelo autor.

3.6 MAPA DE CONSERVAÇÃO DO AMINOÁCIDO ENTRE DIFERENTES ESPÉCIES

O estudo da condução foi realizado utilizando as técnicas convencionais. O potencial de ação muscular composto (PAMC) foi registrado na maioria dos casos nos nervos medianos, ulnares, peroneiros e tibiais e os potenciais de ação sensitivos (PAS) foram obtidos, na maioria dos casos, dos nervos medianos, ulnares, radiais, fibulares superficiais e surais (Apêndice C).

3.7 BIÓPSIA DE NERVO

Quando disponível a biópsia de nervo foi revisada. Alguns pacientes foram submetidos a biópsia de nervo previamente a serem encaminhados ao ambulatório de neurogenética ou para excluir a possibilidade de uma neuropatia inflamatória sobreposta.

3.8 COMITÊ DE ÉTICA

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (Processo HCRP nº 12219/2004) e pelo comitê de ética do NHNN REC 09/H0716/61.

3.9 FINANCIAMENTO

Parte do estudo foi desenvolvido no NHNN, Londres. Durante 24 meses, as atividades desempenhadas na instituição destino foram supervisionadas pela Prof Dra Mary M. Reilly. A estadia em Londres por 12 meses foi financiada pela Capes, através do programa Ciências Sem Fronteiras na modalidade Doutorado Sanduíche Processo 205854/2014-1 e houve a extensão de 12 meses no programa com financiamento pelo *National Institutes of Neurological Diseases and Stroke and office of Rare Diseases*, Reino Unido.

4. RESULTADOS

4.1 PACIENTES

Foram incluídos 30 pacientes com diagnóstico de neuropatia periférica hereditária de acordo com os critérios previamente definidos, sendo 19 pacientes em seguimento no ANGE, Ribeirão Preto, Brasil e 11 pacientes em seguimento no ambulatório de Neuropatia Periférica do NHNN, Londres, Inglaterra. Os pacientes em seguimento no ANGE foram sequenciados no CMG, no Instituto John P. Hussman de Genética Humana, Miami ou no ION. Todos os pacientes em seguimento no NHNN foram sequenciados no ION.

Os pacientes foram classificados em CMT1 (3), CMT2 (12), iCMT (8), dHMN (4) e HSN (3) baseado na história clínica, achados de exame físico e padrão observado no estudo da condução. A Tabela 3-1 resume os principais dados.

A Figura 3.1 sumariza a distribuição dos pacientes de acordo com o subtipo de CMT, o tipo de teste realizado e o local em que sequenciamento foi realizado. Quando divididos em subtipos temos 3 pacientes com CMT1 (2 brasileiros e 1 inglês), 12 pacientes com CMT2 (6 brasileiros e 6 ingleses), 8 iCMT (6 brasileiros e 2 ingleses), 4 dHMN (2 brasileiros e 2 ingleses) 3 HSN (2 brasileiros e 1 inglês).

Dos 30 casos incluídos no estudo, foram encontradas 13 variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas (43.3%) e 1 (3.3%) variante de significado indeterminado. Essas variantes serão discutidas em detalhes nas sessões subsequentes.

Tabela 3-1 – Sumário das características clínicas

Fenótipo_ID	Lab	Origem	Gen.	Idade de início	Idade na avaliação	Sintoma inicial	Característica adicional	PH	Cons	CM (LMD/Amp/VC)
CMT1_F1	CMG	BRA	M	14	19	Fraqueza nas mãos	Nenhuma	E	N	2.6/7.3/37
CMT1_F2	ION	RU	F	5	23	Dificuldade de marcha	Exclusivo motor	E	S	6.4/2.2/28
CMT1_F3	Miami	BRA	M	<10	55	Dificuldade de marcha	Nenhuma	AR	S	6.4/2.7/21.9
CMT2_F1	CMG	BRA	M	3	18	Dificuldade de marcha e quedas	Não comprimento dependente, subluxação quadril, escoliose grave	E	S	2.1/4.5/50
CMT2_F2	Miami	BRA	M	7	23	Dificuldade de marcha e quedas	Nenhuma	E	S	2.4/3.7/54
CMT2_F3	ION	RU	M	<10	14	Dificuldade de marcha	Paralisia CV, RM anormalidades SB	E	N	1.4/46.6**
CMT2_F4	ION	RU	M	11	24	Fraqueza nas mãos	Predomínio MMSS	E	N	5.2/8.2*
CMT2_F5	ION	RU	M	<10	21	Dificuldade de marcha	Espasticidade e TEA	E	N	3.6/8.3/51
CMT2_F6	Miami	BRA	F	1	22	Quedas frequentes	Surdez, ataxia, MOE	E	N	3.3/0.6/55.7
CMT2_F7	ION	RU	M	14	18	Dificuldade de marcha	Nenhuma	AR	S	3.3/4.2/52
CMT2_F8	ION	RU	F	40s	48	Dificuldade de marcha	Início tardio	AR	N	2.7/2.7/50
CMT2_F9	Miami	BRA	F	11	48	Dificuldade de marcha e quedas frequentes	Nenhuma	XL	S	3.5/4.1/48
CMT2_F10	CMG	BRA	M	55	65	Perda da sensibilidade em pés	Assimetria	E	N	2.6/6.5/53.8
CMT2_F11	Miami	BRA	F	1	8	Perda do equilíbrio	Ataxia cerebelar	AR	S	2.5/07/45.7
CMT2_F12	ION	RU	F	<1	27	Hipotonia	Disautonomia TGI	E	S	ND
iCMT_F1	Miami	BRA	F	8	21	Dificuldade de marcha e quedas frequentes	Nenhuma	AR	S	2.8/9.4/38.9
iCMT_F2	Miami	BRA	M	40s	48	Dificuldade de pegar objetos	Nenhuma	AR	S	2.8/7.6/42.1
iCMT_F3	ION	BRA	F	6	22	Dificuldade de marcha	Paralisia facial grave	E	N	3.9/3.98/45.8
iCMT_F4	CMG	BRA	M	40	43	Dificuldade para correr	Atividade agulha	AR	S	2.1/5.1/43.2
iCMT_F5	Miami	BRA	M	12	25	Dificuldade de marcha	Nenhuma	AR	S	2.1/5.3/44.7
iCMT_F6	Miami	BRA	M	3	28	Dificuldade de marcha	Involução cognitiva, espasticidade	E	S	3.8/3.4/43.3
iCMT_F7	ION	RU	M	Adol.	35	Entorses e perda de equilíbrio	Tremor	AD	N	3.3/9.4/43
iCMT_F8	Miami	BRA	F	36	36	Dor em mãos	Nenhuma	E	N	3.2/5.3/38.4
dHMN_F1	ION	RU	F	Adol.	31	Dificuldade de marcha	Liberção piramidal	E	N	3.6/14.6/61
dHMN_F2	ION	RU	M	8	17	Dificuldade de marcha	Nenhuma	E	N	M3.6/4.9/55**
dHMN_F3	CMG	BRA	M	10	11	Dificuldade de marcha	CPK 450, ?DI	E	S	2.7/2.62/47.1
dHMN_F4	CMG	BRA	M	16	21	Dificuldade de marcha	Predomínio MMII	E	N	1.9/7.1/59
HSN_F1	ION	RU	M	<10	35	Hipoestesia e deformidades articulares	Úlceras recorrentes na face	AD	N	3.5/7.8/60
HSN_F2	ION	BRA	M	1	4	Insensibilidade a dor	Amputações e úlceras recorrentes	E	N	Indisponível
HSN_F3	ION	BRA	F	13	21	Pandisautonomia	Nenhuma	E	N	2.3/9.4/52

Fonte: elaborado pelo autor.

* PAMC do nervo ulnar estava ausente, sendo realizado estudo de nervo axilar. ** Nervo mediano. ID = identificação, Lab = laboratório em que foi sequenciada a amostra, PH = padrão de herança, Cons = Consanguinidade, CM = condução sensitivo e motora, LMD = latência motora distal, Amp = amplitude, VC = Velocidade de condução, BRA = Brasil, RU = Reino Unido, M = Masculino, F = Feminino, E = esporádico, N = Não, S = Sim, CPK = creatino kinase, RM = ressonância magnética, SB = substância branca, MMSS = Membros superiores, MMII = Membros inferiores, MOE = Motilidade ocular extrínseca, TEA = Transtorno do Espectro Autista, DI = Deficiência Intelectual, Adol. = Adolescência, TGI = trato gastrointestinal, ND = não detectado.

Figura 3.1.– Organograma mostrando o número total de amostras e sua distribuição conforme o local em que cada amostra foi sequenciada e o fenótipo

Fonte: elaborado pelo autor.

4.1.1 CMT1

4.1.1.1 Caso CMT1_F3

Procedência: Brasil.

Local de sequenciado: Miami.

Paciente com quadro de dificuldade de marcha e quedas frequentes desde a primeira década de vida. Seus pais eram consanguíneos e negavam qualquer sintoma neurológico. Tem sete irmãos, dos quais 3 afetados (2 homens e 1 mulher)(Figura 3.2). Nunca foi capaz de correr e sempre teve desempenho ruim nos esportes. O quadro foi lentamente progressivo ao longo dos anos. Aos 50 anos passou a notar perda de sensibilidade nos membros inferiores. Aos 52 anos passou a notar dificuldade com equilíbrio e passou a apresentar quedas eventuais.

Figura 3.2 – Heredograma da família CMT1_3

Fonte: elaborado pelo autor.

Ao exame físico, realizado aos 55 anos de idade, apresentava marcha com pés caídos bilateralmente. Incapaz de ficar na pontas dos pés, calcâneos ou mesmo fazer marcha em tandem. Sinal de Romberg ausente. Nervos cranianos normais. Apresentava hipotrofia nos músculos distais das mãos e dos pés. Presença de tremor postural de leve a moderada intensidade nos membros superiores. No exame

de força os músculos proximais dos membros superiores e inferiores eram normais (grau 5) e os distais estavam com força reduzida. Os músculos primeiro interósseo dorsal (1ID) e abdutor do dedo mínimo (ADM) eram 4-, a músculo abdutor curto do polegar (APB) era 3, a dorsiflexão dos pés 4- e a flexão plantar era grau 4. Seus reflexos osteotendíneos profundos estavam globalmente abolidos. Os reflexos cutâneos plantares eram indiferentes. A sensibilidade dolorosa era diminuída até terço distal das pernas. A sensibilidade vibratória era alterada até os tornozelos e a sensibilidade proprioceptiva era normal. O CMTNS2 foi de 15.

O estudo eletroneuromiográfico evidenciou prolongamento das latências motoras distais, redução das amplitudes, redução das velocidades de condução e prolongamento das ondas F. No estudo da condução sensitiva apenas o potencial de ação sensitiva (PAS) do nervo radial foi detectado e apresentava amplitude acentuadamente reduzida e conduzindo de maneira alentecida (Tabela 3-2). Os nervos mediano e tibial apresentaram prolongamento da duração de seus potenciais de ação muscular compostos (PAMC) com perda da morfologia habitual (Figura 3.3).

Tabela 3-2 – Estudo da condução sensitiva e motora do paciente CMT1_F3

Estudo da condução						
	PAMC (mV)	VCM (m/s)	LMD (ms)	Onda F (ms)	PAS (μV)	VCS (m/s)
Nervo Mediano	0.3	24.9	9.3	104.4	Ausente	-
Nervo Ulnar	2.7	21.9	6.4	114.4	Ausente	-
Nervo Radial	-	-	-	-	1.4	33.5
Nervo Peroneiro	Ausente	-	-	-	-	-
Nervo Fibular superficial	-	-	-	-	Ausente	-
Nervo Tibial Posterior	0.18	20.2	7.5	-	-	-
Nervo Sural	-	-	-	-	Ausente	-

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 3.3 – Potencial de ação muscular

Potencial de ação muscular composto dos nervos mediano direito e ponto nos genes *PMP22*, *MPZ* e tibial posterior direito do paciente CMT1_F3, evidenciando prolongamento da duração e perda da morfologia habitual

Fonte: acervo do setor de neurofisiologia do HCRP-USP.

Anormalidades na dosagem do cromossomo 17 e mutações de ponto nos genes *PMP22*, *MPZ* e *GJB1* haviam sido excluídas. O WES evidenciou uma mutação *nonsense* (*Stopgain*) em homozigose no gene *SH3TC2* (Transcrição ENST00000512049.1, RefSeq NM_024577.3, c.2839C>T; p.Arg947Ter). Essa variante está presente no GenomAD em uma frequência total de 0.051% (16/30960), porém nenhuma em homozigose. Esta variante é nova e a análise *in silico* prediz a interrupção prematura da tradução proteica pela criação de um códon de parada. Variantes *stopcodon* em resíduos próximos p.Tyr943Ter e p.Arg954Ter foram reportadas previamente em diversos trabalhos como patogênicas (SENDEREK et al., 2003; AZZEDINE et al., 2006; BAETS et al., 2011; LASSUTOVA et al., 2011; LUPSKY J et al., 2010; MANGANELLI et al., 2014). Essa variante foi classificada como patogênica.

4.1.2 CMT2

4.1.2.1 Caso CMT2_F3

Procedência: Inglaterra.

Local de sequenciado: ION.

Paciente é o quinto filho de uma prole de 5, de pais saudáveis e não consanguíneos (Figura 3.4). Sua gestação transcorreu sem intercorrências e seu parto ocorreu sem complicações. Apresentou atraso no desenvolvimento motor: andou com 2 anos de idade. Aos 18 meses de idade, os pais notaram que o tônus de seus membros inferiores era diminuído. O quadro de fraqueza era nitidamente mais evidente distalmente nos membros inferiores, e com o passar do tempo foi progredindo lentamente. Aos 4 anos de idade passou a necessitar do uso de órteses para deambular e aos 13 anos de idade ficou restrito a cadeira de rodas. Os seus membros superiores foram acometidos desde os 4 anos. Negava alterações de sensibilidade ou alterações esfincterianas.

Figura 3.4 – Heredograma da família CMT2_F3

Fonte: elaborado pelo autor.

Ao exame físico, realizado aos 17 anos, com paciente restrito a cadeiras de rodas. Apresentava paresia facial bilateral associado a ptose discretamente assimétrica (direita maior que esquerda). Seu discurso era bem articulado, porém o volume era baixo e apresentava certo grau de rouquidão (avaliação com otorrinolaringologista confirmou se tratar de uma paralisia de corda vocal). Apresentava cifoescoliose acentuada. Apresentava hipotrofia acentuada nos membros superiores a partir dos ombros e desde as coxas nos membros inferiores. Sua força era grau 4 para flexão do braço, grau 0 para extensão do punho e extensão dos dedos. A extensão do quinto dedo da mão esquerda era grau 3, com todos os grupo musculares grau 0. Nos membros inferiores a força proximal era 2 para flexão do quadril a direita e 1 a esquerda, a extensão dos quadris era grau 4 bilateralmente e restante era grau 0. Os reflexos osteotendíneos eram abolidos

difusamente, exceto o tricipital direito que estava presente com manobra de reforço. Os reflexos cutâneos plantares eram indiferentes. O exame da sensibilidade dolorosa era normal, a sensibilidade vibratória era alterada até joelhos e normal nos membros superiores.

Aos 3 anos de idade ele foi submetido ao estudo eletrofisiológico em outro serviço que evidenciou nervo mediano com amplitude de 1.4 mV e VC de 42.6 m/s e latência distal normal. O nervo radial sensitivo não foi detectado. O CMTNSv2 foi de 26. O exame físico e o estudo da condução sensitivo e motora dos pais foi normal.

O sequenciamento direto dos genes PMP22, MFN2, NEFL, EGR2, GJB1, PRX e LMNA foi normal. WES identificou uma mutação em heterozigose composta no gene GDAP1 (Transcrição ENST00000220822.11, RefSeq NM_018972 (c.355C>A, c.487C>T; p.Pro119Thr, p.Gln163Ter). A variante p.Pro119Thr é nova e não está presente nos bancos de dados GenomAD, EVS, dbSNP, ExAC e 1000 Genoma. Está localizada em um local conservado (PhyloP100=7,2 e PhastC=1). A análise *in silico* prediz essa variante possui efeito patogênico (*Mut-assessor: high; Mut-taster: diseasecausing; Polyphen2=possibly-damaging; SIFT:pathogenic, LRT:deleterius*). A mutação *missense (stopgain)* p.Gln163Ter foi publicada previamente em diferentes trabalhos como patogênica (CLARAMUNT et al., 2005; CUESTA et al., 2002; SEVILLA et al., 2008; SILVERA et al., 2013). A variante nova foi considerada como provavelmente patogênica e em associação a mutação previamente publicada justifica o fenótipo observado nesse paciente.

4.1.2.2 CASO CMT2_F5

Procedência: Inglaterra.

Local de sequenciado: ION.

Paciente masculino, segundo filho de pais saudáveis e não consanguíneos (Figura 3.5). Parto a termo, sem intercorrências. Apresentou atraso no desenvolvimento motor. Aos 3 anos de idade, seus pais notaram que ele interagiu pouco com outras crianças e a época foi diagnosticado com transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH). No entanto, com o passar dos anos, surgiram novos sintomas, como dificuldade significativa na escrita e na fala. Dentro desse

contexto, seu diagnóstico foi revisto e firmado como transtorno do espectro autista (TEA).

Figura 3.5 –Heredograma da família CMT2_F5.

Fonte: elaborado pelo autor.

Nos anos subsequentes a dificuldade de marcha ficou mais evidente e os pais puderam perceber que ele apresentava entorses frequentes e que tinha desempenho ruim nas atividades físicas que não se poderia explicar exclusivamente pelo TEA (como se atribuía previamente).

Ao exame físico (aos 20 anos de idade) apresentava marcha espástica com inversão dos pés, *pes cavus*, atrofia distal da musculatura intrínseca dos pés e fraqueza para flexão dorsal dos pés. Não apresentava alterações esfinterianas. Os reflexos osteotendíneos profundos eram normais nos membros superiores e patologicamente exaltados nos membros inferiores. O reflexo cutâneo plantar era extensor bilateralmente. Na avaliação sensitiva havia uma hipopalestesia até o nível dos tornozelos bilateralmente com preservação das demais modalidades.

O estudo da condução, realizado aos 18 anos de idade, evidenciou uma neuropatia sensitivo e motora primariamente axonal, com padrão de distribuição comprimento-dependente (Tabela 3-3). O CMTNEv2 nessa ocasião foi de 7.

Tabela 3-3 – Estudo da condução sensitivo e motora doEsse paciente CMT2_F5

Condução sensitiva				
	Direita		Esquerda	
	Amplitud e (μ V)	Velocidade de condução (m/s)	Amplitude (μ V)	Velocidade de Condução (m/s)
Mediano	10	50	11	49
Ulnar	7	52	5	48
Radial	11	55	11	58
Sural	Ausente	-	Ausente	-
Fibular superficial	Ausente	-	Ausente	-

Condução Motora				
	Latência (ms)	Amplitude (mV)	Velocidade de condução (m/s)	Onda F (ms)
Mediano (APB)	3.6	9.7	50	30
Ulnar (ADM)	3.0	8.3	51	31
Peroneiro comum (EDB)	Ausente	-	-	-
Tibial posterior (AHL)	5.0	0.3	34	Ausente

Estudo da condução sensitivo e motora do paciente CMT2_F5. ms = milissegundos; mV = milivolts; m/s = metros por segundo; μ V = microvolt; APB = *abductor pollicis brevis*; ADM = *abductor digiti minimi*; EDB = *extensor digitorum brevis*; AHL = *abductor hallucis*.

Fonte: elaborado pelo autor.

Esse paciente havia sido submetido ao sequenciamento do painel para CMT2 e nenhuma mutação patogênica havia sido detectada. O WES do caso índice, conforme explicado anteriormente. Obedecendo aos critérios de filtragem estabelecidos foram identificadas:

- 1 variante em heterozigose no gene associado a CMT2Q (DHTKD1);
- 3 variantes em heterozigose em genes recessivos (LYST, PLEKHG5 e NEB);

- 1 variante no gene KIF1A associado a HSN2C e HSP 30.

O sequenciamento direto da variante identificada no gene DHTKD1 confirmou que ela estava presente no caso índice, porém também estava presente no pai assintomático. As variantes identificadas em heterozigose em genes recessivos foram descartadas.

O sequenciamento direto da variante nova no gene KIF1A (c.38G>A; p.Arg13His) (Transcrição ENST00000498729.7, RefSeq NM_001244008.1) do caso índice e de seus pais demonstrou que era uma variante *de novo*. Esse nucleotídeo é altamente conservado entre diferentes espécies e entre diferentes membros da família kinase de proteínas [1(KIF5B), 2(KIF3A e KIF17), 3(KIF1A) e 5(KIF11)] (Figura 3.6). Evidências adicionais que deram suporte a patogenicidade desta variante foram: grau de conservação, análise *in silico* (*MutationTaster*, *Polyphen-2* e *SIFT* predisseram a variante como patogênica), e o fato de não estar presente nos bancos de dados de populações normais (dbSNP, EVS, Projeto 1000 Genomas, GenomeAD e ExAC). Foi feita uma análise adicional direcionada a genes relacionados com TEA e não foram identificadas variantes em genes conhecidos. Adicionalmente, essa mutação, p.Arg13His, está localizada em um sítio de ligação de ATP, um local necessário para hidrólise do ATP e geração de energia para o transporte ao longo dos microtubulos. Assim, essa variante foi considerada como provavelmente patogênica.

3.6 Mapa de conservação do aminoácido entre diferentes espécies

Espécies																				
<i>H. sapiens</i>	A	G	A	S	V	K	V	A	V	R	V	R	P	F	N	S	R	E	M	
<i>Mutata</i>	A	G	A	S	V	K	V	A	V	R	V	H	P	F	N	S	R	E	M	
<i>F. catus</i>	A	G	A	S	V	K	V	A	V	R	V	R	P	F	N	S	R	E	M	
<i>M. musculus</i>	A	G	A	S	V	K	V	A	V	R	V	R	P	F	N	S	R	E	M	
<i>T. rubripes</i>	A	G	A	S	V	K	V	A	V	R	V	R	P	F	N	S	R	E	T	
<i>D. rerio</i>	A	G	A	S	V	K	V	A	V	R	V	R	P	F	N	S	R	E	I	
<i>D. melanogaster</i>				S	S	V	K	V	A	V	R	V	R	P	F	N	S	R	E	I
<i>C. elegans</i>				S	S	V	K	V	A	V	R	V	R	P	F	N	Q	R	E	I
<i>X. tropicalis</i>	A	G	A	S	V	K	V	A	V	R	V	R	P	F	N	S	R	E	I	
Familia Kinesina																				
<i>KIF5B</i>	A	E	C	N	I	K	V	M	C	R	F	R	P	L	N	E	S	E	V	
<i>KIF3A</i>	S	C	D	N	V	K	V	V	V	R	C	R	P	L	N	E	R	E	K	
<i>KIF17</i>	A	S	E	A	V	K	V	V	V	R	C	R	P	M	N	Q	R	E	R	
<i>KIF1A</i>	M	A	G	A	V	K	V	A	V	R	V	R	P	F	N	S	R	E	M	
<i>KIF4A</i>	V	K	G	I	V	R	V	A	L	R	C	R	P	L	V	P	K	E	I	
<i>KIF11</i>	E	K	G	K	I	Q	V	V	V	R	C	R	P	F	N	L	A	E	R	

A figura demonstra que a arginina na posição 13 é conservada do homem até *X. Tropicalis* e também é conservada entre as diferentes proteínas kinase.

Fonte: elaborado pelo autor.

4.1.2.3 Caso CMT2_F8

Procedência: Inglaterra.

Local de sequenciado: ION.

Paciente primeira filha de uma prole de 2, de pais saudáveis e não consanguíneos. Sua irmã mais nova, faz seguimento em outro serviço com diagnóstico de CMT (Figura 3.7). Sua gestação transcorreu sem intercorrências e o parto foi normal, a termo, e sem complicações. O desenvolvimento neuropsicomotor foi adequado. Na infância e adolescência apresentou bom desempenho nas atividades físicas e não teve qualquer queixa até os 40 anos de idade, quando passou a torcer os tornozelos, principalmente em superfícies irregulares. Com o passar do tempo esses entorses passaram a ficar mais frequentes. Aos 50 anos os passou a apresentar dificuldade para manipular objetos e realizar movimento finos com as mãos. Ao exame apresenta marcha com pé caído bilateralmente. Romberg ausente. Nervos cranianos normais. A força era grau 5 proximal e ADM, APB e 1ID grau 4 nos membros superiores. Nos membros inferiores a flexão dorsal do pé era

grau 3 e restante grau 5. Os reflexos eram preservados nos membros superiores e abolidos nos inferiores. O exame da sensibilidade dolorosa era normal. A sensibilidade vibratória era alterada até tornozelos. O estudo da condução foi realizado em dois momentos diferentes, aos 48 anos e aos 60 anos (Tabela 3-4). O CMTNS2 foi de 10, aos 60 anos de idade.

Figura 3.7 – Heredograma da família CMT2_F8

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 3-4 – Estudo da condução sensitivo e motora do paciente CMT2_F8

Condução sensitiva								
Aos 48 anos					Aos 60 anos			
	Amplitude (μV)	Velocidade de condução (m/s)			Amplitude (μV)	Velocidade de Condução (m/s)		
Mediano	16	45			4	50.0		
Ulnar	15	-			5	49		
Radial	-	-			-	-		
Sural	Ausente	-			-	-		
Fibular								
superficial	-	-			-	-		
Condução Motora								
	Latência (ms)	Amplitude (mV)	VC (m/s)	Onda F (ms)	Latência (ms)	Amplitude (mV)	VC (m/s)	Onda F (ms)
Mediano (APB)	3.2	7.9	51.0	32.6	3.8	0.45	47	-
Ulnar (ADM)	-	-	-		2.7	2.7	63	-
Peroneio comum (EDB)	-	-	-		-	Ausente	-	-
Tibial posterior (AHL)	4.1	0.1	41.0		-	Ausente	-	-

Estudo da condução sensitivo e motora do paciente CMT2_F8, realizado aos 48 e aos 60 anos de idade. ms = milissegundos; mV = miliVolts; m/s = metros por segundo; μ V = microVolt; APB = abductor pollicis brevis; ADM = abductor digiti minimi, EDB = extensor digitorum brevis; AHL = abductor hallucis.

Fonte: elaborado pelo autor.

No exame eletromiográfico do músculo tibial anterior demonstrou fibrilações e ondas agudas positivas durante o repouso. Com contração voluntária apresentou

potenciais de unidade motora com número de fases aumentado, padrão de interferência reduzido e frequência de disparo, amplitude e duração aumentados.

O sequenciamento Sanger dos genes PMP22, MFN2, SPTLC1, HSPB1, HSPB8, GJB1, GDAP1, TRPV4, NEFL foram normais. O WES identificou mutação heterozigota composta no gene MME (Transcrição ENST00000460393.5, RefSeq NM_000902: c.466delC, c.1672G>A; p.Pro156fs14Ter, p.Gly558Ser). A variante *frameshift*, p.Pro156fs14Ter, está presente em 0.023% no GenomAD (66/276392). A variante *missense*, p.Gly558Ser, está localizada em um local conservado (PhyloP100=5,2 e PhastC=0.92) e a análise *in silico* prediz essa variante com efeito patogênico (*Mut-taster: diseasecausing; Polyphen2= possibly-damaging; SIFT :pathogenic, LRT: deleterius*). A variante p.Pro156fs14Ter foi previamente reportada como patogênica (AUER-GRUMBACH et al., 2016). Ambas as variantes foram identificadas na irmã afetada. A análise do DNA materno mostrou que ela era portadora da variante missense, de forma que obrigatoriamente a outra mutação foi herdada do pai, confirmando assim que elas se encontravam em alelos diferentes. A mutação missense foi considerada como provavelmente patogênica e em associação a variante previamente reportada acreditamos justificar o fenótipo observado nessa família.

4.1.2.4 CMT2_F9

Procedência: Brasil.

Local de sequenciado: Miami.

Segunda filha de uma prole de 4, de pais eram saudáveis e consanguíneos (Figura 3.8). Há em sua família um sobrinho, filho de uma irmã saudável que é também afetado. Seu parto foi normal e transcorreu sem intercorrências. Apresentou desenvolvimento neuropsicomotor adequado. Aos 11 anos de idade passou a apresentar dificuldade de marcha e quedas frequentes. Nega queixas sensitivas ou mesmo alterações esfinterianas. Ao longo das décadas subsequentes o quadro foi de lenta progressão.

Figura 3.8 – Heredograma da família CMT2_F9

Caso índice é representada pelo terceiro símbolo na segunda linha (II – 3), irmã é representada pelo segundo símbolo na segunda linha (II – 2), a mãe é representada pelo segundo símbolo na primeira linha (I – 2), o sobrinho é representado pelo primeiro símbolo na terceira linha (III – 1), a irmã é representada pelo sexto símbolo na segunda linha (II – 6).

Fonte: elaborado pelo autor.

Ao exame, aos 48 anos de idade, apresentava marcha com pé caído bilateralmente. Presença de hipotrofia nos músculos da perna e dos pés. Os nervos cranianos eram normais. A força nos membros superiores era normal. Nos membros inferiores era grau 0 para flexão dorsal e 4+ para flexão plantar. Os reflexos bicipital, tricipital e patelar eram presentes e simétricos, os demais eram ausentes. Os reflexos cutâneos plantares eram em flexão. A sensibilidade dolorosa era alterada até 3 cm acima dos joelhos nos membros inferiores e 3 cm acima dos punhos nos membros superiores. A sensibilidade vibratória era alterada nos artelhos. A coordenação era normal. O estudo da condução apresentou uma neuropatia sensitivo e motora, primariamente axonal (Tabela 3-5). O CMTNS2 foi de 12.

Seu sobrinho (III – 1), avaliado aos 16 anos, apresentava uma neuropatia sensitivo e motora com padrão de distribuição comprimento dependente. O início dos sintomas dele ocorreu aos 14 anos. A força nos membros superiores era grau 4+ para abdução do polegar e para abdução do quinto dedo, restante grau 5. Para

flexão dorsal dos pés a força era grau 3 e 4+ para flexão plantar. O sensibilidade dolorosa era alterada nas pernas até joelhos. A sensibilidade vibratória era alterada até cotovelos nos membros superiores e alterada até joelhos nos membros inferiores. Os reflexos eram globalmente diminuídos mas presentes simetricamente. O estudo da condução evidenciou uma neuropatia sensitivo e motora primariamente axonal. A irmã (II – 6) era clínica e eletrofisiologicamente normal (Amplitude(mV para motor e μ V)/VC(m/s): nervo ulnar 11.6/62.1, nervo peroneiro 4.5/49.3, Sural 22/52.1), bem como sua mãe (I – 2) (nervos peroneiro 5.2/42.6, Sural 21/42.6).

O sequenciamento direto dos genes PMP22, GJB1, EGR2, LITAF e motora do caso índice da família CMT2-F9

Condução sensitiva				
	Direita		Esquerda	
	Amplitude (μV)	Velocidade de condução (m/s)	Amplitude (μV)	Velocidade de Condução (m/s)
Mediano	2.7	48.3	5.6	49.6
Ulnar	2.6	46.2	3.7	52.1
Radial	-	-	-	-
Sural	1.5	30.8	1.8	46.3
Fibular superficial	Ausente	-	-	-
Condução Motora				
	Latência (ms)	Amplitude (mV)	Velocidade de condução (m/s)	Onda F (ms)
Mediano (APB)	5.8	0.2	54	-
Ulnar (ADM)	4.0	1.7	34.5	-
Peroneiro comum (EDB)	Ausente	-	-	-
Tibial posterior (AHL)	4.1	0.2	22.8	82.0

Estudo da condução sensitivo e motora do caso índice da família CMT2-F9. ms = milissegundos; mV = milivolts; m/s = metros por segundo; μ V = microvolt; APB = abductor

pollicis brevis; ADM = abductor digiti minimi, EDB = extensor digitorum brevis; AHL = abductor hallucis.

Fonte: elaborado pelo autor.

WES identificou uma variante nova em heterozigose no gene DYNC1H1 ENST00000360184.4, RefSeq NM_001376.4, c.11458C>A; p.Gln3820Lys). Essa variante não está presente no banco de dados GenomAD, EVS, dbSNP, ExAC e 1000 Genoma. Está localizada em um local conservado (PhyloP100=7,81 e PhastC=1). Análise *in silico* prediz essa variante com efeito patogênico moderado (*Mut-assessor: Medium; Mut-taster:diseasecausing; Polyphen2=possibly-damaging; SIFT:Tolerate, LRT:deleterius*). Essa variante foi considerada de significado indeterminado e há dúvidas quanto ao seu impacto.

4.1.2.5 CASO CMT2_F10

Procedência: Brasil.

Local de sequenciado: CMG.

Paciente masculino, avaliado aos 65 anos de idade, com quadro progressivo de perda de sensibilidade em pés com início aos 53 anos. Único filho de pais saudáveis e não consanguíneos (Figura 3.9). Apresentou quadro lentamente progressivo de perda da sensibilidade em pés, que ascendeu até metade da perna e acometeu ambas as mãos. Apresentou discreta perda do equilíbrio em ambientes escuros. Ao exame a marcha era atípica. Sinal de Romberg estava ausente. Os nervos cranianos eram normais. A força era preservada globalmente (grau 5). Os reflexos eram hipoativos, mas presentes e simétricos. A sensibilidade dolorosa estava alterada até terço distal das pernas com discreta assimetria. O estudo da condução evidenciou uma neuropatia sensitivo e motora primariamente axonal (Tabela 3-6 – Estudo da condução sensitivo e motora do paciente CMT2_F10. ms = milissegundos; mV = miliVolts; m/s = metros por segundo; μ V = microVolt; APB = *abductor pollicis brevis*; ADM = *abductor digiti minimi*, EDB = *extensor digitorum brevis*; AHL = *abductor hallucis*).

Figura 3.9 – Heredograma da família CMT2_F10

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 3-6 – Estudo da condução sensitivo e motora do paciente CMT2_F10

Condução sensitiva				
	Direita		Esquerda	
	Velocidade		Velocidade	
	Amplitude	de	Amplitude	de
	(μV)	condução	(μV)	Condução
		(m/s)		(m/s)
Mediano	7.7	53.2	7	52.8
Ulnar	6.4	51.4	5	51.5
Radial	21.1	65.5	30.5	57
Sural	4.3	41.4	2.3	40.2
Fibular				
superficial	1.4	37.2	2.1	38.9

Condução Motora				
	Velocidade			
	Latência	Amplitude	de	Onda F
	(ms)	(mV)	condução	(ms)
			(m/s)	
Mediano				
(APB)	3.1	5.4	50.5	31.5
Ulnar (ADM)	2.6	6.5	53.8	31.6
Peroneiro				
comum	5	0.56	38.8	-
(EDB)				
Tibial				
posterior	4	1.08	39.6	75.2
(AHL)				

Estudo da condução sensitivo e motora do paciente CMT2_F10. ms = milisegundos; mV = miliVolts; m/s = metros por segundo; μ V = microVolt; APB = *abductor pollicis brevis*; ADM = *abductor digiti minimi*, EDB = *extensor digitorum brevis*; AHL = *abductor hallucis*.

Fonte: elaborado pelo autor.

