RICARDO DI LAZZARO FILHO

**Estudo genético-clínico de pacientes com síndromes
progeróides**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Programa: Mestrado Profissional em
Aconselhamento Genético e Genômica
Humana.

Área de concentração: Biologia (Genética)

Orientadora: Dra. Débora Romeo Bertola

São Paulo

2017

LAZZARO FILHO, Ricardo di

Estudo genético-clínico de pacientes com síndromes
progeróides / Ricardo di LAZZARO FILHO; orientadora
Debora Romeo BERTOLA. -- São Paulo, 2017.

91 f. + anexo

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva.

1. Progeróide. 2. Síndrome de Hutchinson-Gilford. 3.
Síndrome de Rothmund-Thomson. 4. Aconselhamento genético.
I. BERTOLA, Debora Romeo, orient. II. Título.

Catálogo da Publicação
Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências

Nome: LAZZARO FILHO, Ricardo di

Título: Estudo genético-clínico de pacientes com síndromes progeróides.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profa. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

À minha avó Dora, à minha mãe, Claudia, e à minha tia Luciana.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Débora Romeo Bertola, profissional brilhante e pessoa adorável, que me orientou, não só durante esse trabalho, mas desde o segundo ano da graduação em medicina, durante as aulas, atendimentos ambulatoriais e na criação da Liga de Genética Clínica da FMUSP. Jamais conseguiria concluir essa obra sem sua ajuda, orientação e disponibilidade, mostrando que, quando se ama o que faz, não há distinção entre férias e trabalho.

À minha avó Dora por ser a pessoa mais maravilhosa que podia fazer parte da minha vida, ser meu exemplo e inspiração em inúmeros sentidos. Por me fazer uma pessoa melhor, cuidar de mim e querer meu bem a cada instante.

Ao meu irmão, Leonardo, que compartilho muito mais que sequências de nucleotídeos. Por me trazer orgulho ao trilhar seu próprio caminho e ser a pessoa extraordinária, em todos os sentidos, que sempre foi.

Aos meus pais, Ricardo di Lazzaro e Claudia di Lazzaro, por terem me dado condições melhores do que tiveram, permitindo que eu me dedicasse a estudar por tantos anos. Por terem sido exemplos do que ser, e às vezes, do que não ser, mas sempre me ensinando a enxergar o mundo como ele realmente é. E por terem me transmitido tantas coisas, entre elas, as variantes genéticas que me fazem, de certa maneira, único.

À minha tia, e segunda mãe, Luciana Rossi Cotrim, por me incentivar e me apoiar a todo momento. Por realmente tentar me entender se interessar sempre, fazendo tudo que é possível para me ajudar.

A toda minha família, incluindo os novos membros, consanguíneos ou não, em especial a minha irmã, Fernanda, que está, literalmente, nos primeiros passos de sua vida. À minha tia Maria Isabel por também estar sempre disposta a me auxiliar no que for necessário.

Ao André Chinchio, meu irmão não biológico, que há quase quinze anos vêm sendo, não só meu companheiro nos mais inimagináveis projetos, mas meu confidente e melhor amigo. Tenho certeza de que eu não teria alcançado metade do que alcancei, sem sua existência e a presença diária em minha vida.

À Renata Paraizo Leite, por acreditar em mim, quando poucas pessoas acreditavam. Por enxergar em mim qualidades, quando nem eu mesmo enxergava. Por ter me incentivado a crescer e a fazer coisas que não eu imaginava conseguir. E por ainda hoje, de um modo diferente, não se cansar de me desejar ao seu lado.

À Izabela Caldeira, por toda a ajuda, preocupação, companheirismo e incentivo, que, apesar de não acreditar, foram fundamentais para mim durante esse período. E por toda a compreensão e o esforço exorbitante que fez para me deixar feliz, desde que nos conhecemos.

Aos excepcionais amigos e colegas de universidade Michel Naslavsky e Guilherme Yamamoto, não só por toda a ajuda técnica durante essa pesquisa, mas também pelas discussões intrigantes que vão muito além da genômica e da biologia molecular.

Aos meus queridos amigos Guilherme Magacho, Luciano Naganawa, Victor Kubota, Marcos Iki, Fábio Bertassi, Bruno Affonso, Gustavo Kerr, João Victor Yumoto, Alexandre Osada, Henrique Garcia da Costa, Mariana Scolari e Débora Komukai, que em tantas conversas, dos mais variados níveis e assuntos, foram fundamentais no meu desenvolvimento como indivíduo. Presentes ou não, são pessoas que levarei para toda a vida.

Aos professores do Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco e do Departamento de Genética do Instituto de Biociências, em especial, à Profa. Dra. Regina Mingroni Netto, pela admirável iniciativa de criar e conduzir o programa de Mestrado Profissional em Aconselhamento Genético e Genômica Humana. E à Profa. Dra. Mayana Zatz, à Profa. Dra. Maria Rita Passos-Bueno e à Profa. Dra. Mariz Vainzof pelo incrível trabalho que fazem no

Genoma, construindo um centro de excelência mundial, a despeito de todas as dificuldades existentes no país. Agradeço também à Monica, Katia, Meire, Daniela, Monize, Vanessa, Naila, Kelly, Suzana, Daniel, Márcia e Bernardete pelo excelente trabalho que desenvolvem no centro, e que foi fundamental para a conclusão dessa pesquisa.

Aos médicos e residentes da Unidade de Genética do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP, em especial à Dra. Chong Ae Kim e à Dra. Rachel Honjo, não só pela organização dos ambulatórios, mas também pelas grandes contribuições que deram ao trabalho.

A todos que trabalham na Genera, por possibilitarem que todo o conhecimento a que tive acesso na universidade possa ser aplicado e retornado à sociedade.

Por fim, agradeço a todos os pacientes atendidos durante esse período e aos seus familiares, por permitirem que suas unicidades contribuam para os avanços da saúde e da ciência no país.

“We are built as gene machines and cultured as meme machines, but we have the power to turn against our creators.”

Richard Dawkins

RESUMO

LAZZARO FILHO, R. **Estudo genético-clínico de pacientes com síndromes progeróides**. 2017. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biologia - Genética) Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Algumas síndromes genéticas monogênicas apresentam fenótipos considerados progeróides, ou seja, desenvolvem precocemente características clínicas semelhantes às observadas no envelhecimento humano normal. A relação fisiopatológica entre essas doenças e o processo de envelhecimento vem sendo estudada, sendo que o entendimento dos mecanismos moleculares em um campo contribui para a compreensão do outro. As síndromes de Hutchinson-Gilford e Rothmund-Thomson são duas condições progeróides raras, já bem caracterizadas clinicamente, que são causadas por alterações nos genes *LMNA* (em um alelo) e *RECQL4* (nos dois alelos), respectivamente. No entanto, em cerca de 40% a 60% dos indivíduos com a síndrome de Rothmund-Thomson, não são encontradas mutações em *RECQL4*, constituindo um subgrupo chamado de tipo I; desse modo, os casos com alteração no gene constituem o tipo II da síndrome. Indivíduos com o tipo II apresentam um risco aumentado para o desenvolvimento de câncer, particularmente o osteossarcoma. Neste trabalho, nove pacientes com sinais progeróides foram avaliados clinicamente e tiveram o DNA sequenciado. Um paciente recebeu o diagnóstico clínico de síndrome de Hutchinson-Gilford, que foi confirmado pela mutação patogênica mais frequente encontrada no gene *LMNA* (p.Gly608Gly). Oito pacientes jovens, com mediana de idade de 2 anos e 2 meses, foram diagnosticados clinicamente como afetados pela síndrome de Rothmund-Thomson, cujas características clínicas mais comuns incluíam déficit pôndero-estatural, cabelos e sobrancelhas/cílios esparsos, fronte ampla, lesão cutânea (eritema em face e lesão poiquilodérmica) e anomalias ósseas, alterações típicas da síndrome. Catarata estava presente em 50% dos indivíduos. Nenhum dos pacientes desenvolveu algum tipo de tumor até o momento. O sequenciamento do gene *RECQL4* mostrou a presença de três variantes patogênicas diferentes, em três probandos (37,5%), sendo dois em homozigose e um em heterozigose composta, todas já descritas previamente na literatura. Em busca de alterações em outro gene que pudesse explicar o quadro apresentado pelos pacientes sem mutação, três dos probandos, incluindo os genitores de um deles, tiveram o exoma sequenciado. No entanto, não foram encontradas, nessa etapa, variantes adicionais que explicassem na totalidade os fenótipos apresentados. Comparando os achados clínicos dos pacientes com a síndrome de Rothmund-Thomson tipo I e tipo II, foi observada diferença estatisticamente significativa na incidência de catarata subcapsular nos pacientes sem mutação ($p < 0,05$), semelhante ao que é descrito na literatura. Diante dos achados clínicos e moleculares obtidos, foi realizado o aconselhamento genético para todos os indivíduos, enfatizando a evolução, os cuidados e acompanhamentos necessários para as duas doenças em questão e fornecendo informações aos genitores dos probandos sobre o risco de recorrência para a prole futura.

Palavras-chave: Progeróide. Síndrome de Hutchinson-Gilford. Síndrome de Rothmund-Thomson. Aconselhamento genético.

ABSTRACT

LAZZARO FILHO, R. **Genetic and clinical study of patients with progeroid syndromes.** 2017. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biologia - Genética) Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Some monogenic disorders exhibit progeroid phenotypes, in other words, they develop premature characteristics similar to those observed in normal human aging. The physiopathological correlation between these diseases and the aging process has been studied, and the understanding of the molecular mechanisms in one field contributes to the understanding of the other. The Hutchinson-Gilford and Rothmund-Thomson syndromes are two clinically well-characterized rare progeroid conditions that are caused by changes in the *LMNA* (in one allele) and *RECQL4* (in both alleles) genes, respectively. However, in about 40% to 60% of individuals with Rothmund-Thomson syndrome, no mutations are found in *RECQL4*, constituting a subgroup called type I; thus, cases with mutations in the gene constitute the type II group of the syndrome. Individuals with type II have an increased risk for the development of cancer, particularly osteosarcoma. In this study, nine patients with progeroid signs were clinically evaluated and had the DNA sequenced. One patient was clinically diagnosed with Hutchinson-Gilford syndrome, which was confirmed by the most frequent pathogenic mutation found in the *LMNA* gene (p.Gly608Gly). Eight young patients with median age of 2 years and 2 months were clinically diagnosed as affected by Rothmund-Thomson syndrome, whose most common clinical features included: short stature; sparse hair, eyebrows and eyelashes; erythematous skin lesions and poikiloderma; and bone abnormalities; all typical of the syndrome. Cataract was present in 50% of individuals. None of the patients has developed any type of tumor at this time. Sequencing of the *RECQL4* gene showed the presence of three different pathogenic variants in three probands (37.5%), two in homozygous and one in compound heterozygosity, all previously described in the literature. In search of alterations in another gene that could explain the phenotype presented by the patients without mutation, three of the probands, including the parents of one of them, had the exome sequenced. However, there were no additional variants at this stage that fully explained the phenotypes presented by these individuals. Comparing the clinical findings of patients with Rothmund-Thomson syndrome type I and type II, a statistically significant difference was observed in the incidence of subcapsular cataract in patients without mutation ($p < 0.05$), similar to that described in the literature. In light of the clinical and molecular findings, genetic counseling was performed for all individuals, emphasizing the evolution, care and follow-up needed for the two diseases in question and providing information to the parents of the probands on the risk of recurrence for future offspring.

Keywords: Progeroid. Hutchinson-Gilford syndrome. Rothmund-Thomson syndrome. Genetic counseling.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Principais alterações moleculares associadas ao envelhecimento biológico.....	20
Figura 2 - Quadro clínico da Síndrome de Hutchinson-Gilford.	22
Figura 3 - Localização genômica do gene LMNA no cromossomo 1.	23
Figura 4 - Mecanismo de síntese e maturação da lamina A.	24
Figura 5 - Quadro clínico da Síndrome de Rothmund-Thomson	26
Figura 6 - Localização genômica do gene RECQL4 no cromossomo 8.....	27
Figura 7 - Estrutura tridimensional da proteína humana DNA helicase Q4 dependente de ATP	27
Figura 8 - Variantes patogênicas encontradas até 2009 no gene RECQL4 associadas à síndrome de Rothmund-Thomson	29
Figura 9 - Imagem ilustrando as etapas do sequenciamento por Sanger utilizando equipamento de eletroforese capilar.	31
Figura 10 - Variação do custo do sequenciamento completo do genoma humano em dólares americanos (US\$) entre abril/2001 e outubro/2015	32
Figura 11 - Ilustração do método de sequenciamento de um equipamento Illumina (Estados Unidos)	33
Figura 12 - Etapas do sequenciamento massivo paralelo, desde a extração do DNA até a variante reportada em um relatório final.....	34
Figura 13 - Lesão poiquilodérmica em pacientes SRT1 (A) e SRT4 (B,C)	51
Figura 14 - Defeito do eixo radial nos pacientes 1 (A,B) e 2 (C).....	52
Figura 15 - Anomalias metafisárias nos pacientes 1 (A) e 4 (B).	52

Figura 16 - Imagens extraídas do <i>software</i> Integrative Genomics Viewer (IGV) (Estados Unidos), demonstrando as alterações encontradas nos pacientes SRT1 e SRT3.....	54
Figura 17 - Variantes encontradas no presente estudo	66
Figura 18 - Exemplo do sequenciamento do gene <i>RECQL4</i>	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista das 44 doenças com fenótipo progeróide ou com envelhecimento considerado acelerado ou prematuro, de acordo com descrição OMIM.....	19
Tabela 2 - Variantes patogênicas encontradas no gene da lamina A/C relacionadas a SHG típico e atípico	24
Tabela 3 - Alterações patogênicas em RECQL4 associadas à síndrome de Rothmund-Thomson, reportadas entre 2010 e 2017	28
Tabela 4 - Variante encontrada no gene da lamina A/C.	45
Tabela 5 - Principais achados clínicos relacionados à doença, observados nos pacientes com diagnóstico de SRT. Informações retiradas no atendimento ambulatorial mais recente	47
Tabela 6 - Resultados dos sequenciamentos do gene RECQL4.....	53
Tabela 7 - Mutações de novo encontradas no paciente SRT6	57
Tabela 8 - Variantes raras em heterozigose composta encontradas no paciente SRT6.....	58
Tabela 9 - Compilado dos achados clínicos de 39 pacientes reportados na literatura com mutação para SRT.....	69
Tabela 10 - Comparação das principais características clínicas entre o grupo de pacientes com mutação no gene RECQL4 (SRT tipo II) e o grupo de pacientes sem mutação no gene RECQL4 (SRT tipo I)	71

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

\$	dólares americanos
-	ausência
+	presença
<	menor que
=	igual a
>	maior que
≤	menor ou igual a
≥	maior ou igual a
AAS	ácido acetilsalicílico
ab	balanço alélico
ABraOM	Arquivo Brasileiro Online de Mutações
AVC	acidente vascular cerebral
BP	baixo peso
C4	vértebra cervical 4
C5	vértebra cervical 5
C6	vértebra cervical 6
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CEGH-CT	Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco
CIUR	Crescimento intrauterino restrito
cm	centímetros
CPK	creatinofosfoquinase
D	direito
ddNTP	didesoxinucleosídeo modificado
dL	decilitro

DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxinucleosídeo trifosfato dNTP
DP	desvio padrão
Dr.	Doutor
E	esquerdo
ed.	edição
EDTA	<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ExAC	<i>Exome Aggregation Consortium</i>
F	feminino
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g	grama
GH	hormônio de crescimento
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>
IB-USP	Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo
ICr	Instituto da Criança
IGF1	<i>insulin-like growth fator</i>
IGV	<i>Integrative Genomics Viewer</i>
Kb	kilobase
kDa	kilodalton
Kg	kilograma
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LRT	<i>Likelihood Ratio Test</i>
M	masculino
Mg	miligrama
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