O sequenciamento direto dos genes PMP22, GJB1, EGR2, LITAF e MPZ foram normais. WES identificou uma variante em hemizigose no gene DRP2 (Transcrição ENST00000541709.5, NM_001171184, c.723delC; p.Val241fs). Essa variante não está presente no banco de dados GenomAD, EVS, dbSNP, ExAC e 1000 Genoma. Essa é uma variante *nonsense* nova, cuja análise *in silico* (Mutaster e CADD) prediz a criação de uma proteína truncada. Como as mutações reportadas até o momento no gene DRP2 são mutações *nonsense* próximas ao resíduo dessa variante a consideramos como provavelmente patogênica.

4.1.2.6 Caso CMT2_F12

Procedência: RU.

Local de sequenciado: ION.

Paciente feminina, segunda filha de uma prole de dois, de pais saudáveis e consanguíneos de origem Iraniana (Figura 3.10). Não havia na família histórico prévio de doença neurológica. Ao nascer era hipotônica e apresentou atraso significativo no desenvolvimento motor, iniciando a caminhar com 2,5 anos. Aos 4 anos de idade ainda era capaz de deambular independentemente com uso de órteses. Aos 6 anos de idade ela ficou restrita a cadeira de rodas. Aos 9 anos apresentou um episódio de pneumonia, após esse episódio ela passou a necessitar do uso ventilação não invasiva durante as noites. Ao longo dos meses subsequentes ela passou a necessitar de suporte ventilatório 24 horas por dia. Negava qualquer sintoma sensitivo, queixas urinárias, sintomas vasomotores ou anormalidade na sudorese. Ainda na primeira década de vida, passou a apresentar sintomas gastrointestinais caracterizados por constipação, plenitude pós-prandial e movimentos intestinais diminuídos. Os sintomas gastrointestinais foram se agravando ao longo dos anos e a paciente passou a apresentar sialorréia, disfagia, odinofagia e distensão abdominal resultando na necessidade de passagem de sonda nasogástrica para alívio da distensão. Aos 14 anos de idade ela passou a apresentar episódios recorrentes de distensão intestinal aguda que agravavam seus sintomas respiratórios. Aos 27 anos de idade ela foi submetida a uma gastrostomia percutânea endoscópica, e desde então são drenados diariamente 2-3 litros de conteúdo gástrico decorrentes da gastroparesia e do movimento intestinal diminuído. Aos 28 anos de idade, foi demonstrado através de um teste de impedância esofágica que ela apresentava refluxo gastroesofágico grave. Estudo neurofisiológico anorretal demonstrou função normal do esfíncter e da sensibilidade perianal. Nessa época ela necessitava de realização de enemas em dias alternados devido a constipação crônica. Aos 30 anos de idade ela iniciou nutrição enteral total.

Figura 3.10 – Heredograma da família CMT2_F12.

Fonte: elaborado pelo autor.

Seu exame aos 27 anos de idade revelou uma escoliose acentuada (Figura 10). Movimentos oculares extrínsecos preservados, língua e palato normais. Apresentava fraqueza discreta para flexão do pescoço. Havia uma atrofia e fraqueza acentuadas dos músculos proximal e distal nos membros superiores e inferiores (Figura 3.11). Os valores de força seguindo a escala MRC, seguem listados a seguir (direito/esquerdo). Adução do ombro (4+/4+), flexão e extensão do cotovelo (1/1), distal nos membros superiores e difusamente nos membros inferiores era grau zero. Os reflexos osteotendíneos profundos estavam ausentes globalmente. Reflexos cutâneos plantares eram indiferentes. Sensibilidade dolorosa normal. A sensibilidade vibratória era alterada até os tornozelos e a propriocepção era alterada apenas nos artelhos. Aos 27 anos foi submetida a estudo da condução que revelou ausência dos potenciais sensitivos e motores em todos os nervos testados. O CMTNSv2 foi de 28. Eletromiografia evidenciou sinais de desnervação crônica nos músculos proximais dos membros superiores (bíceps e deltóide).

Figura 3.11 – Características clínicas e estudo de imagem do paciente CMT2_F12

A-E Fotografias das pernas, braços e tronco da paciente demonstrando atrofia grave proximal e distal e cifoescoliose acentuada. F múltiplas figuras da CT de abdômen mostrando distensão gástrica acentuada com distorção da arquitetura normal do estômago. G-H radiografia demonstrando coluna vertebral e tórax com demonstrando alargamento e estreitamento dos espaços intercostais e elevação de ambos os hemidiafragmas com dilatação das alças intestinais (lado direito obtido aos 27 anos, lado esquerdo obtido aos 31 anos de idade). I demonstrando malformações esqueléticas com cifoescoliose acentuada.

Fonte: Tomaselli et al., sob revisão.

Essa paciente havia sido submetido ao sequenciamento direto de múltiplos genes relacionados (*MFN2*, *MPZ*, *LMNA*, *MT-ATP6* e *MT-ATP8*) e nenhuma variante havia sido identificada. Como seu fenótipo era atípico para as formas conhecidas de CMT foi submetido ao sequenciamento de WES que foi negativo. Após análise da qualidade da leitura do WES, ficou evidente que a cobertura de alguns genes relacionados as neuropatias hereditárias estava baixa e se optou por realizar o painel multigênico específico para CMT (Apêndice D).

O WES havia revelado 22.346 variantes exônicas, as quais foram filtradas obedecendo os critérios previamente discutidos. Havia sido identificada uma variantes em heterozigose no gene IGHMBP2 (ENST00000255078.7, RefSeq NM_002180, c.1325A>G; p.Tyr442Cys). Embora essa fosse uma variante nova, estivesse localizada em local altamente conservado (phastCons = 1 e phyloP = 4.56), com grande diferença físico química entre tirosina (Tyr) e cistetina (Cys), e tivesse sido predita como patogênica pela análise *in silico* com as ferramentas (SIFT (1), MutationTaster (p-value: 1), and Polyphen2 (1)) ela havia sido identificada em um único alelo, sendo então considerada como não patogênica.

O painel mutligênico específico revelou que 99.92% dos éxons codificadores (+/- 15 bp, exceto para gene GJB1, para o qual a região alvo inclui 860 nucleotídeos na região *upstream* do códon de início (ATG) para avaliação da região promotora específica do neurônio) de todos os genes foi igual ou superiores a 30X. A cobertura mínima foi de 19X para o gene AARS. Essas regiões foram analisadas manualmente para garantir a qualidade.

Curiosamente o painel multigênico específico detectou a mesma variante no gene IGHMBP2 detectada pelo WES, porém em homozigose. Essa variante foi então confirmada por sequenciamento Sanger e foi possível demonstrar que ambos os pais eram portadores assintomáticos. Essa variante foi considerada patogênica e submetida ao *Inherited Neuropathy Variant Browser*.

Na Biópsia de Nervo (aos 3 anos de idade) todos os fascículos presentes eram pequenos (Figura 3.12). Os nervos eram pequenos e com mielina com espessura moderada. Não havia evidências de degeneração axonal ativa ou desmielinização ativa ou mesmo a presença de infiltrado inflamatório. A microdissecção (*teasing*) de fibras revelou um encurtamento das regiões intermodais sugerindo algum grau de regeneração. A microscopia eletrônica evidenciou algumas fibras mielínicas com membrana basal duplicada e alguns agregados de fibras em regeneração.

Figura 3.12 – Biópsia do nervo sural do paciente índice da família CMT2_F12

A, A1 e A2 são imagens da biópsia do nervo sural da paciente e B, B1 e B2 são fotos da biópsia do nervo sural de paciente controle pareado por idade. As lâminas foram preparadas com a coloração azure de metileno – fucsina básica (MBA-BF). O tamanho dos fascículos nervosos observados na biópsia do paciente (A) em comparação com controle (B) são extremamente pequenos. Com magnificação das imagens (A1 e B1), se evidencia uma acentuada redução na densidade das fibras, as fibras são de pequeno diâmetro e não observamos fibras mielínicas ao longo dos fascículos. Não há evidências de degeneração axonal ativa (A2 e B2) ou mesmo sinais de um processo de demielinização e remielinização. Há raros agrupamentos de fibras sugerindo regeneração mínima. Escala: 100µm A e B, 50µm A1 e B1, 25µm A2 e B2.

Fonte: Tomaselli et al., sob revisão.

4.1.3 iCMT

4.1.3.1 Caso iCMT_F2

Procedência: Brasil.

Local de sequenciado: Miami.

Paciente masculino com dificuldade para deambular desde a segunda década de vida. Sempre apresentou sensação de pernas frias e apresentava equilíbrio ruim. Seu desempenho nos esportes sempre foi péssimo. Aos 25 anos passou a notar que seus pés estavam se invertendo e sua marcha ficou mais laboriosa. O quadro ficou estável ao longo dos anos subsequentes. Porém, aos 43 anos passou a notar dificuldade para movimentos finos de mãos, dificuldade para abrir garrafas e manipular objetos. Nessa época passou a notar atrofia em pés. Nega queixas sensitivas. A história familiar é complexa pois embora seus pais sejam consanguíneos há claramente uma transmissão de homem a homem (seu filho é também afetado) (Figura 3.13), sugerindo um padrão de herança autossômico dominante. Seus pais nunca foram avaliados, mas em princípio não há relato de alterações neurológicas. Ao exame físico caminhava com pés caídos bilateralmente. Se sente mais confortável andando, do que parado. Ao ficar parado, seus joelhos ficam instáveis (*knee bob sign*). Apresenta atrofia da musculatura intrínseca das mãos e pernas, com dedos em martelo. Reflexos hipoativos nos membros superiores e ausentes nos inferiores. A força proximal nos membros superiores é grau 5 e distal grau 3 nos músculos APB/ADM e 1ID e grau 4 para extensão dos dedos. Nos membros inferiores a força é grau 5 proximal e distal grau 2 para flexão dorsal do pé e grau 4 para flexão plantar. A sensibilidade dolorosa foi normal. A sensibilidade vibratória foi alterada até tornozelos. O estudo da condução sensitivo e motora evidenciou uma neuropatia sensitivo e motora com redução das velocidades de condução na faixa intermediária (Tabela 3-7). O CMTNE2 foi de 11.

Figura 3.13 – Heredograma da família iCMT_F2.

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 3-7 – Estudo da condução sensitivo e motora e eletromiografia do caso índice (II – 3) da família iCMT_F2.

Condução sensitiva				
	Direita		Esquerda	
	Amplitude (μ V)	Velocidade de cond ução (m/s)	Amplitude (μ V)	Veloci dade de Cond ução (m/s)
Mediano	Ausente	-	1.2	38.8
Ulnar	1.7	43.6	2.3	44.9
Radial	8.7	45.5	4.7	42.9
Sural	Ausente	-	-	-
Fibular superficial	-	-	-	-
Condução Motora				
	Latência (ms)	Ampli tude (mV)	Velocidade de condução (m/s)	Onda F (ms)
Mediano (APB)	8.5	1.28	19.1	63.8
Ulnar (ADM)	4.35	7.7	42.0	40.6
Peroneiro comum (EDB)	Ausente	-	-	-
Tibial posterior (AHL)	11	0.08	-	-

Eletromiografia (com agulha bipolar)							
	Fibs/OAP	DRC	Duração	Amp	Poli	Rec	Int
D Biceps Brachii	0	0	↑	↑	N	Red	↓
D EIP	0	0	↑	↑	N	Red	↓
D 1ID	0	+	↑↑	↑	↑	Red	↓
D Vasto Medial	0	0	↑↑	↑	↑	Red	↓
D Gluteus Máximo	0	0	N	N	N	N	N
D Tibial Anterior	0	0	↑↑	↑↑	↑↑	Red	↓
D Gastrocnemius medial	2+	+	↑	↑↑	↑↑	Red	↓↓

realizado aos 49 anos. ms = milisegundos; mV = milivolts; m/s = metros por segundo; μ V = microvolt; APB = abductor pollicis brevis; ADM = abductor digiti minimi, EDB = extensor digitorum brevis; AHL = abductor hallucis.

Fonte: elaborado pelo autor.

Seu filho (III -1) foi avaliado aos 16 anos e apresentava uma polineuropatia sensitivo e motora simétrica com padrão de distribuição comprimento-dependente, de predomínio motor e foi questionada a presença de sinais de liberação piramidal. Ao exame apresentava força proximal em membros superiores grau 5 e distal grau 4 (APB e ADM). Nos membros inferiores apresentava flexão dorsal do pé grau 3 e flexão plantar grau 4. Seus reflexos eram presentes e simétricos. Sem espasticidade. Questionável reflexo cutâneo plantar em extensão bilateralmente. Paciente não concordou em fazer EMG.

Sua irmã (II – 6) possui uma polineuropatia sensitivo e motora simétrica com padrão de distribuição comprimento-dependente, de predomínio motor com início na terceira década de vida. Ao exame realizado aos 57 anos de idade apresentava marcha com pé caído bilateralmente. Hipoestesia dolorosa até tornozelos. Força distal em membros superiores grau 4 e proximal grau 5. Nos membros inferiores a força proximal é grau 5 e distal era grau 2 para flexão dorsal do pé e grau 4 para flexão plantar. Os reflexos osteotendíneos estão diminuídos globalmente, exceto os aquileus que estão ausentes. O estudo da condução sensitivo e motora evidenciou uma neuropatia sensitivo e motora com reduções das velocidades de condução na faixa intermediária (Tabela 3-8).

Tabela 3-8 – Estudo da condução sensitivo e motora da irmã (II – 6) da família iCMT_F2,

Condução sensitiva			
Direita		Esquerda	
Amplitude	Velocidade de	Amplitude	Velocidade de

	(μ V)	condução (m/s)	(μ V)	Condução (m/s)
Mediano	1.1	43.6	-	-
Ulnar	1.0	52.3	-	-
Radial	9.6	50.8	-	-
Sural	2.9	32.8	-	-
Fibular superficial	2.6	40.6	-	-
Condução Motora				
	Latência (ms)	Amplitude (mV)	Velocidade de condução (m/s)	Onda F (ms)
Mediano (APB)	3.9	5.3	35.9	36.2
Ulnar (ADM)	2.55	7.0	46.7	29.9
Peroneio comum (EDB)	3.7	0.16	36.9	-
Tibial posterior (AHL)	4.1	1.8	30	60.5

realizado aos 49 anos. ms = milisegundos; mV = milivolts; m/s = metros por segundo; μ V = microvolt; APB = abductor pollicis brevis; ADM = abductor digiti minimi, EDB = extensor digitorum brevis; AHL = abductor hallucis.

Fonte: elaborado pelo autor.

WES evidenciou uma mutação sabidamente patogênica em heterozigose no gene AARS (Transcrição ENST00000261772.8, RefSeq NM_001605, c.986G>A; p.Arg329His). Está variante é reportada como patogênica no banco de dados *ClinVar* e no banco de dados de neuropatia hereditária da Universidade de Miami (*Inherited Neuropathy Variant Browser*).

4.1.3.2 Caso iCMT_F4

Procedência: Brasil.

Local de sequenciado: CMG.

Paciente foi avaliado aos 42 anos de idade com relato de que aos 39 anos de idade iniciou com dificuldade de marcha e dificuldade para correr. Com o tempo passou a apresentar quedas inesperadas, principalmente em superfícies irregulares. Negava qualquer alteração sensitiva ou esfinterianas. Ao exame apresentava marcha com pé caído bilateralmente. Tinha atrofia acentuada em mãos e em membros inferiores desde as raízes de ambas as coxas. Em membros superiores a força era grau 4 proximal, APB e ADM eram grau 1, flexão e extensão dos punhos eram grau 4-. Nos membros inferiores apresentava força grau 3 para flexão e 4+

para extensão do quadril, extensão da perna era 4+ flexão dorsal e plantar dos pés era grau 1. Os reflexos eram abolidos difusamente. Os reflexos cutâneos plantares eram indiferentes. O exame de sensibilidade era normal para todas as modalidades avaliadas (dor, vibratório e proprioceptiva). O estudo da condução sensitivo motora realizado aos 42 anos de idade evidenciou uma polineuropatia sensitivo e motora com redução das velocidades de condução na faixa intermediária (Tabela 3-9). O CMTNS2 foi de 12 na primeira avaliação. Nesse momento as amplitudes dos PAS eram normais, porém havia uma discreta redução das velocidades de condução. O exame foi novamente repetido aos 51 anos de idade com uma piora significativa nas amplitudes dos PAMC e PAS. Seus pais são saudáveis e consanguíneos. Sua irmã mais velha e seu irmão mais novo apresentam o mesmo fenótipo. Adicionalmente, possui um sobrinho com queixa de alteração na marcha e câimbras nos membros inferiores (filho de sua irmã que é normal que casou com um primo de primeiro grau) (Figura 3.14).

Sua irmã iniciou aos 40 anos de idade com dificuldade progressiva da marcha e quedas frequentes. Refere que após alguns anos as mãos foram também afetadas. Apresentava atrofia em mãos e pernas. Nos membros superiores a força é grau 5 proximal, APB e ADM grau 2, EDC 4-. Nos membros inferiores era grau 5 proximal e flexão plantar dos pés era grau 2 e flexão dorsal grau 2. Os reflexos osteotendíneos profundos eram presentes, exceto os aquileus que eram ausentes. Os reflexos cutâneos plantares eram indiferentes. A sensibilidade era normal em todas as modalidades testadas. O estudo da condução evidenciou uma neuropatia sensitivo e motora com redução das velocidades de condução na faixa intermediária (Tabela 3-9).

O sobrinho refere que desde os 33 anos vem notando que a marcha está diferente e que sente câimbras nos membros inferiores. Nega qualquer limitação nas atividades cotidianas e pratica esportes regularmente. Nega dor lombar. Nega alteração de sensibilidade. O exame físico evidenciou como única alteração força grau 4 para extensão dos halux e câimbras durante o teste de força. O estudo da condução evidenciou amplitudes dos potenciais de ação muscular compostos nos membros inferiores com amplitudes discretamente reduzidas, associadamente a discretas reduções nas velocidades de condução e aumento na duração dos potenciais (Tabela 3-9). Eletromiografia evidenciou um processo de desnervação aguda/crônica dos músculos com inervação comum das raízes L5S1 bilateralmente

(incluindo sinais de desnervação em progressão nos músculos paraespinal lombar L5 e glúteo médio).

Figura 3.14 – Heredograma família iCMT_F4.

O caso índice é representado pelo sétimo símbolo na segunda linha (II – 7). A irmã é representada como o segundo símbolo na segunda linha (II – 2). O sobrinho é o quarto símbolo na terceira linha (III- 4).

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 3-9 – Estudo da condução sensitivo e motora da família iCMT_F4

ID	Potencial de Ação Sensitivo										Potencial de Ação Muscular Composto								Idade EMG
	Mediano		Ulnar		Radial		Sural		Fib Sup		Mediano		Ulnar		Peroneiro		Tibial		
	Amp	VC	Amp	VC	Amp	VC	Amp	VC	Amp	VC	Amp	VC	Amp	VC	Amp	VC	Amp	VC	
II – 7'	10.6	45.9	11.1	42.9	23.1	46.4	14.6	32	16.6	35.2	6.07	41.2	3.02	44.6	0.19	22.1	Aus	-	42
II – 7''	0.9	42.4	0.6	44.4	2.5	46.9	Aus	-	-	-	Aus	-	Aus	-	-	-	-	-	51
II - II	4.7	51	8.8	50.4	30.6	51.8	6.8	43.2	5.1	40.2	5.3	44.7	6.0	51.2	Aus	-	Aus	-	56
II - 4	18.8	55.8	14.3	56.5	28.3	62.5	8.8	44.6	-	-	11.03	53.6	-	-	6.1	44.4	-	-	60
II - 7	16.1	51.2	13.2	51.5	33.2	58.8	10.2	40.2	-	-	12.5	58.7	-	-	6.2	48.7	-	-	57
III - 4	18.5	51.1	10.5	50.0	43.2	56.2	13.8	43.8	5.9	45.5	13.9	51.0	-	-	2.79	37.6	4.16	36.3	35
II - 8	11.3	51.8	9.6	53.7	25.6	53.6	11.4	38.5	8.5	39.8	5.91	39.7	5.4	54.3	Aus	-	Aus	-	48

ms = milisegundos; mV = milivolts; m/s = metros por segundo; μ V = microvolt; APB = abductor pollicis brevis; ADM = abductor digiti minimi, EDB = extensor digitorum brevis; AHL = abductor hallucis. Símbolo pintado = afetado, símbolo meio pintado = dificuldade em pés, Amp = amplitude, ID = identificação, Fib Sup = Fibular superficial, VC = Velocidade de condução, Aus = ausente.

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 3-10 – Eletromiografia do paciente índice (II – 7) da família iCMT_F4

Eletromiografia (com agulha bipolar)							
	Fibs/O	DR	Duraçã	Amp	Poli	Rec	Int
	AP	C	o				
D Vasto Medial	2+	0	Aum	18.0	N	Red	2 UM
D Tibial Anterior	2+	0	Aum	16.0	1+	Red	2 UM
D Extn. Hallucis Lng	0	0	Aum	1.5	3+	Red	1 UM
D Biceps Brachii	0	0	Aum	3.0	2+	Red	3
D 1ID	2++	0	Aum	8.0	1+	Red	2 UM
D Paraespinal Lombar	0	0	0	0	1+	N	N

Fibs = fibrilações, OAP = onda aguda positiva, Poli = polifasia, Rec = recrutamento, Int = padrão de interferência, Aum = Aumentado, 1ID = primeiro interósseo dorsal, N = Normal, UM = unidade motora.

Fonte: elaborado pelo autor.

WES evidenciou uma mutação no gene MME (Transcrição ENST00000460393.5, RefSeq NM_000902, c.466delC, p.P156Lfs14Ter. A variante está presente em 0.023% no GenomAD (66/276392). Assa variante foi identificada em heterozigose na mãe I – 2, e nos irmãos II – 2 e II – 8 e foi identificada em homozigose no caso índice II – 7.

O sobrinho III – 4 ainda não foi sequenciado, pois foi visto recentemente. Curiosamente seu estudo da condução apresentou discreta redução nas velocidades de condução nos nervos dos membros inferiores e a eletromiografia sugeria um processo pré-ganglionar envolvendo as raízes L5-S1 bilateralmente com sinais de desnervação ativa. Curiosamente se observarmos a eletromiografia do caso índice (Tabela 10) havia um processo de desnervação difuso no membros inferiores com sinais de desnervação ativa que poderia ser confundido com um processo de desnervação pré-ganglionar uma vez que os potenciais sensitivos estavam preservados. Essa variante foram consideradas como provavelmente patogênicas.

4.1.3.3 Caso iCMT_F7

Procedência: RU.

Local de sequenciado: ION.

Paciente masculino, nascido de parto normal, sem intercorrências, com desenvolvimento neuropsicomotor adequado. Ele refere que tem um irmão normal, mas que seu pai tem diagnóstico de CMT associado a tremores (Figura 3.15 – Heredograma da família iCMT_F7.). Durante a adolescência passou a notar inversão dos pés e perda de equilíbrio, associado a atrofia progressiva dos músculos das pernas. O quadro foi lentamente progressivo. Negava queixas sensitivas ou esfinterianas. Referia um tremor mínimo nos membros superiores que não afeta suas atividades diárias.

Figura 3.15 – Heredograma da família iCMT_F7

Fonte: elaborado pelo autor.

:

Ao exame ele caminhava com inversão de ambos os pés, ficava na ponta dos pés, porém não sobre os calcanhares. Nervos cranianos normais. Nos membros superiores apresentava um tremor essencial discreto e uma hipotrofia discreta de ambos os 1ID. Nos membros inferiores ele apresentava uma atrofia acentuada das pernas. O exame de força dos músculos 1ID/APB/ADM revelou força grau 4

bilateralmente. Nos membros inferiores a flexão dorsal do pé era grau 2, eversão 4-, inversão e flexão plantar grau 5. Os reflexos osteotendíneos profundos eram presentes, exceto os aquileus que eram ausentes. O exame de sensibilidade revelou perda da sensibilidade dolorosa até metade do pé, alteração da sensibilidade vibratória até tornozelos e proprioceptiva normal.

O estudo da condução sensitivo e motora evidenciou uma neuropatia sensitivo e motora com reduções intermediárias da velocidade de condução (Tabela 1-1). O CMTNS2 foi de 10.

Tabela 3-11 – Estudo da condução sensitiva e motora e eletromiografia iCMT_F7

Estudo da condução					
	PAMC	VCM	LMD	PAS	VCS
	(mV)	(m/s)	(ms)	(µV)	(m/s)
Nervo Mediano	5.3	39	3.8	Ausente	-
Nervo Ulnar	9.4	43	3.3	Ausente	-
Nervo Radial	-	-	-	3	51
Nervo Peroneio	Ausente	-	-	-	-
Nervo Fibular superficial	-	-	-	-	-
Nervo Tibial Posterior	Ausente	-	-	-	-
Nervo Sural	-	-	-	Ausente	-

PAMC = potencial de ação muscular composto, VCM = velocidade de condução motora, VCS = velocidade de condução sensitiva, LMD = latência motora distal, PAS = potencial de ação sensitivo, mV = milivots, m/s = metros/segundo, ms = milissegundos, µV = microvolts, Fibs – fibrilações, OAP = onda aguda positiva, Amp = amplitude, Poli = polifásico, Rec = recrutamento, Int = padrão de interferência, Red = reduzido, N = normal, + presente, ↑ = aumentado, ↓ = diminuído, 1ID = primeiro interósseo dorsal, D = direito, E = esquerdo.

Fonte: elaborado pelo autor.

Foi identificada uma mutação sabidamente patogênica no gene AARS (Transcrição ENST00000261772.8, RefSeq NM_001605, c.986G>A; p.Arg329His). Essa é a mesma mutação identificada na família iCMT_F2.

4.1.4 Caso iCMT_F8

Procedência: Brasil.

Local de sequenciado: Miami.

Paciente feminina filha de pais saudáveis e consanguíneos (Figura 3.16). A mesma foi avaliada aos 36 anos. Parto foi normal a termo e desenvolvimento neuropsicomotor adequado. Alguns dias antes de vir a consulta passou a notar dor nos dedos das mãos e achar que as mãos estavam fracas. Nega alterações nos membros inferiores. Ao exame físico força era preservada globalmente, reflexos osteotendíneos preservados e reflexos cutâneo plantares flexores. Ao exame de sensibilidade uma hipoestesia dolorosa até joelhos e terço proximal dos antebraços. Sensibilidade vibratória alterada em artelhos. O estudo da condução sensitivo e motora evidenciou uma neuropatia sensitivo e motora simétrica com redução das velocidades de condução na faixa intermediária (Tabela 3-12). O CMTNS2 foi de 6.

Figura 3.16 – Heredograma da família iCMT_F8.

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 3-12 – Estudo da condução sensitivo e motora do caso índice da família iCMT_F8

	Condução sensitiva			
	Direita		Esquerda	
	Amplitude (μ V)	Velocidade de condução (m/s)	Amplitude (μ V)	Velocidade de Condução (m/s)
Mediano	13	36.5	-	-
Ulnar	17	39.7	-	-
Radial	18	42.9	-	-
Sural	Ausente	-	-	-

Fibular superficial	Ausente	-	-	-
Condução Motora				
	Latência	Amplitude	Velocidade de	Onda F
	(ms)	(mV)	condução (m/s)	(ms)
Mediano (APB)	4.8	6.7	46.7	28.3
Ulnar (ADM)	3.2	5.3	38.4	32.6
Peroneiro comum	5.1	2.2	31.9	62.8
(EDB)				
Tibial posterior	-	-	-	-
(AHL)				

ms = milisegundos; mV = milivolts; m/s = metros por segundo; μ V = microvolt; APB = abductor pollicis brevis; ADM = abductor digiti minimi, EDB = extensor digitorum brevis; AHL = abductor hallucis.

Fonte: elaborado pelo autor.

A dosagem do cromossomo 17 e sequenciamento dos genes PMP22 e GJB1 foram normais. WES evidenciou uma mutação heterozigose no gene MPZ (Transcrição ENST00000533357.1, RefSeq NM_000530, c.86C>T; p.Ala29Val). Essa variante não está presente no banco de dados GenomAD, EVS, dbSNP, ExAC e 1000 Genoma. Esta localizada em local altamente conservado (PhyloP100=6.76, PhastC100=1). Análise *in silico* prediz que essa variante como patogênica (Mut-assessor=médio; Mutaster=disease causing; MetaLR = damage, FATHMM = damaging, PolyPhen2 = probably damaging, Proven = damaging, SIFT = damaging). Não tivemos acesso a material para testar se a variante estava presente nos pais e também para avaliá-los clinicamente. Essa variante foi considerada provavelmente patogênica.

4.1.5 dHMN

4.1.5.1 Caso dHMN_F1

Procedência: RU.

Local de sequenciado: ION.

Paciente feminino, única filha de pais saudáveis e não consanguíneos (Figura 3.17). Paciente apresentou desenvolvimento neuropsicomotor normal. Seus pais notaram, na primeira década de vida que ela possuía arco plantar elevado e era mais lenta que as outras crianças ao correr, ficando sempre em último nas brincadeiras infantis. Na segunda década de vida, refere que passou a notar fraqueza em membros inferiores e dificuldade progressiva da marcha. Aos 25 anos de idade passou a apresentar fasciculações e câimbras principalmente nos membros inferiores e mais frequentemente durante a noite. As câimbras e as fasciculações eram também desencadeadas por mínimos esforços. Ela negava qualquer sintoma nos membros superiores e qualquer alteração sensitiva.

Figura 3.17 – Heredograma da família dHMN_F1

Fonte: elaborado pelo autor.

Ao exame físico, realizado aos 31 anos de idade, era evidente a marcha com báscula de bacia e pé caído bilateralmente. Os nervos cranianos eram normais. O sinal de Romberg estava ausente. Ela ficava sobre os calcanhares, mas era incapaz de ficar na ponta dos pés (Figura 3.18 A-D). A força nos membros superiores era grau 5 em todos os músculos testados e apresentava um tremor postural leve. Durante a inspeção foram identificadas fasciculações em ambos os quadríceps e câimbras foram desencadeadas pelos esforços mínimos durante avaliação da força. A flexão dorsal dos pés apresentava força 4+ e flexão plantar era grau 4. O tônus era normal. Os reflexos osteotendíneos profundos eram exaltados globalmente, incluindo os reflexos trapézio e peitoral. Os reflexos cutâneos plantares eram flexores bilateralmente. A avaliação sensitiva foi absolutamente normal. O estudo da condução foi normal e o estudo eletromiográfico evidenciou potenciais de unidade

motora com amplitude, número de fases e duração aumentadas e recrutamento reduzido associadamente a sinais de desnervação em progressão (Tabela 3-13).

Tabela 3-13 – Estudo da condução sensitiva e motora e eletromiografia do caso índice da família dHMN_F1

Estudo da condução							
	PAMC (mV)	VCM (m/s)	LMD (ms)	PAS (µV)	VCS (m/s)		
Nervo Mediano	10	63	3.8	17	52		
Nervo Ulnar	14.6	61	3.6	25	53		
Nervo Radial	-	-	-	55	65		
Nervo Peroneio	6.1	57	5.4	-	-		
Nervo Fibular superficial	-	-	-	18	47		
Nervo Tibial Posterior	8.3	49	4.4	-	-		
Nervo Sural	-	-	-	22	45		

Eletromiografia (com agulha bipolar)							
	Fibs/OA P	DR C	PAUM	Amp	Poli	Rec	Int
D 1ID	0	0	N	N	N	N	N
D Vasto Medial	0	0	↑↑	↑	↑	Red	↓
D Gluteus Máximo	0	0	N	N	N	N	N
D Tibial Anterior	0	0	↑↑	↑↑	↑↑	Red	↓
D Gastrocnemius medial	2+	+	↑	↑↑	↑↑	Red	↓↓
D Peroneio longo	1+	+	↑↑	↑	↑↑	Red	↓↓
E Tibial Anterior	0	0	↑↑	↑↑↑	↑↑	Red	↓↓
E Gastrocnemio medial	2+	+	↑	↑	↑↑	Red	1 UM
D Paraespinal lumbar	0	0	N	N	N	N	N

realizada aos 31 anos de idade. PAMC = potencial de ação muscular composto, VCM = velocidade de condução motora, VCS = velocidade de condução sensitiva, LMD = latência motora distal, PAS = potencial de ação sensitivo, mV = milivots, m/s = metros/segundo, ms = milissegundos, µV = microvolts, Fibs – fibrilações, OAP = onda aguda positiva, Amp = amplitude, Poli = polifásico, Rec = recrutamento, Int = padrão de interferência, Red = reduzido, N = normal, + presente, ↑ = aumentado, ↓ = diminuído, 1ID = primeiro interósseo dorsal, D = direito, E =

Fonte: elaborado pelo autor.

O CMTNSvs era 5. A ressonância magnética (RM) do encéfalo e da coluna total foram normais (Figura 3.18 E-G). A RM dos membros inferiores evidenciou infiltração moderada de gordura no músculo bíceps femoral (cabeça curta) (Figura 18 H e I) e preservação dos demais músculos da coxa. Na perna, observamos atrofia gravíssima dos músculos soleus e gastrocnêmico medial (Figura 3.18 J).

Figura 3.18 – Aspectos clínicos, e achados de RM de neuroeixo e de membros inferiores do paciente índice da família dHMN_F1

A-D Fotos demonstrando pes cavus e atrofia distal em membros inferiores com preservação dos membros superiores. E e F Cortes Sagital e Coronal da RM ponderados na sequência T1 demonstrando encéfalo normal. G Corte Sagital ponderado na sequência T2 da RM demonstrando medula espinal normal. H Corte axial ponderado na sequência T1 da RM ao nível médio da coxa com aspecto normal. I Corte axial ponderado na sequência T1 da RM do segmento distal da coxa demonstrando moderada liposubstituição do bíceps femoral, cabeça curta (seta). J Corte axial ponderado na sequência T1 da RM ao nível médio da perna demonstrando acentuada atrofia gordurosa dos músculos soleus (So), gastrocnêmico medial (MG) e gastrocnêmico lateral (LG); associadamente a liposubstituição assimétrica do

músculo peroneiro longo (PL); e relativa preservação dos músculos tibial anterior (TA) e tibial posterior (TP).

Fonte: acervo do *National Hospital for Neurology and Neurosurgery (NHNN)*, Queen Square, Londres, Reino Unido, 2017.

Essa paciente havia sido submetida ao sequenciamento através de painel multigênico para neuropatia motora hereditária (99.9% das regiões codificadoras e +/- 15 bp). A cobertura mínima foi 26 vezes, em uma pequena região de 211 bp do gene TRPV4 (posição 110234313 a 110234524). Essa região foi então analisada manualmente para avaliar a qualidade do sequenciamento e nenhuma variante foi identificada. Como o painel para HMN foi negativo, foi realizado WES.

- Uma variante em heterozigose no gene MARS, associado a CMT2U;
- Duas variantes em heterozigose composta no gene VRK1 associado a amiotrofia espinal com hipoplasia pontocerebelar (SMA-PCH) e esclerose lateral amiotrófica (ELAf).

Através do sequenciamento Sanger, a variante identificada no gene MARS (c.590C>T; p.Ala197Val) (RefSeq número NM_004990.3) não foi localizada nos bancos de dados de populações normais, mas foi identificada no pai assintomático sendo excluída como causa do fenótipo dessa paciente.

O sequenciamento Sanger do DNA da paciente e de seus pais confirmou a presença das 2 variantes no gene VRK1 identificadas com WES e que elas estavam localizadas em alelos diferentes (pai era portador assintomático da variante (p.Thr228Met) e a mãe era portadora assintomática da mutação (p.Arg358X) (Transcrição, ENST00000216639.7, RefSeq NM_003384 ,c.683C>T, c.1072C>T; p.Thr228Met, p.Arg358X)(Figura 19). A mutação p.Arg358X foi reportada em estudos prévios como patogênica em homozigose. A variante nova p.Thr228Met é localizada no domínio motor kinase em uma região altamente conservada (PhyloP = 3.69 e PhastCons = 1)(Figura 3.19) e foi predita como patogênica por análise *in silico*. Essa variante foi identificada em 7 alelos (7/121386) no ExAC (MAF 0.005%), sem nenhum portador em homozigose.

Figura 3.19 – Estrutura do gene VRK1 A e

mostram a estrutura do gene e da proteína codificada, C mostra a segregação das duas variantes na família, C mostra a conservação do resíduo Treonina (T) na posição 228 do gene VRK1 entre diferentes espécies. NLS = sinalizador de localização celular.

Fonte: elaborado pelo autor.

4.1.5.2 Caso dHMN_F3

Procedência: Brasil.

Local de sequenciado: CMG.

Segundo filho de uma prole de três, de pais saudáveis. Os pais eram primos de primeiro grau (Figura 3.20). O mesmo nasceu a termo, sem intercorrências. Apresentou desenvolvimento neuropsicomotor adequado. Ainda na primeira década de vida a mãe notava que ele tinha certa dificuldade para brincar com as demais crianças e não o considerava hábil no futebol. Aos 10 anos de idade ficou evidente a dificuldade de marcha as custas de fraqueza distal.

Figura 3.20 – Heredograma da família dHMN_F3

Fonte: elaborado pelo autor.

Ao exame apresentava marcha com pés discretamente caídos. Era capaz de ficar nas pontas dos pés, mas não sobre os calcanhares. A força nos membros superiores era grau 5 proximal, APB era grau 1, 1ID, grau 3, ADM grau 2, EDC 4+ e flexão dos dedos era grau 5. Nos membros inferiores a força era grau 5 proximal e 4 para flexão dorsal dos pés e 4+ para flexão plantar. O tônus era aumentado nos membros inferiores. Os reflexos aquileu e estiloradial eram ausentes, o patelar e tricipital eram exaltados e o bicipital hipoativo. O reflexo cutâneo plantar era extensor bilateralmente. O exame de sensibilidade era normal. O estudo eletroneuromiográfico foi compatível com uma neuropatia motora (Tabela 3-14). O CMTNS2 foi de 9. A RM de encéfalo com tractografia foi normal.

Tabela 3-14 – Estudo da condução sensitivo e motora e eletromiografia do caso índice da família dHMN_F3

Condução sensitiva				
	Direita		Esquerda	
	Amplitude (μ V)	Velocidade de condução (m/s)	Amplitude (μ V)	Velocidade de condução (m/s)
Mediano	15.2	55.1	-	-
Ulnar	10.1	54.8	-	-
Radial	-	-	-	-
Sural	13.4	45.1	-	-
Fibular superficial	17.9	45.7	-	-
Condução Motora				

	Latência (ms)	Amplitude de (mV)	Velocidade de condução (m/s)	Onda F (ms)		
Mediano (APB)	15.6	0.02	-	-		
Ulnar (ADM)	2.7	2.62	47.1	-		
Peroneiro comum (EDB)	3.8	0.595	38.0	-		
Tibial posterior (AHL)	Ausente	-	-	-		
	Fibs/OAP	DRC	Amp	Poli	Rec	Int
E 1ID	3+	0	N	-	No act	No act
E Extn. Digitorum Com	0	0	4.0	N	Full	4
E Biceps Brachii	0	0	4.0	N	Full	Full
E Extn. Indicis Pro	0	0	10.0	N	Red	3-4
D Vasto Medial	0	0	9.0	N	Red	4-5
D Tibial Anterior	0	0	8.0	1+	Red	2-3
D Extn. Hallucis Lng.	2+	0	8.0	↑↑	Red	2-3

ms = milisegundos; mV = miliVolts; m/s = metros por segundo; µV = microVolt; APB = abductor pollicis brevis; ADM = abductor digiti minimi, EDB = extensor digitorum brevis; AHL = abductor hallucis. Fibs = fibrilações, OAP = ondas agudas positivas, DRC = descarga rápida complexa, Amp = amplitude, Poli = polifasia, Rec = recrutamento, Int = interferência.

Fonte: elaborado pelo autor.

WES evidenciou uma mutação homozigose no gene SIGMAR1 (Transcrição ENST00000277010.4, RefSeq NM_001282207.1, c.343G>A; p.Gly115Ser). Essa variante não está presente no banco de dados GenomAD, EVS, dbSNP, ExAC e 1000 Genoma. Esta localizada em local altamente conservado (PhyloP100=7.61, PhastC100=1). Análise *in silico* prediz essa variante como patogênica (Mut-assessor=medium; Mutaster=disease causing; MetaLR = damaging, FATHMM = damaging, Polyphen2 = probably-damaging, LRT = deleterius; Proven = damaging, SIFT = damaging). Essa variante foi considerada provavelmente patogênica.

4.1.6 HSN

4.1.6.1 HSN_F2

Procedência: Brasil.

Local de sequenciado: ION.

Paciente é o 2 filho de pais saudáveis e não consanguíneos. Possui 1 irmão por parte de mãe normal e 2 irmãs com o mesmo pai normais. (Figura 3.21).

Figura 3.21 – Heredograma da família HSN_F2

Fonte: elaborado pelo autor.

Gravidez e parto sem intercorrências. Os pais referem que com 1 ano de vida o filho passou a apresentar lesões escurecidas difusamente pelo corpo. Ele refere que as lesões evoluíam com atrofia da pele. Quando elas ocorriam nos dedos (mãos ou pés) refere que secavam e seguiam com reabsorção dos dedos. A essa época os pais notaram que a criança aparentava não responder a estímulos dolorosos. Com um ano de idade os pais referem que passaram a perceber mutilações distalmente nas mãos e pés e que as úlceras dificilmente cicatrizavam. Seu desenvolvimento neuropsicomotor foi normal. Ao exame, realizado aos 5 anos, havia ausência de dígitos em ambas as mãos, em pé direito possui apenas o quinto pododáctilo, em pé esquerdo ausência do quinto pododáctilo. Presença de múltiplas lesões difusamente pelo corpo (inclusive em face) em diferentes estágios de cicatrização (Figura 3.22). Foi realizada EMG cujo laudo refere de uma polineuropatia sensitiva, primariamente axonal.

Figura 3.22 – Figura mostrando a absorção dos dedos das mãos e dos pés e a presença de lesões em pele

Esse paciente foi submetido ao painel para HSN que foi negativo. Devido a complexidade fenotípica e ao estudo com painel ser negativo se optou por realizar o WES do caso índice e seus pais (trio). A análise conjunta evidenciou uma mutação heterozigota composta no gene *FLVCR1* (ENST00000366971 ,c.1194C>A; p.Tyr398X; c.1526-3C>T, p.?). A variante *nonsense* p.Tyr398X não está presente no banco de dados GenomAD, EVS, dbSNP, ExAC e 1000 Genoma. A variante c.1526-3C>T não esta presente no GenomAD. Análise *in silico* prediz essa variante com baixo impacto sobre o *splicing*. A variante TyrY398X foi considerada provavelmente patogênica e a variante c.1526-3C>T,p.? foi considerada de significado indeterminado. As características fenotípicas sugerem fortemente que o fenótipo observado pelo paciente índice seja causado por essas mutações, no entanto estudos adicionais necessitam de ser realizados para confirmação

5 DISCUSSÃO

Esse estudo avaliou o uso das técnicas de sequenciamento de nova geração, basicamente WES, como ferramenta para investigação das causas moleculares de formas Mendelianas de CMT. Foram analisados os dados de 30 casos índices (com alguma forma de neuropatia hereditária) selecionados de dois centros de referência para investigação e acompanhamento de neuropatia hereditária: o HCRP em Ribeirão Preto, Brasil e o NHNN, em Londres, Inglaterra. As NGS (WES e painel multigênico específico) se mostraram ferramentas eficazes para determinar a causa molecular em pacientes com todos os subtipos de CMT (CMT1, CMT2, iCMT, dHMN e HSN).

Até pouco tempo atrás, muitos *loci* para doenças mendelianas foram identificados através de estudos de clonagem posicional (PULITI et al, 2007). Para ser preciso, até 2010, todas as formas mendelianas de CMT foram identificadas usando essas estratégias. No entanto, elas não são adequadas para todos os grupos de doenças, limitando, assim, seu uso. Isso se deve ao fato de que para que se tenha grande probabilidade de identificar um *locus* se precisa de famílias com grande número de indivíduos (afetados e não afetados), de preferência com baixa variabilidade fenotípica e alta penetrância. Essas famílias estão cada vez menos comuns. Ademais, a mutação causal pode estar sob seleção negativa e não ser transmitida por muitas gerações ou ainda representar eventos *de novo*, limitando assim o uso dos estudos de *linkage* e criando a necessidade de outras ferramentas de investigação molecular.

Atualmente, WES é provavelmente o método com melhor custo benefício para investigação de doenças neurológicas em pequenas famílias ou mesmo em casos isolados em que não se pode realizar estudo de linkage. Como dito ao longo das sessões anteriores, o CMT apresenta uma grande heterogeneidade genética, se beneficiando da vasta cobertura obtida com WES e a possibilidade de se poder analisar novamente os dados a qualquer momento. Como dito anteriormente, estima-se que 85% das variações patogênicas do genoma humano envolvam as regiões codificadoras. Assim, como as regiões codificadoras constituem entre 1 e 2 % do genoma humano o sequenciamento dessa porção “relativamente” pequena do genoma trará uma alta probabilidade de definição diagnóstica. Assim, fica claro que

o WES fornecem uma alternativa poderosa e factível para investigação de doenças genéticas com alta penetrância. Diferentemente dos estudos de clonagem posicional, o WES pode ser aplicado a famílias com poucos indivíduos, ou até mesmo a casos isolados, que de outra forma não seriam capazes de fornecer informações significativas para definição do diagnóstico molecular (NG, 2010).

No presente estudo foi realizada inicialmente a análise de um painel virtual contendo somente genes relacionados a cada subtipo de CMT, e quando nenhuma variante foi identificada a análise foi expandida para todos os dados obtidos com WES. A taxa de positividade obtida no presente estudo com WES foi de 43.3% (6 variantes patogênicas e 7 provavelmente patogênicas), sendo essa uma percentagem maior que as taxas reportadas em outros estudos que avaliaram o uso de WES na prática clínica (~25%) (IGLESIAS, 2014; YANG et al., 2013). Em coortes de pacientes com neuropatia hereditária a taxa de positividade encontrada com NGS foi variável (18 a 60% dos casos) (DREW et al., 2015; HARTLEY et al., 2017; LUPO et al., 2016; WALSH et al., 2017, KLEIN et al., 2014; SCHABHUTTL et al., 2014). Essa variação pode ser decorrente de um *bias* de amostra (por exemplo a inclusão de amostras que não haviam sido testadas para as causas comuns como *GJB1*, *PMP22*, *MPZ* e *GDAP1* aumentando a taxa de resultados positivos), a determinação fenotípica (boa determinação fenotípica permite a utilização de filtros adicionais que permitem a inclusão de genes que, embora não tenham sido relatados como causadores de CMT desempenham papel em alguma via regulatória do sistema nervoso periférico) ou mesmo devido ao tamanho das amostras. É possível que nos casos em que o WES não foi capaz de identificar a causa da neuropatia, a variação no material genético esteja localizada em uma região não codificadora como observado em cerca de 11% dos casos de CMTX1 (TOMASELLI et al., 2017) ou mesmo seja secundária a variações estruturais como nos casos de CMTX3 e dHMN (BREWER et al., DREW et al., 2016). Possibilidades adicionais são a existência de doenças multigênicas e fatores modificadores. Hoje não dispomos de pipelines para análise sistemática da interação de variantes monoalélicas em genes recessivos ocorrendo em diferentes *locus*.

Com as quedas progressivas nos custos das NGS, provavelmente haverá uma migração natural do WES para o WGS uma vez que até 15% das variantes localizadas em regiões codificadoras podem ser perdidas quando se faz WES devido a qualidade da cobertura obtida com as diferentes metodologias,

adicionalmente com o aumento progressivo do entendimento do efeito das variantes localizadas nas regiões não codificadoras mais mecanismos relacionados ao desenvolvimento de doenças são compreendidos permitindo a análise adequada dos dados obtidos com WGS.

Foram identificadas 14 variantes de interesse nesse estudo e algumas características individuais de cada gene serão abordadas a seguir. A abordagem será realizada de acordo com cada família.

5.1 Caso CMT1_F3

Foi identificada uma mutação nova *nonsense* em homozigose no gene SH3TC2 como causa da neuropatia nessa família. O fenótipo apresentado foi de CMT clássico.

SH3TC2 codifica uma proteína (SH3TC2/KIAA1985) que está envolvida na comunicação intracelular entre proteínas. A SH3TC2 é expressa exclusivamente nas células de Schwann no SNP, e está ancorada a estruturas da membrana plasmática e da membrana perinuclear (ARNAUD et al., 2009; LUPO et al., 2009). A SH3TC2 se localiza no endossomo ao se associar a GTPase Rab11 e controla o processo de reciclagem de porções da membrana e receptores que foram internalizados e os realoca na membrana plasmática (ROBERTS, 2010). Assim, mutações patogênicas na SH3TC2 causam a perda da capacidade dessa proteína se associar a Rab11, com consequente perda da capacidade de reciclagem intracelular SH3TC2-mediada. Esse mecanismo é importante para manutenção da mielina e sua perda leva a desmielinização, proliferação anormal da célula de Schwann com formação de bulbos de cebola e desorganização dos nodos de Ranvier (ARNAUD et al., 2009).

Os achados clínicos, eletrofisiológicos e a progressão lenta observada no paciente índice está de acordo com o observado na literatura em pacientes com CMT4C (SENDEREK et al., 2003). Escoliose acontece em até 85% dos pacientes com CMT4C, porém não foi observada no paciente índice. Tanto os nervos motores quanto os nervos sensitivos estavam conduzindo de maneira alentecida (21.9 a 33.5m/s). Os nervos tibial posterior direito e mediano direito apresentavam um significativo aumento na duração dos PAMC e perda de sua morfologia habitual, sugerindo a presença de dispersão temporal. Dispersão temporal e bloqueio de condução estão geralmente associados a polineuropatias inflamatórias

desmielinizantes adquiridas, porém não são específicas desses processos uma vez que já foram relatadas em associação a diferentes formas de neuropatia hereditária (LITAF, MPZ e GJB1) (MURPHY et al., 2011; GERDING et al., 2009). Yger *et al.* reportaram dispersão temporal e bloqueio de condução em ao menos um nervo de todos os 14 pacientes com CMT4C por eles estudados (YGER et al., 2012). Esse caso aumenta a variabilidade genotípica das mutações localizadas no gene SH3TC2.

5.2 CMT2

5.2.1 Caso CMT2_F3

O paciente índice apresentou um fenótipo de CMT2 grave (CMTNS2 = 26) de início precoce, caracterizado por atraso no desenvolvimento motor e paralisia de corda vocal. Devido a gravidade do quadro o estudo eletrofisiológico disponível foi apenas o exame realizado aos 3 anos de idade em outro serviço, que foi compatível com um processo primariamente axonal (Nervo Mediano com amplitude de 1.4 mV e VC de 42.6 m/s). Os dados clínicos e eletrofisiológicos disponíveis estão de acordo com o fenótipo comumente observado nos pacientes com AR-CMT2K, que é causada por mutações bialélicas no gene GDAP1. Além de AR-CMT2K, mutações no gene GDAP1 já foram relacionadas a outras formas recessivas de CMT (CMT4A e CMTRIA) e algumas mutações foram relacionadas a forma dominante (CMT2K).

GDAP1 codifica a proteína associada a diferenciação induzida por gangliosídeo 1. Essa proteína é expressa principalmente no SNC (cérebro e medula), porém é expressa também no SNP, particularmente na célula de Schwann. Ela se localiza na lâmina externa da membrana mitocondrial e está envolvida na via de transdução de sinal durante o desenvolvimento neuronal (NIEMANN et al., 2005). *GDAP1* regula a dinâmica mitocondrial que é fundamental para o adequado funcionamento da mielina no sistema nervoso periférico (NIEMANN et al., 2005).

As formas recessivas de CMT costumam causar fenótipos graves com início precoce como observado no caso índice. Não raro se observa paralisia diafragmática e de cordas vocais (NELIS et al., 2002). Ao passo, que, mutações em heterozigose têm sido associadas a fenótipos mais leves com início mais tardio (ZIMON et al., 2011, SIVERA et al., 2010).

Uma das mutações encontradas na paciente (p.Pro119Thr) está localizada no aminoácido vizinho a mutação p.Arg120Trp que foi previamente reportada como patogênica em heterozigose. Especificamente, a mutação p.Arg120Trp, relatada por Sivera *et al.*, causa uma neuropatia axonal de leve a moderada gravidade com início dos sintomas na adolescência (SIVERA *et al.*, 2010). Adicionalmente, os autores observaram o envolvimento clínico relativamente simétrico da força para flexão dorsal e plantar do pé, a ausência de estridor e uma grande variabilidade com relação a gravidade da doença entre pacientes da mesma família. Embora clinicamente não houvesse diferença entre a força para flexão dorsal e plantar do pé, a RM de membros inferiores demonstrou um processo de liposubstituição mais intensa no compartimento posterior da perna se comparado ao anterolateral (SIVERA *et al.*, 2010). No artigo original os autores atribuíram essa grande variabilidade a uma provável penetrância incompleta dessa mutação (SIVERA *et al.*, 2010). O que se demonstrou mais tarde ser, na realidade, decorrente da co-segregação de variantes específicas em um gene modificador (junctofilina 1) (Plamartin *et al.*, 2015). A mutação p.Gln163X causa um códon de parada prematura e já foi publicada previamente em diferentes trabalhos (CLARAMUNT *et al.*, 2005; CUESTA *et al.*, 2002; SEVILLA *et al.*, 2008; SIVERA R, 2013). O quadro apresentado pelo paciente está de acordo com os relatos prévios de pacientes com neuropatia decorrentes de mutações recessivas no gene GDAP1.

5.2.2 Caso CMT2_F5

Foi identificada uma mutação *de novo* no gene KIF1A como sendo a causa do fenótipo complexo apresentado pelo paciente índice (TEA, espasticidade e neuropatia axonal). O TEA é um transtorno do desenvolvimento neurológico caracterizado por deficits de interação social, de linguagem e de comunicação associados a presença de comportamentos repetitivos e não usuais, cerca de 10-15% dos casos são monogênicos (LEVY *et al.*, 2009). Há muitos genes (FMR1, MECP2, NLGN4X, NLGN3) relacionados ao desenvolvimento de TEA, porém nenhum desses genes descreve a coexistência de paraparesia espástica (HSP) ou mesmo neuropatia.

O gene KIF1A codifica uma proteína motora dependente de ATP (da família das kinesinas) que está presente especificamente no neurônio. Essa proteína possui

um papel fundamental no transporte anterógrado das vesículas precursoras sinápticas ao longo dos microtubolos (OKADA et al, 1995, LEE et al., 2003), bem como de proteínas pós-sinápticas envolvidas no processo de plasticidade neuronal (LEE et al., 2015). Até o dia de hoje, mutações *nonsense* em homozigose são associadas a HSN2C (OMIM: 614213, com ou sem declínio intelectual) e mutações *missense* no domínio motor estão associadas com HSP 30 (OMIM: 610357) (RIVIERE et al., 2011; KLEBE et al., 2012). Mais recentemente, mutações *de novo* dominantes localizadas no domínio motor têm sido relatadas com fenótipos mais complexos podendo incluir declínio intelectual (DI), graus variados de atrofia cerebelar, HSP, atrofia óptica, neuropatia periférica e epilepsia (LEE et al., 2015, OKAMOTO et al., 2014; ESMAEELI NIEH et al., 2015, OHBA et al., 2015).

É possível, que durante o processo de desenvolvimento neural (intra útero) essa mutação afete a migração neuronal justificando transtornos de neurodesenvolvimento. Outra mutação localizada em outro sítio de ligação de ATP, p.Ser69Leu, foi reportada em uma família com HSP, na qual o pai apresentava deficit de atenção (YLIKALLIO et al., 2015). Mutações no gene DYNC1H1 que codifica uma proteína relacionada ao transporte axonal retrógrado já foram relatadas como causa de TDAH, defeitos de migração neuronal e neuro/neuronopatia motora (SCOTO et al., 2015). Assim, esse caso expande os fenótipos relacionados a mutações no gene KIF1A acrescentando TEA as manifestações possíveis.

5.2.3 CMT2_F9

A paciente índice apresentou um quadro lentamente progressivo de uma neuropatia sensitivo e motora primariamente axonal cujo início dos sintomas ocorreram na segunda década de vida. Embora os pais sejam consanguíneos não se pode excluir um padrão de herança ligado ao cromossomo X, uma vez que a irmã (mãe de um sobrinho afetado) é normal. Ao fazermos a análise utilizamos filtros para priorizar variantes bialélicas e variantes dentro do cromossomo X e nenhuma mutação que justificasse o fenótipo da paciente foi encontrada. Adicionalmente buscamos variantes localizadas no DNA mitocondrial, ponderando a variabilidade fenotípica baseada em uma possível heteroplasmia e novamente nenhuma variante com potencial impacto funcional foi detectada.

Ampliamos a análise considerando a possibilidade hipotética de uma doença com padrão de herança autossômica dominante com penetrância incompleta. Identificamos uma variante nova em heterozigose no gene DYNC1H1 (p.Gln3820Lys). Essa variante não está presente nos bancos de dados de populações normais e a análise *in silico* prediz essa variante como patogênica.

Mutações em heterozigose no gene DYNC1H1 (dineína citoplasmática de cadeia pesada) têm sido associadas a três fenótipos distintos: CMT2O, declínio intelectual AD tipo 13 e atrofia muscular espinal de predomínio em membros inferiores (SMALED).

O fenótipo CMT2O se caracteriza por pés cavus, dificuldade de marcha, perda de força e atrofia nos membros inferiores e alterações sensitivas (TSURUSAKI et al., Y 2012; SABBLAH et al., 2018). O início dos sintomas geralmente ocorre na segunda década de vida e costuma ser lentamente progressivo (TSURUSAKI et al., Y 2012; SABBLAH et al., 2018). O complexo dineína é fundamental para o funcionamento do axônio, uma vez que é responsável pelo transporte axonal retrógrado, incluindo mitocôndrias, vesículas de neurotransmissores, neurofilamentos e fatores de sobrevivência anti apoptose ao longo dos microtúbulos (KARKI et al., 1999).

A variante encontrada na paciente índice (p.Gln3820Lys) está localizada no domínio motor, próxima a uma mutação (p.His3822Pro) que foi reportada em associação a quadro grave de defeito na migração neuronal causando deficiência intelectual e neuropatia axonal (WILLEMSSEN et al., 2012).

A variante encontrada na paciente índice foi classificada como de significado indeterminado. Embora, dineínas mutadas sejam relacionadas a CMT2O, não há evidências suficientes para assegurar o status dessa variante encontrada. As evidências que não apoiam a patogenicidade dessa variante são o padrão de herança (heredograma sugere uma doença AR ou ligada ao X), a divergência na gravidade dos fenótipos apresentados por mutações vizinhas (declínio intelectual grave e neuropatia grave versus CMT2 moderado sem envolvimento cognitivo). Infelizmente não tivemos acesso a amostras de DNA de familiares para confirmar se essa variante segrega com o fenótipo. Esse, seria um teste fácil e relativamente barato que poderia ajudar na interpretação dessa variante. Adicionalmente as mutações relatadas no gene DYNC1H1 tem alta penetrância o que iria contra nossa hipótese de penetrância incompleta.

5.2.4 CMT2_F10

O paciente índice apresenta um quadro de CMT2 leve de início tardio, de predomínio sensitivo, com lenta progressão e discreta assimetria. Embora clinicamente não houvesse alterações motoras o estudo eletrofisiológico evidenciou o acometimento de ambos os grupos de fibras (motoras e sensitivas).

O gene *DRP2* codifica a proteína relacionada a distrofina 2, essa proteína interage com a periaxina e destróglicana para formar o complexo periaxina-DRP2-destróglicana (complexo PDG). O complexo PDG é responsável por conectar proteínas da matriz extracelular como a laminina à mielina, criando zonas de adesão entre a superfície adaxonal da mielina compacta e a membrana plasmática das células de Schwann (BRENNAN et al., 2015). Entre as zonas de adesão criadas pelo complexo PDG estão localizadas as bandas de Cajal, que são extensões citoplasmáticas. O complexo PDG desempenha um papel crucial na manutenção das bandas de Cajal que por sua vez regulam a distância internodal (BRENNAN et al., 2015).

Mutações no gene *DRP2* foram previamente relatadas em associação a CMT intermediário ligado ao X (CMTXI) (BRENNAN et al., 2015). Brennan *et al.* apresentaram um caso de um homem que apresentou um quadro de CMT de início tardio (aos 50 anos) devido a uma mutação *nonsense* no gene *DRP2* (p.Gln269X). O estudo eletrofisiológico desse paciente evidenciou o prolongamento das LMD com discreta redução da velocidade de condução. Nesse mesmo estudo, os autores realizaram biópsia de pele e demonstraram que nas fibras mielínicas da derme a *DRP2* estava ausente e de que com microscopia eletrônica as bandas de Cajal não foram identificadas. Esses achados histopatológicos foram idênticos aos encontrados nas amostras de tecido de camundongos *Drp2 knockout* (BRENNAN et al., 2015).

A mutação encontrada no paciente índice (p.Val241fs) é uma mutação que prediz a criação de uma proteína truncada que potencialmente afetara a formação do complexo CDG e as bandas de Cajal. No paciente índice as velocidades de condução estavam normais, a não ser por discreta redução observada nos nervos avaliados nos membros inferiores, qual consideramos ser secundária a perda axonal. A não existência de casos na família pode ser decorrente do fato de a mãe ser portadora assintomática da variante, o que é comumente observado nas

doenças ligadas ao X, devido ao fenômeno de inativação do cromossomo X. Brennan et al. descreveram mulheres portadoras da mutação p.Gln269X apenas com dedos em martelo. A similaridade fenotípica observada entre o paciente descrito anteriormente e o caso índice e o fato de ambas as mutações serem *nonsense* suportam a patogenicidade dessa variante.

5.2.5 CMT2_F12

Foi identificada uma mutação gene IGHMBP2 como causa da neuropatia nesse paciente. Mutações em homozigose no gene IGHMBP2 são classicamente associadas a dois fenótipos distintos: atrofia muscular espinhal com insuficiência respiratória tipo 1 (SMARD1) e com CMT2S. No SMARD1 a degeneração do motoneurônio alfa no corno anterior da medula espinhal leva a uma quadro de paralisia diafragmática e atrofia muscular. Nervos sensitivos e autonômicos podem estar envolvidos em alguns pacientes. É uma doença que se inicia no primeiro ano de vida, causa insuficiência respiratória e óbito precoce é uma das principais características da doença. No entanto, pacientes com fenótipos menos graves (início mais tardio com sobrevida até 15-20 anos de idade) têm sido reportados (GROHMANN et al., 1999; GROHMANN et al., 2001). Ao passo que pacientes com CMT2S apresentam uma neuropatia axonal lentamente progressiva, com envolvimento preferencial da musculatura distal alteração sensitiva e preservação da capacidade respiratória (COTTENIE et al., 2014; SCHOTTMANN et al., 2015).

O presente caso apresenta características que o diferem dos fenótipos classicamente observados SMARD1 e CMT2S. No SMARD1 a maioria dos pacientes necessitam de suporte ventilatório no primeiro ano de vida evoluindo para óbito na primeira década de vida. Esse paciente desenvolveu insuficiência respiratória com necessidade de suporte ventilatório aos 9 anos de idade e está ainda viva aos 33 anos. Envolvimento sensitivo e autonômico, incluindo sudorese excessiva, taquicardia, constipação e disfunção vesical, já foram descritas em pacientes com SMARD1 e pacientes com CMT2S. Por esse motivo, nos acreditamos que esse paciente apresente uma sobreposição entre os fenótipos de CMT2S e SMARD1 dentro do espectro das doenças IGHMBP2 relacionadas.

Não fica claro porque o envolvimento autonômico nessa paciente foi restrito ao trato gastrointestinal. Jedrzejowska *et al.* relataram cinco pacientes de quatro

diferentes famílias com disfunção autonômica devido a mutações no *IGHMBP2*, que incluíam sudorese excessiva, taquicardia, constipação e disfunção vesical (JEDRZEJOWSKA et al., 2015). Schottmann *et al.* relataram dois irmãos com disfunção autonômica progressiva incluindo trato gastrointestinal e disfunção vesical associadamente a uma neuropatia axonal sem insuficiência respiratória, um dos irmãos foi submetido a cirurgia para correção de acalásia aos 18 anos de idade (SCHOTTMANN et al., 2014).

IGHMBP2 codifica uma proteína pertencente a superfamília helicase putativa. Ele é expressa no cérebro durante a fase de desenvolvimento do sistema nervoso central e também no cérebro na fase adulta, principalmente no cerebelo (COTTENIE et al., 2014). Ela desempenha um papel no processo de transcrição é um componente da maquinaria responsável pela translação (DE PLANELL-SAGUER et al.,; GUENTHER et al., 2009).

Esse achado sugere que mutações no *IGHMBP2* podem causar uma neuropatia axonal de início precoce em associação a disautonomia órgão específica afetando exclusivamente o trato gastrointestinal. Essa mutação, foi incorretamente nomeada como heterozigota através do WES devido a baixa cobertura obtida no sequenciamento. Esse fato chama a atenção quanto a necessidade da análise da cobertura obtida dos genes de interesse ao analisar os dados obtidos, para evitar um resultado falso negativo. Esse caso acrescenta a lista de fenótipos possíveis *IGHMBP2*-relacionados a sobreposição SMARD1/CMT2S com disautonomia órgão específico.

5.3 iCMT_F2 E iCMT_F7

Foi identificada uma mutação sabidamente patogênica no gene *AARS* (p.Arg329His) em duas famílias não relacionadas, uma brasileira (iCMT_F2) e outra inglesa (iCMT_F7).

Ambos os pacientes apresentaram fenótipo semelhante caracterizado por uma neuropatia sensitivo e motora, clinicamente com franco predomínio motor, com início na segunda década de vida. O padrão de distribuição foi comprimento dependente e as velocidades de condução dos nervos motores nos membros superiores se encontravam na faixa intermediária. A progressão foi lenta ao longo de

décadas em ambos os casos. O fenótipo de estava de acordo com os relatos disponíveis na literatura acerca dessa mutação (LATOURET et al., 2010).

O gene AARS é um dos quatro genes que codificam uma aminoacil-tRNA sintetase (ARS) aos quais mutações causadoras de CMT (GARS – CMT2D, YARS – CMTD1C, AARS – CMT2N, KARS – CMT1B) (ANTONELLIS et al., 2003; JORDANOVA et al., 2006; LATOURET et al., 2010; MCLAUGHLIN et al., 2010). As ARSs são enzimas expressas em todas as células do organismo humano e são responsáveis por ligar aminoácidos específicos a molécula correspondentes de tRNA no citoplasma e na mitocôndria, assim completando a primeira etapa do processo de translação (ANTONELLIS et al., 2008).

A mutação p.Arg329His foi reportada pela primeira vez em 2010 (LATOURET et al., 2010) e desde então inúmeras publicações com populações não relacionadas relataram a recorrência dessa mutação específica. Antonellis *et al.* demonstraram que a patogenidade dessa mutação se deve a perda de função devido a falha no processo de deaminação mediada pela metilação do dinucleotídeo CpG (MCLAUGHLIN et al. 2012).

5.4 CMT2F4 E CMT2F8

Foi identificada na família CMT2F8 uma mutação heterozigota composta no gene MME (p.Leu156fs14Ter, p.Gly558Ser) como sendo a causa do fenótipo apresentado (neuropatia axonal de início tardio). As mutações identificadas estavam presentes nas duas irmãs afetadas e a análise do DNA parental demonstrou estarem presentes em alelos diferentes. O fenótipo apresentado pelas irmãs, a concordância fenotípica, a ausência no banco de dados de populações normais suporta a patogenidade da mutação nova e corrobora o diagnóstico de CMT2T.

Mutações no gene MME (metaloendopeptidase) têm sido reportadas como causa de formas dominantes e recessivas de CMT2 de início tardio e de formas dominantes de ataxia espinocerebelar do tipo 43 (DEPOND et al., 2016; HIGUCHI et al., 2016, AUER-GRUMBACH et al., 2016).

Higuchi *et al.* identificaram 10 pacientes com mutação em homozigose (*missense* e *nonsense*) no gene MME como a causa de CMT2 de início tardio (idade de início dos sintomas variando de 36 a 56 anos). O fenótipo apresentado era de fraqueza, atrofia e perda de sensibilidade nos membros inferiores. A velocidade de

condução no nervo mediano variava de 37.4 a 53 m/s (HIGUCHI et al., 2016). Ainda nesse estudo os autores propuseram que mutações no gene MME são a causa mais frequente de CMT2 recessivo de início tardio no Japão. O quadro clínico descrito é compatível com o observado no caso índice.

O gene MME codifica a enzima neprilisina (NEP), que é uma enzima envolvida no processo de degradação de uma grande variedade de neuropeptídeos. NEP é expressa no sistema nervoso central e periférico. Sua função no SNP é desconhecida, enquanto no SNC é a enzima mais importante no processo de degradação da proteína beta-amilóide (KIOUSSI et al., 1991; KIOUSSI et al., 1992, TURNER et al., 2001). Os autores demonstraram a ausência ou a diminuição significativa na expressão de NEP no nervo periférico dos pacientes com CMT (HIGUCHI et al., 2016).

A família iCMT_F4 apresenta um quadro de neuropatia sensitivo motora com início tardio cujas velocidades de condução estão na faixa intermediária. O heredograma sugere um padrão de herança claramente recessivo. No entanto, a variante identificada nessa família se apresenta em homozigose apenas no caso índice. Os demais indivíduos afetados apresentam a variante em heterozigose. Esse fato tornou a interpretação dessa variante mais complexa e difícil e se baseou principalmente no trabalho de Auer-Grumbach *et al.*, no qual os autores associaram a presença de variantes raras ao desenvolvimento de CMT2 tardio (AUER-GRUMBACH et al, 2016).

Auer-Grumbach *et al.* avaliaram 28 indivíduos (22 com diagnóstico de CMT) de 19 famílias diferentes portadoras de variantes em heterozigose no gene MME. Os pacientes afetados apresentaram uma neuropatia com início na quarta década de vida (início dos sintomas variando de 30 a 80 anos de idade). A maioria dos pacientes referia hipoestesia e parestesias nos artelhos como manifestação inicial que posteriormente ascendia até joelhos. Após alguns anos os pacientes apresentavam fraqueza nos membros inferiores. Pacientes com idade avançada apresentavam deterioração clínica significativa e eventualmente ficaram restritos a cadeira de rodas. O estudo da condução evidenciou uma neuropatia sensitivo e motora axonal (AUER-GRUMBACH et al, 2016). Nesse estudo os autores identificaram 11 mutações no gene MME (7 mutações *nonsense* e 4 mutações *missense*).