ND	não descrito ou não disponível
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NL	normal
nm	nanômetro
NR	não realizado ou não avaliado
ns	não sinônima
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OMS	Organização Mundial da Saúde
p.	Página
PC	perímetro cefálico;
PCR	reação em cadeia da polimerase
POIKTMP	<i>Hereditary fibrosing poikiloderma with tendon contractures, myopathy, and pulmonary fibrosis</i>
pRB	proteína do retinoblastoma
Prof.	Professor
et al.	e outros
rev.	revista
RX	radiografia
SHG	síndrome de Hutchinson-Gilford
SIFT	<i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>
sin	sinônima
SRT	síndrome de Rothmund-Thomson
WHO	Organização Mundial da Saúde
x	vezes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Síndromes progeróides e envelhecimento	18
1.1.1	Síndrome de Hutchinson-Gilford.....	21
1.1.2	Síndrome de Rothmund-Thomson.....	25
1.2	Investigação molecular das doenças mendelianas.....	30
2	OBJETIVOS.....	36
2.1	Objetivos gerais	37
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	38
3.1	Casuística	39
3.2	Aprovação ética	39
3.3	Metodologias.....	40
3.3.1	Dados clínicos dos pacientes	40
3.3.2	Análise molecular	40
3.3.3	Análise estatística.....	42
4	RESULTADOS.....	43
4.1	Paciente com síndrome de Huntchison-Gilford	44
4.2	Sequenciamento do <i>LMNA</i>	45
4.3	Pacientes com síndrome de Rothmund-Thomson.....	45
4.4	Sequenciamento do <i>RECQL4</i>	53
4.5	Sequenciamento do Exoma Completo	55
5	DISCUSSÃO.....	60
5.1	Síndrome de Hutchinson-Gilford	61
5.2	Síndrome de Rothmund-Thomson	63
5.2.1	Achados clínicos da síndrome	63
5.2.2	Aspectos moleculares na síndrome de Rothmund-Thomson	66

5.3	Aconselhamento genético dos pacientes	74
6	CONCLUSÕES.....	78
	REFERÊNCIAS	80
	ANEXOS.....	89

1.1 Síndromes progeróides e envelhecimento

As doenças mendelianas ou monogênicas constituem um dos grandes grupos de doenças genéticas, cujo fenótipo decorre de mutação em um único gene. Apesar da maioria das doenças monogênicas ser considerada rara, com uma prevalência menor que 1:2.000 nascimentos, estima-se que haja mais de oito mil doenças monogênicas na espécie humana. Em junho de 2017, no catálogo de doenças mendelianas – *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM, 2017) –, estavam descritos 5.014 fenótipos com base molecular conhecida. Além disso, estavam listados mais 3.386 fenótipos, ou com base molecular desconhecida (1.601) ou com suspeita de uma causa monogênica (1.785). Mesmo que individualmente pouco frequentes, quando agrupadas, elas correspondem a uma fração significativa de anormalidades nos nascidos vivos, com uma taxa entre 40 e 82 a cada 1.000 (JAMUAR et al., 2015), o que justifica sua importância em termos de saúde pública e, conseqüentemente, algumas adaptações feitas pelos sistemas de saúde de diversos países, inclusive mais recentemente no Brasil (BRASIL, 2014).

Algumas doenças monogênicas apresentam sinais de envelhecimento precoce, sendo chamadas de síndromes progeróides. Essas condições podem ser separadas em síndromes progeróides segmentais, quando afetam múltiplos órgãos e tecidos, ou síndromes progeróides unimodais, que afetam majoritariamente um único órgão (MARTIN, 2005). Entre as segmentais, pode-se citar, entre outras, as síndromes de Hutchinson-Gilford, Cockayne (BERTOLA et al., 2006), Bloom, Werner, Rothmund-Thomson, Wiedemann-Rautenstrauch e tricotiodistrofia.

A Tabela 1 lista as síndromes genéticas descritas no OMIM que apresentam sinais de envelhecimento precoce.

O conhecimento obtido a partir do estudo das síndromes monogênicas pode auxiliar no entendimento do processo fisiopatológico do envelhecimento humano. Este processo ainda não foi completamente elucidado, entretanto, ao nível molecular, acredita-se que ele possa englobar instabilidade genômica, diminuição dos telômeros, alterações epigenéticas, perda da proteostase,

desregulação da detecção de nutrientes, disfunções mitocondriais, senescência, dentre outras alterações ilustradas na Figura 1 (LOPEZ-OTÍN et al., 2013).

Tabela 1 - Lista das 44 doenças com fenótipo progeróide ou com envelhecimento considerado acelerado ou prematuro, de acordo com descrição OMIM

Lista de doenças com fenótipo progeróide ou envelhecimento acelerado/prematuro

Ataxia-telangiectasia
 Cardiomiopatia dilatada e hipogonadismo hipergonadotrófico
 Cutis laxa (autossômica dominante III)
 Cutis laxa (autossômica recessiva tipo IIB)
 Cutis laxa (autossômica recessiva tipo IIIA)
 Cutis laxa (autossômica recessiva tipo IIIB)
 Deficiência isolada do hormônio de crescimento tipo IA
 Disqueratose congênita (autossômica dominante I)
 Displasia espondiloepimetáfisária com frouxidão ligamentar tipo I
 Displasia mandibuloacral com lipodistrofia tipo A
 Displasia mandibuloacral com lipodistrofia tipo B
 Distrofia muscular congênita associada a *LMNA*
 Doença ataxia-telangiectasia like 2
 Epidermólise bolhosa simples com manchas
 Gerodermia osteodisplásica
 Lipodistrofia parcial adquirida
 Nanismo hiperostótico de Lenz-Majewski
 Nanismo microcefálico osteodisplásico primordial tipo II
 Oftalmoplegia externa progressiva com deleção de DNA mitocondrial (autossômica dominante 3)
 Síndrome branquiooculofacial
 Síndrome da hipoplasia mandibular, surdez, características progeróides e lipodistrofia
 Síndrome da hipotricose-linfedema-telangiectasia-defeito renal
 Síndrome da pele enrugada
 Síndrome de autoinflamação, lipodistrofia e dermatose
 Síndrome de Bloom
 Síndrome de Cockayne
 Síndrome de Ehlers-Danlos (tipo progeróide II)
 Síndrome de Ehlers-Danlos com baixa estatura e anomalias em membros
 Síndrome de GAPO
 Síndrome de Hutchinson-Gilford (Progeria)
 Síndrome de Keppen-Lubinsky
 Síndrome de Nestor-Guillermo
 Síndrome de Prader-Willi
 Síndrome de Rothmund-Thomson
 Síndrome de Ruijs-Aalfs
 Síndrome de SHORT
 Síndrome de Werner
 Síndrome de Williams-Beuren
 Síndrome de Wolfram 2
 Síndrome do envelhecimento prematuro do tipo Penttinen
 Síndrome marfanóide com lipodistrofia
 Síndrome progeróide XFE
 Tricotiodistrofia fotossensitiva 1
 Xeroderma pigmentoso (grupo de complementação F)

Figura 1 - Principais alterações moleculares associadas ao envelhecimento biológico. Extraído de LOPEZ-OTÍN et al., 2013.

Por outro lado, o envelhecimento pode compreender, ao nível macromolecular, características como a alopecia, presbiopia, osteoartrite, osteoporose, perda progressiva da fertilidade, perda da massa muscular e da mobilidade, aumento do risco para desenvolvimento de doenças cardíacas e câncer, dentre outros aspectos (LOPEZ-OTÍN et al., 2013).

Algumas das alterações moleculares e das características fenotípicas associadas ao envelhecimento considerado normal são observadas em síndromes progeróides. Uma parte considerável dessas doenças são resultados de alterações em genes responsáveis pela integridade do DNA. A família das *RECQLs*, por exemplo, são proteínas do tipo helicases, que promovem a

abertura da dupla hélice para que possa ocorrer a replicação. Defeitos nas proteínas *RECQL2/WRN*, *RECQL3/BLM* e *RECQL4* podem causar, respectivamente, as síndromes de Werner, Bloom e Rothmund-Thomson (KAROW et al., 2000). Genes ligados ao reparo do DNA, como aqueles presentes na via de reparo por excisão de nucleotídeos, estão associados à síndrome de Cockayne e ao xeroderma pigmentoso (CLEAVER et al., 2009). Adicionalmente, a lamina A é uma das principais proteínas que mantém a integridade e a forma do núcleo celular, permitindo um funcionamento adequado da cromatina e fatores nucleares. Uma alteração específica no gene da lamina A/C (*LMNA*) é responsável pela síndrome de Hutchinson-Gilford, doença que possui um quadro clínico de envelhecimento precoce com características bastante semelhantes a do envelhecimento humano normal (MARTIN; OSHIMA, 2000).

Além das alterações em pele, tecido subcutâneo e múltiplos órgãos, algumas destas doenças apresentam comprometimento ósseo, sendo listadas também na classificação das doenças ósseas genéticas (BONAFE et al., 2015). Entre elas, pode-se destacar a síndrome de Hutchinson-Gilford, pertencente ao grupo das osteólises (grupo 28). Já na síndrome de Rothmund-Thomson, observa-se um defeito de redução dos membros, caracterizado por uma hipoplasia do eixo radial, condição alélica às síndromes de Baller-Gerold (grupo 33) e RAPADILINO (grupo 39).

1.1.1 Síndrome de Hutchinson-Gilford

A síndrome de Hutchinson-Gilford (SHG), também chamada simplesmente de progéria, foi descrita em 1886, sendo inicialmente identificada em um paciente de seis anos (HUTCHINSON, 1886). Considerada uma síndrome muito rara, apresenta uma incidência aproximada de 1 para 8 milhões de nascidos vivos. Até recentemente, somente cerca de 130 pacientes com a doença haviam sido descritos na literatura (POLLEX; HELEGE, 2004).

O fenótipo apresentado pelos pacientes afetados inclui déficit pômdero-estatural de início pós-natal, ausência de gordura subcutânea, alopecia e alterações em face (GORDON; BROWN; COLLINS, 2015). Além disso, ocorrem

anormalidades nos ossos e articulações, uma vez que os pacientes apresentam clavículas pequenas, costelas finas, acro-osteólise e redução da densidade mineral dos ossos, com acentuada desmineralização óssea e necrose avascular, inclusive da cabeça femoral, que, em conjunto, pode caracterizar uma displasia esquelética (GONZALO; KREIENKAMP; ASKJAER, 2016). Outra característica comum nos pacientes, e uma das primeiras manifestações da síndrome, são as alterações na pele, a qual pode conter regiões com descoloração, pontos de pigmentação e áreas que restringem a movimentação normal. Alterações esclerodermóides também podem ser observadas no abdome e nas extremidades inferiores do corpo (GONZALO; KREIENKAMP; ASKJAER, 2017). A Figura 2 ilustra alguns dos principais sinais clínicos presentes na síndrome.

Figura 2 - Quadro clínico da Síndrome de Huchinson-Gilford.
Adaptado de Shawn (2014).

Todavia, uma das alterações mais importantes na SHG são as complicações cardiovasculares, em que há aterosclerose, potencialmente isquemia e infarto do miocárdio. Além disso, também são observados em muitos casos acidentes vasculares cerebrais (AVC) nos pacientes. Estas manifestações vasculares podem gerar sintomas neurológicos como cefaleia e convulsões (GONZALO; KREIENKAMP; ASKJAER, 2017).

A expectativa de vida média é de 13,4 anos de idade e a causa da morte da maioria dos pacientes é por infarto agudo do miocárdio ou por AVC, devido à aterosclerose. Células e tecidos de origem mesenquimal são os mais afetados na SHG (GONZALO; KREIENKAMP; ASKJAER, 2017).

O padrão de herança é autossômico dominante, geralmente causado por mutações *de novo*, com apenas alguns poucos casos descritos de irmãos afetados devido ao mosaicismo gonadal de um dos genitores (WUYTS et al., 2005). Uma mutação no gene *LMNA* (c.C1824T/p.Gly608Gly) é responsável pela maioria dos casos (Figura 3). Essa alteração leva a formação de *splice* alternativo, dentro do éxon 11 do gene, causando a deleção de 50 aminoácidos próximos do C terminal da prelamina A, que compreende a região de clivagem final para a CAAX prenil proteinase homólogo 1 (*ZMPSTE24*), gerando acumulação de uma proteína tóxica chamada de progerina, como ilustrado na Figura 4. Essa proteína prejudica a integridade do envoltório nuclear das células, promove mudanças na cromatina mitocondrial, disfunções no reparo do DNA, encurtamento dos telômeros e senescência celular prematura (POLLEX; HELEGE, 2004; GONZALO; KREIENKAMP; ASKJAER, 2017).

Figura 3 - Localização genômica do gene *LMNA* no cromossomo 1. Retirado do site Genecards®

Outras vinte variantes no gene *LMNA* foram relatadas no banco de dados ClinVar (NCBI) como patogênicas, causadoras de fenótipos relacionados a SHG. Dessas, cinco foram validadas e listadas por Gordon, Brown e Collins (2015) no *GeneReviews*® como causadoras de SHG atípico (Tabela 2).

Figura 4 - Mecanismo de síntese e maturação da lamina A (A) e da progerina (B) desde a transcrição até a proteína madura. Evidencia-se em (B) a deleção de 50 aminoácidos na pré-progerina, como consequência do *splice* alternativo dentro do éxon 11. Extraído de Gonzalo, Kreienkamp e Askjaer (2017).

Tabela 2 - Variantes patogênicas encontradas no gene da lamina A/C relacionadas a SHG típico e atípico

Fenótipo	Variante no <i>LMNA</i>	Quadro clínico comparado a SHG
SHG típico	c.1824C>T	Quadro clínico clássico
	c.1822G>A	Levemente mais grave
	c.1968+1G>A	De leve a moderadamente mais grave
SHG atípico	c.1968+2T>A	Similar
	c.1968+2T>C	Similar
	c.1968+5G>C	Similar

Modificada de GeneReviews®.

Atualmente a SHG não possui um tratamento padrão. Entretanto, terapias em estágios pré-clínicos parecem ser promissoras. Para o futuro, a terapia gênica para inibir o *splice* alternativo impróprio do gene *LMNA* e terapia com células tronco parecem também ser uma estratégia terapêutica potencial para a doença (REHMAN et al. 2015).

1.1.2 Síndrome de Rothmund-Thomson

A síndrome de Rothmund-Thomson (SRT), foi descrita inicialmente pelo oftalmologista alemão Auguste Rothmund em 1868, que identificou quatro pacientes, filhos de pais consanguíneos, com alterações em pele e catarata juvenil. Três indivíduos com um quadro semelhante, porém apresentando alteração óssea e sem catarata, foram descritos posteriormente pelo dermatologista inglês Sydney Thomson (VENNOS et al., 1992). É considerada uma doença rara, com menos de 400 casos descritos na literatura, embora não haja dados epidemiológicos precisos sobre a sua prevalência (LARIZZA; ROVERSI; VOLPI, 2010).

O quadro clínico da doença caracteriza-se por lesões cutâneas progressivas logo no primeiro ano de vida, em face, membros, evoluindo para um aspecto poiquilodérmico. Inicia-se entre três e seis meses de idade com uma lesão eritematosa em face, podendo também apresentar edema e bolhas, com comprometimento posterior da região glútea e das extremidades. Em um período de meses a anos, as lesões adquirem um aspecto poiquilodérmico, caracterizado por manchas reticulares hipo e hiperpigmentadas, com telangiectasias e áreas atróficas. Posteriormente, apresentam alopecia progressiva associada e catarata de início precoce, juvenil, em 70% dos casos antes dos seis anos de idade. Também há baixa estatura, hipogonadismo e alterações dentárias, incluindo dentes supranumerários ou hipodontia (MARQUES et al., 2008; WANG; PLON, 2016). Além disso, são observados distúrbios esqueléticos em 75% dos pacientes, especialmente, hipoplasia/agenesia de ossos do eixo radial (polegar/rádio), hipoplasia/agenesia da patela, osteopenia, sendo comum ocorrerem fraturas e processos de cura mais lentos, devido à diminuição da densidade óssea concomitante (BECKMANN, 2015; LU; JIN; WANG, 2017). Outros achados podem incluir ainda: bossa frontal, prognatismo, microftalmia, microcórnea, estrabismo, glaucoma, disgenesia de íris, nariz pequeno, pâncreas anular, ânus anteriorizado, criptorquidia, mãos e pés pequenos, atrofia ungueal,

embranquecimento prematuro do cabelo e deficiência intelectual (WANG; PLON, 2016). A Figura 5 ilustra alguns dos principais sinais da SRT.

Figura 5 - Quadro clínico da Síndrome de Rothmund-Thomson. Adaptado de CRAM (2010).

A síndrome aumenta o risco para desenvolvimento de alguns tipos de tumores, como carcinomas de células escamosas, melanoma e, principalmente, osteossarcoma. (LU; JIN; WANG, 2017). Devido ao risco aumentado de câncer nos ossos, orienta-se monitoramento clínico direcionado e rápida avaliação caso haja sinais ou sintomas sugestivos do tumor. O estudo radiológico dos ossos longos pode ser realizado aos cinco anos de idade para posterior comparação com anormalidades ósseas que possam sugerir um osteossarcoma (WANG et al., 2001). A incidência de osteossarcoma nos pacientes afetados pode chegar a 30%, sendo mais presentes em pacientes com variantes genéticas que levam a proteínas truncadas (WANG et al., 2003).

A doença apresenta padrão de herança autossômico recessivo e está associada a mutações no gene *RECQL4*, o qual está localizado na região q24.3 do cromossomo 8 (Figura 6) e que pertence a uma família de DNA helicases chamada de RecQ, altamente conservada da bactéria ao homem. Nos humanos a família RecQ possui 5 membros distintos, os quais são *RECQL1*, *BLM*, *WRN*, *RECQL4* e *RECQL5* (WOO et al., 2006). O gene *RECQL4* codifica uma DNA helicase Q4 (*RecQ protein-like 4*), proteína de 133 kDa, ilustrada na Figura 7, que consiste em 1.208 aminoácidos (SUTER et al., 2016). Além disso, sabe-se que o gene *RECQL4* possui uma estrutura não usual, com 21 éxons em somente

6 Kb, no DNA genômico. Possui, desta forma, íntrons pequenos, com aproximadamente 80 pb, o que gera uma condição que tem sido implicada em *splices* ineficientes.

Figura 6 - Localização genômica do gene RECQL4 no cromossomo 8. Retirado do site Genecards®

Originalmente o gene *RECQL4* está envolvido na replicação e reparo do DNA, na recombinação homóloga, e na manutenção dos telômeros e da integridade mitocondrial, e por estes motivos, muitas doenças associadas ao *RECQL4* apresentam desfechos clínicos relacionados com aspectos do envelhecimento (LU; JIN; WANG, 2017).

Figura 7 - Estrutura tridimensional da proteína humana DNA helicase Q4 dependente de ATP. Retirado de SWISS-MODEL (2017)

Por obedecer a um padrão de herança autossômico recessivo, em uma família na qual há um afetado por essa síndrome, estima-se que numa próxima gestação, haja um risco de 25% do conceito ser afetado pela SRT, por herdar mutações nos dois alelos do gene *RECQL4*; 50% de ser um heterozigoto portador para uma mutação patogênica e 25% de chance de herdar os alelos normais (SHARON; PLON, 2016).

Através de análises moleculares foram identificadas duas formas da doença, denominadas de tipo I e II (WANG et al., 2003). No tipo I não foram observadas mutações no gene *RECQL4*, o que sugere uma heterogeneidade genética nesta síndrome. Por outro lado, pacientes do tipo II, que correspondem entre 40 e 60% dos casos de SRT, de fato apresentam mutação no *RECQL4* (LU et al., 2016; SIMON et al., 2010).

Existem hoje 95 variantes causadoras da SRT no *Human Gene Mutation Database* (HGMD), incluindo mutações *missense*, *nonsense* e *frameshift*, além de deleções intrônicas e em sítios de *splice*, localizadas ao longo do gene inteiro, como ilustrado na Figura 8 e listado na Tabela 3.

Tabela 3 - Alterações patogênicas em *RECQL4* associadas à síndrome de Rothmund-Thomson, reportadas entre 2010 e 2017

Alteração no DNA	Alteração na proteína	Referência
c.2767_2768delTT	p.(Leu923Alafs * 53)	Fradin et al. (2013)
c.2272C>T	p.(Arg758*)	Colombo et al. (2014)
c.1531T>C	p.(Cys511Arg)	Piard et al. (2015)
c.1236G>A	p.(Trp412*)	Piard et al. (2015)
c.2545_2546delGT	p.(Phe850Profs*33)	Piard et al. (2015)
c.1913T>C	p.(Leu638Pro)	Piard et al. (2015)
c.2802G>A	p.(Trp934*)	Piard et al. (2015)
c.2590C>T	p.(Gln864*)	Piard et al. (2015)
c.1343_1347delCCACC	p.(Pro448Argfs*18)	Piard et al. (2015)
c.1222C>T	p.(Gln408*)	Suter et al. (2016)
c.558_564dupAGATCCT	p.(Gly189Argfs*11)	Suter et al. (2016)
c.2085delA	p.(Lys695Asnfs*148)	Suter et al. (2016)
c.2277dupC	p.(Phe760Leufs*49)	Suter et al. (2016)
c.3008_3009delTG	p.(Val1003Alafs*29)	Suter et al. (2016)
c.3330dupA	p.(Glu1111Argfs*116)	Suter et al. (2016)
c.1930_1935dupGCCACA	p.(Ala644Thr645dup)	Suter et al. (2016)
c.2569_2574dupTGCACC	p.(Cys857_thr858dup)	Suter et al. (2016)
c.2789_2812del24	p.(His930_Leu937del)	Suter et al. (2016)
c.3573C>G	p.(Ser1191Arg)	Suter et al. (2016)
c.3283delinsCC	p.(Glu1095Profs*15)	Zhang et al. (2016)

Alterações no transcrito NM_004260.3

Figura 8 - Variantes patogênicas encontradas até 2009 no gene *RECQL4* associadas à síndrome de Rothmund-Thomson. Extraído de Larizza, Roversi e Volpi (2010).

A suspeita clínica da síndrome baseia-se principalmente na lesão cutânea. A presença de uma lesão poiquilodérmica típica (aparecimento e padrão de desenvolvimento das lesões) leva ao diagnóstico definitivo da síndrome.

Na biópsia de pele podem ser identificadas alterações compatíveis com poiquiloderma, que mesmo não sendo específico, é consistente com SRT. É considerado provável o diagnóstico do paciente que possui um padrão atípico de lesões (considerando a idade de início, distribuição ou padrão de desenvolvimento) associado a outras duas características da síndrome, como: recorrência na família, câncer de pele, anomalias esqueléticas, catarata, baixa estatura e cabelos esparsos (WANG et al., 2001).

Caso os sinais clínicos sejam inconclusivos, testes moleculares para identificação das variantes patogênicas bialélicas podem ser utilizados. A triagem molecular pode ser realizada pelo sequenciamento do gene *RECQL4* (WANG; PLON, 2016).

Algumas síndromes genéticas podem cursar com sinais e sintomas semelhantes à SRT, incluindo síndromes ligadas a outros genes da família das helicases, como a síndrome de Bloom e a síndrome de Werner, causadas por alterações nos genes *BLM* e *WRN*, respectivamente. Além disso, podem ser considerados diagnósticos diferenciais: ataxia telangiectasia, anemia de Fanconi, xeroderma pigmentoso, síndrome de Kindler, disqueratose congênita, poiquiloderma associada a neutropenia e a síndrome POIKTMP (sigla do inglês

para *Hereditary fibrosing poikiloderma with tendon contractures, myopathy, and pulmonary fibrosis*) (WANG; PLON, 2016).

Em qualquer uma das formas da síndrome, o manejo recomendado direciona-se apenas ao tratamento das manifestações clínicas decorrentes da doença, como o uso de protetor solar e restrição de exposição da pele ao sol, o tratamento com laser nas telangiectasias, a remoção cirúrgica da catarata e terapias consideradas padrão para tratamento de cânceres. É de extrema importância, também, o acompanhamento médico com consultas periódicas anuais, o monitoramento do crescimento e desenvolvimento, exame ocular e o monitoramento radiológico, com exames imediatos em caso de suspeitas oncológicas (WANG; PLON, 2016).

1.2 Investigação molecular das doenças mendelianas

Apesar de algumas síndromes progeróides como a SHG já serem bem compreendidas clínica e geneticamente, diversas outras síndromes ainda demandam uma maior compreensão, como a SRT, em que não é conhecido o mecanismo molecular dos casos do tipo I. Além disso, existem ainda inúmeros pacientes que apresentam sinais de envelhecimento precoce, sem terem diagnóstico clínico ou genético estabelecido.

Com os avanços nas técnicas de sequenciamento de DNA, houve, nas duas últimas décadas, uma vultosa redução do custo e aumento na velocidade de sequenciamento (WETTERSTRAND, 2017). Isso permitiu a maior acessibilidade para a realização de exames genéticos, como o sequenciamento completo do exoma e o sequenciamento de múltiplos genes em painéis gênicos. Consequentemente, essa conjuntura vem permitindo ampliar os conhecimentos das bases moleculares das doenças mendelianas, com a descoberta de novas variantes patogênicas e a elucidação de casos complexos, sem diagnóstico estabelecido anteriormente. .

O sequenciamento genético por Sanger foi o principal método de estudo de DNA utilizado no século XX. Desenvolvido por Sanger e Coulson (1975) e posteriormente modificado (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), essa técnica foi fundamental para o sequenciamento dos primeiros genes humanos e

nas primeiras associações genótipo-fenótipo das doenças mendelianas. O mesmo princípio foi utilizado em conjunto com sequenciadores automáticos de DNA por eletroforese capilar no sequenciamento do genoma humano (LANDER et al., 2001; VENTER et al., 2001).

O método estabelece a sequência de bases nitrogenadas a partir de um fragmento de DNA fita simples, um par de *primers* adjacentes à região de interesse, uma enzima DNA polimerase, desoxinucleosídeos trifosfato normais (dNTPs) e didesoxinucleosídeos modificados (ddNTPs), os quais interrompem o alongamento da cadeia de DNA quando incorporados. Os ddNTPs podem ser marcados de forma radioativa ou fluorescente para detecção em máquinas automáticas de sequenciamento. Assim, como ilustrado na Figura 9, os produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) serão fragmentos de fita simples, de tamanhos diversos, contendo em sua extremidade 3' final um ddNTP marcado, possível de ser identificado em géis ou sequenciadores automáticos.

Figura 9 - Imagem ilustrando as etapas do sequenciamento por Sanger utilizando equipamento de eletroforese capilar. Retirado de Wikipedia®.

A partir do início dos anos 2000, novos métodos de sequenciamento de DNA passaram a ser utilizados na pesquisa científica e, posteriormente, na rotina diagnóstica. Chamados de sequenciamento massivo paralelo, “sequenciamento de nova geração” ou NGS, da sigla em inglês para *next-generation sequencing*, esse conjunto de abordagens em *high-throughput*, destacavam-se do modelo anterior por sequenciar múltiplos fragmentos paralelamente (VOELKERDING; DAMES; DURTSCHI, 2009). Esse avanço permitiu uma redução importante no tempo e no custo do sequenciamento humano, como ilustrado no gráfico abaixo (Figura 10).

Figura 10 - Variação do custo do sequenciamento completo do genoma humano em dólares americanos (\$) entre abril/2001 e outubro/2015. Eixo das ordenadas em escala logarítmica de valores. Dados retirados de Wetterstrand (2017).

No sequenciamento por NGS, o DNA extraído é fragmentado e todo ou parte dele, amplificado por PCR. Para selecionar regiões específicas do genoma, como regiões codificantes de genes de interesse, podem ser utilizadas sondas de captura durante a etapa de amplificação. Caso o objetivo seja sequenciar o genoma completo, todo o material genético é amplificado, sem captura de regiões específicas.

Seguidamente, o produto amplificado é então sequenciado através de umas das tecnologias existentes, como a do sequenciamento por síntese

(utilizado nos equipamentos da Illumina, Estados Unidos) ou por ligação (utilizado em alguns equipamentos da Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). Nessa etapa, são realizadas leituras de milhões de pequenos trechos do DNA, que são processadas por bioinformática, sendo alinhadas, comparadas entre si e com genomas referência. É gerada, por fim, uma tabela de variantes, a qual se costuma incluir a frequência alélica encontrada por bancos de dados populacionais, dados encontrados na literatura científica, e algoritmos de predição de patogenicidade (JAMUAR; TAN, 2015). A Figura 11 ilustra o método de sequenciamento por NGS, enquanto a Figura 12, todas as etapas envolvidas, incluindo as etapas de bioinformática e análise das variantes.

Figura 11 - Ilustração do método de sequenciamento de um equipamento Illumina (Estados Unidos). (a) Reagentes passam pela *flow cell*, entre as lâminas de vidro modificadas, com milhões de fragmentos de DNA ancorados. (b) Secção transversal da *flow cell* mostrando a síntese da segunda fita a partir da sequência molde ancorada. A incidência de um laser ativa a emissão de uma cor específica, conforme a base do nucleotídeo modificado incorporado no final de cada ciclo. (c) A captura de imagens da superfície da *flow cell* após cada ciclo, registra a base incorporada em cada fragmento. (d) A análise das imagens permite descobrir a sequência de bases de fita sintetizada em cada fragmento. Imagem retirada de Gilchrist (2010).

Figura 12 - Etapas do sequenciamento massivo paralelo, desde a extração do DNA até a variante reportada em um relatório final.

Um exemplo da utilização de técnicas de NGS para identificação de síndromes progeróides, cuja etiologia é desconhecida é o estudo de Puente et al. (2011), que através do sequenciamento do exoma e de outras técnicas moleculares, analisaram alguns pacientes diagnosticados com uma síndrome progeróide atípica. Os achados clínicos de dois pacientes analisados, inicialmente, sugeriram a existência de uma forma da SHG, uma vez que apresentavam várias características clínicas desta síndrome, mas sem mutações identificadas nos genes *LMNA* e *ZMPSTE24*. Um dos pacientes era o segundo filho de pais consanguíneos, evoluindo com desenvolvimento normal até os dois anos de idade, quando começou a apresentar mudanças na pele, perda da gordura subcutânea da face, nariz convexo, mudanças no tórax, osteoporose severa, dentre outros sinais e sintomas. Em princípio, o paciente recebeu o diagnóstico de SHG, mas posteriormente outras características sugeriram que se tratava de uma síndrome progeróide distinta. Este paciente, no momento das análises, estava com 31 anos, condição incomum na SHG, na qual em geral os indivíduos vivem somente até, em média, os 13 anos de idade.