Entre as famílias apresentadas houve grande variedade na gravidade dos sintomas apresentados pelos indivíduos incluídos, variando de alterações exclusivamente sensitivas, ataxia, alterações exclusivamente motoras e uma paciente que era uma carreadora obrigatória que faleceu aos 80 anos sem qualquer queixa. Os autores argumentaram que a justificativa para essa grande variabilidade observada nessas famílias se deva a penetrância dependente da idade, as quais exibem assim penetrância incompleta. A variante encontrada na família iCMT_F4 (p.Leu156fs14Ter) foi reportada em 2 indivíduos de famílias independentes no estudo de Auer-Grumbach *et al.* (AUER-GRUMBACH *et al.*, 2016). Nesse estudo, os autores demonstraram que pacientes carregando essa mutação (p.Leu156fs14Ter) em heterozigose não apresentaram depósito amilóide no nervo periférico e que os níveis de atividade de NEP em gordura e sangue estavam significativamente reduzidos. Finalmente, os autores compararam a frequência agregada das variantes no gene MME e a frequência de variantes em um grupo controle (*burden testing*) e demonstraram uma associação significativa entre variantes com perda da função no gene MME e CMT2 de início tardio (AUER-GRUMBACH *et al.*, 2016). A identificação dessa família dá suporte ao trabalho de Auer-Grumbach *et al.*, em que a presença de variantes raras no gene MME estão relacionadas ao desenvolvimento de CMT2 de início tardio. No entanto, estudos adicionais em pacientes com CMT2 de início tardio precisam de ser conduzidos.

5.5 iCMT_F8

O caso índice da família iCMT_F8 apresentou uma forma de CMT de início tardio com redução das velocidades de condução na faixa intermediária. Embora os pais fossem consanguíneos nenhuma mutação recessiva foi identificada em algum gene CMT-relacionado. A variante identificada no gene MPZ (p.Ala29Val) é nova, não está presente no banco de dados de populações normais e a análise computacional prediz essa variante como deletéria.

Mutações no gene MPZ têm sido relacionadas a formas dominantes (CMT1B, CMT2J, CMTID, neuropatia hipomielinizante congênita) e a formas recessivas de CMT (neuropatia hipomielinizante congênita).

É bem estabelecido a associação de mutações no gene MPZ a formas dominantes de CMT com redução das velocidades de condução na faixa

intermediária (CMTID)(BANCHS et al., 2010). Em geral há grande variabilidade na gravidade do quadro e na variação das velocidades de condução (variando de 33 a 48 m/s). Analisando esses dados em conjunto, acreditamos que essa variante seja provavelmente patogénica e justifique os achados no caso índice.

5.6 dHMN_F1

O caso índice da família dHMN_F1 foi avaliado por apresentar um quadro de uma neuropatia motora hereditária com sinais de liberação piramidal. Foi identificada uma mutação heterozigota composta no gene *VRK1*, ampliando assim o espectro das doenças relacionadas a esse gene.

Classicamente, pacientes com mutação no gene *VRK1* apresentam um quadro complexo com início precoce de SMA associado a hipotrofia ponto cerebelar e microcefalia (RENBAUM et al., 2009). O envolvimento do sistema nervoso central é a característica principal dessa doença, que é rara e geralmente fatal. Mais recentemente, entretanto, fenótipos menos graves caracterizados por uma neuropatia axonal complexa e esclerose lateral amiotrófica (ELA) foram associados com mutações bialélicas no *VRK1* (GONZAGA-JAUREGUI et al., 2013; NGUYEN et al., 2015; RENBAUM et al., 2009). Adicionalmente, 2 irmãos carregando duas variantes *missense* em alelos diferentes foram descritos com neuropatia axonal associado a microcefalia (GONZAGA-JAUREGUI et al., 2013), e mutações heterozigotas compostas foram associadas com SMA de início adulto e doença do neurônio motor e microcefalia com início infantil (VINOGRAD-BYK et al., 2015). Através do sequenciamento de todo exoma foi identificada uma alteração bialélica no gene *VRK1* como provável causa do fenótipo observado nessa paciente.

Em contraste aos casos acima relatados, a paciente não apresentava microcefalia ou HPC e foi fenotipicamente classificada como portadora de uma neuropatia motora com envolvimento preferencial dos membros inferiores e sinais de envolvimento do neurônio motor superior. O fenótipo observado é similar ao relatado por Nguyen *et al.* (NGUYEN et al., 2015), cuja paciente apresentava duas mutações *missense* (p.His119Arg and p.Arg321Cys) no *VRK1* e o paciente apresentou fraqueza progressiva nos membros inferiores associado a sinais de envolvimento do neurônio motor superior. No entanto, os autores classificaram o paciente como ELA de início precoce. O estudo da condução sensitivo e motora foi normal e a

eletromiografia evidenciou sinais de instabilidade da membrana muscular (fibrilações, ondas agudas positivas, descargas rápidas complexas e fasciculações) associadamente a sinais de desnervação crônica nos membros inferiores similar ao observado no caso acima descrito. Foi realizado um RM dos membros inferiores e o compartimento anterolateral estava relativamente preservada como observado nos pacientes com dHMN devido as mutações nos genes da *família heat shock* (HSPB1, HSPB3 e HSPB8).

A mutação p.Arg358X é uma mutação nonsense reportada primeiramente por Renbaum et al., que causa a ausência da proteína VRK1 no núcleo celular (RENBAUM et al., 2009, VINOGRAD-BYK et al., 2015). A proteína serina/treonina quinase codificada pelo *VRK1* é expressa em diversos tecidos e se localiza no núcleo celular (LOPEZ-BORGES et al., 2000), com altas taxas de expressão em células mitóticas (GONZAGA-JAUREGUI et al., 2013). Essa proteína é crítica para o desenvolvimento do sistema nervoso central nas fases embrionárias (VINOGRAD-BYK et al., 2015; GONZAGA-JAUREGUI et al., 2013) e importante para migração neuronal pós mitótica (VINOGRAD-BYK et al., 2015).

VRK1 está envolvido em uma grande variedade de processos celulares, pois ele faz a fosforilação reversa de múltiplos fatores transcricionais envolvidos no processo de progressão celular (p53, CREB, Mdm2, ATF-2, c-JUN) (Valbuena A, 2011). Estudos recentes, sugerem que VRK1 mutada afeta a expressão de genes associados com a via da Relina, uma via sabidamente conhecida por desempenhar um importante papel no processo de migração do neurônio motor na medula espinal durante a fase embrionária de desenvolvimento do sistema nervoso (HAWTHORNE et al., 2014). Esse caso aumenta a variabilidade fenotípica VRK1-relacionadas, por poder também causar um quadro de dHMN com sinais de liberação piramidal e envolvimento preferencial do compartimento posterior da perna. Curiosamente o padrão observado na RM demonstrou um envolvimento preferencial dos músculos com inervação comum da raiz S1. Embora meramente especulativo isso pode sinalizar um processo de degeneração do corpo do neurônio motor no sentido podocefálico, o sentido inverso observado no processo de migração mediado pelo sistema Relina.

5.7 dHMN_F3

O paciente índice apresentou um quadro de fraqueza distal com envolvimento preferencial dos membros superiores associado a espasticidade e sinais de liberação piramidal devido a uma mutação em homozigose no gene SIGMAR1. O estudo eletrofisiológico foi compatível com uma neuropatia motora distal não comprimento-dependente. O fenótipo do paciente foi compatível com a descrição observada na síndrome Silver, exceto pelo padrão de herança ser provavelmente AR (baseado na história de consanguinidade dos pais).

A patogenicidade dessa mutação se baseia na análise *in silico* e na similaridade fenotípica observada nos casos previamente relatados em associação a mutações no gene SIGMAR1 (LI X et al., 2015, HORGHA et al., 2016).

Mutações bialélicas no gene receptor intracelular não opióide sigma 1 (SIGMAR1) têm sido reportadas como causa de dHMN e esclerose lateral amiotrófica juvenil (ELAj) (LI et al., 2015; AL-SAIF et al., 2011). SIGMAR1 codifica o receptor sigma1, uma chaperone do retículo endoplasmático (RE) que se localiza nas mitocôndrias, especificamente associadas a membrana do RE (HAYASHI et al., 2007). Ela está envolvida em uma grande gama de processos celulares, incluindo a sinalização mediada por Ca^{2+} entre o RE e a mitocôndria. Ela é expressa nos neurônios motores do tronco e da medula espinal. Alguns estudos demonstraram que a perda da função do receptor sigma-1 causa perda da conexão entre a mitocôndria e o RE interrompendo o transporte axonal, levando a degeneração axonal e morte celular (BERNARD-MARISSAL et al., 2015). Essa degeneração distal-proximal (*dying-back*), é consistente com o envolvimento predominantemente distal da fraqueza, no entanto não explicaria o envolvimento preferencial dos membros superiores.

Como no caso índice, indivíduos afetados por mutações no gene SIGMAR1 podem apresentar uma combinação entre fraqueza nos membros superiores (com ou sem envolvimento dos membros inferiores) e sinais piramidais nos membros inferiores. Al-Saif *et al.* e Horga *et al.* relataram o envolvimento preferencial da musculatura extensora dos antebraços associadamente a sinais de liberação piramidal nos membros inferiores (AL-SAIF et al., 2011, HORGHA et al., 2016), característica essa não observada no caso índice.

Finalmente o fenótipo clínico apresentado pelo paciente é compatível com o fenótipo observado na síndrome Silver. Essa síndrome foi reportada devido a mutações em heterozigose no gene BSCL2. Essa doença é alelica a dHMN tipo 5, porém diverge devido a presença de espasticidade. Esse relato acrescenta mutações em homozigose no gene SIGMAR1 as causas de síndrome Silver. Horga et al. descreveram um caso em que o paciente apresentava uma síndrome que os autores definiram como Silver-like, em que o paciente apresentava dHMN com sinais de liberação piramidal, espasticidade nos membros inferiores e nos membros superiores os músculos extensores dos antebraços são mais gravemente afetados que os flexores (Horga et al., 2016).

5.8 HSN_F2

O paciente índice apresentou um quadro de insensibilidade congênita a dor, acro mutilações e úlceras recorrentes devido a uma mutação heterozigota composta no gene FLVCR1. O fenótipo clássico associado a mutações nesse gene é de ataxia cordonal posterior associado a retinite pigmentosa. Achados adicionais têm sido relatados em grau variado e incluem acalásia, escoliose, neuropatia sensitiva, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e hipersinal do cardão posterior da medula observado na RM (CASTORI et al., 2017; SHAIANI et al., 2015; YANATORI et al., 2012; ISHIURA et al., 2011; RAJADHYAKSHA et al., 2010).

A patogenicidade das variantes encontradas no caso índice se baseia na ausência de variantes em homozigose no gene FLVCR1 no GenomAD (124064 indivíduos), na análise *in silico* predizer efeito deletério e nas similaridades fenotípicas observadas em pacientes com quadros decorrentes de mutações nesse gene. Recentemente, Chiabrando et al. relataram pacientes apresentando insensibilidade congênita a dor devido a degeneração de neurônios sensitivos (CHIABRANDO et al., 2016). Adicionalmente, o paciente índice apresentava um fenômeno de reabsorção dos dedos das mãos e dos pés e úlceras recorrentes de difícil cicatrização também relatado em associação aos quadros relacionados a mutações no gene FLVCR1.

A perda de sensibilidade a dor é o indicador clínico das doenças degenerativas envolvendo fibras sensitivas do SNP. A ausência do reflexo de defesa a estímulos nocivos causa o aparecimento de lesões e úlceras crônicas o que pode

justificar lesões recorrentes. O envolvimento massivo das fibras de grosso e fino calibre distingue as neuropatias sensitivas dos quadros de insensibilidade congênita a dor associados as canalopatias (ROTTHIER et al., 2012).

O FLVCR1 é um heme transportador expresso em diferentes tecidos, fazendo parte da família principal de transportadores. Duas isoformas diferentes já foram descritas: FLVCR1a que se localiza na membrana plasmática e é responsável pela desintoxicação do heme em diferentes tipos celulares (progenitores eritróides, endotélio, hepatócito, linfócito e células intestinais), e FLVCR1b que se localiza na mitocôndria e está envolvido no transporte de hemes recém sintetizados da mitocondrial ao citosol.

A expressão de ambas as isoformas é necessária para o controle da quantidade citoplasmática de heme livre, que é fundamental para diversas funções metabólicas como: transporte e armazenamento de oxigênio, transferências de elétrons, metabolismo de esteróides, transdução e processamento de microRNA (CHIABRANDO D, 2014). Excesso de heme livre é deletério devido a sua habilidade de promover estresse oxidativo, inibir proteossoma e causar disfunção mitocondrial, levando em última análise a morte celular. Por essa razão, a quantidade intracelular de heme livre é finamente regulada em múltiplos níveis e o transporte mediado pela isoforma a contribui para esse processo. Chiabrando D et al. demonstraram que pacientes com mutações no gene FLVCR1 e fenótipo de insensibilidade a dor (deneração das fibras sensitivas) apresentam a atividade de exportação do heme significativamente diminuídas. O excesso de heme potencializa o estresse oxidativo e aumenta a apoptose celular.

Chiabrando D, 2016 et al. relataram 2 pacientes com ausência de resposta a estímulos dolorosos, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, hipermobilidade ligamentar, escoliose, úlceras e mutilações em mãos. O estudo eletrofisiológico desses pacientes evidenciou ausência de PAS em um indivíduo e PAS extremamente reduzidos no outro. Eles apresentavam lesões de difícil cicatrização que evoluíam para atrofia de pele. Com a evolução da doença apresentaram degeneração retiniana e atrofia óptica. Um dos pacientes apresentou distrofia ungueal e acroosteólise com reabsorção óssea e de partes moles. Ambos os pacientes possuíam uma mutação heterozigota composta pela combinação de uma mutação *missense* e uma *nonsense*, (p.Cys192Arg, p.Tyr442Leufs*7 e p.Met204Cysfs*56, p.Pro221Ser)(CHIABRANDO et al., 2016).

O paciente índice apresenta um fenótipo aparentemente mais grave com fenômeno de reabsorção mais intenso, isso pode ser decorrente de ele possuir duas variantes nonsense ao invés dos casos apresentados com a presença de uma mutação nonsense e uma *missense*.

Adicionalmente camundongos FLVCR1-knockout apresentam um quadro grave e incompatível com a vida caracterizado por deficiência de eritropoese e deformidades cranianas e de membros como observado na síndrome Diamond-Blackfan (KEEL et al., 2008).

Embora não tenhamos indícios que favoreçam a patogenicidade da mutação localizada no sítio de *splicing* os dados acima descritos suportam a patogenicidade dessas variantes no caso apresentado e ampliam o fenótipo das neuropatias sensitivas associadas as mutações no gene FLVCR1.

Esse estudo demonstrou a utilidade do WES no diagnóstico molecular de pacientes com neuropatia hereditária, confirmando as observações de outros trabalhos com neuropatia hereditária que sugerem seu uso na prática clínica (DREW et al., 2015; HARTLEY et al., 2017; LUPO et al., 2016; WALSH et al., 2017, KLEIN et al., 2014; SCHABHUTTL et al., 2014). Como acima discutido em detalhes, ele permitiu a definição diagnóstica em casos com mutações em genes conhecidos (*SH3TC2*, *MPZ*, *GDAP1*, *AARS*) e permitiu a definição diagnóstica em casos com mutações em genes ainda pouco conhecidos aumentando a compreensão fenotípica a eles relacionada (*VRK1*, *SIGMAR1*, *DRP2*, *IGHMBP2*). Não resta dúvidas que o WES apresenta uma infinidade de desafios a serem resolvidos antes de sua implementação definitiva na prática clínica.

Nesse contexto, o uso de painéis multigênicos têm se mostrado uma alternativa viável para o sequenciamento massivo de quantidades limitadas de genes predeterminados de acordo com a epidemiologia local. Seu uso apresenta algumas vantagens quando comparada ao WES como custo menor e maior facilidade para armazenamento e análise dos dados. A principal desvantagem é a análise restrita dos genes inclusos no painel com consequente menor taxa de resultados positivos, ao passo que o WES possibilita a análise de todo exoma em uma única vez e apresenta uma taxa maior de resultados positivos. Nesse estudo, 5 dos 13 (38.4%) pacientes (CMT2_F5, CMT2_F8, CMT2_F12, dHMN_F1 e HSN_F2) cujo diagnóstico molecular foi definido com WES haviam realizado painel multigênico específico previamente ao WES sem definição diagnóstica. Adicionalmente a

paciente HSN_F3, com quadro de pandisautonomia, foi submetida apenas a sequenciamento do painel para HSN com resultado negativo. Acrescenta-se ainda o paciente índice da família CMT2_F12 (neuropatia axonal grave com disautonomia restrita ao trato gastrointestinal secundária a uma mutação em homozigose no gene IGHMBP2) que foi primeiramente submetida ao WES sem determinação da causa de sua neuropatia. Uma análise da qualidade de sequenciamento evidenciou uma cobertura insatisfatória para vários genes incluídos no painel de CMT2 e dHMN, assim nesse caso específico se optou por realizar o painel após o resultado negativo do WES e o mesmo foi capaz de identificar uma variante em homozigose que havia sido erroneamente identificada pelo WES como heterozigota por baixa cobertura na região em que a mutação estava localizada. Essas características devem ser ponderadas na escolha de qual método utilizar uma vez que os custos do sequenciamento de painéis multigênicos e WES têm se equiparado e a capacidade de arquivamento e processamento de dados tem aumentado exponencialmente. Alternativas, como a realizada nesse estudo de criar “painéis virtuais”, nos quais uma lista de genes relacionados a fenótipos específicos é primeiramente analisada antes da análise completa dos dados do WES sistematizam os mecanismos de filtragem e criam uma situação confortável uma vez que caso o resultado seja negativo uma reanálise pode ser feita a qualquer momento sem custos adicionais.

Isso tudo considerando que o diagnóstico molecular causa impacto direto nas estratégias para manejo de pacientes com doenças genéticas, pois permite: aconselhamento genético adequado com a possibilidade de diagnóstico pré-implantacional, acesso a material educativo pelos pacientes e seus familiares e disponibiliza o acesso a grupos de apoio. Ademais, evita a realização de exames desnecessários (incluindo procedimento invasivos e caros) e permite a organização de avaliação apropriada (interconsulta oftalmológica, cardiológica, ortopédica). O reconhecimento correto da doença em nível molecular permite a instituição de terapias direcionadas baseadas no genótipo e permite estabelecer critérios de elegibilidade para participação de ensaios clínicos.

Para tal, a interpretação dos dados obtidos com NGS precisam de ser transformados em informação clinicamente relevantes ao paciente. A identificação de alelos relacionados à doença dentre os antecedentes de polimorfismos e em meio aos erros de sequenciamento permanece sendo o grande obstáculo, que para ser superado necessita de adequada interpretação de informações referentes a

indivíduos normais (sem qualquer doença), o conhecimento sobre variantes em genes recessivos e mutações com penetrância incompleta. Entretanto cada genoma possui milhares de variantes preditas como patogênicas e para as quais não se conhece a real função. Estudos multicêntricos são necessário para o estabelecimento de bancos de dados que permitiram a correlação fenótipo genótipo.

Embora haja diversos relatos sobre variações no número de cópias em *locus* CMT-relacionados elas são extremamente raras como causa de neuropatia, excluídas as alterações no cromossomo 17 relacionadas ao CMT1A e HNPP. Três estudos independentes foram realizados utilizando a técnica de aCHG para analisar a contribuição das CNV na etiologia das neuropatias hereditárias e todos concluíram que esse tipo de mecanismo é raro nas neuropatias hereditárias (HOYER et al., 2015; HUANG et al., 2010; PAHLIVAN et al., 2016). Embora raro, variações estruturais devem ser consideradas no processo de investigação das neuropatias hereditárias e a integração de ferramentas que possibilitem a análise desse tipo de alteração no material genômico obtido com NGS será uma ferramenta interessante.

Finalmente, a presença de variantes comuns em doenças complexas são difíceis de serem analisadas com base exclusivamente nos dados genômicos, uma vez que um fator de risco para uma doença específica pode ser influenciado por vários genes com variantes raras ou comuns. Traços complexos são geneticamente heterogêneos e grande número de amostras são necessárias para gerar poder estatístico suficiente para identificar variantes associadas. Doenças clinicamente semelhantes podem ser influenciadas por fatores genéticos bastante diferentes.

É extremamente difícil de determinar inequivocamente o impacto de variantes raras (<5%) sobre genes. Atualmente o método mais robusto de estabelecer a associação de variantes raras com fenótipos específicos é através da análise de segregação da variante. Entretanto familiares nem sempre estão disponíveis para análise, não raro o padrão de herança não é claro. Por exemplo, variantes em 2 genes diferentes (herança digênica) podem se manifestar como um traço que segrega de maneira recessiva. Estudos de associação em indivíduos não pertencentes a uma mesma família com mesmo fenótipo a procura de variantes raras em *locus* específicos.

Esse estudo demonstrou a efetividade do uso de WES para diagnóstico de pacientes com CMT. WES tem permitido a associação de um número crescente de genes novos às neuropatias hereditárias.

6. CONCLUSÕES

1. Este estudo confirma que o WES é uma ferramenta efetiva no diagnóstico das neuropatias hereditárias.
2. Foram identificadas mutações conhecidas (*SH3TC2*, *AARS*, *MME* e *GDAP1*) e variantes novas provavelmente patogênicas em genes classicamente relacionados a CMT (*MPZ*) e em genes recentemente descritos em associação a CMT ou fenótipos complexos (*KIF1A*, *DRP2*, *IGHMBP2*, *VRK1*, *SIGMAR1*, *FLVCR1*).
3. A descoberta das variantes novas ampliou a lista de variantes com potencial deletério aos genes *GDAP1*, *DRP2*, *IGHMBP2*, *MPZ*, *MME*, *SIGMAR1*, *FLVCR1* e *VRK1*.
4. Expandiu os fenótipos relacionados as mutações nos genes *VRK1*, *FLVCR1*, *IGHMBP2* e *KIF1A*. A saber, *VRK1* mutado pode causar uma dHMN com sinais de liberação piramidal e envolvimento preferencial do compartimento posterior da perna; *FLVCR1* mutado pode causar quadro um fenótipo grave de insensibilidade congênita a dor e acromutilações, *IGHMBP2* pode causar a sobreposição SMARD1/CMT2S associadamente a disautonomia restrita ao TGI e acrescenta TEA as manifestações KIF1A-relacionadas.
5. Trouxe evidências adicionais que suportam a associação de variantes raras em heterozigose no gene *MME* ao desenvolvimento de CMT2 tardio.

APÊNDICE A

EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA extraído no CMG foi realizado a partir de 4 mL de sangue total coletados em tubo de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). O material foi centrifugado a 2.000xg, durante 10 minutos para formação de *buffy coat*. Em seguida, 300µL do *buffy coat* eram recolhidos e adicionados a primeira célula do cartucho do aparelho de extração Maxwell da Promega®, seguido pelo protocolo de extração do fabricante, através do uso de *beads* magnéticas. Após a extração o DNA era quantificado e armazenado a 20°C negativos.

Para DNA extraído no ION, o sangue foi armazenado em tubos de EDTA. O DNA foi extraído utilizando o kit FlexiGene® (Quiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Nesse processo, 300µL de sangue são adicionados a 750µL de tampão (FG1), para lise celular. A amostra é centrifugada por 20 segundos a 10.000xg. O sobrenadante é descartado, ficando apenas o material precipitado. Adiciona-se, então 150µL de tampão (FG2 – com uma protease), e se agita o tubo para homogeneização do material. A amostra é centrifugada novamente por 5 segundos e depois colocada num bloco de aquecimento a 65°C por 5 minutos. Nesse momento, 150µL de isopropanolol (100%) são adicionados e o tubo homogeneizado novamente para precipitação do DNA. A amostra é centrifugada por 3 minutos a 10.000xg e o sobrenadante é descartado e o material precipitado passa por um processo de secagem em temperatura ambiente. São então adicionados 200µL de tampão (FG3) e a amostra é agitada usando o equipamento vórtex por 5 segundos. O DNA é então dissolvido por aquecimento da amostra a 65°C em um bloco de aquecimento (<https://www.qiagen.com>).

QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A quantificação do DNA foi realizada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop® com software ND-2000. Nessa metodologia, são captadas as medidas de absorbância das moléculas em um comprimento de onda específico. O DNA absorve a 260nm. Assim, para controle de qualidade, se calcula a razão de

absorbância entre 260/280nm e 260/230nm, valores entre 2-2,2 denotam DNA puro e valores menores indicam a presença de contaminantes. Para cada análise foi utilizado 1µL de solução. Adicionalmente obtivemos a concentração de DNA em cada amostra em ng/µL.

DESENHO DOS PRIMERS

Primeiramente foi realizada uma PCR *in silico* para avaliar se o par de *primers* desenhado automaticamente com o Primer 3 é efetivo e contem a sequencia desejada (<https://genome.ucsc.edu>). Para garantir que não havia um número excessivo de SNPs em cada primer foi aplicado a ferramenta SNPCheck3 (<http://www.snpcheck.net>). Isso se deve ao fato de que a presença de SNPs nos *primers* pode levar ao sequenciamento de áreas similares longe do *locus* alvo, ou ainda perder variantes localizadas nas posições próximas aos sítios de amplificação dos *primers*. Finalmente realizamos uma busca em outras regiões do DNA que possuam 95% ou mais de similaridade em ao menos 25 bp, assim evitamos (quando possível) a utilização de pares de *primers* que amplifiquem muitas regiões que possuam homologia com a área de interesse, para tal utilizamos a ferramenta BLAT (<https://genome.ucsc.edu>).

REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE (PCR)

As reações de PCR foram realizadas utilizando AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA), com DNA a uma diluição 10pmol/µL, com uma temperatura de anelamento de 58°C, conforme abaixo (Tabela 1.4.1 e 1.4.2).

Tabela 1.4.1 Protocolo PCR

	Para cada amostra
2X Master Mix	12.5ul
10uM Primer F	1ul
10uM Primer R	1ul
dH2O	9.5ul
DNA	1ul
	25ul total

- O DNA deve estar a uma concentração de 10pmol/µL.

- Os primers devem ser diluídos para 200uM.

Tabela 1.4.2 Protocolo dos ciclos térmicos para amplificação da PCR. Min = minutos, C = Celsius, s = segundos

95°C 15 min	95°C 30s	72°C 10 min	4°C - indefinidamente
	58°C 30s		
	72°C 45s (x30)		

Fonte: elaborado pelo autor.

PROTOCOLO ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

O gel é preparado utilizando agarose ultrapura e solução TBE (1X). Para produção da solução tampão TBE (10X) são diluídos 121.1 gr de trisma, 61.8 gr de ácido bórico e 7.4 gr de ácido etilenodiaminotetracético em 1L de água destilada (dH₂O). Para transforma a solução TBE (10X) em TBE (1X), a solução é diluída em dH₂O nessa proporção.

Para produção do gel é adicionado 75mL de TBE (1X) a 1 gr de agarose ultrapura. Após, essa solução é colocada em um forno de micro ondas por 5 minutos e posteriormente resfriada para que seja então adicionado 2ul de brometo de etídio (EtBr). Após, ainda em fase líquida o gel é despejado sobre a cuba de eletroforese horizontal e as barras de marcação são posicionadas antes que o gel endureça. Após resfriada, as barras são retiradas e a cuba é coberta com TBE (1X), alguns milímetros acima, garantindo que todas as células estejam cobertas com a solução tampão.

Nesse momento, aplica-se 3ul da solução de PCR a 3ul de corante laranja em cada célula da cuba de eletroforese, que devem homogeneizados.

As amostras são colocadas no lado negativo da placa. A máquina é então ligada a uma voltagem de 60mV por aproximadamente 25-30 minutos. Após a placa é levada ao transiluminador UV para leitura.

PURIFICAÇÃO DO PRODUTO OBTIDO COM A PCR

Foi realizado o método de purificação enzimática, o qual é feito com uma mistura de fosfatase alcalina rápida (*Fast*, *Thermo Fischer Scientific*) e exonuclease I (*Thermo Fischer Scientific*). A fosfatase alcalina remove desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP) e a exonuclease remove as cadeias únicas de DNA (ssDNA). A

mistura é preparada pela adição de 50µL de Exonuclease I, 200µL de Fast e 750µL de água pura. A solução é armazenada a 20°C negativos.

Assim, 5µL do produto da PCR é homogeneizado com 2µL da solução enzimática para purificação do DNA. Sendo então colocado em termo ciclador (máquina de PCR) a 37°C por 30 minutos seguido de 80°C por 15 minutos. O material obtido está pronto para ser utilizado na reação de sequenciamento.

SEQUENCIAMENTO DO DNA

Antes que um fragmento de DNA de interesse seja sequenciado, ele deve ser desnaturado em cadeias simples através de aquecimento e ser novamente amplificado (Tabela 1.7.1).

Para sequenciamento de cada amostra, é necessário 2ul de *Sequencing Buffer 5x BigDye (Thermo Fischer Scientific)*, 2.5ul de água auto clavada, 1ul primer *Forward* ou *Reverse* (na concentração de 3.2 uM), 0.5ul *Big Dye Terminator v3.1 (Thermo Fischer Scientific)*, 4ul do produto da PCR purificado (conforme explicado no item 1.6), sendo então adicionados 10ul por célula.

Tabela 1.7.1 Protocolo dos ciclos térmicos para amplificação do DNA. Min = minutos, C = Celsius, s = segundos

96°C 10s	4°C indefinidamente
50°C 5s	
60°C 4 min	
(25x)	

Fonte: elaborado pelo autor.

O sequenciamento do DNA é obtido a partir da síntese do DNA complementar do produto da PCR utilizando deoxinucleotideo trifosfatado (dNPT) e deoxinucleotideo trifosfatado marcado por fluorescência (ddNPT). O ddNPT determina a parada da síntese do DNA e gera um sinal fluorescente. O sinal gerado depende de qual ddNPT foi incorporado, assim cada nucleotídeo é sinalizado com uma cor diferente permitindo a leitura.

PURIFICAÇÃO DO MATERIAL PARA SEQUENCIAMENTO

Uma solução de Sephadex é preparada pela adição de 2.9 gr de *Sephadex G-50 powder* (*Sigma-Aldrich*) a 40 ml de água auto clavada. Essa solução é misturada e deixada em temperatura ambiente por 30 minutos para hidratação. Após, 350ul da solução de *Sephadex* são pipetadas em cada célula de uma placa de filtragem *Corning FiltrEX* 96 (0.66 mm de filtro de fibra de vidro). Essa placa é colocada sobre uma placa de coleta vazia e centrifugada por 3 minutos a 700xg. A placa *Corning FiltrEX* é então colocada sobre uma nova placa e todo material obtido da reação de sequenciamento é pipetado sobre as colunas de *Sephadex* e centrifugados novamente por 5 minutos a 910xg. O material filtrado será colocado no sequenciador.

APÊNDICE B

CONTROLE DE QUALIDADE

Os dados gerados pelo sequenciamento do DNA são armazenados em um arquivo '.fastq'. Esse arquivo é gerado em formato de texto e contém a sequência nucleotídica gerada e o escore de qualidade correspondente a cada um dos fragmentos gerados. Esse escore (Phred) representa a certeza com que cada base foi identificada, assim indicando a probabilidade de que uma base tenha sido identificada incorretamente.

O escore de qualidade de uma base específica, Q , é definido pela equação: $Q = -10\log_{10}(e)$ onde "e" representa a probabilidade estimada de que uma base foi identificada erroneamente. Assim, um escore de qualidade alto indica uma menor chance de erro. Um valor de $Q20$, por exemplo, corresponde a uma probabilidade de erro de 1 em 100, enquanto um valor de $Q30$ prediz um erro a cada 1000 (Tabela 1.1.1). Na realidade escores Phred maiores que 40 são infrequentes e um número mínimo de 20 é comumente utilizado.

Tabela 1.1.1. Escores de qualidade Phred

Escore de Qualidade	Probabilidade de identificação incorreta da base	Inferência da acurácia para identificação da base
10	1 em 10	90%
20	1 em 100	99%
30	1 em 1000	99.9%

Fonte: elaborado pelo autor.

A primeira análise dos dados brutos gerados é realizada utilizando uma ferramenta chamada FastQC. O FastQC realiza uma série de testes no arquivo fastq, para gerar um relatório (referente aos escores de qualidade) que seja compreensivo. Ele avalia a qualidade dos dados brutos considerando: o tamanho de

cada região sequenciada, o escore de qualidade por base sequenciada (Q), o escore de qualidade da sequência, a proporção GC da sequência, o número de sequências duplicadas e o número de sequências representadas inesperadamente.

ALINHAMENTO/MAPEAMENTO

Mapear as leituras geradas ao genoma de referência é a primeira e mais importante etapa para a maioria dos pipelines. A plataforma HiSeq 2000, por exemplo, produz mais de 6 bilhões de fragmentos (*paired-end reads*), com tamanho máximo de 2x100bp, o que equivale em última análise a 600Gb de dados. Devido ao grande número de fragmentos e ao grande tamanho do genoma de referência, algoritmos foram otimizados para melhorar a velocidade de processamento dos dados e o uso da memória dos computadores. Diferentes ferramentas de alinhamento possuem diferentes abordagens, todas com intuito de melhorar a acurácia e melhorar a capacidade de detectar os diferentes tipos de variações existentes no DNA.

Independentemente do tipo de ferramenta utilizada o alinhamento ocorre através de múltiplas etapas. Na primeira, são identificadas pequenas regiões da sequência de referência as quais muito provavelmente os fragmentos (sequências lidas) se alinharão de maneira acurada. Após, algoritmos de alinhamento mais lentos e mais precisos são aplicados a um subconjunto limitado de regiões identificadas no primeiro passo, que são os considerados possíveis sítios de ligação. Nesse processo, a maioria dos algoritmos constrói estruturas contendo dados complementares, chamados índices de informação, tanto para a sequência de referência quanto para os fragmentos lidos.

Adicionalmente há três aspectos dignos de nota. Primeiro, como os dados gerados são fragmentos curtos (100bp) há uma probabilidade considerável de que ocorra ambiguidade durante o processo de mapeamento ao genoma de referência. Para superar esse problema o sequenciamento *paired-end reads* é recomendado (Lee, 2012). Segundo, leituras que ocorrem com grande número de incompatibilidades devem ser desconsideradas e mutações nesses fragmentos devem ser descartadas. Finalmente, as NGS utilizam etapas de PCR para preparações de suas bibliotecas, assim, várias leituras originadas de uma única

região alvo podem ser sequenciadas, interferindo nas estatísticas da etapa de chamada de variantes. Por esse motivo, é prática comum remover as duplicatas de PCR após o alinhamento.

As ferramentas utilizadas para alinhamento dos dados obtidos com o genoma de referência, hg37, foram o Novoalign (www.novocraft.com) e o BWA (<http://bio-bwa.sourceforge.net>).