O segundo paciente estudado, apresentava características semelhantes ao do primeiro e estava com 24 anos. Além disso, ambos não apresentavam evidências de doenças cardiovasculares. As análises moleculares por NGS identificaram nos dois indivíduos, mutações no gene *BANF1*, alterações não presentes na população controle. Este achado ilustra a importância do emprego destas tecnologias para compreensão dos diversos tipos de síndromes, que ainda precisam ser melhor compreendidas (PUENTE et al., 2011). Em concordância, Cabanillas et al. (2011), identificou em outros pacientes as

mesmas mutações no *BANF1*, confirmando a existência desta nova síndrome progeróide, também chamada de síndrome de Néstor-Guilhermo.

A identificação de mutações como a *BANF1* pode permitir novas abordagens de rastreamento e de terapêutica para pacientes nestas e em diversas outras condições sem etiologia definida. Deste modo, ainda há oportunidades reais, não só, para estabelecer o diagnóstico de pacientes com a descoberta de novas variantes patogênicas, muitas vezes com expansão do espectro fenotípico de uma síndrome, mas também, para uma maior compreensão do genoma humano no desenvolvimento de doenças genéticas e no envelhecimento.

2.1 Objetivos gerais

- Identificar variantes patogênicas em síndromes progeróides;
- Estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo;
- Realizar o aconselhamento genético para as famílias estudadas.

3.1 Casuística

Os pacientes estudados nesse trabalho são provenientes do ambulatório de genética, da Unidade de Genética do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (ICr-HCFMUSP). O ambulatório conta com médicos geneticistas com longa experiência em genética clínica e que mantêm o acompanhamento dos pacientes do serviço. Além disso, por meio do complexo do Hospital das Clínicas, os pacientes são frequentemente acompanhados por diferentes especialidades clínicas e realizam exames laboratoriais e radiológicos de rotina conforme necessário. Assim, os pacientes estudados possuem histórico de saúde completo desde a primeira consulta, feito por uma equipe multidisciplinar de profissionais especializados.

A casuística do presente trabalho foi formada por nove indivíduos:

- Um paciente do gênero masculino, atualmente com 6 anos e 2 meses, com diagnóstico clínico de síndrome de Hutchinson-Gilford;
- Sete pacientes com o diagnóstico definitivo e um com diagnóstico provável de síndrome de Rothmund-Thomson: cinco do gênero feminino e três do masculino, com idades entre 1 ano e 8 meses e 14 anos e 4 meses, sendo a mediana de 2,2 anos.

3.2 Aprovação ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da FMUSP, como subprojeto ao protocolo de pesquisa nº 0588/10 intitulado “Estudo Genético-clínico das Displasias Esqueléticas”. O documento comprobatório encontra-se anexo a essa dissertação.

3.3 Metodologias

3.3.1 Dados clínicos dos pacientes

Durante a consulta nos ambulatórios de genética os pacientes são avaliados por meio de anamnese, história familiar e um exame físico completo, incluindo dados antropométricos, como peso, estatura e perímetro cefálico, além de fotografias. Os dados clínicos e de exames complementares utilizados nessa pesquisa foram obtidos do prontuário digital da Unidade de Genética e do serviço de apoio diagnóstico do Hospital das Clínicas.

Para a análise e cálculos antropométricos, foi utilizado o *software* WHO Anthro (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Para esse estudo, considerou-se baixa estatura os valores de *Z-score* inferiores a 2.

3.3.2 Análise molecular

Foi realizado o estudo molecular destes pacientes pela técnica do sequenciamento massivo paralelo, ou NGS, no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CEGH-CEL / IB-USP). O centro é uma das principais referências em genética molecular humana do país, e conta com uma estrutura laboratorial sólida e adequada para a realização das análises necessárias.

Para a realização do sequenciamento, foi coletada uma amostra de 4 mL de sangue periférico dos pacientes em tubo contendo EDTA (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*). A extração do DNA genômico das células sanguíneas nucleadas foi realizada no robô de extração automático QIA Symphony (Qiagen, Alemanha) com o kit de extração de DNA da própria fabricante. A quantificação do DNA e a avaliação da pureza (razão de comprimentos de onda 260/280 nm maior que 1,80) foi realizada no NanoDrop (Thermo Fischer Scientific, Estados Unidos). Nos pacientes com diagnóstico de SHG e SRT, foram avaliados inicialmente os genes *LMNA* e *RECQL4*, respectivamente, ambos parte de um painel customizado de 85 genes responsáveis por diferentes doenças esqueléticas, desenhado e já validado pelo

CEGH-CEL / IB-USP. O sequenciamento foi realizado em equipamento Illumina MiSeq (Illumina, Estados Unidos) utilizando kit de captura e preparo de biblioteca (Nextera – Custom Target Enrichment, Illumina) de acordo com o protocolo do fabricante.

Nos pacientes com SRT em que não foi identificada nenhuma alteração patogênica no *RECQL4*, realizou-se o sequenciamento do exoma completo em equipamento Illumina HiSeq2000 (Illumina) utilizando kit de captura Agilent SureSelect Human All Exon V6 (Agilent, Estados Unidos), a fim de identificar variantes patogênicas em outros genes associados a poiquiloderma, em doenças que seriam diagnósticos diferenciais da SRT, ou mesmo para o encontro de um novo gene associado à SRT. Nesta possibilidade, duas estratégias foram traçadas: a análise dos exomas dos probandos na tentativa de se identificar variantes compartilhadas em um mesmo gene; e o estudo do exoma do trio (probando com genitores), para avaliar mutações *de novo*, além da análise de variantes em homozigose e heterozigose composta, compatível com o padrão de herança autossômico recessivo proposto para a SRT tipo I

Todo o alinhamento, processamento dos dados, chamada e anotação de variantes foi feito utilizando os algoritmos e *softwares*: Burrows-Wheeler Aligner (BWA), Picard (Broad Institute), Genome Analysis Toolkit package (GATK) (Broad Institute), e ANNOVAR. Para a anotação das variantes foram utilizados os seguintes bancos de dados públicos e preditores de patogenicidade de variantes: 1000 Genomes Project (IGSR); ClinVar (NCBI); ABraOM (NASLAVSKY et al. 2017); Human Gene Mutation Database (HGMD); dbSNP (NCBI); ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>); SIFT (NG; HENIKOFF, 2003); PolyPhen (Harvard University); MutationTaster (SCHWARZ et al., 2014); e *Likelihood Ratio Test* (LRT).

As variantes genéticas encontradas no sequenciamento dos pacientes, foram analisadas a partir de critérios determinados para que pudesse ser atribuído significado clínico que justificasse o fenótipo apresentado pelos indivíduos.

Como índice mínimo de qualidade, utilizou-se o critério de cobertura maior ou igual a 10 vezes (*depth* $\geq 10x$) e balanço alélico entre 0,3 e 0,7 ($0,3 \leq ab \leq 0,7$) quando presente em heterozigose.

Na filtragem de cada variante, foi considerada a sua frequência nos bancos de dados populacionais utilizados, excluindo-se variantes comuns, com frequência igual ou superior a 0,5%, em pelo menos dois bancos de dados diferentes. A presença da mesma variante em indivíduos não relacionados, e com suspeitas clínicas distintas, sequenciados na mesma reação, também foi desconsiderada, por traduzir um possível erro do sequenciamento.

Para a atribuição de patogenicidade, consideraram-se as classificações em bancos de dados que apresentam informações clínicas e dados da literatura científica. Foram também considerados os algoritmos de predição *in silico* listados anteriormente.

3.3.3 Análise estatística

Com o objetivo de caracterizar melhor e comparar os achados clínicos dos pacientes estudados, foi realizada uma análise descritiva envolvendo os valores de prevalência de cada característica em número absoluto e relativo. Apresentaram-se, também, os valores clínicos quantitativos relevantes para as condições clínicas compreendidas na pesquisa.

Para comparação entre as frequências de variantes categóricas, utilizou-se o teste exato de Fischer, considerando uma diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$.

4.1 Paciente com síndrome de Hutchinson-Gilford

O paciente com diagnóstico clínico de SHG, avaliado em consulta mais recente aos seis anos e dois meses de idade, é o único filho de um casal jovem e não-consanguíneo. Foi avaliado inicialmente na Unidade de Genética do ICr-HCFMUSP aos dois anos e nove meses com hipótese diagnóstica de uma displasia ectodérmica. O paciente, sexo masculino, nasceu a termo, após uma gestação sem intercorrências, de parto cesáreo, com peso de nascimento de 3.300 g e comprimento de 50 cm. Ficou internado por oito dias devido aspiração de líquido meconial. O desenvolvimento neuropsicomotor era adequado. Sua mãe referiu que, com um ano de idade, notou que os cabelos começaram a cair e as veias ficaram mais proeminentes. Não havia nenhuma queixa referente a pouca sudorese, anomalias dentárias ou de unhas. Referiu ainda dificuldade em ganhar peso. O exame físico revelou: peso de 11 Kg (Z-score -1,97), estatura de 91 cm (Z-score -0,89) e perímetro cefálico de 48 cm (normal). Apresentava alopecia, com veias visíveis em fronte e couro cabeludo, nariz afilado, tecido celular cutâneo escasso, com veias proeminentes nos membros e certa restrição articular, clinodactilia do 5º dedo bilateral, pele xerótica com efélides em regiões axilares e peri-inguinais.

Os seguintes exames complementares foram realizados:

- Avaliação bioquímica: triglicérides de 96 mg/dL (ideal <100); colesterol total de 175 mg/dL (ideal <150), LDL de 144 mg/dL (ideal <100);
- RX completo de esqueleto com fêmur encurvado bilateralmente, falanges distais de segundo e terceiro quirodáctilos curtas e afiladas, pés com discreta hipoplasia das falanges distais, mais evidentes em primeiro e segundo pododáctilos e coluna com redução da altura vertebral de C4, C5, C6 com fusão parcial entre elas;
- Densitometria óssea: normal;
- Ecocardiograma: normal;

- Avaliação oftalmológica: normal.

O paciente permanece em seguimento no Ambulatório de Genética, além de acompanhamento em outras especialidades, como nutrição, endocrinologia e cardiologia. Em 2015 foi prescrito AAS 3,5 mg/Kg como profilático para aterosclerose. Na avaliação aos 4 anos e 9 meses, seus dados antropométricos mostraram uma queda no seu crescimento (*Z-score* -1,85).

O quadro clínico apresentado pelo paciente era compatível com o diagnóstico de SHG, assim, foi solicitado o sequenciamento do gene *LMNA*.

4.2 Sequenciamento do *LMNA*

Foi encontrada a variante c.1824C>T (p.Gly608Gly) em heterozigose no éxon 11 do gene *LMNA* (Tabela 4). A alteração, apesar de sinônima, é descrita na literatura como patogênica e causadora da doença.

Tabela 4 - Variante encontrada no gene da lamina A/C.

Posição*	Gene	Alteração** (DNA/proteína)	
1:156138613	<i>LMNA</i>	c.1824C>T	p.(Gly608Gly)

*Genoma referência GRCh38 38.1/141. Transcrito: NM_170707.3.

4.3 Pacientes com síndrome de Rothmund-Thomson

Todos os pacientes incluídos neste estudo preenchiam os critérios clínicos estabelecidos por Wang et al. (2001) para a SRT: sete apresentavam o padrão típico, recebendo assim um diagnóstico definitivo, e um foi classificado como um diagnóstico provável, uma vez que apresentava uma lesão cutânea atípica. A Tabela 5 reúne as principais características clínicas dos pacientes, destacando aquelas relacionadas à síndrome. As figuras 13, 14 e 15 apresentam imagens das lesões em pele (Figura 13) e alterações radiológicas (Figuras 14 e 15).

O paciente SRT3, é o único paciente da casuística com história de consanguinidade, sendo os pais primos de primeiro grau. O probando possui um irmão mais velho, de 12 anos, com quadro de câimbras e dores musculares após realizar exercícios físicos na escola há dois anos. Como permaneceu com os sintomas por mais de seis meses, foi avaliado e diagnosticado por um reumatologista como miosite. Apresentava exames bioquímicos com elevação das enzimas musculares (CPK). Fez uso de corticoide e evoluiu com osteoporose, tendo duas fraturas vertebrais. Esse irmão foi, também, avaliado em nosso serviço e não apresentava sinais compatíveis com a SRT.

Tabela 5 - Principais achados clínicos relacionados à doença, observados nos pacientes com diagnóstico de SRT. Informações retiradas no atendimento ambulatorial mais recente (continuação).

Cabelos esparsos	+	+	-	+	+	+	+	-	6/8 (75)
Sobrancelhas/cílios esparsos	+	+	-	+	+	+	+	-	6/8 (75)
Unhas displásicas/hipoplásicas	-	-	-	+	+	+	+	-	4/8 (50)
Manchas café com leite	-	-	+	-	-	-	-	-	1/8 (12,5)
Anomalias oculares									
Catarata subcapsular	-	-	-	+	+	+	+	-	4/8 (50)
				(2a)	(1a)	(1a6m)	(nascimento)		
Microftalmia	-	-	-	-	+	-	-	-	1/8 (12,5)
Glaucoma	NR	NR	NR	+	+	NR	+	NR	3/3 (37,5)
Anomalias dentárias									
Dentes hipoplásicos	-	-	-	-	-	-	-	-	0/8 (0)
Anomalias esqueléticas									
Defeito do eixo radial	+	+	-	-	-	-	-	+	3/8 (37,5)
	Agenesia de polegares bilateral e radio unilateral	Polegares hipoplásicos						Polegar E hipoplásico e agenesia do rádio E	
Osteopenia	-	NR	+	+	-	NR	NR	-	2/5 (40)
Alterações metafisárias nos ossos longos	+	+	-	+	+	NR	NR	-	4/6 (66,6)

Tabela 5 - Principais achados clínicos relacionados à doença, observados nos pacientes com diagnóstico de SRT. Informações retiradas no atendimento ambulatorial mais recente (conclusão).

Hipoplasia das patelas	+	NR	NR	-	NR	NR	NR	NR	1/2 (50)
Encurtamento das falanges médias	+	+	NR	+	+	NR	NR	-	4/5 (80)
Dor óssea/dificuldade de deambulação	+	-	-	+	-	-	-	-	2/8 (25)
Câncer									
Osteossarcoma	-	-	-	-	-	-	-	-	0/8 (0)
Carcinoma basocelular/epinocelular em pele	-	-	-	-	-	-	-	-	0/8 (0)
Infecções respiratórias recorrentes	-	-	-	-	-	-	-	-	0/8 (0)
Vômitos/diarreia crônica	-	-	-	-	+	-	-	-	1/8 (12,5)
Desenvolvimento neuropsicomotor	NL	NL	Atraso	NL	NL	NL	Atraso	NL	Atraso 2/8 (25)
Dificuldade escolar	+								Escola para deficiente visual (Braille) 1/2 (50)
Outros achados	Cirurgia em joelhos - varismo		Doença neuromuscular	Cirurgia em joelhos – varismo; criptorquidia	Hipotireoidismo		Apêndice pré-auricular	Escoliose	

F: feminino; M: masculino; +: presença; -: ausência; NL: normal; ND: não disponível; NR: não realizado ou não avaliado; CIUR: Crescimento intrauterino restrito; PC: perímetro cefálico; DP: desvio padrão; E: esquerdo; GH: hormônio de crescimento; IGF1: *insulin-like growth factor*

Figura 13 - Lesão poiquilodérmica em pacientes SRT1 (A) e SRT4 (B,C): poiquiloderma típico em face (A), poiquiloderma generalizado, não poupando o tronco e abdome (B,C).

Figura 14 - Defeito do eixo radial nos pacientes SRT1 (A e B) e SRT2 (C): agenesia do rádio (A); agenesia do polegar (A e B); ulna encurvada (A); hipoplasia do polegar (C).