A ferramenta Novoalign aplica um algoritmo chamado Needleman-Wunsh, o qual divide a sequência completa em sequências menores e aplica a teoria de penalidades de lacunas (indel) para permitir a análise consecutiva dos espaços em um dado alinhamento, permitindo deleções de até 7 bp em *single-end read*, e maiores em *paired-end reads*. Novoalign permite o mapeamento de *paired-end reads* pois ele primeiro encontra o posicionamento de todas as leituras reais, as posiciona de acordo com as coordenadas do genoma de referência e depois analisa as sequências potenciais para parear as duas sequências a sequência de referência. O tamanho esperado para o alinhamento dessas sequências é de 300 bp. Adicionalmente, Novoalign calcula o score Phred de probabilidade de que o alinhamento de todo fragmento esteja incorreto. Essa probabilidade depende do tamanho do fragmento, no número de bases identificadas erroneamente e no número de lacunas e não singularidade da região dentro do genoma.

A ferramenta BWA é um software que faz o mapeamento de pequenas sequências ao genoma de referência que suporta o pareamento das *paired-end reads*. Ela consiste de 3 algoritmos: BWA-*backtrack*, BWA-SW e BWA-MEM. O primeiro faz alinhamento de dados obtidos das plataformas Illumina com até 100 bp em tamanho, os dois últimos fazem o alinhamento de sequências maiores (70 a 1000 bp) independente da plataforma usada. Todos algoritmos BWA alinham de maneira eficiente os dados obtidos mesmo quando existam pequenas lacunas ou até mesmo erros de leitura (<2%). Primeiramente ele identifica todas as posições das sequências com bom alinhamento e as classifica de acordo com as coordenadas cromossômicas e, em seguida, faz uma varredura linear em todos os possíveis pontos de alinhamento para emparelhar as sequências restantes. Ele gera um arquivo de saída SAM que pode depois ser utilizado para as análises subsequentes do pipeline (LI, 2009).

REMOÇÃO DE PCRS DUPLICADAS – SAMTOOL E PICARD

Samtools (<http://samtools.sourceforge.net/>) é um conjunto de ferramentas projetadas para manipular arquivos SAM e os arquivos binários BAM, que são gerados para as análises subsequentes do pipeline. O formato SAM define um formato de alinhamento genérico dos nucleotídeos que descreve o alinhamento de sequências grandes a uma sequência de referência (LI, 2009). O arquivos SAM são arquivos de texto delimitados por tabulação (tab) que contêm um cabeçalho com as informações sobre o projeto e sobre o genoma e uma sessão de informações sobre o alinhamento, como posição de mapeamento e informações sobre erros de leituras. A Samtools é utilizada para converter arquivos SAM/BAM e ordenar as sequências (organizando os arquivos de acordo com a coordenada mais para esquerda) e arquivando (gerando um arquivo complementar '.bai' que permite um acesso fácil e rápido aos arquivos BAM) os arquivos alinhados gerados pelo Novoalign.

Um artefacto técnico que ocorre com procedimentos de captura de sequências é a geração de leituras de DNA duplicadas (definidas como leituras com mesmo ponto de início e direção) que ocorrem devido a duplicações induzidas por PCR. Essas áreas de leitura compartilham a mesma sequência e o mesmo posicionamento no alinhamento ao genoma de referência. É essencial que essas sequências duplicadas sejam identificadas para que elas não influenciem o processo de nomeação das variantes. Os artefactos de PCR são removidos usando a ferramenta Picard (<http://sourceforge.net/projects/picard/>), que manipula os arquivos SAM e BAM. A Picard remove todos os pares de sequência com as mesmas coordenadas, mantendo apenas o par com o melhor escore de mapeamento. Os registros de alinhamento contidos nos arquivos SAM são analisados para que se localizem moléculas duplicadas gerando um novo arquivo que inclui as sequencias de leitura sem as sequencias duplicadas.

NOMEAÇÃO DAS SNPS

A nomeação das SNPs ocorre por comparação dos arquivos SAM/BAM ao genoma de referência. O resultado final é uma lista de SNPs, cada qual associada ao escore Phred, que leva em consideração os escores de mapeamento e de identificação de nucleotídeos, Essas informações são geradas em um arquivo '.VCF'

(*Variant Call Format*). A versão binária desse arquivo é o BCF, o qual mantém as mesmas informações do VCF, porém é mais eficiente para processamento de muitas amostras.

Para nomeação das SNPs (*SNP calling*) o pipeline utiliza as ferramentas Samtools e VCFtool (ION e CMG) ou FreeBayes (*John P. Hussman Institute for Human Genomics*), que são um conjunto de softwares para processamento dos arquivos VCF, incluindo a validação e comparação das SNPs identificadas (DANECEK, 2011).

A Samtools analisa as informações geradas pelo arquivo BAM, como número de sequências diferentes que compartilham a mesma diferença de leitura quando comparada ao genoma de referência, as mutações induzidas por PCR, os erros associados com as sequências lidas (escore Phred associado a cada base lida), o erro associado ao mapeamento (qualidade de mapeamento) e calcula a probabilidade dos dados gerados corresponderem ao genótipo, apresentando, por fim, esses dados no arquivo VCF/BCF. Bcftool realiza a nomeação das SNPs propriamente dita, quando o arquivo BCF é convertido para VCF, e apenas as SNPs localizadas nos exons alvos são incluídas.

A FreeBayes é um detector de variantes projetado para encontrar pequenas variações, especificamente SNPs, indels e alterações de múltiplos nucleotídeos. Ele usa os dados obtidos com o arquivos BAM, bem como os escores de qualidade. Ele determina qual a combinação mais provável do genótipo fornecido no arquivo BAM ao genoma de referência. Ele gera um arquivo VCF com as posições polimórficas (<https://wiki.gacrc.uga.edu/wiki/Freebayes>).

NOMEAÇÃO DE INDELS

Para nomear pequenas indels o pipeline da ION utilizou o programa Dindel que realinha as sequências obtidas a haplótipos candidatos (ALBERS, 2011). O programa considera todas as indels candidatas no arquivo BAM, e testa cada uma para ver quais são reais e quais são um erro de sequenciamento ou mapeamento.

Na primeira etapa, Dindel extrai todas as indels do arquivo BAM (indels candidatas) ao redor das quais as sequências de leitura serão realinhadas na terceira etapa. Nessa etapa, o Dindel também infere a distribuição do tamanho das inserções da biblioteca, essa informação será utilizada na terceira etapa para as

paired-end reads. Na segunda etapa, as indels candidatas obtidas na etapa 1 são agrupadas em janelas de aproximadamente 120 bp, em arquivo de realinhamento. Na terceira etapa, para cada janela, Dindel gera haplótipos candidatos para cada indel candidata detectada no arquivo BAM, e realinha as sequências a esses haplótipos candidatos. Essa é a etapa mais intensa do ponto de vista computacional. Na quarta etapa, é gerado um arquivo VCF com as indels e os escores de qualidade.

ANOTAÇÃO DAS VARIANTES

A ferramenta ANNOVAR realiza a anotação funcional das variantes identificadas incluindo SNPs, indels, substituições e CNVs (WANG, 2010). Ela fornece uma ampla variedade de técnicas para anotação, organizando-as em diferentes categorias: baseadas em genes, regiões ou filtros. Ele utiliza inúmeras bases de dados que precisam de ser armazenadas individualmente. Essa abordagem assegura que a versão mais adequada seja utilizada pelo sistema. ANNOVAR utiliza seis escores diferentes para estimar o grau de impacto funcional de uma variante: GERP, LRT, MutationTaster, PolyPhen, PhyloP conservation e SIFT (POLLARD, 2010; CHUN, 2009; DAVYDOV, 2010; ADZHUBEI, 2010; SCHWARZ, 2010).

A ferramenta de anotação *SeattleSeq* realiza as anotações dos SNV e indels detectadas, quer sejam elas novas ou conhecidas. Essa ferramenta inclui o registro no banco de dados SNP (dbSNP), o nome dos genes e o seu número de acesso (rs db), tipo de variante (missense, nonsense, frameshift, non-frameshift), posição do resíduo afetado e aminoácido alterado, escores de conservação, ferramentas de predição *in silico* e associação clínica (<http://snp.gs.washington.edu>).

APÊNDICE C

ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO

NERVOS SENSITIVOS

Os potenciais de ação sensitivos (PAS) foram obtidos dos nervos medianos, ulnares, radiais, fibulares superficiais e surais. A tabela C.1 resume os pontos de registro, estímulo e os valores de referencia para cada um desses nervos.

Tabela C.1 Resumo dos nervos sensitivos: registros, estímulos e valores normativos estudados

Nervo	Registro	Estímulo	Valores Normativos
Mediano sensitivo	Obtido no punho	2º quirodáctilo	Amp. $\geq 9,0 \mu\text{V}$, VC $\geq 50,0 \text{ m/s}$, Lat. no punho: $\leq 3,5 \text{ ms}$
Ulnar sensitivo	Obtido no punho	Dedo V	Amp. $\geq 9,0 \mu\text{V}$, VC $\geq 50,0 \text{ m/s}$, Lat. no punho: $\leq 3,1 \text{ ms}$
Radial sensitivo	Tabaqueira anatômica	Face medial do 1/3 distal do antebraço	Amp: $\geq 15,0 \mu\text{V}$, VC $\geq 50,0 \text{ m/s}$
Sural	Tornozelo, adjacente ao maléolo externo	Panturrilha	Amp: $\geq 5,6 \mu\text{V}$, VC $\geq 40 \text{ m/s}$ e Lat. $\leq 3,4 \text{ ms}$
Fibular superficial	Tornozelo	1/3 distal da perna	Amp: $\geq 5 \mu\text{V}$, VC $\geq 40 \text{ m/s}$, Lat. $\leq 3,1 \text{ ms}$

Fonte: elaborado pelo autor.

NERVOS MOTORES

Os nervos motores estudados foram os nervos mediano, ulnar, peroneiro e tibial bilateralmente. A captação dos PAMC foi obtida com eletrodos de disco metálico, tendo sido colocado o eletrodo ativo sobre o ponto motor do músculo

estudado e o de referência na superfície óssea mais próxima, 3 cm distalmente ao eletrodo ativo.

As ondas F foram obtidas distalmente com estímulo supra máximo e o catodo proximal ao anodo, com obtenção de 8 a 10 ondas na maioria dos exames e registrando-se a menor latência obtida. Na tabela 1.1.2.1 encontra-se uma descrição da técnica empregada em cada um desses nervos.

Tabela 15 – Resumo dos nervos motores: registros, estímulos e valores normativos estudados. APB = *abductor pollicis brevis*; ADM = *abductor digiti minimi*; EDB = *extensor digitorum brevis*

Nervo	Registro	Estímulo	Valores Normativos
Mediano motor	Eletrodo ativo no músculo APB e o de referência na base do primeiro metacarpo	Punho, fossa antecubital, axila e ponto de Erb	Amp. $\geq 3,80$ mV, VC $\geq 50,0$ m/s, Lat. distal (LD) (punho): $\leq 4,0$ ms
Mediano – onda F	Idem	Punho	Lat. ≤ 32 ms
Nervo ulnar motor	Com o eletrodo ativo no músculo ADM, e o de referência na base do quinto metacarpo	punho, abaixo e acima do epicôndilo medial, axila e ponto de Erb	Amp. $\geq 3,80$ mV, VC $\geq 50,0$ m/s, LD (punho) $\leq 3,1$ ms
Nervo ulnar – onda F	Idem	Punho	Lat. ≤ 33 ms
Nervo peroneiro	Com o eletrodo ativo no músculo EDB e o de referência na base do 5° pododáctilo	No 1/3 distal da perna	Amp. $\geq 2,80$ mV, VC $\geq 45,0$ m/s, LD (punho) ≤ 5 ms
Nervo peroneiro – onda F	Idem	No 1/3 distal da perna	Lat. ≤ 56 ms

Tibial posterior	Eletrodo ativo no músculo abdutor hallucis e o de referência na base do hálux	No tornozelo, adjacente ao maléolo interno e fossa poplítea	Amp. $\geq 3,60\text{mV}$, VC $\geq 40\text{ m/s}$, LD $\leq 5,5\text{ ms}$
Tibial posterior – onda F	Idem	Tornozelo	Lat. $\leq 58\text{ ms}$

Fonte: elaborado pelo autor.

APÊNDICE D

Tabela 1. Lista de genes relacionados a CMT2 e neuropatia motora hereditária e respectivas estatísticas de alinhamento da profundidade de cobertura obtida com WES

	Gene	On-target			Average depth	Median depth	Max depth
		≥1X (%)	≥10 (%)	≥30X (%)			
Alanyl-tRNA synthetase	AARS	100	98	96	99	97	192
ATPase Cu ⁽²⁺⁾ -transporting, alpha polypeptide	ATP7A	100	100	88	72	68	185
Bicaudal D homolog of drosophila 2	BICD2	100	84	54	39	34	114
BSCL2	BSCL2	98	94	87	88	94	182
Dynactin 1	DCTN1	100	100	87	88	88	194
Dynamamin 2	DNM2	100	100	90	94	97	247
Dynein, cytoplasmic 1, heavy chain 1	DYNC1H1	100	100	96	101	100	218
Early growth response 2	EGR2	100	74	58	56	45	189
FGD1-related F-actin binding protein	FGD4	100	99	91	68	70	134
SAC domain containing inositol phosphatase 3	FIG4	100	100	97	77	72	180
Glycyl-tRNA synthetase	GARS	100	100	94	88	88	207
Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1	GDAP1	100	100	100	104	98	208
GAP junction protein, beta-1	GJB1 (including promoter region)	67	48	32	24	29	115
Histidine triad nucleotide-	HINT1	100	91	65	47	45	112

binding protein 1							
Heat-shock 27-KD protein 1	HSPB1	100	84	77	85	85	197
Heat-shock 27-KD protein 8	HSPB8	100	79	73	79	84	182
Immunoglobulin mu-binding protein 2	IGHMBP2	100	97	85	71	69	177
LPS-induced TNF-alpha factor	LITAF	100	91	68	52	54	130
Lamin A/C	LMNA	99	94	84	76	71	186
Leucin-rich repeat and sterile alpha motif containing 1	LRSAM1	100	100	96	98	99	204
Methionyl-tRNA synthetase	MARS	100	93	63	44	41	140
Mitofusin 2	MFN2	100	100	97	101	101	215
Myelin protein zero	MPZ	100	100	76	61	57	150
Myotubularin-related protein 2	MTMR2	100	100	100	90	88	183
NMYC downstream-regulated gene 1	NDRG1	100	90	78	67	67	146
Neurofilament protein, light polypeptide	NEFL	100	96	78	60	57	146
Pheripheral myelin protein 22	PMP22	100	100	100	104	101	171
Phosphoribosylpyrophosphate synthetase 1	PRPS1	100	100	100	95	90	170
Periaxin	PRX	100	92	75	75	63	257
Sterile alpha motif domain-containing protein 9	RAB7A	100	94	92	94	104	142
SET-binding factor 2	SBF2	100	100	95	73	73	159
Senataxin	SETX	100	98	83	72	67	238
SH3 domain and tetratricopeptide repeat domain 2	SH3TC2	100	98	87	82	83	219

Solute carrier family 52 (Riboflavin transporter), member 1	SLC52A1	98	72	41	28	25	92
Solute carrier family 52 (Riboflavin transporter), member 2	SLC52A2	100	83	50	47	31	175
Solute carrier family 52 (Riboflavin transporter), member 3	SLC52A3	100	91	76	68	60	208
Transient receptor potential cation channel, subfamily 5, member 4	TRPV4	100	93	78	69	67	210
Valosin containing protein	VCP	100	98	95	108	108	231
Tyrosyl-tRNA synthetase	YARS	100	100	95	88	86	239

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 2. Lista de genes relacionados a CMT2 e neuropatia motora hereditária e respectivas estatísticas de alinhamento da profundidade de cobertura obtida com painel multigênico

Gene		≥1X (%)	≥10X (%)	≥30X (%)	Average depth	Median depth	Max depth
Alanyl-tRNA synthetase	AARS	100	100	99.6	328	322	756
BSCL2	BSCL2	100	100	100	303	263	779
Dynamin 2	DNM2	100	100	100	288	280	781
Dynein, cytoplasmic 1, heavy chain 1	DYNC1H1	100	100	99.9	358	329	963
Glycyl-tRNA synthetase	GARS	100	100	99.8	273	240	741
Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1	GDAP1	100	100	100	472	387	1170

GAP junction protein, beta-1	GJB1 (Including promoter region)	100	100	100	329	274	601
Histidine triad nucleotide-binding protein 1	HINT1	100	100	100	405	363	816
Heat-shock 27-KD protein 1	HSPB1	100	100	100	366	299	656
Heat-shock 27-KD protein 8	HSPB8	100	100	100	303	283	572
Immunoglobulin mu-binding protein 2	IGHMBP2	100	100	100	334	333	702
Lamin A/C	LMNA	100	100	100	374	352	949
Leucin-rich repeat and sterile alpha motif containing 1	LRSAM1	100	100	98.2	276	246	784
Methionyl-tRNA synthetase	MARS	100	100	100	368	359	704
Mitofusin 2	MFN2	100	100	100	281	278	695
Myelin protein zero	MPZ	100	100	100	327	292	801
Neurofilament protein, light polypeptide	NEFL	100	100	100	292	223	689
Pheripheral myelin protein 22	PMP22	100	100	100	546	545	1044
Phosphoribosylpyrophosphate synthetase 1	PRPS1	100	100	100	372	354	645
Sterile alpha motif domain-containing protein 9	RAB7A	100	100	100	456	395	884
SH3 domain and tetratricopeptide repeat domain 2	SH3TC2	100	100	100	357	381	508
Transient receptor potential cation channel, subfamily 5, member 4	TRPV4	100	100	100	362	377	676
Valosin containing protein	VCP	100	100	98.67	310	278	776

Tyrosyl-tRNA synthetase	YARS	100	100	100	315	322	640
--------------------------------	-------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Fonte: elaborado pelo autor.

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO REGISTRO DE PACIENTES COM A DOENÇA DE CHARCOT-MARIE-TOOTH.

Prezado Sr (a).....RG:....., como já é do seu conhecimento, o Sr(a) é portador da Doença de Charcot-Marie-Tooth ou Neuropatia Hereditária Sensitivo-Motora, uma neuropatia de origem genética, conforme já lhe foi explicado após suas consultas clínicas, avaliação familiar, eletroneuromiografia e teste genético.

Também é do seu conhecimento que embora várias medidas possam ser realizadas para melhorar sua qualidade de vida e que alguns tratamentos estejam sendo usados de maneira experimental, não existe ainda cura para este grupo de doenças. Por este motivo, cientistas do mundo todo estão organizando um **REGISTRO** de pacientes com a Doença de Charcot-Marie-Tooth, com o objetivo de estudar as características clínicas e genéticas, para constituir grupos de pacientes com características semelhantes.

Estamos convidando-o a participar deste **REGISTRO**. Caso concorde em participar deste **REGISTRO**, dados de seu prontuário serão copiados em um banco de dados internacional. O Sr./A Sra. não será submetido (a) a nenhuma avaliação ou exame laboratorial para participar. Somente sua pasta será revista. Esclarecemos que a revisão de seu prontuário com a finalidade de participação nesta pesquisa somente será realizada com sua autorização e serão mantidas em sigilo absoluto, ou seja, não haverá como identifica-lo.

Sua identificação neste **REGISTRO** será feita por meio de um código, que somente eu saberei a quem pertence. Estes dados poderão ser utilizados no futuro em pesquisas, mas isto somente será possível caso concorde com isto. O sigilo das informações está garantido e em nenhum momento o Sr(a) será identificado. Com base nestes dados, poderá ser convidado para participar em vários estudos, incluindo aqueles de tratamento, mas isto somente acontecerá caso concorde e deseje participar.

Página 1-2 do TCLE

Sua participação neste REGISTRO é voluntária e não implica em custos de nenhuma natureza. Não há risco à sua integridade física. Há o risco em potencial de que seus dados sejam acessados e utilizados de maneira inapropriada, mas este risco é pequeno, já que o acesso será totalmente controlado pelo pesquisador responsável. Caso deseje ter seu nome retirado. Isto será feito de imediato, mas os dados obtidos até o momento de sua saída serão utilizados. Seu tratamento e seguimento no Ambulatório de Neurogenética independe de sua participação, ou seja, participando ou não deste REGISTRO seu tratamento medico continuará a ser feito da mesma maneira que sempre foi.

Não há qualquer benefício imediato para os participantes, a não ser o desejo de contribuir para o conhecimento desta afecção.

Este estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa deste Hospital. Este comitê tem por função garantir que as pesquisas sejam realizadas de maneira ética e pode ser contatado pelo telefone 3602-2228, de segunda a sexta –feira, em horário comercial, e está sediado no Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Campus da USP, 14049-800.

Informações adicionais ou dúvidas poderão ser obtidas no Ambulatório de Neurogenética, realizado todas as segundas-feiras no período vespertino, no Setor de Neurofisiologia Clínica, todos os dias, das 7:00 às 18 :00 horas, ambos no Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Campus da USP, 14049-800 ou pelo telefone 16-36022391.

Responsável pelo REGISTRO: Prof. Dr. Wilson Marques Junior

Caso concorde em participar, o Sr/Sra assinará duas vias deste documento chamado TCLE. Uma via ficará com o Sr/Sra, devidamente assinada pelo pesquisador responsável.

Nome do paciente/responsavel:.....

Assinatura do paciente/responsavel:.....

Prof. Dr. Wilson Marques Jr

Data:/...../.....

Página 2-2 do TCLE

TCLE versão 2.0 de maio de 2012

ANEXO B

CMT ESCORE DE NEUROPATIA – VERSÃO 2

CMT neuropathy score – Version 2.

Parameter	0	1	2	3	4
Sensory symptoms [*]	None	Symptoms below or at ankle bones	Symptoms up to the distal half of the calf	Symptoms up to the proximal half of the calf, including knee	Symptoms above knee (above the top of the patella)
Motor symptoms (legs)	None	Trips, catches toes, slaps feet, Shoe inserts	Ankle support or stabilization (AFOs) Foot surgery [‡]	Walking aids (cane, walker)	Wheelchair
Motor symptoms (arms)	None	Mild difficulty with buttons	Severe difficulty or unable to do buttons	Unable to cut most foods	Proximal weakness (affect movements involving the elbow and above)
Pinprick sensibility ^{*§}	Normal	Decreased below or at ankle bones	Decreased up to the distal half of the calf	Decreased up to the proximal half of the calf, Including knee	Decreased above knee (above the top of the patella)
Vibration [‡]	Normal	Reduced at great toe	Reduced at ankle	Reduced at knee (tibial tuberosity)	Absent at knee and ankle
Strength (legs) [‡]	Normal	4+, 4, or 4– on foot dorsiflexion or plantar flexion	≤3 on foot dorsiflexion or ≤3 on foot plantar flexion	≤3 on foot dorsiflexion and ≤3 on plantar flexion	Proximal weakness
Strength (arms) [‡]	Normal	4+, 4, or 4– on intrinsic hand muscles ^{**}	≤3 on intrinsic Hand muscles ^{**}	≤5 on wrist extensors	Weak above elbow
Ulnar CMAP (median)	≥6 mV (≥4 mV)	4–5.9 mV (2.8–3.9)	2–3.9 mV (1.2–2.7)	0.1–1.9 mV (0.1–1.1)	Absent (absent)
Radial SAP amplitude, antidromic testing	≥15 μV	10–14.9 μV	5–9.9 μV	1–4.9 μV	<1 μV

AFO, ankle-foot orthoses; CMAP, compound muscle action potential; SAP, sensory action potential.

*Use the picture below to discriminate the level of the symptoms.

[†]Uses aid most of the time. The patient was prescribed to wear/use or should be wearing/using the aid in the examiner's opinion (see written instructions, Table S2). [‡]See written instructions for details of eligible foot surgery. [§]Abnormal if patient says it is definitely decreased compared to a normal reference point. ^{||}Use Rydel-Seiffer tuning fork. Definition of normal: ≥ 5 . [¶]Limb strength scores refer to MRC grade. ^{**}Intrinsic hand muscles strength assessment: test only abductor pollicis brevis (APB) and first dorsal interosseus (FDI), then choose the stronger to give the score.

ANEXO C

PARECER: APROVAÇÃO DE REALIZAÇÃO DE PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

Ribeirão Preto, 10 de dezembro de 2004

Ofício nº 3397/2004
CEP/SPC

Prezada Senhora:

O trabalho intitulado **"ANÁLISE MUTACIONAL DOS GENES: PMP22, P0, CX32 E EGR2 EM PACIENTES COM A DOENÇA DE CHARCOT-MARIE-TOOTH"**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 194ª Reunião Ordinária realizada em 06/12/2004, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 12219/2004.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.

PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
SILMARA PAULA GOUVÊA DE LIMA
PROF. DR. WILSON MARQUES JÚNIOR (Orientador)
Depto. de Neurologia, Psiquiatria e Psicologia Médica
Em mãos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

Ribeirão Preto, 09 de fevereiro de 2006

Ofício nº 326/2006
CEP/SPC

PROCESSO HCRP nº 12219/2004

Prezada Senhora:

O Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 218ª Reunião Ordinária realizada em 06/02/2006, **analisou e aprovou o Adendo (ampliação do número de genes estudados de quatro para trinta e cinco)** ao Projeto de Pesquisa intitulado **"ANÁLISE MUTACIONAL DOS GENES: PMP22, PO, CX32 E EGR2 EM PACIENTES COM A DOENÇA DE CHARCOT-MARIE-TOOTH"**. O CEP aprovou continuidade da pesquisa.

Aproveito a oportunidade para renovar protestos de estima e consideração.

PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCFMRP-USP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
SILMARA PAULA GOUVÊA DE LIMA
PROF. DR. WILSON MARQUES JÚNIOR (Orientador)
Depto. de Neurologia, Psiquiatria e Psicologia Médica
Em mãos

ANEXO D

ARTIGO PUBLICADO NO JPNS

DOI: 10.1111/jns.12235

Journal of the Peripheral Nervous System 00:1–4 (2017)

CASE REPORT

A *de novo* dominant mutation in *KIF1A* associated with axonal neuropathy, spasticity and autism spectrum disorderPedro J. Tomaselli^{1,2}, Alexander M. Rossor¹, Alejandro Horga¹, Matilde Laura¹, Julian C. Blake¹, Henry Houlden³, and Mary M. Reilly¹¹MRC Centre for Neuromuscular Diseases and National Hospital for Neurology and Neurosurgery, UCL Institute of Neurology, London, UK; ²Department of Neuromuscular Disorders, Clinical Hospital of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil; and ³Department of Neurogenetics, The National Hospital for Neurology and Neurosurgery, UCL Institute of Neurology, London, UK

Abstract Mutations in the kinesin family member 1A (*KIF1A*) gene have been associated with a wide range of phenotypes including recessive mutations causing hereditary sensory neuropathy and hereditary spastic paraplegia and *de novo* dominant mutations causing a more complex neurological disorder affecting both the central and peripheral nervous system. We identified by exome sequencing a *de novo* dominant missense variant, (c.38G>A, p.R13H), within an ATP binding site of the kinesin motor domain in a patient manifesting a complex phenotype characterized by autism spectrum disorder (ASD), spastic paraplegia and axonal neuropathy. The presence of ASD distinguishes this case from previously reported patients with *de novo* dominant mutations in *KIF1A*.

Key words: autism spectrum disorder, *KIF1A*, Kinesin family member 1A gene, next-generation sequencing, peripheral neuropathy

Introduction

Recessive mutations in the gene kinesin family member 1A (*KIF1A*) have been reported as causative of hereditary sensory neuropathy type 2C (OMIM: 614213) and hereditary spastic paraplegia type 30 (OMIM: 610357) (Riviere *et al.*, 2011; Klebe *et al.*, 2012). *KIF1A* is a member of the kinesin family and functions as an anterograde motor protein that transports membranous organelles along microtubules. More recently, *de novo* dominant mutations have been

shown to cause a complex phenotype characterized by developmental delay, cerebellar ataxia, spasticity, and peripheral neuropathy (Okamoto *et al.*, 2014; Esmaeeli Nieh *et al.*, 2015; Ohba *et al.*, 2015). Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by deficits in social interaction, language and communication, and the presence of repetitive or unusual behaviors (Levy *et al.*, 2009). We report a patient with a *de novo* missense variant in *KIF1A* presenting with a complex phenotype characterized by ASD, axonal neuropathy, and spasticity. This case further expands the phenotype of dominant mutations in *KIF1A*.

Address correspondence to: Mary M. Reilly, MRC Centre for Neuromuscular Diseases and National Hospital for Neurology and Neurosurgery, UCL Institute of Neurology, Queen Square, London, WC1N 3BG, U.K. Tel: +(44)08451555000; Fax: +(44)02034483633 E-mail: m.reilly@ucl.ac.uk

[The copyright line for this article was changed on 22 September 2017 after original online publication.]

Case Report

A 20-year-old male was seen with early onset spasticity, axonal neuropathy, and ASD. He is the second

Table 1. Nerve conduction study (aged 18).

Sensory NCS	Right		Left	
	Amplitude (μ V)	Conduction velocity (m/s)	Amplitude (μ V)	Conduction velocity (m/s)
Median	10	50	11	49
Ulnar	7	52	5	48
Radial	11	55	11	58
Sural	Absent	–	Absent	–
Superficial Peroneal	Absent	–	Absent	–
Motor NCS	Right		Left	
	Latency (ms)	Amplitude (mV)	Conduction velocity (m/s)	F wave (ms)
Right median (APB)	3.6	9.7	50	30
Right ulnar (ADM)	3.0	8.3	51	31
Right common peroneal (EDB)	Absent	–	–	–
Right posterior tibial (AHL)	5.0	0.3	34	Absent

ADM, abductor digiti minimi; AHL, abductor hallucis; APB, abductor pollicis brevis; EDB, extensor digitorum brevis; NCS, nerve conduction study.

child of unrelated and healthy parents. He was born at term but his developmental motor milestones were delayed. At 3 years of age, he was noted to interact poorly with other children. After starting main stream school, he was diagnosed with attention deficit and hyperactivity disorder (ADHD) and displayed significant difficulties with written and spoken language and was given a formal diagnosis of ASD. Additional features of spasticity and neuropathy became evident in adulthood. Neurological examination at age 20 demonstrated normal cranial nerves with a positive jaw jerk and pout reflex. The upper limbs were normal. He had a spastic gait with in-turning of the feet, pes cavus, and mild wasting of the intrinsic foot muscles but only minimal weakness of ankle dorsiflexion. Sphincter function was normal. Deep tendon reflexes were normal in the upper limbs, but pathologically brisk in the lower limbs with extensor plantar responses. Sensory examination revealed reduced vibration sensation to the ankles but was otherwise normal. Nerve conduction study at age 18 revealed a length-dependent sensory and motor axonal neuropathy with signs of chronic denervation in the lower limbs (Table 1).

We performed whole-exome sequencing in the proband to determine the causative gene as previously described using the Illumina Nextera rapid capture focused enrichment kit and run on the Illumina HiSeq 2500 (Cottenie et al., 2014; Shigemizu et al., 2015).

Next-generation sequencing exome analyses revealed 21,683 variants within coding regions or splicing sites. Variants were filtered for non-synonymous and nonsense variants with a minor allele frequency <0.5% in the The Exome Aggregation Consortium (ExAC), 1,000 Genomes and Exoma Variant Server (EVS) public databases, and for sequence quality (read depth > 7), resulting in 420 variants. Additional filtering was performed for genes associated with neurological

diseases and seven variants were identified. One heterozygous variant was detected in *DHTKD1*, a gene associated with autosomal dominant CMT2Q but did not segregate with the disease. Three heterozygous variants in genes associated with autosomal recessive disorders (*LYST*, *PLEKHG5* and *NEB*) were identified. Mutations in two additional genes associated with distal myopathy and deafness (*FLNC* and *GJB3*) were identified but were predicted benign using *in silico* analysis. A novel missense mutation, c.38G>A; p.R13H in *KIF1A* was identified (RefSeq accession number NM_001244008.1). This mutation is located within a highly evolutionary conserved region both between species and also among different kinesin proteins (1 [KIF5B], 2 [KIF3A and KIF17], 3 [KIF1A], 4 [KIF4A], and 5 [KIF11]) where it forms part of the ATP binding site (Fig. 1). Sanger sequencing of the proband and parent's DNA was performed as previously described (Liu et al., 2014), and confirmed the mutation had arisen *de novo* in the proband. The mutation resides in the motor domain of *KIF1A*, providing further evidence in support of the pathogenicity of this novel mutation. *In silico* analysis using MutationTaster, Polyphen-2, and SIFT predicted the p.R13H mutation to be pathogenic. This variant was not present in the Single Nucleotide Polymorphism database (dbSNP), EVS, NHLBI Exome Sequencing Project, 1000 Genomes and ExAC databases. There were no additional variants in known ASD-related genes.

Discussion

We describe a novel *de novo* dominant mutation in the kinesin motor domain of *KIF1A* as a cause of a complex neurodevelopmental disorder characterized by ASD, spasticity and axonal neuropathy. ASD

Figure 1. Panel (A) shows the pedigree and chromatograms of the proband. Panel (B) shows that the arginine at position 13 of KIF1A is conserved from man to *Xenopus tropicalis* and is also conserved across other kinesin proteins.

is a complex and poorly understood condition, and approximately 10%–15% of cases are associated with mutations in single genes (Levy et al., 2009). Several genes (e.g., FMR1, MECP2, NLGN4X, and NLGN3) have been implicated in ASD but none have been reported in association with hereditary spastic paraplegia or axonal neuropathy.

KIF1A encodes a neuron-specific ATP-dependent motor protein which is important for anterograde axonal transport of cargo including synaptic vesicle precursors (Okada et al., 1995; Lee et al., 2003), as well as post-synaptic proteins involved in synaptic plasticity (Lee et al., 2015). To date, recessive non-sense mutations have been reported as causative of hereditary sensory neuropathy with or without minimal intellectual disability whereas recessive missense mutations in the motor domain are causative of hereditary spastic paraplegia. *De novo* dominant mutations within the motor domain have been reported in association with complex phenotypes characterized by intellectual disability and the variable presence of cerebellar atrophy, spastic paraparesis, optic nerve atrophy, peripheral neuropathy, and epilepsy (Lee et al., 2015).

The p.R13H mutation is located in a highly conserved residue within the ATP binding site, a region necessary for the hydrolysis of ATP required for force generation and vesicle transport along microtubules. *In utero*, this mutation may affect cortical neuronal migration resulting in neurodevelopmental disorders such

as ASD. The p.S69L mutation in KIF1A has previously been reported in a family with pure spastic paraplegia and in whom the proband but not the affected father had attention deficit disorder. The authors concluded it was not part of the phenotype as it did not segregate with the mutation (Ylikallio et al., 2015), however, the presence of ASD in our case suggests that it was probably part of the disorder. Mutations in the retrograde transport protein, DYNC1H1, have already been reported as a cause of ADHD, cortical migration defects and motor neuropathy further highlighting the importance of motor proteins in cortical and motor neuron development (Scoto et al., 2015). This case report suggests that ASD and ADHD should be considered within the phenotypic spectrum of dominant mutations in KIF1A and further expands the spectrum of phenotypes associated with KIF1A mutations.

Acknowledgements

M. M. R. is supported by the Medical Research Council (MRC), MRC Centre grant (G0601943), and the National Institutes of Neurological Diseases and Stroke and office of Rare Diseases (U54NS065712). This research was also supported by the National Institute for Health Research University College London Hospitals Biomedical Research Centre and by the National Institute for Health Research Biomedical Research Centre at Great Ormond Street Hospital for Children

NHS Foundation Trust and University College London. P. J. T. was supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for funding. A. M. R. is funded by a Wellcome Trust Postdoctoral Fellowship for Clinicians (110043/Z/15/Z).

References

- Cottenie E, Kochanski A, Jordanova A, Bansagi B, Zimon M, Horga A, Jaunmuktane Z, Saveri P, Rasic VM, Baets J, Bartsakoulia M, Ploski R, Teterycz P, Nikolic M, Quinlivan R, Laura M, Sweeney MG, Taroni F, Lunn MP, Moroni I, Gonzalez M, Hanna MG, Bettencourt C, Chabrol E, Franke A, von Au K, Schilhabel M, Kabzinska D H-P, Brandner S, Lim SC, Song H, Choi BO, Horvath R, Chung KW, Zuchner S, Pareyson D, Harms M, Reilly MM, Houlden H (2014). Truncating and missense mutations in IGHMBP2 cause Charcot-Marie tooth disease type 2. *Am J Hum Genet* 95:590–601. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.10.002>.
- Esmaili Nieh S, Madou MR, Sirajuddin M, Fregeau B, McKnight D, Lexa K, Strober J, Spaeth C, Hallinan BE, Smaoui N, Pappas JG, Burrow TA, McDonald MT, Latibashvili M, Leshinsky-Silver E, Lev D, Blumkin L, Vale RD, Barkovich AJ, Sherr EH (2015). De novo mutations in KIF1A cause progressive encephalopathy and brain atrophy. *Ann Clin Transl Neurol* 2:623–635. <https://doi.org/10.1002/actn.3.198>.
- Klebe S, Lossos A, Azzedine H, Mundwiler E, Sheffer R, Gaussen M, Marelli C, Nawara M, Carpentier W, Meyer V, Rastetter A, Martin E, Bouteiller D, Orlando L, Gyapay G, El-Hachimi KH, Zimmerman B, Gamliel M, Misk A, Lerer I, Brice A, Durr A, Stevanin G (2012). KIF1A missense mutations in SPG30, an autosomal recessive spastic paraplegia: distinct phenotypes according to the nature of the mutations. *Eur J Hum Genet* 20:645–649. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.261>.
- Lee JR, Shin H, Ko J, Choi J, Lee H, Kim E (2003). Characterization of the movement of the kinesin motor KIF1A in living cultured neurons. *J Biol Chem* 278:2624–2629. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211152200>.
- Lee JR, Srouf M, Kim D, Hamdan FF, Lim SH, Brunel-Guitton C, Decarie JC, Rossignol E, Mitchell GA, Schreiber A, Moran R, Van Haren K, Richardson R, Nicolai J, Oberndorff KM, Wagner JD, Boycott KM, Rahikkala E, Junna N, Tyynismaa H, Cuppen I, Verbeek NE, Stumpel CT, Willemsen MA, de Munik SA, Rouleau GA, Kim E, Kamsteeg EJ, Kleefstra T, Michaud JL (2015). De novo mutations in the motor domain of KIF1A cause cognitive impairment, spastic paraparesis, axonal neuropathy, and cerebellar atrophy. *Hum Mutat* 36:69–78. <https://doi.org/10.1002/humu.22709>.
- Lewy SE, Mandell DS, Schultz RT (2009). Autism. *Lancet* 374:1627–1638. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61376-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61376-3).
- Liu YT, Laura M, Hersheson J, Horga A, Jaunmuktane Z, Brandner S, Pittman A, Hughes D, Polke JM, Sweeney MG, Proukakis C, Janssen JC, Auer-Grumbach M, Zuchner S, Shields KG, Reilly MM, Houlden H (2014). Extended phenotypic spectrum of KIF5A mutations: from spastic paraplegia to axonal neuropathy. *Neurology* 83:612–619. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000691>.
- Ohba C, Haginoya K, Osaka H, Kubota K, Ishiyama A, Hraide T, Komaki H, Sasaki M, Miyatake S, Nakashima M, Tsunasaki Y, Miyake N, Tanaka F, Saito H, Matsumoto N (2015). De novo KIF1A mutations cause intellectual deficit, cerebellar atrophy, lower limb spasticity and visual disturbance. *J Hum Genet* 60:739–742. <https://doi.org/10.1038/jhg.2015.108>.
- Okada Y, Yamazaki H, Sekine-Aizawa Y, Hirokawa N (1995). The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. *Cell* 81:769–780. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90538-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90538-3).
- Okamoto N, Miya F, Tsunoda T, Yanagihara K, Kato M, Saitoh S, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K (2014). KIF1A mutation in a patient with progressive neurodegeneration. *J Hum Genet* 59:639–641. <https://doi.org/10.1038/jhg.2014.80>.
- Riviere JB, Ramalingam S, Lavastre V, Shekarabi M, Holbert S, Lafontaine J, Srouf M, Merner N, Rochefort D, Hince P, Gaudet R, Mes-Masson AM, Baets J, Houlden H, Brice B, Nicholson GA, Van Esch H, Nafissi S, De Jonghe P, Reilly MM, Timmerman V, Dion PA, Rouleau GA (2011). KIF1A, an axonal transporter of synaptic vesicles, is mutated in hereditary sensory and autonomic neuropathy type 2. *Am J Hum Genet* 89:219–230. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.06.013>.
- Scoto M, Rossor AM, Harms MB, Cirak S, Calissano M, Robb S, Manzur AY, Martinez Arroyo A, Rodriguez Sanz A, Mansour S, Fallon P, Hadjilovm I, Klein A, Yang M, De Visser M, Overweg-Plandsoen WC, Baas F, Taylor JP, Benatar M, Connolly AM, A-Lözi MT, Nixon J, de Goede CG, Foley AR, McWilliam C, Pitt M, Sewry C, Phadke R, Hafezparast M, Chong WK, Mercuri E, Baloh RH, Reilly MM, Muntoni F (2015). Novel mutations expand the clinical spectrum of DYNC1H1-associated spinal muscular atrophy. *Neurology* 84:668–679. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001269>.
- Shigemizu D, Momozawa Y, Abe T, Morizono T, Borevich KA, Takata S, Ashikawa K, Kubo M, Tsunoda T (2015). Performance comparison of four commercial human whole-exome capture platforms. *Sci Rep* 5:12742. <https://doi.org/10.1038/srep12742>.
- Ylikallio E, Kim D, Isohanni P, Auranen M, Kim E, Lonnqvist T, Tyynismaa H (2015). Dominant transmission of de novo KIF1A motor domain variant underlying pure spastic paraplegia. *Eur J Hum Genet* 23:1427–1430. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.297>.

Web resources

- The International Genome Sample Resource: <http://www.internationalgenome.org>
- NCBI dbSNP: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>
- NHLBI Exome Sequencing Project (ESP), Exome Variant Server: <http://evs.gs.washington.edu/EVS>
- The Exome Aggregation Consortium (ExAC): <http://exac.broadinstitute.org/>
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): <http://www.omim.org/>
- SIFT: <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>
- Poliphen2: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
- MutationTaster: <http://www.mutationtaster.org/>

ARTIGO EM REVISÃO NO NEUROLOGY GENETICS

**A Compound heterozygous mutation in the VRK1 gene is a cause of hereditary
motor neuropathy with upper motor neuron signs**

Pedro J Tomaselli, MSc; Alexander M Rossor, PhD; Matilde Laurà, PhD; Alejandro Horga, PhD; Julian C Blake, PhD; Jasper Morrow, PhD; Henry Houlden, PhD; Mary M Reilly, PhD

Pedro José Tomaselli, MRC Centre for Neuromuscular Diseases, National Hospital for Neurology and Neurosurgery and UCL Institute of Neurology, Queen Square, London, UK and Department of Neuromuscular Disorders, Clinical Hospital of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Alexander M Rossor, MRC Centre for Neuromuscular Diseases, National Hospital for Neurology and Neurosurgery and UCL Institute of Neurology, Queen Square, London, UK

Matilde Laurà, MRC Centre for Neuromuscular Diseases, National Hospital for Neurology and Neurosurgery and UCL Institute of Neurology, Queen Square, London, UK

Alejandro Horga, MRC Centre for Neuromuscular Diseases, National Hospital for Neurology and Neurosurgery and UCL Institute of Neurology, Queen Square, London, UK

Julian C Blake, Department of Clinical Neurophysiology, Norfolk and Norwich University Hospital, Norwich, UK

A Compound heterozygous mutation in the vaccinia related kinase-1 gene is a cause of hereditary motor neuropathy with upper motor neuron signs

Pedro J Tomaselli,^{1, 2} Alexander M Rossor,¹ Matilde Laurà,¹ Alejandro Horga,¹ Julian C Blake,³ Henry Houlden,⁴ Mary M Reilly¹

¹MRC Centre for Neuromuscular Diseases, National Hospital for Neurology and Neurosurgery and UCL Institute of Neurology, Queen Square, London, UK.

²Department of Neuromuscular Disorders, Clinical Hospital of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

³Department of Clinical Neurophysiology, Norfolk and Norwich University Hospital, Norwich, UK. ⁴Department of Neurogenetics Genetics, National Hospital for Neurology and Neurosurgery and UCL Institute of Neurology, Queen Square, London, UK.

Correspondence to:

Professor Mary M Reilly. MRC Centre for Neuromuscular Diseases, National Hospital for Neurology and Neurosurgery and UCL Institute of Neurology, Box 108, Queen Square, London, WC1N 3BG, UK. Phone: +44 020 3448 8457. Fax: +44 020 3448 3633. Email: m.reilly@ucl.ac.uk.

Abstract

Recessive mutations in VRK1 (human vaccinia-related kinase 1) gene have been reported in a small number of patients with spinal muscular atrophy with pontocerebellar hypoplasia (SMA-PCH). More recently, a pure axonal neuropathy has been reported in association with VRK1 mutations. We describe a 31-year-old woman with lower limb predominant motor neuropathy with upper motor neuron signs. We identified by exome sequencing a novel missense mutation in exon 8, c.683C>T, p.T228M, and a previously reported pathogenic nonsense mutation in exon 12, c.1072C>T, p.R358X, in *VRK1*. Analysis of parental DNA showed the mutations were on separate alleles. The pathogenicity of the novel missense mutation was supported by genomic conservation; *in-silico* prediction scores and the strong phenotypic similarities with a recently reported case carrying compound heterozygous mutations in *VRK1*. This study expands the clinical spectrum of VRK1-related disorders, and suggests that mutations in VRK1 should be considered in patients with motor neuropathy.

INTRODUCTION

The hereditary motor neuropathies encompass a heterogeneous group of genetic disorders characterised by neurogenic weakness and minimal or no sensory signs (Rossor, 2012). The distribution of muscle weakness, proximal versus distal (bulbar or distal), and the presence of atypical features (e.g. vocal cord palsy, respiratory distress, pyramidal signs, congenital contractures), narrows the differential diagnosis and guides the molecular approach. Nevertheless, the genetic basis of the majority of cases of HMN is unknown.

Central nervous system abnormalities are the hallmark of Spinal Muscular Atrophy with Ponto Cerebellar Hypoplasia (SMA-PCH) a rare, recessive and often fatal disease caused by mutations in the vaccinia-related kinase gene (*VRK1*). More recently, however, milder phenotypes of a complex axonal neuropathy and early onset amyotrophic lateral sclerosis have been linked to recessive *VRK1* mutations (Gonzaga-Jauregui, 2013; Nguyen, 2015; Renbaum, 2009). We describe a case of lower limb predominant motor neuropathy with upper motor neuron signs but normal ponto cerebellar development, adding *VRK1* to the list of hereditary motor neuropathy genes.

PATIENT AND METHODS

The proband was investigated as part of a study to determine the molecular diagnosis in patients with inherited neuropathies using whole-exome sequencing (WES). This study was approved by The National Hospital for Neurology and Neurosurgery Research Ethics Committee/ Central London REC 3 09/H0716/61.

Genetic studies. A next-generation sequencing (NGS) target panel of 15 genes implicated in hereditary motor neuropathy was performed and no pathogenic mutation was detected ([Supplementary table 1](#)). Whole exome sequencing (WES) was therefore performed as previously described, using the Illumina's Nextera rapid capture focused enrichment kit and run on the Illumina HiSeq 2500 (Cottenie, 2014; Shigemizu, 2015). Variants of interest were confirmed by Sanger sequencing and *in silico* analysis was performed using multiple prediction tools.

RESULTS

Clinical features.

The proband was the only child of healthy, non-consanguineous parents of Irish and Prussian-English descent. There was no family history of neurological disease. The proband was born of a normal birth and had normal developmental milestones. In her first decade of life, she was noted to have high foot arches and was slow at running. In the second decade of life she developed progressive muscle weakness in the lower limbs. At the age of 25, she developed severe nocturnal cramps and fasciculation in the lower limbs, which were triggered by minimal effort. She denied any symptoms in the upper limbs and any sensory symptoms in the upper and lower limbs.

On neurological examination at the age of 31, she walked with a waddling gait and bilateral foot drop. She could stand on her heels but not on her toes. Cranial nerve examination was normal. She had minimal postural hand tremor. There was no wasting in the upper limbs and strength was normal. Fasciculations were observed in both thighs and cramps were triggered by minimal efforts during the examination. There was mild distal weakness in the lower limbs with ankle dorsiflexion grade 4+ and ankle plantar flexion 4 bilaterally on the Medical Research Council scale (MRC) ([figure 1a-1d](#)). Tone was normal in the upper and lower limbs. Deep tendon reflexes were brisk in the upper and lower limbs, including trapezius and pectoralis reflexes. The plantar reflex was flexor bilaterally. Sensory examination was unremarkable. Nerve conduction studies were within normal limits and concentric needle EMG showed large polyphasic motor units of increased duration in the lower limbs consistent with chronic denervation and reinnervation, indicative of a motor axonal neuropathy ([table 1](#)).

Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Score (CMTNS) was five.

Brain and spinal cord MRIs were normal ([figure 1e-1g](#)). MRI of the lower limbs demonstrated normal appearances of the thigh muscles and severe fatty replacement of the soleus and gastrocnemius muscles bilaterally, with peroneous muscles being less affected ([figure 1h-1j](#)). Serum creatine kinase level was normal at 119 IU/L.

Genetic studies.

99.99% of the coding exons (+/- 15 bases pairs) of all genes in the target dHMN panel were sequenced to a read depth of 30X or greater. The minimal coverage was 26X, at

small regions of 211 bases pairs of TRPV4 (position 110234313 to 110234524). This region was analysed manually to confirm the quality of reading and no pathogenic mutation was detected.

Variants found in WES were filtered for nonsynonymous variants with a minor allele frequency <0.75% in the ExAc, 1.000 Genomes and EVS database, and additional filtering according to the inheritance pattern, clinical significance and sequence quality (depth > 6). From 197 variants that met our filtering criteria, five involved genes associated with pure and complex inherited neuropathies/neuronopathies. Three were heterozygous variants in genes associated with autosomal recessive disorders (*IKBKAP*, *LYST*, and *USP8*). One heterozygous variant was detected in gene associated with autosomal dominant CMT2U (*MARS*); and compound heterozygous variants were detected in *VRK1*, a gene recently associated with hereditary amyotrophic lateral sclerosis (ALS).

The novel variant in *MARS*, c.590C>T; p.A197V, (Ensembl ID ENST00000262027) was validated by Sanger sequencing. This variant was not present in the Exome Aggregation Consortium database (EXaC; <http://exac.broadinstitute.org/>), but was present in the unaffected father. Thus, this variant was regarded as not pathogenic (**supplementary figure 1**).

Sanger sequencing of parental DNA showed that the father carried the missense variant in exon 8 of *VRK1*, c.683C>T, p.T228M, and the mother carried the nonsense mutation in exon 12, c.1072C>T, p.R358X (Ensembl ID ENST00000216639), confirming the two variants were on separate alleles (figure 2a-2c). R358X has previously been reported as pathogenic in the homozygous state and is essentially a null mutation. The novel T228M variant is located within the kinase domain of *VRK1* in an evolutionary conserved region (PhyloP = 3.69 and PhastCons = 1) and is predicted to be pathogenic by *in silico* analysis (figure 2d). This variant was present in seven out of 121.386 alleles in the EXaC database (MAF 0.005%), with none of the carriers being homozygous.

DISCUSSION

Next generation sequencing (NGS) has opened a new era for clinical molecular diagnosis. Unlike targeted Sanger of individual genes, NGS has led to the identification of variants in known disease genes but with a novel phenotype. Using WES, we identified

compound heterozygous mutations in *VRK1* as the possible candidate gene in a patient with hereditary motor neuropathy predominantly affecting the lower limbs in association with upper motor neuron signs and normal brain MRI.

As previously reported, patients harbouring recessive nonsense mutations in *VRK1* present with an early onset complex phenotype characterised by spinal muscular atrophy in association with pontocerebellar hypotrophy, and microcephaly (Renbaum, 2009). In addition, two siblings harbouring two compound heterozygous missense mutations in *VRK1* were described with axonal neuropathy associated with microcephaly (Gonzaga-Jauregui, 2013). And more recently, compound heterozygous mutations were reported in association with adult onset spinal muscle atrophy (SMA) and childhood motor neuron disease and microcephaly (Stoll, 2016).

In contrast to these previously reported cases, our case did not have microcephaly or pontocerebellar hypoplasia and was characterised by predominant lower limb motor neuropathy with upper motor neuron signs. The phenotype is similar to the one reported by Nguyen *et al.*, who harboured a compound heterozygous missense mutation (p.H119R and p.R321C) in *VRK1* and was characterised by progressive lower limb weakness and brisk reflexes. Although the case was classified as early onset amyotrophic lateral sclerosis, the patient had normal sensory and motor nerve conduction studies with active (fibrillations, positive sharp waves, complex repetitive discharges and fasciculation) and chronic denervation restricted to the lower limbs similar to our case. On lower limb MRI, the anterolateral compartments were relatively spared as is observed in motor neuropathies due to mutations in the small heat shock protein HSPB1 and HSPB8 (Rossor, 2012).

The R358X non-sense mutation in *VRK1* reported by Renbaum *et al.* resulted in the absence of *VRK1* protein in the nucleus (Renbaum, 2009; Vinograd-Byk, 2015). *VRK1* encodes the vaccinia related kinase-1, a serine/threonine kinase. *VRK1* is ubiquitously expressed and localises to the nucleus (Lopez-Borges, 2000), with high levels of expression in mitotic cells (Gonzaga-Jauregui, 2013). *VRK1* is critical for early brain development (Gonzaga-Jauregui, 2013; Vinograd-Byk, 2015), and important for postmitotic neuronal migration (Vinograd-Byk, 2015). *VRK1* is involved in wide array of cellular processes, by reversible phosphorylation of multiple transcriptional factors involved in cell cycle progression (p53, CREB, Mdm2, ATF-2, c-JUN) (Valbuena, 2011). Recent studies suggest that mutated *VRK1* affects the expression of genes associated

with the Reelin pathway (Vinograd-Byk, 2015), a pathway known to play a role in motor neuronal migration in the spinal cord of the developing nervous system (Hawthorne, 2014).

In conclusion, we propose that missense mutations in *VRK1* manifest a milder phenotype compared to nonsense mutation characterized by a combination of upper and lower motor neuron signs mostly confined to the lower limbs, with normal brain development.

REFERENCES

- Cottenie, E., Kochanski, A., Jordanova, A., Bansagi, B., Zimon, M., Horga, A., *et al.* Truncating and missense mutations in IGHMBP2 cause Charcot-Marie Tooth disease type 2. *Am J Hum Genet.* 2014; 95(5):590-601.
- Gonzaga-Jauregui, C., Lotze, T., Jamal, L., Penney, S., Campbell, I.M., Pehlivan, D., *et al.* Mutations in *VRK1* associated with complex motor and sensory axonal neuropathy plus microcephaly. *JAMA Neurol.* 2013; 70(12):1491-8.
- Hawthorne, A.L. Repurposing Reelin: the new role of radial glia, Reelin and Notch in motor neuron migration. *Exp Neurol.* 2014; 256(17-20).
- Lopez-Borges, S., Lazo, P.A. The human vaccinia-related kinase 1 (*VRK1*) phosphorylates threonine-18 within the mdm-2 binding site of the p53 tumour suppressor protein. *Oncogene.* 2000; 19(32):3656-64.
- Nguyen, T.P., Biliciler, S., Wiszniewski, W., Sheikh, K. Expanding Phenotype of *VRK1* Mutations in Motor Neuron Disease. *J Clin Neuromuscul Dis.* 2015; 17(2):69-71.
- Renbaum, P., Kellerman, E., Jaron, R., Geiger, D., Segel, R., Lee, M., *et al.* Spinal muscular atrophy with pontocerebellar hypoplasia is caused by a mutation in the *VRK1* gene. *Am J Hum Genet.* 2009; 85(2):281-9.
- Rossor, A.M., Kalmar, B., Greensmith, L., Reilly, M.M. The distal hereditary motor neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2012; 83(1):6-14.
- Shigemizu, D., Momozawa, Y., Abe, T., Morizono, T., Boroevich, K.A., Takata, S., *et al.* Performance comparison of four commercial human whole-exome capture platforms. *Sci Rep.* 2015; 5(12742).
- Stoll M, Teoh H, Lee J, Reddel S, Zhu Y, Buckley M, Sampaio H, Roscioli T, Farrar M,

Nicholson G. Novel motor phenotypes in patients with VRK1 mutations without pontocerebellar hypoplasia. *Neurology*. 2016 Jul 5;87(1):65-70.

Valbuena, A., Castro-Obregon, S., Lazo, P.A. Downregulation of VRK1 by p53 in response to DNA damage is mediated by the autophagic pathway. *PLoS One*. 2011; 6(2):e17320.

Vinograd-Byk, H., Sapir, T., Cantarero, L., Lazo, P.A., Zeligson, S., Lev, D., *et al*. The spinal muscular atrophy with pontocerebellar hypoplasia gene VRK1 regulates neuronal migration through an amyloid-beta precursor protein-dependent mechanism. *J Neurosci*. 2015; 35(3):936-42.

Figure 1. Brain and spinal cord MRI of the proband. (1a-1d) Pictures of the patient showing pes cavus and wasting distally in lower limbs with normal upper limbs. (1e-1f) Sagittal and coronal T1-weighted MRI showing normal brain. (1g) Sagittal T2-weighted MRI showing normal spinal cord. (1h) Axial T1-weighted MRI of the thighs demonstrating normal appearance. (1i-1j) Axial T1-weighted MRI of lower legs showing atrophy of the leg muscles with fatty replacement particularly affecting tibialis posterior, soleus and gastrocnemius.

Figure 2. (A-B Show the VRK gene and protein structure (C) shows segregation of the two mutations in the family (D) shows conservation of threonine (T) amino acid at position 228 of the *VRK1* gene across species. NLS = nuclear localization signal.

Table 1. Nerve conduction studies and electromyography performed at 31 years of age. CMAP = compound muscle action potential, MNCV = motor nerve conduction velocity, DML = distal minimal latency, SNAP = sensory nerve action potential, SNCV = sensory nerve conduction velocity, mV = millivolts, m/s = meter/second, ms = milliseconds, μ V = microvolts, Fibs = fibrillations, PSW = positive sharp waves, MUAP = motor unit action potential, Amp = amplitude, Poly = polyphasic, Rec = recruitment, Int = interference pattern, Red = reduced, N = normal, + present, $\uparrow$ = increased, $\downarrow$ = decreased, MH = medial head, FDIO = first dorsal interosseous, R = right, L = left.

Supplementary table 1. Genes included in distal hereditary motor neuropathy target panel.

Gene name	Gene symbol	Inheritance pattern	Phenotype
ATPase Cu ⁽²⁺⁾ -transporting, alpha polypeptide	ATP7A	XLR	dHMN, X-linked 3
Bicaudal D homolog of drosophila 2	BICD2	AD	SMALED
BSCL2	BSCL2	AD	dHMN VA, Silver Syndrome
Dynactin 1	DCTN1	AD	dHMN VIIB
Dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1	DYNC1H1	AD	CMT2, SMALED
Glycyl-tRNA synthetase	GARS	AD	CMT2D, dHMN VA
Heat-shock 27-KD protein 1	HSPB1	AD	CMT2F, dHMN IIB
Heat-shock 27-KD protein 3	HSPB3	AD	dHMN IIC
Heat-shock 27-KD protein 8	HSPB8	AD	CMT2L, dHMN IIA
Immunoglobulin MU-binding protein 2	IGHMBP2	AR	CMT2S, dHMN VI
Senataxin	SETX	AD	ALS 4
Solute carrier family 52 (Riboflavin transporter), member 1	SLC52A1	AR	MADRAS
Solute carrier family 52 (Riboflavin transporter), member 2	SLC52A2	AR	Brown-Vialetto-Van syndrome 2
Solute carrier family 52 (Riboflavin transporter), member 3	SLC52A3	AR	Brown-Vialetto-Van syndrome 1, Fazio-Londe disease
Transient receptor potential cation channel, subfamily V, Member 4	TRPV4	AD	dHMN IIC

ARTIGO EM REVISÃO NO JOURNAL OF NEUROMUSCULAR DISORDERS

Manuscript Details

Manuscript number	NMD_2017_608
Title	IGHMBP2 mutation associated with organ-specific autonomic dysfunction
Article type	Case report

Abstract

Biallelic mutations in the IGHMBP2 have been associated with two distinct phenotypes: spinal muscle atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1) and CMT2S. We describe a patient who developed progressive muscle weakness and wasting in her upper and lower limbs from infancy. She developed respiratory involvement aged 9, eventually requiring 24-hour non-invasive ventilation, and severe autonomic dysfunction restricted to the gastrointestinal tract. Neurophysiological studies at age 27 years revealed absent sensory and motor responses and severe chronic denervation changes in proximal muscles of the upper limbs. Targeted multigene panel sequencing detected a novel homozygous missense variant in the IGHMBP2 gene (c.1325A>G; p.Tyr442Cys). This variant was validated by Sanger sequencing and co-segregation analysis confirmed that both parents were asymptomatic heterozygous carriers. Our data supports that IGHMBP2 mutations may also cause overlapping SMARD1-CMT2S phenotypes and that organ-specific autonomic dysfunction may be a feature of the disease.

Keywords	CMT, IGHMBP2 gene, target multigene panel, next generation sequencing, SMARD1
Corresponding Author	Pedro José Tomaselli
Corresponding Author's Institution	Clinical Hospital of Ribeirão Preto
Order of Authors	Pedro José Tomaselli, Alejandro Horga, Alexander Rossor, Zane Jaunmuktane, Andrea Cortese, Julian Blake, Natalia Zarate-Lopes, Henry Houlden, Mary Reilly
Suggested reviewers	Mario Saporta, Maria Jędrzejowska, DAVIDE PAREYSON

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Cover Letter.pdf [Cover Letter]

NMD_submission_checklist.pdf [Checklist]

Highlights.docx [Highlights]

Manuscript.docx [Manuscript File]

Figure 1.tiff [Figure]

Figure 2.jpg [Figure]

Figures legends.docx [Figure]

NMD_author_agreement_form.pdf [Author Agreement]

Supplementary Material.pdf [e-Component]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

***IGHMBP2* mutation associated with organ-specific autonomic dysfunction**

Pedro J Tomaselli^{a, b*}, Alejandro Horga^{a*}, Alexander M Rossor^a, Zane Jaunmuktane^c, Andrea Cortese^a, Julian C Blake^d, Natalia Zarate-Lopez^e, Henry Houlden^a, Mary M Reilly^a

^a MRC Centre for Neuromuscular Diseases, National Hospital for Neurology and Neurosurgery and UCL Institute of Neurology, Queen Square, London, UK, WC1N 3AR.

^b Department of Neuromuscular Disorders, Clinical Hospital of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil, 14640-900.

^c Division of Neuropathology, National Hospital for Neurology and Neurosurgery and UCL Institute of Neurology, Queen Square, London, UK, WC1N 3AR.

^d Department of Clinical Neurophysiology, Norfolk and Norwich University Hospital, Norwich, UK, NR4 7UY.

^e Department of Gastroenterology, University College London Hospitals, London, UK, NW1 2BU.

*These authors contributed equally for this study.

Declarations of interest: none

Correspondence to:

Professor Mary M Reilly. MRC Centre for Neuromuscular Diseases, National Hospital for Neurology and Neurosurgery and UCL Institute of Neurology, Box 108, Queen Square, London, WC1N 3BG, UK. Phone: +44 020 3448 8457. Fax: +44 020 3448 3633. Email: m.reilly@ucl.ac.uk.

Abstract

Biallelic mutations in the *IGHMBP2* have been associated with two distinct phenotypes: spinal muscle atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1) and CMT2S. We describe a patient who developed progressive muscle weakness and wasting in her upper and lower limbs from infancy. She developed respiratory involvement aged 9, eventually requiring 24-hour non-invasive ventilation, and severe autonomic dysfunction restricted to the gastrointestinal tract. Neurophysiological studies at age 27 years revealed absent sensory and motor responses and severe chronic denervation changes in proximal muscles of the upper limbs. Targeted multigene panel sequencing detected a novel homozygous missense variant in the *IGHMBP2* gene (c.1325A>G; p.Tyr442Cys). This variant was validated by Sanger sequencing and co-segregation analysis confirmed that both parents were asymptomatic heterozygous carriers. Our data supports that *IGHMBP2* mutations may also cause overlapping SMARD1-CMT2S phenotypes and that organ-specific autonomic dysfunction may be a feature of the disease.

Keywords: CMT, *IGHMBP2* gene, target multigene panel, next generation sequencing, SMARD1

Abbreviations:

CMT = Charcot-Marie-Tooth disease

EMG = electromyography

MRC = Medical Research Council

PEG = percutaneous endoscopic gastrostomy

SMARD1 = spinal muscle atrophy with respiratory distress

WES = whole exome sequencing

1. Introduction

Autosomal recessive mutations in the immunoglobulin μ -binding protein 2 gene (*IGHMBP2*) have been associated with two distinct phenotypes: spinal muscle atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1) and, more recently, Charcot-Marie-Tooth disease type 2S (CMT2S). In SMARD1, degeneration of alpha motor neurons of the spinal cord results in diaphragmatic paralysis and distal muscular atrophy. Sensory and autonomic nerves are also affected in some patients. The disorder usually starts in infancy and early death due to respiratory distress is a hallmark of the disease, although patients with milder phenotypes (later onset and survival until 15-20 years of age) have been described [1, 2]. In contrast, patients with CMT2S develop an axonal neuropathy manifesting with slowly progressive, distal-predominant muscle weakness and sensory loss with preserved respiratory function [3, 4].

We describe a case of motor and sensory axonal neuropathy associated with respiratory involvement and severe gastrointestinal organ-specific autonomic dysfunction due to a novel missense mutation in *IGHMBP2*, illustrating the phenotypic overlap between SMARD1 and CMT2S.

2. Case report

The patient was evaluated in the inherited neuropathy clinic in the Centre for Neuromuscular Diseases, National Hospital for Neurology and Neurosurgery, London, UK. Written informed consent was obtained for participation in the study and

for publication of images. Methods for whole exome sequencing (WES), targeted multigene panel and Sanger sequencing are provided in the [supplementary material](#). Nerve conduction studies, EMG and nerve biopsy were performed using standard methods. This study was approved by the local research ethics committee.

2.1 Clinical history and phenotype.

The patient was the eldest daughter of two siblings born to consanguineous healthy parents of Iranian origin. Her family history was unremarkable. She presented with hypotonia and delayed walking during infancy. Despite this, she was able to walk independently until 4 years of age, when she started to use ankle-foot orthoses. By 6 years of age, she was wheelchair-bound. Following an episode of pneumonia at 9 years of age, she was started on nocturnal non-invasive ventilation and over the subsequent months, she became 24-hour ventilator dependent. She reported no sensory or urinary symptoms, abnormal sweating or vasomotor symptoms.

She developed gastrointestinal symptoms in the first decade of life characterized by abdominal bloating, infrequent bowel movements and constipation. Additional gastrointestinal symptoms developed over the following years, including excessive saliva, dysphagia and odynophagia eventually resulting in intermittent nasogastric tube placement to relieve the gastric gaseous distension.

Unfortunately, her gastrointestinal symptoms gradually worsened and, at age 14 years, she developed recurrent episodes of acute bowel distension affecting her respiratory capacity and requiring more frequent nasogastric tube placement. At age 27 years, a percutaneous endoscopic gastrostomy (PEG) was performed from which 1-3 liters of gastric content was drained per day because of gastroparesis and slow bowel function.

At age 28 years, oesophageal intraluminal impedance testing showed excessive gastroesophageal reflux. Anorectal physiology studies confirmed normal sphincter function and rectal sensation but despite this, her constipation worsened to the extent she required an enema every other day. Prokinetic medications had limited effect on her symptoms and her weight decreased. At age 30 years, she was started on total parenteral nutrition.

Examination at 27 years of age revealed severe kyphoscoliosis ([figure 1](#)). Cranial nerve examination, including eye movements, tongue and palate, was normal. There was mild neck flexion weakness. Her upper and lower limbs were wasted proximally and distally and she was severely weak globally with Medical Research Council (MRC) grades for shoulder adduction 4+/5, elbow flexion and extension 1/5 and finger flexion 1/5 bilaterally with no movement more distally in the upper limbs and no movement in the lower limbs. Deep tendon reflexes were absent and plantar responses were mute. Pinprick sensation was normal throughout. Vibration sense was absent at the toes and ankles and proprioception was absent at the toes.

Subsequent examinations confirmed progression of the motor and sensory deficits. Nerve conduction studies performed at age 27 years revealed absent sensory and motor responses throughout. Needle EMG showed severe chronic denervation in proximal muscles of the upper limbs (biceps and deltoid).

2.2 Genetics studies

Targeted Sanger sequencing of *MFN2*, *MPZ*, *LMNA*, *MT-ATP6* and *MT-ATP8* genes revealed no pathogenic mutations. Given the atypical phenotype, we performed whole exome sequencing (WES) which revealed a novel heterozygous variant in *IGHMBP2* (c.1325A>G; p.Tyr442Cys). WES coverage of some genes involved in hereditary neuropathy was low ([supplementary table 1](#)) and we therefore decided to

proceed with targeted multi-gene panel testing to confirm the absence of mutations in common neuropathy-related genes. Interestingly, the targeted multi-gene panel detected the same variant in *IGHMBP2* detected by WES but in homozygosity (see [supplementary table 2](#) for genes included and alignment statistics). *In silico* analyses revealed that, this variant involved an evolutionarily conserved amino acid, and was predicted to be pathogenic ([supplementary material](#)). The homozygous variant was validated by Sanger sequencing and the analysis of parental DNA samples confirmed that both parents were heterozygous carriers. This variant has been submitted to the Inherited Neuropathy Variant Browser.