Figura 15 - Anomalias metafisárias nos pacientes SRT1 (A) e 4 (B): metáfises com fragmentação na porção medial da tíbia (A); metáfises alargadas, irregulares, com trabeculado grosseiro (B).

4.4 Sequenciamento do *RECQL4*

Foram encontradas durante a etapa do sequenciamento do *RECQL4*, três variantes patogênicas, que confirmam o diagnóstico de SRT em três dos oito pacientes analisados. Em uma paciente, duas mutações distintas foram identificadas (heterozigose composta): uma *frameshift*, causado pela deleção de dois pares de bases, e uma mutação *nonsense*, que gera um códon de parada prematuro no éxon 16. Em dois outros pacientes não aparentados, a mesma deleção intrônica de onze pares de bases localizada no íntron 8, foi identificada em homozigose. Todas as variantes encontradas já haviam sido descritas anteriormente na literatura. A Tabela 6 reúne os resultados dos sequenciamentos, e a Figura 16 ilustra as alterações encontradas em SRT1 e SRT3, exemplificando cada tipo de variante reportada.

Tabela 6 - Resultados dos sequenciamentos do gene *RECQL4*.

Paciente	Gene	Alteração (DNA/proteína)*		Referência
SRT1	<i>RECQL4</i>	c.2269C>T	p. (Gln757*)	Kitao et al. (1999)
		c.2547_2548delGT	p.(Phe850Profs*33)	Wang et al. (2003)
SRT2	<i>RECQL4</i>	c.1483+27del11	-	Balraj et al. (2002)
		(homozigose)	-	
SRT3	<i>RECQL4</i>	c.1483+27del11	-	Balraj et al. (2002)
		(homozigose)	-	
SRT4		Sem alterações patogênicas em <i>RECQL4</i>		
SRT5		Sem alterações patogênicas em <i>RECQL4</i>		
SRT6		Sem alterações patogênicas em <i>RECQL4</i>		
SRT7		Sem alterações patogênicas em <i>RECQL4</i>		
SRT8		Sem alterações patogênicas em <i>RECQL4</i>		

*Transcrito: NM_004260.3. Referência da descrição inicial na literatura.

(A)

(B)

(C)

Figura 16 - Imagens extraídas do *software Integrative Genomics Viewer (IGV)* (Estados Unidos), demonstrando as alterações encontradas nos pacientes SRT1 e SRT3. (A) Deleção de dois pares de bases no éxon 15, no paciente SRT1, causando uma mudança na matriz de leitura, sendo uma alteração em *frameshift*. (B) Troca de um par de base no éxon 14 (c.2269C>T), no mesmo paciente, gerando um códon de parada prematuro (mutação *nonsense*). (C) Deleção de onze pares de bases em homozigose do íntron 8, no paciente SRT3.

Na avaliação do probando SRT3, o painel utilizado para o estudo do gene *RECQL4* também incluía genes associados a distrofias musculares e miopatias. Foi identificado no probando, além da mutação em *RECQL4*, uma mutação *missense* (c.899T>C / p. Val300Ala) em homozigose no gene *FKRP*. Mutações neste gene estão associados a uma distrofia muscular tipo cinturas e essa mutação havia sido descrita previamente em uma família brasileira, cujos genitores eram primos de primeiro grau (DE PAULA et al., 2003). A probanda nesta família, falecida aos 33 anos por um quadro de pneumonia, começou a ter fraqueza muscular aos 14 anos, com elevação de CPK. Dois dos seus cinco irmãos, assintomáticos, também eram portadores da mesma mutação em homozigose.

Diante deste fato, a mutação no gene *FKRP* foi pesquisada utilizando o mesmo painel de genes e também identificada em homozigose no irmão de SRT3, que apresentava o quadro de miosite. Desta forma, o diagnóstico deste paciente é, de fato, uma distrofia muscular tipo cinturas. Além disso, pelo fato do paciente SRT3 apresentar um atraso motor e também apresentar a mutação em *FKRP*, a dosagem de CPK foi realizada e evidenciou níveis elevados. Em conclusão, o paciente SRT3 é afetado por duas doenças mendelianas autossômicas recessivas: a SRT e a distrofia muscular tipo cinturas.

4.5 Sequenciamento do Exoma Completo

Em três dos quatro pacientes típicos do grupo de SRT (SRT4, SRT5 e SRT6) que não apresentaram alterações patogênicas no *RECQL4* foi realizado o sequenciamento do exoma completo. Em um paciente (SRT6), incluiu-se, também, a análise do exoma dos pais.

Em uma primeira análise, foram pesquisadas mutações raras nos probandos em genes já associados a síndromes que também apresentam poiquiloderma, como *FAM111B* (poiquiloderma com contraturas de tendão, miopatia e fibrose pulmonar); *USB1* (poiquiloderma com neutropenia), *KIND1* (síndrome de Kindler); *ACD*, *DKC1*, *NOLA2*, *NOLA3*, *PARN*, *RTEL1*, *TERC*, *TERT*, *TINF2*, *WRAP53* (disqueratose congênita) e *ERCC4*, *DDB2*, *ERCC2*,

ERCC3, *ERCC5*, *XPA*, *XPC* (xeroderma pigmentoso). Nenhuma variante rara foi encontrada nesses genes, nos três indivíduos com a SRT tipo I.

Numa segunda etapa, investigou-se a presença de variantes em um gene único ainda não associado a síndromes com poiquiloderma, baseado na premissa de uma heterogeneidade genética lócica na SRT. A investigação do exoma em busca de novas variantes em genes que pudessem justificar o diagnóstico clínico dos pacientes, seguiu a metodologia e os critérios de qualidade apresentados anteriormente nesse trabalho.

Nos exomas dos três probandos foram encontradas e avaliadas 3.563 variantes raras em 1.249 genes. Explorou-se, mais profundamente, genes associados com os sinais clínicos apresentados pelos pacientes, comparando as variantes suspeitas entre os todos os pacientes sequenciados. Não foram encontradas alterações em um mesmo gene que pudesse explicar o fenótipo dos três indivíduos afetados.

Numa terceira etapa, foram analisadas as variantes raras obtidas no exoma de SRT6 e de seus genitores. Observou-se uma mutação em homozigose no gene *PI4KAP1* (sendo que apenas no pai ela estava presente em heterozigose), 11 mutações *de novo* em heterozigose, e oito variantes em heterozigose composta (quatro genes). A Tabela 7 reúne as mutações *de novo* encontradas na paciente, e a Tabela 8, as variantes em heterozigose composta.

Tabela 7 - Mutações *de novo* encontradas no paciente SRT6

Posição*	Referência	Alternativa	Região	Gene	Efeito	Alteração DNA	Alteração Proteína	Transcrito	Freq. EXAC (%)	ABRaOM	SIFT	PolyPhen2 (HDIV)	Mutation Taster	Zigossidade
1:203452694	C	T	exônica	<i>PRELP</i>	sin	c.C382T	p.L128L	NM_002725	0,03	1	NA	NA	NA	het
3:10183630	G	C	exônica	<i>VHL</i>	sin	c.G99C	p.S33S	NM_000551	0	0	NA	NA	NA	het
8:55540109	T	G	exônica	<i>RP1</i>	ns	c.T3667G	p.C1223G	NM_006269	0	0	D	D	N	het
9:100043896	A	G	ncRNA	<i>C9ORF174</i>	NA	NA	NA	NA	0	0	NA	NA	NA	het
9:140509557	C	T	exônica	<i>ARRDC1</i>	sin	c.C1269T	p.G423G	NM_152285	0,0009	1	NA	NA	NA	het
10:75893804	G	A	exônica	<i>AP3M1</i>	sin	c.C564T	p.D188D	NM_012095	0,08	0	NA	NA	NA	het
12:66839215	C	T	exônica	<i>GRIP1</i>	sin	c.G1272A	p.T424T	NM_001178074	0,02	0	NA	NA	NA	het
17:46679439	A	C	ncRNA; <i>splicing</i>	<i>HOXB-AS3</i>	NA	NA	NA	NA	0,08	0	NA	NA	NA	het
18:8784751	A	G	exônica	<i>MTCL1</i>	sin	c.A1641G	p.T547T	NM_015210	0,0008	0	NA	NA	NA	het
21:22707948	A	G	exônica	<i>NCAM2</i>	sin	c.A861G	p.A287A	NM_004540	0	0	NA	NA	NA	het
22:20398238	A	G	ncRNA	<i>PI4KAP1</i>	NA	NA	NA	NA	0	0	NA	NA	NA	hom
22:26997923	C	T	exônica	<i>CRYBB1</i>	sin	c.G495A	p.E165E	NM_001887	0	0	NA	NA	NA	het

*Genoma referência hg19. Frequências alélicas avaliadas nos bancos de dados EXAC completo e o número de alelos reportados no ABRaOM entre cerca de 1.200 alelos no banco. Abreviaturas: sin: sinônima; ns: não sinônima; NA: não aplicável; ncRNA: não codificante de RNA; het: heterozigoto; hom: homozigoto. Classificação SIFT - D: "*deleterious*" ou deletério; T: "*tolerated*" ou tolerado. Classificação Polyphen2 - D: "*probably damaging*" ou provavelmente danosa; P: "*possibly damaging*" ou possivelmente danosa; B: "*benign*" ou benigna. Classificação Mutation Taster - D: "*disease causing*" ou causador de doença; P: "*polymorphism*" ou polimorfismo.

Tabela 8 - Variantes raras em heterozigose composta encontradas no paciente SRT6

Posição*	Referência	Alternativa	Região	Gene	Efeito	Alteração DNA	Alteração Proteína	Transcrito	Freq. EXAC (%)	ABRaOM	SIFT	PolyPhen2 (HDIV)	Mutation Taster
2:232995439	T	G	exônica	<i>DIS3L2</i>	ns	c.T712G	p.Y238D	NM_001257282	0,41	2	D	B	P
2:233001357	C	A	exônica	<i>DIS3L2</i>	ns	c.C878A	p.P293H	NM_001257281	0,02	1	T	P	D
6:41895277	A	G	<i>splicing</i>	<i>BYSL</i>	NA	NA		NA	0,06	2	NA	NA	NA
6:41900300	G	C	exônica	<i>BYSL</i>	ns	c.G1170C	p.K390N	NM_004053	0	0	D	D	D
14:58814371	C	G	exônica	<i>ARID4A</i>	sin	c.C1179G	p.L393L	NM_002892	0,05	1	NA	NA	NA
14:58817906	A	T	exônica	<i>ARID4A</i>	ns	c.A1520T	p.Y507F	NM_002892	>0,01	1	T	B	P
20:2582839	T	A	exônica	<i>TMC2</i>	ns	c.T1305A	p.F435L	NM_080751	0,06	1	T	P	D
20:2593857	G	A	exônica	<i>TMC2</i>	sin	c.G1761A	p.T587T	NM_080751	0,07	1	NA	NA	NA

*Genoma referência hg19. Frequências alélicas avaliadas nos bancos de dados EXAC completo e o número de alelos reportados no ABRaOM entre cerca de 1.200 alelos no banco. Abreviaturas: sin: sinônimo; ns: não sinônimo; NA: não aplicável. Classificação SIFT - D: "*deleterious*" ou deletério; T: "*tolerated*" ou tolerado. Classificação Polyphen2 - D: "*probably damaging*" ou provavelmente danosa; P: "*possibly damaging*" ou possivelmente danosa; B: "*benign*" ou benigna. Classificação Mutation Taster - D: "*disease causing*" ou causador de doença; P: "*polymorphism*" ou polimorfismo.

Entre as mutações *de novo*, oito eram sinônimas e três estavam localizadas em genes não codificantes, ou seja, a princípio 11 não alteravam o aminoácido a ser incorporado na proteína. Apenas uma mutação *missense* estava em região exônica, alterando no gene *RP1* (c.T3667G / p.Cys1223Gly). Este gene atua em fotorreceptores e nele, mutações de perda de função estão associadas à retinose pigmentar em humanos.

Variantes raras estavam presentes no paciente em heterozigose composta nos genes *DIS3L2*, *BYSL*, *ARID4A* e *TMC2*. Nenhuma das variantes encontradas havia sido previamente reportada como patogênica nos bancos de dados utilizados, e nenhum dos genes continha, individualmente, dois alelos com alta probabilidade de serem patogênicos, segundo os algoritmos de predição *in silico*.

O gene *DIS3L2* está associado à síndrome de Perlman, uma doença autossômica recessiva, que entre outras alterações, leva a macrosomia e possui alta mortalidade neonatal (MORRIS; ASTUTI; MAHER, 2013).

Uma mutação provavelmente patogênica e outra em sítio de *splicing* foram encontradas no gene *BYSL*, que codifica uma proteína citoplasmática potencialmente envolvida com a implantação do embrião (AOKI et al., 2006).

Uma variante sinônima e uma *missense* foram encontradas no *ARID4A*. Esse gene codifica uma proteína que, como outras, liga-se à proteína do retinoblastoma (pRB). Modelos animais indicam que esse gene está associado à infertilidade masculina, ao *imprinting* genômico e à supressão de leucemia (WU et al., 2013).

Por fim, o gene *TMC2* continha uma variante sinônima e uma *missense*. Estudos em animais constataram que alterações no gene levam a perda de audição. Em humanos, o gene *TMC1*, que possui 57% de homologia com o *TMC2*, está associado a dois tipos de surdez hereditária (KURIMA et al., 2002).

5.1 Síndrome de Hutchinson-Gilford

A SHG ou progéria é uma doença monogênica com alterações fenotípicas bastante evidentes com o desenvolvimento da doença. Como descrito nesse estudo, o paciente com SHG apresentava um quadro clínico típico da doença, compatível com o relatado na literatura (Gordon, Brown et Collins, 2015).

Por ser uma síndrome rara e com múltiplas comorbidades, o paciente mantém o acompanhamento ambulatorial nas especialidades clínicas de genética, endocrinologia, cardiologia, nutrologia e odontologia. Em sua última avaliação, aos cinco anos e quatro meses de idade, ele ainda não apresentava sinais de aterosclerose.

A mutação encontrada no sequenciamento do gene *LMNA* (c.C1824T / p.Gly608Gly) é a principal e mais frequente alteração molecular encontrada em pacientes com progéria (POLLEX; HELEGE, 2004). Como já detalhado na introdução desse trabalho, essa alteração leva à formação de um *splice* alternativo, dentro do éxon 11 do gene, causando a deleção de 50 aminoácidos próximos do C terminal da prelamina A. Como consequência, o final da cascata bioquímica gera uma proteína anômala e tóxica para a célula chamada de progerina (POLLEX; HELEGE, 2004).

A relação entre o envelhecimento humano considerado normal e o envelhecimento prematuro apresentado na SHG vem sendo discutida desde a caracterização da síndrome. Estudos recentes demonstraram que células e tecidos humanos não afetados pela doença produzem pequenas quantidades de progerina, e que a proteína poderia estar relacionada ao processo de senescência e envelhecimento natural de organismos (CAO et al., 2011). Revêchon et al. (2017) demonstraram, inclusive, que mesmo em baixa quantidade, a expressão sustentada de progerina causa fibrose e lipodistrofia no tecido adiposo de animais, lesões presentes em pacientes com progéria e indivíduos idosos saudáveis. Outros estudos recentes também associaram a presença da proteína com o desenvolvimento e o envelhecimento de órgãos e tecidos humanos (GITTEMBERGER-DE GROOT et al. 2016; ROGOWSKI-

TYLMAN et al. 2016). Presume-se que o mecanismo fisiopatológico que associe o envelhecimento com a progerina envolva um maior dano ao DNA e uma diminuição em seu mecanismo reparo (NODA et al., 2015).

Assim como para praticamente todas as doenças monogênicas, atualmente não existe cura para a SHG. No entanto, uma variedade de abordagens medicamentosas vem sendo propostas e aplicadas para retardar o desenvolvimento da doença como inibidores da farnesiltransferase, a combinação de estatinas e aminobifosfonatos, e o macrolídio rapamicina (BLONDEL et al, 2014). Esses medicamentos são caros e podem causar efeitos colaterais importantes nos pacientes (HAZAN-MOLINA et DROR, 2015). Estudos *in vitro* recentes demonstraram, também, que o antidiabético metformina, uma droga de baixo custo e com poucos efeitos colaterais, melhora os danos celulares causados pela progerina, apresentando-se como uma potencial opção no tratamento dos afetados (EGESIPE et al, 2016; PARK; SHIN, 2016).

É válido ressaltar, que a rapamicina e a metformina vêm sendo estudadas, também, por estenderem o tempo de vida em animais, inclusive retardando o processo de envelhecimento biológico (HARRISON et al, 2009; ANISIMOV et al., 2011; MARTIN-MONTALVO et al., 2013; CABREIRO et al., 2013). A transposição desses estudos para a espécie humana é bastante complicada, metodologicamente e eticamente. Porém, em estudo retrospectivo analisando uma coorte de 180.926 indivíduos, Bannister e al. (2014) concluíram que pacientes diabéticos tipo 2 que faziam uso de metformina viveram em média mais tempo – morrendo em idades mais avançadas – que os indivíduos controle não diabéticos e que os indivíduos diabéticos que faziam uso de outro tratamento.

5.2 Síndrome de Rothmund-Thomson

5.2.1 Achados clínicos da síndrome

A SRT é uma doença monogênica rara, descrita em diferentes grupos étnicos. Na literatura, não há concordância quanto a uma predileção por um determinado gênero. Alguns trabalhos mostraram uma prevalência igual entre os gêneros, enquanto outros, predomínio do gênero masculino ou feminino (LARIZZA; ROVERSI; VOLPI, 2010). Na casuística estudada, houve um ligeiro predomínio de afetados do gênero feminino (1,6F:1M).

Os achados clínicos mais frequentes observados no presente estudo foram: déficit pôndero-estatural (87,5%); presença de fronte ampla (87,5%); eritema facial (100%); poiquiloderma (87,5%); fotossensibilidade (87,5%); cabelos, sobrancelhas e/ou cílios esparsos (75%); e anomalias esqueléticas, como alterações metafisárias nos ossos longos (66,6%) e braquimetafalangia (80%).

No presente estudo, não foram relatadas alterações frequentes no período gestacional e a grande maioria dos pacientes (75%) nasceu a termo, sem intercorrências no período neonatal. Por outro lado, peso ou comprimento abaixo do percentil 10 foi observado em 5/8 indivíduos (62,5%), indicando que o comprometimento do crescimento é, muitas vezes, de origem pré-natal. O déficit pôndero-estatural se intensifica no decorrer dos primeiros meses e anos de vida das crianças. Na literatura, um peso baixo ao nascimento, com baixo ganho pôndero-estatural na evolução está presente em cerca de 75% dos indivíduos afetados pela SRT (WANG et al., 2001). A análise bioquímica referente aos níveis do hormônio de crescimento (GH) e seus efetores muitas vezes é normal, embora uma deficiência de GH tenha sido descrita em alguns pacientes (LARIZZA; ROVERSI; VOLPI, 2010). No presente estudo, um paciente apresentava níveis séricos de GH e IGF1 baixos, enquanto em outro, o teste de estimulação do GH com clonidina foi normal. Um único paciente iniciou o uso terapêutico de GH com boa resposta. Não há relatos na presente casuística de vômitos/diarreias crônicas, ou mesmo infecções de repetição que pudessem

contribuir para o déficit pôndero-estatural destes pacientes, achados descritos na literatura (LARIZZA; ROVERSI; VOLPI, 2010).

A característica clínica mais prevalente e típica na SRT é a lesão cutânea, a qual foi considerada como único critério clínico diagnóstico, desde que apresentando a forma clássica de distribuição, idade de aparecimento e evolução (WANG et al., 2001). Dos oito pacientes aqui estudados, sete (87,5%) apresentavam a lesão cutânea típica da síndrome, preenchendo o critério clínico para o diagnóstico definitivo da SRT. O paciente com lesão cutânea atípica, apresentava, associado a este quadro, um peso e estatura abaixo da média para a idade e uma anomalia do eixo radial, preenchendo os critérios para um diagnóstico provável da SRT (WANG et al., 2001). O *rash* cutâneo tende a aparecer entre três e seis meses de idade, como um eritema acompanhado de edema e bolhas na região da face, que posteriormente se espalha para acometer a região glútea e os membros, inicialmente a região extensora e depois a flexora das extremidades. Em geral, o tronco e o abdome são poupados (LARIZZA; ROVERSI; VOLPI, 2010). Essas lesões se cronificam, levando ao aspecto característico do poiquiloderma. No presente estudo, em quatro pacientes a lesão poiquilodérmica era generalizada, acometendo o tronco e a região abdominal. Outra anomalia de pigmentação descrita de forma mais rara e de aparecimento mais tardio na SRT são as manchas café com leite, assim denominadas por sua coloração característica (LARIZZA; ROVERSI; VOLPI, 2010). Um único paciente neste estudo apresentava diversas manchas café com leite, já observadas aos 2 anos e 10 meses de idade.

Outros achados ectodérmicos observados nesse estudo incluem a escassa pilificação e a displasia ungueal. Cabelos, sobrancelhas e/ou cílios esparsos foram achados comuns, compatíveis com os dados observados na literatura. A presença de poucos pelos pode ser generalizada e envolver também os pelos que aparecem normalmente durante a puberdade, como a presença de barba e pelos nas regiões axilares e região púbica (WANG et al., 2001; LARIZZA; ROVERSI; VOLPI, 2010). Como a casuística deste estudo é composta por crianças jovens, esses últimos achados não puderam ser avaliados.

Diversas anomalias esqueléticas foram descritas na SRT. Mehollin-Ray et al. (2008) avaliaram anomalias ósseas realizando uma radiografia completa de esqueleto em 28 indivíduos com a SRT e encontraram alterações em 21 deles

(75%). As alterações mais comuns foram: anormalidade do trabeculado ósseo nas metáfises (64%); braquimetafalangia, especialmente do 2º e 5º dedos (64%); agenesia ou hipoplasia dos polegares ou dos 1ºs metacarpos (43%); osteopenia (25%); luxação da cabeça do rádio (21%); sinostose radioulnar (18%); e hipoplasia ulnar ou encurvamento da ulna (18%). Outros achados incluíram anomalias na patela (agenesia/hipoplasia e presença de múltiplos centros de ossificação). No presente estudo, semelhante ao descrito por Mehollin-Ray et al. (2008), as duas alterações mais comuns observadas foram as alterações metafisárias dos ossos longos e a braquimetafalangia. É importante ressaltar que nos dois pacientes mais velhos da casuística, com idades de 14 anos e 4 meses e 11 anos e 8 meses, foram observadas dor óssea e dificuldade de deambulação. Além disso, ambos necessitaram de correção cirúrgica do varismo em membros inferiores, provavelmente secundário às alterações metafisárias.

Dentre os achados oftalmológicos, a catarata subcapsular é a mais característica, em geral de progressão rápida e de aparecimento nos primeiros anos de vida. Outros achados incluem anomalias na pressão intraocular (glaucoma), anomalias da câmara anterior (anomalias na córnea, disgenesia da íris), fotofobia e anomalias retinianas (LARIZZA; ROVERSI; VOLPI, 2010). No presente estudo, catarata subcapsular estava presente em quatro dos oito indivíduos estudados, com aparecimento que variou desde o nascimento até os 2 anos de idade. Três destes indivíduos também apresentavam glaucoma. O indivíduo com 11 anos e 8 meses evoluiu para cegueira, sendo educado em escola especial para indivíduos com déficit visual (treinamento de leitura em Braille).

A SRT é considerada uma síndrome de predisposição ao desenvolvimento de neoplasias malignas, particularmente osteossarcoma e câncer de pele, cuja média de idade de aparecimento é de 14 anos e 34,4 anos, respectivamente. A prevalência do osteossarcoma em pacientes com a síndrome é de 30%, e do câncer de pele, 5%. A casuística estudada foi composta de pacientes jovens, com mediana de 2,2 anos, ainda em risco de desenvolver algum desses tipos de câncer.

O desenvolvimento neuropsicomotor e cognitivo nos pacientes com a SRT tendem a ser normais. Raramente há pacientes com deficiência intelectual (VENNOS; COLLINS; JAMES, 1992). Nesse trabalho, dois indivíduos têm

apresentado atraso motor. Em um deles (SRT3), este comprometimento pode ser decorrente de outra doença autossômica recessiva, uma distrofia muscular, concomitante.

5.2.2 Aspectos moleculares na síndrome de Rothmund-Thomson

No presente estudo, mutações no gene *RECQL4* estavam presentes em três dos indivíduos (37,5%). Esta positividade aumenta para 43% caso seja excluído o paciente com o *rash* cutâneo atípico e, portanto, com diagnóstico provável e não definitivo da SRT, de acordo com os critérios de Wang et al. (2001). Esta positividade está de acordo com os dados da literatura, mostrando uma positividade que varia entre 40 e 60% (SUTER et al., 2016; PIARD et al., 2015; SIITONEN et al., 2009; CABRAL et al., 2008). A Figura 17 mostra a posição das variantes encontradas no gene.

Figura 17 - Variantes encontradas no presente estudo. Adaptado de Larizza, Roversi e Volpi. (2010).

Todas as mutações identificadas nos pacientes analisados já haviam sido descritas previamente. A mutação c.2269C>T / p.(Gln757*) é descrita em diferentes populações e é a mutação recorrente mais frequente nos pacientes com SRT (OMIM). As outras duas mutações incluem uma mutação tipo *frameshift* e uma deleção de 11 pares de base intrônica. As mutações mais comumente descritas em pacientes com a SRT são mutações *nonsense* e *frameshift* (LARIZZA; ROVERSI; VOLPI, 2010).

No entanto, algumas deleções intrônicas entre 11 e 25 pares de bases foram identificadas como patogênicas para a síndrome (LARIZZA; ROVERSI; VOLPI, 2010). A primeira descrição da deleção encontrada nos pacientes SRT2 e SRT3 foi reportada por Balraj et al. (2002) em uma família malaia. A patogenicidade dessas variantes decorre do fato de que, ao contrário da maioria dos genes humanos, o *RECQL4* possuir íntrons curtos, sendo 13 menores que 100 pares de bases (WANG et al., 2002). Sabe-se que íntrons excessivamente pequenos, menores que cerca de 80 pares de bases, impossibilitam a formação correta do *splicing*, o que foi demonstrado por Wang et al. (2002) em um caso de SRT.

Essas deleções estavam presentes em homozigose nos pacientes SRT2 e SRT3: um deles apresentava consanguinidade entre seus genitores (SRT3) e o outro, apesar de seus pais negarem consanguinidade, eram provenientes de uma cidade pequena no Nordeste do Brasil, o que poderia sugerir um parentesco mais distante entre eles.

Suter et al. (2016) enfatizaram que a identificação e caracterização das mutações em *RECQL4* são importantes para definir melhor o risco do desenvolvimento de câncer, evitar avaliações clínicas e laboratoriais extensivas, além de permitir estabelecer o risco de recorrência na futura prole dos genitores de uma criança afetada pela SRT.

Na literatura, a comparação da frequência entre as características clínicas presentes no grupo de pacientes com mutação em *RECQL4* e no grupo sem mutações neste gene, permitiu estabelecer algumas associações entre o genótipo e o fenótipo. Até o presente, pacientes com mutações em *RECQL4* não apresentaram catarata subcapsular. Por outro lado, neoplasias malignas, especialmente o osteossarcoma, ocorrem em pacientes com mutações neste gene (ZHANG et al., 2016; SUTER et al., 2016; PIARD et al., 2015; FRADIN et al., 2013; SIMON et al., 2010; SIITONEN et al., 2009; CABRAL et al., 2008; SZNAJER et al., 2006; KELLERMAYER et al., 2005; BEGHINI et al., 2003). Mehollin-Ray et al. (2008) avaliando as anomalias esqueléticas em pacientes com SRT observaram que essas estavam presentes em todos os dezoito pacientes com mutação em *RECQL4* e em apenas três dos dez sem mutação. Esta diferença foi estatisticamente significativa.

Desta forma, pode-se classificar a presente casuística em dois grupos: SRT tipo II, aqueles com poiquiloderma e defeitos esqueléticos decorrentes de mutações encontradas no gene *RECQL4* (pacientes SRT1, SRT2 e SRT3) e SRT tipo I, aqueles com poiquiloderma e catarata juvenil, sem mutações identificadas no *RECQL4* (pacientes SRT4, SRT5, SRT6 e SRT7) (Wang et al., 2003).

A Tabela 9 reúne a incidência de diferentes características clínicas em pacientes de SRT com variantes patogênicas em *RECQL4*.

Tabela 9 - Compilado dos achados clínicos de 39 pacientes reportados na literatura com mutação para SRT (continua)

Dados clínicos	Zhang et al. (2016)	Suter et al. (2016)	Piard et al. (2015)	Fradin et al. (2013)	Siitonen et al. (2009)	Simon et al. (2010)	Cabral et al. (2008)	Sznajer et al. (2006)	Kellermayer et al. (2005)	Beghini et al. (2003)	Total (%)
Nº de casos com mutação (Total de casos com SRT)	1 (1)	13* (44)	10 (27)	1 (1)	16** (33)	1 (1)	5*** (6)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	39 (100)
Gênero	1F	6F/6M	7F/3M	1M	3F/3M	1M	2F/3M	1M	1M	1M	19 (49) F 20 (51) M
Idade (anos)	5	1,5-39	1,3-21	21	3,5-14	21	8-18	7	9	18	
Dados antropométricos											
BP ao nascimento	ND	4/12	ND	1/1	ND	ND	ND	1/1	1/1	1/1	8/16 (50)
Deficiência de crescimento, microsomia	1/1	8/12	8/10	1/1	5/6	ND	1/5	1/1	1/1	ND	25/37 (68)
Pele e fâneros											
Rash em face, mãos ou pernas	1/1	5/12	ND	ND	ND	ND	ND	1/1	1/1	1/1	9/16 (56)
Poiquiloderma	1/1	9/12	10/10	1/1	6/6	1/1	5/5	1/1	1/1	1/1	36/39 (92)
Fotossensibilidade	ND	2/12	ND	ND	ND	ND	2/5	0/1	1/1	ND	5/19 (26)
Manchas café com leite	ND	2/12	ND	ND	1/6	ND	ND	1/1	ND	ND	4/19 (21)
Alopecia ou cabelos esparsos	ND	4/12	2/10	1/1	3/6	1/1	ND	1/1	1/1	1/1	14/33 (42)
Sobrancelhas/cílios esparsos ou ausentes	ND	6/12	8/9	1/1	3/6	1/1	1/5	1/1	1/1	1/1	22/37 (60)
Unhas distróficas	ND	2/12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2/12 (17)
Anomalias dentárias	ND	3/12	2/7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5/19 (26)
Anomalias oculares											
Coloboma de pálpebra	ND	1/12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1/12 (8)
Catarata	ND	ND	0/10	ND	ND	ND	ND	0/1	ND	0/1	0/11 (0)
Anomalias esqueléticas											
Ponte nasal deprimida	ND	3/12	ND	0/1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3/13 (23)

Tabela 9 - Compilado dos achados clínicos de 39 pacientes reportados na literatura com mutação para SRT (conclusão)

Anomalias em ossos longos	ND	5/12	ND	ND	ND	ND	ND	1/1	ND	ND	6/13 (46)
Ausência/Alterações em polegares	ND	4/12	4/10	1/1	5/6	ND	ND	0/1	1/1	1/1	16/32 (50)
Outras alterações em eixo radial	ND	ND	3/10	ND	5/6	ND	ND	1/1	1/1	1/1	11/19 (58)
Osteopenia/osteoporose	ND	2/12	ND	ND	3/6	ND	ND	ND	1/1	ND	6/19 (32)
Dor articular	ND	1/12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1/12 (8)
Ausência/Hipoplasia de patela	ND	ND	2/5	ND	5/6	ND	ND	1/1	1/1	1/1	10/14 (71)
Trato gastrointestinal											
Diarreia crônica/intermitente	ND	3/12	1/7	1/1	5/6	ND	ND	1/1	1/1	ND	12/28 (43)
Desenvolvimento neuropsicomotor											
Atraso de desenvolvimento/deficiência intelectual	1/1	2/12	0/10	0/1	ND	1/1	ND	0/1	0/1	ND	4/27 (15)
Atraso do início da fala	ND	3/12	ND	ND	ND	ND	ND	0/1	ND	ND	3/13 (23)
Câncer											
Carcinoma de célula escamosas ou basais	ND	1/12	0/10	0/1	ND	ND	ND	0/1	ND	1/1	2/25 (8)
Osteossarcoma	ND	1/12	0/10	0/1	0/6	1/1	1/5	0/1	ND	0/1	3/27 (11)

Legenda: *12 dos 13 casos possuíam descrição clínica. **seis dos 16 casos tinham diagnóstico clínico de SRT. ***dois dos probandos eram irmãos. F: feminino; M: masculino; ND: não descrito no trabalho; BP: baixo peso. Quantidade de pacientes que apresentavam o fenótipo/total de pacientes avaliados para cada fenótipo.