2.3 Nerve biopsy aged 3

All fascicles in the biopsy were small size (Figure 2). Nerve fibers across the fascicles were small and moderately thinly myelinated. There was no evidence of ongoing active axonal degeneration or demyelination and no inflammatory infiltrates were observed. Teased fiber preparation showed uniformly short internodes suggesting some regeneration. Electronic microscopy revealed some myelinated fibers with reduplicated basement membranes and a few small clusters of regeneration.

3. Discussion

We describe a patient with autosomal recessive motor and sensory neuropathy with severe organ-specific autonomic dysfunction due to a novel *IGHMBP2* missense variant. The mutation was miscalled as a heterozygous allele on whole exome sequencing due to poor coverage but was detected in homozygosity using a targeted gene panel.

The present case has features that diverge from classical SMARD1 and CMT2S phenotypes. In contrast to SMARD1, in which most patients require assisted ventilation within the first year of life and die within the first decade of life, our patient developed respiratory involvement requiring non-invasive ventilation at age 9 years and is still alive in her 30s. Sensory involvement and autonomic dysfunction, including excessive sweating, tachycardia, constipation and bladder dysfunction, have been described in patients with SMARD1 but also in patients with CMT2S due to *IGHMBP2* mutations. For this reason, we believe our patient represents an overlapping SMARD1 / CMT2S phenotype within the spectrum of *IGHMBP2*-related disorders.

It is not clear why our patient has autonomic dysfunction restricted to the gastrointestinal tract. Autonomic involvement in patients with *IGHMBP2*-related disorders has been previously described. Jedrzejowska *et al.* reported five patients from four different families with autonomic dysfunction, including mild-to-severe excessive sweating, tachycardia, constipation and bladder dysfunction [5]. Schottmann *et al.* reported two siblings with progressive autonomic features including gastrointestinal and bladder dysfunction in association with an axonal sensorimotor neuropathy without respiratory distress, one of whom required surgery for achalasia at age 18 years [4].

IGHMBP2 encodes a protein belonging to the putative helicase superfamily. It is expressed in developing and adult human brain, with high expression in the cerebellum [3]. It is functionally linked to translation and may be a component of the translational machinery [6, 7].

We suggest that mutations in *IGHMBP2* may cause an early onset severe sensory motor axonal neuropathy in association with severe organ specific autonomic neuropathy affecting the gastrointestinal tract.

Acknowledgements

AMR is funded by a Wellcome Trust Postdoctoral Fellowship for Clinicians (110043/Z/15/Z). MMR is grateful to the Medical Research Council (MRC), MRC Centre grant (G0601943), and to the National Institutes of Neurological Diseases and Stroke and office of Rare Diseases (U54NS065712) for their support. The INC (U54NS065712) is a part of the NCATS Rare Diseases Clinical Research Network (RDCRN). This research was also supported by the National Institute for Health Research University College London Hospitals Biomedical Research Centre. PJT was supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the National Institutes of Neurological Diseases and Stroke and office of Rare Diseases.

References

- [1] Grohmann, K., Wienker, T.F., Saar, K., Rudnik-Schoneborn, S., Stoltenburg-Didinger, G., Rossi, R., *et al.* Diaphragmatic spinal muscular atrophy with respiratory distress is heterogeneous, and one form is linked to chromosome 11q13-q21. *Am J Hum Genet.* 1999; 65(5):1459-62.
- [2] Grohmann, K., Schuelke, M., Diers, A., Hoffmann, K., Lucke, B., Adams, C., *et al.* Mutations in the gene encoding immunoglobulin mu-binding protein 2 cause spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Nat Genet.* 2001; 29(1):75-7.

- [3] Cottenie, E., Kochanski, A., Jordanova, A., Bansagi, B., Zimon, M., Horga, A., *et al.* Truncating and missense mutations in IGHMBP2 cause Charcot-Marie Tooth disease type 2. *Am J Hum Genet.* 2014; 95(5):590-601.
- [4] Schottmann, G., Jungbluth, H., Schara, U., Knierim, E., Morales Gonzalez, S., Gill, E., *et al.* Recessive truncating IGHMBP2 mutations presenting as axonal sensorimotor neuropathy. *Neurology.* 2015; 84(5):523-31.
- [5] Jedrzejowska, M., Madej-Pilarczyk, A., Fidzianska, A., Mierzewska, H., Pronicka, E., Obersztyn, E., *et al.* Severe phenotypes of SMARD1 associated with novel mutations of the IGHMBP2 gene and nuclear degeneration of muscle and Schwann cells. *Eur J Paediatr Neurol.* 2014; 18(2):183-92.
- [6] de Planell-Saguer, M., Schroeder, D.G., Rodicio, M.C., Cox, G.A., Mourelatos, Z. Biochemical and genetic evidence for a role of IGHMBP2 in the translational machinery. *Hum Mol Genet.* 2009; 18(12):2115-26.
- [7] Guenther, U.P., Handoko, L., Varon, R., Stephani, U., Tsao, C.Y., Mendell, J.R., *et al.* Clinical variability in distal spinal muscular atrophy type 1 (DSMA1): determination of steady-state IGHMBP2 protein levels in five patients with infantile and juvenile disease. *J Mol Med (Berl).* 2009; 87(1):31-41.

Websites

Exome Variant Server: <http://evs.gs.washington.edu/EVS>. Accessed May 12, 2017.

Exome Aggregation Consortium: <http://exac.broadinstitute.org>. Accessed May 12, 2017.

Inherited Neuropathy Variant Browser:

http://hihg.med.miami.edu/code/http/cmt/public_html/index.html#/

Supplementary Material

Next generation sequencing

WES and targeted multigene panel on DNA from blood sample obtained from patient was performed at Neurogenetics Laboratory of UCL Institute of Neurology; Queen Square, London, UK using the Illumina's Nextera rapid capture focused enrichment kit and run on the Illumina HiSeq 2500 instrument. The resulting 100bp paired-end sequence reads were mapped against the human reference genome assembly 19 (GRCh37) with the Burrows-Wheeler Aligner (BWA) package. NGS analysis was performed using in house pipeline.

Whole exome sequencing

WES revealed a total of 22,346 exonic variants. Variants were filtered for non-synonymous, splice-site, and coding indel variants that had a minor allele frequency (MAF) <0.1% in the Exome Variant Server (EVS), 1000 genome project and Exome Aggregation Consortium database (ExAC). 323 variants met these filtering criteria, and one variant was in a gene associated with inherited neuropathies. The c.1325A>G; p.Tyr442Cys, was found in heterozygosity in *IGHMBP2*. This variant has not been previously reported in the literature or to public databases of genetic variation (dbSNP, NHLBI exome variant server, ExAC database). It is located in a high conserved region (phastCons = 1 and phyloP = 4.56), there is a large physiochemical difference between Tyrosin (Tyr) and Cysteine (Cys) and has been predicted to be pathogenic by SIFT (1), MutationTaster (p-value: 1), and Polyphen2 (1).

Targeted multigene panel

Target multigene panel analysis revealed that 99.82% of the coding exons (+/- base pairs, except GJB1, for which the target region is extended 860 bases upstream of the ATG start codon to include the nerve specific promoter region) of all genes in the panel were sequenced to a read depth of 30X or greater. The minimum coverage depth of coverage was 19X for AARS gene. The regions with coverage below 30X were analyzed manually.

Sanger sequencing

PCRs were performed with AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), with an annealing temperature of 58°C. Sequencing reactions were performed using M13 primers and BigDye Terminator cycle sequencing chemistry (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Sequences were analyzed on an ABI3730XL automated DNA sequencer and SeqScape software (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Primers are available under request.

Supplementary table 1. List of genes related to CMT2 and hereditary motor neuropathy and alignment statistics of depth coverage on WES.

	Gene	On-target			Average depth	Median depth	Max depth
		≥1X (%)	≥10 (%)	≥30X (%)			
Alanyl-tRNA synthetase	AARS	100	98	96	99	97	192
ATPase Cu ⁽²⁺⁾ -transporting, alpha polypeptide	ATP7A	100	100	88	72	68	185
Bicaudal D homolog of drosophila 2	BICD2	100	84	54	39	34	114
BSCL2	BSCL2	98	94	87	88	94	182

Dynactin 1	DCTN1	100	100	87	88	88	194
Dynamamin 2	DNM2	100	100	90	94	97	247
Dynein, cytoplasmic 1, heavy chain 1	DYNC1H1	100	100	96	101	100	218
Early growth response 2	EGR2	100	74	58	56	45	189
FGD1-related F-actin binding protein	FGD4	100	99	91	68	70	134
SAC domain containing inositol phosphatase 3	FIG4	100	100	97	77	72	180
Glycyl-tRNA synthetase	GARS	100	100	94	88	88	207
Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1	GDAP1	100	100	100	104	98	208
GAP junction protein, beta-1	GJB1 (including promoter region)	67	48	32	24	29	115
Histidine triad nucleotide-binding protein 1	HINT1	100	91	65	47	45	112
Heat-shock 27-KD protein 1	HSPB1	100	84	77	85	85	197
Heat-shock 27-KD protein 8	HSPB8	100	79	73	79	84	182
Immunoglobulin mu-binding protein 2	IGHMBP2	100	97	85	71	69	177
LPS-induced TNF-alpha factor	LITAF	100	91	68	52	54	130
Lamin A/C	LMNA	99	94	84	76	71	186
Leucin-rich repeat and sterile alpha motif containing 1	LRSAM1	100	100	96	98	99	204
Methionyl-tRNA synthetase	MARS	100	93	63	44	41	140
Mitofusin 2	MFN2	100	100	97	101	101	215

Myelin protein zero	MPZ	100	100	76	61	57	150
Myotubularin-related protein 2	MTMR2	100	100	100	90	88	183
NMYC downstream-regulated gene 1	NDRG1	100	90	78	67	67	146
Neurofilament protein, light polypeptide	NEFL	100	96	78	60	57	146
Pheripheral myelin protein 22	PMP22	100	100	100	104	101	171
Phosphoribosylpyrophosphate synthetase 1	PRPS1	100	100	100	95	90	170
Periaxin	PRX	100	92	75	75	63	257
Sterile alpha motif domain-containing protein 9	RAB7A	100	94	92	94	104	142
SET-binding factor 2	SBF2	100	100	95	73	73	159
Senataxin	SETX	100	98	83	72	67	238
SH3 domain and tetratricopeptide repeat domain 2	SH3TC2	100	98	87	82	83	219
Solute carrier family 52 (Riboflavin transporter), member 1	SLC52A1	98	72	41	28	25	92
Solute carrier family 52 (Riboflavin transporter), member 2	SLC52A2	100	83	50	47	31	175
Solute carrier family 52 (Riboflavin transporter), member 3	SLC52A3	100	91	76	68	60	208
Transient receptor potential cation channel, subfamily 5, member 4	TRPV4	100	93	78	69	67	210
Valosin containing protein	VCP	100	98	95	108	108	231

Tyrosyl-tRNA synthetase	YARS	100	100	95	88	86	239
-------------------------	------	-----	-----	----	----	----	-----

Supplementary table 2. List of genes related to CMT2 and hereditary motor neuropathy and alignment statistics of depth coverage on targeted multigene panel.

Gene		≥1X (%)	≥10X (%)	≥30X (%)	Average depth	Median depth	Max depth
Alanyl-tRNA synthetase	AARS	100	100	99.6	328	322	756
BSCL2	BSCL2	100	100	100	303	263	779
Dynamin 2	DNM2	100	100	100	288	280	781
Dynein, cytoplasmic 1, heavy chain 1	DYNC1H1	100	100	99.9	358	329	963
Glycyl-tRNA synthetase	GARS	100	100	99.8	273	240	741
Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1	GDAP1	100	100	100	472	387	1170
GAP junction protein, beta-1	GJB1 (Including promoter region)	100	100	100	329	274	601
Histidine triad nucleotide-binding protein 1	HINT1	100	100	100	405	363	816
Heat-shock 27-KD protein 1	HSPB1	100	100	100	366	299	656
Heat-shock 27-KD protein 8	HSPB8	100	100	100	303	283	572
Immunoglobulin mu-binding protein 2	IGHMBP2	100	100	100	334	333	702
Lamin A/C	LMNA	100	100	100	374	352	949
Leucin-rich repeat and sterile alpha motif containing 1	LRSAM1	100	100	98.2	276	246	784

Methionyl-tRNA synthetase	MARS	100	100	100	368	359	704
Mitofusin 2	MFN2	100	100	100	281	278	695
Myelin protein zero	MPZ	100	100	100	327	292	801
Neurofilament protein, light polypeptide	NEFL	100	100	100	292	223	689
Pheripheral myelin protein 22	PMP22	100	100	100	546	545	1044
Phosphoribosylpyrophosphate synthetase 1	PRPS1	100	100	100	372	354	645
Sterile alpha motif domain-containing protein 9	RAB7A	100	100	100	456	395	884
SH3 domain and tetratricopeptide repeat domain 2	SH3TC2	100	100	100	357	381	508
Transient receptor potential cation channel, subfamily 5, member 4	TRPV4	100	100	100	362	377	676
Valosin containing protein	VCP	100	100	98.67	310	278	776
Tyrosyl-tRNA synthetase	YARS	100	100	100	315	322	640

REFERÊNCIAS

Adachi H, Ishihara K, Tachibana H, Oka N, Higuchi Y, Takashima H, Yoneda Y, Kageyama Y. Adult-onset Krabbe disease presenting with an isolated form of peripheral neuropathy. *Muscle Nerve*. 2016 Jun;54(1):152-7. doi: 10.1002/mus.25067. Epub 2016 May 19.

Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*. 2013 Jan; Chapter 7:Unit7.20. doi: 10.1002/0471142905.hg0720s76

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010 Apr;7(4):248-9.

Albers CA, Lunter G, MacArthur DG, McVean G, Ouwehand WH, Durbin R. Dindel: accurate indel calls from short-read data. *Genome Res*. 2011 Jun;21(6):961-73.

Al-Saif A, Al-Mohanna F, Bohlega S. A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2011;70:913–919.

Ainsworth PJ, Bolton CF, Murphy BC, Stuart JA, Hahn AF. Genotype/phenotype correlation in affected individuals of a family with a deletion of the entire coding sequence of the connexin 32 gene. *Hum Genet*. 1998 Aug;103(2):242-4.

Antonellis A, Green ED. The role of aminoacyl-tRNA synthetases in genetic diseases. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008;9:87–107.

Antonellis A, Ellsworth RE, Sambuughin N, Puls I, Abel A, Lee-Lin SQ, Jordanova A, Kremensky I, Christodoulou K, Middleton LT, et al. Glycyl tRNA synthetase mutations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D and distal spinal muscular atrophy type V. *Am J Hum Genet*. 2003;72:1293–9.

Arnaud E, Zenker J, de Preux Charles AS, Stendel C, Roos A, Médard JJ, Tricaud N, Kleine H, Luscher B, Weis J, Suter U, Senderek J, Chrast R. SH3TC2/KIAA1985 protein is required for proper myelination and the integrity of the node of Ranvier in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Oct 13;106(41):17528-33. doi: 10.1073/pnas.0905523106.

Attarian S, Vallat J-M, Magy L, et al. An exploratory randomised double-blind and placebo-controlled phase 2 study of a combination of baclofen, naltrexone and sorbitol (PXT3003) in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Orphanet J. Rare Dis*. 2014;9:199.

Auer-Grumbach M, Toegel S, Schabhüttl M, Weinmann D, Chiari C, Bennett DLH, Beetz C, Klein D, Andersen PM, Böhme I, Fink-Puches R, Gonzalez M, Harms MB, Motley W, Reilly MM, Renner W, Rudnik-Schöneborn S, Schlotter-Weigel B, Themistocleous AC, Weishaupt JH, Ludolph AC, Wieland T, Tao F, Abreu L, Windhager R, Zitzelsberger M, Strom TM, Walther T, Scherer SS, Züchner S, Martini R, Senderek J. Rare Variants in MME, Encoding Metalloprotease Neprilysin, Are Linked to Late-Onset Autosomal-Dominant Axonal Polyneuropathies. *Am J Hum Genet*. 2016 Sep 1;99(3):607-623. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.07.008.

Azzedine H, Ravisé N, Verny C, Gabrëels-Festen A, Lammens M, Grid D, Vallat JM, Durosier G, Senderek J, Nouioua S, Hamadouche T, Bouhouche A, Guilbot A, Stendel C, Ruberg M, Brice A, Birouk N, Dubourg O, Tazir M, LeGuern E Spine deformities in Charcot-Marie-Tooth 4C caused by SH3TC2 gene mutations. *Neurology*. 2006 Aug 22;67(4):602-6.

Baets J, Deconinck T, De Vriendt E, Zimoń M, Yperzeele L, Van Hoorenbeeck K, Peeters K, Spiegel R, Parman Y, Ceulemans B, Van Bogaert P, Pou-Serradell A, Bernert G, Dinopoulos A, Auer-Grumbach M, Sallinen SL, Fabrizi GM, Pauly F, Van den Bergh P, Bilir B, Battaloglu E, Madrid RE, Kabzińska D, Kochanski A, Topaloglu H, Miller G, Jordanova A, Timmerman V, De Jonghe P Genetic spectrum of hereditary neuropathies with onset in the first year of life. *Brain*. 2011 Sep;134(Pt 9):2664-76. doi: 10.1093/brain/awr184. Epub 2011 Aug 11.

Baets J, Timmerman V. Inherited peripheral neuropathies: A myriad of genes and complexes phenotypes. *Brain*. 2011 134:1585-1590.

Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, Shendure J.. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet*. 2011 Nov;12(11):745-55.

Banchs I, Casasnovas C, Montero J, Volpini V, Martínez-Matos JA. Charcot-Marie-Tooth disease with intermediate conduction velocities caused by a novel mutation in the MPZ gene. *Muscle Nerve*. 2010 Aug;42(2):184-8. doi: 10.1002/mus.21643.

Barber KE, Ford AM, Harris RL, Harrison CJ, Moorman AV. MLL translocations with concurrent 3' deletions: interpretation of FISH results. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004 Nov;41(3):266-71.

Batzer, M.A, Deininger, P.L. Repeats of Alu and Human Diversity of Genomic. *Genetics* 3: 370-9, 2002.

Bennett CA, Petrovski S, Oliver KL, Berkovic SF. ExACTly zero or once: A clinically helpful guide to assessing genetic variants in mild epilepsies. *Neurol Genet*. 2017 Jul 6;3(4):e163.

Bentley, D.R. et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 2008 456(7218), 53-9. doi:10.1038/nature07517.

Bernard-Marissal N, Medard JJ, Azzedine H, Chrast R. Dysfunction in endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk underlies SIGMAR1 loss of function mediated motor neuron degeneration. *Brain* 2015;138:875–890

Bird TD. Charcot-Marie-Tooth Hereditary Neuropathy Overview. 1998 Sep 28 [Updated 2016 Sep 1]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1358>

Bird, A. Perceptions of epigenetics. *Nature*. 2007 May 24;447(7143):396-8.

Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet*. 2003 Mar;33 Suppl:228-37.

Bras, J., Guerreiro, R., Hardy, J. Use of next-generation sequencing and other whole-

genome strategies to dissect neurological disease. *Nat Rev Neurosci* 2012 13(7), 453-64. doi:10.1038/nrn3271.

Brewer MH, Chaudhry R, Qi J, Kidambi A, Drew AP, Menezes MP, Ryan MM, Farrar MA, Mowat D, Subramanian GM, Young HK, Zuchner S, Reddel SW, Nicholson GA, Kennerson ML. Whole Genome Sequencing Identifies a 78 kb Insertion from Chromosome 8 as the Cause of Charcot-Marie-Tooth Neuropathy CMTX3. *PLoS Genet.* 2016 Jul 20;12(7):e1006177. doi: 10.1371/journal.pgen.1006177.

Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, Hunter K, Stanton VP, Thirion JP, Hudson T. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell.* 1992 Feb 21;68(4):799-808. Erratum in: *Cell.* 1992 Apr 17;69(2):385.

Bruder CE, Piotrowski A, Gijsbers AA, Andersson R, Erickson S, Diaz de Ståhl T, Menzel U, Sandgren J, von Tell D, Poplawski A, Crowley M, Crasto C, Partridge EC, Tiwari H, Allison DB, Komorowski J, van Ommen GJ, Boomsma DI, Pedersen NL, den Dunnen JT, Wirdefeldt K, Dumanski JP. Phenotypically concordant and discordant monozygotic twins display different DNA copy-number-variation profiles. *Am J Hum Genet.* 2008 Mar;82(3):763-71. doi: 10.1016/j.ajhg.2007.12.011.

Brennan KM, Bai Y, Pisciotta C, Wang S, Feely SM, Hoegger M, Gutmann L, Moore SA, Gonzalez M, Sherman DL, Brophy PJ, Züchner S, Shy ME. Absence of Dystrophin Related Protein-2 disrupts Cajal bands in a patient with Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromuscul Disord.* 2015 Oct;25(10):786-93. doi: 10.1016/j.nmd.2015.07.001.

Cantuti-Castelvetri L, et al. Mechanism of neuromuscular dysfunction in Krabbe disease. *J Neurosci.* 2015 Jan 28;35(4):1606-16. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2431-14.2015.

Carr AS, Polke JM, Wilson J, Pelayo-Negro AL, Laura M, Nanji T, Holt J, Vaughan J, Rankin J, Sweeney MG, Blake J, Houlden H, Reilly MM. MFN2 deletion of exons 7 and 8: founder mutation in the UK population. *J Peripher Nerv Syst.* 2015 Jun;20(2):67-71. doi: 10.1111/jns.12117.

Castori M, Morlino S, Ungelenk M, Pareyson D, Salsano E, Grammatico P, Tolosano E, Kurth I, Chiabrando D. Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa coexisting with sensory-autonomic neuropathy and leukemia due to the homozygous p.Pro221Ser FLVCR1 mutation. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2017 Oct;174(7):732-739. doi: 10.1002/ajmg.b.32570.

Chance PF, Alderson MK, Leppig KA, Lensch MW, Matsunami N, Smith B, Swanson PD, Odelberg SJ, Distèche CM, Bird TD. DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Cell.* 1993 Jan 15;72(1):143-51.

Chiabrando D, Castori M, di Rocco M, Ungelenk M, Gießelmann S, Di Capua M, Madeo A, Grammatico P, Bartsch S, Hübner CA, Altruda F, Silengo L, Tolosano E, Kurth I. Mutations in the Heme Exporter FLVCR1 Cause Sensory Neurodegeneration with Loss of Pain Perception. *PLoS Genet.* 2016 Dec 6;12(12):e1006461. doi: 10.1371/journal.pgen.1006461

Chiabrando D, Vinchi F, Fiorito V, Mercurio S, Tolosano E. Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. *Front Pharmacol.* 2014;5:61

Chuijal, H. DNA sequencing technologies key to the human genome project. *Nature Education* 2008 1(1):219.

Chumakov I, Milet A, Cholet N, et al. Polytherapy with a combination of three repurposed drugs (PXT3003) down-regulates Pmp22 over-expression and improves myelination, axonal and functional parameters in models of CMT1A neuropathy. *Orphanet J. Rare Dis.* 2014;9:201.

Chun S, Fay JC. Identification of deleterious mutations within three human genomes. *Genome Res.* 2009 Sep;19(9):1553-61.

Claramunt R, Pedrola L, Sevilla T, López de Munain A, Berciano J, Cuesta A, Sánchez-Navarro B, Millán JM, Saifi GM, Lupski JR, Vílchez JJ, Espinós C, Palau F. Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. *J Med Genet.* 2005 Apr;42(4):358-65.

Cooper GM, Goode DL, Ng SB, Sidow A, Bamshad MJ, Shendure J, Nickerson DA. Single-nucleotide evolutionary constraint scores highlight disease-causing mutations. *Nat Methods.* 2010 Apr;7(4):250-1.

Corrado L, Magri S, Bagarotti A, Carecchio M, Piscosquito G, Pareyson D, Varrasi C, Vecchio D, Zonta A, Cantello R, Taroni F, D'Alfonso S. A novel synonymous mutation in the MPZ gene causing an aberrant splicing pattern and Charcot-Marie-Tooth disease type 1b. *Neuromuscul Disord.* 2016 Aug;26(8):516-20.

Cottenie E, Kochanski A, Jordanova A, Bansagi B, Zimon M, Horga A, Jaunmuktane Z, Saveri P, Rasic VM, Baets J, Bartsakoulia M, Ploski R, Teterycz P, Nikolic M, Quinlivan R, Laura M, Sweeney MG, Taroni F, Lunn MP, Moroni I, Gonzalez M, Hanna MG, Bettencourt C, Chabrol E, Franke A, von Au K, Schilhabel M, Kabzinska D, Hausmanowa-Petrusewicz I, Brandner S, Lim SC, Song H, Choi BO, Horvath R, Chung KW, Zuchner S, Pareyson D, Harms M, Reilly MM, Houlden H. Truncating and missense mutations in IGHMBP2 cause Charcot-Marie Tooth disease type 2. *Am J Hum Genet* 2014 95(5): 590-601.

Cintra, Cintra VP, Lourenço CM, Marques SE, de Oliveira LM, Tumas V, Marques W Jr. Mutational screening of 320 Brazilian patients with autosomal dominant spinocerebellar ataxia. *J Neurol Sci.* 2014 Dec 15;347(1-2):375-9. doi: 10.1016/j.jns.2014.10.036.

Cuesta A, Pedrola L, Sevilla T, García-Planells J, Chumillas MJ, Mayordomo F, LeGuern E, Marín I, Vílchez JJ, Palau F. The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet.* 2002 Jan;30(1):22-5. Epub 2001 Dec 17.

Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA, Handsaker RE, Lunter G, Marth GT, Sherry ST, McVean G, Durbin R; 1000 Genomes Project Analysis Group. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics.* 2011 Aug 1;27(15):2156-8.

Davydov EV, Goode DL, Sirota M, Cooper GM, Sidow A, Batzoglou S. Identifying a high fraction of the human genome to be under selective constraint using GERP++. *PLoS Comput Biol.* 2010;6(12):e1001025.

de Planell-Saguer, M., Schroeder, D.G., Rodicio, M.C., Cox, G.A., Mourelatos, Z. Biochemical and genetic evidence for a role of IGHMBP2 in the translational machinery. *Hum Mol Genet.* 2009; 18(12):2115-26.

Depondt C, Donatello S, Rai M, Wang F, Manto M, Simonis N, Pandolfo M. MME mutation in dominant spinocerebellar ataxia with neuropathy (SCA43). *Neurol. Genet.* 2016;2:e94,. Nota: Artigo eletronico.

DiVincenzo C, Elzinga CD, Medeiros AC, Karbassi I, Jones JR, Evans MC, Braastad CD, Bishop CM, Jaremko M, Wang Z, Liaquat K, Hoffman CA, York MD, Batish SD, Lupski JR, Higgins JJ. The allelic spectrum of Charcot-Marie-Tooth disease in over 17,000 individuals with neuropathy. *Mol Genet Genomic Med.* 2014;2:522–9.

Drew AP, Cutrupi AN, Brewer MH, Nicholson GA, Kennerson ML. A 1.35 Mb DNA fragment is inserted into the DHMN1 locus on chromosome 7q34-q36.2. *Hum Genet.* 2016 Nov;135(11):1269-1278.

Drew AP, Zhu D, Kidambi A, Ly C, Tey S, Brewer MH, Ahmad-Annuar A, Nicholson GA, Kennerson ML. Improved inherited peripheral neuropathy genetic diagnosis by whole-exome sequencing. *Mol Genet Genomic Med.* 2015 Mar;3(2):143-54. doi: 10.1002/mgg3.126. Epub 2015 Jan 14.

ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 2012 489, 57–74.

Engelen M, Kemp S, Poll-The BT. X-linked adrenoleukodystrophy: pathogenesis and treatment. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2014 Oct;14(10):486. doi: 10.1007/s11910-014-0486-0. Review.

Esmaeeli Nieh S, Madou MR, Sirajuddin M, Fregeau B, McKnight D, Lexa K, Strober J, Spaeth C, Hallinan BE, Smaoui N, Pappas JG, Burrow TA, McDonald MT, Latibashvili M, Leshinsky-Silver E, Lev D, Blumkin L, Vale RD, Barkovich AJ, Sherr EH. De novo mutations in KIF1A cause progressive encephalopathy and brain atrophy. *Ann Clin Transl Neurol* 2015 2(6): 623-635.

Evgrafov OV, Mersiyanova I, Irobi J, Van Den Bosch L, Dierick I, Leung CL, Schagina O, Verpoorten N, Van Impe K, Fedotov V, Dadali E, Auer-Grumbach M, Windpassinger C, Wagner K, Mitrovic Z, Hilton-Jones D, Talbot K, Martin JJ, Vasserman N, Tverskaya S, Polyakov A, Liem RK, Gettemans J, Robberecht W, De Jonghe P, Timmerman V.. Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy. *Nat Genet.* 2004 Jun;36(6):602-6.

Garrison E, Marth G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. 2012 arXiv:1207.3907v2

Panosyan FB, Mountain JM, Reilly MM, Shy ME, Herrmann DN. Rydel-Seiffer fork revisited: Beyond a simple case of black and white. *Neurology.* 2016 Aug 16; 87(7): 738–740.

García-Sobrino T, Blanco-Arias P, Palau F, Espinós C, Ramirez L, Estela A, San Millán B, Arias M, Sobrido MJ, Pardo J. Phenotypical features of a new dominant GDAP1 pathogenic variant (p.R226del) in axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromuscul Disord.* 2017 Jul;27(7):667-672. doi: 10.1016/j.nmd.2017.01.008. Epub 2017 Jan 17.

Gerding WM, Koetting J, Epplen JT, Neusch C. Hereditary motor and sensory neuropathy caused by a novel mutation in LITAF. *Neuromuscul Disord* (2009)19:701–703.

Gess B, Baets J, De Jonghe P, et al. Ascorbic acid for the treatment of Charcot-Marie-Tooth disease. *Cochrane database Syst. Rev.* 2015;12:CD011952Hartley T, Wagner

JD, Warman-Chardon J, Tétreault M, Brady L, Baker S, Tarnopolsky M, Bourque PR, Parboosingh JS, Smith C, McInnes B, Innes AM, Bernier F, Curry CJ, Yoon G, Horvath GA, Bareke E, Gillespie M; FORGE Canada Consortium; Care&Rare Canada Consortium, Majewski J, Bulman DE, Dymont DA, Boycott KM. Whole-exome sequencing is a valuable diagnostic tool for inherited peripheral neuropathies: Outcomes from a cohort of 50 families. *Clin Genet*. 2018 Feb;93(2):301-309. doi: 10.1111/cge.13101. Epub 2017 Dec 12.

Gess B, Schirmacher A, Boentert M, Young P. Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes in a German neuromuscular center population. *Neuromuscul Disord*. 2013;23:647–51.

Girirajan, S., Campbell, C.D., Eichler, E.E. Human copy number variation and complex genetic disease. *Annu Rev Genet* 2011;45(1):203-226.

Gonzaga-Jauregui C, Lotze T, Jamal L, et al. Mutations in VRK1 associated with complex motor and sensory axonal neuropathy plus microcephaly. *JAMA Neurol*. 2013; 70(12):1491-1498.

Gonzalez M, Falk MJ, Gai X, Postrel R, Schüle R, Zuchner S. Innovative genomic collaboration using the GENESIS (GEM.app) platform. *Hum Mutat*. 2015 Oct;36(10):950-6. doi: 10.1002/humu.22836. Epub 2015 Aug 12.

Gonzalez-Perez A, Lopez-Bigas N. Improving the assessment of the outcome of nonsynonymous SNVs with a consensus deleteriousness score, Condel. *Am J Hum Genet*. 2011 Apr 8;88(4):440-9.

Grohmann, K., Schuelke, M., Diers, A., Hoffmann, K., Lucke, B., Adams, C., et al. Mutations in the gene encoding immunoglobulin mu-binding protein 2 cause spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Nat Genet*. 2001; 29(1):75-7.

Grohmann, K., Wienker, T.F., Saar, K., Rudnik-Schoneborn, S., Stoltenburg-Didinger, G., Rossi, R., et al. Diaphragmatic spinal muscular atrophy with respiratory distress is heterogeneous, and one form is linked to chromosome 11q13-q21. *Am J Hum Genet*. 1999; 65(5):1459-62.

Gu, W., Zhang, F., Lupski, J.R. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics*. 2008 Nov 3;1(1):4. doi: 10.1186/1755-8417-1-4.

Guelly C, Zhu PP, Leonardis L, Papić L, Zidar J, Schabhüttl M, Strohmaier H, Weis J, Strom TM, Baets J, Willems J, De Jonghe P, Reilly MM, Fröhlich E, Hatz M, Trajanoski S, Pieber TR, Janecke AR, Blackstone C, Auer-Grumbach M. Targeted high-throughput sequencing identifies mutations in atlastin-1 as a cause of hereditary sensory neuropathy type I. *Am J Hum Genet* 2011;88:99–105.doi:10.1016/j.ajhg.2010.12.003

Guenther, U.P., Handoko, L., Varon, R., Stephani, U., Tsao, C.Y., Mendell, J.R., et al. Clinical variability in distal spinal muscular atrophy type 1 (DSMA1): determination of steady-state IGHMBP2 protein levels in five patients with infantile and juvenile disease. *J Mol Med (Berl)*. 2009; 87(1):31-41.

Huang J, Wu X, Montenegro G, Price J, Wang G, Vance JM, Shy ME, Züchner S. Copy number variations are a rare cause of non-CMT1A Charcot-Marie-Tooth disease. *J Neurol*. 2010 May;257(5):735-41. doi: 10.1007/s00415-009-5401-2.

Hawthorne AL. Repurposing Reelin: the new role of radial glia, Reelin and Notch in motor neuron migration. *Exp Neurol*. 2014; 256:17-20.

Hayashi T, Su TP. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. *Cell* 2007;131:596–610.

Higuchi, Y., Hashiguchi, A., Yuan, J., Yoshimura, A., Mitsui, J., Ishiura, H., Tanaka, M., Ishihara, S., Tanabe, H., Nozuma, S., Okamoto, Y., Matsuura, E., and 21 others. Mutations in MME cause an autosomal-recessive Charcot-Marie-Tooth disease type 2. *Ann. Neurol.* 79: 659-672, 2016.

Horga A, Tomaselli PJ, Gonzalez MA, Laurà M, Muntoni F, Manzur AY, Hanna MG, Blake JC, Houlden H, Züchner S, MM. SIGMAR1 mutation associated with autosomal recessive Silver-like syndrome *Neurology.* 2016 Oct 11; 87(15): 1607–1612. doi: 10.1212/WNL.0000000000003212

Hoyer H, Braathen GJ, Eek AK, Skjelbred CF, Russell MB. Charcot-Marie-Tooth caused by a copy number variation in myelin protein zero. *Eur J Med Genet.* 2011 Nov-Dec;54(6):e580-3. doi: 10.1016/j.ejmg.2011.06.006.

Hoyer H, Braathen GJ, Eek AK, Nordang GB, Skjelbred CF, Russell MB. Copy number variations in a population-based study of Charcot-Marie-Tooth disease. *Biomed Res Int.* 2015;2015:960404. doi: 10.1155/2015/960404. Epub 2015 Jan 8.

Huang J, Wu X, Montenegro G, Price J, Wang G, Vance JM, Shy ME, Züchner S. Copy number variations are a rare cause of non-CMT1A Charcot-Marie-Tooth disease. *J Neurol.* 2010 May;257(5):735-41. doi: 10.1007/s00415-009-5401-2.

Irobi J, Van Impe K, Seeman P, Jordanova A, Dierick I, Verpoorten N, Michalik A, De Vriendt E, Jacobs A, Van Gerwen V, Vennekens K, Mazanec R, Tournay I, Hilton-Jones D, Talbot K, Kremensky I, Van Den Bosch L, Robberecht W, Van Vandeckerckhove J, Van Broeckhoven C, Gettemans J, De Jonghe P, Timmerman V. Hot-spot residue in small heat-shock protein 22 causes distal motor neuropathy. *Nat Genet.* 2004 Jun;36(6):597-601.

Ishiura H, Fukuda Y, Mitsui J, Nakahara Y, Ahsan B, Takahashi Y, Ichikawa Y, Goto J, Sakai T, Tsuji S. Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa in a Japanese family with a novel mutation in FLVCR1. *Neurogenetics.* 2011 May;12(2):117-21. doi: 10.1007/s10048-010-0271-4.

Ivanova N, Claeys KG, Deconinck T, Litvinenko I, Jordanova A, Auer-Grumbach M, Haberlova J, Löfgren A, Smeyers G, Nelis E, Mercelis R, Plecko B, Priller J, Zámečník J, Ceulemans B, Erichsen AK, Björck E, Nicholson G, Sereda MW, Seeman P, Kremensky I, Mitev V, De Jonghe P. Hereditary spastic paraplegia 3A associated with axonal neuropathy. *Arch Neurol* 2007;64:706. doi:10.1001/archneur.64.5.706

Jaiswal M, Divers J, Dabelea D, Isom S, Bell RA, Martin CL, Pettitt DJ, Saydah S, Pihoker C, Standiford DA, Dolan LM, Marcovina S, Linder B, Liese AD, Pop-Busui R, Feldman EL. Prevalence of and Risk Factors for Diabetic Peripheral Neuropathy in Youth With Type 1 and Type 2 Diabetes: SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Diabetes Care.* 2017 Sep;40(9):1226-1232. doi: 10.2337/dc17-0179. Epub 2017 Jul 3.

Jedrzejowska, M., Madej-Pilarczyk, A., Fidzianska, A., Mierzewska, H., Pronicka, E., Obersztyn, E., et al. Severe phenotypes of SMARD1 associated with novel mutations of the IGHMBP2 gene and nuclear degeneration of muscle and Schwann cells. *Eur J Paediatr Neurol.* 2014; 18(2):183-92.

Jordanova A, Irobi J, Thomas FP, Van Dijck P, Meerschaert K, Dewil M, Dierick I, Jacobs A, De Vriendt E, Guergueltcheva V, et al. Disrupted function and axonal distribution

of mutant tyrosyl-tRNA synthetase in dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Nat Genet.* 2006;38:197–202.

Kagiava A, Sargiannidou I, Theophilidis G, Karaiskos C, Richter J, Bashiardes S, Schiza N, Nearchou M, Christodoulou C, Scherer SS, Kleopa KA. Intrathecal gene therapy rescues a model of demyelinating peripheral neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Apr 26;113(17):E2421-9.

Karki S, Holzbaur EL. Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11:45–53. doi: 10.1016/S0955-0674(99)80006-4.

Keel SB, Doty, RT, Yang, Z, Quigley, JG, Chen J, Knoblauch S, Kingsley, PD, De Domenico I, Vaughn M. B, Kaplan J, Palis J, Abkowitz J. L. A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science* 319: 825-828, 2008.

Klein D, Patzkó Á, Schreiber D, et al. Targeting the colony stimulating factor 1 receptor alleviates two forms of Charcot-Marie-Tooth disease in mice. *Brain.* 2015;138:3193–205.

Kioussi C, Matsas R. Endopeptidase-24.11, a cell-surface peptidase of central nervous system neurons, is expressed by Schwann cells in the pig peripheral nervous system. *J Neurochem* 1991;57:431–440.

Kioussi C, Crine P, Matsas R. Endopeptidase-24.11 is suppressed in myelin-forming but not in non-myelin-forming Schwann cells during development of the rat sciatic nerve. *Neuroscience* 1992;50:69–83.

Klebe S, Lossos A, Azzedine H, Mundwiller E, Sheffer R, Gaussen M, Marelli C, Nawara M, Carpentier W, Meyer V, Rastetter A, Martin E, Bouteiller D, Orlando L, Gyapay G, El-Hachimi KH, Zimmerman B, Gamliel M, Misk A, Lerer I, Brice A, Durr A, Stevanin G. KIF1A missense mutations in SPG30, an autosomal recessive spastic paraplegia: distinct phenotypes according to the nature of the mutations. *Eur J Hum Genet* 2012 20(6): 645-649.

Kolb, S.J. Mutant small heat shock protein B3 causes motor neuropathy: utility of a candidate gene approach. *Neurology.* 2010 Feb 9;74(6):502-6. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181cef84a.

Kostiner DR, Nguyen H, Cox VA, Cotter PD. Stabilization of a terminal inversion duplication of 8p by telomere capture from 18q. *Cytogenet Genome Res.* 2002;98(1):9-12.

Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009;4(7):1073-81.

Latour P, Thauvin-Robinet C, Baudalet-Mery C, Soichot P, Cusin V, Faivre L, Locatelli MC, Mayencon M, Sarcey A, Broussolle E, et al. A major determinant for binding and aminoacylation of tRNA(Ala) in cytoplasmic Alanyl-tRNA synthetase is mutated in dominant axonal charcot-marie-tooth disease. *Am J Hum Genet.* 2010;86:77–82

Laššuthová P, Mazanec R, Vondráček P, Šišková D, Haberlová J, Sabová J, Seeman P. High frequency of SH3TC2 mutations in Czech HMSN I patients. *Clin Genet.* 2011 Oct;80(4):334-45. doi: 10.1111/j.1399-0004.2011.01640.x.

Lee JR, Shin H, Ko J, Choi J, Lee H, Kim E.. Characterization of the movement of the kinesin motor KIF1A in living cultured neurons. *J Biol Chem* 2003 278(4): 2624-2629.

Lee H, Schatz MC. Genomic dark matter: the reliability of short read mapping illustrated by the genome mappability score. *Bioinformatics*. 2012 Aug 15;28(16):2097-105.

Lee JR, Srour M, Kim D, Hamdan FF, Lim SH, Brunel-Guitton C, Décarie JC, Rossignol E, Mitchell GA, Schreiber A, Moran R, Van Haren K, Richardson R, Nicolai J, Oberndorff KM, Wagner JD, Boycott KM, Rahikkala E, Junna N, Tyynismaa H, Cuppen I, Verbeek NE, Stumpel CT, Willemsen MA, de Munnik SA, Rouleau GA, Kim E, Kamsteeg EJ, Kleefstra T, Michaud JL. De novo mutations in the motor domain of KIF1A cause cognitive impairment, spastic paraparesis, axonal neuropathy, and cerebellar atrophy. *Hum Mutat* 2015 36(1): 69-78.

Levy SE, Mandell DS, Schultz RT. Autism. *Lancet* 2009 374(9701): 1627-1638.

Lee SM, Chin L-S, Li L. Dysregulation of ErbB Receptor Trafficking and Signaling in Demyelinating Charcot-Marie-Tooth Disease. *Mol. Neurobiol*. 2016 doi:10.1007/s12035-015-9668-2.

Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2009;25:1754-1760.

Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009 Aug 15;25(16):2078-9.

Li X, Hu Z, Liu L, Xie Y, Zhan Y, Zi X, Wang J, Wu L, Xia K, Tang B, Zhang R. A. SIGMAR1 splice-site mutation causes distal hereditary motor neuropathy. *Neurology*. 2015 Jun 16;84(24):2430-7. doi: 10.1212/WNL.0000000000001680.

Liu YT, Laura M, Hersheson J, Horga A, Jaunmuktane Z, Brandner S, Pittman A, Hughes D, Polke JM, Sweeney MG, Proukakis C, Janssen JC, Auer-Grumbach M, Zuchner S, Shields KG, Reilly MM, Houlden H. Extended phenotypic spectrum of KIF5A mutations: From spastic paraplegia to axonal neuropathy. *Neurology* 2014 83(7): 612-619.

Lopez-Borges S, Lazo PA. The human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) phosphorylates threonine-18 within the mdm-2 binding site of the p53 tumour suppressor protein. *Oncogene*. 2000; 19(32):3656-3664.

Lupo V, García-García F, Sancho P, Tello C, García-Romero M, Villarreal L, Alberti A, Sivera R, Dopazo J, Pascual-Pascual SI, Márquez-Infante C, Casasnovas C, Sevilla T, Espinós C. Assessment of Targeted Next-Generation Sequencing as a Tool for the Diagnosis of Charcot-Marie-Tooth Disease and Hereditary Motor Neuropathy. *J Mol Diagn*. 2016 Mar;18(2):225-34. doi: 10.1016/j.jmoldx.2015.10.005. Epub 2016 Jan 2.

Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzetta V, Trask BJ, Saucedo-Cardenas O, Barker DF, Killian JM, Garcia CA, Chakravarti A, Patel PI. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell*. 1991 Jul 26;66(2):219-32.

Lupski JR, Garcia CA. Molecular genetics and neuropathology of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain Pathol*. 1992 Oct;2(4):337-49. Review.

Lupski JR, Reid JG, Gonzaga-Jauregui C, Rio Deiros D, Chen DC, Nazareth L, Bainbridge M, Dinh H, Jing C, Wheeler DA, McGuire AL, Zhang F, Stankiewicz P, Halperin JJ, Yang C, Gehman C, Guo D, Irikat RK, Tom W, Fantin NJ, Muzny DM, Gibbs RA Whole-

genome sequencing in a patient with Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *N Engl J Med*. 2010 Apr 1;362(13):1181-91. doi: 10.1056/NEJMoa0908094. Epub 2010 Mar 10.

Manolio, T.A., et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009 Oct 8;461(7265):747-53. doi: 10.1038/nature08494.

Mamta Jaiswal, Jasmin Divers, Dana Dabelea, Scott Isom, Ronny A. Bell, Catherine L. Martin, David J. Pettitt, Sharon Saydah, Catherine Pihoker, Debra A. Standiford, Lawrence M. Dolan, Santica Marcovina, Barbara Linder, Angela D. Liese, Rodica Pop-Busui, Eva L. Feldman. Prevalence of and Risk Factors for Diabetic Peripheral Neuropathy in Youth With Type 1 and Type 2 Diabetes: SEARCH for Diabetes in Youth Study *Diabetes Care* Sep 2017, 40 (9) 1226-1232; DOI: 10.2337/dc17-0179

Martini R. Neuregulin-1 alleviates Charcot-Marie-Tooth disease in rats. *Nat. Med*. 2014;20:984–5.

Masingue M, Perrot J, Carlier RY, Piguët-Lacroix G, Latour P, Stojkovic T. WES homozygosity mapping in a recessive form of Charcot-Marie-Tooth neuropathy reveals intronic GDAP1 variant leading to a premature stop codon. *Neurogenetics*. 2018 Feb 2. doi: 10.1007/s10048-018-0539-7.

Mellion M, Gilchrist JM, de La Monte S. Alcohol-related peripheral neuropathy: nutritional, toxic or both? *Muscle Nerve*. 2011 Mar; 43(3): 309–316. doi: 10.1002/mus.21946

Murphy SM, Herrmann DN, McDermott MP, Scherer SS, Shy ME, Reilly MM, Pareyson D. Reliability of the CMT neuropathy score (second version) in Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst*. 2011 Sep;16(3):191-8. doi: 10.1111/j.1529-8027.2011.00350.x.

Mendonça N, França MC Jr., Gonçalves AF, Januário C. Clinical Features of Machado-Joseph Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1049:255-273. doi: 10.1007/978-3-319-71779-1_13.

Morral JA1, Davis AN, Qian J, Gelman BB, Koeppen AH.. Pathology and pathogenesis of sensory neuropathy in Friedreich's ataxia. *Acta Neuropathol*. 2010 Jul;120(1):97-108. doi: 10.1007/s00401-010-0675-0. Epub 2010 Mar 26.

Muntoni F. Novel mutations expand the clinical spectrum of DYNC1H1-associated spinal muscular atrophy. *Neurology* 2015 84(7): 668-679.

Murphy SM, Laura M, Blake J, Polke J, Bremner F, Reilly MM. Conduction block and tonic pupils in Charcot-Marie-Tooth disease caused by a myelin protein zero p.Ile112Thr mutation. *Neuromuscul Disord* (2011)21:223–226.

Murphy SM, Laura M, Fawcett K, et al. Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012;83:706–10.

Manganelli F, Tozza S, Pisciotto C, Bellone E, Iodice R, Nolano M, Geroldi A, Capponi S, Mandich P, Santoro L Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes in a Southern Italy population. *J Peripher Nerv Syst*. 2014 Dec;19(4):292-8. doi: 10.1111/jns.12092.

Maeda, M. H., Mitsui, J., Soong, B.-W., Takahashi, Y., Ishiura, H., Hayashi, S., Shirota, Y., Ichikawa, Y., Matsumoto, H., Arai, M., Okamoto, T., Miyama, S., Shimizu, J., Inazawa, J., Goto, J., Tsuji, S. Increased gene dosage of myelin protein zero causes Charcot-Marie-Tooth disease. *Ann. Neurol.* 71: 84-92, 2012.

McLaughlin HM, Sakaguchi R, Liu C, Igarashi T, Pehlivan D, Chu K, Iyer R, Cruz P, Cherukuri PF, Hansen NF, et al. Compound heterozygosity for loss-of-function lysyl-tRNA synthetase mutations in a patient with peripheral neuropathy. *Am J Hum Genet.* 2010;87:560–6.

McLaughlin HM, Sakaguchi R, Giblin W; NISC Comparative Sequencing Program, Wilson TE, Biesecker L, Lupski JR, Talbot K, Vance JM, Züchner S, Lee YC, Kennerson M, Hou YM, Nicholson G, Antonellis A. A recurrent loss-of-function alanyl-tRNA synthetase (AARS) mutation in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 2N (CMT2N). *Hum Mutat.* 2012 Jan;33(1):244-53. doi: 10.1002/humu.21635.

Nadal M, Valiente A, Domènech A, Pritchard M, Estivill X, Ramos-Arroyo MA. Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: two cases with a reciprocal translocation t(16;17)(q12;11.2) interrupting the PMP22 gene. *J Med Genet.* 2000 May;37(5):396-8. No abstract available.

Nelis E, Erdem S, Van Den Bergh PY, Belpaire-Dethiou MC, Ceuterick C, Van Gerwen V, Cuesta A, Pedrola L, Palau F, Gabreëls-Festen AA, Verellen C, Tan E, Demirci M, Van Broeckhoven C, De Jonghe P, Topaloglu H, Timmerman V. Mutations in GDAP1: autosomal recessive CMT with demyelination and axonopathy. *Neurology.* 2002 Dec 24;59(12):1865-72.

Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigham AW, Tabor HK, Dent KM, Huff CD, Shannon PT, Jabs EW, Nickerson DA, Shendure J, Bamshad MJ.. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet.* 2010 Jan;42(1):30-5.

Nguyen TP, Biliciler S, Wiszniewski W, Sheikh K. Expanding Phenotype of VRK1 Mutations in Motor Neuron Disease. *J Clin Neuromuscul Dis.* 2015; 17(2):69-71.

Nicholas J. Schork, Sarah S. Murray, Kelly A. Frazer, and Eric J. Topol Common vs. Rare Allele Hypotheses for Complex Diseases. *Curr Opin Genet Dev.* 2009 Jun; 19(3): 212–219. doi: 10.1016/j.gde.2009.04.010

Niemann A, Ruegg M, La Padula V, Schenone A, Suter U. Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol.* 2005 Sep 26;170(7):1067-78. Epub 2005 Sep 19.

Ohba C, Haginoya K, Osaka H, Kubota K, Ishiyama A, Hiraide T, Komaki H, Sasaki M, Miyatake S, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Tanaka F, Saitsu H, Matsumoto N. De novo KIF1A mutations cause intellectual deficit, cerebellar atrophy, lower limb spasticity and visual disturbance. *J Hum Genet* 2015 60(12): 739-742.

Okada Y, Yamazaki H, Sekine-Aizawa Y, Hirokawa N. The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. *Cell* 2015 81 (5): 769-780.

Okamoto Y, Goksungur MT, Pehlivan D, Beck CR, Gonzaga-Jauregui C, Muzny DM, Atik MM, Carvalho CMB, Matur Z, Bayraktar S, Boone PM, Akyuz K, Gibbs RA, Battaloglu E, Parman Y, Lupski JR. Exonic duplication CNV of NDRG1 associated with autosomal-recessive HMSN-Lom/CMT4D. *Genet Med.* 2014 May;16(5):386-394. doi:

10.1038/gim.2013.155. Erratum in: *Genet Med*. 2014 Feb;16(2):203.

Okamoto N, Miya F, Tsunoda T, Yanagihara K, Kato M, Saitoh S, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K. KIF1A mutation in a patient with progressive neurodegeneration. *J Hum Genet* 2014 59(11): 639-641.

Ostertag, E.M., et al. SVA Elements Are Nonautonomous Retrotransposons that Cause Disease in Humans *Am J Hum Genet*. 2003 Dec; 73(6): 1444–1451. doi: 10.1086/380207.

Pla-Martín D, Calpena E, Lupo V, Márquez C, Rivas E, Sivera R, Sevilla T, Palau F, Espinós C. Junctophilin-1 is a modifier gene of GDAP1-related Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Mol Genet*. 2015 Jan 1;24(1):213-29. doi: 10.1093/hmg/ddu440.

Passarge, E. Color atlas of genetics. Fifth Edition. Stuttgart, Germany, 2018.

Pehlivan D, Beck CR, Okamoto Y, Harel T, Akdemir ZH, Jhangiani SN, Withers MA, Goksungur MT, Carvalho CM, Czesnik D, Gonzaga-Jauregui C, Wiszniewski W, Muzny DM, Gibbs RA, Rautenstrauss B, Sereda MW, Lupski JR. The role of combined SNV and CNV burden in patients with distal symmetric polyneuropathy. *Genet Med*. 2016 May;18(5):443-51. doi: 10.1038/gim.2015.124. Epub 2015 Sep 17.

Pierce, B.A. Genetics: A conceptual approach. New York: W.H. Freeman, (2012). 6th edição.

Pinto, D. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature* 2010 466(7304), 368-72. doi:10.1038/nature09146.

Pollard KS, Hubisz MJ, Rosenbloom KR, Siepel A. Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies. *Genome Res*. 2010 Jan;20(1):110-21.

Pulst SM. What does phenotype have to do with it? *Neurol Genet* Aug 2017;3(4):e175.

Puliti A, Caridi G, Ravazzolo R, Ghiggeri GM. Teaching molecular genetics: chapter 4 —positional cloning of genetic disorders. *Pediatr Nephrol*. 2007 Dec; 22(12): 2023–2029.

Rajadhyaksha AM, Elemento O, Puffenberger EG, Schierberl KC, Xiang JZ, Putorti ML, Berciano J, Poulin C, Brais B, Michaelides M, Weleber RG, Higgins JJ. Mutations in FLVCR1 cause posterior column ataxia and retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet*. 2010 Nov 12;87(5):643-54. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.10.013.

Renbaum P, Kellerman E, Jaron R, et al. Spinal muscular atrophy with pontocerebellar hypoplasia is caused by a mutation in the VRK1 gene. *Am J Hum Genet*. 2009; 85(2):281-289.

Rivière JB, Ramalingam S, Lavastre V, Shekarabi M, Holbert S, Lafontaine J, Srour M, Merner N, Rochefort D, Hince P, Gaudet R, Mes-Masson AM, Baets J, Houlden H, Brais B, Nicholson GA, Van Esch H, Nafissi S, De Jonghe P, Reilly MM, Timmerman V, Dion PA, Rouleau GA. KIF1A, an axonal transporter of synaptic vesicles, is mutated in hereditary sensory and autonomic neuropathy type 2. *Am J Hum Genet*. 2011 Aug 12;89(2):219-30. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.06.013.

Rodrigues, G.R. Clinical and genetic analysis of 29 Brazilian patients with Huntington's disease-like phenotype. *Arq Neuropsiquiatr*. 2011 Jun;69(3):419-23.

Rossor AM, Carr AS, Devine H, Chandrashekar H, Pelayo-Negro AL, Pareyson D,

Shy ME, Scherer SS, Reilly MM.. Peripheral neuropathy in complex inherited diseases: an approach to diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017 Oct;88(10):846-863. doi: 10.1136/jnnp-2016-313960. Epub 2017 Aug 9. Review.

Rossor AM, Kalmar B, Greensmith L, Reilly MM. The distal hereditary motor neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012; 83(1):6-14.

Rossor AM, Tomaselli PJ, Reilly MM. Recent advances in the genetic neuropathies. *Curr Opin Neurol*. 2016 Oct;29(5):537-48.

Rossor AM, Evans MR, Reilly MM. A practical approach to the genetic neuropathies. *Pract Neurol*. 2015;15:187–98.

Rouger H, LeGuern E, Birouk N, Gouider R, Tardieu S, Plassart E, Gugenheim M, Vallat JM, Louboutin JP, Bouche P, Agid Y, Brice A. Charcot-Marie-Tooth disease with intermediate motor nerve conduction velocities: characterization of 14 Cx32 mutations in 35 families. *Hum Mutat*. 1997;10(6):443-52.

Rotthier A, Baets J, Timmerman V, Janssens K. Mechanisms of disease in hereditary sensory and autonomic neuropathies. *Nat Rev Neurol*. 2012;8(2):73–85.

Raeymaekers P, Timmerman V, Nelis E, et al. Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT 1a). The HMSN Collaborative Research Group. *Neuromuscul Disord* 1991;1:93–7

Saporta MA. Charcot-Marie-Tooth disease and other inherited neuropathies. *Continuum (Minneap Minn)*. 2014 Oct;20 (5 Peripheral Nervous System Disorders):1208-25.

Saporta AS, Sottile SL, Miller LJ, Feely SM, Siskind CE, Shy ME. Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann Neurol*. 2011 Jan;69(1):22-33. doi: 10.1002/ana.22166.

Sabblah TT, Nandini S, Ledray AP, Pasos J, Calderon JLC, Love R, King LE, King SJ. A novel mouse model carrying a human cytoplasmic dynein mutation shows motor behavior deficits consistent with Charcot-Marie-Tooth type 2O disease. *Sci Rep*. 2018 Jan 29;8(1):1739. doi: 10.1038/s41598-018-20081-1.

Shaibani A, Wong LJ, Wei Zhang V, Lewis RA, Shinawi M. Autosomal recessive posterior column ataxia with retinitis pigmentosa caused by novel mutations in the FLVCR1 gene. *Int J Neurosci*. 2015 Jan;125(1):43-9. doi: 10.3109/00207454.2014.904858.

Sivera R, Espinós C, Vilchez JJ, Mas F, Martínez-Rubio D, Chumillas MJ, Mayordomo F, Muelas N, Bataller L, Palau F, Sevilla T. Phenotypical features of the p.R120W mutation in the GDAP1 gene causing autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst*. 2010 Dec;15(4):334-44. doi: 10.1111/j.1529-8027.2010.00286.x.

Schabhüttl M, Wieland T, Senderek J, Baets J, Timmerman V, De Jonghe P, Reilly MM, Stieglbauer K, Laich E, Windhager R, Erwa W, Trajanoski S, Strom TM, Auer-Grumbach M. Whole-exome sequencing in patients with inherited neuropathies: outcome and challenges. *J Neurol*. 2014 May;261(5):970-82. doi: 10.1007/s00415-014-7289-8. Epub 2014 Mar 15.

Schottmann, G., Jungbluth, H., Schara, U., Knierim, E., Morales Gonzalez, S., Gill, E., et al. Recessive truncating IGHMBP2 mutations presenting as axonal sensorimotor neuropathy. *Neurology*. 2015; 84(5):523-31.

Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*. 2010 Aug;7(8):575-6.

Scoto M, Rossor AM, Harms MB, Cirak S, Calissano M, Robb S, Manzur AY, Martinez Arroyo A, Rodriguez Sanz A, Mansour S, Fallon P, Hadjikhouri I, Klein A, Yang M, De Visser M, Overweg-Plandsoen WC, Baas F, Taylor JP, Benatar M, Connolly AM, Al-Lozi MT, Nixon J, de Goede CG, Foley AR, McWilliam C, Pitt M, Sewry C, Phadke R, Hafezparast M, Chong WK, Mercuri E, Baloh RH, Reilly MM, Shigemizu D, Momozawa Y, Abe T, Morizono T, Boroevich KA, Takata S, Ashikawa K, Kubo M, Tsunoda T (2015). Performance comparison of four commercial human whole-exome capture platforms. *Sci Rep* 5: 12742.

Senderek J, Bergmann C, Stendel C, Kirfel J, Verpoorten N, De Jonghe P, Timmerman V, Chrast R, Verheijen MH, Lemke G, Battaloglu E, Parman Y, Erdem S, Tan E, Topaloglu H, Hahn A, Müller-Felber W, Rizzuto N, Fabrizi GM, Stuhmann M, Rudnik-Schöneborn S, Züchner S, Michael Schröder J, Buchheim E, Straub V, Klepper J, Huehne K, Rautenstrauss B, Büttner R, Nelis E, Zerres K. Mutations in a gene encoding a novel SH3/TPR domain protein cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4C neuropathy. *Am J Hum Genet*. 2003 Nov;73(5):1106-19. Epub 2003 Oct 21.

Sereda MW, Meyer zu Hörste G, Suter U, et al. Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT-1A). *Nat. Med*. 2003;9:1533–7.

Sevilla T, Jaijo T, Nauffal D, Collado D, Chumillas MJ, Vilchez JJ, Muelas N, Bataller L, Domenech R, Espinós C, Palau F. Vocal cord paresis and diaphragmatic dysfunction are severe and frequent symptoms of GDAP1-associated neuropathy. *Brain*. 2008 Nov;131(Pt 11):3051-61. doi: 10.1093/brain/awn228. Epub 2008 Sep 23.

Sivera R, Sevilla T, Vilchez JJ, Martínez-Rubio D, Chumillas MJ, Vázquez JF, Muelas N, Bataller L, Millán JM, Palau F, Espinós C. Charcot-Marie-Tooth disease: genetic and clinical spectrum in a Spanish clinical series. *Neurology*. 2013 Oct 29;81(18):1617-25. doi:10.1212/WNL.0b013e3182a9f56a. Epub 2013 Sep 27.

Shigemizu D, Momozawa Y, Abe T, Morizono T, et al. Performance comparison of four commercial human whole-exome capture platforms. *Sci Rep*. 2015; 5(12742). (Gonzaga-Jauregui C, 2013; Nguyen TP 2015; Renbaum P, 2009).

Skre H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth disease. *Clin Genet* 1974;6(2):98-118.

Stoll M, Teoh H, Lee J, et al. Novel motor phenotypes in patients with VRK1 mutations without pontocerebellar hypoplasia. *Neurology*. 2016 Jul 5;87(1):65-70.

Silveira-Moriyama, L., Paciorkowski, A.R. Genetic diagnosis for Neurologists. *Continuum* 2018;24(1, Child Neurology):18-36.

Shelbourne, P., Johnson, K. Myotonic dystrophy: another case of too many repeats? *Hum Mutat*. 1992;1(3):183-9. Review.

Stone EA, Sidow A. Physicochemical constraint violation by missense substitutions mediates impairment of protein function and disease severity. *Genome Res.* 2005 Jul;15(7):978-86.

Schork, N.J. 2009. Common vs. rare allele hypotheses for complex diseases. *Curr Opin Genet Dev* 19(3), 212-9. doi:10.1016/j.gde.2009.04.010.

Singleton, A.B. Towards a complete resolution of the genetic architecture of disease. *Trends Genet* 2010 26(10), 438-42. doi:10.1016/j.tig.2010.07.004.

Sumner, C.J. et al. A dominant mutation in FBXO38 causes distal spinal muscular atrophy with calf predominance. *Am J Hum Genet.* 2013 Nov 7;93(5):976-83. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.10.006.

Sun YM, Lu C, Wu ZY. Spinocerebellar ataxia: relationship between phenotype and genotype - a review. *Clin Genet.* 2016 Oct;90(4):305-14. doi: 10.1111/cge.12808. Epub 2016 Jun 30. Review.

The 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature* volume 526, pages 68–74. doi:10.1038/nature15393.

Tchernitchko D, Goossens M, Wajcman H. In silico prediction of the deleterious effect of a mutation: proceed with caution in clinical genetics. *Clin Chem.* 2004 Nov;50(11):1974-8.

Thomas PK, Marques W Jr, Davis MB, Sweeney MG, King RH, Bradley JL, Muddle JR, Tyson J, Malcolm S, Harding AE. The phenotypic manifestations of chromosome 17p11.2 duplication. *Brain.* 1997 Mar;120 (Pt 3):465-78 Timmerman, V., Strickland, A.V., Züchner, S. Genetics of Charcot-Marie-Tooth (CMT) Disease within the Frame of the Human Genome Project Success. *Genes (Basel).* 2014 Mar; 5(1): 13–32. doi: 10.3390/genes5010013.

Tomaselli, P.J. et al. A de novo dominant mutation in KIF1A associated with axonal neuropathy, spasticity and autism spectrum disorder. *J Peripher Nerv Syst.* 2017 Dec;22(4):460-463. doi: 10.1111/jns.12235.

Tomaselli PJ, Rossor AM, Poh R, Polke J, Laura M, Houlden H, Reilly MM. HNPP due to a heterozygous deletion of exons 4 and 5 of the PMP22 gene. *Neuromuscular Disorder* 26S1 (2016) S28.

Tomaselli PJ, Rossor AM, Horga A, Jaunmuktane Z, Carr A, Saveri P, Piscoquito G, Pareyson D, Laura M, Blake JC, Poh R, Polke J, Houlden H, Reilly MM. Mutations in noncoding regions of GJB1 are a major cause of X-linked CMT. *Neurology.* 2017 Apr 11;88(15):1445-1453. doi: 10.1212/WNL.0000000000003819. Epub 2017 Mar 10.

Tsurusaki Y, Saitoh S, Tomizawa K, Sudo A, Asahina N, Shiraishi H, Ito J, Tanaka H, Doi H, Saito H, Miyake N, Matsumoto N. A DYNC1H1 mutation causes a dominant spinal muscular atrophy with lower extremity predominance. *Neurogenetics.* 2012 Nov;13(4):327-32. doi: 10.1007/s10048-012-0337-6.

Turner AJ, Isaac RE, Coates D. The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *Bioessays* 2001;23:261–269.

Valbuena A, Castro-Obregon S, Lazo PA. Downregulation of VRK1 by p53 in response to DNA damage is mediated by the autophagic pathway. *PLoS One.* 2011; 6(2):e17320.

Valentijn LJ, Baas F, Zorn I, Hensels GW, de Visser M, Bolhuis PA. Alternatively sized duplication in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Hum Mol Genet.* 1993 Dec;2(12):2143-6

Vinograd-Byk H, Sapir T, Cantarero L. The spinal muscular atrophy with pontocerebellar hypoplasia gene VRK1 regulates neuronal migration through an amyloid-beta precursor protein-dependent mechanism. *J Neurosci.* 2015; 35(3):936-942.

Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA.. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet* 2005 6(2), 109-18. doi:10.1038/nrg1522.

Wang K , Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: e164.

Weterman MA, van Ruissen F, de Wissel M, Bordewijk L, Samijn JP, van der Pol WL, Meggouh F, Baas F. Copy number variation upstream of PMP22 in Charcot-Marie-Tooth disease. *Eur J Hum Genet.* 2010 Apr;18(4):421-8. doi: 10.1038/ejhg.2009.186.

Willemsen MH, Vissers LE, Willemsen MA, van Bon BW, Kroes T, de Ligt J, de Vries BB, Schoots J, Lugtenberg D, Hamel BC, van Bokhoven H, Brunner HG, Veltman JA, Kleefstra T. Mutations in DYNC1H1 cause severe intellectual disability with neuronal migration defects. *J Med Genet.* 2012 Mar;49(3):179-83. doi: 10.1136/jmedgenet-2011-100542.

Wright CF1, Middleton A, Burton H, Cunningham F, Humphries SE, Hurst J, Birney E, Firth HV. Policy challenges of clinical genome sequencing. *BMJ* 2013;347:f6845.

Yamamoto S, Jaiswal M, Charng WL, Gambin T, Karaca E, Mirzaa G, Wiszniewski W, Sandoval H, Haelterman NA, Xiong B, Zhang K, Bayat V, David G, Li T, Chen K, Gala U, Harel T, Pehlivan D, Penney S, Vissers LELM, de Ligt J, Jhangiani SN, Xie Y, Tsang SH, Parman Y, Sivaci M, Battaloglu E, Muzny D, Wan YW, Liu Z, Lin-Moore AT, Clark RD, Curry CJ, Link N, Schulze KL, Boerwinkle E, Dobyns WB, Allikmets R, Gibbs RA, Chen R, Lupski JR, Wangler MF, Bellen HJ. A *Drosophila* genetic resource of mutants to study mechanisms underlying human genetic diseases. *Cell.* 2014 Sep 25; 159(1): 200–214. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.002.

Yanatori I, Yasui Y, Miura K, Kishi F. Mutations of FLVCR1 in posterior column ataxia and retinitis pigmentosa result in the loss of heme export activity. *Blood Cells Mol Dis.* 2012 Jun 15;49(1):60-6. doi: 10.1016/j.bcmd.2012.03.004.

Yger M, Stojkovic T, Tardieu S, Maisonobe T, Brice A, Echaniz-Laguna A, Alembik Y, Girard S, Cazeneuve C, Leguern E, Dubourg O. Characteristics of clinical and electrophysiological pattern of Charcot-Marie-Tooth 4C. *J Peripher Nerv Syst.* 2012 Mar;17(1):112-22. doi: 10.1111/j.1529-8027.2012.00382.x.

Ylikallio E, Kim D, Isohanni P, Auranen M, Kim E, Lönnqvist T, Tynismaa H. Dominant transmission of de novo KIF1A motor domain variant underlying pure spastic paraplegia. *Eur J Hum Genet* 2015 23(10): 1427-1430.

Zhang F, Seeman P, Liu P, Weterman MA, Gonzaga-Jauregui C, Towne CF, Batish SD, De Vriendt E, De Jonghe P, Rautenstrauss B, Krause KH, Khajavi M, Posadka J, Vandenberghe A, Palau F, Van Maldergem L, Baas F, Timmerman V, Lupski JR. Mechanisms for nonrecurrent genomic rearrangements associated with CMT1A or HNPP: rare CNVs as a cause for missing heritability. *Am J Hum Genet.* 2010 Jun 11;86(6):892-903. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.05.001. Epub 2010 May 20.

Zimoń M, Baets J, Fabrizi GM, Jaakkola E, Kabzińska D, Pilch J, Schindler AB, Cornblath DR, Fischbeck KH, Auer-Grumbach M, Guelly C, Huber N, De Vriendt E, Timmerman V, Suter U, Hausmanowa-Petrusewicz I, Niemann A, Kochański A, De Jonghe P, Jordanova A. Dominant GDAP1 mutations cause predominantly mild CMT phenotypes. *Neurology*. 2011 Aug 9;77(6):540-8. doi: 10.1212/WNL.0b013e318228fc70. Epub 2011 Jul 13.