Na comparação entre os tipos I e II da casuística de SRT estudada (Tabela 10), observou-se que a única característica com diferença estatisticamente significativa entre os grupos, foi a presença da catarata subcapsular. Essa lesão foi observada em todos os pacientes sem mutação e em nenhum paciente com mutação, o que também é relatado na literatura (Tabela 9). O tamanho da amostra estudada impede uma análise estatística mais elaborada, mas vale a pena ressaltar que algumas características clínicas estavam presentes com maior intensidade no grupo de pacientes sem mutação no *RECQL4*, como a presença de um poiquiloderma mais generalizado e um Z-score de peso e estatura para idade mais comprometido. Desta forma, observou-se uma variação do Z-score de peso para idade no grupo II entre -1.54 e -2.73, enquanto no grupo I, entre -2.99 a -6.23. Da mesma forma, a variação do Z-score da estatura para a idade foi de -2.18 a -3.82 para o grupo II, e de -6.47 a -11.28, para o grupo I.

Tabela 10 - Comparação das principais características clínicas entre o grupo de pacientes com mutação no gene *RECQL4* (SRT tipo II) e o grupo de pacientes sem mutação no gene *RECQL4* (SRT tipo I)

Características clínicas	SRT tipo II	SRT tipo I	Valor de P
Baixa estatura	3/3	4/4	1.0000
Baixo peso	2/3	4/4	0.4286
Rash cutâneo/poiquiloderma	3/3	4/4	1.0000
Cabelos/sobrancelhas e/ou cílios esparsos	2/3	4/4	0.4286
Catarata	0/3	4/4	0.0286*
Defeito do eixo radial	2/3	0/4	0.1429
Alterações metafisárias	2/3	2/2	1.0000
Braquimetafalangia	2/3	2/2	1.0000

* significante $p < 0,05$.

Pesquisadores ainda desconhecem o mecanismo molecular presente no tipo I da SRT. Não são incomuns, também, casos da síndrome em que um só alelo alterado é encontrado (LARIZZA; ROVERSI; VOLPI, 2010). Questiona-se, assim, se as diferenças clínicas entre os grupos I e II poderão, no futuro, ser justificadas como resultante de alterações em genes distintos, caracterizando, por fim, duas síndromes diferentes. Outro cenário, seria o que as alterações genéticas que ocasionam a SRT tipo I estariam localizadas em regiões promotoras ou reguladoras do *RECQL4*, não podendo, dessa forma, serem detectadas no sequenciamento do gene ou do exoma.

Não há nenhuma descrição na literatura associando a técnica de sequenciamento do exoma completo com a SRT. No entanto, esta técnica foi a utilizada para a descoberta de dois genes responsáveis por síndromes que também apresentam poiquiloderma e que fazem parte do diagnóstico diferencial da SRT: a síndrome do poiquiloderma com neutropenia, tipo Clericuzio, causada por variantes bialélicas no gene *USB1* e a síndrome do poiquiloderma fibrosante hereditário com contraturas articulares e fibrose pulmonar, decorrente de mutações em heterozigose no gene *FAM111B* (VOLPI et al., 2010; MERCIER et al., 2013).

No presente estudo, foram avaliados três pacientes negativos com diagnóstico da SRT tipo I na tentativa de se identificar o gene responsável pelo fenótipo destes indivíduos. Nas análises dos exomas realizados, afastou-se a presença de variantes em genes reconhecidamente associados a fenótipos com lesões cutâneas poiquilodérmicas ou semelhantes, constituindo os diagnósticos diferenciais da SRT. Além disso, o estudo conjunto dos três pacientes sem mutação, na tentativa de se identificar variantes em um único gene, e a realização do exoma em um probando e seus genitores não foram frutíferas.

Foram avaliadas variantes em homozigose, heterozigose composta e mutações *de novo*. Destas últimas, a maioria era sinônima, mas uma delas merece destaque, a mutação no gene *CRYBB1* (NM_001887 / c.G495A / p.Glu165Glu). Essa alteração não estava presente em nenhum dos bancos de dados de frequência populacional utilizados e esse gene codifica a proteína beta-cristalina B1, importante para o desenvolvimento e manutenção do cristalino humano. Pode-se especular que mutações nesse gene possam levar ao

desenvolvimento da catarata observada no probando. No entanto, não é possível explicar todo o quadro clínico apresentado pelo paciente.

A única mutação em região exônica encontrada foi a variante (c.T3667G / p.Cys1223Gly) no gene *RP1*. Mutações de perda de função neste gene estão associadas a um quadro ocular retiniano. Como a mutação é *missense*, não há como prever com precisão seu efeito na proteína.

Um fato a se destacar, é a presença no gene *PI4KAP1* de uma mutação em homozigose, sendo que somente seu pai possuía a mesma alteração em heterozigose. Embora a grande maioria das mutações *de novo* consideradas patogênicas esteja associada a um fenótipo com padrão de herança dominante, há alguns raros exemplos de ocorrência de patogenicidade em doenças autossômicas recessivas, combinando uma variante herdada de um dos genitores com um evento *de novo*, no mesmo *locus* (ACUNA-HIDALGO; VELTMAN; HOISCHEN, 2016).

Dos genes nos quais foram encontradas mutações em heterozigose composta, apenas um destes genes havia sido claramente associado a um fenótipo mendeliano, o gene *DIS3L2*, responsável pela síndrome de Perlman. De forma semelhante ao observado no gene *RP1*, aqui as mutações encontradas em pacientes com Perlman também são de perda de função. Os outros três genes apresentam funções mais específicas, como implantação do embrião, infertilidade e surdez. Desta forma, as análises realizadas não permitiram identificar um gene candidato cuja função conhecida, até o presente, pudesse explicar de forma completa o fenótipo da SRT tipo I.

O fato de não terem sido encontradas variantes nas regiões codificadoras em um outro gene, que pudesse justificar o quadro clínico dos pacientes sem mutação em *RECQL4*, reforça a possibilidade de que as alterações genéticas desses casos estejam presentes em regiões intrônicas ou regulatórias, não avaliadas pela limitação da técnica utilizada. O fato deste gene apresentar uma conformação com íntrons pequenos, conforme observa-se na Figura 18, com uma cobertura abrangente de várias dessas regiões pela técnica de NGS, torna pouco provável que alterações nos íntrons sejam responsáveis pelos casos de

esclarecer a causa da doença, dando possibilidade à família envolvida de entender e aceitar a doença do seu filho, além de eliminar o sentimento de culpa que pode ocorrer em decorrência da falta de um diagnóstico certo (JAMUAR; TAN, 2015). No caso das doenças progeróides aqui avaliadas, a confirmação diagnóstica muda o manejo médico destes indivíduos.

O aconselhamento do paciente com SHG foi realizado na consulta seguinte à confirmação da mutação no gene *LMNA*. Durante o atendimento, foram abordados os pontos principais relacionados à síndrome, buscando esclarecer todas as dúvidas com empatia e clareza. Devido ao seu padrão de herança autossômico dominante, e considerando que os casos relatados na literatura eram resultado de mutação de novo, foi atribuído um risco baixo de recorrência. Estima-se que casos de recorrência possam ocorrer por mosaicismismo gonadal, com risco de 0,2% (GORDON; BROWN; COLLINS, 2015). Deixou-se claro, dessa maneira, que a doença não foi herdada de nenhum dos progenitores, eximindo o sentimento de culpa que pudesse ser gerado pela condição.

Apesar de ser uma doença rara, com poucos casos descritos na literatura, a SHG apresenta um prognóstico pouco esperançoso. Com sobrevida média aproximada de 14 anos, avaliações periódicas com atenção a complicações cardiovasculares são recomendadas, uma vez que os pacientes podem evoluir com uma aterosclerose progressiva e grave, podendo levar a isquemia miocárdica, infarto e acidentes vasculares cerebrais, com óbito precoce. Diferente da aterosclerose observada no envelhecimento normal dos indivíduos, na progeria não há elevação dos níveis séricos de colesterol (GONZALO et al., 2017). No entanto, como já discutido anteriormente, foi explicado aos progenitores que alguns medicamentos que prolongam e melhoram a vida dos afetados já estão sendo comercializados. Além disso, diversos outros tratamentos estão sendo pesquisados em diferentes estágios de desenvolvimento. Essas informações não são de fácil acesso à população geral, mas são importantíssimas para pacientes e familiares de doenças incuráveis.

Em relação à casuística de pacientes com SRT, o fato do diagnóstico ser clínico permitiu realizar um aconselhamento genético desde o início, assim que fechado o diagnóstico. Tanto o tipo I quanto o tipo II da doença apresentam

padrão de herança autossômico recessivo, sendo assim, foi explicado aos progenitores que havia um risco de recorrência próximo a 25% (WANG; PLON, 2016).

Como existem algumas diferenças em relação ao prognóstico dos dois tipos da síndrome, houve uma segunda etapa do aconselhamento após os resultados do sequenciamento do *RECQL4* e do exoma. Em todos os casos, deixou-se claro a importância do acompanhamento e os cuidados necessários para monitoramento de tumores e outras complicações associadas.

A confirmação de mutações no gene *RECQL4* está associada a um risco aumentado para o desenvolvimento de neoplasias malignas, especialmente o osteossarcoma. Na casuística desse trabalho, três indivíduos apresentam mutações neste gene. Wang et al. (2003) realizaram análise molecular do gene *RECQL4* em 33 indivíduos com SRT provenientes de 29 famílias, sendo 11 pacientes com osteossarcoma. Na comparação entre os afetados que desenvolviam tumores ósseos com aqueles que não desenvolviam, os autores observaram que em todos os indivíduos com osteossarcoma havia pelo menos uma mutação que gerava uma proteína truncada. Isso parece indicar que mutações desse tipo estão associadas a um risco aumentado para o desenvolvimento de osteossarcoma. Os três pacientes com mutações identificadas nessa pesquisa apresentam mutações que levam à produção de uma proteína truncada: uma mutação *nonsense*, uma *frameshift* e uma deleção intrônica com alteração de *splicing*. Além disso, no paciente SRT3, o tio paterno, também com quadro clínico da doença, desenvolveu osteossarcoma durante a vida adulta. Desta forma, todos os pacientes com SRT tipo II, com mutações identificadas em *RECQL4*, estão sendo acompanhados segundo as orientações sugeridas por Wang et al. (2001): sendo orientados a procurar atendimento médico especializado, caso desenvolvam dor óssea ou sinais como edema ou aumento local em membros; e a realizar um estudo radiológico dos ossos longos aos cinco anos de idade, para ser usado como comparação caso apareça alguma lesão durante a evolução.

Nos pacientes de SRT tipo I, em que não foram encontradas mutações em *RECQL4*, houve um cuidado no esclarecimento de que, mesmo não tendo sido encontradas variantes patogênicas que explicassem o quadro, o diagnóstico

da doença é clínico, e por isso, o risco de recorrência e os cuidados com o acompanhamento dos pacientes continuam sendo fundamentais. Explicou-se que há pesquisadores no mundo inteiro procurando compreender melhor as causas da síndrome, e que as variantes causadoras da doença poderiam ser descobertas em um futuro próximo.

Durante toda a pesquisa e o acompanhamento dos pacientes estudados, a importância do aconselhamento genético ficou ainda mais nítida, demonstrando-se como parte fundamental do cuidado ao paciente com doença genética.

- Foram encontradas quatro variantes patogênicas em quatro pacientes com síndromes progeróides.
- A variante c.1824C>T (p.Gly608Gly) no gene *LMNA*, confirmou o diagnóstico clínico do paciente com SHG, sendo a variante mais comum associada à doença.
- Foram reportadas três variantes em *RECQL4* em três pacientes com SRT, sendo dois casos em homozigose e um em heterozigose composta. Isso representa 37,5% dos casos avaliados, ou 42,9% dos pacientes com diagnóstico clínico definitivo de SRT, prevalência semelhante a da literatura, que varia de 40 a 60%.
- Todas as alterações reportadas em *RECQL4* levam a produção de uma proteína truncada, sendo uma *frameshift*, uma *nonsense* e uma intrônica que impossibilita o *splicing* correto.
- Todas as variantes patogênicas associadas a quadros progeróides encontradas na pesquisa, já haviam sido descritas anteriormente na literatura.
- A separação da casuística entre os tipos I e II da SRT demonstrou a presença exclusiva de catarata subcapsular em pacientes sem mutação em *RECQL4*. Essa diferença foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) e está de acordo com os dados da literatura.
- Não foi possível identificar a base molecular dos pacientes com SRT tipo I, sem mutações no gene *RECQL4*.
- Os resultados dos testes moleculares, em conjunto com a avaliação clínica, permitiram o aconselhamento genético dos pacientes.

REFERÊNCIAS

ACUNA-HIDALGO, Rocio; VELTMAN, Joris A.; HOISCHEN, Alexander. New insights into the generation and role of de novo mutations in health and disease. **Genome biology**, v. 17, n. 1, p. 241, 2016.

ANISIMOV, Vladimir N. et al. Rapamycin increases lifespan and inhibits spontaneous tumorigenesis in inbred female mice. **Cell cycle**, v. 10, n. 24, p. 4230-4236, 2011.

ANNOVAR. Disponível em <<http://www.openbioinformatics.org/annovar/>>. Acesso em 01 ago. 2017.

AOKI, Rui et al. The Bysl gene product, bystin, is essential for survival of mouse embryos. **FEBS letters**, v. 580, n. 26, p. 6062-6068, 2006.

BALRAJ, Pauline et al. An unusual mutation in RECQ4 gene leading to Rothmund–Thomson syndrome. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 508, n. 1, p. 99-105, 2002.

BANNISTER, CA et al. Can people with type 2 diabetes live longer than those without? A comparison of mortality in people initiated with metformin or sulphonylurea monotherapy and matched, non-diabetic controls. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 16, n. 11, p. 1165-1173, 2014.

BECKMANN N. Multiple Low Energy Long Bone Fractures in the Setting of Rothmund-Thomson Syndrome. **Case Reports in Medicine**, p. 1-8, 2015.

BEGHINI, Alessandro et al. RNA processing defects of the helicase gene RECQL4 in a compound heterozygous Rothmund–Thomson patient. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 120, n. 3, p. 395-399, 2003.

BERTOLA, Debora R. et al. Cockayne syndrome type A: novel mutations in eight typical patients. **Journal of human genetics**, v. 51, n. 8, p. 701-705, 2006.

BLONDEL, Sophie et al. Induced Pluripotent Stem Cells Reveal Functional Differences Between Drugs Currently Investigated in Patients With Hutchinson-

Gilford Progeria Syndrome. **Stem cells translational medicine**, v. 3, n. 4, p. 510-519, 2014.

BONAFE, Luisa et al. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2015 revision. **American journal of medical genetics Part A**, v. 167, n. 12, p. 2869-2892, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 199, de 30 de janeiro de 2014. Institui a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras, aprova as Diretrizes para Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) e institui incentivos financeiros de custeio. Disponível:

<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/prt0199_30_01_2014.html>. Acesso em 01 de ago. 2017.

BROAD INSTITUTE. Exome Aggregation Consortium (ExAC). Disponível em <<http://exac.broadinstitute.org/>>. Acesso em 01 ago. 2017.

BROAD INSTITUTE. Genome Analysis Toolkit package (GATK). Disponível em <<https://www.broadinstitute.org/gatk/>>. Acesso em 01 ago. 2017.

BROAD INSTITUTE. Picard. Disponível em <<http://broadinstitute.github.io/picard/>>. Acesso em 01 ago. 2017.

BURROWS-WHEELER ALIGNER (BWA). Disponível em <<http://bio-bwa.sourceforge.net>>. Acesso em 01 ago. 2017.

CABANILLAS, Rubén et al. Néstor–Guillermo progeria syndrome: a novel premature aging condition with early onset and chronic development caused by BANF1 mutations. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 155, n. 11, p. 2617-2625, 2011.

CABRAL, Rosa Estela Caseira et al. Identification of new RECQL4 mutations in Caucasian Rothmund–Thomson patients and analysis of sensitivity to a wide range of genotoxic agents. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 643, n. 1, p. 41-47, 2008.

CABREIRO, Filipe et al. Metformin retards aging in *C. elegans* by altering microbial folate and methionine metabolism. **Cell**, v. 153, n. 1, p. 228-239, 2013.

CAO, Kan et al. Progerin and telomere dysfunction collaborate to trigger cellular senescence in normal human fibroblasts. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 7, p. 2833, 2011.

CLEAVER, James E.; LAM, Ernest T.; REVET, Ingrid. Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. **Nature reviews. Genetics**, v. 10, n. 11, p. 756, 2009.

COLOMBO, Elisa Adele et al. Novel physiological RECQL4 alternative transcript disclosed by molecular characterisation of Rothmund–Thomson Syndrome sibs with mild phenotype. **European Journal of Human Genetics**, v. 22, n. 11, p. 1298, 2014.

CRAM. Rothmund-Thomson Syndrome. 2010. Disponível em <<http://www.cram.com/flashcards/rothmund-thomson-syndrome-1445109>>. Acesso em 30 jul. 2017.

DE PAULA, Flavia et al. Asymptomatic carriers for homozygous novel mutations in the FKR1P gene: the other end of the spectrum. **European journal of human genetics: EJHG**, v. 11, n. 12, p. 923, 2003.

EGESIPE, Anne-Laure et al. Metformin decreases progerin expression and alleviates pathological defects of Hutchinson–Gilford progeria syndrome cells. **Aging and Mechanisms of Disease**, v. 2, p. 16026, 2016.

FRADIN, M. et al. Long-term follow-up and molecular characterization of a patient with a RECQL4 mutation spectrum disorder. **Dermatology**, v. 226, n. 4, p. 353-357, 2013.

GENEREVIEWS. Genomic View for *LMNA* gene. Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LMNA>>. Acesso em: 4 set. 2016.

GENEREVIEWS. Genomic View for *RECQL4* gene. Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RECQL4>>. Acesso em: 4 set. 2016.

GILCHRIST M. Bringing it all back home: next-generation sequencing technology and you. Mill Hill Essays, 2010. Disponível em

<<http://www.historyofnrmr.org.uk/mill-hill-essays/essays-yearly-volumes/2010-2/bringing-it-all-back-home-next-generation-sequencing-technology-and-you/>>. Acesso em 31 jul. 2017.

GITTENBERGER-DE GROOT, Adriana C. et al. Progerin Expression during Normal Closure of the Human Ductus Arteriosus: A Case of Premature Ageing?. In: **Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease**. Springer Japan, p. 245-251, 2016.

GONZALO, Susana; KREIENKAMP, Ray; ASKJAER, Peter. Hutchinson-Gilford Progeria syndrome: a premature aging disease caused by LMNA gene mutations. **Ageing research reviews**, v. 33, p. 18-29, 2017.

GORDON, Leslie B; BROWN, W. Ted; COLLINS, Francis S. Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. 2003 Dec 12 [Updated 2015 Jan 8]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1121/>>. Acesso em 01 ago. 2017.

HARRISON, David E. et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. **nature**, v. 460, n. 7253, p. 392-395, 2009.

Harvard University. PolyPhen. Disponível em <<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>>. Acesso em 01 ago. 2017.

HAZAN-MOLINA, Hagai; DROR, Aizenbud D. Treatment Considerations in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A Case Report. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 39, n. 2, p. 172-178, 2015.

Human Gene Mutation Database (HGMD). Disponível em <<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>>. Acesso em 01 ago. 2017.

Hutchinson Jonathan. A case of congenital absence of hair with atrophic condition of the skin and its appendages. **Lancet**. 1:923, 1886.

International Genome Sample Resource (IGSR). Disponível em <<http://www.internationalgenome.org/>>. Acesso em 01 ago. 2017.

JAMUAR, Saumya Shekhar; TAN, Ene-Choo. Clinical application of next-generation sequencing for Mendelian diseases. **Human genomics**, v. 9, n. 1, p. 10, 2015.

KAROW, Julia K.; WU, Leonard; HICKSON, Ian D. RecQ family helicases: roles in cancer and aging. **Current opinion in genetics & development**, v. 10, n. 1, p. 32-38, 2000.

KELLERMAYER, Richard et al. A patient with Rothmund-Thomson syndrome and all features of RAPADILINO. **Archives of dermatology**, v. 141, n. 5, p. 617-620, 2005.

KITAO, Saori et al. Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome. **Nature genetics**, v. 22, n. 1, 1999.

KURIMA, Kiyoto et al. Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, TMC1, required for cochlear hair-cell function. **Nature genetics**, v. 30, n. 3, p. 277, 2002.

LANDER, Eric S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409 (6822): 860–921, 2001.

LARIZZA, Lidia; ROVERSI, Gaia; VOLPI, Ludovica. Rothmund-thomson syndrome. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 5, n. 1, p. 2, 2010.

LÓPEZ-OTÍN, Carlos et al. The hallmarks of aging. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1194-1217, 2013.

LU, Huiming et al. RECQL4 promotes DNA end resection in repair of DNA double-strand breaks. **Cell reports**, v. 16, n. 1, p. 161-173, 2016.

LU, Linchao; JIN, Weidong; WANG, Lisa L. Aging in Rothmund-Thomson syndrome and related RECQL4 genetic disorders. **Ageing research reviews**, v. 33, p. 30-35, 2016.

MARQUES, Silvio Alencar; PEREIRA, Fabíola de Paula; STOLF, Hamilton Ometto. Você conhece esta síndrome?. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, p. 476-479, 2008.

MARTIN, George M. Genetic modulation of senescent phenotypes in Homo sapiens. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 523-532, 2005.

MARTIN, George M.; OSHIMA, Junko. Lessons from human progeroid syndromes. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 263, 2000.

MARTIN-MONTALVO, Alejandro et al. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. **Nature communications**, v. 4, p. 2192, 2013.

MEHOLLIN-RAY, Amy R. et al. Radiographic abnormalities in Rothmund-Thomson syndrome and genotype–phenotype correlation with RECQL4 mutation status. **American Journal of Roentgenology**, v. 191, n. 2, p. W62-W66, 2008.

MERCIER, Sandra et al. Mutations in FAM111B cause hereditary fibrosing poikiloderma with tendon contracture, myopathy, and pulmonary fibrosis. **The American Journal of Human Genetics**, v. 93, n. 6, p. 1100-1107, 2013.

MORRIS, Mark R.; ASTUTI, Dewi; MAHER, Eamonn R. Perlman syndrome: overgrowth, Wilms tumor predisposition and DIS3L2. In: **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**. 2013.

NASLAVSKY, Michel Satya et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. **Human Mutation**, 2017.

NCBI. ClinVar. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>>. Acesso em 01 ago. 2017.

NCBI. dbSNP. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>>. Acesso em 01 ago. 2017.

NG, Pauline C.; HENIKOFF, Steven. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 13, p. 3812-3814, 2003.

NODA, Asao et al. Progerin, the protein responsible for the Hutchinson-Gilford progeria syndrome, increases the unrepaired DNA damages following exposure to ionizing radiation. **Genes and Environment**, v. 37, n. 1, p. 13, 2015.

OMIM.ORG. OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man. Disponível em: <<http://www.omim.org/>>. Acesso em: 01 ago. 2017.

PARK, Seul-Ki; SHIN, Ok Sarah. Metformin alleviates ageing cellular phenotypes in Hutchinson–Gilford progeria syndrome dermal fibroblasts. **Experimental Dermatology**, 2017.

PIARD, J. et al. Search for RECQL4 mutations in 39 patients genotyped for suspected Rothmund–Thomson/Baller-Gerold syndromes. **Clinical genetics**, v. 87, n. 3, p. 244-251, 2015.

POLLEX, R. L.; HEGELE, Robert A. Hutchinson–Gilford progeria syndrome. **Clinical genetics**, v. 66, n. 5, p. 375-381, 2004.

PUENTE, Xose S. et al. Exome sequencing and functional analysis identifies BANF1 mutation as the cause of a hereditary progeroid syndrome. **The American Journal of Human Genetics**, v. 88, n. 5, p. 650-656, 2011.

REHMAN, Neeha Abdul et al. Can Hutchinson-Gilford progeria syndrome be cured in the future?. **Intractable & rare diseases research**, v. 4, n. 2, p. 111-112, 2015.

REVÊCHON, Gwladys et al. Rare progerin-expressing preadipocytes and adipocytes contribute to tissue depletion over time. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

ROGOWSKI-TYLMAN, Michał et al. Molecular aspects of skin aging. Literature review. **Dermatology Review/Przegląd Dermatologiczny**, v. 103, n. 2, 2016.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **J. Mol. Biol.** 94 (3): 441–8. PMID 1100841, 1975.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 74 (12): 5463–7. Bibcode:1977PNAS...74.5463S. PMC 431765, 1977.

SCHWARZ, Jana Marie et al. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. **Nature methods**, v. 11, n. 4, p. 361-362, 2014.

SHAWN A. Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS). Disponível em <http://mbc-progeria.blogspot.com.br/2014_01_01_archive.html>. Acesso em 30 jul. 2017.

SIITONEN, H. Annika et al. The mutation spectrum in RECQL4 diseases. **European journal of human genetics**, v. 17, n. 2, p. 151, 2009..

SIMON, T. et al. Multiple malignant diseases in a patient with Rothmund–Thomson syndrome with RECQL4 mutations: Case report and literature review. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 152, n. 6, p. 1575-1579, 2010.

SUTER, Aude-Annick et al. Rothmund–Thomson Syndrome: novel pathogenic mutations and frequencies of variants in the RECQL4 and USB1 (C16orf57) gene. **Molecular genetics & genomic medicine**, v. 4, n. 3, p. 359-366, 2016.

SWISS-MODEL, Universitat Basel. O94761 (RECQ4_HUMAN) Disponível em <<https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/O94761?csm=CB809A7765AB48A1>>. Acesso em 30 jul. 2017.

SZNAJER, Yves et al. Atypical Rothmund-Thomson syndrome in a patient with compound heterozygous mutations in RECQL4 gene and phenotypic features in RECQL4 syndromes. **European journal of pediatrics**, v. 167, n. 2, p. 175-181, 2008.

VENNOS, Elizabeth M.; COLLINS, Marlise; JAMES, William D. Rothmund-Thomson syndrome: review of the world literature. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 27, n. 5, p. 750-762, 1992.

VENTER, J. Craig et al. The sequence of the human genome. **science**, v. 291, n. 5507, p. 1304-1351, 2001.

VOELKERDING, Karl V.; DAMES, Shale A.; DURTSCHI, Jacob D. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 641-658, 2009.

VOLPI, Ludovica et al. Targeted next-generation sequencing appoints c16orf57 as clericuzio-type poikiloderma with neutropenia gene. **The American Journal of Human Genetics**, v. 86, n. 1, p. 72-76, 2010.

WANG, Lisa L. et al. Association between osteosarcoma and deleterious mutations in the RECQL4 gene in Rothmund–Thomson syndrome. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 9, p. 669-674, 2003.

WANG, Lisa L. et al. Clinical manifestations in a cohort of 41 Rothmund-Thomson syndrome patients. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 102, n. 1, p. 11-17, 2001.

WANG, Lisa L. et al. Intron-size constraint as a mutational mechanism in Rothmund-Thomson syndrome. **The American Journal of Human Genetics**, v. 71, n. 1, p. 165-167, 2002.

WANG, Lisa L.; PLON, Sharon E. Rothmund-Thomson Syndrome. 1999 Oct 6 [Updated 2016 Aug 11]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1237/>>. Acesso em 01 ago. 2017.

WETTERSTRAND; Kris A. DNA Sequencing Costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP), 2017. Disponível em <www.genome.gov/sequencingcosts>. Acesso em 01 ago. 2017.

Wikimedia Foundation, Inc. Wikipedia: Sanger sequencing. Disponível em <https://en.wikipedia.org/wiki/Sanger_sequencing>. Acesso em 31 jul. 2017.

WOO, Leslie L. et al. The Rothmund-Thomson gene product RECQL4 localizes to the nucleolus in response to oxidative stress. **Experimental cell research**, v. 312, n. 17, p. 3443-3457, 2006.

WU, Ray-Chang et al. ARID4A and ARID4B regulate male fertility, a functional link to the AR and RB pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 12, p. 4616-4621, 2013.

WUYTS, Wim et al. Somatic and gonadal mosaicism in Hutchinson–Gilford progeria. **American journal of medical genetics Part A**, v. 135, n. 1, p. 66-68, 2005.

ZHANG, J. et al. A rare RECQL4 indel mutation in a Chinese patient with Rothmund–Thomson syndrome. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 30, n. 11, 2016.

ANEXOS

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Ao

Departamento de Pediatria

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU** na sessão de 05.04.17 a execução do subprojeto intitulado **"Estudo Genético-Clinico de pacientes com Síndrome de Rothmund-Thomson"**, que será dissertação de mestrado do aluno **Ricardo di Lazzaro filho**, sob orientação da **Profa. Dra. Débora Romeo Bertola**.

O referido projeto faz parte do **Protocolo de Pesquisa nº 0558/11**, intitulado **"ESTUDO GENÉTICO-CLÍNICO DAS DISPLASIAS ESQUELÉTICAS"**, aprovado por esta CAPPesq em 08.12.2010.

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Débora Romeo Bertola

CAPPesq, 08 de Março de 2016

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador

Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq