

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

**Caracterização genotípica de pacientes brasileiros  
pediátricos com a doença de Charcot-Marie-Tooth axonal  
utilizando tecnologias de sequenciamento de nova geração**

**Fernanda Barbosa Figueiredo**

**Ribeirão Preto  
2021**

**Fernanda Barbosa Figueiredo**

**Caracterização genotípica de pacientes brasileiros  
pediátricos com a doença de Charcot-Marie-Tooth axonal  
utilizando tecnologias de sequenciamento de nova geração**

Versão corrigida

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

Área de Concentração: Neurologia  
Sub-área: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Wilson Marques Júnior

**Ribeirão Preto  
2021**

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

Figueiredo, Fernanda Barbosa

Caracterização genotípica de pacientes brasileiros pediátricos com a doença de Charcot-Marie-Tooth axonal utilizando tecnologias de sequenciamento de nova geração. Ribeirão Preto, 2021.

177 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Neurologia.

Orientador: Marques Júnior, Wilson.

1. Charcot-Marie-Tooth axonal. 2. CMT pediátrico. 3. Rendimento diagnóstico. 4. Sequenciamento de nova geração. 5. Epidemiologia molecular.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Nome:** Fernanda Barbosa Figueiredo

**Título:** Caracterização genotípica de pacientes brasileiros pediátricos com a doença de Charcot-Marie-Tooth axonal utilizando tecnologias de sequenciamento de nova geração.

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

Aprovado em: 20/07/2021

Banca Examinadora:

Prof. Dr.: Fernanda Kok

Instituição: USP

Julgamento: Aprovado Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: Victor Evangelista de Faria Ferraz

Instituição: FMRP-USP / Departamento de Genética

Julgamento: Aprovado Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dra.: Claudia Ferreira da Rosa Sobreira

Instituição: FMRP-USP / Departamento: Neurologia

Julgamento: Aprovado Assinatura: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Luciane e Matusalém pelo amor, dedicação e apoio incondicional. Vocês nunca mediram esforços para que eu pudesse correr atrás dos meus ideais e tornar meus sonhos possíveis. Sou eternamente grata a vocês. Aos meus familiares, em especial à Titi e Amanda, por todo amor, carinho e companheirismo. Ao meu companheiro Maurício, por todo amor, cumplicidade, paciência, ensinamentos e incentivo. Vocês são uma inspiração e estão sempre me ensinando e me ajudando a me tornar uma pessoa cada vez melhor. Nada seria possível sem vocês. Meu eterno amor e gratidão!

Ao meu orientador, professor Dr. Wilson Marques Júnior, pela oportunidade de trabalhar em sua equipe e por todos os ensinamentos que me proporcionou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual. Muito obrigada pela confiança!

À Silmara, Sandra, Daiana e Tatiana que além de colegas de trabalho se tornaram amigas. Muito obrigada por todos os ensinamentos que me passaram, por toda a ajuda profissional que sempre me deram e pelo companheirismo que tornaram meu dia a dia muito mais leve.

Ao Pedro e ao Renato por toda ajuda concedida durante a execução deste trabalho e pelas discussões sempre produtivas.

Aos colegas do laboratório de Neurogenética por todos os momentos compartilhados, ensinamentos técnicos e pela disponibilidade e empenho em me ajudar sempre que se fez necessário.

À toda equipe do centro de medicina genômica (CMG) e ao Mendelics pela parceria desenvolvida durante a execução do trabalho.

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

À toda equipe da pós-graduação de Neurologia que muito me auxiliaram durante toda a trajetória do doutorado.

Agradeço também à todas as outras pessoas que aqui eu não citei o nome, mas não menos importantes, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”*

*Oliver Wendell Holmes*

## RESUMO

FIGUEIREDO, F. B. **Caracterização genotípica de pacientes brasileiros pediátricos com a doença de Charcot-Marie-Tooth axonal utilizando tecnologias de sequenciamento de nova geração.** 2021. 177 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

**Introdução:** A doença de Charcot-Marie-Tooth, também conhecida como neuropatia hereditária sensitivo motora (HMSN), é um grupo clínico e geneticamente heterogêneo de doenças que afetam os nervos sensitivos e motores do sistema nervoso periférico (SNP). Ela é a neuropatia periférica mais frequente entre crianças e adolescentes atendidas em um centro de doenças neuromusculares. Porém, não existem muitos estudos disponíveis na literatura direcionados especificamente para a população pediátrica de CMT ( $\leq 20$  anos). Elas podem ser classificadas de acordo com as velocidades de condução dos nervos motores em CMT1 (subtipos desmielinizantes), CMT2 (subtipos axonais) e CMTi (subtipos intermediários), quanto ao padrão de herança (autossômico dominante, autossômico recessivo, ligado ao X ou mitocondrial) e gene responsável. O teste genético estabelece um diagnóstico preciso e tem um impacto significativo tanto para os pacientes afetados quanto para seus familiares. A introdução das tecnologias de sequenciamento de nova geração permitiu um grande avanço na descoberta de novas variantes e genes relacionados às HMSN (mais de 120 genes) e, conseqüentemente, um aumento significativo no número de pacientes que recebem um diagnóstico molecular. Apesar desses avanços, a maioria dos pacientes com a forma axonal (CMT2) (~60%) ainda ficam sem um diagnóstico molecular definitivo, indicando que a maioria dos genes ou variantes para esse subtipo ainda precisam ser descobertas. O objetivo do presente estudo foi caracterizar genotipicamente pacientes pediátricos com o diagnóstico clínico sugestivo de Charcot-Marie-Tooth axonal (CMT2). Além disso, definimos a epidemiologia molecular de uma amostra da população brasileira, propomos um esquema diagnóstico específico e avaliamos o rendimento diagnóstico das diferentes técnicas moleculares utilizadas. **Métodos:** Foram coletadas amostras de crianças e adolescentes (com idade inferior a 20 anos na primeira consulta) com diagnóstico clínico sugestivo de CMT2, que consultaram no ambulatório de Neurogenética do HC-FMRP até dezembro de 2020. O diagnóstico molecular foi realizado utilizando tecnologias de NGS (painel



multigênico e WES). Posteriormente, todas as variantes candidatas encontradas foram confirmadas por Sanger. **Resultados:** No total, foram incluídos 56 casos índices pediátricos ( $\leq 20$  anos), não relacionados, com diagnóstico clínico sugestivo de CMT2. O diagnóstico molecular foi alcançado em 67,8% dos pacientes (38/56), considerando apenas as alterações patogênicas e provavelmente patogênicas. 14,2% (8/56) dos pacientes apresentaram variantes classificadas como sendo de significado incerto (VUS) e 17,8% (10/56) dos pacientes ficaram sem nenhuma variante candidata. Diferenciando entre painel e WES, o rendimento diagnóstico do painel foi de 39,1% (9/23) contra 61,7% no WES (29/47). O gene mais frequentemente mutado foi *MFN2* com dez variantes encontradas em 15 pacientes, seguido por *GJB1* com três variantes encontradas em 3 pacientes. Os outros 20 pacientes diagnosticados geneticamente apresentam variantes em vários genes menos comuns sendo eles, *MORC2* e *PNKP* (acometeram dois pacientes cada) e *AARS1*, *AIFM1*, *DNAJB2*, *EMD/LMNA*, *GDAP1*, *HSPB1*, *HSPB3*, *IGHMBP2*, *KIF1A*, *KIF5A*, *NAGLU*, *PLA2G6*, *SLC5A7*, *TRPV4*, *DNM2* e *LRSAM1* (acometeram um paciente cada). Esse resultado mostra a grande heterogeneidade genética presente nessa coorte. Além disso, nós encontramos 22 variantes novas que ainda não foram descritas na literatura em genes já conhecidos ampliando o espectro genético de CMT2. Dentre essas variantes, 1 variante foi classificada como patogênica, 11 foram classificadas como provavelmente patogênicas e 10 foram classificadas como VUS. **Conclusão:** Os resultados obtidos mostram que a epidemiologia molecular local da coorte estuda se mostrou bastante heterogênea, com 29 genes mutados em 38 pacientes e que as tecnologias de NGS, especialmente o WES, são eficazes no diagnóstico molecular de pacientes pediátricos com CMT2. Ademais, a descoberta de novas variantes amplia o espectro genético das formas axonais de CMT.

**Palavras-chave:** Charcot-Marie-Tooth axonal; CMT pediátrico; Rendimento diagnóstico; Sequenciamento de nova geração; Epidemiologia molecular.

## ABSTRACT

FIGUEIREDO, F. B. **Genotypic characterization of Brazilian pediatric patients with axonal Charcot-Marie-Tooth disease using next generation sequencing technologies**. 2021. 177 p. Tese (Doutorado). Ribeirão Preto School of Medicine, University of Sao Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

**Background:** Charcot-Marie-Tooth disease, also known as hereditary motor and sensory neuropathy (HMSN), is a clinical and genetically heterogeneous group of disorders that affect the sensory and motor nerves of the peripheral nervous system (PNS). It is the most frequent peripheral neuropathy among children and adolescents seen at a neuromuscular disease center. However, there are not many studies available in the literature explicitly aimed at the pediatric population of CMT ( $\leq 20$  years). They can be classified according to motor conduction velocities in CMT1 (demyelinating subtypes), CMT2 (axonal subtypes), and CMTi (intermediate subtypes), according to inheritance pattern (autosomal dominant, autosomal recessive, X-linked, or mitochondrial) and causative gene. Genetic testing establishes an accurate diagnosis and has a significant impact on both affected patients and their families. The introduction of next-generation sequencing technologies has allowed for a breakthrough in discovering novel variants and genes related to HMSN (more than 120 genes) and, consequently, a significant increase in the number of patients receiving a molecular diagnosis. Despite these advances, most patients with the axonal form (CMT2) (~ 60%) still lack a definitive molecular diagnosis, indicating that most of the genes or variants for this subtype have yet to be discovered. The present study aimed to genotypically characterize pediatric patients with a clinical diagnosis suggestive of axonal Charcot-Marie-Tooth (CMT2). In addition, we define the molecular epidemiology of a sample of the Brazilian population, propose a specific diagnostic scheme and evaluate the diagnostic yield of the different molecular techniques used. **Methods:** Samples were collected from children and adolescents (under the age of 20 at the first examination) with clinical diagnosis suggestive of CMT2, who consulted at the Neurogenetics outpatient clinic of HC-FMRP until December 2020. Molecular diagnosis was performed using NGS technologies (multigenic panel and WES). Subsequently, all candidate variants found were confirmed by Sanger. **Results:** In total, 56 unrelated pediatric index cases ( $\leq 20$  years) were included, with clinical diagnosis suggestive of CMT2. The molecular diagnosis

was reached in 67.8% of the patients (38/56), considering only pathogenic and probably pathogenic variants. 14.2% of the patients presented variants classified as being of uncertain significance (VUS) (8/56), and 17.8% of the patients were left without any candidate variant (10/56). Contrasting between panel and WES, the diagnostic yield of the panel was 39.1% (9/23) against 61.7% in WES (29/47). The most frequently mutated gene was *MFN2*, with ten variants found in 15 patients, followed by *GJB1*, with three variants found in 3 patients. The other 20 genetically diagnosed patients have variants in several fewer common genes, being *MORC2* and *PNKP* (affected two patients each) and *AARS1*, *AIFM1*, *DNAJB2*, *EMD/LMNA*, *GDAP1*, *HSPB1*, *HSPB3*, *IGHMBP2*, *KIF1A*, *KIF5A*, *NAGLU*, *PLA2G6*, *SLC5A7*, *TRPV4*, *DNM2* and *LRSAM1* (affected one patient each). This result shows the broad genetic heterogeneity present in this cohort. Also, we found 22 new variants that have not yet been described in the literature in known genes associated with HMSN, expanding the genetic spectrum of CMT2. Among these variants, one variant was classified as pathogenic, 13 were classified as probably pathogenic, and ten were classified as VUS. **Conclusion:** The results obtained show that the molecular epidemiology of the cohort studied was shown to be quite heterogeneous, with 29 mutated genes in 38 patients and that NGS technologies, especially WES, are effective in the molecular diagnosis of pediatric patients with CMT2. Furthermore, the discovery of novel variants broadens the genetic spectrum of axonal CMT subtypes.

**Keywords:** Axonal Charcot-Marie-Tooth; Pediatric CMT; Diagnostic yield; Next generation sequencing; Molecular epidemiology.

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1-1: Representação esquemática dos principais subtipos de neuropatias hereditárias.</i>	22
<i>Figura 1-2: Genes e proteínas envolvidas na fisiopatologia da doença de CMT.</i>	23
<i>Figura 1-3: Pipeline de bioinformática utilizado para análise de dados de NGS.</i>	36
<i>Figura 4-1: Fluxo de trabalho.</i>	43
<i>Figura 4-2: Fluxograma da distribuição das amostras.</i>	48
<i>Figura 4-3: Conjunto de termos utilizados para descrever a consequência de uma variante e sua localização no transcrito.</i>	54
<i>Figura 4-4: Pipeline utilizado para análise dos dados provenientes do painel CMT2.</i>	55
<i>Figura 4-5: Pipeline utilizado para análise dos dados provenientes do Exoma.</i>	55
<i>Figura 4-6: Fluxograma ilustrando os filtros utilizados para análise dos dados NGS.</i>	57
<i>Figura 5-1: Fluxograma mostrando a distribuição das amostras.</i>	66
<i>Figura 5-2: Distribuição das variantes nos genes.</i>	72
<i>Figura 5-3: Percentual de diagnóstico dos pacientes com CMT2.</i>	76
<i>Figura 6-1: Percentual de diagnóstico molecular em diferentes coortes de pacientes com CMT2.</i>	79
<i>Figura 6-2: Perfil genotípico em diferentes coortes de pacientes com CMT2.</i>	86

## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1-1: Técnicas de biologia molecular para detecção de variantes no genoma.</i>	20
<i>Tabela 1-2: Classificação CMT.</i>	26
<i>Tabela 4-1: Sites usados para seleção de genes do painel CMT2.</i>	49
<i>Tabela 4-2: Genes selecionados para o painel CMT2.</i>	49
<i>Tabela 4-3: Consequência das variantes.</i>	57
<i>Tabela 4-4: Sites dos bancos de dados e ferramentas utilizadas para classificação das variantes.</i>	60
<i>Tabela 4-5: Sites e ferramentas utilizadas para desenho dos primers.</i>	61
<i>Tabela 4-6: Protocolo PCR.</i>	61
<i>Tabela 4-7: Perfil térmico da PCR touchdown.</i>	62
<i>Tabela 4-8: Protocolo da reação de sequenciamento.</i>	62
<i>Tabela 4-9: Perfil térmico da reação de sequenciamento.</i>	63
<i>Tabela 4-10: Sites e ferramentas utilizadas para nomenclatura das variantes.</i>	64
<i>Tabela 5-1: Informações clínicas e moleculares dos pacientes.</i>	67
<i>Tabela 5-2: Descrição das variantes encontradas.</i>	73
<i>Tabela 6-1: Percentual de pacientes com CMT2 que receberam diagnóstico molecular em diferentes estudos.</i>	83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACMG	Colégio Americano de Genética Médica e Genômica
AD	Autossômico dominante
AFOs	Órtese de tornozelo e pé ( <i>ankle foot orthoses</i> )
ALS	Esclerose lateral amiotrófica
AMP	Associação de Patologia Molecular
ANGE	Ambulatório de Neurogenética
AR	Autossômico recessivo
CMG	Centro de Medicina Genômica
CMT	Charcot-Maire-Tooth
CMT1	Charcot-Maire-Tooth desmielinizante
CMT2	Charcot-Maire-Tooth axonal
CMTi	Charcot-Maire-Tooth intermediário
CNV	Varição no número de cópias
dHMN	Neuropatia motora hereditária distal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FISH	Hibridização in situ por fluorescência
gDNA	DNA genômico
GRCh	<i>Genome Reference Consortium Human</i>
HC-FMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
HGVS	<i>Human Genome Variation Society</i>
HMSN	Neuropatia hereditária sensitivo motora

HSN ou HSAN	Neuropatia hereditária sensitiva e/ou autonômica
Indels	Inserções e deleções
LNAE	Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental
MAF	<i>Minor allele frequency</i>
MLPA	amplificação multiplex de sondas dependente de ligação
MMII	Membros inferiores
MMSS	Membros superiores
MNCV	Velocidade de condução do nervo motor
mtDNA	DNA mitocondrial
NGS	Sequenciamento de nova geração
NH	Neuropatias hereditárias
nm	Nanômetro
PAMC	Potencial de ação muscular composto
PANS	Potenciais de ação do nervo sensitivo
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SNPs	Polimorfismo de nucleotídeo único ( <i>Single-nucleotide polymorphism</i> )
SNV	Variante de nucleotídeo único ( <i>Single-nucleotide variant</i> )
uL	Microlitro
UTR	<i>Untranslated region</i>
VE	Variantes estruturais
VEP	<i>Variant effect predictor</i>
VUS	Variantes de significado incerto

WES	Sequenciamento de todo exoma (whole exome sequencing)
WGS	Sequenciamento de todo genoma (whole genome sequencing)
XL	Herança ligada ao X



# SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>19</b>
1.1	O genoma humano e doenças genéticas	19
1.2	A doença de Charcot-Marie-Tooth	21
1.2.1	Classificação da CMT	25
1.2.2	Epidemiologia	29
1.3	A doença de Charcot-Marie-Tooth na criança e adolescente	30
1.4	Diagnóstico genético em CMT	31
1.4.1	Tecnologias utilizadas para diagnóstico molecular em CMT	33
1.4.1.1	Sequenciamentos de nova geração	34
1.4.1.2	Anotação, interpretação e classificação das variantes	37
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>40</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
3.1	Objetivo Principal	41
3.2	Objetivos Gerais	41
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>42</b>
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	42
4.2	FLUXO DE TRABALHO (DELINEAMENTO EXPERIMENTAL)	42
4.3	PACIENTES	44
4.3.1	Critérios de inclusão	44
4.3.2	Critérios de não inclusão	45
4.3.3	Avaliação clínica	45
4.4	LABORATÓRIO	46
4.4.1	Coleta de material e extração do DNA	46
4.4.2	Quantificação, pureza e integridade das amostras	47
4.4.3	Escolha da técnica de sequenciamento e envio das amostras	48
4.4.4	Painel – CMG	49
4.4.4.1	Desenho do painel	49
4.4.4.2	Preparação da biblioteca	51

4.4.4.3	Sequenciamento	51
4.4.4.4	Análise bioinformática	51
4.4.5	WES – Mendelics	52
4.4.5.1	Anotação	52
4.4.6	Análise e interpretação dos resultados	54
4.4.7	Classificação das variantes	59
4.4.8	Confirmação e validação por Sanger	60
4.4.8.1	Desenho dos primers	60
4.4.8.2	Reação em cadeia da polimerase	61
4.4.8.3	Sequenciamento	62
4.4.8.4	Precipitação e purificação da Reação de Sequenciamento	63
4.4.8.5	Análise e nomenclatura das variantes	64
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>65</b>
5.1	PACIENTES	65
5.2	RESULTADOS MOLECULARES	71
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>77</b>
6.1	PERCENTUAL DE DIAGNÓSTICO NOS PACIENTES COM CMT2	77
6.2	PERFIL GENOTÍPICO DA COORTE ESTUDADA	84
6.3	CORRELAÇÃO GENOTÍPICA-FENOTÍPICA	87
6.4	O IMPACTO TERAPÊUTICO DO DIAGNÓSTICO PRECOCE	106
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>109</b>
<b>8.</b>	<b>TRABALHOS FUTUROS</b>	<b>110</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>111</b>
	<b>APÊNDICE</b>	<b>128</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>165</b>

# 1. REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 O GENOMA HUMANO E DOENÇAS GENÉTICAS

A primeira versão completa do genoma humano foi disponibilizada em abril de 2003 e desde então tem ajudado a desvendar as complexidades por trás do nosso DNA (ABDELLAH et al., 2004). Uma observação impressionante na análise do genoma foi a de que existe uma similaridade muito grande, de aproximadamente 99,9%, entre a sequência de DNA de indivíduos de todo o mundo (FEUK; CARSON; SCHERER, 2006). Portanto, através de estudos dessa pequena fração do genoma (0,1%), que constitui a variação genética entre indivíduos, é que podem ser obtidas informações sobre variabilidade fenotípica e suscetibilidade a doenças.

A versão mais recente do genoma humano de referência (GRCh38.p13) contém mais de 3 bilhões de nucleotídeos que estão organizados nos 23 pares de cromossomos dentro do núcleo de todas as nossas células (KITTS et al., 2016). O projeto *1000 Genomes*, que sequenciou mil indivíduos de 26 populações diferentes, mostrou que um genoma típico difere em 4 a 5 milhões de pares de base do genoma referência, porém a maioria dessas variantes são toleradas (AUTON et al., 2015). O grande desafio é encontrar entre todas as variantes presentes num genoma quais variantes são causadores de doença e quais não são.

De uma maneira geral, o genoma humano pode ser dividido em regiões codificadoras de proteínas (genes) e regiões não codificadoras de proteína. Embora essas variações possam ocorrer ao longo de todo o genoma, um estudo mostrou que 85% das mutações patogênicas relacionadas às doenças estão localizadas nas regiões codificadoras de proteínas, que representam apenas ~1% de todo o genoma humano (~30Mb) (MAJEWSKI et al., 2011; PIPIS et al., 2019).

O espectro da variação genética humana é amplo, podendo variar de mutações de um único nucleotídeo a grandes eventos envolvendo cromossomos inteiros (aneuploidias) (EICHLER, 2019). De modo geral, elas podem ser classificadas como:

- (i) Variantes estruturais (VE): São aquelas alterações genômicas que afetam um número grande de pares de bases. Dentre elas estão as alterações no

- número de cromossomos (aneuploidia), inversões, translocações e variações no número de cópias (CNVs) que podem ser causadas por inserções, deleções e duplicações em segmento de DNA maiores que 1kb;
- (ii) Indels: Inserções ou deleções que ocorrem no DNA que variam de 1 a 49 pares de bases;
- (iii) Variante de nucleotídeo único (SNVs): São alterações de uma única base no DNA (EICHLER, 2019; FEUK; CARSON; SCHERER, 2006).

Para a identificação de cada uma dessas variantes existe uma técnica de biologia molecular mais apropriada. Na Tabela 1-1 estão exemplificadas algumas dessas técnicas.

Tabela 1-1: Técnicas de biologia molecular para detecção de variantes no genoma.

<b>Classe das variantes</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>Técnica para identificação</b>
<b>SNVs</b>	1	Sanger NGS
<b>Indels</b>	1-49	Sanger NGS
<b>CNVs</b>	>50	Cariótipo Microarray MLPA FISH qPCR
<b>Aneuploidia Inversões Translocações</b>	>50 – cromossomo inteiro	Cariótipo Microarray

Fonte: Elaborada pela autora. Adaptada de: Cantsilieris, Baird e White (2013), Eichler (2019) e Silveira-Moriyama e Paciorkowski (2018).

Notas: (Abreviações – ordem alfabética): CNVs: Copy number variation (variação no número de cópias); FISH: hibridização in situ por fluorescência; Indels: Inserções e deleções; MLPA: amplificação multiplex de sondas dependente de ligação; NGS: sequenciamento de nova geração; qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa; SNVs: Single-nucleotide variant (variante de nucleotídeo único).

Os avanços nas tecnologias da biologia molecular, como os sequenciadores de nova geração (NGS), permitiram um grande progresso no diagnóstico genético de várias doenças raras. Aproximadamente 80% das doenças raras são de origem genética e, embora tenha ocorrido acentuada melhora nos últimos anos, apenas uma minoria dos pacientes recebe um diagnóstico molecular (LIU et al., 2019; TURRO et al., 2020). Essas doenças geralmente são fatais ou cronicamente debilitantes e a

maioria dos pacientes (50%-75%) apresentam sintomas ao nascimento ou na infância (LIU et al., 2019). Estima-se que 350 milhões de pessoas em todo o mundo sofrem de doenças raras e que cada paciente custa em média 5 milhões de dólares para o sistema de saúde ao longo de sua vida (LIU et al., 2019). No Brasil, estima-se que esse número seja de 13 milhões de pessoas afetadas com doenças raras (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

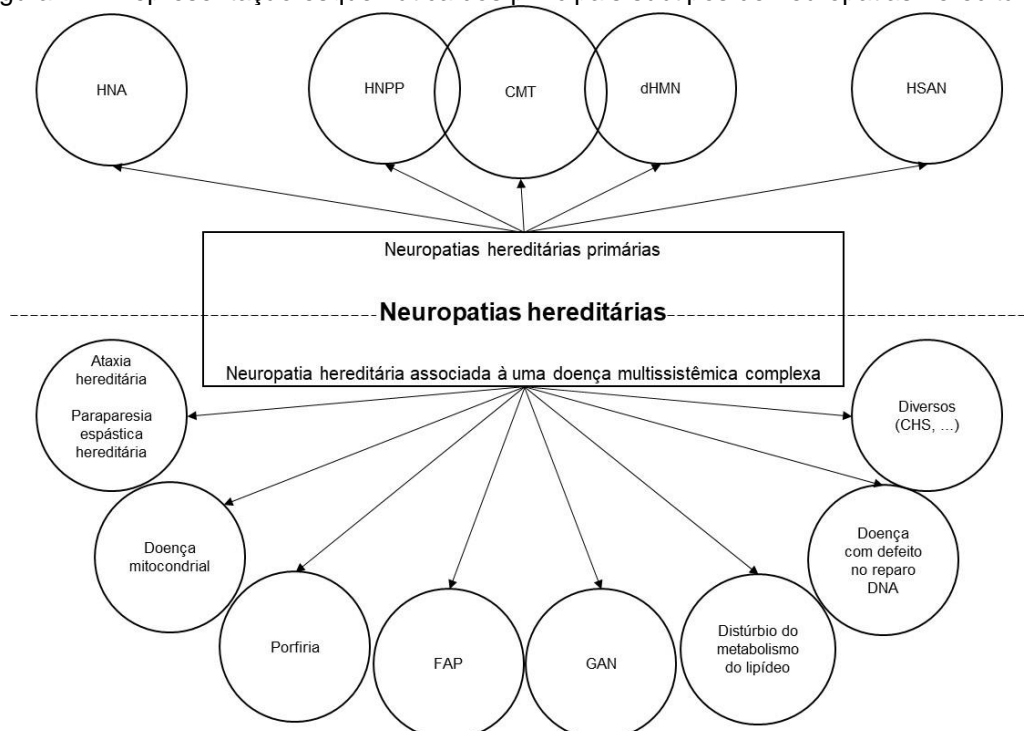
Estabelecer um diagnóstico definitivo é, na maioria das vezes, um processo complexo, caro e demorado. Estima-se que um paciente com doença rara demora, em média, 4,8 anos para receber um diagnóstico molecular definitivo (LIU et al., 2019). Esses números mostram a importância, cada vez maior, de se inserir o diagnóstico genético na prática clínica. Até o momento, foram catalogadas aproximadamente 10.000 doenças raras e, dentre elas, está a doença de Charcot-Maire-Tooth (CMT), o grupo de doenças mais frequente entre as neuropatias hereditárias (FERREIRA, 2019; PIPIS et al., 2019).

## 1.2 A DOENÇA DE CHARCOT-MARIE-TOOTH

As neuropatias hereditárias (NH) são um grupo heterogêneo de doenças crônicas e lentamente progressivas que causam prejuízos funcionais significativos e diminuição da qualidade de vida nos pacientes (JOHNSON et al., 2014; MATHIS et al., 2015). Elas podem ser subdivididas em dois grandes grupos: (i) Neuropatia hereditária primária, onde a neuropatia é a manifestação única ou predominante; (ii) Neuropatia hereditária associada a uma doença multissistêmica complexa (Figura 1-1) (CARROLL et al., 2019; MATHIS et al., 2015). Dentre as NHs primárias, o tipo mais frequente é a doença de Charcot-Marie-Tooth (CMT), também conhecida como neuropatia hereditária sensitivo motora (HMSN). Existem dois outros grupos de NHs primárias, que são bem mais raras: (i) neuropatia motora hereditária distal (dHMN), que tem envolvimento predominantemente motor e (ii) neuropatia hereditária sensitiva e/ou autonômica (HSN ou HSAN), que envolve predominantemente os nervos sensitivos e autonômicos (PISCIOTTA; SHY, 2018; ROSSOR; TOMASELLI; REILLY, 2016). Esses 3 grupos podem ser denominados coletivamente de CMT e doenças

correlacionadas e muitas vezes, eles compartilham uma sobreposição clínica e molecular (BERCIANO et al., 2012; PISCIOTTA; SHY, 2018).

Figura 1-1: Representação esquemática dos principais subtipos de neuropatias hereditárias.



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

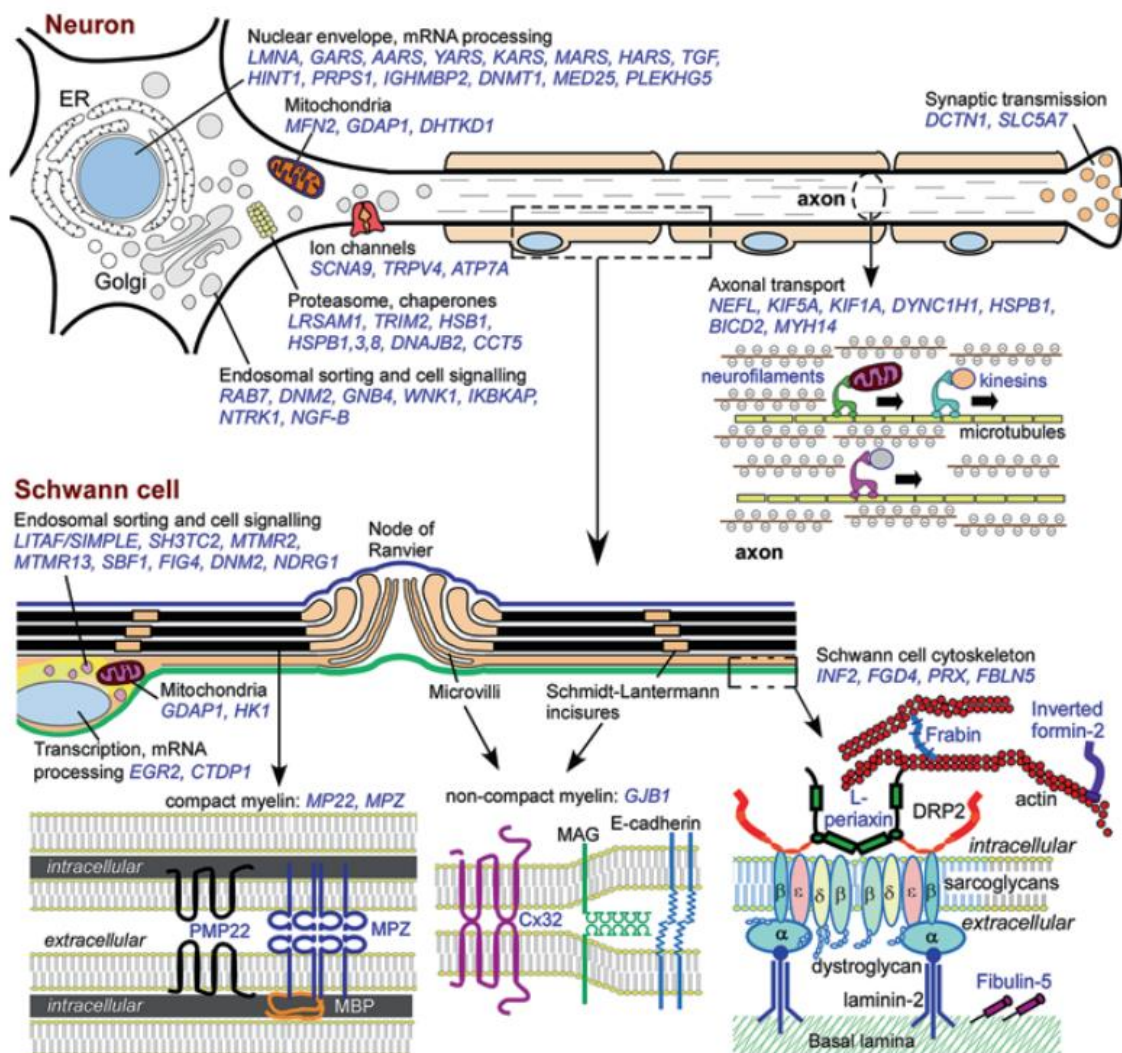
Notas (Abreviações – ordem alfabética): CHS, Síndrome de Chediak–Higashi; CMT, Charcot-Marie-Tooth; dHMN, neuropatia hereditária motora distal; FAP, polineuropatia amiloidótica familiar; GAN, neuropatia axonal gigante; HNA, neuropatia nevralgica hereditária; HNPP, neuropatia hereditária com susceptibilidade a paralisia por pressão; HSAN, neuropatia hereditária sensitivo autonômica; SPG, paraparesia espástica hereditária.

CMT (CID:G60.0) representa um grupo clínico e geneticamente heterogêneo de doenças que afetam os nervos sensitivos e motores do sistema nervoso periférico (SNP) (CARROLL et al., 2019). A doença foi descrita no ano de 1886 por 3 neurologistas, Jean Martin Charcot e seu estudante Pierre Marie, em Paris, e Howard Henry Tooth na Inglaterra (DYCK, 1968). Eles a descreveram como uma atrofia muscular peroneal (PMA) lentamente progressiva que não afetava as extremidades superiores ao longo de vários anos (MATHIS et al., 2015). Em 1968, Peter Dyck e Edward Lambert propuseram a primeira classificação da CMT baseado em achados eletrofisiológicos e de biópsia de nervo em CMT1 e CMT2, onde CMT1 representa as formas desmielinizantes, com velocidade de condução nervosa reduzida, enquanto

CMT2 corresponde ao tipo axonal, que cursa com preservação da velocidade de condução (MATHIS et al., 2015).

A CMT é uma doença mendeliana, monogênica, causada por alterações em genes que codificam proteínas que estão envolvidas em diversos processos fisiológicos como, por exemplo, a compactação e manutenção da mielina, formação do citoesqueleto, transporte axonal, sinalização celular, metabolismo mitocondrial, agregação e processamento de proteínas, transcrição do mRNA, entre outros (Figura 1-2) (JERATH; SHY, 2015; PAREYSON; MARCHESI, 2009). Atualmente, são mais de 120 genes relacionados às HMSNs e as principais alterações encontradas são do tipo CNV (duplicações e deleções), pequenos indels e SNVs (BENARROCH et al., 2019).

Figura 1-2: Genes e proteínas envolvidas na fisiopatologia da doença de CMT



Fonte: Kleopa; Kagiava; Sargiannidou (2019)

Notas: Reimpressa com permissão da revista Springer Nature. Número da licença (5090200587073).

O fenótipo clássico da CMT é caracterizado por atrofia muscular progressiva, fraqueza e perda sensitiva durante as primeiras décadas de vida (PISCIOTTA; SHY, 2018; ROSSOR; TOMASELLI; REILLY, 2016). Outras manifestações clínicas comuns incluem, anormalidades na marcha, deformidades esqueléticas (pés cavos, dedos em martelo, mãos em garra, cifoescoliose e displasia de quadril) e diminuição ou ausência dos reflexos miotáticos (FRIDMAN; REILLY, 2015; PISCIOTTA; SHY, 2018). A maioria dos pacientes com fenótipo clássico permanece ambulatorial ao longo da vida e tem uma expectativa de vida normal (PISCIOTTA; SHY, 2018). No entanto, a CMT pode ser clinicamente heterogênea, com variabilidade na idade de início, velocidade de progressão e achados eletrofisiológicos (PISCIOTTA; SHY, 2018). Esses fenótipos clínicos característicos podem sugerir mutações em genes específicos permitindo, algumas vezes, uma correlação fenótipo-genótipo (PISCIOTTA; SHY, 2018). Porém, é importante ressaltar que na doença de CMT existe uma grande heterogeneidade fenotípica, (diferentes fenótipos de CMT podem ser causados por mutações em um mesmo gene) e heterogeneidade genotípica (mutações em diferentes genes podem resultar num mesmo fenótipo) (BENARROCH et al., 2019; BERCIANO et al., 2012).

Atualmente, o tratamento para os diversos subtipos de CMT é sintomático e de reabilitação envolvendo uma equipe multidisciplinar (neurologistas, fisiatras, cirurgões ortopédicos, ortopedistas, fisioterapeutas e terapeutas ocupacionais), de acordo com a necessidade de cada paciente (SCHERER; KLEOPA; BENSON, 2020). O manejo terapêutico consiste em terapias física e ortopédica que devem ser individualizadas a fim de manter a qualidade de vida dos pacientes com CMT, especialmente nas crianças (JANI-ACSADI et al., 2015). Embora ainda não exista um tratamento curativo para CMT, os avanços tecnológicos em genética molecular têm permitido a descoberta de novos genes e melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da doença levando, conseqüentemente, a identificação de novos alvos terapêuticos e um progresso considerável na preparação para os ensaios clínicos em CMT (ROSSOR; SHY; REILLY, 2020; ROSSOR; TOMASELLI; REILLY, 2016). Uma descoberta importante foi de que qualquer que seja o defeito metabólico ou estrutural que afeta principalmente a mielina ou o axônio, a via final comum é representada por um processo degenerativo axonal, comprimento-dependente (os nervos mais longos do corpo são afetados primeiro e mais gravemente), de distal para proximal (MOSS et al., 2021; NAVE; SEREDA; EHRENREICH, 2007; PAREYSON;



MARCHESI, 2009; PISCIOTTA; SHY, 2018; ROSSOR; TOMASELLI; REILLY, 2016). Conseqüentemente, prevenir essa degeneração axonal passou a ser um alvo atraente já que ela está diretamente relacionada com a progressão dos sinais clínicos nos pacientes ao longo dos anos (MOSS et al., 2021; PAREYSON; MARCHESI, 2009; SCHERER; WRABETZ, 2008).

### 1.2.1 Classificação da CMT

A CMT é classificada de acordo com as seguintes características: local primário do acometimento neural (mielina ou axônio); padrão de herança (autossômico dominante, autossômico recessivo, ligado ao X ou mitocondrial); e mutação/localização gênica.

A distinção entre as formas mielínicas e axonais é definida pela determinação das velocidades de condução dos nervos motores (MNCV), ulnar e mediano (PAREYSON; SCAIOLI; LAURÀ, 2006). As formas desmielinizantes (CMT1) são aquelas com MNCVs reduzidos (< 38 m/s), enquanto nas formas axonais (CMT2) as MNCVs são normais ou levemente reduzidas ( $\geq 38$  m/s) com amplitudes reduzidas dos potenciais de ação muscular composto (PAMC) (HARDING; THOMAS, 1980; SAPORTA et al., 2011; TAZIR et al., 2014). Além disso, observou-se que certas mutações estavam associadas com a diminuição da MNCV em faixa intermediária (25–45 m/s), portanto, CMT intermediário (CMTi) foi designado como uma categoria separada (FRIDMAN; REILLY, 2015; SAPORTA et al., 2011).

Posteriormente, os subtipos de CMT são categorizados de acordo com o padrão de herança, sendo CMT1 a forma desmielinizante e herança autossômica dominante; CMT4 a forma desmielinizante e herança autossômica recessiva; AD CMT2 e AR CMT2 são as formas axonais de herança autossômica dominante e autossômica recessiva respectivamente; AD CMTi e AR CMTi são as formas intermediárias de herança autossômica dominante e autossômica recessiva respectivamente. Herança ligada ao X (CMTX) e mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) também foram relatadas sendo essas últimas de herança materna (CARROLL et al., 2019; FRIDMAN; REILLY, 2015). Em seguida, uma designação de letra segue o subtipo que representa gene/*locus* específico mutado, como CMT1 (A,B,C...), CMT2 (A,B,C ...),

CMT3, CMT4, CMTX (1,2,3 ...). Por exemplo, CMT1A refere-se a CMT1 autossômico dominante devido a uma duplicação do gene *PMP22* enquanto CMT1B identifica a forma autossômica dominante de CMT1 causada por mutações de ponto no gene *MPZ* e assim sucessivamente. A Tabela 1-2 apresenta a classificação mais utilizada da CMT e seus respectivos genes. Atualmente, mutações ou variações no número de cópias em mais de 120 genes foram identificados como causa de CMT e neuropatias correlatas (dHMN, HSN, HSN) (JUNEJA et al., 2019; PISCIOTTA; SHY, 2018). Apesar dessa classificação ser confusa e não haver um consenso internacional, ela é a mais utilizada e a que será adotada neste trabalho (REILLY; SHY, 2009; TAZIR et al., 2014).

Tabela 1-2: Classificação CMT.

(Continua)

TIPO	GENE	LOCUS
<b>FORMAS DESMIELINIZANTES - Autossômica dominante (AD CMT1)</b>		
CMT1A	Duplicação do PMP22	17p11.2
CMT1B	MPZ	1q22
CMT1C	LITAF	16p13.3-p12
CMT1D	EGR2	10q21.1-q22.1
CMT1E	Mutações de ponto do PMP22	17p11.2
CMT1F	NEFL	8p21
CMT1	ARHGEF10	8p23
CMT1+	FBLN5	14q32.12
<b>FORMAS DESMIELINIZANTES - Autossômica recessiva (CMT4)</b>		
CMT4A	CMT4A	CMT4A
CMT4B1	CMT4B1	CMT4B1
CMT4B2	CMT4B2	CMT4B2
CMT4B3	CMT4B3	CMT4B3
CMT4C	CMT4C	CMT4C
CMT4D (HMSNL)	NDRG1	8q24.3
CMT4E	EGR2	10q21.1-q22.1
CMT4F	PRX	19q13.1-q13.2
CMT4G (Russe)	HK1	10q22
CMT4H	FGD4	12p11.2
CMT4J	FIG4	6q21
CMT4K	SURF1	9q34

Fonte: Elaborada pela autora. Adaptada de: Pestronk (2021).

Tabela 1-2: Classificação CMT.

(Continuação)

TIPO	GENE	LOCUS
CCFDN	CTDP1	18q23
<b>FORMAS AXONAIS - Autossômica dominante (AD CMT2)</b>		
CMT2A1	KIF1B	1p36.2
CMT2A2	MFN2	1p36.2
CMT2B	RAB7	3q21
CMT2C	TPRV4	12q24
CMT2D	GARS	7p15
CMT2E	NEFL	8p21
CMT2F	HSP27/HSPB1	7q11.23
CMT2G	12q12-q13.3	12q12-q13.3
CMT2I	MPZ	1q22
CMT2J	MPZ	1q22
CMT2K	GDAP1	8q13-q21.1
CMT2L	HSP22/HSPB8	12q24
CMT2M	DNM2	19p13
CMT2N	AARS1	16q22
CMT2O	DYNC1H1	14q32
CMT2P	LRSAM1	9q33.3
CMT2Q	DHTKD1	10p14
CMT2R	TRIM2	4q31.3
CMT2U	MARS	12q13
CMT2V	NAGLU	17q21
CMT2W	HARS	5q31
CMT2Y	VCP	9p13
CMT2Z	MORC2	22q12
CMT2CC	NEFH	22q12
CMT2DD	ATP1A1	1p13
CMT2	TFG	3q12
CMT2	DGTA2	11q13
CMT2	MME	3q25
CMT2	JAG1	20p12
CMT2	GBF1	10q24
CMT2-like	BSCL2	11q13

Fonte: Elaborada pela autora. Adaptada de: Pestronk (2021).

Tabela 1-2: Classificação CMT.

(Continuação)

TIPO	GENE	LOCUS
<b>FORMAS AXONAIS - Autossômica recessiva (AR-CMT2)</b>		
AR CMT2A	LMNA	1q21.2
AR CMT2A2B	MFN2	1p36
AR CMT2B	PNKP	19q13
AR CMT2F	HSPB1	7q11
AR CMT2K	GDAP1	8q21
AR CMT2P	LRSAM1	9q33
AR CMT2R	TRIM2	4q31
AR CMT2S	IGHMBP2	11q13
AR CMT2T	MME	3q25
AR CMT2X	SPG11	15q21
AR CMT2EE	MPV17	2p23
AR CMT2	AHNAK2	14q32
AR CMT2	EGR2	10q21
AR CMT2	DNAJB2	2q35
AR CMT2	PRPH	12q13
AR CMT2	SACS	13q12
AR CMT2	SORD	15q21
ARAN-NM	HINT1	5q31.1
AR CMT2	GAN	16q24.1
<b>FORMAS AXONAIS – Mitocondriais</b>		
CMT 2	MT-ATP6	Mitocondrial
<b>FORMAS INTERMEDIÁRIAS - Autossômica Dominante (DI-CMT)</b>		
AD CMTiA	10q24.1-25.1	10q24.1-25.1
AD CMTiB	DNM2	19p13
AD CMTiC	YARS	1p35
AD CMTiE	INF2	14q32
AD CMTiF	GNB4	3q26
AD CMTiG	NEFL	8p21
AD CMTi	CLORF194	1p13
AD CMTi	EBP50	17q25

Fonte: Elaborada pela autora. Adaptada de: Pestronk (2021).

Tabela 1-2: Classificação CMT.

(Continuação)

TIPO	GENE	LOCUS
<b>FORMAS INTERMEDIÁRIAS - Autossômica recessiva (RI-CMT)</b>		
AR CMTiA	GDAP1	8q21
AR CMTiB	KARS	16q23.1
AR CMTiC	PLEKHG5	1p36.31
AR CMTiD	COX6A1	12q24
<b>FORMAS LIAGADA AO X (CMT 1X)</b>		
CMTX1	GJB1	Xq13.1
CMTX4	AIFM1	Xq26.1
CMTX5	PRPS1	Xq22-q24
CMTX6	PDK3	Xp22.11
<b>NEUROPATIA HEREDITÁRIA SENSÍVEL À COMPRESSÃO</b>		
HNPP	Deleção / mutações de ponto PMP22	17p11.2

Fonte: Elaborada pela autora. Adaptada de: Pestronk (2021).

### 1.2.2 Epidemiologia

A doença de Charcot-Marie-Tooth é a doença hereditária mais frequente do sistema nervoso periférico e uma das doenças neurogenéticas mais comuns (BARRETO et al., 2016). O dado mais frequentemente utilizado foi obtido de um estudo realizado na Noruega Ocidental, onde estimou-se uma prevalência de CMT em 1:2.500 habitantes (SKRE, 1974). No entanto, os estudos mostram que provavelmente existe uma grande variabilidade epidemiológica de acordo com a população geográfica estudada, podendo variar de 9,7:100.000 habitantes na Sérvia até 82,3:100.000 habitantes na Noruega (BARRETO et al., 2016; BRAATHEN, 2012; MLADENOVIC et al., 2011). Um estudo recente, realizado na Dinamarca, mostrou que aproximadamente 21,5% (202/940) dos pacientes diagnosticados com polineuropatia não especificada em hospitais da Dinamarca apresentavam CMT (VAETH et al., 2021). Este dado sugere que a doença de CMT pode ser muito mais frequente do que os valores previamente estimados.

A maioria dos estudos epidemiológicos relacionados à CMT descrevem a frequência dos diferentes subtipos de CMT e são de trabalhos realizados na Europa

e com adultos (BRAATHEN, 2012; PAREYSON; SAVERI; PISCIOTTA, 2017). O subtipo mais frequente é CMT1, representando aproximadamente 60% de todas as formas de CMT (FRIDMAN et al., 2015; GESS et al., 2013; MANGANELLI et al., 2014; MARQUES et al., 2005; MURPHY et al., 2012a; SAPORTA et al., 2011). Por outro lado, alguns estudos relatam que as formas axonais representam 12 a 36% de todos os casos de CMT (BACQUET et al., 2018; BARRETO et al., 2016). Nos países da Europa ocidental, América do Norte e Japão, as formas autossômicas dominantes são mais frequentes (SISKIND; SHY, 2011; TAZIR et al., 2014). No entanto, em países com alta prevalência de casamentos consanguíneos ou com populações isoladas, a herança autossômica recessiva pode ser responsável por mais de 30 a 50% de todas as formas (DUBOURG et al., 2006; TAZIR et al., 2014).

Os estudos epidemiológicos direcionados à população pediátrica são raros e geralmente abordam a prevalência de neuropatias periféricas em geral e não somente da CMT. Alguns estudos mostram que CMT é a neuropatia periférica mais frequente entre crianças e adolescentes podendo representar cerca de 40% de todos os casos atendidos em ambulatórios de doenças neuromusculares pediátricas (JANI-ACSADI et al., 2015; KARARIZOU et al., 2006; SHABO et al., 2007). Em concordância com esse dado, um estudo realizado pelo nosso grupo no Setor de Doenças Neuromusculares e Neurogenética da FMRP-USP, mostrou que dentre 149 crianças com neuropatias periféricas atendidas até 2010, 82 (55,03%) tinham CMT (BORGHETTI, 2010). Esses dados indicam que as crianças e adolescentes representam uma parcela importante dos pacientes acometidos com CMT.

Apesar do conhecimento sobre a frequência de CMT em diferentes partes do mundo ainda ser limitado, segundo a associação de Charcot-Marie-Tooth, estima-se que 3 milhões de pessoas no mundo sejam afetadas por essa doença (CHARCOT-MARIE-TOOTH ASSOCIATION, 2021).

### **1.3 A DOENÇA DE CHARCOT-MARIE-TOOTH NA CRIANÇA E ADOLESCENTE**

Embora a maioria dos pacientes com CMT apresentem as primeiras manifestações clínicas durante a infância, não existem muitos estudos voltados, especificamente, para a população pediátrica de CMT ( $\leq 20$  anos). No geral, os primeiros sinais clínicos

em crianças incluem: atraso no desenvolvimento motor, problemas na marcha, frequentes quedas, choro fraco, dificuldade de sucção, problemas de coordenação motora e deformidades esqueléticas (BAETS et al., 2011; JANI-ACSADI et al., 2015; WILMSHURST; OUVRIER, 2011). Quando os sintomas começam já ao nascimento, os recém nascidos podem apresentar hipotonia e insuficiência respiratória grave (BAETS et al., 2011). Muitas vezes, as manifestações de início são sutis, como por exemplo, não conseguir acompanhar as outras crianças em brincadeiras, ter problemas para se vestir, amarrar os sapatos e escrever na escola, podendo acarretar em atraso diagnóstico (JANI-ACSADI et al., 2015). Um estudo mostrou que esse atraso no diagnóstico de pacientes com CMT pediátrico pode ser de até 10 anos, mesmo em famílias que já apresentam histórico da doença (JANI-ACSADI et al., 2015). Isso pode prejudicar condutas terapêuticas já que o curso natural da doença resulta na progressão dos sintomas até a idade adulta, em variados graus, dependendo do subtipo de CMT e gene envolvido.

#### 1.4 DIAGNÓSTICO GENÉTICO EM CMT

O diagnóstico da CMT é baseado nas seguintes etapas: definição do fenótipo clínico, identificação do padrão de herança, exame eletrofisiológico, análises moleculares e, biópsia de nervo, em casos específicos (PAREYSON; MARCHESI, 2009). O processo que antecede os testes moleculares (definição do fenótipo clínico, identificação do padrão de herança e exames eletrofisiológicos) combinados com os dados provenientes de estudos epidemiológicos, são de extrema importância para seleção dos testes genéticos.

O subtipo mais comum de CMT é o CMT1A, que é responsável, por aproximadamente, 60% dos casos de CMT que recebem diagnóstico molecular. O CMT1A é causado por uma duplicação de 1,4 Mb no braço curto do cromossomo 17 (17p11.2), que contém nove genes, incluindo o gene da proteína mielínica periférica 22 (*PMP22*) (LUPSKI et al., 1991; PATEL et al., 1992; PIPIS et al., 2019). Uma deleção desta mesma região cromossômica (14Mb) causa outra neuropatia hereditária, a neuropatia hereditária com susceptibilidade à paralisia por pressão (HNPP),

destacando a importância, do nível de expressão, da proteína *PMP22* para a função do SNP (CHANCE et al., 1993; OLIVEIRA et al., 2016).

Outros genes comumente associados com a CMT são *GJB1* (CMTX1), *MFN2* (CMT2A) e *MPZ* (CMT1B). Alguns estudos populacionais mostraram que, coletivamente, esses cinco subtipos correspondem a >90% dos casos de CMT diagnosticados geneticamente (FRIDMAN et al., 2015; MURPHY et al., 2012a; SAPORTA et al., 2011). No entanto, aproximadamente 40% dos pacientes ainda ficam sem um diagnóstico molecular definitivo (CARROLL et al., 2019; FRIDMAN et al., 2015; MURPHY et al., 2012a; SAPORTA et al., 2011). Esse número é ainda maior quando se trata das formas axonais (CMT2). Pacientes com CMT1 são os mais propensos a receber um diagnóstico genético (>85% dos pacientes), seguidos por aqueles com HSN (30–40%), CMT2 (25–35%) e HMN (15–25%) (CARROLL et al., 2019; FRIDMAN et al., 2015; MURPHY et al., 2012a; SAPORTA et al., 2011). É importante ressaltar que esses números podem ser diferentes, dependendo da população de estudo. Por exemplo, estudos populacionais realizados na Itália, Espanha e Finlândia, mostraram que alterações no gene *GDAP1* são muito mais frequentes que alterações no gene *MFN2* (AURANEN et al., 2013; MANGANELLI et al., 2014; PEZZINI et al., 2016; SIVERA et al., 2013). Portanto, essa informação deve ser considerada ao analisar pacientes de origens étnicas específicas, e a abordagem diagnóstica deve ser adaptada de acordo com o local de estudo.

A estratégia clássica para o diagnóstico genético da CMT, que é realizada através de uma análise sequencial de genes candidatos, (teste para duplicação/deleção do gene *PMP22* seguidos por sequenciamento de Sanger para genes específicos) está sendo amplamente substituída pelos sequenciamentos de nova geração (NGS), especialmente nos subtipos mais heterogêneos como CMT2. Isso porque, com a crescente descoberta de novos genes relacionados a CMT (>120) juntamente com a heterogeneidade clínica e fenotípica da doença, fica inviável realizar teste sequencial, gene a gene, pela metodologia de Sanger (PIPIS et al., 2019).

Dois estudos realizados no Brasil, mostraram que o sequenciamento de nova geração é uma ferramenta eficiente para diagnóstico das neuropatias hereditárias. O primeiro, realizado pelo nosso grupo, mostrou que o WES (*whole exome sequencing*) foi capaz de diagnosticar 43,3% dos 30 pacientes com CMT avaliados (TOMASELLI, 2018). Já o segundo, realizado por um grupo no sul do Brasil, mostrou que um painel



gênico (104 genes relacionados às neuropatias hereditárias), foi capaz de diagnosticar 45,4% de 11 pacientes com CMT2 (PADILHA et al., 2020). É importante ressaltar que ambos consideraram apenas as variantes patogênicas e provavelmente patogênicas como diagnóstico molecular definitivo. Existem outros estudos que mostraram a eficácia de utilizar WES na prática clínica para diagnóstico molecular em pacientes com neuropatias hereditárias, incluindo CMT. Os principais benefícios são um aumento no percentual de pacientes que recebem um diagnóstico molecular definitivo além da diminuição do custo e tempo de diagnóstico (CHOI et al., 2012; DREW et al., 2015; HARTLEY et al., 2018; LEE et al., 2019; SCHABHÜTTL et al., 2014; VISSERS et al., 2017).

O teste genético é extremamente importante pois estabelece um diagnóstico preciso (principalmente em pacientes esporádicos), pode evitar a necessidade de realizar outros testes caros e/ou dolorosos, confirma padrão de herança e permite um aconselhamento genético mais eficaz. Além disso, o diagnóstico genético pode fornecer informações prognósticas, melhorar a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da doença e possibilitar a seleção de pacientes para participação em ensaios e pesquisas terapêuticas.

#### **1.4.1 Tecnologias utilizadas para diagnóstico molecular em CMT**

Como citado anteriormente, existem diversas técnicas de biologia molecular disponíveis e, um dos pontos a se levar em questão na hora de escolher a melhor técnica é o tipo de alteração que você espera/quer encontrar no genoma do paciente. Em CMT já foram descritas variantes do tipo estrutural (CNVs – duplicação e deleção), indels e SNVs (DIVINCENZO et al., 2014).

Para detectar duplicação e deleção em genes, algumas das técnicas moleculares disponíveis incluem a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), hibridização in situ por fluorescência (FISH) e a amplificação multiplex de sondas dependente de ligação (MLPA) (CANTSILIERIS; BAIRD; WHITE, 2013; SILVEIRA-MORIYAMA; PACIORKOWSKI, 2018).

Para pesquisa de SNVs e indels (<49 pb) o mais utilizado é o sequenciamento de Sanger e NGS. Os sequenciadores de DNA são equipamentos que permitem a

determinação da ordem exata dos nucleotídeos (A, T, C e G) em uma sequência de DNA. A principal diferença entre as duas metodologias é o volume do sequenciamento. Enquanto o método Sanger sequencia apenas um único fragmento de DNA por vez, o NGS consegue sequenciar milhões de fragmentos de forma simultânea em uma única corrida (MARDIS, 2011).

O sequenciamento de Sanger, também conhecido como sequenciamento dideoxi ou de eletroforese capilar, é a técnica molecular mais utilizada e considerada “padrão ouro” no diagnóstico molecular, porém apresenta algumas limitações quando se trata de doenças heterogêneas, como é o caso da CMT.

#### 1.4.1.1 Sequenciamentos de nova geração

Sequenciamentos de nova geração (NGS), também conhecidos como sequenciamento massivamente paralelo ou de alto rendimento (*high-throughput*), são termos coletivamente usados para descrever as tecnologias de sequenciamento que vieram pós Sanger (MUZZEY; EVANS; LIEBER, 2015). Eles são capazes de sequenciar, simultaneamente, milhões de fragmentos de DNA de uma forma eficiente e precisa. Esse sequenciamento pode ser de todo o genoma (WGS - whole genome sequencing), das regiões codificadoras de proteínas (todo o exoma – WES - whole exome sequencing) ou apenas de genes e/ou regiões específicas para determinada doença (painéis multigênicos) (PIPIS et al., 2019).

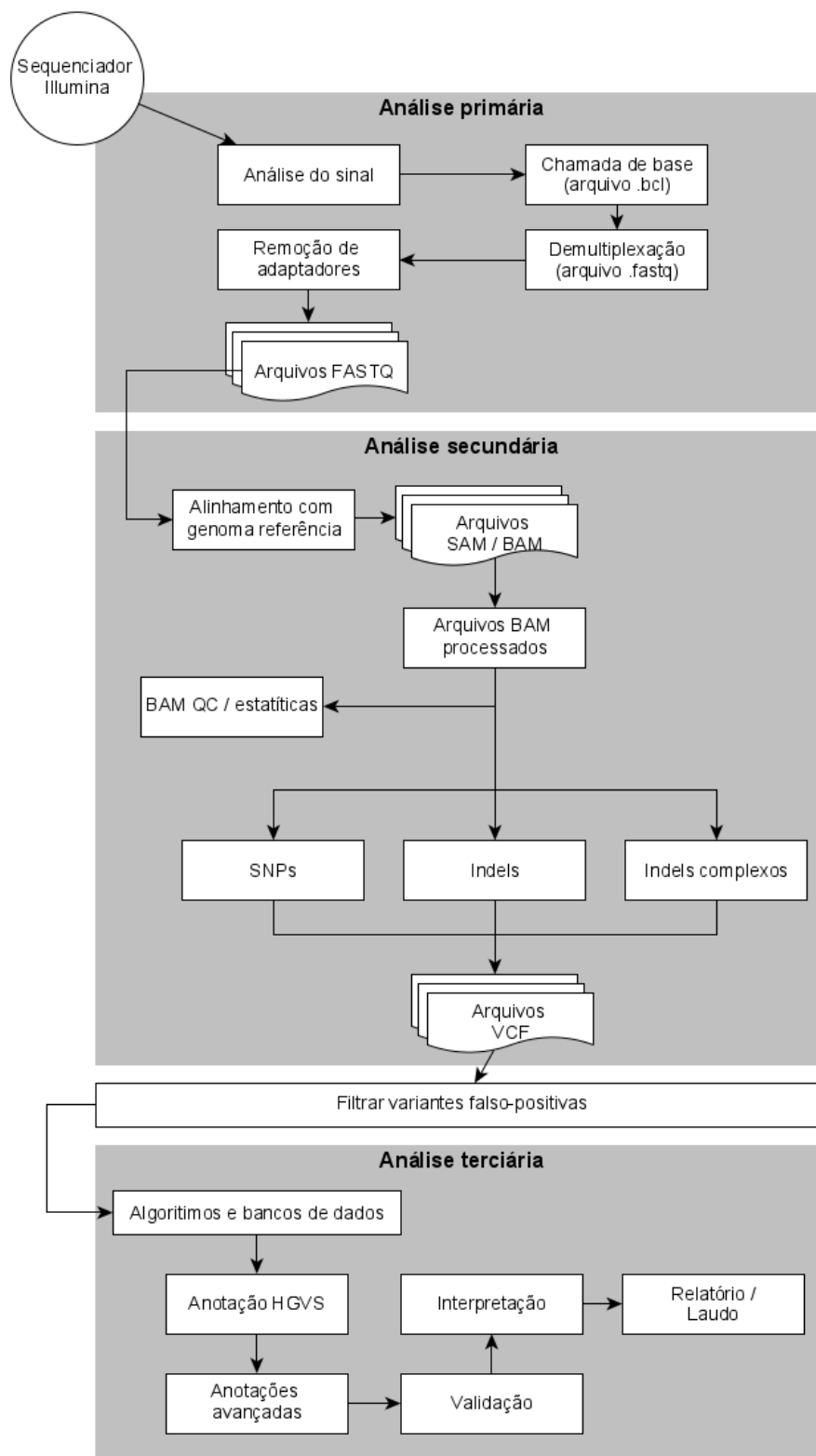
Existem diversos sequenciadores de nova geração disponíveis no mercado e as principais metodologias são: (i) pirosequenciamento (454-Roche®); (ii) sequenciamento por ligação e detecção de oligonucleotídeo (SOLiD - Applied BioSystems®); (iii) metodologia de semicondutores (Ion Torrent - Life Technologies®); (iv) sequenciamento por sínteses (SBS - Illumina®) e; (v) sequenciamento de moléculas únicas (Pacific Biosciences® e o Oxford Nanopore®). O método mais comumente usado, que também será utilizado nesse trabalho, é o SBS da Illumina®.

Independentemente da plataforma ou metodologia utilizada, todo o processo, de uma forma geral, pode ser resumido em 4 etapas principais, com exceção dos sequenciadores de moléculas únicas. São elas, (i) extração e fragmentação do DNA; (ii) preparação da biblioteca; (iii) enriquecimento; (iv) sequenciamento (YOHE; THYAGARAJAN, 2017).

O maior desafio em se trabalhar com essa tecnologia está nas etapas subsequentes, que são, análise e interpretação dos dados. Os sequenciadores geram uma infinidade de dados, que são os chamados dados brutos, que precisam passar por uma série de processos de bioinformática capazes de transformar sinais em dados, dados em informações interpretáveis e essas informações em conhecimento (OLIVER; HART; KLEE, 2015). Esse processo pode ser classificado em 3 etapas: (i) A análise primária: inclui as etapas de demultiplexação e chamada de bases. Este processo consiste em transformar os sinais brutos gerados pelo sequenciador em sequências curtas de nucleotídeos (reads) juntamente com as informações de qualidade da base sequenciada; (ii) Análise secundária: compreende a etapa de alinhamento das reads a um genoma de referência (ou montagem *de novo*) seguido pela detecção das variantes na amostra; (iii) Análise terciária: consiste em anotação das variantes encontradas na etapa anterior, para tentar determinar seu significado biológico, permitindo posteriormente a priorização e interpretação das variantes (OLIVER; HART; KLEE, 2015; YOHE; THYAGARAJAN, 2017).

Toda essa informação deve estar representada em um pipeline, que nada mais é do que algoritmos de bioinformática executados em uma sequência predefinida para o processamento dos dados de NGS (ROY et al., 2018). A Figura 1-3 ilustra resumidamente esse processo, incluindo os principais arquivos gerados em cada etapa. Esses pipelines são personalizáveis com base nas necessidades de cada laboratório. São diversos os algoritmos de bioinformática utilizados durante o processo de análise dos dados, e a maioria estão disponíveis de forma gratuita, em diversas linguagens de programação.

Figura 1-3: Pipeline de bioinformática utilizado para análise de dados de NGS.



Fonte: Elaborada pela autora. Adaptado de: Oliver, Hart e Klee (2015) e Roy et al. (2018).  
 Notas (abreviações – ordem alfabética): BAM QC: Controle de qualidade arquivos BAM; HGVS: Human genome variation Society; Indels: Inserções e deleções; SNPs: Single-nucleotide polymorphism (Polimorfismo de nucleotídeo único); VCF: variant call format.

#### 1.4.1.2 Anotação, interpretação e classificação das variantes

O uso das tecnologias de NGS melhorou muito a capacidade de diagnosticar doenças genéticas raras, porém, também aumentou muito o número de variantes encontradas em um paciente. Normalmente, experimentos de WGS geram 3 milhões de variantes enquanto WES geram ~200 mil a ~400 variantes (FRIDMAN; REILLY, 2015; ZHANG et al., 2020). Sendo assim, a classificação e interpretação correta do significado clínico das variantes é um processo crítico para um bom diagnóstico genético e conduta clínica mais adequada. Em 2015, o Colégio Americano de Genética Médica e Genômica (ACMG) e a Associação de Patologia Molecular (AMP) publicaram algumas diretrizes e recomendações para interpretação e classificação das variantes na prática clínica (RICHARDS et al., 2015). Eles definiram um sistema de terminologia em 5 níveis para classificar as variantes como (i) patogênicas; (ii) provavelmente patogênicas; (iii) variantes de significado incerto (VUS); (iv) provavelmente benignas e; (v) benignas. Para isso, é necessário levar em consideração diversos critérios e parâmetros que são obtidos através de observações clínicas, pesquisas na literatura e bancos de dados.

A maioria desses parâmetros são adicionados às variantes encontradas durante o processo de anotação. Abaixo seguem algumas das informações importantes que podem ser adicionadas às variantes:

- i. Informações estruturais: Informar em qual(ais) gene(s), transcritos, éxon, íntron, regiões regulatórias etc., a variante está localizada. Além disso, também são fornecidas informações se houve ou não alteração na sequência de aminoácidos (nomenclatura HGVS), possibilitando a classificação do tipo de variante (missense, nonsense, sinônimas etc.). Por exemplo, variantes nonsense têm maior probabilidade de serem patogênicas do que variantes missense. É importante ressaltar que um gene pode produzir mais de um transcrito e isso pode gerar diferentes anotações para uma mesma variante (OLIVER; HART; KLEE, 2015).
- ii. Informações funcionais: Irá fornecer informações sobre o impacto da variante na estrutura da proteína e/ou diferentes transcritos e conservação do aminoácido em diferentes espécies.

- iii. Informações de bancos de dados: Irão fornecer algumas informações importantes sobre a variante encontrada. Essas informações podem ser:
- iv. Bancos de dados de frequência populacional: Variantes comuns (que tem uma alta frequência) na população geral, não têm relevância biológica no contexto de um ensaio clínico (OLIVER; HART; KLEE, 2015). Essa informação é extremamente útil para remover polimorfismos benignos da lista de variantes. Existem alguns projetos que sequenciaram amostras de diversos indivíduos considerados saudáveis, e esses dados estão disponíveis para consulta em bancos de dados como por exemplo, 1000 Genomes, NHLBI (National Heart, Lung e Blood Institute), ExAC, GnomAD e ABraOM (sendo esse, último um banco de dados específico da população brasileira) (AUTON et al., 2015; FU et al., 2013; KARCZEWSKI et al., 2020; LEK et al., 2016; NASLAVSKY et al., 2017).
- v. Bancos de dados específicos de mutação/doença: Esses bancos geralmente contêm informações sobre variantes encontradas em pacientes com doença e sua avaliação de patogenicidade. Porém, é importante ressaltar que essas variantes podem estar classificadas de forma incorreta (RICHARDS et al., 2015). Na tentativa de minimizar esses erros, foi criado o banco de dados ClinVar que tem como objetivo compilar as variações genéticas, juntamente com as respectivas interpretações do seu significado clínico. Alguns dos bancos de dados utilizados para consulta são: OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), HGMD (Human gene mutation database), DisGeNET, dbSNP (the Single Nucleotide Polymorphism Database), Ensembl Variation database etc.
- vi. Outras informações importantes: Informações sobre o gene, padrão de herança, fenótipo do paciente e análise de segregação (RICHARDS et al., 2015). A doença de CMT classicamente se manifesta como uma neuropatia sensitivo-motora comprimento dependente, porém, existem algumas características clínicas adicionais que podem ajudar a diferenciar entre os vários subtipos genéticos e a determinar a patogenicidade de novas variantes descobertas. Por exemplo, a presença de espasticidade (sugere variantes nos genes *BSCL2* ou *KIF5A*), atrofia óptica (sugerindo variantes *MFN2*) e envolvimento das cordas vocais (sugerindo variantes nos genes *GDAP1*, *TRPV4*, *SLC5A7* ou *DCTN1*) (PIPIS et al., 2019)

---

Esse processo é realizado, na maioria das vezes, por ferramentas computacionais que irão extrair informações da literatura e de diversos bancos de dados e adicioná-las às variantes encontradas. A maioria delas se concentram na anotação de SNVs e INDELS, pois são mais facilmente identificados, e algumas mais recentes também fazem anotação de CNVs (PABINGER et al., 2014). Existem várias ferramentas de anotação disponíveis e as mais usadas são SnpEff (CINGOLANI et al., 2012), ANNOVAR (WANG; LI; HAKONARSON, 2010) e Variant Effect Predictor (VEP) (MCLAREN et al., 2016).

## **2. JUSTIFICATIVA**

A doença de Charcot-Marie-Tooth é o grupo de doenças neuromusculares mais frequente entre crianças e adolescentes, porém, não existem muitos estudos voltados especificamente para essa população. A caracterização fenotípica e genotípica dessa população é extremamente importante para que o diagnóstico clínico e genético desta faixa etária possa ser bem definido e realizado de forma precisa e sistematizada possibilitando maior agilidade no diagnóstico definitivo e que estudos da história natural da doença possam ser iniciados. Ademais, a caracterização genotípica irá fornecer um melhor conhecimento da epidemiologia molecular nessa faixa etária.

O diagnóstico genético tem um impacto significativo tanto para os pacientes afetados quanto para seus familiares. Além de melhorar a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da doença pode possibilitar a seleção de pacientes para participação em futuros ensaios e pesquisas terapêuticas. Apesar de ainda não existir um tratamento específico para as formas de CMT, as crianças e adolescentes parecem ser o principal grupo alvo, já que a degeneração axonal ainda não ocorreu ou está em fase inicial de instalação.



---

## **3.OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO PRINCIPAL**

O objetivo principal do presente estudo será caracterizar genotipicamente a doença de Charcot-Marie-Tooth axonal (CMT2) em pacientes pediátricos (com idade igual ou inferior a 20 anos na primeira consulta) utilizando plataformas de sequenciamento de nova geração (painel multigênico e sequenciamento de todo exoma).

### **3.2 OBJETIVOS GERAIS**

1. Definir a epidemiologia molecular de uma amostra de pacientes brasileiros pediátricos com CMT2;
2. Avaliar a eficácia do NGS no diagnóstico molecular desta população específica (CMT2 de início infantil);
3. Propor uma estratégia de diagnóstico molecular específico para as formas axonais de CMT2;

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O presente estudo passou por análise e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP), de acordo com o processo de HCRP nº de HCRP nº 3924/2915 (A doença de Charcot-Marie-Tooth na Criança – Aspectos Genotípicos e Fenotípicos).

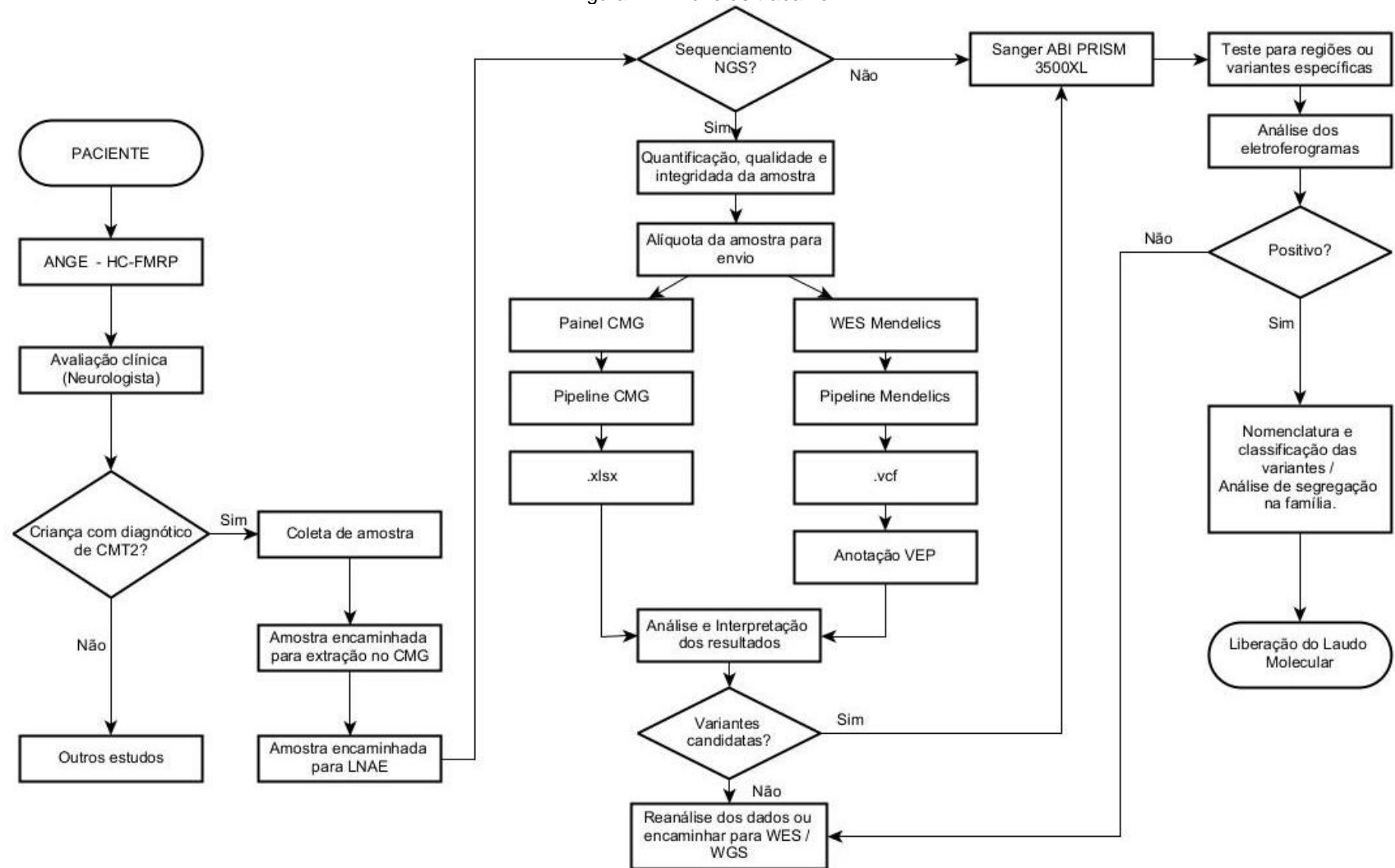
### **4.2 FLUXO DE TRABALHO (DELINEAMENTO EXPERIMENTAL)**

Foram coletadas amostras de crianças e adolescentes com diagnóstico clínico sugestivo de neuropatia sensitivo motora axonal que consultaram no ambulatório de Neurogenética do HC-FMRP até dezembro de 2020. Logo após a coleta, as amostras eram diretamente encaminhadas para o Centro de Medicina Genômica (CMG) para extração do DNA. Em seguida, as amostras eram encaminhadas ao Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental (LNAE), onde foram realizados alguns procedimentos, para posteriormente envio aos centros para realização de NGS. Os centros envolvidos neste trabalho foram:

- i. CMG, onde foi realizado sequenciamento de painel multigênico;
- ii. Laboratório Mendelics, onde foi realizado o sequenciamento de todo o Exoma (WES).

As primeiras análises dos dados gerados pelos sequenciadores de nova geração foram realizadas por cada centro, cada um com seu próprio pipeline. Os dados eram então enviados ao nosso laboratório para posteriores análises e interpretação dos resultados. Todas as variantes candidatas encontradas por NGS foram confirmadas e validadas por Sanger. Abaixo, segue um fluxograma ilustrando a distribuição dos procedimentos (Figura 4-1).

Figura 4-1: Fluxo de trabalho.



Fonte: Elaborada pela autora.

Notas: CMG: Centro de medicina genômica; LNAE: Laboratório de neurologia aplicada e experimental; NGS: Sequenciamento de nova geração; WES: *Whole genome sequencing* (sequenciamento de todo o genoma); VEP: *Ensembl Variant Effect Predictor*; WGS: *Whole genome sequencing* (sequenciamento de todo o genoma).

### 4.3 PACIENTES E FAMILIARES

Foram selecionados pacientes com até 20 anos no momento do primeiro atendimento, com diagnóstico clínico-neurofisiológico sugestivo de neuropatia hereditária sensitivo motora axonal (HMSN2) que deram entrada no Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental (LNAE) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP/USP) até dezembro de 2020.

Na literatura, as definições de idade e as etapas do ciclo de vida de uma pessoa são arbitrárias e podem ser influenciadas pela cultura e pelo contexto. Segundo a Organização Mundial da saúde, é considerado criança ou adolescente, pessoas com até 19 anos de idade (WHO, 2020) enquanto o Estatuto da Criança e do Adolescente (ECA) considera até os 18 anos de idade (ECA, 1990). Um estudo mais recente sugeriu que essa idade deveria se estender até os 24 anos pois se adapta melhor ao desenvolvimento dos adolescentes hoje em dia (SAWYER et al., 2018). Considerando esses dados, nós optamos por selecionar pacientes com idade igual ou inferior a 20 anos no momento da primeira consulta e algumas vezes, esse grupo será denominado de CMT pediátrico.

Além disso, nós coletamos amostra dos familiares do paciente índice, quando possível, para podermos realizar o estudo de segregação na família.

#### 4.3.1 Critérios de inclusão

Foram considerados os seguintes critérios de inclusão:

1. Crianças com idade igual ou inferior a 20 anos na data da primeira consulta;
2. Diagnóstico clínico de neuropatia hereditária sensitivo motora;
3. Eletroneuromiografia compatível com padrão axonal;
4. Sem diagnóstico molecular definido;

5. Os pais tenham concordado em participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A, página 165).

#### 4.3.2 Critérios de não inclusão

Foram considerados os seguintes critérios de não inclusão ao estudo:

1. Outros subtipos de CMT;
2. Resultado molecular já definido;
3. Não concordância com a participação do estudo.

#### 4.3.3 Avaliação clínica

As informações clínicas dos pacientes foram obtidas a partir da revisão dos prontuários médicos dos pacientes que consultaram no Ambulatório de Neurogenética do HCFMRP-USP até dezembro de 2020. Nem todos os pacientes tinham todos os dados desejados e, devido a pandemia, não foi possível fazer a convocação. A avaliação clínica é feita de acordo com a ficha de avaliação de neuropatias hereditárias do Ambulatório de Neurogenética juntamente com o CMT *Neuropathy score* (CMTNS) (SHY et al., 2005), apresentados nos anexos B e C, respectivamente (Anexos B e C, páginas 168 e 177). O CMTNS foi classificado em leve (CMTNS 0-10), moderado (CMTNS 11-20) e grave (CMTNS maior que 21).

Os critérios utilizados para classificar a neuropatia como sendo axonal foram: velocidade de condução dos nervos ulnar (MNCV<sub>u</sub>) e/ou mediano (MNCV<sub>m</sub>) >38 m/s e redução da amplitude dos potenciais de ação muscular compostos (PAMC) e dos potenciais de ação sensitivos (PANS).

## 4.4 LABORATÓRIO

As técnicas de biologia molecular utilizadas neste trabalho foram o sequenciamento de Sanger, sequenciamento de regiões específicas do genoma (painel multigênico) e sequenciamento de todo o Exoma (WES).

### 4.4.1 Coleta de material e extração do DNA

Foram coletadas aproximadamente 10 mL de sangue periférico dos pacientes para extração do DNA genômico (gDNA), utilizando-se o sistema de coleta a vácuo em tubos Vacutainer™ com anticoagulante EDTA.

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

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

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

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

detergente; (ii) ligação dos ácidos nucleicos a partículas de sílica magnetizadas; (iii) lavagem das partículas ligadas, isolando-as dos outros componentes celulares; (iv) e eluição de ácidos nucleicos.

#### 4.4.2 Quantificação, pureza e integridade das amostras

A obtenção de um material genético de alta qualidade é uma etapa essencial para a realização de testes moleculares. A obtenção de um gDNA puro e íntegro tem impacto direto nos resultados das técnicas de sequenciamento, principalmente nos sequenciamentos de nova geração. Para verificar a integridade e pureza do DNA extraído nós utilizamos, respectivamente, as técnicas de gel de agarose e espectrofotometria. As amostras que não passaram em um dos testes de qualidade foram excluídas do trabalho e, quando possível, os pacientes foram solicitados a coletar nova amostra.

- i. Quantificação e pureza: Foram verificadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific®). A espectrofotometria é um método que se utiliza da interação entre a luz e a matéria, para medir de forma quantitativa, a concentração de determinadas moléculas em uma solução. Ou seja, a concentração de uma substância absorvente presente em uma solução é proporcional à quantidade de luz absorvida. As moléculas de ácido nucleico (DNA e RNA) absorvem luz em um comprimento de onda de 260 nm. Quanto maior for a absorção de luz nesse comprimento de onda, maior será a concentração de DNA na solução. O cálculo da concentração é feito utilizando-se a equação de Beer-Lambert e o resultado é dado em ng/ul. As amostras foram alíquotadas em eppendorfs de 0,5 mL a uma concentração aproximada de 50 ng/uL. Todas as amostras utilizadas nesse trabalho, foram diluídas, quando necessário, com água destilada ultrapura DNase, RNase free (Invitrogen™) até atingir a concentração desejada. Além disso, existem duas medidas usadas para avaliar a pureza do DNA na amostra que são as razões das absorbâncias 260/280 e 260/230. Valores de 1,8 (260/280) e 2,0 (260/230) indicam pureza do DNA. Se a razão for menor em qualquer um deles pode indicar a presença de contaminantes na amostra como proteínas, fenol, EDTA

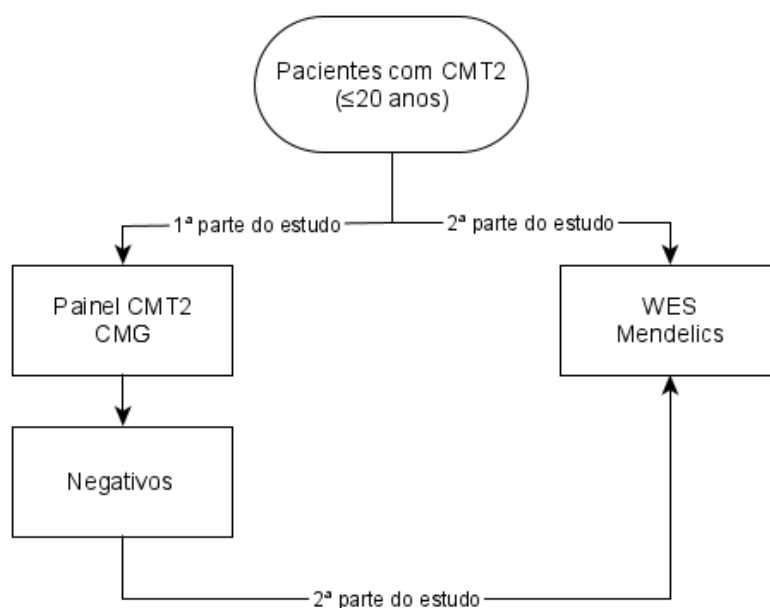
etc. Os valores estabelecidos para a seleção das amostras foram de 1,8 - 2,0 nm para a razão 260/280 e 2,0 - 2,2 nm para razão 260/230.

- ii. Integridade do DNA no gel de agarose: Essa técnica permite ver se o DNA total está íntegro ou sofreu quebras durante o processo de extração. Para isso nós aplicamos 12  $\mu$ L de uma alíquota diluída da amostra DNA em um gel de agarose a 1%. Maiores detalhes dessa técnica estão em Apêndice A (página 128).

#### 4.4.3 Escolha da técnica de sequenciamento e envio das amostras

Na primeira parte do estudo, os pacientes selecionados foram submetidos a estudo por painel multigênico contendo 51 genes sabidamente causadores de neuropatia sensitivo motora axonal (Tabela 4-2). Durante o desenvolvimento do estudo, percebeu-se que os custos de um exoma diminuíram muito, fazendo que o custo/benefício do exoma o transformasse na técnica ideal a ser utilizada. Sendo assim, na segunda parte do estudo, os pacientes selecionados juntamente com aqueles que haviam sido negativos no painel CMT2 foram enviados para o sequenciamento de todo o exoma em laboratório comercial (Mendelics – SP) e interpretado localmente (Figura 4-2).

Figura 4-2: Fluxograma da distribuição das amostras



Fonte: Elaborada pela autora.



#### 4.4.4 Painel – CMG

##### 4.4.4.1 Desenho do painel

Foi criado um painel com 51 genes associados a causas conhecidas de CMT axonal utilizando o software DesignStudio da Illumina (Tabela 4-2). Os genes foram selecionados após pesquisas extensas na literatura e bancos de dados específicos disponíveis online (Tabela 4-1). No total, foram sintetizadas 996 sondas.

Tabela 4-1: Sites usados para seleção de genes do painel CMT2

Sites	
<b>DesignStudio (Illumina)</b>	<a href="https://designstudio.illumina.com/">https://designstudio.illumina.com/</a>
<b>PanelApp</b>	<a href="https://panelapp.genomicsengland.co.uk/">https://panelapp.genomicsengland.co.uk/</a>
<b>OMIM</b>	<a href="https://www.omim.org/">https://www.omim.org/</a>
<b>Neuromuscular</b>	<a href="https://neuromuscular.wustl.edu/naltbrain.html">https://neuromuscular.wustl.edu/naltbrain.html</a>

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 4-2: Genes selecionados para o painel CMT2.

(Continua)

Símbolo	Nome	Localização Cromossômica
<b>AARS1</b>	Alanyl-Trna Synthetase 1	16q22.1
<b>AIFM1</b>	Apoptosis Inducing Factor Mitochondria Associated 1	Xq26.1
<b>ARHGEF10</b>	Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 10	8p23.3
<b>BSCL2</b>	'Bsc12 Lipid Droplet Biogenesis Associated, Seipin	11q12.3
<b>COX6A1</b>	Cytochrome C Oxidase Subunit 6a1	12q24.31
<b>DCAF8</b>	Ddb1 And Cul4 Associated Factor 8	1q23.2
<b>DHTKD1</b>	Dehydrogenase E1 And Transketolase Domain Containing 1	10p14
<b>DNAJB2</b>	Dnaj Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B2	2q35
<b>DNM2</b>	Dynamamin 2	19p13.2
<b>DYNC1H1</b>	Dynein Cytoplasmic 1 Heavy Chain 1	14q32.31
<b>GAN</b>	Gigaxonin	16q23.2
<b>GARS1</b>	Glycyl-Trna Synthetase	7p14.3

Fonte: Elaborada pela autora. Adaptada de Tweedie et al. (2021).

Tabela 4-2: Genes selecionados para o painel CMT2.

(Continuação)

<b>Símbolo</b>	<b>Nome</b>	<b>Localização Cromossômica</b>
<b>GDAP1</b>	Ganglioside Induced Differentiation Associated Protein 1	8q21.11
<b>GJB1</b>	Gap Junction Protein Beta 1	Xq13.1
<b>GJB3</b>	Gap Junction Protein Beta 3	1p34.3
<b>GNB4</b>	G Protein Subunit Beta 4	3q26.33
<b>HARS</b>	Histidyl-Trna Synthetase 1	5q31.3
<b>HINT1</b>	Histidine Triad Nucleotide Binding Protein 1	5q23.3
<b>HSPB1</b>	Heat Shock Protein Family B (Small) Member 1	7q11.23
<b>HSPB3</b>	Heat Shock Protein Family B (Small) Member 3	5q11.2
<b>HSPB8</b>	Heat Shock Protein Family B (Small) Member 8	12q24.23
<b>IFRD1</b>	Interferon Related Developmental Regulator 1	7q31.1
<b>IGHMBP2</b>	Immunoglobulin Mu DNA Binding Protein 2	11q13.3
<b>INF2</b>	Inverted Formin 2	14q32.33
<b>KARS1</b>	Lysyl-Trna Synthetase 1	16q23.1
<b>KIF1A</b>	Kinesin Family Member 1A	2q37.3
<b>KIF5A</b>	Kinesin Family Member 5A	12q13.3
<b>LMNA</b>	Lamin A/C	1q22
<b>LRSAM1</b>	Leucine Rich Repeat And Sterile Alpha Motif Containing 1	9q33.3-q34.11
<b>MARS1</b>	Methionyl-Trna Synthetase 1	12q13.3
<b>MED25</b>	Mediator Complex Subunit 25	19q13.33
<b>MFN2</b>	Mitofusin 2	1p36.22
<b>MME</b>	Membrane Metalloendopeptidase	3q25.2
<b>MORC2</b>	MORC Family CW-Type Zinc Finger 2	22q12.2
<b>MPZ</b>	Myelin Protein Zero	1q23.3
<b>NEFL</b>	Neurofilament Light	8p21.2
<b>PDK3</b>	Pyruvate Dehydrogenase Kinase 3	Xp22.11
<b>PLA2G6</b>	Phospholipase A2 Group VI	22q13.1
<b>PLEKHG5</b>	Pleckstrin Homology And Rhogef Domain Containing G5	1p36.31
<b>PMP22</b>	Peripheral Myelin Protein 22	17p12
<b>PRPS1</b>	Phosphoribosyl Pyrophosphate Synthetase 1	Xq22.3
<b>RAB7A</b>	RAB7A, Member RAS Oncogene Family	3q21.3
<b>SH3TC2</b>	SH3 Domain And Tetratricopeptide Repeats 2	5q32
<b>TDP1</b>	Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1	14q32.11
<b>TFG</b>	Trafficking From ER To Golgi Regulator	3q12.2
<b>TGFB1</b>	Transforming Growth Factor Beta 1	19q13.2
<b>TRIM2</b>	Tripartite Motif Containing 2	4q31.3
<b>TRPV4</b>	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 4	12q24.11
<b>TUBB3</b>	Tubulin Beta 3 Class III	16q24.3
<b>VCP</b>	Valosin Containing Protein	9p13.3
<b>YARS1</b>	Tyrosyl-Trna Synthetase 1	1p35.1

Fonte: Elaborada pela autora. Adaptada de Tweedie et al. (2021).

#### 4.4.4.2 Preparação da biblioteca

Para a preparação da biblioteca, foi usado o kit TruSeq® Custom Amplicon v1.5 (Illumina®) seguindo o protocolo recomendado, que incluem as seguintes etapas:

- i. Hibridação das sondas sintetizadas upstream e downstream da região de interesse;
- ii. Remoção das sondas não ligadas ao gDNA utilizando um filtro que faz a seleção dos fragmentos por tamanho;
- iii. Adição de uma DNA polimerase e uma DNA ligase para fazer a extensão e ligação das sondas hibridizadas na região alvo;
- iv. Amplificação dos fragmentos de interesse, juntamente com a adição de adaptadores (P5 e P7) que serão necessários, posteriormente para a geração dos clusters;
- v. Limpeza da biblioteca utilizando microesferas magnéticas (beads);
- vi. Normalização das bibliotecas;
- vii. Finalizado este processo, as bibliotecas estão prontas para ser sequenciadas e a placa pode ser devidamente selada e guardada por até 30 dias a uma temperatura de -25°C a -15°C.
- viii. Misturar volumes iguais das bibliotecas normalizadas em um único tubo. Após a mistura, diluir e desnaturar a biblioteca antes de colocá-la no sequenciador.

#### 4.4.4.3 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado no equipamento MiSeq® (Illumina®) com o kit MiSeq Reagent Micro v2. Esse kit fornece reagentes para até 325 ciclos de sequenciamento e tem capacidade de gerar 1,2 Gb de dados. O sequenciamento foi do tipo paired-end (2x150) com cobertura média de 200 vezes com 24 amostras por corrida. O sequenciamento é um processo completamente automatizado e pode ser monitorado pela tela Sequencing do aparelho ou remotamente usando o aplicativo Sequencing Analysis Viewer (SAV).

#### 4.4.4.4 Análise bioinformática

Na análise do painel de amplicon foi utilizado o programa FastQC para verificação da qualidade das amostras sequenciadas. A remoção de adaptadores e o filtro por

qualidade de sequência foram feitos com o programa Trim Galore. O genoma humano utilizado como referência no mapeamento das reads foi o GRCh37.75 e o BWA mem foi o programa utilizado no mapeamento (LI; DURBIN, 2009). Para o processamento do arquivo mapeado foi utilizado o programa Picard (sam para bam, análise de cobertura). A remoção dos primers dos arquivos mapeados foi feita com o programa BAMClipper. A análise germinativa para identificação das variantes foi feita com o programa PIsces e o vcf gerado adaptado com o programa Jacquard para subsequente anotação. A anotação das variantes identificadas foi feita com um script Perl (in-house script) que utiliza o SnpEff e o UMD para predição da anotação e efeito funcional das variantes. Finalmente, é gerado um arquivo .xlsx para interpretação dos resultados.

#### 4.4.5 WES – Mendelics

Os exomas realizados no laboratório Mendelics foram realizados utilizando um kit para captura dos éxons customizado na plataforma Illumina® e sequenciados no equipamento NovaSeq 6000 Illumina®. O sequenciamento foi do tipo paired-end (2x100) com uma cobertura horizontal uniforme superior a 95% dos alvos e cobertura vertical em torno de 100 vezes. As sequências obtidas foram mapeadas ao genoma humano de referência versão GRCh37 até fevereiro de 2020 e, a partir dessa data, com a versão GRCh38 utilizando a ferramenta Burrows-Wheeler Aligner (BWA) (LI; DURBIN, 2009). As análises de bioinformáticas subsequentes até a geração do arquivo .vcf e identificação das CNVs foram realizadas com um script validado internamente, seguindo as recomendações de melhores práticas do Genome Analysis Toolkit (GATK) (© Broad Institute) (MCKENNA et al., 2010).

##### 4.4.5.1 Anotação

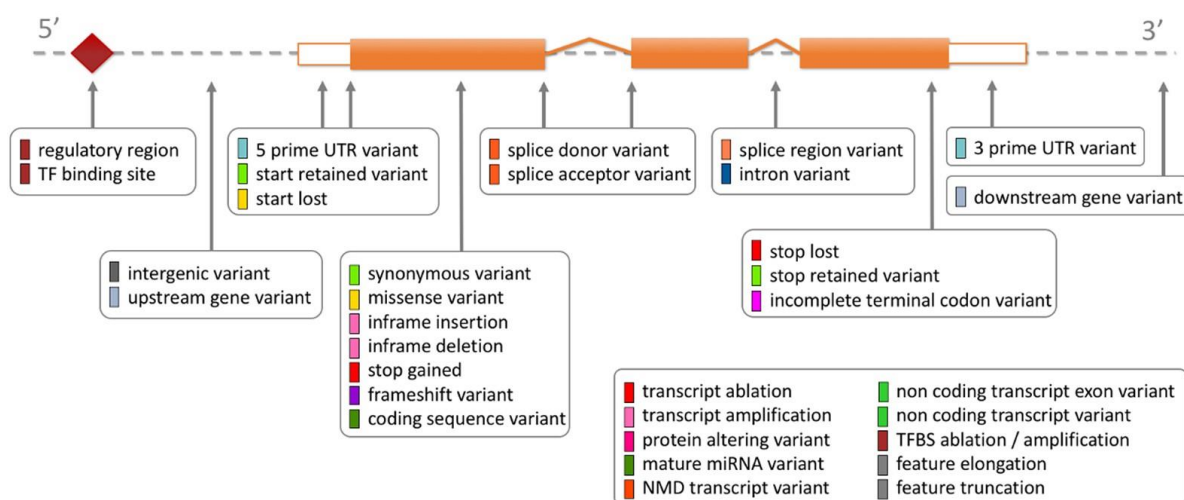
Os arquivos .vcf disponibilizados pelo Laboratório Mendelics, foram anotados utilizando a plataforma VEP (ensembl) utilizando os seguintes parâmetros:

- i. Banco de dados de transcritos: “Ensembl/GENCODE transcripts”;
- ii. Identificadores: “Gene symbol”; “Transcript version”; “Protein”; “HGVS”;

- iii. Bancos de dados de frequência: “Find co-located known variants [yes]”; “1000 Genomes global minor allele frequency”; “gnomAD (exomes) allele frequencies”; “PubMed IDs for citations of co-located variants”;
- iv. Anotações adicionais: “Transcript biotype”; “Exon and intron numbers”; “Transcript support level”; “APPRIS”; “MANE”; “Protein domains”; “Phenotypes”; “DisGeNET”;
- v. Preditores de patogenicidade: “SIFT [Prediction only]”; “PolyPhen [Prediction only]”; “CADD”; “SpliceAI”; “BLOSUM62”.

O VEP é uma plataforma independente que está disponível como uma ferramenta online, gratuita e de interface simples que permite envio (upload) de diversos tipos de arquivo, incluindo os arquivos do tipo .vcf. Ele realiza anotações da maioria dos tipos de variações genômicas em regiões codificantes e não codificantes do genoma (MCLAREN et al., 2016). Os arquivos de saída (output) podem ser do tipo .txt e retornam anotações detalhadas com os possíveis efeitos de cada variante a nível de transcritos, proteínas e regiões regulatórias (MCLAREN et al., 2016). As variantes são anotadas usando a nomenclatura da Human Genome Variation Society (HGVS) e suas possíveis consequências são descritas usando um conjunto padronizado de termos para anotação de variantes que foram definidos em colaboração com o projeto Sequence Ontology (SO) (CUNNINGHAM et al., 2015; DEN DUNNEN et al., 2016).

Figura 4-3: Conjunto de termos utilizados para descrever a consequência de uma variante e sua localização no transcrito.

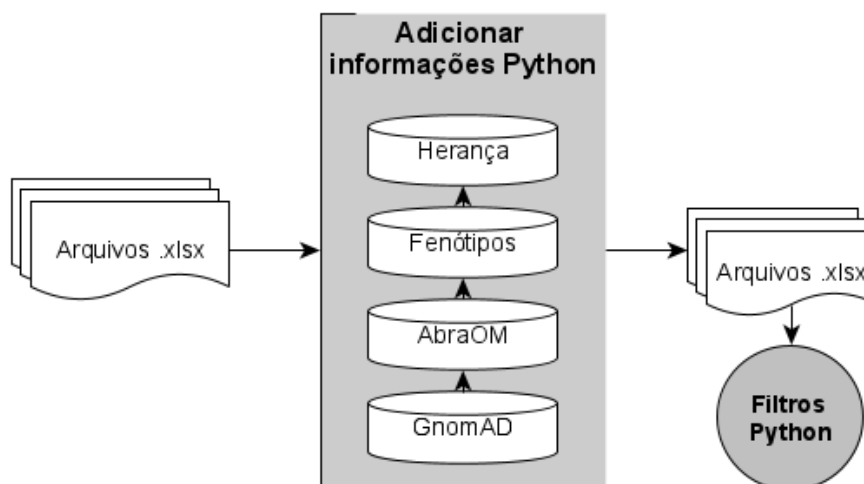


Fonte: Yates et al. (2020). Disponível em: [http://www.ensembl.org/info/genome/variation/prediction/predicted\\_data.html#consequences](http://www.ensembl.org/info/genome/variation/prediction/predicted_data.html#consequences).  
Nota: Acesso entre 2016-2020.

#### 4.4.6 Análise e interpretação dos resultados

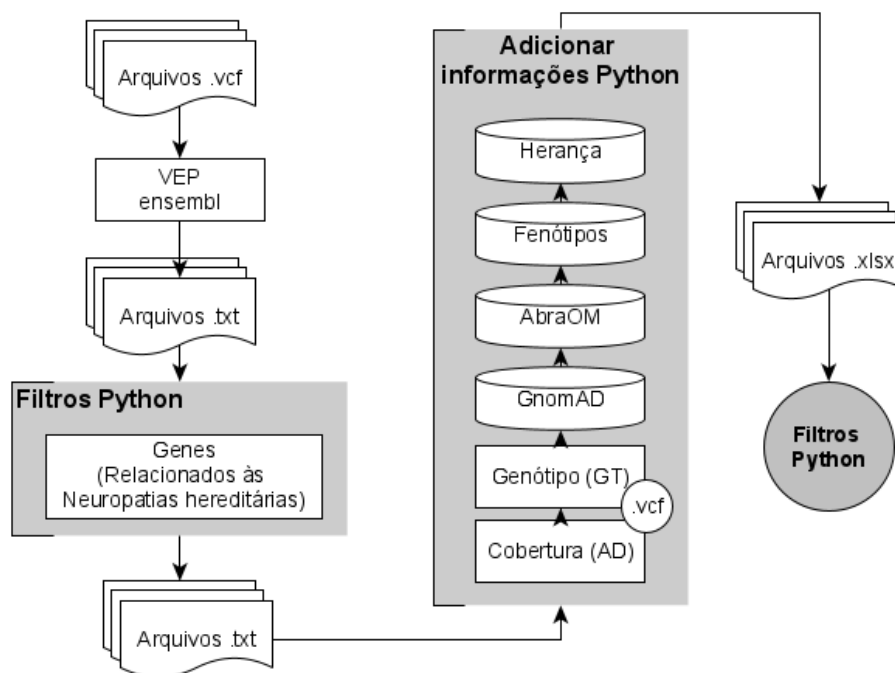
Como citado anteriormente, os sequenciamentos de nova geração realizados nesse trabalho foram feitos em diferentes centros e conseqüentemente, os arquivos finais, disponibilizados por cada um deles, foram diferentes. Os dados provenientes de painel multigênico foram disponibilizados em formato .xlsx com todas as variantes encontradas no paciente já anotadas. Já os dados provenientes do sequenciamento do exoma (realizado em laboratório comercial e interpretado localmente) foram disponibilizados em formato .vcf com todas as variantes encontradas no paciente, porém sem anotação. Sendo assim, foram desenvolvidos dois pipelines para análise de cada um dos experimentos como mostrado nas figuras abaixo (Figura 4-4 e 4-5). Alguns passos do pipeline foram executados utilizando a linguagem de programação Python (versão 3.8). É importante ressaltar que nos arquivos provenientes de exoma, o primeiro passo foi selecionar apenas as variantes localizadas em genes relacionados às neuropatias hereditárias. Lista dos genes selecionados disponível no apêndice B (página 131).

Figura 4-4: Pipeline utilizado para análise dos dados provenientes do painel CMT2.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4-5: Pipeline utilizado para análise dos dados provenientes do Exoma.



Fonte: Elaborada pela autora.

Para iniciar a análise, é necessário a aplicação de filtros para priorizar as variantes com maior probabilidade de serem as responsáveis pelo fenótipo do paciente. A primeira pesquisa realizada nesse trabalho, para todos os pacientes, foi a busca por variantes que já foram descritas na literatura como patogênicas e que estão relacionadas com o fenótipo de CMT2. Posteriormente, para os pacientes que não apresentaram alterações conhecidamente patogênicas, foi realizado uma série sequencial de filtros (Figura 4-6), seguido por análise cuidadosa de interpretação e classificação das possíveis variantes patogênicas (Item 4.4.7). De uma maneira geral, os filtros usados nesse trabalho foram os seguintes:

- i. Localização das variantes: estima-se que 85% das variantes patogênicas presentes no genoma humano, estão localizadas nas regiões codificadoras de proteína, ou seja, nos éxons (MAJEWSKI et al., 2011). Sendo assim foram removidas as variantes localizadas fora dos éxons (regiões intrônicas, intergênicas, UTR3', UTR5' etc.);
- ii. Consequência: As variantes com alto a moderado impacto de causar dano a proteína, como por exemplo, alterações do tipo não sinônimas (missense,

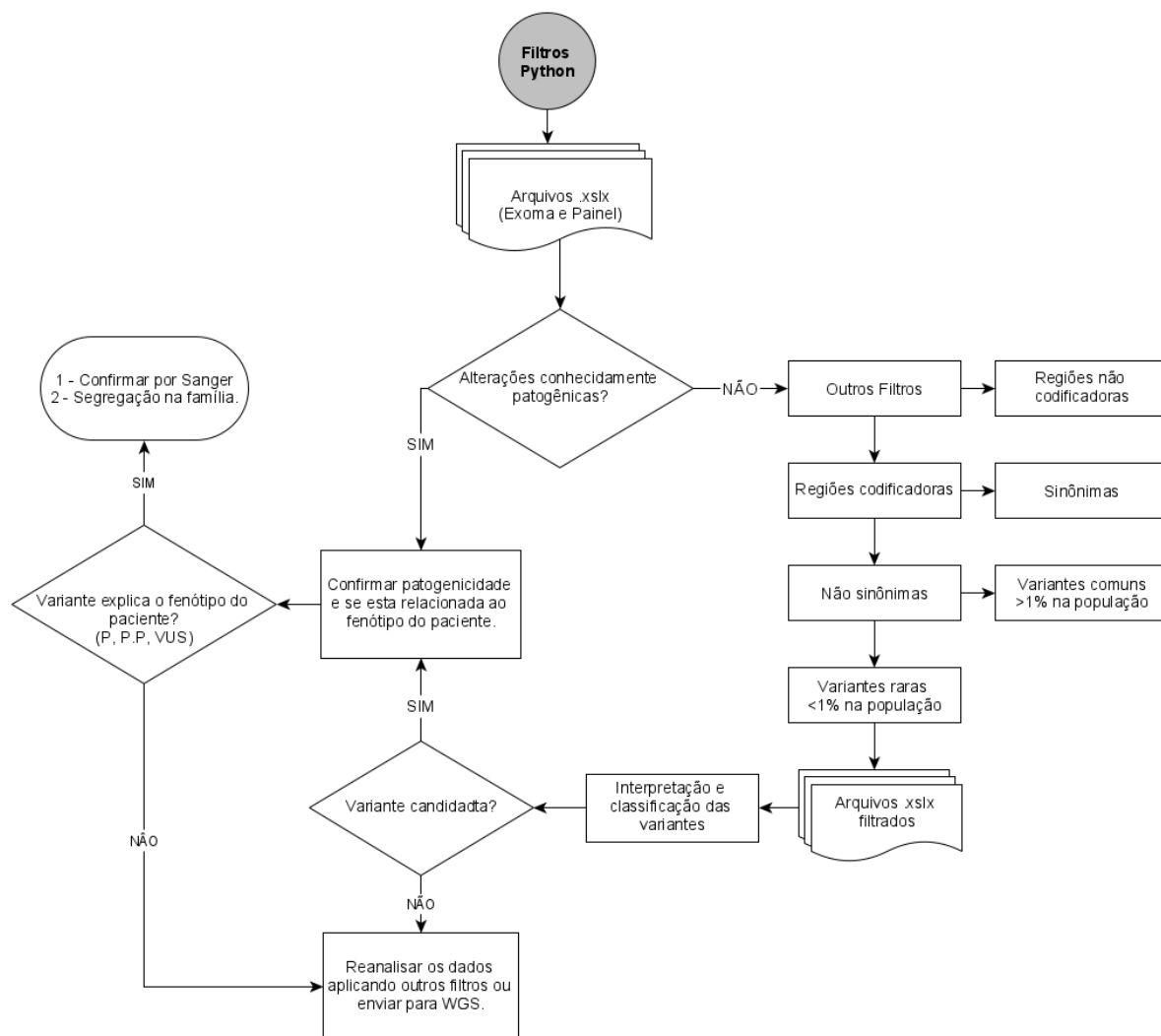
nonsense, frameshift etc.) ou que alteram splicing, foram selecionadas (Tabela 4-3).

- iii. Frequência das variantes em bancos de dados populacionais: Foram removidas as variantes com frequência acima de 1% (MAF > 1% – *minor allele frequency*) nos bancos de dados populacionais (1000 genome; ABraOM e GnomAD).

Aqueles pacientes que ficaram sem alterações candidatas para explicar o seu fenótipo, no exoma, foram reanalisados, alterando alguns filtros, como por exemplo, (i) Pesquisa de alterações *nonsense* em todo o exoma; (ii) caso houvesse suspeita de herança ligada ao X, todos os genes no cromossomo X foram analisados; (iii) e busca por possíveis alterações patogênicas nas regiões não codificadoras.



Figura 4-6: Fluxograma ilustrando os filtros utilizados para análise dos dados NGS.



Fonte: Elaborada pela autora.

Notas: P: Patogênica; P.P: Provavelmente patogênica; VUS: variante de significado incerto.

Tabela 4-3: Consequência das variantes.

(Continua)

Consequência (termos)	Código Sequence Ontology (SO)	Impacto
<b>transcript_ablation</b>	SO:0001893	Alto
<b>splice_acceptor_variant</b>	SO:0001574	Alto
<b>splice_donor_variant</b>	SO:0001575	Alto
<b>stop_gained</b>	SO:0001587	Alto
<b>frameshift_variant</b>	SO:0001589	Alto
<b>stop_lost</b>	SO:0001578	Alto
<b>start_lost</b>	SO:0002012	Alto

Fonte: Elaborada pela autora. Traduzido e adaptado de: Ensembl (YATES et al., 2020)

Nota: Termos utilizados para descrever a consequência das variantes segundo o Sequence ontology (SO).

Tabela 4-3: Consequência das variantes.

(Continuação)

<b>Consequência (termos)</b>	<b>Código Sequence Ontology (SO)</b>	<b>Impacto</b>
<b>transcript_amplification</b>	SO:0001889	Alto
<b>inframe_insertion</b>	SO:0001821	Moderado
<b>inframe_deletion</b>	SO:0001822	Moderado
<b>missense_variant</b>	SO:0001583	Moderado
<b>protein_altering_variant</b>	SO:0001818	Moderado
<b>regulatory_region_ablation</b>	SO:0001894	Moderado
<b>incomplete_terminal_codon_variant</b>	SO:0001626	Moderado
<b>start_retained_variant</b>	SO:0002019	Moderado
<b>stop_retained_variant</b>	SO:0001567	Moderado
<b>splice_region_variant</b>	SO:0001630	Baixo
<b>synonymous_variant</b>	SO:0001819	Baixo
<b>coding_sequence_variant</b>	SO:0001580	Modificador
<b>mature_miRNA_variant</b>	SO:0001620	Modificador
<b>5_prime_UTR_variant</b>	SO:0001623	Modificador
<b>3_prime_UTR_variant</b>	SO:0001624	Modificador
<b>non_coding_transcript_exon_variant</b>	SO:0001792	Modificador
<b>intron_variant</b>	SO:0001627	Modificador
<b>NMD_transcript_variant</b>	SO:0001621	Modificador
<b>non_coding_transcript_variant</b>	SO:0001619	Modificador
<b>upstream_gene_variant</b>	SO:0001631	Modificador
<b>downstream_gene_variant</b>	SO:0001632	Modificador
<b>TFBS_ablation</b>	SO:0001895	Modificador
<b>TFBS_amplification</b>	SO:0001892	Modificador
<b>TF_binding_site_variant</b>	SO:0001782	Modificador
<b>regulatory_region_amplification</b>	SO:0001891	Modificador
<b>feature_elongation</b>	SO:0001907	Modificador
<b>regulatory_region_variant</b>	SO:0001566	Modificador
<b>feature_truncation</b>	SO:0001906	Modificador
<b>intergenic_variant</b>	SO:0001628	Modificador

Fonte: Elaborada pela autora. Traduzido e adaptado de: Ensembl (YATES et al., 2020).

Nota: Termos utilizados para descrever a consequência das variantes segundo o Sequence ontology (SO).

#### 4.4.7 Classificação das variantes

As variantes candidatas encontradas nesse trabalho foram classificadas em patogênica, provavelmente patogênica, VUS, provavelmente benigna e benigna, seguindo as normas e diretrizes recomendadas pelo ACMG-AMP (RICHARDS et al., 2015). Existem diversos critérios que podem ser utilizados para a classificação das variantes, e para cada critério utilizado existe um esquema de pontuação. Alguns dos critérios e suas respectivas pontuações estão apresentados no apêndice C (página 132). De forma geral, neste trabalho, foram usados os seguintes parâmetros:

- (i) Informações funcionais da variante: Localização (regiões codificantes, intrônicas, regiões repetitivas etc.), tipo da variante (*missense*, sinônima, *indels* etc.);
- (ii) Informações contidas em bancos de dados: descrição na literatura ou bancos de dados de variantes, bancos de dados de frequência na população, conservação do aminoácido em diferentes espécies, localização na proteína etc.;
- (iii) Observações clínicas: associação com o fenótipo, se a variante ocorre em *trans* ou em *cis* com outra variante e estudo de segregação na família;
- (iv) Ferramentas de predição de patogenicidade.

Para isso, nós utilizamos diversos bancos de dados e ferramentas de bioinformáticas disponíveis online (Tabela 4-4) bem como a ferramenta VarSome, que centraliza informações de mais de 35 bancos de dados (KOPANOS et al., 2019). É importante ressaltar que a classificação de uma variante pode mudar com o tempo, à medida que novas descobertas sobre elas vão sendo feitas.

Tabela 4-4: Sites dos bancos de dados e ferramentas utilizadas para classificação das variantes.

<b>Bancos de dados / Ferramentas para classificação das variantes</b>	
<b>POPULACIONAIS</b>	<a href="http://gnomad.broadinstitute.org/">http://gnomad.broadinstitute.org/</a>
	<a href="http://evs.gs.washington.edu/EVS">http://evs.gs.washington.edu/EVS</a>
	<a href="http://abraom.ib.usp.br/search.php">http://abraom.ib.usp.br/search.php</a>
<b>DOENÇA/MUTAÇÃO</b>	<a href="http://www.omim.org/">http://www.omim.org/</a>
	<a href="https://neuromuscular.wustl.edu/naltbrain.html">https://neuromuscular.wustl.edu/naltbrain.html</a>
	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/</a>
	<a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a>
	<a href="https://ghr.nlm.nih.gov/">https://ghr.nlm.nih.gov/</a>
	<a href="http://www.hgmd.org">http://www.hgmd.org</a>
	<a href="http://hihg.med.miami.edu/code/http/cmt/public_html/index.html#/">http://hihg.med.miami.edu/code/http/cmt/public_html/index.html#/</a>
<b>PROTEÍNA</b>	<a href="http://www.uniprot.org/">http://www.uniprot.org/</a>
<b>PROGRAMAS DE PREDIÇÃO</b>	Mutationtaster: <a href="http://www.mutationtaster.org">http://www.mutationtaster.org</a>
	Polyphen2: <a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2</a>
	SIFT: <a href="http://sift.jcvi.org">http://sift.jcvi.org</a>
	UMD predictor: <a href="http://umd-predictor.eu/">http://umd-predictor.eu/</a>
<b>VAR SOME</b>	<a href="https://varsome.com/">https://varsome.com/</a>

Fonte: Elaborada pela autora.  
Nota: Acesso entre 2016 e 2020.

#### 4.4.8 Confirmação e validação por Sanger

O sequenciamento de Sanger foi realizado para confirmar todas as variantes candidatas encontradas por NGS e para estudo de segregação nas famílias, quando possível.

##### 4.4.8.1 Desenho dos primers

Os primers foram desenhados utilizando duas ferramentas, o Primer3Plus em conjunto com a ferramenta BLAST (NCBI) e o Primer-blast (NCBI), que já incorpora um mecanismo de alinhamento global que verifica a especificidade dos primers pré-existentes e detecta possíveis alvos de amplificação (ALTSCHUL et al., 1990; UNTERGASSER et al., 2007; YE et al., 2012). Posteriormente, para avaliar se o par

de primers desenhado pelas duas ferramentas é realmente específico para a região de interesse, nós utilizamos a ferramenta PCR *in-silico* (UCSC) (KENT et al., 2002). Além disso, para verificar a presença de SNPs nos locais de ligação previstos ao par de primers, foi utilizado o programa SNPCheck V3. Todas as ferramentas estão disponíveis on-line e os sites estão descritos na Tabela 4-5 abaixo:

Tabela 4-5: Sites e ferramentas utilizadas para desenho dos primers.

Sites	
<b>Primer-blast (NCBI)</b>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a>
<b>Primer3Plus</b>	<a href="https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi">https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi</a>
<b>BLAST (NCBI)</b>	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
<b>PCR in-silico (UCSC)</b>	<a href="https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr">https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr</a>
<b>SNPCheck V3</b>	<a href="https://genetools.org/SNPCheck/snpcheck.htm">https://genetools.org/SNPCheck/snpcheck.htm</a>

Fonte: Elaborada pela autora.  
Nota: Acesso entre 2016 e 2020.

#### 4.4.8.2 Reação em cadeia da polimerase

Para confirmar as alterações encontradas por NGS foi realizado uma PCR touchdown utilizando o kit da enzima Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). O protocolo utilizado para sua realização está representado na Tabela 4-6, seguido do perfil térmico (Tabela 4-7). O protocolo usado para testar genes específicos, juntamente com os primers utilizados estão descritos no apêndice A (página 128).

Tabela 4-6: Protocolo PCR

Reagentes	Volume (µL)
H2O free Dnase	5,5
10X High Fidelity Buffer	2,5
dNTPs (200 mM/µL)	1,0
MgCl <sub>2</sub> (50mM/µL)	0,3
Primer F (10 µM/µL)	0,5
Primer R (10 µM/µL)	0,5
Platinum Taq DNA Polymerase (5U/µL)	0,2
DNA (50ng/µL)	1,0

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 4-7: Perfil térmico da PCR touchdown

Temperatura	Tempo	Ciclos
94°C	3'	1x
94°C	10"	2X
65°C	40"	
72°C	40"	
94°C	10"	2X
63°C	40"	
72°C	40"	
94°C	10"	2X
61°C	40"	
72°C	40"	
94°C	10"	2X
59°C	40"	
72°C	40"	
94°C	10"	2X
57°C	40"	
72°C	40"	
94°C	10"	32X
55°C	40"	
72°C	40"	
72°C	3'	1x
4°C	∞	

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.4.8.3 Sequenciamento

As amostras foram preparadas com o kit de reação BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) na placa MicroAmp® Optical 96-Well. O protocolo e o perfil térmico utilizado para realização da reação encontram-se nas Tabela 4-8 e Tabela 4-9.

Tabela 4-8: Protocolo da reação de sequenciamento.

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

Fonte: Elaborada pela autora.

Notas: Primer F: Forward; Primer R: Reverse

Tabela 4-9: Perfil térmico da reação de sequenciamento.

Temperatura	Tempo	Ciclos
96°C	2'	1x
96°C	30"	33X
50°C	15"	
60°C	4'	
72°C	7'	1x
4°C	∞	

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.4.8.4 Precipitação e purificação da Reação de Sequenciamento

O protocolo utilizado para precipitação do produto da reação de sequenciamento foi o seguinte:

- i. Adicionar a cada well (poço) uma mistura de 1,5 µl de EDTA mais 1,0 µl de acetato de sódio. É importante assegurar que os reagentes cheguem ao fundo do well. Colocar a placa em um vórtex de placa e aplicar uma leve homogeneização por aproximadamente 1 minuto;
- ii. Posteriormente, adicionar 30 µl de etanol 100% gelado em cada well, selar a placa com adesivo e, em seguida colocar a placa no vórtex por aproximadamente 1 minuto;
- iii. Cobrir a placa com papel alumínio e deixá-la na temperatura ambiente por 15 minutos;
- iv. Após essa etapa, retirar o alumínio e colocar a placa na centrífuga por 30 minutos a 3000 RPM;
- v. Ao final da centrifugação, retirar o adesivo da placa, inverter ela na centrífuga em um papel limpo e, aplicar um *spin* (190G – 20 segundos) para descartar o sobrenadante;
- vi. Aplicar 35 µl de etanol 70% gelado em cada well e levar a placa imediatamente para uma segunda centrifugação (2.500 RPM por 15 minutos);
- vii. Remover o sobrenadante com um *spin* (190G – 20 segundos);
- viii. Levar a placa ao termociclador (60°C por 10 minutos) coberta com papel alumínio, para completa evaporação do etanol;

- ix. Após essa etapa, o precipitado foi ressuspenso com com 10 µL de formamida, em seguida desnaturado a 95°C por 5 minutos e logo depois, colocado no gelo por no mínimo 2 minutos;
- x. Em seguida a placa foi colocada no equipamento ABI PRISM 3500 XL (Applied Biosystems®).

Os equipamentos e reagentes utilizados estão descritos abaixo:

- xi. Vórtex de placa: Thermomixer comfrot (Eppendorf®)
- xii. Centrífuga: Eppendorf® Centrifuge 5424;
- xiii. Termociclador: Veriti™ 96-Well Thermal Cycler;
- xiv. Formamida: Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems®).
- xv. Adesivo: Platemax Cyclorseal sealing film.

#### 4.4.8.5 Análise e nomenclatura das variantes

As imagens dos eletroferogramas e a sequência dos nucleotídeos foram analisadas através do Sequencing Analysis Software 6 (Applied Biosystems) e do SeqMan (Lasergene – DNASTar®).

Todas as alterações encontradas no presente trabalho, foram nomeadas de acordo com as diretrizes da *Human Genome Variation Society* (HGVS) (DEN DUNNEN et al., 2016) e confirmadas utilizando-se a ferramenta Mutalyzer (WILDEMAN et al., 2008), disponível online (Tabela 4-10).

Tabela 4-10: Sites e ferramentas utilizadas para nomenclatura das variantes.

Sites	
SEQUÊNCIA	<a href="https://genome.ucsc.edu/">https://genome.ucsc.edu/</a>
	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/</a>
	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/</a>
	<a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a>
NOMENCLATURA	<a href="http://varnomen.hgvs.org/">http://varnomen.hgvs.org/</a>
	<a href="https://mutalyzer.nl/">https://mutalyzer.nl/</a>

Fonte: Elaborada pela autora.  
Nota: Acesso entre 2016 e 2020.



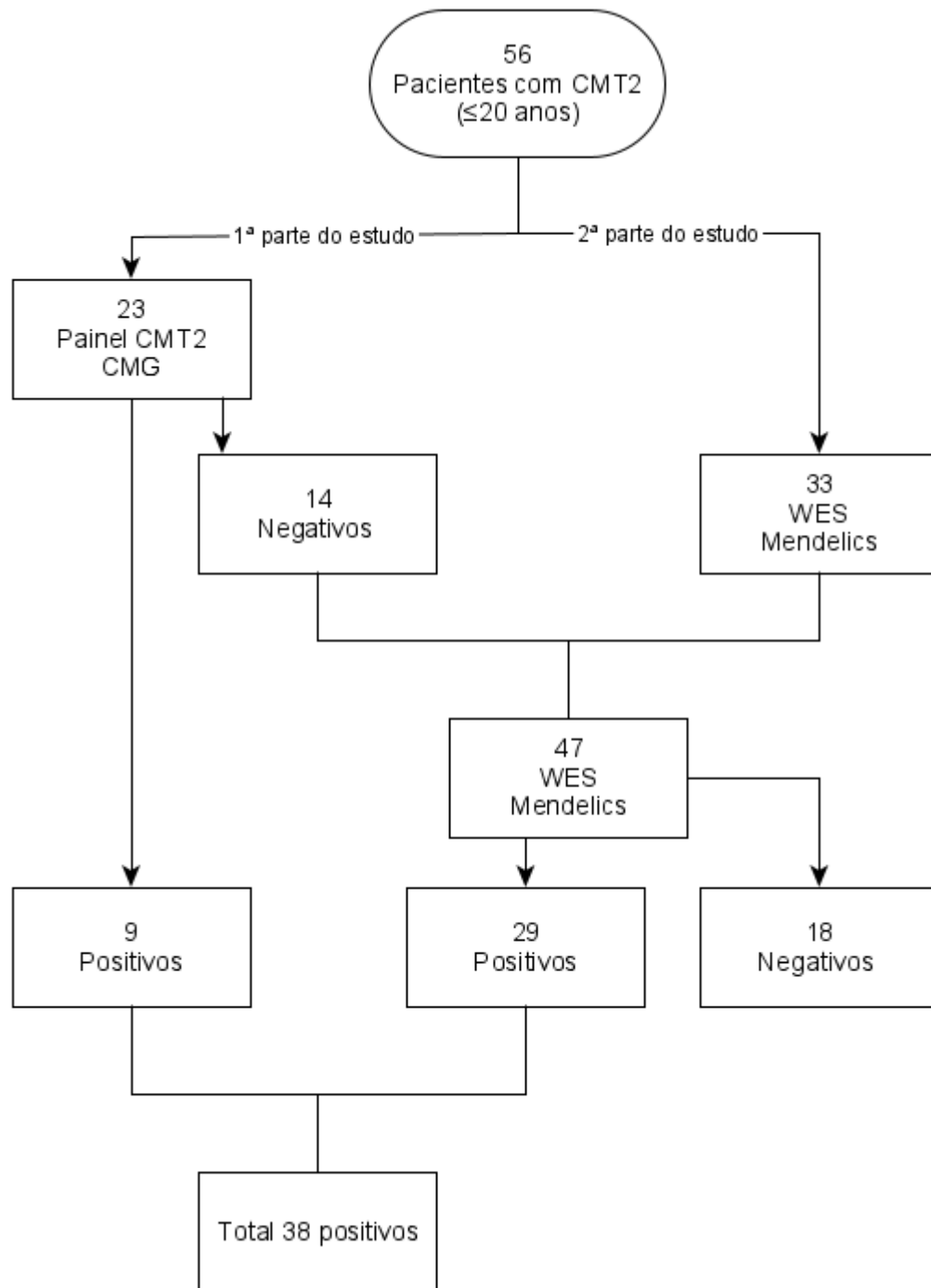
## 5. RESULTADOS

### 5.1 PACIENTES

No total, foram incluídos 56 casos índices pediátricos ( $\leq 20$  anos), não relacionados, com diagnóstico clínico sugestivo de neuropatia hereditária sensitivo motora axonal (HMSN2 ou CMT2) que passaram por consulta e estavam em seguimento ativo no ANGE até dezembro de 2020. As 56 amostras de DNA dos pacientes foram enviadas para realização de NGS em duas etapas como citado anteriormente. Vinte e três amostras foram encaminhadas para a realização de painel multigênico no CMG. Dessas, 14 apresentaram resultados negativos nas análises. Posteriormente, as 14 amostras que foram negativas no painel juntamente com mais 33 amostras selecionadas, foram então encaminhadas para sequenciamento de todo o exoma no laboratório Mendelics – SP. No total, o WES foi realizado para 47 amostras. Abaixo, segue um fluxograma ilustrando a distribuição e o número de amostras enviados para cada centro (Figura 5-1).

Na coorte estudada, a média de idade dos pacientes no momento da primeira consulta foi de 12 anos, variando de  $<1$  ano (CMT\_38) a 20 anos (CMT\_31 e CMT\_41). Sessenta e quatro por cento dos pacientes eram do sexo masculino ( $n = 36$ ), e a maioria dos probandos ( $n = 21 / 37,5\%$ ) apresentavam uma forma grave de CMT2 (CMTNS  $> 21$ ). Como citado anteriormente, alguns pacientes não puderam ser totalmente caracterizados quanto aos dados clínicos e não puderam ser convocados. Uma caracterização clínica mais detalhada e tentativa de correlacionar o genótipo com o fenótipo será realizada assim que possível. O resumo das informações clínicas dos 56 pacientes (quando possível) juntamente com as informações dos resultados moleculares e tecnologia NGS utilizada para diagnóstico, estão disponíveis na Tabela 5-1. Já os resultados da análise de segregação (quando possível) e confirmação das variantes por Sanger estão apresentados nas tabelas no apêndice D (página 159).

Figura 5-1: Fluxograma mostrando a distribuição das amostras.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 5-1: Informações clínicas e moleculares dos pacientes

(Continua)

ID PACIENTE	SEXO	I.P.C. (anos)	FENÓTIPO	OUTRAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	CMT score	HF	GENE	VARIANTE(s)	ZIG.	ACMG	NGS	HERANÇA	DM
CMT_1	M	8	CMT2	-	Leve	Sim	AARS1	c.986G>A	HET	P	Painel	AD	Sim
CMT_2	M	16	CMT2/dHMN	-	Grave	Não	DNAJB2	NA (c.352+1G>A)	HOM	P	Painel	Esp.	Sim
CMT_3	F	13	CMT2	-	Leve	Sim	GJB1	p.Val139Met (c.415G>A)	HET	P	Painel/WES	XL	Sim
CMT_4	M	7	CMT2	-	Leve	Sim	HSPB1	p.Pro182Ala (c.544C>G)	HET	P	WES	AD	Sim
CMT_5	M	6	CMT2	Comprometimento cognitivo e disautonomia	Grave	Não	IGHMBP2	p.Cys932Trpfs*46 (c.2796delC)	HOM	P	Painel/WES	AR	Sim
CMT_6	M	7	CMT2	-	Grave	ND	MFN2	p.Arg94Gln (c.281G>A)	HET	P	WES	ND	Sim
CMT_7	F	6	CMT2	sem alteração ocular	Moderado	Sim	MFN2	p.Arg94Gln (c.281G>A)	HET	P	Painel	AD	Sim
CMT_8	F	18	CMT2	-	Grave	Sim	MFN2	p.Arg94Gln (c.281G>A)	HET	P	WES	AD	Sim
CMT_9	M	11	CMT2	Liberção piramidal	Moderado	Sim	MFN2	p.Arg94Trp (c.280C>T)	HET	P	WES	AD	Sim
CMT_10	M	6	CMT2	-	Grave	Não	MFN2	p.Arg104Trp (c.310C>T)	HET	P	Painel	Esp.	Sim
CMT_11	M	11	CMT2	-	Grave	Não	MFN2	p.Arg104Trp (c.310C>T)	HET	P	Painel	Esp.	Sim
CMT_12	F	11	CMT2	predomínio motor	Grave	Não	MFN2	p.Thr105Met (c.314C>T)	HET	P	WES	Esp.	Sim
CMT_13	F	7	CMT2/dHMN	Liberção piramidal	Grave	Não	MFN2	p.Arg280His (c.839G>A)	HET	P	WES	Esp.	Sim
CMT_14	F	6	CMT2	-	Grave	Sim	MFN2	p.Arg364Trp (c.1090C>T)	HET	P	WES	AD	Sim

Fonte: Elaborado pela autora.

Notas: (Abreviações - ordem alfabética): ACMG: Classificação de patogenicidade; AD: Autossômico dominante; AR: Autossômico recessivo; CMT2: Charcot-Marie-Tooth axonal; Consang.: Consanguinidade; dHMN: Neuropatia hereditária motora distal; DM: Diagnóstico molecular; Esp.: Esporádico; F: Feminino; HEM: Hemizigose; HET: Heterozigose; HF: Histórico familiar; HOM: Homozigose; I.P.C: Idade da primeira consulta; ID: Identificação; Indef.: Indefinido; LP: Provavelmente patogênica; M: Masculino;

NA: Não se aplica; ND: Não disponível; NGS: Teste NGS realizado; P: Patogênica; VUS: Variante de significado incerto; WES: Sequenciamento de todo exoma; XL: Ligado ao X; ZIG.: Zigosidade; MMSS: Membros superiores.

Tabela 5-1: Informações clínicas e moleculares dos pacientes

(Continuação)

ID PACIENTE	SEXO	I.P.C. (anos)	FENÓTIPO	OUTRAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	CMT score	HF	GENE	VARIANTE(s)	ZIG.	ACMG	NGS	HERANÇA	DM
CMT_15	M	15	CMT2	-	Grave	Não	MFN2	p.Arg364Trp (c.1090C>T)	HET	P	WES	Esp.	Sim
CMT_16	F	3	CMT2	-	Grave	Não	MFN2	p.Arg364Trp (c.1090C>T)	HET	P	Painel	Esp.	Sim
CMT_17	F	11	CMT2	-	Grave	Não	MFN2	p.Ala738Val (c.2213C>T)	HET	P	Painel	Esp.	Sim
CMT_18	M	16	CMT2	-	Grave	Não	MFN2	p.Gln751* (c.2251C>T)	HET	P	Painel	AD	Sim
CMT_19	F	19	CMT2	deficiência intelectual, ataxia cerebelar e surdez	Grave	Não	MORC2	p.Arg252Trp (c.754C>T)	HET	P	Painel/WES	Esp.	Sim
CMT_20	M	8	CMT2	-	Moderado	Não	MORC2	p.Arg252Trp (c.754C>T)	HET	P	WES	Esp.	Sim
CMT_21	M	11	CMT2/dHMN	-	Moderado	Não	PLA2G6	p.Ala341Thr (c.1021G>A)	HOM	P	WES	AR	Sim
CMT_22	M	16	CMT2 complexo	ataxia leve	Grave	Consag.	PNKP	p.Thr408Del (c.1221_1223del)	HOM	P	Painel/WES	AR	Sim
CMT_23	M	17	CMT2 complexo	ataxia e apraxia oculomotora	Moderado	Não	PNKP	p.Thr408Del (c.1221_1223del)	HOM	P	WES	ND	Sim
CMT_24	M	9	CMT2	-	Moderado	Não	TRPV4	p.Arg232Cys (c.694C>T)	HET	P	WES	Esp.	Sim
CMT_25	M	13	CMT2 complexo	surdez, constipação, perda visual, ataxia, disartria, comprometimento cognitivo	Leve	Sim	AIFM1	p.Ala259Gly (c.776C>G)	HEM	LP	Painel	XL	Sim
CMT_26	F	18	CMT2	predomínio motor	Grave	Sim	DNM2	p.Ser357Phe (c.1070C>T)	HET	LP	Painel/WES	AD	Sim
CMT_27	M	10	CMT2	Fraqueza difusa, predomínio MMSS, face comprometida	Leve	ND	EMD LMNA	NA (c.82+1G>A) p.Ser573Leu (c.1718C>T)	HEM HET	LP VUS	WES	ND	Sim
CMT_28	F	14	CMT2/dHMN	Disautonomia	Leve	Não	GDAP1	p.Arg226del (c.677_679del)	HET	LP	WES	Esp.	Sim

Fonte: Elaborado pela autora.

Notas: (Abreviações - ordem alfabética): ACMG: Classificação de patogenicidade; AD: Autossômico dominante; AR: Autossômico recessivo; CMT2: Charcot-Marie-Tooth axonal; Consang.: Consanguinidade; dHMN: Neuropatia hereditária motora distal; DM: Diagnóstico molecular; Esp.: Esporádico; F: Feminino; HEM: Hemizigose; HET: Heterozigose; HF: Histórico familiar; HOM: Homozigose; I.P.C: Idade da primeira consulta; ID: Identificação; Indef.: Indefinido; LP: Provavelmente patogênica; M: Masculino; NA: Não se aplica; ND: Não disponível; NGS: Teste NGS realizado; P: Patogênica; VUS: Variante de significado incerto; WES: Sequenciamento de todo exoma; XL: Ligado ao X; ZIG.: Zigosidade; MMSS: Membros superiores.

Tabela 5-1: Informações clínicas e moleculares dos pacientes

(Continuação)

ID PACIENTE	SEXO	I.P.C. (anos)	FENÓTIPO	OUTRAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	CMT score	HF	GENE	VARIANTE(s)	ZIG.	ACMG	NGS	HERANÇA	DM
CMT_29	M	4	CMT2	dor nos pés	Leve	Sim	GJB1	p.Arg107Gln (c.320G>A)	HEM	LP	WES	XL	Sim
CMT_30	M	16	CMT2	-	Moderado	Sim	GJB1	p.Gly129Glu (c.386G>A)	HEM	LP	WES	XL	Sim
CMT_31	M	20	CMT2/CMTi	Distal sensitivo leve	Leve	Sim	HSPB3	p.Trp93Ter (c.279G>A)	HET	LP	WES	AD	Sim
CMT_32	F	19	CMT2 complexo	-	Leve	Não	KIF1A	p.Arg316Gln (c.947G>A)	HET	LP	Painel/WES	Esp.	Sim
CMT_33	M	18	CMT2/dHMN	-	Grave	Não	KIF5A	p.Asp996Gly (c.2987A>G)	HET	LP	Painel/WES	Esp.	Sim
CMT_34	M	14	CMT2	-	Grave	Não	LRSAM1	p.Glu312Alafs*48 (c.935_942del)	HET	LP	WES	Esp.	Sim
CMT_35	F	17	CMT2	-	Grave	Não	MFN2	p.Ala220Thr (c.658G>A)	HET	LP	WES	Esp.	Sim
CMT_36	F	11	CMT2	-	Moderado	Não	MFN2	p.Ser249Cys (c.746C>G)	HET	LP	WES	Esp.	Sim
CMT_37	F	4	CMT2	muita dor	Moderado	Não	NAGLU	p.Arg177Gln (c.530G>A)	HET	LP	WES	Esp.	Sim
CMT_38	M	<1	CMT2	-	ND	ND	SLC5A7	NA (c.1113+2T>A)	HOM	LP	WES	ND	Sim
CMT_39	F	11	CMT2	-	ND	ND	ATP1A1	p.Gly549Arg (c.1645G>A)	HET	VUS	Painel/WES	ND	Não
CMT_40	M	10	CMT2/dHMN	-	Leve	Sim	DCTN1	p.Ala286Val (c.857C>T)	HET	VUS	WES	ND	Não
CMT_41	M	20	CMT2	-	ND	ND	DNM2 ATP7A	p.Val351Met (c.1051G>A) p.Leu1474Val (c.4420C>G)	HET HEM	VUS VUS	WES	ND	Não
CMT_42	M	11	CMT2	-	Leve	Não	KARS1	p.Arg507Gln (c.1520G>A)	HET	VUS	WES	Esp.	Não

Fonte: Elaborado pela autora.

Notas: (Abreviações - ordem alfabética): ACMG: Classificação de patogenicidade; AD: Autossômico dominante; AR: Autossômico recessivo; CMT2: Charcot-Marie-Tooth axonal; Consang.: Consanguinidade; dHMN: Neuropatia hereditária motora distal; DM: Diagnóstico molecular; Esp.: Esporádico; F: Feminino; HEM: Hemizigose; HET: Heterozigose; HF: Histórico familiar; HOM: Homozigose; I.P.C: Idade da primeira consulta; ID: Identificação; Indef.: Indefinido; LP: Provavelmente patogênica; M: Masculino; NA: Não se aplica; ND: Não disponível; NGS: Teste NGS realizado; P: Patogênica; VUS: Variante de significado incerto; WES: Sequenciamento de todo exoma; XL: Ligado ao X; ZIG.: Zigosidade; MMSS: Membros superiores.

Tabela 5-1: Informações clínicas e moleculares dos pacientes

(Continuação)

ID PACIENTE	SEXO	I.P.C. (anos)	FENÓTIPO	OUTRAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	CMT score	HF	GENE	VARIANTE	ZIG.	ACMG	NGS	HERANÇA	DM
CMT_43	M	19	CMT2	-	ND	ND	KARS1	p.Thr419Ile (c.1256C>T)	HET	VUS	WES	ND	Não
							TTR	p.Val142Ile (c.424G>A)	HET	P			
CMT_44	F	1	CMT2	-	ND	ND	MME	p.Glu172Asp (c.516A>T)	HET	VUS	WES	ND	Não
CMT_45	F	17	CMT2	-	Leve	ND	MYH14	p.Glu1942Lys (c.5824G>A)	HET	VUS	Painel/WES	ND	Não
CMT_46	F	13	CMT2	-	ND	ND	SETX	p.Met386Val (c.1156A>G)	HET	VUS	WES	ND	Não
CMT_47	M	17	CMT2/CMTi	incontinência fecal	ND	Não	-	-	-	-	WES	Esp.	Não
CMT_48	M	14	CMT2	-	ND	ND	-	-	-	-	WES	ND	Não
CMT_49	M	5	CMT2	miopatia associada?	Grave	Sim	-	-	-	-	Painel/WES	AR	Não
CMT_50	M	10	CMT2	Comprometimento cognitivo	Moderado	Não	-	-	-	-	Painel/WES	Esp.	Não
CMT_51	M	15	CMT2/dHMN	liberação piramidal	ND	ND	-	-	-	-	WES	ND	Não
CMT_52	M	14	CMT2	-	ND	ND	-	-	-	-	WES	ND	Não
CMT_53	M	19	CMT2	-	ND	ND	-	-	-	-	Painel/WES	ND	Não
CMT_54	F	17	CMT2	surdez	Grave	Consang.	-	-	-	-	Painel/WES	AR	Não
CMT_55	M	18	CMT2	-	ND	ND	-	-	-	-	Painel/WES	ND	Não
CMT_56	M	13	CMT2	-	ND	ND	-	-	-	-	WES	ND	Não

Fonte: Elaborado pela autora.

Notas: (Abreviações - ordem alfabética): ACMG: Classificação de patogenicidade; AD: Autossômico dominante; AR: Autossômico recessivo; CMT2: Charcot-Marie-Tooth axonal; Consang.: Consanguinidade; dHMN: Neuropatia hereditária motora distal; DM: Diagnóstico molecular; Esp.: Esporádico; F: Feminino; HEM: Hemizigose; HET: Heterozigose; HF: Histórico familiar; HOM: Homozigose; I.P.C: Idade da primeira consulta; ID: Identificação; Indef.: Indefinido; LP: Provavelmente patogênica; M: Masculino; NA: Não se aplica; ND: Não disponível; NGS: Teste NGS realizado; P: Patogênica; VUS: Variante de significado incerto; WES: Sequenciamento de todo exoma; XL: Ligado ao X; ZIG.: Zigosidade; MMSS: Membros superiores.

## 5.2 RESULTADOS MOLECULARES

Após análise dos dados de 56 pacientes, foram encontradas 18 variantes conhecidamente patogênicas, 14 variantes que foram classificadas como provavelmente patogênicas e 11 variantes que foram classificadas como VUS, totalizando 43 variantes diferentes localizadas em 29 genes conhecidos por causar neuropatia (Figura 5-2). Alguns dos critérios utilizados para classificação das variantes encontradas estão disponíveis no apêndice C (página 132). A maioria das variantes encontradas são SNVs localizadas em regiões codificadoras de proteína (79%; 34/43), 16,27% são variantes nulas (alteram splicing: 3; frameshift: 2; e stop codon: 2) e duas variantes são pequenas deleções (inframe). Além disso, 22 variantes são novas e ainda não foram descritas na literatura (1 patogênica, 11 provavelmente patogênicas e 10 VUS). A busca por variantes candidatas do tipo CNVs foi realizada em todos os 47 pacientes que fizeram exoma e nós não encontramos nenhuma CNV potencialmente patogênica nesses pacientes. Na Tabela 5-2 estão representadas todas as variantes candidatas encontradas neste trabalho.

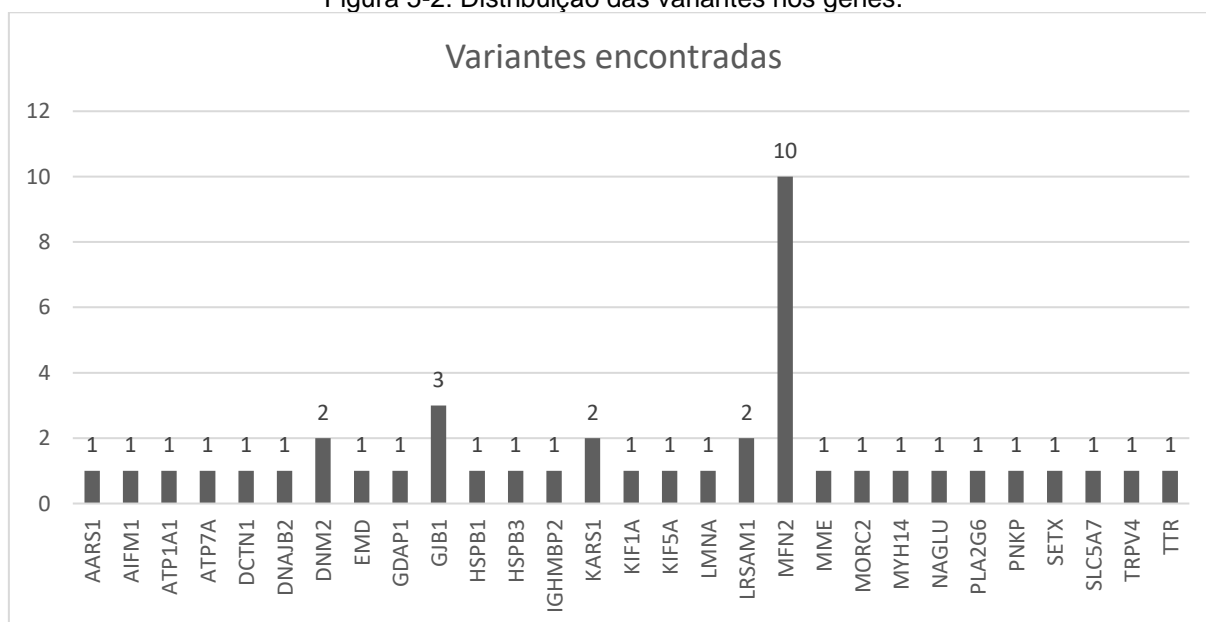
O diagnóstico molecular foi alcançado em 67,8% dos pacientes (38/56), considerando apenas as alterações patogênicas e provavelmente patogênicas. Oito pacientes apresentaram variantes classificadas como sendo de significado incerto VUS) (14,2%) e dez pacientes (17,8%) ficaram sem nenhuma variante candidata (Figura 5-3). No painel de CMT2, foram encontradas variantes conhecidamente patogênicas em 8 pacientes e 1 variante provavelmente patogênica em 1 paciente, totalizando 9 casos positivos (39,1%) (Figura 5-3). As variantes patogênicas e provavelmente patogênicas encontradas no painel estão localizadas nos genes *AARS1* (n = 1), *AIFM1* (n = 1), *DNAJB1* (n = 1) e *MFN2* (n = 6). Dentre os 14 pacientes que foram negativos no painel, 7 (50%) pacientes receberam um diagnóstico molecular utilizando WES, em 2 pacientes foram encontradas variantes de significado incerto e os 5 pacientes restantes permaneceram sem nenhuma variante candidata (Tabela 5-1). No WES, foram encontradas variantes conhecidamente patogênicas em 16 pacientes e variantes provavelmente patogênica em 13 pacientes, totalizando 29 casos positivos (61,7%) (Figura 5-3). As variantes patogênicas e provavelmente

patogênicas encontradas no exoma estão localizadas em 18 genes diferentes incluindo *DNM2*, *EMD/LMNA*, *GDAP1*, *GJB1*, *HSPB1*, *HSPB3*, *IGHMBP2*, *KIF1A*, *KIF5A*, *LRSAM1*, *MFN2*, *MORC2*, *NAGLU*, *PLA2G6*, *PNKP*, *SLC5A7* e *TRPV4*. Dentre os pacientes positivos no exoma, 5 deles apresentaram variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas em genes que não estavam no painel CMT2 (*EMD*, *NAGLU*, *PNKP* e *SLC5A7*).

O gene mais frequentemente mutado foi a *MFN2* com 10 variantes encontradas em 15 pacientes, seguido por *GJB1* com 3 variantes encontradas em 3 pacientes. Os outros genes apresentaram 1 ou 2 variantes (Figura 5-2).

A maioria dos casos com diagnóstico genético positivo (38 pacientes) apresentaram alterações em heterozigose (28) seguido por alterações em homozigose (6) e hemizigose (4).

Figura 5-2: Distribuição das variantes nos genes.



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: Esse gráfico representa o número de variantes diferentes encontradas em cada gene.



Tabela 5-2: Descrição das variantes encontradas.

(Continua).

PACIENTES	GENE	TRANSCRITO	HGVSc.	HGVSp.	rsID	ZIGOZIDADE	ACMG	LIT.
CMT_1	AARS1	ENST00000261772	c.986G>A	p.Arg329His	rs267606621	HET	P	Sim
CMT_2	DNAJB2	ENST00000336576	c.352+1G>A	NA	rs756614404	HOM	P	Sim
CMT_3	GJB1	ENST00000361726	c.415G>A	p.Val139Met	rs104894812	HET	P	Sim
CMT_4	HSPB1	ENST00000248553	c.544C>G	p.Pro182Ala	ND	HET	P	Sim
CMT_5	IGHMBP2	ENST00000255078	c.2796delC	p.Cys932Trpfs*46	ND	HOM	P	Não
CMT_6	MFN2	ENST00000235329	c.281G>A	p.Arg94Gln	rs28940291	HET	P	Sim
CMT_7								
CMT_8								
CMT_9	MFN2	ENST00000235329	c.280C>T	p.Arg94Trp	rs119103263	HET	P	Sim
CMT_10	MFN2	ENST00000235329	c.310C>T	p.Arg104Trp	rs119103268	HET	P	Sim
CMT_11								
CMT_12	MFN2	ENST00000235329	c.314C>T	p.Thr105Met	rs863224069	HET	P	Sim
CMT_13	MFN2	ENST00000235329	c.839G>A	p.Arg280His	rs28940294	HET	P	Sim
CMT_14	MFN2	ENST00000235329	c.1090C>T	p.Arg364Trp	rs119103265	HET	P	Sim
CMT_15								
CMT_16								
CMT_17	MFN2	ENST00000235329	c.2213C>T	p.Ala738Val	rs1569889919	HET	P	Sim
CMT_18	MFN2	ENST00000235329	c.2251C>T	p.Gln751*	rs1557539119	HET	P	Sim
CMT_19	MORC2	ENST00000397641	c.754C>T	p.Arg252Trp	rs864309503	HET	P	Sim
CMT_20								
CMT_21	PLA2G6	ENST00000332509	c.1021G>A	p.Ala341Thr	rs769000561	HOM	P	Sim
CMT_22	PNKP	ENST00000596014	c.1221_1223del	p.Thr408Del	rs786205207	HOM	P	Sim
CMT_23								
CMT_24	TRPV4	ENST00000261740	c.694C>T	p.Arg232Cys	rs387906904	HET	P	Sim
CMT_25	AIFM1	ENST00000287295	c.776C>G	p.Ala259Gly	ND	HEM	LP	Não

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: (Abreviações – ordem alfabética): ACMG – P: Patogênica / LP: provavelmente patogênica / VUS: variante de significado incerto; HGVSc ou HGVSp: Nomenclatura baseada nas normas de Human Genome Variation Society (HGVS) de acordo com a sequência codificadora (c.) ou com a sequência da proteína (p.); LIT: Se a variante já foi descrita na literatura ou não; NA: Não se aplica; ND: Não disponível; rsID (Reference SNP ID): é uma identificação usada para se referir a um SNP específico; Zigosidade – HET: Heterozigose / HEM: Hemizigose / HOM: Homozigose.

Tabela 5-2: Descrição das variantes encontradas.

(Continuação).

PACIENTES	GENE	TRANSCRITO	HGVSc.	HGVSp.	rsID	ZIGOZIDADE	ACMG	LIT.
CMT_26	DNM2	ENST00000389253	c.1070C>T	p.Ser357Phe	rs1064793101	HET	LP	Sim
	LMNA	ENST00000368300	c.1718C>T	p.Ser573Leu	rs60890628	HET	VUS	Sim
CMT_27	EMD	ENST00000369842	c.82+1G>A	NA	ND	HEM	LP	Sim
CMT_28	GDAP1	ENST00000220822	c.677_679del	p.Arg226del	rs1586806238	HET	LP	Sim
CMT_29	GJB1	ENST00000361726	c.320G>A	p.Arg107Gln	rs1383588318	HEM	LP	Não
CMT_30	GJB1	ENST00000361726	c.386G>A	p.Gly129Glu	rs1602349280	HEM	LP	Não
CMT_31	HSPB3	ENST00000302005	c.279G>A	p.Trp93*	rs142626276	HET	LP	Não
CMT_32	KIF1A	ENST00000498729	c.947G>A	p.Arg316Gln	rs749718096	HET	LP	Não
CMT_33	KIF5A	ENST00000455537	c.2987A>G	p.Asp996Gly	ND	HET	LP	Não
CMT_34	LRSAM1	ENST00000300417	c.935_942del	p.Glu312Alafs*48	ND	HET	LP	Não
	LRSAM1	ENST00000300417	c.944G>T	p.Arg315Leu	ND	HET	VUS	Não
CMT_35	MFN2	ENST00000235329	c.658G>A	p.Ala220Thr	ND	HET	LP	Não
CMT_36	MFN2	ENST00000235329	c.746C>G	p.Ser249Cys	ND	HET	LP	Não
CMT_37	NAGLU	ENST00000225927	c.530G>A	p.Arg177Gln	rs1323850779	HET	LP	Não
CMT_38	SLC5A7	ENST00000264047	c.1113+2T>A	NA	ND	HOM	LP	Não
CMT_39	ATP1A1	ENST00000295598	c.1645G>A	p.Gly549Arg	ND	HET	VUS	Não
CMT_40	DCTN1	ENST00000361874	c.857C>T	p.Ala286Val	rs896989123	HET	VUS	Não
CMT_41	ATP7A	ENST00000341514	c.4420C>G	p.Leu1474Val	ND	HET	VUS	Não
	DNM2	ENST00000389253	c.1051G>A	p.Val351Met	rs876661176	HET	VUS	Não
CMT_42	KARS1	ENST00000302445	c.1520G>A	p.Arg507Gln	rs752076127	HET	VUS	Não

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: (Abreviações – ordem alfabética): ACMG – P: Patogênica / LP: provavelmente patogênica / VUS: variante de significado incerto; HGVSc ou HGVSp: Nomenclatura baseada nas normas de Human Genome Variation Society (HGVS) de acordo com a sequência codificadora (c.) ou com a sequência da proteína (p.); LIT: Se a variante já foi descrita na literatura ou não; NA: Não se aplica; ND: Não disponível; rsID (Reference SNP ID): é uma identificação usada para se referir a um SNP específico; Zigosidade – HET: Heterozigose / HEM: Hemizigose / HOM: Homozigose.

Tabela 5-2: Descrição das variantes encontradas.

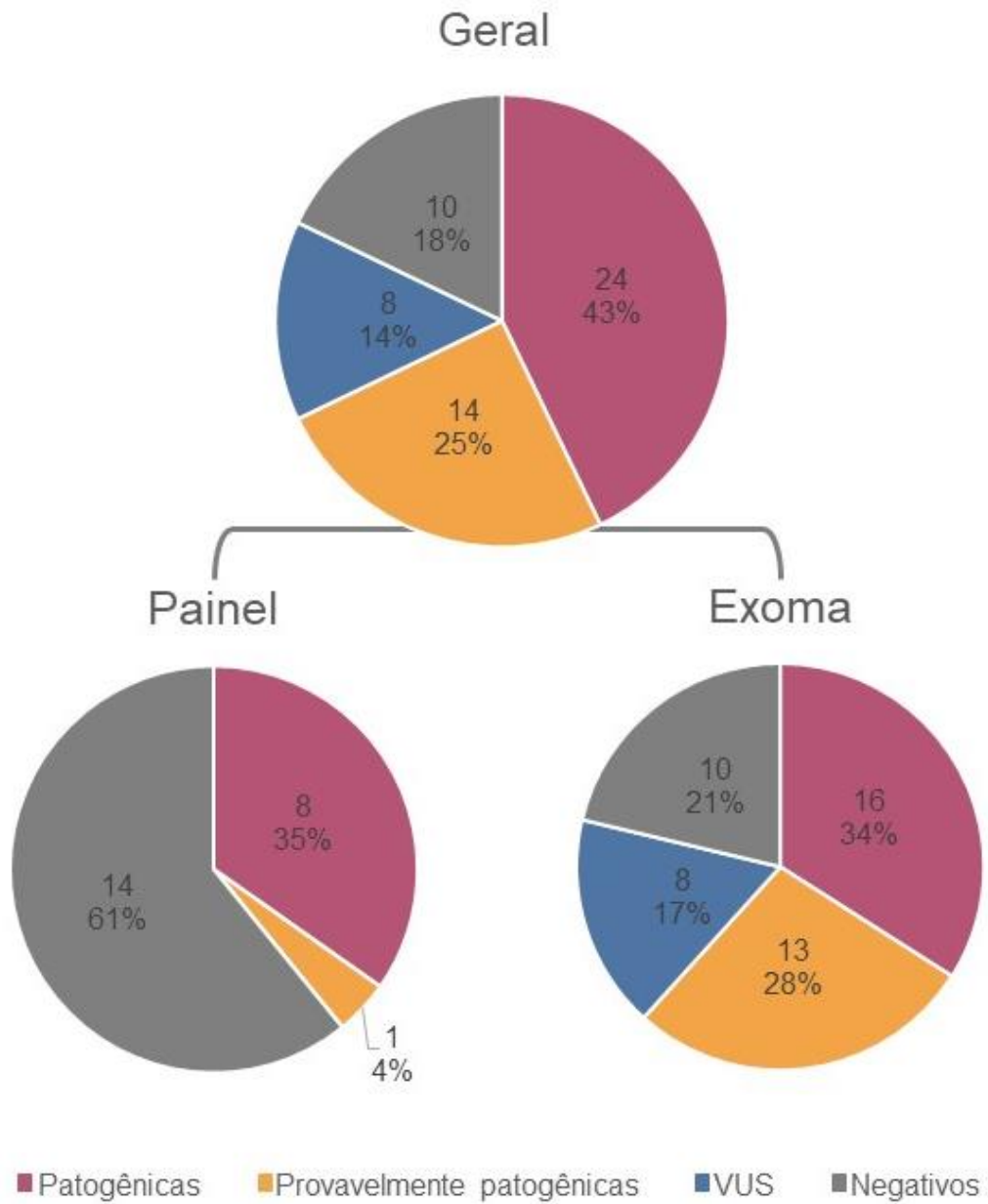
(Continuação).

PACIENTES	GENE	TRANSCRITO	HGVSc.	HGVSp.	rsID	ZIGOSIDADE	ACMG	LIT.
CMT_43	KARS1	ENST00000302445	c.1256C>T	p.Thr419Ile	rs773192982	HET	VUS	Não
	TTR	ENST00000237014	c.424G>A	p.Val142Ile	rs76992529	HET	P	Sim
CMT_44	MME	ENST00000360490	c.516A>T	p.Glu172Asp	rs201333758	HET	VUS	Não
CMT_45	MYH14	ENST00000376970	c.5824G>A	p.Glu1942Lys	ND	HET	VUS	Não
CMT_46	SETX	ENST00000224140	c.1156A>G	p.Met386Val	ND	HET	VUS	Não

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: (Abreviações – ordem alfabética): ACMG – P: Patogênica / LP: provavelmente patogênica / VUS: variante de significado incerto; HGVS ou HGVS: Nomenclatura baseada nas normas de Human Genome Variation Society (HGVS) de acordo com a sequência codificadora (c.) ou com a sequência da proteína (p.); LIT: Se a variante já foi descrita na literatura ou não; NA: Não se aplica; ND: Não disponível; rsID (Reference SNP ID): é uma identificação usada para se referir a um SNP específico; Zigosidade – HET: Heterozigose / HEM: Hemizigose / HOM: Homozigose.

Figura 5-3: Percentual de diagnóstico dos pacientes com CMT2.



Fonte: Elaborada pela autora.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 PERCENTUAL DE DIAGNÓSTICO NOS PACIENTES COM CMT2

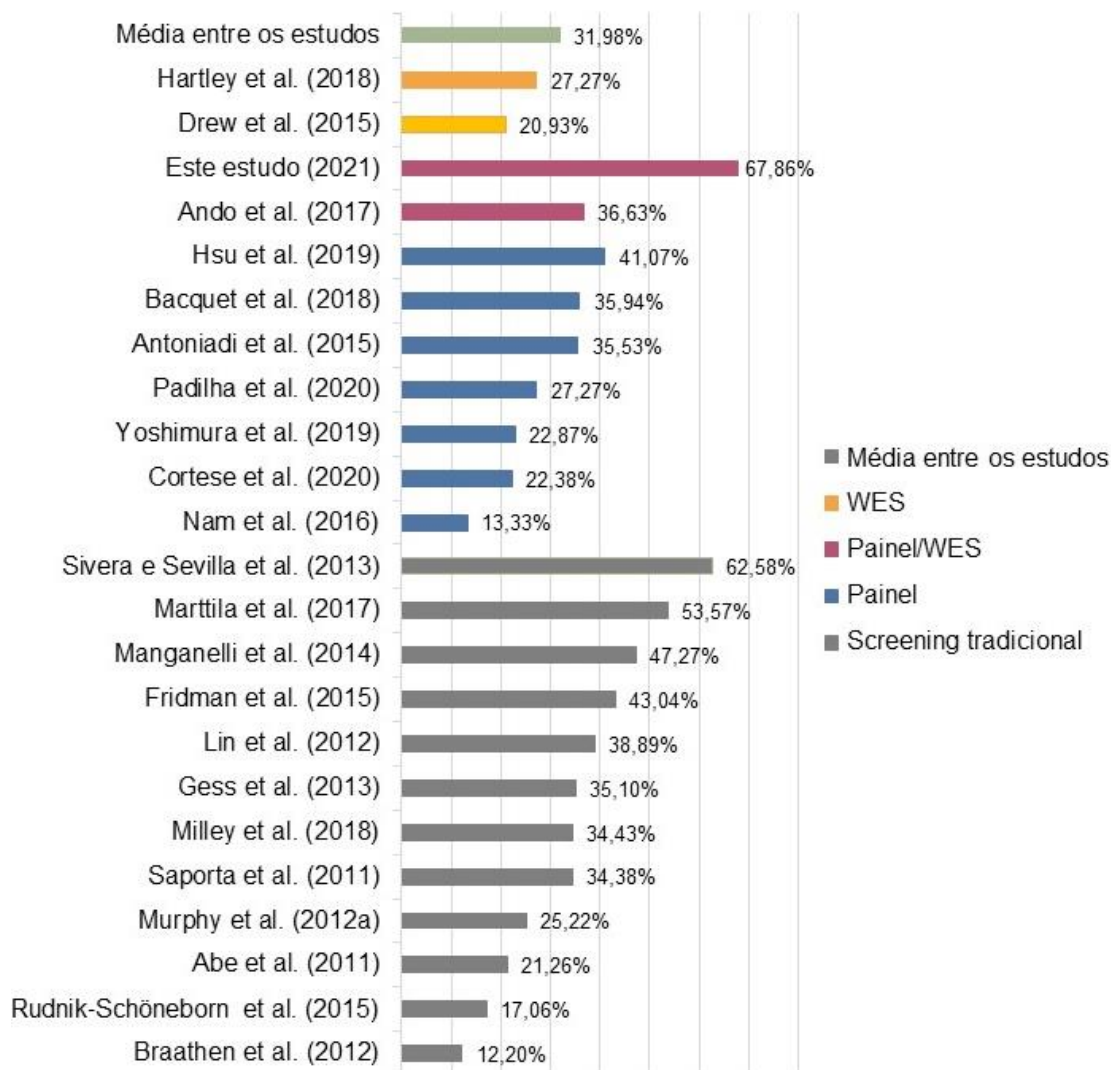
Através da utilização de tecnologias de sequenciamento de nova geração (painel e exoma), nós realizamos um screening molecular em 56 crianças e adolescentes ( $\leq$  20 anos) com diagnóstico clínico sugestivo de neuropatia hereditária sensitivo motora axonal que passaram por consulta no ambulatório de Neurogenética do HC-FMRP até dezembro de 2020. Nos últimos anos, o diagnóstico genético das neuropatias hereditárias evoluiu rapidamente com o surgimento dos sequenciadores de nova geração. Essa tecnologia tem permitido um aumento significativo no número de pacientes que recebem um diagnóstico molecular e na descoberta de novos genes e variantes relacionados às NHs (PIPIS et al., 2019). Apesar desses avanços, a maioria dos pacientes com a forma axonal (CMT2) (~60%) ainda ficam sem um diagnóstico molecular definitivo, indicando que a maioria dos genes ou variantes para esse subtipo ainda precisam ser descobertas (CORTESE et al., 2020; PIPIS et al., 2019; ROSSOR et al., 2013). Neste trabalho, nós obtivemos um alto rendimento de diagnóstico para as formas axonais (67,8%; 38/56) considerando apenas as alterações patogênicas e provavelmente patogênicas encontradas. Distinguindo entre painel e WES, esse percentual foi de 39,1% e 61,7% respectivamente. Esse desempenho foi maior do que os apresentados por diversos estudos de epidemiologia genética, inclusive dentre aqueles que também utilizam NGS para diagnóstico (Figura 6-1 e Tabela 6-1).

Antes de iniciarmos a discussão dos resultados, é importante ressaltar alguns pontos. Primeiro, não existem estudos de epidemiologia genética voltados especificamente para pacientes pediátricos com CMT axonal. A maioria dos estudos de epidemiologia genética disponíveis na literatura não especificam a idade dos pacientes na primeira consulta ou selecionam coortes de pacientes com CMT adulto ou mista (adultos e crianças). Na literatura, foram encontrados apenas dois estudos realizados em coortes de pacientes pediátricos. O primeiro, publicado em 2011, Baets et al. (2011) avaliaram a frequência de mutações em uma coorte de 77 pacientes índices que apresentaram sintomas de HMSN no primeiro ano de vida. Eles pesquisaram por mutações em 11 genes utilizando metodologia tradicional de

---

sequenciamento (teste sequencial gene a gene utilizando Sanger) e alcançaram um diagnóstico molecular em 45% (35/77) dos pacientes. Porém, não é possível acessar a taxa de diagnóstico nos diferentes subtipos da doença. No segundo trabalho, Vissers et al. (2017) avaliaram a eficácia do WES, em termos de diagnóstico e custo, em um centro de neurologia pediátrica. Eles avaliaram um total de 150 pacientes pediátricos com doenças neurológicas complexas de origem genética e concluíram que WES possibilitou um diagnóstico significativamente mais conclusivo em 29,3% dos pacientes comparado à via de diagnóstico tradicional (7,3% dos pacientes). No entanto, esse estudo não engloba somente pacientes com neuropatias periféricas hereditárias, ou mais especificamente, CMT. Segundo, a metodologia utilizada entre os trabalhos, tanto para a seleção dos pacientes quanto as tecnologias utilizadas no diagnóstico, são diferentes. E por último, é preciso considerar que os trabalhos mais antigos e que utilizavam de metodologia tradicional (Sanger) para diagnóstico das formas axonais testavam apenas para alguns poucos genes específicos. Por esses motivos, os trabalhos que usaremos para discutir nossos resultados serão aqueles em que foi possível acessar o percentual de diagnóstico em pacientes com CMT axonal sem distinguir metodologia utilizada e nem a idade dos pacientes.

Figura 6-1: Percentual de diagnóstico molecular em diferentes coortes de pacientes com CMT2.



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: WES – sequenciamento de todo o exoma.

O estudo que obteve a maior taxa de diagnóstico em coortes de pacientes com CMT2 (sem especificar idade) foi um estudo realizado na população Espanhola, em 2013, que alcançou um diagnóstico molecular em 62,6% dos pacientes com CMT2 (102/163) utilizando screening tradicional para 18 genes mais frequentemente mutados nesse subtipo de neuropatia (SIVERA et al., 2013) (Figura 6-1). Eles atribuem esse alto valor devido a alta taxa de mutações encontrada no gene *GDAP1* que apresenta um efeito fundador naquela região (SIVERA et al., 2013). Em contrapartida, o estudo que obteve a menor taxa de diagnóstico em pacientes com CMT2 (12,2%) foi realizado na Noruega em 2012 (BRAATHEN, 2012) (Figura 6-1). Porém eles realizaram screening convencional (teste gene a gene) onde testaram

apenas 5 genes (*GJB1*, *LITAF*, *MFN2*, *MPZ* e *PMP22*) em 41 pacientes com CMT2 (BRAATHEN, 2012).

As maiores coortes de pacientes com CMT2 analisadas são de estudos realizados nos EUA (13 centros do INC - *Inherited Neuropathies Consortium*) (FRIDMAN; REILLY, 2015), Alemanha (RUDNIK-SCHÖNEBORN et al., 2015) e dois estudos do Japão (ANDO et al., 2017; YOSHIMURA et al., 2019) onde eles avaliaram 237, 340, 445 e 682 pacientes com CMT2 e obtiveram diagnóstico molecular em 43,0%, 17,1%, 36,6% e 22,8% dos pacientes, respectivamente. Porém a idade da primeira consulta não foi um parâmetro para seleção dos pacientes e as metodologias utilizadas para diagnóstico molecular foram diferentes entre eles (Tabela 6-1).

Dentre os estudos que utilizam painel de genes (NGS) para pesquisa molecular, a taxa de diagnóstico molecular para coortes de pacientes com CMT2 variou entre 13,33% e 41,07% (ANTONIADI et al., 2015; BACQUET et al., 2018; CORTESE et al., 2020; HSU et al., 2019; NAM et al., 2016; PADILHA et al., 2020; YOSHIMURA et al., 2019). Recentemente, Cortese et al., (2020) utilizou painéis de genes (NGS) para investigar a eficácia desta técnica no diagnóstico de pacientes com CMT e encontrou variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas em 22% dos pacientes com CMT2 (32/143) (CORTESE et al., 2020). Estes trabalhos não especificam a idade dos pacientes que participaram do estudo, porém, foi possível acessar a média de idade dos pacientes no estudo realizado por Cortese et al., (2020) que foi de 49 anos ( $\pm 17$ ).

Os trabalhos que utilizam WES para diagnóstico geralmente aplicam essa técnica em coortes de pacientes com neuropatias hereditárias, não sendo possível, na maioria das vezes, acessar o número de pacientes que receberam o diagnóstico molecular em cada subtipo específico da doença. A obtenção desse dado foi possível em dois estudos, um realizado na Austrália e outro no Canadá que encontraram uma taxa de diagnóstico em pacientes com CMT2 de 20,93% (9/436) e 27,27% (6/22), respectivamente (ambos não especificam idade dos pacientes na primeira consulta) (DREW et al., 2015; HARTLEY et al., 2018). Porém, é importante ressaltar que ambos os estudos encaminharam para WES pacientes com CMT2 que já haviam testado negativo para os genes mais comuns, inclusive *MFN2*, um dos genes mais comumente mutado em pacientes com CMT2 (DREW et al., 2015; HARTLEY et al., 2018). No trabalho realizado no Canadá, foi possível diferenciar entre os pacientes com CMT2 que eram adultos ( $n = 10$ ) e aqueles que eram pediátricos ( $n = 12$ ). É



interessante observar que variantes patogênicas e provavelmente patogênicas foram encontradas em 5 pacientes pediátricos com CMT2 contra 1 paciente adulto com CMT2, o que representa uma taxa de diagnóstico de 41,6% (5/12) na coorte de pacientes com CMT2 pediátrica versus 10% (1/10) na coorte de pacientes com CMT2 adulto (HARTLEY et al., 2018).

Todos os trabalhos selecionados para a discussão dos resultados em que foi possível acessar o percentual de diagnóstico em pacientes com CMT2 juntamente com a metodologia utilizada para o diagnóstico molecular estão resumidos na (Tabela 6-1). Calculando a média de diagnóstico de todos os trabalhos descritos nessa tabela, apenas 32% (1055/3299) dos pacientes com CMT2 receberam um diagnóstico molecular definitivo, mostrando que grande parte desse grupo de pacientes ainda fica sem causa molecular definida.

Como citado anteriormente, é difícil fazer uma comparação exata entre os estudos porque as metodologias utilizadas entre eles, incluindo o nosso, são bastante diferentes. É importante considerar que o percentual de diagnóstico alcançado irá depender das características da coorte selecionada, dos critérios usados para classificar as mutações causais e dos testes genéticos utilizados para realizar o diagnóstico molecular (CORTESE et al., 2020; PIPIS et al., 2019). Por exemplo, a inclusão ou exclusão de pacientes que já foram testados previamente para os genes mais comumente mutados em cada subtipo da doença pode alterar a taxa de diagnóstico alcançada. Já, dentre as características específicas da coorte, estão o fato de que pacientes com idade de início precoce dos sintomas, histórico familiar positivo e forma desmielinizante da doença atendidos em clínicas especializadas em neuropatia hereditária estão mais propensos a receber um diagnóstico molecular definitivo do que àqueles atendidos em clínicas de neurologia geral e que apresentam as formas axonais (CORTESE et al., 2020). Um outro fato relevante é a idade do paciente. Alguns estudos mostraram que a principal causa de neuropatia periférica em crianças é de origem hereditária enquanto nos adultos pode ser que existem outras etiologias responsáveis por causar a doença (KARARIZOU et al., 2006; OUVRIER, 1995; WILMSHURST et al., 2003; WILMSHURST; OUVRIER, 2011). Consequentemente, existe uma maior probabilidade de alcançar um diagnóstico genético definitivo em pacientes mais novos. Nosso estudo corrobora todas essas afirmações, já que estudamos pacientes com CMT2 pediátrico provenientes de uma

clínica especializada em neuropatias hereditárias e não testamos, previamente, os pacientes para os genes mais comuns. Em contrapartida, Cortese et al. (2020) mostraram que fatores como sexo, número de genes presentes nos painéis NGS e a gravidade da doença não estão diretamente relacionados com aumento da taxa de diagnóstico molecular. Porém, os nossos resultados sugerem ao contrário. Nós encontramos variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas em 5 pacientes da nossa coorte, utilizando WES, localizadas em genes que não estavam no painel. Isso mostra que 13,15% (5/38) dos nossos pacientes que receberam um diagnóstico molecular foi graças ao uso de WES e não ao painel multigênico, mostrando que o número de genes pesquisado pode ter relevância na taxa de diagnóstico alcançada.

Nós não encontramos nenhuma variante potencialmente patogênica do tipo CNV nos 47 pacientes que realizaram exoma. Alguns estudos mostram que, com exceção da duplicação ou deleção do gene PMP22, variações no número de cópias são raras em pacientes com CMT (HUANG et al., 2010; MORTREUX et al., 2020; PEHLIVAN et al., 2015). Dez pacientes ficaram sem variantes candidatas (17,8%) e isso não significa, necessariamente, um resultado negativo. É preciso considerar alguns fatores:

- (i) Embora o WES e o painel NGS sejam técnicas que têm alta qualidade, algumas regiões codificadoras de proteína podem ficar sem ou com baixa cobertura gerando resultados falso-negativos (PIPIS et al., 2019);
- (ii) O teste de sequenciamento escolhido pode não detectar o tipo de variante que está causando o fenótipo (por exemplo, as variantes estruturais) ou a variante pode estar em uma região que ainda não foi relacionada com a doença ou mesmo de patogenicidade desconhecida;
- (iii) Essas metodologias (painéis NGS e WES) exploram mais as regiões codificadoras do DNA genômico e alguns estudos recentes têm demonstrado que variantes em regiões não codificadoras do genoma, também podem ser responsáveis pelo fenótipo de CMT (BERTOLI-AVELLA et al., 2021; CASSINI et al., 2019; TOMASELLI et al., 2017a). O aumento na identificação dessas variantes provavelmente levará a uma redução ainda maior no percentual de pacientes que ficam sem diagnóstico molecular definitivo, especialmente para as formas axonais (CORTESE et al., 2020).

Tabela 6-1: Percentual de pacientes com CMT2 que receberam diagnóstico molecular em diferentes estudos.

Referência (Ano)	Local	Nº CMT2	Nº CMT2 positivos	% diagnóstico molecular CMT2	Metodologias usadas
Abe et al. (2011)	Japão	127	27	21,26%	Screening tradicional CMT
Saporta et al. (2011)	EUA	96	33	34,38%	Screening tradicional CMT
Braathen et al. (2012)	Noruega	41	5	12,20%	Screening tradicional CMT
Lin et al. (2012)	China	36	14	38,89%	Screening tradicional CMT
Murphy et al. (2012a)	Reino Unido	115	29	25,22%	Screening tradicional CMT
Gess et al. (2013)	Alemanha	151	53	35,10%	Screening tradicional CMT
Sivera e Sevilla et al. (2013)	Espanha	163	102	62,58%	Screening tradicional CMT
Manganelli et al. (2014)	Itália	55	26	47,27%	Screening tradicional CMT
Rudnik-Schöneborn et al. (2015)	Alemanha	340	58	17,06%	Screening tradicional CMT
Drew et al. (2015)	Australia	43	9	20,93%	WES
Antoniadi et al. (2015)	Reino Unido	152	54	35,53%	Painel 56 genes
Fridman et al. (2015)	13 centros INC	237	102	43,04%	Screening tradicional CMT
Nam et al. (2016)	Coreia do Sul	30	4	13,33%	Painel 63 genes
Ando et al. (2017)	Japão	445	163	36,63%	Painel 60 genes/WES
Marttila et al. (2017)	Finlândia	56	30	53,57%	Screening tradicional CMT
Hartley et al. (2018)	Canada	22	6	27,27%	WES
Milley et al. (2018)	Hungria	122	42	34,43%	Screening tradicional CMT
Bacquet et al. (2018)	França	64	23	35,94%	Painel 81 genes
Yoshimura et al. (2019)	Japão	682	156	22,87%	Painel 60/72 genes
Hsu et al. (2019)	Taiwan	112	46	41,07%	Painel 124 genes
Cortese et al. (2020)	Londres/Iowa	143	32	22,38%	Painel 50-135 genes
Padilha et al. (2020)	Brasil	11	5	45,45%	Painel 104 genes
Este estudo (2021)	Brasil	56	38	67,86%	Painel 51 genes/WES
<b>Média entre os estudos</b>	-	<b>3299</b>	<b>1055</b>	<b>31,98%</b>	-

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: INC: *Inherited Neuropathies Consortium*; Nº: número de pacientes; WES – sequenciamento de todo o exoma.

## 6.2 PERFIL GENOTÍPICO DA COORTE ESTUDADA

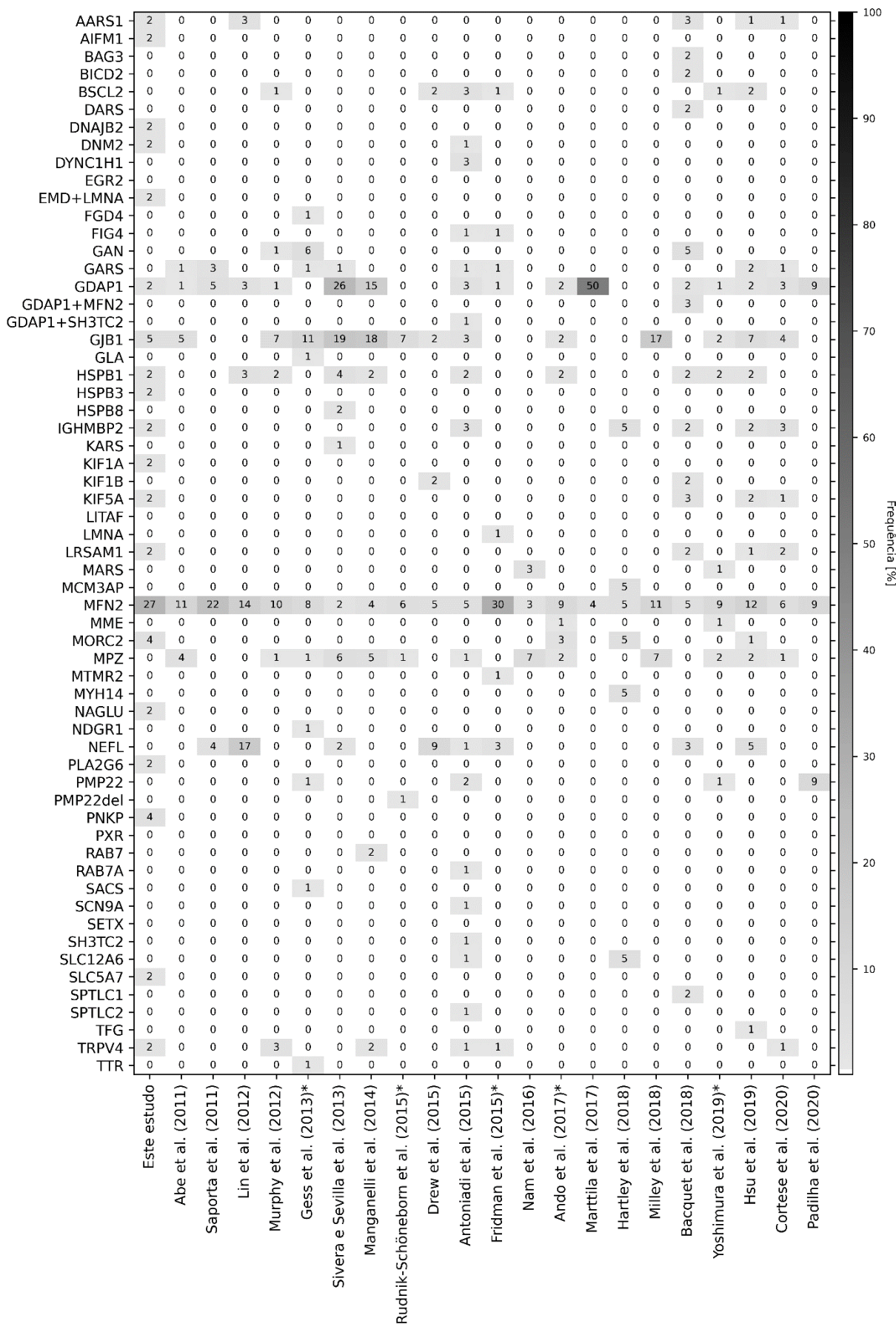
No total, 38 crianças e adolescentes receberam um diagnóstico molecular utilizando NGS, sendo encontradas 31 variantes diferentes (17 patogênicas, 14 provavelmente patogênicas) localizadas em 21 genes. Esse resultado mostra a grande heterogeneidade genética presente nessa coorte. O gene mais frequentemente mutado foi a *MFN2* com 10 variantes encontradas em 15 pacientes, seguido por *GJB1* com 3 variantes encontradas em 3 pacientes. Alterações nos genes *MFN2* e *GJB1* acometem, respectivamente, 39,47% (15/38) e 7,89% (3/38) dos casos de CMT2 que receberam um diagnóstico molecular. Somando, esses dois genes acometem uma porção significativa (47,3%; 18/38) dos casos de CMT2 que receberam um diagnóstico molecular. Esse resultado é corroborado por outros estudos que mostram que esses dois genes são responsáveis por maior parte dos casos de CMT2 (CORTESE et al., 2020; MURPHY et al., 2012a; SAPORTA et al., 2011). Esse resultado pode variar dependendo da coorte estudada, como por exemplo, estudos realizados na Espanha, Itália e Finlândia, mostram que alterações no gene *GDAP1* são mais frequentes em pacientes com CMT2 do que as alterações no gene *MFN2* (CRIMELLA et al., 2010; MANGANELLI et al., 2014; MARTTILA et al., 2017; SIVERA et al., 2013).

Os outros 20 pacientes diagnosticados geneticamente apresentam variantes em vários genes menos comuns cuja identificação teria sido extremamente trabalhosa por sequenciamento direto de genes candidatos. Dentre eles, variantes nos genes *AARS1*, *AIFM1*, *DNAJB2*, *GDAP1*, *HSPB1*, *HSPB3*, *IGHMBP2*, *KIF1A*, *KIF5A*, *NAGLU*, *PLA2G6*, *SLC5A7*, *TRPV4*, *DNM2* e *LRSAM1* acometeram um paciente cada, variantes nos genes *MORC2* e *PNKP* acometeram dois pacientes cada e um paciente (CMT\_27) apresentou uma alteração no gene *EMD* e uma alteração no gene *LMNA*. É interessante notar que as variantes nesses 19 genes apareceram em 1 ou 2 pacientes o que representa apenas 2,6% (1/38) - 5,2% (2/38) dos casos geneticamente diagnosticados. No entanto, quando somados, representam uma parcela importante de 52,7% dos casos geneticamente diagnosticados (20/38).

Um resumo do perfil genotípico dessa coorte em comparação com os estudos de epidemiologia molecular citados anteriormente estão representados na Figura 6-2. Vale lembrar que não existem estudos de epidemiologia molecular voltados especificamente para população de pacientes pediátricos com Charcot-Marie-Tooth axonal. Nesta figura estão representados o perfil genotípico de diferentes coortes de CMT2 juntamente com o percentual que cada gene representa no diagnóstico molecular (número descrito no gráfico). É importante ressaltar que, entre os trabalhos representados na figura, em 5 deles (representado com um asterisco junto ao ano de publicação – Guess et al., 2013; Rudnik-Schöneborn et al., 2015; Fridman et al., 2015; Ando et al., 2017 e; Yoshimura et al., 2019) não foi possível acessar todos os genes envolvidos no diagnóstico dos pacientes com CMT2.

É possível observar que existe uma grande variabilidade genotípica entre as coortes de pacientes com CMT2 estudadas. O gene *MFN2* foi o único gene que apresentou alterações responsáveis pelo fenótipo de CMT2 em todas as coortes, com maior frequência (30%) no estudo realizado por Fridman et al. (2015) seguido pelo nosso estudo (27%). O segundo gene mais frequente entre os estudos foi o *GDAP1* que apareceu em 16 dos 22 estudos selecionados, e foi responsável por 50% dos casos de CMT2 no estudo realizado por Marttila et al. (2017). Já as alterações no gene *GJB1* foram responsáveis pelo fenótipo de CMT2 em 14 dos 22 estudos selecionados. Variantes no gene *MPZ* são responsáveis pelo fenótipo de CMT2 em 13 coortes diferentes, porém nós não encontramos variantes neste gene em nenhum dos nossos pacientes com CMT2 pediátrico. Em contraste, variantes encontradas nos genes *AIFM1*, *DNAJB2*, *EMD + LMNA*, *HSPB3*, *KIF1A*, *NAGLU*, *PLA2G6*, *PNKP* e *SLC5A7* não apareceram em nenhuma das outras coortes representadas na figura, mesmo sendo genes que já foram relacionados com o fenótipo de CMT2. Esses achados mostram a grande heterogeneidade genética que existe entre pacientes com CMT2 em diferentes partes do mundo. Já é sabido que a doença de Charcot-Marie-Tooth, especialmente as formas axonais, são caracterizadas por ampla heterogeneidade genética e uma baixa correlação entre genótipo e fenótipo dificultando o direcionamento do diagnóstico molecular (CHOI et al., 2012). Por esse motivo, as tecnologias de NGS se mostram como melhor estratégia para o diagnóstico molecular nesse grupo de neuropatias hereditárias e com melhor custo-benefício (CORTESE et al., 2020; LUPO et al., 2016; TOMASELLI, 2018; WANG et al., 2016).

Figura 6-2: Perfil genotípico em diferentes coortes de pacientes com CMT2.



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: \*Não foi possível acessar todos os genes responsáveis pelo diagnóstico de CMT2 na coorte estudada.

### 6.3 CORRELAÇÃO GENOTÍPICA-FENOTÍPICA

Em nossa coorte, 15 pacientes não relacionados apresentaram variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas no gene *MFN2* (CMT\_6 a CMT\_18 e CMT\_35 e CMT\_36). O resumo das características clínicas dos pacientes está disponível na Tabela 5-1. No total, foram encontradas 8 variantes conhecidamente patogênicas (p.Arg94Gln, p.Arg94Trp, p.Arg104Trp, p.Thr105Met, p.Arg280His, p.Arg364Trp, p.Ala738Val e p.Gln751\*) e 2 variantes classificadas como provavelmente patogênicas (p.Ala220Thr e p.Ser249Cys). Os critérios utilizados para a classificação das variantes estão disponíveis no apêndice C (a partir da página 132) e os resultados moleculares e análise de segregação, quando possível, estão disponíveis nas tabelas do apêndice D (página 159). Como citado anteriormente, alterações no gene *MFN2* apareceram em todos os estudos de epidemiologia molecular sendo responsável por 2%-30% dos diagnósticos nos pacientes com CMT2 (Figura 6-2). O gene *MFN2* (HGNC: 16877; OMIM: 608507) está localizado no cromossomo 1 e variantes nesse gene são responsáveis pelo fenótipo de CMT2A, a forma axonal mais comum de CMT. Esse subtipo apresenta grande heterogeneidade fenotípica (envolvimento tanto do SNP quanto do SNC) e genotípica (mais de 200 variantes descritas) (FILADI; PENDIN; PIZZO, 2018; PIPIS et al., 2020). Sendo assim, é difícil fazer uma correlação entre fenótipo e genótipo porque uma mesma alteração pode estar relacionada a diferentes sintomas e idade de início (FILADI; PENDIN; PIZZO, 2018; STENSON et al., 2017). De uma forma geral, os pacientes com variantes no gene *MFN2* apresentam uma neuropatia predominantemente motora que geralmente se manifesta precocemente (PIPIS et al., 2020). Dentre as características clínicas adicionais mais comuns estão a presença de atrofia do nervo óptico, envolvimento das cordas vocais, disfunção do neurônio motor superior, comprometimento cognitivo e a presença de lesões na substância branca na ressonância magnética (BO et al., 2008; CHUNG et al., 2010; GENARI et al., 2011; LEE et al., 2017; PIPIS et al., 2020; TOMASELLI et al., 2018a; ZÜCHNER et al., 2006). De maneira geral, em nossa coorte, os pacientes com variantes nesse gene apresentaram um quadro grave a moderado de CMT2 de início precoce, que variou

desde os primeiros meses de vida (CMT\_15) até os 5 anos de idade (CMT\_35 e CMT\_36) (Tabela 5-1). Características clínicas adicionais apareceram em 2 pacientes que apresentaram a presença de sinais de liberação piramidal (CMT\_9 e CMT\_13).

Três pacientes não relacionados (CMT\_3, CMT\_29 e CMT\_28) apresentaram variantes no gene *GJB1*. O resumo das características clínicas dos pacientes está disponível na Tabela 5-1. No total, foram encontradas 1 variante conhecida patogênica (p.Val139Met) em heterozigose em uma paciente do sexo feminino e 2 variantes classificadas como provavelmente patogênica (p.Arg107Gln e p.Gly129Glu) em hemizigose em dois pacientes do sexo masculino. Os critérios utilizados para a classificação das variantes estão disponíveis no apêndice C (a partir da página 132) e os resultados moleculares e análise de segregação, quando possível, estão disponíveis nas tabelas do apêndice D (página 159). Dentre os estudos de epidemiologia molecular selecionados, alterações no gene *GJB1* foram responsáveis pelo fenótipo de CMT2 em 14 coortes, incluindo a nossa, sendo responsável por 2%-19% dos diagnósticos nos pacientes com CMT2 (Figura 6-2). O gene *GJB1* (HGNC: 4283; OMIM: 304040) está localizado no cromossomo X e variantes nesse gene são responsáveis pelo fenótipo de CMTX1 (OMIM: 302800). Alguns estudos mostram que a maioria dos pacientes com CMTX1 apresentam MNCV entre 25 m/s a 45 m/s (subtipo intermediário) com uma degeneração axonal mais proeminente do que des/remielinização, o que corrobora a ideia de que anormalidades axonais precedem a desmielinização (BORTOLOZZI, 2018; TIAN et al., 2021; VAVLITOU et al., 2010; YUAN et al., 2018). Além da neuropatia periférica caracterizada por fraqueza muscular distal progressiva, comprometimento sensitivo, hiporreflexia ou arreflexia e pés cavos, os pacientes podem apresentar disfunções episódicas agudas do sistema nervoso central (SNC) (GOUVEA et al., 2019; TIAN et al., 2021; YUAN et al., 2018). Dentre elas, foram relatados quadros de paralisia, disartria, disfagia, dormência, ataxia, dispneia, sonolência, afasia, anormalidades de comportamento, sinais de Babinski e deficiência auditiva (TIAN et al., 2021; YUAN et al., 2018). Pacientes do sexo feminino com CMTX1 apresentam sintomas geralmente mais leves do que os do sexo masculino, devido ao fenômeno de inativação do X (MURPHY et al., 2012b). De maneira geral, em nossa coorte, os pacientes apresentaram um quadro leve a moderado de CMT2 de início precoce (<2 anos a 7 anos de idade) (Tabela 5-1) e



sintomas adicionais foram observados em apenas um paciente (CMT\_29) que apresentava muitas dores nos pés.

O paciente CMT\_1 é do sexo masculino e através da utilização de um painel multigênico, nós identificamos a variante p.Arg329His em heterozigose no gene *AARS1*. A análise de segregação mostrou que o pai e a avó paterna são positivos para a mesma alteração e ambos são afetados (Apêndice D, página 159). Dentre os estudos de epidemiologia molecular selecionados, alterações no gene *AARS1* foram responsáveis pelo fenótipo de CMT2 em 5 coortes, incluindo a nossa (China, Taiwan, França, Londres/Iowa, Brasil) sendo responsável por 0,9%-2,8% dos diagnósticos nos pacientes com CMT2 (Figura 6-2). O gene *AARS1* (HGNC:20; OMIM: 601065) está localizado no cromossomo 16 e variantes nesse gene são responsáveis pelo fenótipo de CMT2N, uma forma autossômica dominante de CMT2 (OMIM: 613287). A variante encontrada neste trabalho, p.Arg329His, é uma variante conhecidamente patogênica e, apesar de já ter sido descrita em diversos pacientes, apresenta grande heterogeneidade fenotípica, inclusive intrafamiliar. Geralmente, os pacientes com essa variante apresentam CMT2 com envolvimento predominantemente de membros inferiores e pés cavos bilateral (BANSAGI et al., 2015; LATOUR et al., 2010; MCLAUGHLIN et al., 2012). Além disso, alguns pacientes podem manifestar *split hand* (atrofia seletiva dos músculos tenares) e surdez neurossensorial (observado em pacientes de 1 família australiana) (BANSAGI et al., 2015; LATOUR et al., 2010; MCLAUGHLIN et al., 2012). Com relação a idade de início dos sintomas, esta variou desde o nascimento (paciente britânico) até tardiamente (>50 anos) em pacientes britânicos e franceses (BANSAGI et al., 2015; LATOUR et al., 2010; MCLAUGHLIN et al., 2012). Condizente com esses achados, nosso paciente apresentou um fenótipo de CMT2 leve de início precoce (aos 2 anos de idade) caracterizado por um quadro de fraqueza distal dos membros inferiores e pés chatos.

O paciente CMT\_2 é do sexo masculino e através da utilização de um painel multigênico, nós identificamos a variante c.352 + 1G>A em homozigose no gene *DNAJB2*. Os pais não são consanguíneos e a variante estava presente em heterozigose apenas no DNA da mãe. O pai testou negativo para essa alteração (Apêndice D, página 159). Variantes nesse gene não estavam presentes em nenhum dos estudos selecionados de epidemiologia molecular em coortes de pacientes com CMT2 (Figura 6-2). No nosso estudo, apenas um paciente apresentou alteração nesse

gene, representando uma frequência de 1,8% dos diagnósticos nos pacientes com CMT2 pediátricos (1/56). O gene *DNAJB2* (HGNC:5228; OMIM: 604139), também conhecido como HSJ1 (Heat-Shock Protein J1), está localizado no cromossomo 2 e variantes nesse gene são responsáveis pelo fenótipo de AR-CMT2 e DSMA5 (OMIM: 614881), uma neuropatia motora distal, autossômica recessiva, associada com início dos sintomas no começo da vida adulta. A variante encontrada neste trabalho, c.352 + 1G>A, já foi descrita na literatura em alguns pacientes, e um estudo realizado na Espanha, mostrou que essa alteração pode ter um efeito fundador na região de Valencia (LUPO et al., 2016). Os pacientes com essa alteração manifestam um fenótipo de CMT2, DSMA5, e algumas vezes em associação com a doença de Parkinson e ataxia cerebelar (BLUMEN et al., 2012; FRASQUET et al., 2016; TEIVE et al., 2016). Essa associação pode ser explicada pelo papel da proteína HSJ1 que atua como uma co-chaperona que impede a agregação das proteínas mutantes SOD1 e Parkin que estão relacionadas a ALS e Parkinson, respectivamente (BLUMEN et al., 2012; ROSE et al., 2011). Frasquet et al. (2016) mostrou que os pacientes com essa alteração no gene *DNAJB2* apresentam uma dHMN de início precoce associado a um envolvimento sensitivo de início tardio. Neste trabalho, o paciente índice (CMT\_2) apresentou um fenótipo de CMT2 grave com manifestação dos primeiros sintomas aos 13 anos de idade com fraqueza e problemas de locomoção sem sintomas sensoriais iniciais. Atualmente, o paciente apresenta um quadro de CMT2/dHMN com acentuada fraqueza distal e proximal principalmente nos membros inferiores, faz uso de muletas bilateral para caminhar, apresenta um tremor intenso nos MMII, fadiga e câibras difusas, intensas e dolorosas.

O paciente CMT\_4 é do sexo masculino e através do sequenciamento do exoma, nós identificamos a variante p.Pro182Ala em heterozigose no gene *HSPB1*. Na análise de segregação realizada, o paciente índice (CMT\_4), o seu pai e seu avô paterno foram positivos para a mesma alteração (p.Pro182Ala) em heterozigose e todos são afetados, enquanto que os outros membros da família testados, foram negativos para a alteração e não são afetados (Apêndice D, página 159). Dentre os estudos de epidemiologia molecular selecionados, alterações nesse gene foram responsáveis pelo fenótipo de CMT2 em 10 coortes, incluindo a nossa, sendo responsável por 1,5%-4% dos diagnósticos nos pacientes com CMT2 (Figura 6-2). O gene *HSPB1* (HGNC:5246; OMIM: 602195) está localizado no cromossomo 7 e

variantes nesse gene são responsáveis pelos fenótipos de AD-dHMN2B (OMIM: 608634) e AD-CMT2F (OMIM: 606595). A variante encontrada neste trabalho (p.Pro182Ala) já foi descrita na literatura e é uma das 3 alterações patogênicas que acontecem nesse resíduo de aminoácido (p.Pro182Leu e p.Pro182Ser) (EVGRAFOV et al., 2004; KIJIMA et al., 2005; LIU et al., 2020; ROSSOR et al., 2017; TANABE et al., 2018). Os pacientes geralmente manifestam uma neuropatia sensitivo motora axonal (CMT2F) ou uma neuropatia exclusivamente motora (dHMN) com idade de início variável (6-54 anos) (EVGRAFOV et al., 2004; KIJIMA et al., 2005; LIU et al., 2020; ROSSOR et al., 2017; TANABE et al., 2018). Assim como descrito na literatura, o paciente índice apresentou um quadro de neuropatia motora distal que progrediu para CMT2 leve ao longo dos anos. Os primeiros sintomas começaram aos 6 anos, quando a mãe reparou que ele tinha dificuldade com a marcha. Atualmente, o paciente apresenta pés cavos, dedos em martelo, marcha escarvante, hipotrofia distal, discreta fraqueza distal e reflexos profundos diminuídos globalmente (grau 1).

O paciente CMT\_5 é do sexo masculino e através do sequenciamento do exoma, nós identificamos a variante p.Cys932TrpfsTer46 em homozigose no gene *IGHMBP2*. Apesar de não existir parentesco entre os pais, a análise de segregação mostrou que ambos os pais são portadores da mesma alteração em heterozigose e assintomáticos (Apêndice D, página 159). Dentre os estudos de epidemiologia molecular selecionados, alterações nesse gene foram responsáveis pelo fenótipo de CMT2 em 6 coortes, incluindo a nossa, sendo responsável por 1,5%-4,5% dos diagnósticos nos pacientes com CMT2 (Figura 6-2). O gene *IGHMBP2* (HGNC:5542; OMIM: 600502) está localizado no cromossomo 11 e variantes nesse gene são responsáveis pelos fenótipos de AR-CMT2S (OMIM: 616155) e SMARD1 (OMIM: 604320), uma amiotrofia espinhal distal com dificuldades respiratórias extremamente grave, podendo levar à morte do paciente antes mesmo dele completar 1 ano de idade (GUENTHER et al., 2007). A variante encontrada neste trabalho (p.Cys932TrpfsTer46) não foi descrita na literatura e nós a classificamos como patogênica (os critérios utilizados para classificação da variante estão disponíveis no apêndice C, página 139). Pacientes com CMT2S que apresentam alterações recessivas nesse gene manifestam uma neuropatia axonal grave de início precoce, com fraqueza muscular geralmente de predomínio distal e perda sensitiva (CORTESE et al., 2020; KULSHRESTHA et al., 2018; SCHOTTMANN et al., 2015; TOMASELLI et al., 2018b). Além disso, alguns

pacientes também manifestam problemas respiratórios e envolvimento do sistema nervoso autonômico, como por exemplo, disfunções da bexiga e do trato gastrointestinal (CORTESE et al., 2020; KULSHRESTHA et al., 2018; SCHOTTMANN et al., 2015; TOMASELLI et al., 2018b). Condizente com o que foi apresentado na literatura, o paciente índice apresentou um fenótipo de CMT2 com predomínio motor grave e de início precoce (aos 2 anos de idade). Além disso, ele também apresenta um comprometimento cognitivo grave e um quadro de disautonomia (intestino preso e vômitos frequentes).

Em nossa coorte, através do sequenciamento do exoma, nós identificamos a variante p.Arg252Trp em heterozigose no gene *MORC2* em dois probandos (CMT\_19 e CMT\_20) não relacionados. O estudo de segregação só foi possível nos familiares do paciente CMT\_20, onde os pais e um irmão foram negativos para essa alteração (Apêndice D, página 159). Dentre os estudos de epidemiologia molecular selecionados, alterações nesse gene foram responsáveis pelo fenótipo de CMT2 em 4 coortes, incluindo a nossa, sendo responsável por 1%-5% dos diagnósticos nos pacientes com CMT2 (Figura 6-2). O gene *MORC2* (HGNC:23573; OMIM: 616661) está localizado no cromossomo 22 e variantes nesse gene são responsáveis por doenças relacionadas ao neurodesenvolvimento (DIGFAN; OMIM: 619090) e pelo fenótipo de AD-CMT2Z (OMIM: 616688). A variante encontrada nesse trabalho, p.Arg252Trp (c.754C>T), é uma variante conhecidamente patogênica e já foi descrita em diferentes pacientes (ALBULYM et al., 2016; ANDO et al., 2017; SEVILLA et al., 2016). Ela é considerada um *hot spot* e a maioria dos pacientes são casos esporádicos (SANCHO et al., 2019). Isso porque, o nucleotídeo citosina (c.754C) está localizado em uma ilha CpG e, já é sabido que, ilhas CpG são *hot spot* para alterações devido a instabilidade do 5-metilcitosina (forma metilada de citosina) no DNA (SANCHO et al., 2019). Na literatura, os pacientes com essa alteração geralmente manifestam uma neuropatia sensitivo-motora axonal comprimento dependente com início dos sintomas precocemente (6-30 anos) (ALBULYM et al., 2016; ANDO et al., 2017; SEVILLA et al., 2016). Além disso, a presença de retardo mental, sinais piramidais, dismorfismo facial, surdez e fraqueza no pescoço também já foram relatadas em pacientes com essa alteração (p.Arg252Trp) (ALBULYM et al., 2016; ANDO et al., 2017; SEVILLA et al., 2016). A paciente CMT\_19 é do sexo feminino e apresentou os primeiros sintomas aos 6 anos de idade. Ela apresenta um quadro grave de CMT2 com deficiência

intelectual, ataxia cerebelar e surdez. Já o paciente CMT\_20 é do sexo masculino e apresenta um quadro moderado de CMT2 com início dos sintomas aos 5 anos de idade.

O paciente CMT\_21 é do sexo masculino e através do sequenciamento do exoma, nós identificamos a variante p.Ala341Thr em homozigose no gene *PLA2G6*. Apesar de não existir parentesco entre os pais, a análise de segregação mostrou que ambos os pais são portadores da mesma alteração em heterozigose e assintomáticos (Apêndice D, página 159). Variantes nesse gene não estavam presentes em nenhum dos estudos selecionados de epidemiologia molecular em coortes de pacientes com CMT2 (Figura 6-2). No nosso estudo, apenas um paciente apresentou alteração nesse gene, representando uma frequência de 1,8% dos diagnósticos nos pacientes com CMT2 pediátricos (1/56). O gene *PLA2G6* (HGNC:9039; OMIM: 603604) está localizado no cromossomo 22 e variantes nesse gene estão relacionadas com Doença de Parkinson tipo 14 (AR; OMIM: 612953), uma neurodegeneração com acúmulo de ferro no cérebro tipo 2B (AR-NBIA2B; OMIM: 610217) e uma distrofia neuroaxonal infantil (AR-INAD1) também conhecida como neurodegeneração com acúmulo de ferro no cérebro tipo 2A (AR-NBIA2A; OMIM: 256600). A variante p.Ala341Thr encontrada neste trabalho já foi descrita na literatura em heterozigose composta com outra variante (p.His157Arg) em 2 irmãos com distrofia neuroaxonal infantil e acúmulo de ferro no cérebro (INAD) (Critérios utilizados para a classificação da variante estão no apêndice C, página 143). A Distrofia neuroaxonal infantil é uma doença psicomotora grave, de início precoce e rápida progressão caracterizada por hipotonia, hiperreflexia e tetraparesia (GREGORY et al., 2008). As características neuropatológicas incluem a presença de esferoides axonais tanto no SNC quanto no SNP e alguns pacientes ainda podem apresentar acúmulo de ferro nos gânglios da base (HAYFLICK; KURIAN; HOGARTH, 2018). Um estudo mostrou que pacientes com variantes no *PLA2G6* e fenótipo de INAD manifestam os primeiros sintomas por volta de 1,1 anos apresentando regressão psicomotora grave caracterizada por hipotonia precoce progredindo para tetraparesia (GREGORY et al., 2008). Neste mesmo estudo, um número significativo de pacientes apresentava uma fraqueza espástica, ataxia ou instabilidade da marcha, anormalidades neuro-oftalmológicas (como atrofia óptica), atrofia cerebelar, acúmulo anormal de ferro nos gânglios da base (globo pálido e substância nigra) e a presença de esferoides axonais nos nervos

periféricos (biópsia) (GREGORY et al., 2008). O paciente CMT\_21 apresentou um fenótipo de CMT2/dHMN moderado com início dos sintomas aos 5 anos de idade.

Em nossa coorte, através do sequenciamento do exoma, nós identificamos a mesma deleção p.Thr408Del em homozigose no gene *PNKP* em dois probandos (CMT\_22 e CMT\_23) não relacionados. O estudo de segregação só foi possível nos familiares do paciente CMT\_22, onde os pais são primos e, ambos foram positivos para a mesma alteração em heterozigose assim como dois irmãos (Apêndice D, página 159). Variantes nesse gene não estavam presentes em nenhum dos estudos selecionados de epidemiologia molecular em coortes de pacientes com CMT2 (Figura 6-2). No nosso estudo, dois pacientes não relacionados apresentaram a mesma alteração nesse gene, representando uma frequência de 3,5% dos diagnósticos nos pacientes com CMT2 pediátricos (2/56). O gene *PNKP* (HGNC:9154; OMIM: 605610) está localizado no cromossomo 19 e variantes nesse gene são responsáveis pelos fenótipos de ataxia com apraxia oculomotora tipo 4 (AR; OMIM: 616267), microcefalia, convulsões e atraso no desenvolvimento (AR; OMIM: 613402) e CMT axonal tipo B2 (AR-CMT2B2; OMIM: 605589). A variante encontrada neste trabalho (p.Thr408Del) é conhecida patogênica e já foi descrita na literatura em pacientes com um quadro de CMT2B2 e ataxia com apraxia oculomotora tipo 4 (BRAS et al., 2015; LEAL et al., 2018; PEDROSO et al., 2015). Um estudo realizado em famílias portuguesas, encontrou a alteração p.Thr408Del em heterozigose composta com outras variantes no gene *PNKP* (Gln517Leufs\*24 e Arg439Glyfs\*51) em duas famílias não relacionadas. Os pacientes apresentaram idade de início dos sintomas precoce (1-3 anos) com um quadro de neuropatia, ataxia com apraxia oculomotora, distonia (1 paciente), atrofia cerebelar e comprometimento cognitivo (BRAS et al., 2015). Em um outro estudo, realizada na Costa Rica, a variante p.Thr408Del foi encontrada em heterozigose composta com a variante p.Gln517Ter em 5 famílias não relacionadas (LEAL et al., 2018). Diferentemente das famílias portuguesas, a idade de início dos sintomas foi mais tardiamente, por volta da terceira década de vida, quando começaram a apresentar quedas frequentes e problemas na marcha. Os pacientes apresentam um quadro de CMT2 com envolvimento cerebelar e a apraxia oculomotora estava presente em apenas 2 pacientes (LEAL et al., 2018). Assim como descrito na literatura, os dois pacientes apresentaram os primeiros sintomas precocemente sendo que o paciente CMT\_22 apresenta um quadro de CMT2 grave com ataxia leve sem a

presença de apraxia oculomotora (PEDROSO et al., 2015) enquanto que o paciente CMT\_23 apresenta um quadro moderado de CMT2 com ataxia e apraxia oculomotora. No paciente CMT\_23 não foi possível fazer o estudo de segregação dessa alteração.

O paciente CMT\_24 é do sexo masculino e através do sequenciamento do exoma, nós identificamos a variante p.Arg232Cys em heterozigose no gene *TRPV4*. No estudo de segregação, ambos os pais foram negativos para a alteração encontrada (Apêndice D, página 159). Dentre os estudos de epidemiologia molecular selecionados, alterações nesse gene foram responsáveis pelo fenótipo de CMT2 em 6 coortes, incluindo a nossa, sendo responsável por 1%-3% dos diagnósticos nos pacientes com CMT2 (Figura 6-2). O gene *TRPV4* (HGNC:18083; OMIM: 605427) está localizado no cromossomo 12 e variantes nesse gene são responsáveis por uma grande variedade de fenótipos incluindo CMT axonal tipo 2C (AD; OMIM: 606071). A variante encontrada nesse trabalho (p.Arg232Cys) é conhecidamente patogênica e já foi descrita em diversas famílias (FIORILLO et al., 2012; KLEIN et al., 2011; ZIMÓN et al., 2010). Em geral, os pacientes positivos para essa alteração em heterozigose apresentam início precoce dos sintomas podendo ter um quadro de amiotrofia espinhal distal (dSMA) ou atrofia muscular escapulo peroneal (SPSMA) ou CMT2 (FIORILLO et al., 2012; KLEIN et al., 2011; ZIMÓN et al., 2010). Além disso, alguns pacientes podem manifestar problemas nas cordas vocais e diafragma (FIORILLO et al., 2012; KLEIN et al., 2011; ZIMÓN et al., 2010). Condizente com o que está descrito na literatura, o paciente CMT\_24 apresenta um quadro de CMT2 moderado com início precoce dos primeiros sintomas (aos 3 anos de idade).

O paciente CMT\_25 é do sexo masculino e através da utilização de um painel multigênico, nós identificamos a variante p.Ala259Gly em hemizigose no gene *AIFM1*. A análise de segregação na família mostrou que o irmão, também sintomático, apresenta a mesma alteração em hemizigose, a mãe em heterozigose e o pai é negativo, confirmando a herança ligada ao X (Apêndice D, página 159). Variantes nesse gene não estavam presentes em nenhum dos estudos selecionados de epidemiologia molecular em coortes de pacientes com CMT2 (Figura 6-2). No nosso estudo, apenas um paciente apresentou alteração nesse gene, representando uma frequência de 1,8% dos diagnósticos nos pacientes com CMT2 pediátricos (1/56). O gene *AIFM1* (HGNC:8768; OMIM: 300169) está localizado no cromossomo X e variantes nesse gene são responsáveis por diversos fenótipos, incluindo CMTX4 (ou

síndrome de Cowchock; OMIM: 310490) uma forma axonal de CMT com herança recessiva ligada ao X. A variante encontrada neste trabalho (p.Ala259Gly) não foi descrita na literatura e nós a classificamos como provavelmente patogênica (os critérios utilizados para classificação da variante estão disponíveis no apêndice C, página 146). Pacientes com alterações nesse gene geralmente apresentam um quadro precoce de neuropatia axonal com ou sem a presença de ataxia cerebelar, surdez neurossensorial e comprometimento cognitivo (BOGDANOVA-MIHAYLOVA et al., 2019; RINALDI et al., 2012; WANG et al., 2018). De acordo com o que já foi descrito na literatura, o paciente CMT\_25 apresentou um fenótipo de CMT2 complexo e de início precoce caracterizado por surdez, constipação, perda visual, ataxia, disartria e comprometimento cognitivo.

A paciente CMT\_26 é do sexo feminino e através do sequenciamento do exoma, nós identificamos a variante p.Ser357Phe em heterozigose no gene *DNM2*. A análise de segregação na família mostrou que a mãe, a prima e a tia eram positivas para mesma alteração (p.Ser357Phe) e todas são afetadas (Apêndice D, página 159). Dentre os estudos de epidemiologia molecular selecionados, alterações nesse gene foram responsáveis pelo fenótipo de CMT2 em 3 coortes, incluindo a nossa, sendo responsável por 0,4%-1,8% dos diagnósticos nos pacientes com CMT2 (Figura 6-2). O gene *DNM2* (HGNC: 2974; OMIM: 602378) está localizado no cromossomo 19 e variantes nesse gene estão associadas com uma ampla variedade de fenótipos incluindo Miopatia centronuclear (AD; OMIM: 160150), Síndrome de contratura letal congênita tipo 5 (AR-LCCS5; OMIM: 615368), CMT intermediário tipo B (AD-CMTiB; OMIM: 606482) e CMT axonal tipo M (AD-CMT2M; OMIM: 606482). A variante encontrada neste trabalho (p.Ser357Phe) foi recentemente descrita na literatura e classificada como provavelmente patogênica em uma grande família Italiana com fenótipo de CMT2M (LOPERGOLO et al., 2021). Eles observaram que, com exceção do probando, todos os outros membros afetados apresentavam um quadro clínico de neuropatia mais branda, tanto em relação a idade de início quanto a manifestação dos sintomas (LOPERGOLO et al., 2021). Eles atribuíram esse fato a uma outra alteração encontrada no probando no gene *PRX* que poderia estar atuando como um gene modificador da doença. Esse paciente apresentou os primeiros sintomas aos 12 anos com dificuldades da marcha e sintomas sensitivos leves nos MMII. Na última avaliação (aos 27 anos) o paciente mostrou comprometimento mais grave com queda bilateral



dos pés, uso de AFOs para andar, fraqueza e atrofia dos músculos distais dos MMSS e MMII, ausência dos reflexos tendinosos profundo e hiperestesia nos pés (LOPERGOLO et al., 2021). Apesar da variante encontrada (p.Ser357Phe) ter sido recentemente descrita na literatura nós a classificamos como provavelmente patogênica (os critérios utilizados para classificação da variante estão disponíveis no apêndice C, página 146). Existem duas outras variantes em aminoácidos adjacentes (p.Gly358Arg e p.Gly359Asp) que já foram reportadas na literatura, classificadas como patogênicas, relacionadas ao fenótipo de CMT2M e CMTiB respectivamente (CHEN et al., 2018; CLAEYS et al., 2009). Alguns pacientes com alteração no gene *DNM2* apresentaram outras manifestações clínicas, como, oftalmoparesia, catarata congênita e ptose com ou sem a presença de neutropenia (BITOUN et al., 2008; CHEN et al., 2018; CLAEYS et al., 2009; ZÜCHNER et al., 2005). A paciente índice (CMT\_26) apresentou um fenótipo grave de CMT2 com predomínio motor e com a manifestação dos primeiros sintomas por volta dos 16 anos de idade. Alterações oculares, como oftalmoparesia não foram observadas até o momento da última consulta.

O paciente CMT\_27 é do sexo masculino e através do sequenciamento do exoma, nós identificamos a variante (c.82+1G>A) em hemizigose, que altera splicing, no gene *EMD* (HGNC:3331; OMIM: 300384) e uma alteração (p.Ser573Leu) em heterozigose no gene *LMNA* (HGNC:6636; OMIM: 150330). Não foi possível fazer o estudo de segregação nos familiares desse paciente. Dentre os estudos de epidemiologia molecular selecionados, variantes no gene *LMNA* foram identificadas em apenas um estudo, em dois pacientes com AR-CMT2A representando uma parcela de diagnóstico de 0,8% entre os pacientes com CMT2 estudados (2/237) (Figura 6-1) (FRIDMAN et al., 2015). Já variantes no gene *EMD* não estavam presentes em nenhum dos estudos selecionados (Figura 6-2). O gene *EMD* está localizado no cromossomo X e alterações nesse gene levam ao fenótipo de Distrofia Muscular do tipo Emery-Dreifuss (EDMD – OMIM: 310300). A variante encontrada neste trabalho (c.82+1G>A) foi descrita recentemente e classificada como provavelmente patogênica em um paciente com EDMD tipo 1 (BERTOLI-AVELLA et al., 2021). Já o gene *LMNA* está localizado no cromossomo 1 e alterações nesse gene levam a uma gama de fenótipos conhecidos coletivamente como Laminopatias (OMIM: 150330) incluindo CMT2B (OMIM: 605588). A maioria dos pacientes que apresentam CMT2 causados por alterações no gene *LMNA* tem herança autossômica recessiva. Porém, existem dois

trabalhos que documentaram alterações dominantes (p.Glu33Asp e p.Arg571Cys) no gene *LMNA* em pacientes com fenótipo de CMT2B e miopatia (BENEDETTI et al., 2005; GOIZET, 2004). A variante encontrada neste trabalho (p.Ser573Leu) já foi descrita em heterozigose em pacientes com cardiomiopatia dilatada (DCM) e distrofia muscular e em homozigose em um paciente com Artropatia e calcificações tendíneas (FRANCISCO et al., 2017; TAYLOR et al., 2003; VAN ESCH et al., 2006). Curiosamente, um estudo publicado em 2007, descreveu uma única família com grande heterogeneidade fenotípica intrafamiliar que apresentavam variantes em ambos os genes (*LMNA* + *EMD*) (YAOU et al., 2007). Os pacientes apresentavam 3 fenótipos distintos, doença cardíaca atrial (ACD - em 5 pacientes), CMT2 (em 1 paciente) e EDMD com CMT2 (em 2 pacientes). Os 3 pacientes com quadro de CMT2 apresentavam uma alteração em homozigose no gene *LMNA* (p.Arg298Cys) conhecida por causar o fenótipo de AR-CMT2B e uma variante no gene *EMD* (p.delK37) em hemizigose ou heterozigose (YAOU et al., 2007). Já os pacientes que apresentaram alterações em hemizigose no gene *EMD* e uma alteração em heterozigose no gene *LMNA*, assim como nosso paciente, manifestaram apenas o fenótipo de doença cardíaca (YAOU et al., 2007). No entanto, eles mostraram que alterações nesses dois genes (*EMD* + *LMNA*) provavelmente tem um efeito sinérgico tanto no fenótipo quanto na expressão das proteínas lamininas A e C (YAOU et al., 2007). O paciente CMT\_27 apresentou os primeiros sintomas aos 3 anos de idade. Na primeira consulta (aos 10 anos) ele apresentava uma fraqueza muscular difusa, com acometimento predominantemente distal dos membros superiores e um leve comprometimento na face. Nós classificamos a alteração encontrada no gene *EMD* como provavelmente patogênica e a alteração encontrada no gene *LMNA* como VUS. Os critérios utilizados para a classificação estão disponíveis no apêndice C (páginas 147 e 156 respectivamente). Esta família deverá ser melhor estudada assim que possível.

A paciente CMT\_28 é do sexo feminino e através do sequenciamento do exoma, nós identificamos a deleção p.Arg226del em heterozigose no gene *GDAP1*. Na análise de segregação a mãe foi negativa para alteração e não apresenta sintomas (Apêndice D, página 159). Não foi possível coletar amostra do pai. Dentre os estudos de epidemiologia molecular selecionados, alterações no gene *GDAP1* foram responsáveis pelo fenótipo de CMT2 em 16 coortes, incluindo a nossa, com uma alta

frequência (26%-50%) dos casos de CMT2 nas coortes Espanhola e Finlandesa, respectivamente (Figura 6-2). Neste estudo, apenas um paciente apresentou alteração nesse gene, representando uma frequência de 1,7% dos diagnósticos nos pacientes com CMT2 pediátricos (1/56). Porém, um trabalho realizado pelo nosso grupo, onde foi feito um screening do gene *GDAP1*, por Sanger, em pacientes com os subtipos de CMT relacionados ao gene, encontrou alterações patogênicas e provavelmente patogênicas em 5 pacientes não relacionados com AR-CMT2 pediátrico (FIGUEIREDO et al., 2021). Isso mostra que, na nossa região, variantes no gene *GDAP1* é mais frequente do que a representada aqui neste trabalho. O gene *GDAP1* (HGNC:15968; OMIM: 606598) está localizado no cromossomo 8 e variantes nesse gene estão associadas com diversos subtipos de CMT, incluindo CMT4A (OMIM: 214400), AD ou AR-CMT2K (OMIM: 607831) e AR-CMTi (OMIM: 608340). A variante encontrada (p.Arg226del) neste trabalho foi descrita recentemente na literatura, classificada como provavelmente patogênica, por um grupo de pesquisadores Brasileiros do Sul do país (PADILHA et al., 2020). Porém não existem muitas informações sobre as manifestações fenotípicas do paciente, apenas que ele tinha uma neuropatia axonal de início tardio (47 anos) e faz uso de cadeira de rodas para percorrer longas distâncias (PADILHA et al., 2020). Existem outras duas variantes localizadas no mesmo aminoácido (p.Arg226Ser e p.Arg226Lys) ambas com herança AD que foram descritas como patogênicas (CHOI et al., 2012; CRIMELLA et al., 2010; MANGANELLI et al., 2014; PEZZINI et al., 2016). Esses pacientes manifestaram uma forma moderada de CMT2 com uma variabilidade quanto a idade de início dos primeiros sintomas (8-35 anos) (CRIMELLA et al., 2010; MANGANELLI et al., 2014; PEZZINI et al., 2016). Exceto em um estudo, onde o paciente apresentava uma forma de CMT desmielinizante com manifestação dos primeiros sintomas aos 15 anos (CHOI et al., 2012). Um outro achado interessante foi o envolvimento subclínico do sistema nervoso autônomo (SNA) em uma família Italiana com a alteração p.Arg226Ser (PEZZINI et al., 2016). Neste estudo eles mostraram, através de uma biopsia de pele, que havia uma perda moderada de nervos autonômicos para os anexos dérmicos (principalmente dos nervos sudomotores) (PEZZINI et al., 2016). A paciente CMT\_28 apresenta um fenótipo de CMT2/dHMN leve com início dos sintomas antes do primeiro ano de vida. Assim como observado na família italiana, a paciente CMT\_28 apresenta um quadro de disautonomia que é caracterizado por

variabilidade da pressão arterial e frequência cardíaca, hipotensão postural e alterações digestivas.

O paciente CMT\_31 é do sexo masculino e através do sequenciamento do exoma, nós identificamos a variante p.Trp93Ter em heterozigose no gene *HSPB3*. Na análise de segregação, o pai foi positivo para mesma alteração e também é afetado (Apêndice D, página 159). Variantes nesse gene não estavam presentes em nenhum dos estudos selecionados de epidemiologia molecular em coortes de pacientes com CMT2 (Figura 6-2). No nosso estudo, apenas um paciente apresentou alteração nesse gene, representando uma frequência de 1,8% dos diagnósticos nos pacientes com CMT2 pediátricos (1/56). O gene *HSPB3* (HGNC:5248; OMIM: 604624) está localizado no cromossomo 5 e variantes nesse gene são responsáveis pelos fenótipos de dHMN2C (OMIM: 613376), uma neuropatia motora de herança autossômica dominante e AD-CMT2. A variante encontrada neste trabalho (p.Trp93Ter) não foi descrita na literatura e nós a classificamos como provavelmente patogênica (os critérios utilizados para classificação da variante estão disponíveis no apêndice C, página 149). O gene *HSPB3* codifica a proteína *small heat shock protein 27-like* (HSPBL27) pertencente à família de proteínas HSPs (VENDREDY; ADRIAENSSENS; TIMMERMAN, 2020). Elas são caracterizadas por ter um domínio altamente conservado chamado domínio *alpha-crystallin* que exerce um papel importante na interação e funcionamento correto das proteínas HSPs (VENDREDY; ADRIAENSSENS; TIMMERMAN, 2020). A variante encontrada está localizada nesse domínio altamente conservado e resulta em um *stop codon* prematuro. Na literatura, existem apenas a descrição de duas variantes no gene *HSPB3* relacionadas ao fenótipo de CMT2 ou dHMN (p.Arg7Ser e p.Tyr118His) (KOLB et al., 2010; LAŠŠUTHOVÁ et al., 2016; NAM et al., 2018b). A variante p.Tyr118His, também localizada no domínio *alpha-crystallin*, foi encontrada em uma família Coreana com CMT2-AD (NAM et al., 2018b). Os pacientes afetados (probando e pai) apresentavam comprometimento sensitivo, fraqueza e atrofia muscular distal, predominantemente nos MMII, pés cavos e comprometimento da marcha (NAM et al., 2018b). A idade de início dos sintomas no probando foi aos 21 anos de idade e hoje, aos 29 anos, ela faz uso de órteses de tornozelo e pé (NAM et al., 2018b). O paciente CMT\_31 apresenta um fenótipo de CMT2/CMTi leve de início precoce.

A paciente CMT\_32 é do sexo feminino e através do sequenciamento do exoma, nós identificamos a variante p.Arg316Gln em heterozigose no gene *KIF1A*. Não foi

possível fazer estudo de segregação na família dessa paciente. Variantes nesse gene não estavam presentes em nenhum dos estudos selecionados de epidemiologia molecular em coortes de pacientes com CMT2 (Figura 6-2). No nosso estudo, apenas um paciente apresentou alteração nesse gene, representando uma frequência de 1,8% dos diagnósticos nos pacientes com CMT2 pediátricos (1/56). O gene *KIF1A* (HGNC:888; OMIM: 601255) está localizado no cromossomo 2 e variantes nesse gene são responsáveis por diversos fenótipos incluindo a síndrome de NESCAV (herança AD; OMIM: 614255), AR-HSN tipo 2C (OMIM: 614213) e paraparesia espástica tipo 30 (herança AD ou AR; OMIM: 610357). A variante encontrada neste trabalho (p.Arg316Gln) não foi descrita na literatura e nós a classificamos como provavelmente patogênica (os critérios utilizados para classificação da variante estão disponíveis no apêndice C, página 149). O gene *KIF1A* codifica uma proteína motora (família das kinesinas) envolvida no transporte anterógrado de precursores da vesícula sináptica (SV) ao longo dos axônios (LEE et al., 2015; OHBA et al., 2015). A variante p.Arg316Gln está localizada no domínio motor (porção N-terminal) que exerce papel crucial para funcionamento correto da proteína, participando diretamente do processo de transporte axonal (LEE et al., 2015; OHBA et al., 2015). Além disso, existe uma variante localizada no mesmo aminoácido (p.Arg316Trp) que foi descrita em dois pacientes distintos com um quadro clínico complexo caracterizado por atraso global do desenvolvimento, deficiência intelectual de moderada a severa, atrofia do nervo óptico, atrofia cerebelar, ataxia e paraparesia espástica (LEE et al., 2015; OHBA et al., 2015). A presença de neuropatia foi verificada em apenas um dos estudos onde o paciente apresentava diminuição da MCV (24m/s) no nervo tibial posterior (OHBA et al., 2015). Um outro estudo descreveu um paciente com alteração *de novo* no *KIF1A* (p.Arg13His) que apresentava um fenótipo de neuropatia axonal, espasticidade e transtorno do espectro do autista (TEA) (TOMASELLI et al., 2017b). Assim como citado anteriormente, a paciente CMT\_32 apresenta um fenótipo de CMT2 complexo, com início dos primeiros sintomas aos 4 anos de idade.

O paciente CMT\_33 é do sexo masculino e através do sequenciamento do exoma, nós identificamos a variante p.Asp996Gly em heterozigose no gene *KIF5A*. A análise de segregação mostrou que a mãe foi negativa para mesma alteração e é assintomática (Apêndice D, página 159). Dentre os estudos de epidemiologia molecular selecionados, alterações nesse gene foram responsáveis pelo fenótipo de

CMT2 em 4 coortes, incluindo a nossa, sendo responsável por 1,8%-3% dos diagnósticos nos pacientes com CMT2 (Figura 6-2). O gene *KIF5A* (HGNC:6323; OMIM: 602821) está localizado no cromossomo 12 e variantes nesse gene são responsáveis por diversos fenótipos incluindo, paraparesia espástica tipo 10 (AD-HSP 10; OMIM: 604187), AD-ALS25 (OMIM: 617921) e AD-CMT2 com ou sem a presença de sinais piramidais (LIU et al., 2014; NAM et al., 2018a). A variante encontrada neste trabalho (p.Asp996Gly) não foi descrita na literatura e nós a classificamos como provavelmente patogênica (os critérios utilizados para classificação da variante estão disponíveis no apêndice C, página 150). Uma variante localizada no mesmo aminoácido (p.Asn996fs) foi encontrada em um paciente com esclerose lateral amiotrófica familiar (NICOLAS et al., 2018). Neste mesmo trabalho, eles mostraram que pacientes com ALS apresentam variantes localizadas preferencialmente no domínio N-terminal da proteína (*tail*; aminoácido 907-1032) enquanto as variantes localizadas no domínio motor (aminoácido 9-327) manifestam fenótipo de CMT2 ou HSP (NICOLAS et al., 2018). Os pacientes com fenótipo de CMT2 causado por variantes no gene *KIF5A* são caracterizados por idade de início (8-54 anos) e fenótipo bastante variados. Eles podem manifestar um fenótipo clássico de uma neuropatia axonal (CMT2) ou com manifestações clínicas adicionais, como HSP, ataxia, fadigabilidade, sinais piramidais, problemas cognitivos e dificuldades de aprendizagem (LIU et al., 2014; NAM et al., 2018a). O paciente CMT\_33 manifestou os primeiros sintomas aos 11 anos de idade e apresenta um quadro grave de CMT2/dHMN.

O paciente CMT\_34 é do sexo masculino e através do sequenciamento do exoma, nós identificamos duas variantes (p.Glu312AlafsTer48 e p.Arg315Leu) em heterozigose no gene *LRSAM1*. Através de análise do arquivo BAM, foi possível observar que as variantes estão localizadas na mesma read, ou seja, em *cis*. Dentre os estudos de epidemiologia molecular selecionados, alterações nesse gene foram responsáveis pelo fenótipo de CMT2 em 5 coortes, incluindo a nossa, sendo responsável por 0,5%-2% dos diagnósticos nos pacientes com CMT2 (Figura 6-2). O gene *LRSAM1* (LRSAM1; OMIM: 610933) está localizado no cromossomo 9 e variantes nesse gene são responsáveis pelo fenótipo de CMT2P com herança autossômica dominante ou, menos frequente, herança autossômica recessiva (OMIM: 614436). As variantes encontradas neste trabalho (p.Glu312AlafsTer48 e p.Arg315Leu) não foram descritas na literatura e nós as classificamos como

provavelmente patogênica e VUS respectivamente (os critérios utilizados para classificação das variantes estão disponíveis no apêndice C, páginas 150 e 157 respectivamente). Existem vários estudos relatando variantes no gene *LRSAM1* responsáveis pelo fenótipo de CMT2P que é, em geral, caracterizado por uma neuropatia axonal de início tardio (10-56 anos) com comprometimento predominantemente sensitivo, déficit motor lentamente progressivo, atrofia e deformidades nos pés (ENGEHOLM et al., 2014; GUERNSEY et al., 2010; PALAIMA et al., 2021; PERETTI et al., 2019; REILICH et al., 2021). Além disso, ataxia acentuada da marcha, dor neurogênica, envolvimento do sistema nervoso autônomo (como disfunção erétil e problemas urinários) e elevação da creatina quinase (CK) também já foram relatadas (ENGEHOLM et al., 2014; GUERNSEY et al., 2010; REILICH et al., 2021). Alguns estudos também sugerem a possibilidade de uma associação clínica de CMT2P com doenças neurodegenerativas do sistema nervoso central pela presença de Parkinson em alguns pacientes (AERTS et al., 2016; PERETTI et al., 2019). Variantes recessivas nesse gene são raras e foi descrita em apenas duas famílias, uma do Canadá e outra da Austrália (GUERNSEY et al., 2010; REILICH et al., 2021). A maioria das variantes patogênicas descritas nesse gene estão localizados no domínio RING (C-terminal; aminoácidos 675-710) mostrando a importância desse domínio para a correta função da proteína (PALAIMA et al., 2021). As duas variantes encontradas nesse trabalho estão localizadas em um outro domínio funcional importante da proteína (coiled-coil 2 – CC2; aminoácidos 308-416) que, juntamente com outros domínios, são responsáveis pela interação da proteína com o seu substrato (NCBI RESOURCE COORDINATORS, 2018; PALAIMA et al., 2021). Além disso, a alteração (p.Glu312AlafsTer48) causa um *stop codon* prematuro fazendo com que todo o domínio RING da proteína seja perdido. O paciente CMT\_34 apresentou um fenótipo de CMT2 grave de início precoce (aos 11 anos de idade).

A paciente CMT\_37 é do sexo feminino e através do sequenciamento do exoma, nós identificamos a variante p.Arg177Gln em heterozigose no gene *NAGLU*. A análise de segregação mostrou que a mãe foi negativa para mesma alteração e é assintomática (Apêndice D, página 159). Variantes nesse gene não estavam presentes em nenhum dos estudos selecionados de epidemiologia molecular em coortes de pacientes com CMT2 (Figura 6-2). No nosso estudo, apenas um paciente apresentou alteração nesse gene, representando uma frequência de 1,8% dos

diagnósticos nos pacientes com CMT2 pediátricos (1/56). O gene *NAGLU* (HGNC:7632; OMIM: 609701) está localizado no cromossomo 17 e variantes nesse gene são responsáveis por uma forma autossômica recessiva de mucopolissacaridose tipo 3B (Sanfilippo B; OMIM: 252920) e um subtipo autossômico dominante de CMT axonal tipo 2V (AD-CMT2V; OMIM: 616491). A variante encontrada neste trabalho, p.Arg177Gln, não foi descrita na literatura e nós a classificamos com provavelmente patogênica (os critérios utilizados para classificação da variante estão disponíveis no apêndice C, página 152). Na literatura, foi descrita uma variante localizada no mesmo aminoácido (p.Arg177Trp) que estava em heterozigose composta com outra variante no gene *NAGLU* (p.Ser612Gly) em uma paciente com um quadro clínico de mucopolissacaridose tipo 3B. O gene *NAGLU* codifica a enzima  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidase, que está envolvida na degradação de mucopolissacarídeos (heparan sulfato) (SELMER et al., 2012; TÉTREAULT et al., 2015). A função prejudicada dessa enzima leva ao acúmulo de mucopolissacarídeos parcialmente degradados nos lisossomos e ao aumento da excreção de heparan sulfato na urina (SELMER et al., 2012; TÉTREAULT et al., 2015). Esse acúmulo é neurotóxico e pode levar a manifestações clínicas envolvendo tanto o sistema nervoso central quanto o sistema nervoso periférico (TÉTREAULT et al., 2015). A variante encontrada neste trabalho (p.Arg177Gln) está localizada no domínio catalítico da enzima que é extremamente importante para que ela consiga exercer sua atividade enzimática (TÉTREAULT et al., 2015). Até o momento, foram reportadas apenas duas grandes famílias com alterações em heterozigose (p.Ile403Thr e p.Glu123Ter) no gene *NAGLU* e que apresentavam um fenótipo de CMT2 (TÉTREAULT et al., 2015). No geral, os pacientes afetados manifestam um fenótipo de neuropatia axonal predominantemente sensitiva com a presença de dores nas extremidades inferiores que começam entre os 18-61 anos e evoluem com o tempo (TÉTREAULT et al., 2015). Manifestações clínicas menos comuns incluem, fraqueza muscular leve, tremor em repouso, ataxia sensitiva e distúrbio do sono (TÉTREAULT et al., 2015). A atividade enzimática foi medida em 38 indivíduos de uma mesma família (18 casos afetados) e todos os familiares portadores da variante p.Ile403Thr em heterozigose apresentaram uma diminuição significativa da função enzimática (média de 45%) (TÉTREAULT et al., 2015). Assim como citado anteriormente, a paciente CMT\_33 apresenta um quadro de CMT2 moderado de início precoce (aos 4 anos de idade) com a presença de dores intensas e generalizadas.



O paciente CMT\_38 apresenta um quadro de CMT2 de início precoce, é do sexo masculino e através do sequenciamento do exoma, nós identificamos a variante c.1113+2T>A em homozigose no gene *SLC5A7*. Não foi possível fazer estudo de segregação na família dessa paciente. Variantes nesse gene não estavam presentes em nenhum dos estudos selecionados de epidemiologia molecular em coortes de pacientes com CMT2 (Figura 6-2). No nosso estudo, apenas um paciente apresentou alteração nesse gene, representando uma frequência de 1,8% dos diagnósticos nos pacientes com CMT2 pediátricos (1/56). O gene *SLC5A7* (HGNC:14025; OMIM: 608761) está localizado no cromossomo 2 e variantes nesse gene são responsáveis pela Síndrome miastênica congênito tipo 20 (AR-CMS20; OMIM: 617143) e dHMN tipo VIIA (AD; OMIM: 158580). Ele codifica um transportador pré-sináptico de colina (CHT) que faz a recaptção de colina (Ch) após a quebra da acetilcolina (ACh) pela acetilcolinesterase (AChE) na junção neuromuscular (NMJ) (BAUCHÉ et al., 2016; WORTMANN; MAYR, 2019). Após essa recaptção, a colina é usada para ressintetizar ACh pela ação da Colina acetiltransferase (ChAT) (WORTMANN; MAYR, 2019). Variantes bialélicas nesse gene levam ao quadro de CMS20 caracterizado por hipotonia muscular e fraqueza, ptose, problemas de sucção e deglutição e apneia episódica proeminente com início neonatal (WORTMANN; MAYR, 2019). A gravidade da doença é variável e alguns pacientes respondem bem aos inibidores da acetilcolinesterase (BAUCHÉ et al., 2016; WORTMANN; MAYR, 2019). Já as variantes em heterozigose nesse mesmo gene levam ao quadro de dHMN tipo VIIA caracterizado por uma atrofia e fraqueza muscular distal progressiva afetando os membros superiores e inferiores a partir da segunda década de vida (BARWICK et al., 2012; SALTER et al., 2018; WORTMANN; MAYR, 2019). Alguns pacientes podem apresentar paresia das cordas vocais e envolvimento pronunciado e precoce dos músculos intrínsecos da mão, o que poderia ser uma pista clínica útil para a presença de variantes no *SLC5A7* (BARWICK et al., 2012; SALTER et al., 2018; WORTMANN; MAYR, 2019). A variante encontrada neste trabalho (c.1113+2T>A) não foi descrita na literatura e nós a classificamos como provavelmente patogênica (os critérios utilizados para classificação da variante estão disponíveis no apêndice C, página 152). Essa variante é do tipo *nonsense* que está localizada em um sítio canônico de splicing (variantes localizadas +/- 1 ou 2 aminoácidos do éxon). Esse tipo de variante pode ocasionar a perda do éxon adjacente, por exemplo, e por isso geralmente são consideradas como tendo efeito de perda de função da proteína (LoF – *loss of*

*function*) (RICHARDS et al., 2015; TAYOUN et al., 2018). Informações clínicas mais detalhadas serão obtidas após uma reavaliação do paciente.

No total, nós encontramos 22 variantes novas em genes já conhecidos que ainda não foram descritas na literatura (1 patogênica, 11 provavelmente patogênicas e 10 VUS) ampliando o espectro genético de CMT2 (variantes descritas na Tabela 5-2). Essas descobertas são importantes para ajudar futuras interpretações de resultados, melhorar entendimento dos mecanismos genéticos envolvidos em CMT e aumentar a descrição de famílias com alterações raras, para futuramente, quem sabe, conseguir uma correlação entre genótipo e fenótipo. A interpretação das VUS é um desafio de diagnóstico na era do NGS. A classificação incorreta dessas variantes como patogênicas ou benignas pode ter implicações clínicas e jurídicas importantes, especialmente no aconselhamento genético (CORTESE et al., 2020). Nesse estudo, as VUS foram identificadas em 14,2% dos pacientes (n= 8/56) e para reduzirmos esse número, será necessário a realização de outros estudos (funcionais, clínicos, segregação na família, aplicação de outras metodologias para teste genético etc.) e frequentes atualizações na literatura.

#### **6.4 O IMPACTO TERAPÊUTICO DO DIAGNÓSTICO PRECOCE**

Estabelecer um diagnóstico definitivo em pacientes com neuropatias hereditárias é um processo complexo, caro e demorado que pode envolver diversas etapas (VISSERS et al., 2017). Dentre elas estão a realização de ressonância magnética, exames de eletroneuromiografia, exames de sangue bioquímicos e/ou metabólicos, biópsia muscular, testes genéticos para um ou mais genes e consultas em diferentes especialidades médicas (VISSERS et al., 2017). Com o surgimento das tecnologias de NGS houve uma grande revolução no diagnóstico genético nos pacientes com CMT. Como citado anteriormente, a introdução dessas novas tecnologias na prática clínica acelerou dramaticamente a identificação de novos genes relacionados às neuropatias hereditárias periféricas e o número de pacientes que conseguem um diagnóstico genético. Dos métodos de diagnóstico disponíveis atualmente para CMT, os sequenciadores de nova geração são um método eficaz em termos de tempo e

custo capazes de encurtar significativamente o intervalo entre o diagnóstico e o tratamento, se disponível (DOHRN et al., 2017).

O diagnóstico genético tem um impacto significativo tanto para os pacientes afetados quanto para seus familiares. Além de oferecer um diagnóstico preciso de forma mais rápida, ele também pode evitar a necessidade de realizar outros testes caros e/ou invasivos e evita tratamentos desnecessários, que muitas vezes podem ser tóxicos. Ademais, o diagnóstico molecular confirma padrão de herança e permite um aconselhamento genético mais eficaz, muitas vezes fornece informações prognósticas, melhora a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da doença e possibilita a seleção de pacientes para participação em futuros ensaios e pesquisas terapêuticas (ARNOLD et al., 2015; RUDNIK-SCHÖNEBORN; AUER-GRUMBACH; SENDEREK, 2020; SILVEIRA-MORIYAMA; PACIORKOWSKI, 2018). Um exemplo clássico onde o diagnóstico precoce é extremamente importante é na polineuropatia amiloidótica familiar (FAP) relacionado a alterações no gene *TTR* (transtirretina). Essa é uma doença sistêmica, progressiva, que se manifesta inicialmente como polineuropatia axonal sensitivo-motora e autonômica podendo ser letal devido ao envolvimento cardíaco e insuficiência de múltiplos órgãos se não for tratada com antecedência (DOHRN et al., 2017). Atualmente, as opções de tratamento são aprovadas apenas para o primeiro estágio da doença o que torna o diagnóstico molecular precoce essencial (DOHRN et al., 2017).

Existem várias alternativas promissoras de terapia genética surgindo, tais como reposição gênica com vetores virais (AAV), terapias com oligonucleotídeo anti-sense (ASO) e interferência por RNA (RNAi) que estão mudando as perspectivas terapêuticas das NHs (MORELLI et al., 2020; ROSSOR; SHY; REILLY, 2020). Um exemplo, é a utilização de AAV em neuropatias causadas por alterações no gene *GAN* que conseguiu reverter o aumento dos axônios em camundongos, uma marca registrada da doença, (MORELLI et al., 2020). A segurança e eficácia desse tratamento estão sendo avaliados em ensaios clínicos com o primeiro paciente tratado em 2015 (MORELLI et al., 2020).

Os nervos periféricos danificados possuem baixa capacidade regenerativa, fazendo com que o objetivo principal para um tratamento eficaz para CMT seja prevenir a progressão da doença (ROSSOR; SHY; REILLY, 2020). Já é sabido que a progressão da doença e a gravidade clínica dos pacientes está diretamente

---

relacionada com uma perda axonal comprimento-dependente, existindo um intervalo de tempo entre o aparecimento dos primeiros sintomas e a degeneração axonal completa (SAHENK; OZES, 2020). Essas terapias podem ter benefícios limitados caso uma degeneração axonal significativa já houver se instalado em pacientes mais velhos. Portanto, ações terapêuticas que visam retardar ou até mesmo prevenir a progressão da degeneração axonal em pacientes com CMT devem ser idealmente implementadas durante a manifestação dos primeiros sintomas (a infância).

Não existem muito estudos voltados para a população de pacientes com CMT pediátrico e isso pode ser atribuído a ausência de programas de coleta de dados nacionais ou internacionais, ferramentas de avaliação uniformes, estudos de história natural de longo prazo e um atraso significativo no diagnóstico (d até 10 anos) para essa população (JANI-ACSADI et al., 2015).

## 7. CONCLUSÃO

Nós caracterizamos genotipicamente uma amostra de 56 crianças e adolescentes com CMT axonal atendidos no ANGE até dezembro de 2020, utilizando apenas metodologias de sequenciamento de NGS (painel multigênico e sequenciamento de todo o exoma). Os resultados obtidos neste trabalho nos possibilitaram chegar as seguintes conclusões:

1. As tecnologias NGS, especialmente WES, são eficazes no diagnóstico molecular de pacientes pediátricos com CMT2.
2. O diagnóstico molecular foi alcançado em 67,8% dos pacientes (38/56), considerando apenas as alterações patogênicas e provavelmente patogênicas.
3. A epidemiologia molecular local dessa faixa etária se mostrou bastante heterogênea, com 29 genes mutados em 38 pacientes.
4. Variantes nos genes *MFN2* e *GJB1* são responsáveis por 47,3% dos diagnósticos de pacientes pediátricos com CMT2.
5. Variantes raras em 19 genes diferentes são responsáveis por 52,7% dos diagnósticos de pacientes pediátricos com CMT2.
6. Não encontramos variantes candidatas do tipo CNVs na coorte estudada.
7. Devido à alta heterogeneidade genotípica observada, nós sugerimos que pacientes com quadro clínico de CMT2 sejam testados diretamente por plataformas de NGS, especialmente WES.
8. O número de genes pesquisados bem como as características da coorte selecionada (idade de início dos sintomas e atendimento em centros especializados) podem influenciar na taxa de diagnóstico;
9. A descoberta de novas variantes amplia o espectro genético das formas axonais CMT.
10. Evidenciamos os genes que podem manifestar os sintomas clínicos precocemente.

## **8. TRABALHOS FUTUROS**

Diante do exposto acima, são sugeridos os seguintes tópicos para trabalhos futuros:

1. As variantes de significado incerto descritas nos genes relacionados a CMT2 serão avaliadas com mais detalhes por estudos de segregação e se possível com análises funcionais a fim de definir a patogenicidade dessas variantes;
2. Criação de um banco de dados e curadoria de todas as variantes encontradas (raras ou frequentes) para facilitar próximas interpretações;
3. Pacientes que ficaram sem um diagnóstico molecular definitivo serão enviados para realizar WGS ou será feito WES de familiares;
4. Caracterização clínica mais detalhada dos pacientes e tentativa de correlacionar fenótipo e genótipo;
5. Aplicação de escalas que medem progressão da doença específica para população pediátrica (CMTPedS).
6. Possível inclusão em testes terapêuticos;

## REFERÊNCIAS

ABE, A. *et al.* Molecular diagnosis and clinical onset of Charcot-Marie-Tooth disease in Japan. **Journal of Human Genetics**, v. 56, n. 5, p. 364–368, 17 maio 2011.

AERTS, M. B. *et al.* A LRSAM1 mutation links Charcot-Marie-Tooth type 2 to Parkinson's disease. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 3, n. 2, p. 146–149, 22 fev. 2016.

AGARWALA, R. *et al.* Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D8–D13, 4 jan. 2018.

ALBULYM, O. M. *et al.* MORC2 mutations cause axonal Charcot-Marie-Tooth disease with pyramidal signs. **Annals of Neurology**, v. 79, n. 3, p. 419–427, 1 mar. 2016.

ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 5 out. 1990.

ANDO, M. *et al.* Clinical and mutational spectrum of Charcot-Marie-Tooth disease type 2Z caused by MORC2 variants in Japan. **European Journal of Neurology**, v. 24, n. 10, p. 1274–1282, 1 out. 2017.

ANTONIADI, T. *et al.* Application of targeted multi-gene panel testing for the diagnosis of inherited peripheral neuropathy provides a high diagnostic yield with unexpected phenotype-genotype variability. **BMC Medical Genetics**, v. 16, n. 1, p. 84, 21 dez. 2015.

AURANEN, M. *et al.* Dominant GDAP1 founder mutation is a common cause of axonal Charcot-Marie-Tooth disease in Finland. **Neurogenetics**, v. 14, n. 2, p. 123–132, 3 maio 2013.

AUTON, A. *et al.* A global reference for human genetic variation. **Nature**, v. 526, n. 7571, p. 68–74, 1 out. 2015.

BACQUET, J. *et al.* Molecular diagnosis of inherited peripheral neuropathies by targeted next-generation sequencing: molecular spectrum delineation. **BMJ Open**, v. 8, n. 10, p. e021632, 28 out. 2018.

BAETS, J. *et al.* Genetic spectrum of hereditary neuropathies with onset in the first year of life. **Brain**, v. 134, n. 9, p. 2664–2676, set. 2011.

BANSAGI, B. *et al.* Genotype/phenotype correlations in AARS-related neuropathy in a cohort of patients from the United Kingdom and Ireland. **Journal of Neurology**, v.

262, n. 8, p. 1899–1908, 2 ago. 2015.

BARRETO, L. C. L. S. *et al.* Epidemiologic study of Charcot-Marie-Tooth Disease: A systematic review. **Neuroepidemiology**, v. 46, n. 3, p. 157–165, 1 abr. 2016.

BARWICK, K. E. S. *et al.* Defective presynaptic choline transport underlies hereditary motor neuropathy. **The American Journal of Human Genetics**, v. 91, n. 6, p. 1103–1107, 7 dez. 2012.

BAUCHÉ, S. *et al.* Impaired presynaptic high-affinity choline transporter causes a congenital myasthenic syndrome with episodic apnea. **The American Journal of Human Genetics**, v. 99, n. 3, p. 753–761, 1 set. 2016.

BENARROCH, L. *et al.* The 2020 version of the gene table of neuromuscular disorders (nuclear genome). **Neuromuscular Disorders**, v. 29, n. 12, p. 980–1018, 1 dez. 2019.

BENEDETTI, S. *et al.* Dominant LMNA mutations can cause combined muscular dystrophy and peripheral neuropathy. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 76, n. 7, p. 1019–1021, 1 jul. 2005.

BERCIANO, J. *et al.* Guidelines for molecular diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease. **Neurología (English Edition)**, v. 27, n. 3, p. 169–178, abr. 2012.

BERTOLI-AVELLA, A. M. *et al.* Successful application of genome sequencing in a diagnostic setting: 1007 index cases from a clinically heterogeneous cohort. **European Journal of Human Genetics**, v. 29, n. 1, p. 141–153, 28 jan. 2021.

BITOUN, M. *et al.* A novel mutation in the dynamin 2 gene in a Charcot-Marie-Tooth type 2 patient: Clinical and pathological findings. **Neuromuscular Disorders**, v. 18, n. 4, p. 334–338, 1 abr. 2008.

BLUMEN, S. C. *et al.* A rare recessive distal hereditary motor neuropathy with HSJ1 chaperone mutation. **Annals of Neurology**, v. 71, n. 4, p. 509–519, 1 abr. 2012.

BO, R. D. *et al.* Mutated mitofusin 2 presents with intrafamilial variability and brain mitochondrial dysfunction. **Neurology**, v. 71, n. 24, p. 1959–1966, 9 dez. 2008.

BOGDANOVA-MIHAYLOVA, P. *et al.* Clinical spectrum of *AIFM1*-associated disease in an Irish family, from mild neuropathy to severe cerebellar ataxia with colour blindness. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 24, n. 4, p. 348–353, 10 dez. 2019.

BORGHETTI, V. H. S. **Análise fenotípica e genotípica de crianças e adolescentes portadores de neuropatia crônica com início antes dos 18 anos.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2010.



BORTOLOZZI, M. What's the function of connexin 32 in the peripheral nervous system? **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, 10 jul. 2018.

BRAATHEN, G. J. Genetic epidemiology of Charcot-Marie-Tooth disease. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 126, n. S193, p. iv–22, nov. 2012.

BRAS, J. *et al.* Mutations in PNKP cause recessive ataxia with oculomotor apraxia type 4. **The American Journal of Human Genetics**, v. 96, n. 3, p. 474–479, 5 mar. 2015.

CANTSILIERIS, S.; BAIRD, P. N.; WHITE, S. J. Molecular methods for genotyping complex copy number polymorphisms Genomics. **Genomics**, v. 101, n. 2, p. 86–93, 1 fev. 2013.

CARROLL, A. S. *et al.* Inherited Neuropathies. **Seminars in Neurology**, v. 39, n. 05, p. 620–639, 22 out. 2019.

CASSINI, T. A. *et al.* Whole genome sequencing reveals novel IGHMBP2 variant leading to unique cryptic splice-site and Charcot-Marie-Tooth phenotype with early onset symptoms. **Molecular Genetics & Genomic Medicine**, v. 7, n. 6, p. 676, 25 jun. 2019.

CHANCE, P. F. *et al.* DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. **Cell**, v. 72, n. 1, p. 143–151, 15 jan. 1993.

CHARCOT-MARIE-TOOTH ASSOCIATION. Understanding CMT. **Charcot-Marie-Tooth Association**. Disponível em: <<https://www.cmtausa.org/understanding-cmt/>>. Acesso em: 22 mar. 2021.

CHEN, S. *et al.* Phenotype variability and histopathological findings in patients with a novel DNM2 mutation. **Neuropathology**, v. 38, n. 1, p. 34–40, 1 fev. 2018.

CHOI, B.-O. *et al.* Exome sequencing is an efficient tool for genetic screening of Charcot-Marie-Tooth Disease. **Human Mutation**, v. 33, n. 11, p. 1610–1615, nov. 2012.

CHUNG, K. W. *et al.* Early-onset Charcot-Marie-Tooth patients with mitofusin 2 mutations and brain involvement. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 81, n. 11, p. 1203–1206, 1 nov. 2010.

CINGOLANI, P. *et al.* A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff. **Fly**, v. 6, n. 2, p. 80–92, 27 abr. 2012.

CLAEYS, K. G. *et al.* Phenotypic spectrum of dynamin 2 mutations in Charcot-Marie-Tooth neuropathy. **Brain**, v. 132, n. 7, p. 1741–1752, 2009.

COOPER, G. M. Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence. **Genome Research**, v. 15, n. 7, p. 901–913, 17 jun. 2005.

CORTESE, A. *et al.* Targeted next-generation sequencing panels in the diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease. **Neurology**, v. 94, n. 1, p. e51–e61, 7 jan. 2020.

CRIMELLA, C. *et al.* The GST domain of GDAP1 is a frequent target of mutations in the dominant form of axonal Charcot-Marie-Tooth type 2K. **Journal of Medical Genetics**, v. 47, n. 10, p. 712–716, 1 out. 2010.

CUNNINGHAM, F. *et al.* Improving the Sequence Ontology terminology for genomic variant annotation. **Journal of Biomedical Semantics**, v. 6, n. 1, 31 jul. 2015.

DEN DUNNEN, J. T. *et al.* HGVS Recommendations for the description of sequence variants: 2016 Update. **Human Mutation**, v. 37, n. 6, p. 564–569, jun. 2016.

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

DOHRN, M. F. *et al.* Frequent genes in rare diseases: panel-based next generation sequencing to disclose causal mutations in hereditary neuropathies. **Journal of Neurochemistry**, v. 143, n. 5, p. 507–522, 1 dez. 2017.

DREW, A. P. *et al.* Improved inherited peripheral neuropathy genetic diagnosis by whole-exome sequencing. **Molecular Genetics and Genomic Medicine**, v. 3, n. 2, p. 143–154, 1 mar. 2015.

DUBOURG, O. *et al.* Autosomal-recessive forms of demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease. **NeuroMolecular Medicine**, v.8, n. 1-2, p. 75-85, 22 ago. 2006.

DYCK, P. J.; LAMBERT, E. H. Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. **Archives of Neurology**, v. 18, n. 6, p. 603–618, 1968.

ECA, ESTATUTO DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE. Brasil. **Lei 8.069, de 13 de Julho de 1990**. Disponível em: <<https://www.gov.br/mdh/pt-br/centrais-de-conteudo/crianca-e-adolescente/estatuto-da-crianca-e-do-adolescente-versao-2019.pdf>>. Acesso em: set. 2020.

EICHLER, E. E. Genetic variation, comparative genomics, and the diagnosis of disease. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 1, p. 64–74, 4 jul. 2019.

ENGEHOLM, M. *et al.* A novel mutation in LRSAM1 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease with dominant inheritance. **BMC Neurology**, v. 14, n. 1, p. 118, 3 jun. 2014.

EVGRAFOV, O. V. *et al.* Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy. **Nature Genetics**, v. 36, n. 6, p. 602–606, 2 jun. 2004.

FERREIRA, C. R. The burden of rare diseases. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 179, n. 6, p. 885–892, 18 jun. 2019.

FEUK, L.; CARSON, A. R.; SCHERER, S. W. Structural variation in the human genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 2, p. 85–97, fev. 2006.

FIGUEIREDO, F. B. *et al.* GDAP1 mutations are frequent among the autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth Brazilian patients. **Neuromuscular Disorders**, v. 31, n. 6, p. 505–511, 20 mar. 2021.

FILADI, R.; PENDIN, DI.; PIZZO, P. Mitofusin 2: from functions to disease. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 3, p. 330, 28 mar. 2018.

FIORILLO, C. *et al.* TRPV4 mutations in children with congenital distal spinal muscular atrophy. **Neurogenetics**, v. 13, n. 3, p. 195–203, 25 ago. 2012.

FRANCISCO, A. R. G. *et al.* Complex phenotype linked to a mutation in exon 11 of the lamin A/C gene: Hypertrophic cardiomyopathy, atrioventricular block, severe dyslipidemia and diabetes. **Revista Portuguesa de Cardiologia (English Edition)**, v. 36, n. 9, p. 669.e1–669.e4, 1 set. 2017.

FRASQUET, M. *et al.* Phenotype and natural history of inherited neuropathies caused by HSJ1 c.352+1G>A mutation. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 87, n. 11, p. 1265–1268, 1 nov. 2016.

FRIDMAN, V. *et al.* CMT subtypes and disease burden in patients enrolled in the Inherited Neuropathies Consortium natural history study: a cross-sectional analysis. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 86, n. 8, p. 873–878, 1 ago. 2015.

FRIDMAN, V.; REILLY, M. Inherited Neuropathies. **Seminars in Neurology**, v. 35, n. 04, p. 407–423, 6 out. 2015.

FU, W. *et al.* Analysis of 6,515 exomes reveals the recent origin of most human protein-coding variants. **Nature**, v. 493, n. 7431, p. 216–220, 10 jan. 2013.

GENARI, A. B. *et al.* Characterizing the phenotypic manifestations of MFN2 R104W mutation in Charcot–Marie–Tooth type 2. **Neuromuscular Disorders**, v. 21, n. 6, p. 428–432, 1 jun. 2011.

GEISS, B. *et al.* Charcot-Marie-Tooth disease: Frequency of genetic subtypes in a German neuromuscular center population. **Neuromuscular Disorders**, v. 23, n. 8, p. 647–651, 1 ago. 2013.

GOIZET, C. A new mutation of the lamin A/C gene leading to autosomal dominant axonal neuropathy, muscular dystrophy, cardiac disease, and leuconychia. **Journal of Medical Genetics**, v. 41, n. 3, p. e29, 1 mar. 2004.

GOUVEA, S. P. *et al.* New novel mutations in Brazilian families with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 24, n. 2, p. 207–212, 20 jun. 2019.

GREGORY, A. *et al.* Neurodegeneration associated with genetic defects in phospholipase A2. **Neurology**, v. 71, n. 18, p. 1402–1409, 28 out. 2008.

GUENTHER, U. P. *et al.* Clinical and mutational profile in spinal muscular atrophy with respiratory distress (SMARD): defining novel phenotypes through hierarchical cluster analysis. **Human Mutation**, v. 28, n. 8, p. 808–815, 1 ago. 2007.

GUERNSEY, D. L. *et al.* Mutation in the gene encoding ubiquitin ligase LRSAM1 in patients with Charcot-Marie-Tooth Disease. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 8, p. e1001081, 26 ago. 2010.

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

HARTLEY, T. *et al.* Whole-exome sequencing is a valuable diagnostic tool for inherited peripheral neuropathies: Outcomes from a cohort of 50 families. **Clinical Genetics**, v. 93, n. 2, p. 301–309, 1 fev. 2018.

HAYFLICK, S. J.; KURIAN, M. A.; HOGARTH, P. Neurodegeneration with brain iron accumulation. In: GESCHWIND, D. H.; PAULSON, H. L.; KLEIN, C. (ed.). **Handbook of Clinical Neurology**, v. 147, p. 293–305, 2018.

HOYLE, J. C. *et al.* The genetics of Charcot-Marie-Tooth disease: current trends and future implications for diagnosis and management. **The Application of Clinical Genetics**, v. 8, p. 235–243, 2015.

HUANG, J. *et al.* Copy number variations are a rare cause of non-CMT1A Charcot-Marie-Tooth disease. **Journal of Neurology**, v. 257, n. 5, p. 735–741, 1 maio 2010.

HSU, Y. *et al.* Mutation spectrum of Charcot-Marie-Tooth disease among the Han Chinese in Taiwan. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 6, n. 6, p. 1090–1101, 27 jun. 2019.

JANI-ACSADI, A. *et al.* Pediatric Charcot-Marie-Tooth Disease. **Pediatric Clinics of North America**, v. 62, n. 3, p. 767–786, 1 jun. 2015.

JERATH, N. U.; SHY, M. E. Hereditary motor and sensory neuropathies: Understanding molecular pathogenesis could lead to future treatment strategies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1852, n. 4, p. 667–678, Apr. 2015.

JOHNSON, N. E. *et al.* Quality-of-life in Charcot-Marie-Tooth disease: The patient's perspective. **Neuromuscular Disorders**, v. 24, n. 11, p. 1018–1023, nov. 2014.

JUNEJA, M. *et al.* Challenges in modelling the Charcot-Marie-Tooth neuropathies for therapy development. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 90, n. 1, p. 58–67, 1 jan. 2019.

KARARIZOU, E. *et al.* Polyneuropathies in teenagers: A clinicopathological study of 45 cases. **Neuromuscular Disorders**, v. 16, n. 5, p. 304–307, 1 maio 2006.

KARCZEWSKI, K. J. *et al.* The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. **Nature**, v. 581, n. 7809, p. 434–443, 27 maio 2020.

KENT, W. J. *et al.* The human genome browser at UCSC. **Genome research**, v. 12, n. 6, p. 996–1006, 16 jun. 2002.

KIJIMA, K. *et al.* Small heat shock protein 27 mutation in a Japanese patient with distal hereditary motor neuropathy. **Journal of Human Genetics**, v. 50, n. 9, p. 473–476, 10 set. 2005.

KITTS, P. A. *et al.* Assembly: a resource for assembled genomes at NCBI. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D73–D80, 4 jan. 2016.

KLEIN, C. J. *et al.* TRPV4 mutations and cytotoxic hypercalcemia in axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathies. **Neurology**, v. 76, n. 10, p. 887–894, 8 mar. 2011.

KLEOPA, K. A.; KAGIAVA, A.; SARGIANNIDOU, I. Gene Therapy for CMT Inherited Neuropathy. In: Duan D., Mendell J. (eds). **Muscle Gene Therapy**, p. 621–644, Springer, 2019.

KOLB, S. J. *et al.* Mutant small heat shock protein B3 causes motor neuropathy: Utility of a candidate gene approach. **Neurology**, v. 74, n. 6, p. 502–506, 9 fev. 2010.

KOPANOS, C. *et al.* VarSome: the human genomic variant search engine. **Bioinformatics**, v. 35, n. 11, p. 1978–1980, 1 jun. 2019.

KULSHRESTHA, R. *et al.* Charcot-Marie-Tooth disease type 2S with late onset diaphragmatic weakness: An atypical case. **Neuromuscular Disorders**, v. 28, n. 12, p. 1016–1021, 1 dez. 2018.

LAŠŠUTHOVÁ, P. *et al.* Improving diagnosis of inherited peripheral neuropathies through gene panel analysis. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 11, n. 1, p. 118, 22 dez. 2016.

LATOUR, P. *et al.* A Major Determinant for binding and aminoacylation of tRNA<sup>Ala</sup> in cytoplasmic Alanyl-tRNA synthetase is mutated in dominant axonal Charcot-Marie-

Tooth disease. **The American Journal of Human Genetics**, v. 86, n. 1, p. 77–82, jan. 2010.

LEAL, A. *et al.* The polynucleotide kinase 3'-phosphatase gene (PNKP) is involved in Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2B2) previously related to MED25. **Neurogenetics**, v. 19, n. 4, p. 215–225, 24 dez. 2018.

LEE, D. C. *et al.* Yield of next-generation neuropathy gene panels in axonal neuropathies. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 24, n. 4, p. 324–329, 19 dez. 2019.

LEE, J.-R. *et al.* De novo mutations in the motor domain of KIF1A cause cognitive impairment, spastic paraparesis, axonal neuropathy, and cerebellar atrophy. **Human Mutation**, v. 36, n. 1, p. 69–78, 1 jan. 2015.

LEE, M. *et al.* Cerebral white matter abnormalities in patients with Charcot-Marie-Tooth disease. **Annals of Neurology**, v. 81, n. 1, p. 147–151, 1 jan. 2017.

LEK, M. *et al.* Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. **Nature**, v. 536, n. 7616, p. 285–291, 17 ago. 2016.

LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 25, n. 14, p. 1754–1760, jul. 2009.

LIN, K.-P. *et al.* Correction: The mutational spectrum in a cohort of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 among the Han Chinese in Taiwan. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 23 jan. 2012.

LIU, X. *et al.* Molecular analysis and clinical diversity of distal hereditary motor neuropathy. **European Journal of Neurology**, v. 27, n. 7, p. 1319–1326, 12 jul. 2020.

LIU, Y. T. *et al.* Extended phenotypic spectrum of KIF5A mutations: From spastic paraplegia to axonal neuropathy. **Neurology**, v. 83, n. 7, p. 612–9, 12 ago. 2014.

LIU, Z. *et al.* Toward clinical implementation of next-generation sequencing-based genetic testing in rare diseases: Where are we? **Trends in Genetics**, v. 35, n. 11, p. 852–867, 1 nov. 2019.

LOPERGOLO, D. *et al.* A new mutation in DNM2 gene in a large Italian family. **Neurological Sciences**, v. 42, n. 6, p. 2509–2513, 18 jan. 2021.

LUPO, V. *et al.* Assessment of targeted next-generation sequencing as a tool for the diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease and hereditary motor neuropathy. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 18, n. 2, p. 225–234, 1 mar. 2016.

LUPSKI, J. R. *et al.* DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease

type 1A. **Cell**, v. 66, n. 2, p. 219–232, 26 jul. 1991.

MAJEWSKI, J. *et al.* What can exome sequencing do for you? **Journal of Medical Genetics**, v. 48, n. 9, p. 580–589, 1 set. 2011.

MANGANELLI, F. *et al.* Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes in a Southern Italy population. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 19, n. 4, p. 292–298, 1 dez. 2014.

MARDIS, E. R. A decade's perspective on DNA sequencing technology. **Nature**, v. 470, n. 7333, p. 198–203, 9 fev. 2011.

MARQUES, W. *et al.* 17p duplicated Charcot-Marie-Tooth 1A. **Journal of Neurology**, v. 252, n. 8, p. 972–979, 18 ago. 2005.

MARTIN, A. R. *et al.* PanelApp crowdsources expert knowledge to establish consensus diagnostic gene panels. **Nature Genetics**, v. 51, n. 11, p.1560-1565, 1 nov. 2019.

MARTTILA, M. *et al.* Molecular Epidemiology of Charcot-Marie-Tooth disease in Northern Ostrobothnia, Finland: A population-based study. **Neuroepidemiology**, v. 49, n. 1–2, p. 34–39, 1 out. 2017.

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

MCKENNA, A. *et al.* The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. **Genome Research**, v. 20, n. 9, p. 1297–1303, set. 2010.

MCLAREN, W. *et al.* The Ensembl Variant Effect Predictor. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, p. 122, 2016.

MCLAUGHLIN, H. M. *et al.* A Recurrent loss-of-function alanyl-tRNA synthetase (AARS) mutation in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 2N (CMT2N). **Human Mutation**, v. 33, n. 1, p. 244–253, jan. 2012.

MILLEY, G. M. *et al.* Genotypic and phenotypic spectrum of the most common causative genes of Charcot-Marie-Tooth disease in Hungarian patients. **Neuromuscular Disorders**, v. 28, n. 1, p. 38–43, 1 jan. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Genomas raros: Aplicação da genômica de larga escala para o diagnóstico de doenças raras e do risco hereditário de câncer no Brasil, em serviços públicos de saúde.** Disponível em: <[https://hospitais.proadi-sus.org.br/projetos/156/genomas-raros#:~:text=As doenças raras%2C em conjunto,impacto nos serviços de saúde.](https://hospitais.proadi-sus.org.br/projetos/156/genomas-raros#:~:text=As%20doen%C7as%20raras%2C%20em%20conjunto,impacto%20nos%20servi%C7os%20de%20sa%C7ude.)>. Acesso em: 22 mar. 2021.

MISTRY, J. *et al.* Pfam: The protein families database in 2021. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D412–D419, 8 jan. 2021.

MLADENOVIC, J. *et al.* Epidemiology of Charcot-Marie-Tooth disease in the population of Belgrade, Serbia. **Neuroepidemiology**, v. 36, n. 3, p. 177–182, jun. 2011.

MORELLI, K. H. *et al.* Gene therapies for axonal neuropathies: Available strategies, successes to date, and what to target next. **Brain Research**, v.1732, p. 146683, 1 abr. 2020.

MORTREUX, J. *et al.* Identification of novel pathogenic copy number variations in Charcot-Marie-Tooth disease. **Journal of Human Genetics**, v. 65, n. 3, p. 313–323, 18 mar. 2020.

MOSS, K. R. *et al.* New evidence for secondary axonal degeneration in demyelinating neuropathies. **Neuroscience Letters**, v. 744, p. 135595, 23 jan. 2021.

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

MURPHY, S. M. *et al.* X inactivation in females with X-linked Charcot–Marie–Tooth disease. **Neuromuscular Disorders**, v. 22, n. 7, p. 617–621, jul. 2012b.

MUZZEY, D.; EVANS, E. A.; LIEBER, C. Understanding the basics of NGS: From mechanism to variant calling. **Current Genetic Medicine Reports**, v. 3, n. 4, p. 158–165, 4 dez. 2015.

NAM, D. E. *et al.* Wide phenotypic spectrum in axonal Charcot–Marie–Tooth neuropathy type 2 patients with KIF5A mutations. **Genes & Genomics**, v. 40, n. 1, p. 77–84, 10 jan. 2018a.

NAM, D. E. *et al.* Small heat shock protein B3 (HSPB3) mutation in an axonal Charcot-Marie-Tooth disease family. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 23, n. 1, p. 60–66, 1 mar. 2018b.

NAM, S. H. *et al.* Identification of genetic causes of inherited peripheral neuropathies by targeted gene panel sequencing. **Molecules and Cells**, v. 39, n. 5, p. 382–388, 31 maio 2016.

NASLAVSKY, M. S. *et al.* Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. **Human Mutation**, v. 38, n. 7, p. 751-763, jul. 2017.

NAVE, K.-A.; SEREDA, M. W.; EHRENREICH, H. Mechanisms of disease: inherited demyelinating neuropathies - from basic to clinical research. **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 3, n. 8, p. 453-464, ago. 2007.



NICOLAS, A. *et al.* Genome-wide analyses identify KIF5A as a novel ALS gene. **Neuron**, v. 97, n. 6, p. 1268-1283.e6, 21 mar. 2018.

OHBA, C. *et al.* De novo KIF1A mutations cause intellectual deficit, cerebellar atrophy, lower limb spasticity and visual disturbance. **Journal of Human Genetics**, v. 60, n. 12, p. 739–742, 1 dez. 2015.

OLIVEIRA, A. P. M. DE *et al.* Clinical and neurophysiological features of the hereditary neuropathy with liability to pressure palsy due to the 17p11.2 deletion. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 74, n. 2, p. 99–105, fev. 2016.

OLIVER, G. R.; HART, S. N.; KLEE, E. W. Bioinformatics for clinical next generation sequencing. **Clinical Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 124–135, 1 jan. 2015.

OUVRIER, R. Advances in the genetics of hereditary hypertrophic neuropathy in childhood. **Brain and Development**, v. 17, n. suppl. 1, p. 31–38, 1 jan. 1995.

PABINGER, S. *et al.* A survey of tools for variant analysis of next-generation genome sequencing data. **Briefings in Bioinformatics**, v. 15, n. 2, p. 256–278, 2014.

PADILHA, J. P. D. *et al.* Diagnostic yield of targeted sequential and massive panel approaches for inherited neuropathies. **Clinical Genetics**, v. 98, n. 2, p. 185–190, 29 ago. 2020.

PALAIMA, P. *et al.* LRSAM1 and the RING domain: Charcot-Marie-Tooth disease and beyond. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 16, n. 1, p. 74, 10 dez. 2021.

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

PAREYSON, D.; SAVERI, P.; PISCIOTTA, C. New developments in Charcot-Marie-Tooth neuropathy and related diseases. **Current Opinion in Neurology**, v. 30, n. 5, p. 471–480, 1 out. 2017.

PAREYSON, D.; SCAIOLI, V.; LAURÀ, M. Clinical and electrophysiological aspects of Charcot-Marie-Tooth disease. **Neuromolecular Medicine**, v. 8, n. 1-2, p. 3-22, 2006.

PATEL, P. I. *et al.* The gene for the peripheral myelin protein PMP-22 is a candidate for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. **Nature Genetics**, v. 1, n. 3, p. 159–165, jun. 1992.

PEDROSO, J. L. *et al.* Mutation in PNKP presenting initially as axonal Charcot-Marie-Tooth disease. **Neurology Genetics**, v. 1, n. 4, p. e30, 22 dez. 2015.

PEHLIVAN, D. *et al.* The role of combined SNV and CNV burden in patients with

distal symmetric polyneuropathy. **Genetics in Medicine**, v. 18, n. 5, p. 443–451, 17 maio 2016.

PERETTI, A. *et al.* LRSAM1 variants and founder effect in French families with ataxic form of Charcot-Marie-Tooth type 2. **European Journal of Human Genetics**, v. 27, n. 9, p. 1406–1418, 17 set. 2019.

PESTRONK, A. **Neuromuscular Home Page**. Disponível em: <<https://neuromuscular.wustl.edu/>>. Acesso em: 23 mar. 2021.

PEZZINI, I. *et al.* GDAP1 mutations in Italian axonal Charcot–Marie–Tooth patients: Phenotypic features and clinical course. **Neuromuscular Disorders**, v. 26, n. 1, p. 26–32, jan. 2016.

PIPIS, M. *et al.* Next-generation sequencing in Charcot–Marie–Tooth disease: opportunities and challenges. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, n. 11, p. 644–656, 1 nov. 2019.

PIPIS, M. *et al.* Natural history of Charcot-Marie-Tooth disease type 2A: a large international multicentre study. **Brain**, v. 143, n. 12, p. 3589–3602, 1 dez. 2020.

PISCIOTTA, C.; SHY, M. E. Neuropathy. In: GESCHWIND, D. H.; PAULSON, H. L.; KLEIN, C. (ed.). **Handbook of Clinical Neurology**, Elsevier, v. 148, p. 653–665, 2018.

REILICH, P. *et al.* Location matters – Genotype-phenotype correlation in LRSAM1 mutations associated with rare Charcot-Marie-Tooth neuropathy CMT2P. **Neuromuscular Disorders**, v. 31, n. 2, p. 123–133, 1 fev. 2021.

REILLY, M. M.; SHY, M. E. Diagnosis and new treatments in genetic neuropathies. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 80, n. 12, p. 1304–1314, 1 dez. 2009.

RICHARDS, S. *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in Medicine**, v. 17, n. 5, p. 405–423, 5 maio 2015.

RINALDI, C. *et al.* Cowchock syndrome is associated with a mutation in apoptosis-inducing factor. **American Journal of Human Genetics**, v. 91, n. 6, p. 1095–1102, 7 dez. 2012.

ROSE, J. M. *et al.* Molecular chaperone-mediated rescue of mitophagy by a Parkin RING1 domain mutant. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 1, p. 16–27, 1 jan. 2011.

ROSSOR, A. M. *et al.* Clinical implications of genetic advances in Charcot-Marie-Tooth disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 9, n. 10, p. 562–571, out. 2013.

ROSSOR, A. M. *et al.* Pilot phenotype and natural history study of hereditary neuropathies caused by mutations in the HSPB1 gene. **Neuromuscular Disorders**, v. 27, n. 1, p. 50–56, 1 jan. 2017.

ROSSOR, A. M.; SHY, M. E.; REILLY, M. M. Are we prepared for clinical trials in Charcot-Marie-Tooth disease? **Brain Research**, v. 1729, p. 146625, 15 fev. 2020.

ROSSOR, A. M.; TOMASELLI, P. J.; REILLY, M. M. Recent advances in the genetic neuropathies. **Current Opinion in Neurology**, v. 29, n. 5, p. 537–48, 2016.

ROY, S. *et al.* Standards and Guidelines for Validating Next-Generation Sequencing Bioinformatics Pipelines. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 20, n. 1, p. 4–27, 1 jan. 2018.

RUDNIK-SCHÖNEBORN, S. *et al.* Diagnostic algorithms in Charcot-Marie-Tooth neuropathies: experiences from a German genetic laboratory on the basis of 1206 index patients. **Clinical Genetics**, v. 89, n. 1, p. 34–43, jan. 2015.

RUDNIK-SCHÖNEBORN, S.; AUER-GRUMBACH, M.; SENDEREK, J. Charcot-Marie-Tooth disease and hereditary motor neuropathies - Update 2020. **Medizinische Genetik**, v. 32, n. 3, p. 207–219, 1 set. 2020.

SAHENK, Z.; OZES, B. Gene therapy to promote regeneration in Charcot-Marie-Tooth disease. **Brain Research**, v.1727, p. 146533, 15 jan. 2020.

SALTER, C. G. *et al.* Truncating SLC5A7 mutations underlie a spectrum of dominant hereditary motor neuropathies. **Neurology: Genetics**, v. 4, n. 2, p. 222, 1 abr. 2018.

SANCHO, P. *et al.* Characterization of molecular mechanisms underlying the axonal Charcot–Marie–Tooth neuropathy caused by MORC2 mutations. **Human Molecular Genetics**, v. 28, n. 10, p. 1629–1644, 15 maio 2019.

SAPORTA, A. S. D. *et al.* Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. **Annals of Neurology**, v. 69, n. 1, p. 22–33, jan. 2011.

SAWYER, S. M. *et al.* The age of adolescence. **The Lancet Child & Adolescent Health**, v. 2, n. 3, p. 223–228, 1 mar. 2018.

SCHABHÜTTL, M. *et al.* Whole-exome sequencing in patients with inherited neuropathies: Outcome and challenges. **Journal of Neurology**, v. 261, n. 5, p. 970–982, 15 mar. 2014.

SCHERER, S. S.; KLEOPA, K. A.; BENSON, M. D. Peripheral neuropathies. In: ROSENBERG, R. N.; PASCUAL, J. M. (eds.). **Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease**. 6th. ed., Elsevier, p. 345–375, 2020.

SCHERER, S. S.; WRABETZ, L. Molecular mechanisms of inherited demyelinating neuropathies. **Glia**, v. 56, n. 14, p. 1578–1589, 1 nov. 2008.

SCHOTTMANN, G. *et al.* Recessive truncating IGHMBP2 mutations presenting as axonal sensorimotor neuropathy. **Neurology**, v. 84, n. 5, p. 523–531, 3 fev. 2015.

SELMER, K. K. *et al.* A mild form of Mucopolysaccharidosis IIIB diagnosed with targeted next-generation sequencing of linked genomic regions. **European Journal of Human Genetics**, v. 20, n. 1, p. 58–63, 29 jan. 2012.

SEVILLA, T. *et al.* Mutations in the MORC2 gene cause axonal Charcot–Marie–Tooth disease. **Brain**, v. 139, n. 1, p. 62–72, 1 jan. 2016.

SHABO, G. *et al.* The spectrum of polyneuropathies in childhood detected with electromyography. **Pediatric Neurology**, v. 36, n. 6, p. 393–396, 1 jun. 2007.

SHY, M. E. *et al.* Reliability and validity of the CMT neuropathy score as a measure of disability. **Neurology**, v. 64, n. 7, p. 1209–1214, 12 abr. 2005.

SILVEIRA-MORIYAMA, L.; PACIORKOWSKI, A. R. Genetic diagnostics for neurologists. **CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology**, v. 24, n. 1, p. 18–36, 2018.

SISKIND, C.; SHY, M. Genetics of Neuropathies. **Seminars in Neurology**, v. 31, n. 05, p. 494–505, 21 nov. 2011.

SIVERA, R. *et al.* Charcot-Marie-Tooth disease: Genetic and clinical spectrum in a Spanish clinical series. **Neurology**, v. 81, n. 18, p. 1617–1625, 29 out. 2013.

SKRE, H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. **Clinical Genetics**, v. 6, n. 2, p. 98–118, 23 abr. 1974.

STENSON, P. D. *et al.* The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. **Human Genetics**, v. 136, n. 6, p. 665–677, 27 jun. 2017.

TANABE, H. *et al.* Clinical and genetic features of Charcot-Marie-Tooth disease 2F and hereditary motor neuropathy 2B in Japan. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 23, n. 1, p. 40–48, 1 mar. 2018.

TAYLOR, M. R. G. *et al.* Natural history of dilated cardiomyopathy due to lamin A/C gene mutations. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 41, n. 5, p. 771–780, 5 mar. 2003.

TAYOUN, A. N. A. *et al.* Recommendations for interpreting the loss of function

PVS1 ACMG/AMP variant criterion. **Human Mutation**, v. 39, n. 11, p. 1517–1524, 7 nov. 2018.

TAZIR, M. *et al.* Hereditary motor and sensory neuropathies or Charcot–Marie–Tooth diseases: An update. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 347, n. 1–2, p. 14–22, 15 dez. 2014.

TEIVE, H. *et al.* Distal hereditary motor neuropathy with HSJ1 chaperone mutation, presenting with peripheral motor neuropathy, associated to parkinsonism, and cerebellar ataxia. Case report. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 22, n. 2016, p. e154, jan. 2016.

TÉTREAUULT, M. *et al.* Adult-onset painful axonal polyneuropathy caused by a dominant NAGLU mutation. **Brain**, v. 138, n. 6, p. 1477–1483, 1 jun. 2015.

TIAN, D. *et al.* Systematic review of CMTX1 patients with episodic neurological dysfunction. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 8, n. 1, p. 213–223, 1 jan. 2021.

TOMASELLI, P. J. *et al.* Mutations in noncoding regions of GJB1 are a major cause of X-linked CMT. **Neurology**, v. 88, n. 15, p. 1445–1453, 11 abr. 2017a.

TOMASELLI, P. J. *et al.* A de novo dominant mutation in KIF1A associated with axonal neuropathy, spasticity and autism spectrum disorder. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 22, n. 4, p. 460–463, 1 dez. 2017b.

TOMASELLI, P. J. **Avaliação das causas genéticas em pacientes com neuropatia hereditária utilizando técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS)**. 2018. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2018.

TOMASELLI, P. J. *et al.* Severe cognitive impairment in a patient with CMT2A. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 23, n. 2, p. 147–148, 26 jun. 2018a.

TOMASELLI, P. J. *et al.* IGHMBP2 mutation associated with organ-specific autonomic dysfunction. **Neuromuscular Disorders**, v. 28, n. 12, p. 1012–1015, 1 dez. 2018b.

TURRO, E. *et al.* Whole-genome sequencing of patients with rare diseases in a national health system. **Nature**, v. 583, n. 7814, p. 96–102, 2 jul. 2020.

TWEEDIE, S. *et al.* Genenames.org: the HGNC and VGNC resources in 2021. **Nucleic acids research**, v. 49, n. D1, p. D939–D946, 8 jan. 2021.

UNTERGASSER, A. *et al.* Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Web Server, p. W71–W74, 8 maio 2007.

VAETH, S. *et al.* A Search for Undiagnosed Charcot-Marie-Tooth Disease Among Patients Registered with Unspecified Polyneuropathy in the Danish National Patient Registry. **Clinical Epidemiology**, v. Volume 13, p. 113–120, fev. 2021.

VAN ESCH, H. *et al.* A Homozygous Mutation in the Lamin A/C Gene Associated with a Novel Syndrome of Arthropathy, Tendinous Calcinosis, and Progeroid Features. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 2, p. 517–521, 1 fev. 2006.

VAVLITOU, N. *et al.* Axonal Pathology Precedes Demyelination in a Mouse Model of X-Linked Demyelinating/Type I Charcot-Marie-Tooth Neuropathy. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 69, n. 9, p. 945–958, set. 2010.

VENDREDY, L.; ADRIAENSSENS, E.; TIMMERMAN, V. Small heat shock proteins in neurodegenerative diseases. **Cell Stress and Chaperones**, v. 25, n. 4, p. 679–699, 22 jul. 2020.

VISSERS, L. E. L. M. *et al.* A clinical utility study of exome sequencing versus conventional genetic testing in pediatric neurology. **Genetics in Medicine**, v. 19, n. 9, p. 1055–1063, 1 set. 2017.

WANG, B. *et al.* A novel AIFM1 mutation in a Chinese family with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease type 4. **Neuromuscular Disorders**, v. 28, n. 8, p. 652–659, 1 ago. 2018.

WANG, K.; LI, M.; HAKONARSON, H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 16, p. e164–e164, 1 set. 2010.

WANG, W. *et al.* Target-enrichment sequencing and copy number evaluation in inherited polyneuropathy. **Neurology**, v. 86, n. 19, p. 1762–1771, 10 maio 2016.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Geneva. **Adolescent health**. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/adolescent-health#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/adolescent-health#tab=tab_1)>. Acesso em: set. 2020.

WILDEMAN, M. *et al.* Improving sequence variant descriptions in mutation databases and literature using the Mutalyzer sequence variation nomenclature checker. **Human Mutation**, v. 29, n. 1, p. 6–13, 8 jan. 2008.

WILMSHURST, J. M. *et al.* Peripheral neuropathies of infancy. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 45, n. 06, p. 408–414, 9 jun. 2003.

WILMSHURST, J. M.; OUVRIER, R. Hereditary peripheral neuropathies of childhood: An overview for clinicians. **Neuromuscular Disorders**, v. 21, n. 11, p. 763–775, 1 nov. 2011.

WORTMANN, S. B.; MAYR, J. A. Choline-related-inherited metabolic diseases—A mini review. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.42, p. 237-242, 1 mar. 2019.

YAOU, R. BEN *et al.* Multitissular involvement in a family with LMNA and EMD mutations: Role of digenic mechanism? **Neurology**, v. 68, n. 22, p. 1883–1894, 29 maio 2007.

YATES, A. D. *et al.* Ensembl 2020. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D682–D688, 1 jan. 2020.

YE, J. *et al.* Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 134, 18 dez. 2012.

YOHE, S.; THYAGARAJAN, B. Review of clinical next-generation sequencing. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 141, n. 11, p. 1544–1557, 1 nov. 2017.

YOSHIMURA, A. *et al.* Genetic profile and onset features of 1005 patients with Charcot-Marie-Tooth disease in Japan. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 90, n. 2, p. 195–202, 1 fev. 2019.

YUAN, J.-H. *et al.* Genetic and phenotypic profile of 112 patients with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease type 1. **European Journal of Neurology**, v. 25, n. 12, p. 1454–1461, 1 dez. 2018.

ZHANG, J. *et al.* Clinical interpretation of sequence variants. **Current Protocols in Human Genetics**, v. 106, n. 1, 16 jun. 2020.

ZIMÓN, M. *et al.* Dominant mutations in the cation channel gene transient receptor potential vanilloid 4 cause an unusual spectrum of neuropathies. **Brain**, v. 133, n. 6, p. 1798–1809, jun. 2010.

ZÜCHNER, S. *et al.* Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. **Nature Genetics**, v. 37, n. 3, p. 289–294, 30 jan. 2005.

ZÜCHNER, S. *et al.* Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2. **Annals of Neurology**, v. 59, n. 2, p. 276–281, 25 fev. 2006.

# APÊNDICE

## APÊNDICE A – LABORATÓRIO

### PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS APLICADAS NO GEL DE AGAROSE

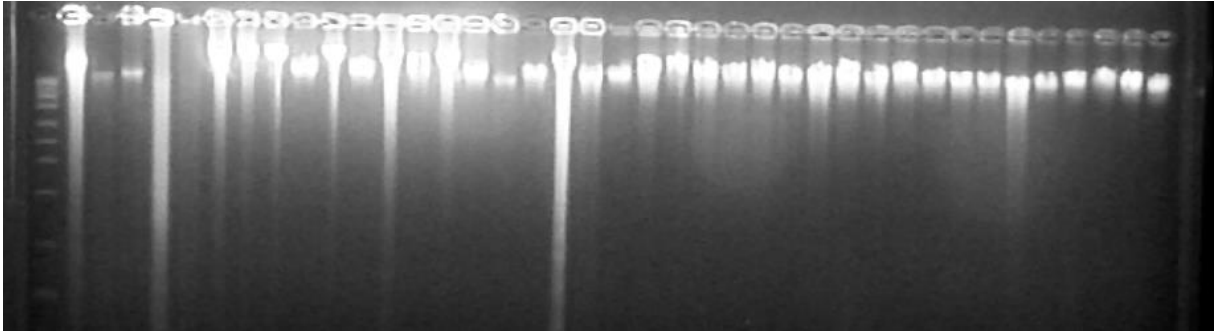
As amostras de DNA aplicadas no gel de agarose para teste de integridade foram alíquotadas em eppendorfs de 500 ul na proporção 1:10 com água ultrapura DNase, RNase free (Invitrogen™). Ou seja, nós pipetamos 1ul do DNA (50ng), adicionamos 10 uL de H<sub>2</sub>O ultrapura e 2,0 ul de Azul de Bromofenol totalizando 12 uL formando um mix. Posteriormente esse mix foi homogeneizada e aplicamos 12 uL no gel.

### PREPARAÇÃO DO GEL DE AGAROSE

O gel foi preparado com agarose ultrapura e tampão Tris-Borato e EDTA (TBE) (1X). Para a produção da solução tampão TBE (10X) são diluídos 121.1 gr de trisma, 61.8 gr de ácido bórico e 7.4 gr de ácido etilenodiaminotetracético em 1L de água destilada (dH<sub>2</sub>O). Posteriormente essa solução TBE (10X) é diluída na proporção 1:10 com dH<sub>2</sub>O para chegar a concentração de 1X. Em um Becker, colocou-se 1,5g de agarose e 148,5 mL de solução TBE 1X e posteriormente essa mistura foi levada ao micro-ondas por aproximadamente 5 minutos até diluição completa da agarose no tampão. Em seguida, foi adicionado 2ul de brometo de etídio (EtBr), um agente intercalante de DNA, que sob luz ultravioleta emite uma luz vermelho alaranjada. Essa mistura é despejada sobre uma placa horizontal, onde são colocados os pentes de marcação, e deixada a temperatura ambiente até o endurecimento do gel. Após esse processo, os pentes são retirados com cuidado e a bandeja é levada à cuba de eletroforese onde deve ficar mergulhada em tampão TBE 1X garantindo total cobertura do gel. São adicionados 12 uL de cada amostra em um poço, sendo o primeiro poço sempre reservado para aplicação do marcador (ladder). O marcador utilizado foi de 1Kb, aplicado 2uL no gel. Foi aplicada uma corrente de 100 mV por



aproximadamente 30 minutos. Em seguida, a placa é levada ao transiluminador UV para análise. As amostras migram do ânodo para o cátodo devido a carga negativa do DNA sendo que os fragmentos menores migram mais rapidamente pelo gel do que os fragmentos maiores. Caso o DNA esteja degradado, nós veremos no gel um perfil de arraste, como mostrado na figura abaixo.



Fonte: Foto tirada pela autora durante os experimentos realizado.

## PCR E PRIMERS PARA TESTAR GENES ESPECÍFICOS

O kit utilizado para realização da PCR foi da enzima Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) e o protocolo empregado juntamente com os primers utilizados estão representados nas tabelas abaixo:

Protocolo PCR – *GDAP1*

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

Fonte: Elaborada pela autora.

Notas: EX: Éxon; µL: microlitro; mM: milimolar; µM: micromolar; ng: nanogramas; U: unidades.

Perfil térmico da PCR – *GDAP1*

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

Fonte: Elaborada pela autora.

Notas: \*T.A. Temperatura de Anneling: Está representada na tabela abaixo.

Sequência de primers do *GDAP1*.

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

Fonte: Elaborada pela autora.

Notas: F: Forward; R: Reverse.

## APÊNDICE B – GENES RELACIONADOS ÀS NEUROPATIAS HEREDITÁRIAS

Símbolo	Símbolo	Símbolo	Símbolo	Símbolo	Símbolo
AARS	DCAF8	GLA	MME	POLR3A	SPART
AARS1	DCTN1	GLE1	MORC2	PPOX	SPAST
ABCA1	DEGS1	GNB4	MPV17	PRDM12	SPG11
ABCC9	DES	HADHA	MPZ	PRKAG2	SPG21
ABHD12	DGAT2	HADHB	MRE11	PRKCG	SPG7
ACTC1	DGUOK	HARS	MT-ATP6	PRNP	SPTBN2
ACTN2	DHH	HARS1	MTMR2	PRPH	SPTLC1
AGTPBP1	DHTKD1	HINT1	MT-RNR1	PRPS1	SPTLC2
AGXT	DMD	HK1	MT-TL1	PRX	SPTLC3
AHNAK	DNAJB2	HMBS	MTPP	PTEN	SUCLA2
AHNAK2	DNAJC3	HOXD10	MYBPC3	PTPN11	SURF1
AIFM1	DNM2	HRAS	MYH14	PTRH2	SYT2
ALDH3A2	DNMT1	HSPB1	MYH6	RAB7A	TAZ
ANKRD1	DRP2	HSPB3	MYH7	RAF1	TCAP
AP1S1	DSC2	HSPB8	MYL2	RBM20	TDP1
APOA1	DSG2	IARS2	MYL3	REEP1	TFG
APTX	DSP	IFRD1	MYOZ2	RETREG1	TGFB1
ARHGEF10	DST	IGHMBP2	MYPN	RIT1	TMEM43
ARL6IP1	DSTYK	INF2	NAGA	RYR2	TNNC1
ARSA	DTNA	ITPR1	NAGLU	SACS	TNNI3
ATL1	DYNC1H1	JPH2	NDRG1	SBF1	TNNT2
ATL3	EGR2	JUP	NEBL	SBF2	TPM1
ATM	ELP1	KARS	NEFH	SCARB2	TRIM2
ATP1A1	EMD	KARS1	NEFL	SCN10A	TRPA1
ATP7A	ERBB3	KCNA1	NEXN	SCN11A	TRPV4
B4GALNT1	ERCC6	KCNA2	NGF	SCN5A	TTBK2
BAG3	ERCC8	KCNC3	NIPA1	SCN9A	TTN
BCKDHB	ETFDH	KIF1A	NRAS	SCO2	TTPA
BICD2	FA2H	KIF1B	NTRK1	SCP2	TTR
BRAF	FAH	KIF5A	OPA1	SCYL1	TUBB3
BSCL2	FAM126A	KLC2	OPA3	SELENOI	TWNK
C12orf65	FBLN5	KRAS	PDHA1	SEPT9	TYMP
C19orf12	FBXO38	L1CAM	PDK3	SETX	VCL
CACNB4	FGD4	LAMA4	PDLIM3	SGCD	VCP
CASQ2	FGF14	LAMP2	PDXK	SGPL1	VPS13A
CAV3	FIG4	LAS1L	PDYN	SH3TC2	VRK1
CCT5	FKTN	LDB3	PEX10	SIGMAR1	WARS
CD59	FLVCR1	LITAF	PEX7	SIL1	WARS1
CHCHD10	FXN	LMNA	PHYH	SLC12A6	WASHC5
CLTCL1	GAA	LRSAM1	PKP2	SLC1A3	WNK1
CNTNAP1	GALC	LYST	PLA2G6	SLC25A19	XK
COA7	GAN	MAP1B	PLEKHG5	SLC25A46	XPA
COQ8A	GARS	MAP2K1	PLN	SLC52A1	XRCC1
COX6A1	GARS1	MAP2K2	PLP1	SLC52A2	YARS
CPOX	GATAD1	MARS	PMM2	SLC52A3	YARS1
CRYAB	GBA2	MARS1	PMP2	SLC5A7	ZFYVE26
CSR3	GDAP1	MCM3AP	PMP22	SMN1	ZFYVE27
CTDP1	GJB1	MED25	PNKP	SOS1	
CYP27A1	GJB3	MFN2	PNPLA6	SORD	
DARS2	GJC2	MMACHC	POLG	SOX10	

Fonte: Essa lista foi elaborada pela autora e adaptada do Genomics England PanelApp (panel: Hereditary neuropathy (Version 1.383) (MARTIN et al., 2019).

Disponível online no site: <https://panelapp.genomicsengland.co.uk/>.

Notas: Símbolos dos genes utilizados para filtrar os arquivos WES. No total, são 296 símbolos. Todos os arquivos WES foram primeiramente filtrados para buscar variantes que estavam presentes apenas nesses 296 símbolos.

## APÊNDICE C – CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA CLASSIFICAÇÃO DAS VARIANTES E SUAS RESPECTIVAS PONTUAÇÕES

Baseado nas normas e diretrizes da ACMG e AMP publicada em 2015  
(RICHARDS et al., 2015).

### PONTUAÇÃO / CRITÉRIO

- Evidência muito forte de patogenicidade
  - **PVS1:** Variantes nulas (nonsense, frameshift, locais de splicing, etc.) em genes em que a perda de função (LOF) é um mecanismo conhecido da doença.
- Forte evidência de patogenicidade
  - **PS1:** Alteração patogênica descrita no mesmo aminoácido independente do nucleotídeo trocado.
  - **PS2:** Alteração *de novo* em um paciente com doença e sem histórico familiar (paternidade e maternidade confirmadas).
  - **PS3:** Estudos funcionais *in vitro* e *in vivo* bem estabelecidos e que dão suporte a um efeito prejudicial do gene.
  - **PS4:** A prevalência da variante em indivíduos afetados é significativamente aumentada em comparação com a prevalência em controles, incluindo dados dos bancos de dados populacionais.
- Moderada evidência de patogenicidade
  - **PM1:** Variante localizada em um *hot spot* e/ou domínio funcional importante bem estabelecido que não apresente nenhuma variante benigna descrita.
  - **PM2:** Ausente ou frequência extremamente baixa (se recessivo) em controles ou bancos de dados populacionais.

- 
- **PM3:** Variante detectada em *trans* com outra variante conhecidamente patogênica em doenças com herança recessiva.
  - **PM4:** Variantes que alteram o comprimento da proteína (deleções/inserções inframe) presente em regiões não repetitivas.
  - **PM5:** Variante missense nova em um resíduo de aminoácido onde uma outra variante missense diferente já foi classificada como patogênica (p.ex.: Arg156His > Arg156Cys).
  - **PM6:** Alteração *de novo* em um paciente sem a confirmação de paternidade.
  - Corroborar evidência de patogenicidade
    - **PP1:** Co segregação da variante em vários membros afetados de uma mesma família em um gene conhecidamente relacionado à doença.
    - **PP2:** Variante missense em um gene que tem uma baixa taxa de variantes missense benignas e onde as variantes missense são um mecanismo comum de doença.
    - **PP3:** Várias linhas de evidência computacional mostram um efeito deletério no gene ou produto do gene (conservação, evolução, alteração de splicing etc.).
    - **PP4:** O fenótipo do paciente ou história familiar é altamente específico para uma doença com uma única etiologia genética.
    - **PP5:** Fonte confiável relata recentemente a variante como patogênica, mas a não há evidência disponível para o laboratório realizar uma avaliação independente.
  - Evidência muito forte de benignidade
    - **BA1:** Frequência alélica acima de 5% em bancos de dados populacionais como GnomAD, ABraOM, ExAC etc.
  - Forte evidência de benignidade
    - **BS1:** A frequência do alelo é maior do que o esperado para a doença.
    - **BS2:** Variante com penetrância completa em idade precoce observada em indivíduo adulto saudável em homozigose (herança recessiva), heterozigose (herança dominante) ou hemizigose (herança ligada ao X).

- 
- **BS3:** Estudos funcionais in vitro ou in vivo bem estabelecidos não mostram nenhum efeito prejudicial na função da proteína ou alteração no splicing.
  - **BS4:** Variante não segrega em todos os membros afetados de uma mesma família.
  - Corroboração de evidência de benignidade
    - **BP1:** Variante missense em um gene onde variantes truncadas são mecanismo responsável pelo fenótipo.
    - **BP2:** Observado em trans com uma variante patogênica para um gene (distúrbio dominante totalmente penetrante) ou observada em cis com uma variante patogênica em qualquer padrão de herança
    - **BP3:** Deleções/inserções inframoléculares em regiões repetitivas sem uma função previamente conhecida.
    - **BP4:** Várias linhas de evidência computacional sugerem nenhum impacto no gene ou produto do gene (conservação, evolução, alteração de splicing etc.).
    - **BP5:** Variante encontrada em paciente com uma base molecular alternativa para a doença.
    - **BP6:** Fonte confiável relata recentemente a variante como benigna, mas não há evidência disponível para o laboratório realizar uma avaliação independente.
    - **BP7:** Variante sinônima (silenciosa) na qual os algoritmos de predição de splicing não prevêem uma alteração de splice na sequência consenso e o nucleotídeo não é altamente conservado.

## REGRAS PARA COMBINAR OS CRITÉRIOS E CLASSIFICAR UMA VARIANTE

### Patogênica

- 1 evidência PVS1 e:
  - 1 Forte (PS1-PS4) ou,
  - 2 Moderadas (PM1-PM6) ou,
  - 1 Moderada (PM1-PM6) e 1 que corrobora (PP1-PP5) ou,
  - 2 que corroboram (PP1-PP5) ou,
- 2 evidências fortes (PS1-PS4) ou
- 1 evidência forte (PS1-PS4) e:
  - 3 moderadas (PM1-PM6) ou,
  - 2 moderadas (PM1-PM6) e 2 que corroboram (PP1-PP5) ou,
  - 1 Moderada (PM1-PM6) e 4 que corroboram (PP1-PP5).

### Provavelmente patogênica

- 1 evidência PVS1 e 1 moderada (PM1-PM6) ou,
- 1 forte (PS1-PS4) e 1-2 moderadas (PM1-PM6) ou,
- 1 forte (PS1-PS4) e 2 que corroboram (PP1-PP5) ou
  - 3 moderadas (PM1-PM6) ou,
- 2 moderadas (PM1-PM6) e 2 que corroboram (PP1-PP5) ou,
- 1 moderada (PM1-PM6) e 4 que corroboram (PP1-PP5)

### Variante de significado incerto (VUS)

- Variantes devem ser classificadas como "de significado incerto" se outros critérios não forem atendidos ou se os critérios para benigno e patogênico forem contraditórios.

### Provavelmente Benigna

- 1 evidência forte (BS1-BS4) e 1 que corrobora (BP1-BP7) ou,
- 2 que corroboram (BP1-BP7)

### Benigna

- 1 evidência BA1 ou,
  - 2 fortes (BS1-BS4).

## VARIANTES ENCONTRADAS NESTE TRABALHO E ALGUNS CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA SUA CLASSIFICAÇÃO

Nessa seção estão apresentadas todas as variantes candidatas encontradas neste trabalho e alguns dos critérios utilizados para sua classificação. As variantes estão organizadas por classificação (variantes patogênicas, provavelmente patogênicas e VUS) e em ordem alfabética pelo símbolo do gene.

A saber:

- As informações sobre e localização da variante na proteína foram extraídas através de consultas nos bancos de dados NCBI [gene] (NCBI RESOURCE COORDINATORS, 2018) e Pfam (MISTRY et al., 2021);
- As informações sobre importância do domínio funcional, regiões *hot spot* da proteína entre outras, foram extraídas da literatura e alguns bancos de dados específicos de mutações;
- Os resultados apresentados obtidos do GERP e dos programas de predição foram provenientes da análise no VarSome (KOPANOS et al., 2019); O GERP (Genomic Evolutionary Rate Profiling) é um programa que calcula a taxa de conservação de um nucleotídeo através do alinhamento de sequências ortólogas de genomas de 35 mamíferos. Os valores variam de -12,3 a 6,17 sendo 6,17 o valor mais conservado (COOPER, 2005).
- Os resultados obtidos dos programas de predição e GERP foram contabilizados como 1 critério, caso houvesse concordância entre eles. Ou seja, se o nucleotídeo é conservado e a maioria dos programas de predição falam que a variante é patogênica, o critério foi contabilizado como PP3 (suporte de patogenicidade). Em caso de discordância, esse critério foi desconsiderado.
- NA: Não se aplica.



## VARIANTES PATOGÊNICAS

### 1. **AARS1: p.Arg329His (c.986G>A)**

a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_1

b. Critérios:

- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e no ABraOM;
  - iii. Literatura (**PS1**): Descrita como patogênica (PMID: 20045102; PMID: 22009580; PMID: 26257172);
  - iv. Conservação (GERP) (**PP3**): 5.6;
  - v. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (20) x benigno (1);
  - vi. Segregação na família (**PP1**): Sim. Variante segrega com o fenótipo da família. Pai e avó paterna são positivos para mesma alteração e afetados.
- PP2, PM2, PS1, PP3, PP1 – Patogênica.

### 2. **DNAJB2: c.352+1G>A**

a. Informações: Encontrada em homozigose no paciente CMT\_2.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PVS1**): Variante nula: altera splicing;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Frequência baixa no GnomAD (9 alelos em heterozigose em 251172 alelos) e ABraOM (1 alelo em heterozigose);
  - iii. Literatura (**PS1**): Descrita como patogênica (PMID: 22522442; PMID: 27083531);
  - iv. Conservação (GERP) (**PP3**): 5.0;
  - v. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (7) x benigno (0);
  - vi. Segregação na família (**PP1**): Sim. Somente a mãe tem alteração em heterozigose. Pai testou negativo para alteração. Ambos são saudáveis.
- PVS1, PM2, PS1, PP3, PP1 – Patogênica.

**3. GJB1: p.Val139Met (c.415G>A)**

a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_3.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Frequência baixa no GnomAD 1 alelo em heterozigose em 171137 alelos) e ausente no ABraOM;
  - iii. Literatura (**PS1**): Descrita como patogênica (PMID: 9272161; PMID: 9361298; PMID: 11438991; PMID: 9099841);
  - iv. Proteína (**PM1**): Domínio funcional importante da proteína (M3);
  - v. Conservação (GERP) (**PP3**): 4.7;
  - vi. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (16) x benigno (1);
  - vii. Segregação na família (**PP1**): Sim. Variante segrega com o fenótipo da família. Diversos familiares afetados e positivos para a mesma alteração. Herança ligada ao X.
- PP2, PM2, PS1, PM1, PP3, PP1 – Patogênica.

**4. HSPB1: p.Pro182Ala (c.544C>G)**

a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_4

b. Critérios:

- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e ABraOM;
  - iii. Literatura (**PS1**): Descrita como provavelmente patogênica (PMID: 27816334);
  - iv. Literatura (**PM5**): Descritas alterações patogênicas no mesmo resíduo de aminoácido (P182S e P182L) (PMID: 16155736; PMID: 25220807; etc.).
  - v. Proteína (**PM1**): Região *hot spot* e domínio funcional importante da proteína (C-terminal 'anchoring motif');
  - vi. Conservação (GERP) (**PP3**): 4.6;
  - vii. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (18) x benigno (3);
  - viii. Segregação na família (**PP1**): Sim. Variante segrega com o fenótipo da família. Pai e avô positivos para mesma alteração e são afetados.
- PP2, PM2, PS1, PM5, PM1, PP3, PP1 – Patogênica.

**5. IGHMBP2: p.Cys932TrpfsTer46 (c.2796delC)**

- a. Informações: Encontrada em homozigose no paciente CMT\_5.
- b. Critérios:
  - i. Consequência (**PVS1**): Variante nula: *Frameshift*;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e no ABraOM;
  - iii. Literatura (**NA**): Não descrita;
  - iv. Proteína (**PM1**): Localizada em domínio funcional importante e altamente conservado da proteína (AN1-like Zinc finger);
  - v. Conservação (GERP) (**PP3**): 4.5;
  - vi. Programas de Predição (**NA**):
  - vii. Segregação na família (**PP1**): Sim. Ambos os pais apresentam a alteração em heterozigose e não são afetados.
- PVS1, PM2, PM1, PP3, PP1 – Patogênica.

**6. MFN2: p.Arg94Gln (c.281G>A)**

- a. Informações: Encontrada em heterozigose nos pacientes CMT\_6, CMT\_7 e CMT\_8.
- b. Critérios:
  - i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e ABraOM;
  - iii. Literatura (**PS1**): Descrita como patogênica (PMID: 9409358; PMID: 15064763; PMID: 15549395; PMID: 16714318; PMID: 17215403; etc.);
  - iv. Proteína (**PM1**): Região *hot spot* e domínio funcional importante da proteína (GTPase);
  - v. Conservação (GERP) (**PP3**): 5.4;
  - vi. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (20) x benigno (1);
  - vii. Segregação na família (**PP1**): Sim, somente no paciente CMT\_7. Variante segrega com o fenótipo da família. Avó materna e mãe (FAM\_7) são positivas para mesma alteração e afetadas.
- PP2, PM2, PS1, PM1, PP3, PP1 – Patogênica.

**7. MFN2: p.Arg94Trp (c.280C>T)**

a. Informações: Encontrada em heterozigose nos pacientes CMT\_9.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e ABraOM;
  - iii. Literatura (**PS1**): Descrita como patogênica (PMID: 15064763; PMID: 16437557; PMID: 16714318; PMID: 16835246; PMID: 17296794; etc.);
  - iv. Proteína (**PM1**): Região *hot spot* e domínio funcional importante da proteína (GTPase);
  - v. Conservação (GERP) (**PP3**): 5.5;
  - vi. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (21) x benigno (0);
  - vii. Segregação na família (**PP1**): Sim. Variante segrega com o fenótipo da família. Pai positivo para mesma alteração e afetado.
- PP2, PM2, PS1, PM1, PP3, PP1 – Patogênica.

**8. MFN2: p.Arg104Trp (c.310C>T)**

a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_10 e CMT\_11.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e ABraOM;
  - iii. Literatura (**PS1**): Descrita como patogênica (PMID: 18316077; PMID: 18425620; PMID: 18957892; PMID: 20008656; etc.);
  - iv. Proteína (**PM1**): Região *hot spot* e domínio funcional importante da proteína (GTPase);
  - v. Conservação (GERP) (**PP3**): 5.5;
  - vi. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (21) x benigno (0);
  - vii. Segregação na família (**PP1**): Sim. Em ambas as famílias os pais são negativos para alteração e não são afetados.
- PP2, PM2, PS1, PM1, PP3, PP1 – Patogênica.

**9. MFN2: p.Thr105Met (c.314C>T)**

- a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_12.
- b. Critérios:
- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e ABraOM;
  - iii. Literatura (**PS1**): Descrita como patogênica (PMID: 15064763; PMID: 16043786; PMID: 16835246; PMID: 17296794; etc.);
  - iv. Proteína (**PM1**): Região *hot spot* e domínio funcional importante da proteína (GTPase);
  - v. Conservação (GERP) (**PP3**): 5.6;
  - vi. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (20) x benigno (1);
  - vii. Segregação na família (**NA**): Não.
- PP2, PM2, PS1, PM1, PP3 – Patogênica.

#### 10. **MFN2: p.Arg280His (c.839G>A)**

- a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_13.
- b. Critérios:
- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Frequência baixa no GnomAD (1 alelo em heterozigose em 250290 alelos) e ausente no ABraOM;
  - iii. Literatura (**PS1**): Descrita como patogênica (PMID: 10732809; PMID: 15064763; PMID: 16714318; PMID: 16835246; PMID: 17215403; etc.);
  - iv. Proteína (**PM1**): Região *hot spot* e domínio funcional importante da proteína (GTPase);
  - v. Conservação (GERP) (**PP3**): 5.2;
  - vi. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (20) x benigno (1);
  - vii. Segregação na família (NA): Não.
- PP2, PM2, PS1, PM1, PP3 – Patogênica.

#### 11. **MFN2: p.Arg364Trp (c.1090C>T)**

- a. Informações: Encontrada em heterozigose nos pacientes CMT\_14, CMT\_15 e CMT\_16.
- b. Critérios:

- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e ABraOM;
  - iii. Literatura (**PS1**): Descrita como patogênica (PMID: 16437557; PMID: 16835246; PMID: 20587496; PMID: 21508331; etc.);
  - iv. Proteína (**PM1**): Região *hot spot* da proteína;
  - v. Conservação (GERP) (**PP3**): 5.6;
  - vi. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (21) x benigno (0);
  - vii. Segregação na família (**PP1**): Sim. Variante segrega com o fenótipo da família. Na família FAM\_14 herança materna e na família FAM\_16 os pais são negativos para alteração e não são afetados (caso esporádico).
- PP2, PM2, PS1, PM1, PP3, PP1 – Patogênica.

## 12. MFN2: p.Ala738Val (c.2213C>T)

a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_17.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e ABraOM;
  - iii. Literatura (**PP5**): Descrita, porém sem muitos critérios de classificação (PMID: 9099841);
  - iv. Proteína (**PM1**): Região *hot spot* e domínio funcional importante da proteína (HR2);
  - v. Conservação (GERP) (**PP3**): 5.2;
  - vi. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (20) x benigno (1);
  - vii. Segregação na família (**PP1**): Sim. Os pais são negativos para alteração e não são afetados.
- PP2, PM2, PP5, PM1, PP3, PP1 – Patogênica.

## 13. MFN2: p.Gln751\* (c.2251C>T)

a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_18.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PVS1**): Variante *Stop codon*;
- ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e ABraOM;

- iii. Literatura (**PS1**): Descrita como patogênica (PMID: 16714318);
  - iv. Proteína (**PM1**): Região *hot spot* da proteína;
  - v. Conservação (GERP) (**PP3**): 5.2;
  - vi. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (7) x benigno (1);
  - vii. Segregação na família (**PP1**): Sim. Variante segrega com o fenótipo da família. A mãe foi positiva para mesma alteração e é afetada.
- PVS1, PM2, PS1, PM1, PP3, PP1 – Patogênica.

#### 14. **MORC2: p.Arg252Trp (c.754C>T)**

- a. Informações: Encontrada em heterozigose nos pacientes CMT\_19 e CMT\_20.
  - b. Critérios:
    - i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
    - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e ABraOM;
    - iii. Literatura (**PS1**): Descrita como patogênica (PMID: 10732809; PMID: 15064763; PMID: 16714318; PMID: 16835246; PMID: 17215403; etc.);
    - iv. Proteína (**PM1**): Domínio funcional importante da proteína (GHKL-type ATPase);
    - v. Conservação (GERP) (**PP3**): 5.6;
    - vi. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (14) x benigno (7);
    - vii. Segregação na família (**PP1**): Sim. Na família FAM\_20 os pais e um irmão são negativos para alteração e não são afetados.
- PP2, PM2, PS1, PM1, PP3, PP1 – Patogênica.

#### 15. **PLA2G6: p.Ala341Thr (c.1021G>A)**

- a. Informações: Encontrada em homozigose no paciente CMT\_21.
  - b. Critérios:
    - i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
    - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Frequência baixa no GnomAD (2 alelos em heterozigose em 161140 alelos) e ausente no ABraOM;
- Literatura (**PS1**): Descrita em dois artigos relacionada ao fenótipo de INAD (distrofia neuroaxonal infantil) (PMID: 16783378; PMID: 20886109);

- iii. Proteína (**PM1**): Região *hot spot* e domínio funcional importante da proteína (ankyrin repeat regions);
  - iv. Conservação (GERP) (**PP3**): 5.3;
  - v. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (14) x benigno (7);
  - vi. Segregação na família (**NA**): Sim. Os pais são heterozigotos para a mesma alteração e não são afetados.
- PP2, PM2, PS1, PM1, PP3 – Patogênica.

#### 16. **PNKP: p.Thr408Del (c.1221\_1223del)**

- a. Informações: Encontrada em homozigose nos pacientes CMT\_22 e CMT\_23.
  - b. Critérios:
    - i. Consequência (**PM4**): Variante *Inframe*;
    - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Frequência baixa no GnomAD (15 alelos em heterozigose em 219494 alelos) e ausente no ABraOM;
    - iii. Literatura (**PS1**): Descrita como patogênica (PMID: 25728773; PMID: 27066567; PMID: 30039206);
    - iv. Proteína (**PM1**): Domínio funcional importante da proteína (Kinase);
    - v. Conservação (GERP) (**NA**): 3.9;
    - vi. Segregação na família (**PP1**): Sim, somente na família do paciente CMT\_22. Na família FAM\_22 os pais e dois irmãos são portadores da mesma alteração em heterozigose e não são afetados.
- PM4, PM2, PS1, PM1, PP1 – Patogênica.

#### 17. **TRPV4: p.Arg232Cys (c.694C>T)**

- a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_24.
- b. Critérios:
  - i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e ABraOM;
  - iii. Literatura (**PS1**): Descrita como patogênica (PMID: 21288981; PMID: 10463355; PMID: 22291064; PMID: 22526352; PMID: 22702953; etc.);
  - iv. Conservação (GERP) (**PP3**): 4.5;
  - v. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (14) x benigno (6);



- vi. Segregação na família (**PP1**): Sim. Os pais são negativos para alteração e não são afetados.
- PP2, PM2, PS1, PP3, PP1 – Patogênica.

### 18. *TTR*: p.Val142Ile (c.424G>A)

a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_43.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
- ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Frequência alta no GnomAD (283 alelos e 1 em homozigose em 282792 alelos) e frequência baixa no ABraOM (8 alelos em heterozigose);
- iii. Literatura (**PS1**): Descrita como patogênica, porém penetrância incompleta (PMID: 1351039; PMID: 2002274; PMID: 2063870; etc.)
- iv. Proteína (**PM1**): Região *hot spot* da proteína.
- v. Conservação (GERP) (**PP3**): 6.0;
- vi. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (12) x benigno (7);
- vii. Segregação na família (**NA**): Não.
- PP2, PM2, PS1, PM1, PP3 – Patogênica, porém com penetrância incompleta.

**VARIANTES CLASSIFICADAS COMO PROVAVELMENTE PATOGÊNICAS****19. AIFM1: p.Ala259Gly (c.776C>G)**

a. Informações: Encontrada em hemizigose no paciente CMT\_25.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e ABraOM;
  - iii. Literatura (**NA**): Não descrita;
  - iv. Proteína (**PM1**): Domínio funcional importante da proteína (FAD-dependent oxidoreductase).
  - v. Conservação (GERP) (**PP3**): 5.2;
  - vi. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (15) x benigno (3);
  - vii. Segregação na família (**PP1**): Sim. A variante segrega com o fenótipo da família. Irmão sintomático apresenta a mesma alteração em hemizigose, a mãe em heterozigose e pai é negativo para alteração encontrada.
- PP2, PM2, PM1, PP3, PP1 – Provavelmente patogênica.

**20. DNM2: p.Ser357Phe (c.1070C>T)**

a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_26.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e ABraOM;
  - iii. Literatura (**PP5**): Descrita recentemente e classificada como provavelmente patogênica (PMID: 33459893);
  - iv. Proteína (**PM1**): Domínio funcional importante da proteína (Middle domain).
  - v. Conservação (GERP) (**PP3**): 4.8;
  - vi. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (18) x benigno (3);
  - vii. Segregação na família (**PP1**): Sim. Variante segrega com o fenótipo da família. Mãe, tia e prima são positivas para mesma alteração e são afetadas.
- PP2, PM2, PP5, PM1, PP3, PP1 – Provavelmente patogênica.

**21. EMD: c.82+1G>A**

a. Informações: Encontrada em hemizigose no paciente CMT\_27.

Encontrada junto com a variante LMNA (p.Ser573Leu).

b. Critérios:

- i. Consequência (**PVS1**): Variante nula: altera splicing;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e no ABraOM;
  - iii. Literatura (**PP5**): Descrita e classificada como provavelmente patogênica (PMID: 32860008);
  - iv. Conservação (GERP) (**PP3**): 3.9;
  - v. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (4) x benigno (1);
  - vi. Segregação na família (**NA**): Não.
- PVS1, PM2, PP5, PP3 – Provavelmente patogênica.

**22. GDAP1: p.Arg226del (c.677\_679del)**

a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_28.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PM4**): Variante *Inframe*;
- ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e no ABraOM;
- iii. Literatura (**PP5**): Descrita e classificada como provavelmente patogênica (PMID: 32506583);
- iv. Literatura (**PM5**): Alterações patogênicas no mesmo resíduo de aminoácido (R226S e R226K) ambas com herança AD (PMID: 22730194; PMID: 25429913; etc.).
- v. Proteína (**PM1**): Domínio funcional importante da proteína (GST C-terminal).
- vi. Conservação (GERP) (**PP3**): 4.76;
- vii. Programas de Predição (**NA**): Não disponível;
- viii. Segregação na família (**PP1**): Sim. Mãe é negativa para mesma alteração e é assintomática.

- PM4, PM2, PP5, PM5, PM1, PP1 – Provavelmente patogênica.

### 23. GJB1: p.Arg107Gln (c.320G>A)

a. Informações: Encontrada em hemizigose no paciente CMT\_29.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Frequência baixa no GnomAD (1 alelo em heterozigose em 190577 alelos) e ausente no ABraOM;
  - iii. Literatura (**NA**): Não descrita;
  - iv. Literatura (**PM5**): Alteração patogênica no mesmo resíduo de aminoácido (R107W) (PMID: 8829637; PMID: 9018031; etc.);
  - v. Proteína (**PM1**): Região *hot spot* da proteína;
  - vi. Conservação (GERP) (**PP3**): 4.6
  - vii. Programas de Predição (**BP4**): patogênico (4) x benigno (14)
  - viii. Segregação na família (**PP1**): Sim. Variante segrega com o fenótipo da família. Mãe testou positivo em heterozigose para mesma alteração e é afetada.
- PP2, PM2, PM5, PM1, PP1 – Provavelmente patogênica.  
Observação: A maioria dos programas de predição classificaram a variante como benigna, porém o nucleotídeo mutado é conservado. Pela discordância desses dois critérios, esse parâmetro não foi contabilizado.

### 24. GJB1: p.Gly129Glu (c.386G>A)

a. Informações: Encontrada em hemizigose no paciente CMT\_30.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
- ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e no ABraOM;
- iii. Literatura (**NA**): Não descrita;
- iv. Proteína (**PM1**): Região *hot spot* da proteína. Diversas variantes patogênicas nos resíduos de aminoácidos vizinhos (126, 127, 128, 130, 131, 132);

- v. Conservação (GERP) (**PP3**): 4.7;
  - vi. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (18) x benigno (0);
  - vii. Segregação na família (**PP1**): Sim. Variante segrega com o fenótipo da família. Mãe testou positivo em heterozigose para mesma alteração e é afetada.
- PP2, PM2, PM1, PP3, PP1 – Provavelmente patogênica.

### 25. **HSPB3: p.Trp93Ter (c.279G>A)**

a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_31.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PVS1**): Variante nula: *Stop codon*;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Frequência baixa no GnomAD (2 alelos em heterozigose em 251272 alelos) e ausente no ABraOM;
  - iii. Literatura (**NA**): Não descrita;
  - iv. Proteína (**PM1**): Localizada em domínio funcional importante e altamente conservado da proteína (alpha-crystallin);
  - v. Conservação (GERP) (**PP3**): 5.7;
  - vi. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (7) x benigno (1);
  - vii. Segregação na família (**PP1**): Sim. Variante segrega com o fenótipo da família. Pai testou positivo em heterozigose para mesma alteração e é afetado.
- PVS1, PM2, PM1, PP3, PP1 – Provavelmente patogênica.

### 26. **KIF1A: p.Arg316Gln (c.947G>A)**

a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_32.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
- ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e no ABraOM;
- iii. Literatura (**PP5**): Depositada como provavelmente patogênica no Clinvar, sem critérios de classificação (RCV000414618.1);

- iv. Literatura (**PM5**): Alteração patogênica no mesmo resíduo de aminoácido (R316W) (PMID: 25265257; PMID: 26354034; etc.);
  - v. Proteína (**PM1**): Localizada em domínio funcional importante e altamente conservado da proteína (Kinesin motor domain);
  - vi. Conservação (GERP) (**PP3**): 4.3;
  - vii. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (11) x benigno (9);
  - viii. Segregação na família (**NA**): Não.
- PP2, PM2, PP5, PM5, PM1, PP3 – Provavelmente patogênica.

### 27. *KIF5A*: p.Asp996Gly (c.2987A>G)

a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_33.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e no ABraOM;
  - iii. Literatura (**NA**): Não descrita;
  - iv. Literatura (**PM5**): Alteração patogênica no mesmo resíduo de aminoácido (N996fs) (PMID: 29566793; etc);
  - v. Proteína (**PM1**): Região hot spot e domínio funcional importante da proteína (Globular domain) que interage com BICD2;
  - vi. Conservação (GERP) (**PP3**): 4.8;
  - vii. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (8) x benigno (5);
  - viii. Segregação na família (**PP1**): Sim. Mãe testou negativo para mesma alteração e não apresenta sintomas.
- PP2, PM2, PM5, PM1, PP3, PP1 – Provavelmente patogênica.

### 28. *LRSAM1*: p.Glu312AlafsTer48 (c.935\_942del)

a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_34.

O paciente apresenta duas variantes no mesmo gene. A segunda foi classificada como VUS.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PVS1**): Variante nula: *Frameshift*;

- ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e no ABraOM;
  - iii. Literatura (**NA**): Não descrita;
  - iv. Proteína (**PM1**): Localizada em domínio funcional importante da proteína (coiled-coil 2);
  - v. Conservação (GERP) (**PP3**): Glu312, His313, Gln314 (5.86);
  - vi. Programas de Predição (**NA**): Não disponível;
  - vii. Segregação na família (**NA**): Não.
- PVS1, PM2, PM1, PP3 – Provavelmente patogênica.

### 29. *MFN2*: p.Ala220Thr (c.658G>A)

a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_35.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e no ABraOM;
  - iii. Literatura (**NA**): Não descrita;
  - iv. Literatura (**PP5**): Alteração depositada no Clinvar no mesmo resíduo de aminoácido classificada como provavelmente patogênica (A220V) (RCV000236128.2);
  - v. Proteína (**PM1**): Região hot spot e domínio funcional importante da proteína (GTPase);
  - vi. Conservação (GERP) (**PP3**): 4.5;
  - vii. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (21) x benigno (0);
  - viii. Segregação na família (**PP1**): Sim. Mãe testou negativo para mesma alteração e não apresenta sintomas.
- PP2, PM2, PP5, PM1, PP3, PP1 – Provavelmente patogênica.

### 30. *MFN2*: p.Ser249Cys (c.746C>G)

a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_36.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;

- ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e no ABraOM;
  - iii. Literatura (**NA**): Não descrita;
  - iv. Literatura (**PM5**): Alteração patogênica no mesmo resíduo de aminoácido (S249F) (PMID: 21326314; PMID: 26801520; etc.);
  - v. Proteína (**PM1**): Região hot spot e domínio funcional importante da proteína (GTPase);
  - vi. Conservação (GERP) (**PP3**): 5.6;
  - vii. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (19) x benigno (2);
  - viii. Segregação na família (**PP1**): Sim. Os pais e uma irmã testaram negativos para mesma alteração e não apresentam sintomas.
- PP2, PM2, PM5, PM1, PP3, PP1 – Provavelmente patogênica.

### 31. **NAGLU: p.Arg177Gln (c.530G>A)**

a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_37.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Frequência baixa no GnomAD (3 alelos em heterozigose em 281760 alelos) e ausente no ABraOM;
  - iii. Literatura (**NA**): Não descrita;
  - iv. Literatura (**PM5**): Alteração patogênica no mesmo resíduo de aminoácido (A177W) relacionada com Mucopolissacaridose 3B (PMID: 20040070);
  - v. Proteína (**PM1**): Localizada em domínio funcional importante da proteína (domínio catalítico - PMID: 25818867);
  - vi. Conservação (GERP) (**PP3**): 4.3;
  - vii. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (11) x benigno (9);
  - viii. Segregação na família (**PP1**): Sim. Mãe é negativa para mesma alteração e é assintomática.
- PP2, PM2, PM5, PM1, PP3, PP1 – Provavelmente patogênica.

### 32. **SLC5A7: c.1113+2T>A**

a. Informações: Encontrada em homozigose no paciente CMT\_38.



## b. Critérios:

- i. Consequência (**PVS1**): Variante nula: altera splicing;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e no ABraOM;
  - iii. Literatura (**NA**): Não descrita;
  - iv. Proteína (**PM1**): Localizada em domínio funcional importante da proteína (domínio catalítico - PMID: 25818867);
  - v. Conservação (GERP) (**PP3**): 5.5;
  - vi. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (6) x benigno (0);
  - vii. Segregação na família (**NA**): Não.
- PVS1, PM2, PM1, PP3 – Provavelmente patogênica.

**VARIANTES CLASSIFICADAS COMO VUS****33. ATP1A1: p.Gly549Arg (c.1645G>A)**

a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_39.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e no ABraOM;
  - iii. Literatura (**NA**): Não descrita;
  - iv. Proteína (**PM1**): Domínio funcional importante da proteína (*loop* intracelular entre os domínios M4 e M5). Responsável pela ligação e hidrólise de ATP;
  - v. Conservação (GERP) (**PP3**): 4.6;
  - vi. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (21) x benigno (0);
  - vii. Segregação na família (**NA**): Mãe testou positivo em heterozigose para mesma alteração. Assim que possível, essa família será reavaliada.
- PP2, PM2, PM1, PP3 – VUS.

**34. ATP7A: p.Leu1474Val (c.4420C>G)**

a. Informações: Encontrada em hemizigose no paciente CMT\_41.

Esse mesmo paciente também apresentou uma variante classificada como VUS no gene *DNM2*.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e no ABraOM;
  - iii. Literatura (**NA**): Não descrita;
  - iv. Conservação (GERP) (**PP3**): 4.9;
  - v. Programas de Predição (**BP4**): patogênico (1) x benigno (17);
  - vi. Segregação na família (**NA**): Mãe positiva em heterozigose para mesma alteração. Assim que possível, essa família será reavaliada.
- PP2, PM2 – VUS.

Observação: A maioria dos programas de predição classificaram a variante como benigna, porém o nucleotídeo mutado é conservado. Pela discordância desses dois critérios, esse parâmetro não foi contabilizado.

### 35. *DCTN1*: p.Ala286Val (c.857C>T)

a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_40.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Frequência baixa no GnomAD (1 alelo em heterozigose em 249802 alelos) e ausente no ABraOM;
  - iii. Literatura (**NA**): Não descrita;
  - iv. Conservação (GERP) (**PP3**): 5.6;
  - v. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (14) x benigno (6);
  - vi. Segregação na família (**NA**): Irmão é positivo para mesma alteração.  
Assim que possível, essa família será reavaliada.
- PP2, PM2, PP3 – VUS.

### 36. *DNM2*: p.Val351Met (c.1051G>A)

a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_41.

Esse mesmo paciente também apresentou uma variante classificada como VUS no gene *ATP7A*.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e no ABraOM;
  - iii. Literatura (**NA**): Não descrita;
  - iv. Conservação (GERP) (**PP3**): 4.8;
  - v. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (8) x benigno (5);
  - vi. Segregação na família (**NA**): Mãe testou negativo para mesma alteração.  
Assim que possível, essa família será reavaliada.
- PP2, PM2, PP3 – VUS.

**37. KARS1: p.Thr419Ile (c.1256C>T)**

a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_43.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Frequência baixa no GnomAD (8 alelos em heterozigose em 282120 alelos) e no ABraOM (1 alelo em heterozigose);
  - iii. Literatura (**NA**): Não descrita;
  - iv. Conservação (GERP) (**PP3**): 5.9;
  - v. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (14) x benigno (7);
  - vi. Segregação na família (**NA**): Não;
- PP2, PM2, PP3 – VUS.

**38. KARS1: p.Arg507Gln (c.1520G>A)**

a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_42.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Frequência baixa no GnomAD (10 alelos em heterozigose em 282886 alelos) e no ABraOM (3 alelos em heterozigose);
  - iii. Literatura (**NA**): Não descrita;
  - iv. Conservação (GERP) (**PP3**): 5.8;
  - v. Programas de Predição (**BP4**): patogênico (6) x benigno (14);
  - vi. Segregação na família (**NA**): Não;
- PP2, PM2, PP3 – VUS.

**39. LMNA: p.Ser573Leu (c.1718C>T)**

a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_27.

Esse mesmo paciente também apresentou uma variante classificada como provavelmente patogênica no gene *EMD*.

b. Critérios:

- i. Consequência (**PP2**): Variante missense;

- ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Frequência baixa no GnomAD (35 alelos em heterozigose e 1 em homozigose em 271142 alelos) e no ABraOM (1 alelo em heterozigose);
- iii. Literatura (**PP5**): Descrita como patogênica relacionada à cardiomiopatia. Relacionada à CMT, classificada como VUS no Clinvar, porém sem critérios de classificação (RCV000653881.2);
- iv. Conservação (GERP) (**PP3**): 5.9;
- v. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (8) x benigno (5);
- vi. Segregação na família (**NA**): Não;
- PP2, PM2 – VUS.

#### 40. *LRSAM1*: p.Arg315Leu (c.944G>T)

- a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_34.  
Esse mesmo paciente também apresentou uma outra variante classificada como provavelmente patogênica neste mesmo gene.
- b. Critérios:
  - i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e no ABraOM;
  - iii. Literatura (**NA**): Não descrita;
  - iv. Conservação (GERP) (**PP3**): 5.5;
  - v. Programas de Predição (**PP3**): patogênico (13) x benigno (6);
  - vi. Segregação na família (**NA**): Não;
  - PP2, PM2, PP3 – VUS.

#### 41. *MME*: p.Glu172Asp (c.516A>T)

- a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_44.
- b. Critérios:
  - i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
  - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Frequência baixa no GnomAD (10 alelos em heterozigose em 250020 alelos) e ausente no ABraOM;
  - iii. Literatura (**NA**): Não descrita;

- iv. Conservação (GERP) (**PP3**): 5.9;
  - v. Programas de Predição (**BP4**): patogênico (0) x benigno (20);
  - vi. Segregação na família (**NA**): A mãe apresenta a mesma variante em heterozigose. Assim que possível, essa família será reavaliada.
- PP2, PM2 – VUS.

#### **42. MYH14: p.Glu1942Lys (c.5824G>A)**

- a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_45.
  - b. Critérios:
    - i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
    - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e no ABraOM;
    - iii. Literatura (**NA**): Não descrita;
    - iv. Conservação (GERP) (**PP3**): 3.6;
    - v. Programas de Predição (**BP4**): patogênico (15) x benigno (5);
    - vi. Segregação na família (**NA**): Não;
- PP2, PM2 – VUS.

#### **43. SETX: p.Met386Val (c.1156A>G)**

- a. Informações: Encontrada em heterozigose no paciente CMT\_46.
  - b. Critérios:
    - i. Consequência (**PP2**): Variante missense;
    - ii. Bancos de dados populacionais (**PM2**): Ausente no GnomAD e no ABraOM;
    - iii. Literatura (**NA**): Não descrita;
    - iv. Conservação (GERP) (**PP3**): 5.8;
    - v. Programas de Predição (**BP3**): patogênico (14) x benigno (6);
    - vi. Segregação na família (**NA**): Não;
- PP2, PM2 – VUS.

## APÊNDICE D – RESULTADOS MOLECULARES DOS PACIENTES E FAMILIARES

Nesta seção estão apresentados os resultados moleculares dos pacientes e seus familiares. Todos os pacientes estão identificados pelo código “CMT\_” seguido por um número (1,2,3 ...) e seus familiares pelo mesmo código e número, seguidos por “F” (familiar) e acompanhado por um número (1,2,3 ...). Por exemplo, CMT\_1 representa o paciente 1 e CMT\_1F1 representa o familiar 1 do paciente 1 e assim sucessivamente. Todos pertencem a mesma família (FAM\_1).

À saber:

- i. Pedigree: Representa o parentesco com o paciente índice.
- ii. SEQ: Tipo de sequenciamento realizado; Painel, WES ou os dois;
- iii. SANGER: Resultado do Sanger para a análise de segregação e confirmação das variantes encontradas por NGS;
- iv. ACMG: Classificação das variantes segundo as normas da ACMG;
- v. DIAG. MOL.: Diagnóstico molecular definido.

Tabela A1: Resultados moleculares dos pacientes e seus respectivos familiares.

(Continua)

ID_PACIENTE	ID_FAMÍLIA	PEDIGREE	SEXO	SINT.	SEQ.	SANGER	GENE	HGVSp.	ZIG.	ACMG	HERANÇA	DIAG. MOL.
CMT_1	FAM_1	INDICE	M	SIM	PAINEL	POSITIVO	AARS1	p.Arg329His	HET	P	AD	SIM
CMT_1F1	FAM_1	PAI	M	SIM		POSITIVO	AARS1	p.Arg329His	HET			
CMT_1F2	FAM_1	AVÓ	F	SIM		POSITIVO	AARS1	p.Arg329His	HET			
CMT_1F3	FAM_1	TIA	F	NÃO		NEGATIVO	AARS1	p.Arg329His				
CMT_2	FAM_2	INDICE	M	SIM	PAINEL	POSITIVO	DNAJB2	c.352+1G>A	HOM	P	ESP.	SIM
CMT_2F1	FAM_2	MÃE	F	NÃO		POSITIVO	DNAJB2	c.352+1G>A	HET			
CMT_2F2	FAM_2	PAI	M	NÃO		NEGATIVO	DNAJB2	c.352+1G>A				
CMT_3	FAM_3	INDICE	F	SIM	PAINEL/WES	POSITIVO	GJB1	p.Val139Met	HET	P	XL	SIM
CMT_3F1	FAM_3	AVÓ P	M	SIM		POSITIVO	GJB1	p.Val139Met	HET			
CMT_3F2	FAM_3	TIA	F	SIM		POSITIVO	GJB1	p.Val139Met	HET			
CMT_3F3	FAM_3	TIO	M	SIM		POSITIVO	GJB1	p.Val139Met	HEM			
CMT_3F4	FAM_3	PAI	M	SIM		POSITIVO	GJB1	p.Val139Met	HEM			
CMT_4	FAM_4	INDICE	M	SIM	WES	POSITIVO	HSPB1	p.Pro182Ala	HET	P	AD	SIM
CMT_4F1	FAM_4	PAI	M	SIM		POSITIVO	HSPB1	p.Pro182Ala	HET			
CMT_4F2	FAM_4	AVÔ	M	SIM		POSITIVO	HSPB1	p.Pro182Ala	HET			
CMT_4F3	FAM_4	MÃE	F	NÃO		NEGATIVO	HSPB1	p.Pro182Ala				
CMT_4F4	FAM_4	IRMÃO	M	NÃO		NEGATIVO	HSPB1	p.Pro182Ala				
CMT_4F5	FAM_4	AVÓ	F	NÃO		NEGATIVO	HSPB1	p.Pro182Ala				
CMT_4F6	FAM_4	FAMILIAR	F	NÃO		NEGATIVO	HSPB1	p.Pro182Ala				
CMT_4F7	FAM_4	FAMILIAR	M	NÃO		NEGATIVO	HSPB1	p.Pro182Ala				
CMT_4F8	FAM_4	FAMILIAR	F	NÃO		NEGATIVO	HSPB1	p.Pro182Ala				

Fonte: Elaborada pela autora.

Notas: (Abreviações e explicações – ordem alfabética): ACMG: Classificação de patogenicidade; AD: Autossômico dominante; AR: Autossômico recessivo; DM: Diagnóstico molecular; ESP.: Esporádico; F: Feminino; FAMILIAR: Quando não sabíamos ao certo qual o grau de parentesco com o paciente índice.; HEM: Hemizigose; HET: Heterozigose; HGVSp.: Nomenclatura das variantes segundo as normas da Human Genome Variation Society.; HOM: Homozigose; ID: Identificação; LP: Provavelmente Patogênica; M: Masculino; NGS: Tipo de sequenciamento NGS realizado - PAINEL, WES (Sequenciamento de todo o exoma) ou os dois.; ND: Informação não disponível; P: Patogênica; PEDIGREE: Parentesco com o paciente índice; SANGER: Resultado do Sanger para a análise de segregação e confirmação das variantes encontradas por NGS.; SINT.: Sintomático; VUS: Variante de significado incerto; WES: Sequenciamento de todo exoma; XL: Ligado ao X; ZIG.: Zigosidade.



Tabela A1: Resultados moleculares dos pacientes e seus respectivos familiares.

(Continuação)

ID_PACIENTE	ID_FAMÍLIA	PEDIGREE	SEXO	SINT.	SEQ.	SANGER	GENE	HGVSp.	ZIG.	ACMG	HERANÇA	DIAG. MOL.
CMT_5	FAM_5	INDICE	M	SIM	PAINEL/WES	POSITIVO	IGHMBP2	p.Cys932TrpfsTer46	HOM	P	AR	SIM
CMT_5F1	FAM_5	PAI	M	NÃO		POSITIVO	IGHMBP2	p.Cys932TrpfsTer46	HET			
CMT_5F2	FAM_5	MAE	F	NÃO		POSITIVO	IGHMBP2	p.Cys932TrpfsTer46	HET			
CMT_6	FAM_6	INDICE	M	SIM	WES	POSITIVO	MFN2	p.Arg94Gln	HET	P	ND	SIM
CMT_7	FAM_7	INDICE	F	SIM	PAINEL	POSITIVO	MFN2	p.Arg94Gln	HET	P	AD	SIM
CMT_7F1	FAM_7	MAE	F	SIM		POSITIVO	MFN2	p.Arg94Gln	HET			
CMT_7F2	FAM_7	TIA	F	NÃO		NEGATIVO	MFN2	p.Arg94Gln				
CMT_7F3	FAM_7	AVÓ M	F	SIM		POSITIVO	MFN2	p.Arg94Gln	HET			
CMT_8	FAM_8	INDICE	F	SIM	WES	POSITIVO	MFN2	p.Arg94Gln	HET	P	AD	SIM
CMT_9	FAM_9	INDICE	M	SIM	WES	POSITIVO	MFN2	p.Arg94Trp	HET	P	AD	SIM
CMT_9F1	FAM_9	PAI	M	SIM		POSITIVO	MFN2	p.Arg94Trp	HET			
CMT_10	FAM_10	INDICE	M	SIM	PAINEL	POSITIVO	MFN2	p.Arg104Trp	HET	P	ESP.	SIM
CMT_10F1	FAM_10	MAE	F	NÃO		NEGATIVO	MFN2	p.Arg104Trp				
CMT_10F2	FAM_10	PAI	M	NÃO		NEGATIVO	MFN2	p.Arg104Trp				
CMT_10F3	FAM_10	IRMA	F	NÃO		NEGATIVO	MFN2	p.Arg104Trp				
CMT_11	FAM_11	INDICE	M	SIM	PAINEL	POSITIVO	MFN2	p.Arg104Trp	HET	P	ESP.	SIM
CMT_11F1	FAM_11	MAE	F	NÃO		NEGATIVO	MFN2	p.Arg104Trp				
CMT_11F2	FAM_11	PAI	M	NÃO		NEGATIVO	MFN2	p.Arg104Trp				
CMT_12	FAM_12	INDICE	F	SIM	WES	POSITIVO	MFN2	p.Thr105Met	HET	P	ESP.	SIM
CMT_13	FAM_13	INDICE	F	SIM	WES	POSITIVO	MFN2	p.Arg280His	HET	P	ESP.	SIM
CMT_14	FAM_14	INDICE	F	SIM	WES	POSITIVO	MFN2	p.Arg364Trp	HET	P	AD	SIM
CMT_14F1	FAM_14	MÃE	F	SIM		POSITIVO	MFN2	p.Arg364Trp	HET			
CMT_15	FAM_15	INDICE	M	SIM	WES	POSITIVO	MFN2	p.Arg364Trp	HET	P	ESP.	SIM

Fonte: Elaborada pela autora.

Notas: (Abreviações e explicações – ordem alfabética): ACMG: Classificação de patogenicidade; AD: Autossômico dominante; AR: Autossômico recessivo; DM: Diagnóstico molecular; ESP.: Esporádico; F: Feminino; FAMILIAR: Quando não sabíamos ao certo qual o grau de parentesco com o paciente índice.; HEM: Hemizigose; HET: Heterozigose; HGVSp.: Nomenclatura das variantes segundo as normas da Human Genome Variation Society.; HOM: Homozigose; ID: Identificação; LP: Provavelmente Patogênica; M: Masculino; NGS: Tipo de sequenciamento NGS realizado - Painel, WES (Sequenciamento de todo o exoma) ou os dois.; ND: Informação não disponível; P: Patogênica; PEDIGREE: Parentesco com o paciente índice; SANGER: Resultado do Sanger para a análise de segregação e confirmação das variantes encontradas por NGS.; SINT.: Sintomático; VUS: Variante de significado incerto; WES: Sequenciamento de todo exoma; XL: Ligado ao X; ZIG.: Zigosidade.

Tabela A1: Resultados moleculares dos pacientes e seus respectivos familiares.

(Continuação)

ID_PACIENTE	ID_FAMÍLIA	PEDIGREE	SEXO	SINT.	SEQ.	SANGER	GENE	HGVSp.	ZIG.	ACMG	HERANÇA	DIAG. MOL.
CMT_16	FAM_16	INDICE	F	SIM	PAINEL	POSITIVO	MFN2	p.Arg364Trp	HET	P	ESP.	SIM
CMT_16F1	FAM_16	PAI	M	NÃO		NEGATIVO	MFN2	p.Arg364Trp				
CMT_16F2	FAM_16	MAE	F	NÃO		NEGATIVO	MFN2	p.Arg364Trp				
CMT_17	FAM_17	INDICE	F	SIM	PAINEL	POSITIVO	MFN2	p.Ala738Val	HET	P	ESP.	SIM
CMT_17F1	FAM_17	PAI	M	NÃO		NEGATIVO	MFN2	p.Ala738Val				
CMT_17F2	FAM_17	MAE	F	NÃO		NEGATIVO	MFN2	p.Ala738Val				
CMT_18	FAM_18	INDICE	M	SIM	PAINEL	POSITIVO	MFN2	p.Gln751Ter	HET	P	AD.	SIM
CMT_18F1	FAM_18	MAE	F	SIM		POSITIVO	MFN2	p.Gln751Ter	HET			
CMT_19	FAM_19	INDICE	F	SIM	PAINEL/WES	POSITIVO	MORC2	p.Arg252Trp	HET	P	ESP.	SIM
CMT_20	FAM_20	INDICE	M	SIM	WES	POSITIVO	MORC2	p.Arg252Trp	HET	P	ESP.	SIM
CMT_20F1	FAM_20	IRMÃO	M	NÃO		NEGATIVO	MORC2	p.Arg252Trp				
CMT_20F2	FAM_20	PAI	M	NÃO		NEGATIVO	MORC2	p.Arg252Trp				
CMT_20F3	FAM_20	MÃE	F	NÃO		NEGATIVO	MORC2	p.Arg252Trp				
CMT_21	FAM_21	INDICE	M	SIM	WES	POSITIVO	PLA2G6	p.Ala341Thr	HOM	P	AR	SIM
CMT_21F1	FAM_21	PAI	M	NÃO		POSITIVO	PLA2G6	p.Ala341Thr	HET			
CMT_21F2	FAM_21	MAE	F	NÃO		POSITIVO	PLA2G6	p.Ala341Thr	HET			
CMT_22	FAM_22	INDICE	M	SIM	PAINEL/WES	POSITIVO	PNKP	p.Thr408Del	HOM	P	AR	SIM
CMT_22F1	FAM_22	PAI	M	NÃO		POSITIVO	PNKP	p.Thr408Del	HET			
CMT_22F2	FAM_22	MAE	F	NÃO		POSITIVO	PNKP	p.Thr408Del	HET			
CMT_22F3	FAM_22	IRMAO	M	NÃO		POSITIVO	PNKP	p.Thr408Del	HET			
CMT_22F4	FAM_22	IRMAO	M	NÃO		POSITIVO	PNKP	p.Thr408Del	HET			
CMT_23	FAM_23	INDICE	M	SIM	WES	POSITIVO	PNKP	p.Thr408del	HOM	P	ND	SIM

Fonte: Elaborada pela autora.

Notas: (Abreviações e explicações – ordem alfabética): ACMG: Classificação de patogenicidade; AD: Autossômico dominante; AR: Autossômico recessivo; DM: Diagnóstico molecular; ESP.: Esporádico; F: Feminino; FAMILIAR: Quando não sabíamos ao certo qual o grau de parentesco com o paciente índice.; HEM: Hemizigose; HET: Heterozigose; HGVSp.: Nomenclatura das variantes segundo as normas da Human Genome Variation Society.; HOM: Homozigose; ID: Identificação; LP: Provavelmente Patogênica; M: Masculino; NGS: Tipo de sequenciamento NGS realizado - Pannel, WES (Sequenciamento de todo o exoma) ou os dois.; ND: Informação não disponível; P: Patogênica; PEDIGREE: Parentesco com o paciente índice; SANGER: Resultado do Sanger para a análise de segregação e confirmação das variantes encontradas por NGS.; SINT.: Sintomático; VUS: Variante de significado incerto; WES: Sequenciamento de todo exoma; XL: Ligado ao X; ZIG.: Zigosidade.

Tabela A1: Resultados moleculares dos pacientes e seus respectivos familiares.

(Continuação)

ID_PACIENTE	ID_FAMÍLIA	PEDIGREE	SEXO	SINT.	SEQ.	SANGER	GENE	HGVSp.	ZIG.	ACMG	HERANÇA	DIAG. MOL.
CMT_24	FAM_24	INDICE	M	SIM	WES	POSITIVO	TRPV4	p.Arg232Cys	HET	P	ESP.	SIM
CMT_24F1	FAM_24	PAI	M	NÃO		NEGATIVO	TRPV4	p.Arg232Cys				
CMT_24F2	FAM_24	MAE	F	NÃO		NEGATIVO	TRPV4	p.Arg232Cys				
CMT_25	FAM_25	INDICE	M	SIM	PAINEL	POSITIVO	AIFM1	p.Ala259Gly	HEM	LP	XL	SIM
CMT_25F1	FAM_25	IRMAO	M	SIM		POSITIVO	AIFM1	p.Ala259Gly	HEM			
CMT_25F2	FAM_25	MÃE	F	NÃO		POSITIVO	AIFM1	p.Ala259Gly	HET			
CMT_25F3	FAM_25	PAI	M	NÃO		NEGATIVO	AIFM1	p.Ala259Gly				
CMT_26	FAM_26	INDICE	F	SIM	PAINEL/WES	POSITIVO	DNM2	p.Ser357Phe	HET	LP	AD	SIM
CMT_26F1	FAM_26	PRIMA	F	SIM		POSITIVO	DNM2	p.Ser357Phe	HET			
CMT_26F2	FAM_26	TIA	F	SIM		POSITIVO	DNM2	p.Ser357Phe				
CMT_26F3	FAM_26	MAE	F	SIM		POSITIVO	DNM2	p.Ser357Phe				
CMT_27	FAM_27	INDICE	M	SIM	WES	POSITIVO	EMD LMNA	c.82+1G>A p.Ser573Leu	HEM HET	P LP	ND	SIM
CMT_28	FAM_28	INDICE	F	SIM	WES	POSITIVO	GDAP1	p.Arg226del	HET	LP	ESP.	SIM
CMT_28F1	FAM_28	MAE	F	NÃO		NEGATIVO	GDAP1	p.Arg226del				
CMT_29	FAM_29	INDICE	M	SIM	WES	POSITIVO	GJB1	p.Arg107Gln	HEM	LP	XL	SIM
CMT_29F1	FAM_29	MÃE	F	SIM		POSITIVO	GJB1	p.Arg107Gln	HET			
CMT_30	FAM_30	INDICE	M	SIM	WES	POSITIVO	GJB1	p.Gly129Glu	HEM	LP	XL	SIM
CMT_30F1	FAM_30	MAE	F	SIM		POSITIVO	GJB1	p.Gly129Glu	HET			
CMT_31	FAM_31	INDICE	F	SIM	WES	POSITIVO	HSPB3	p.Trp93Ter	HET	LP	AD	SIM
CMT_31F1	FAM_31	PAI	M	SIM		POSITIVO	HSPB3	p.Trp93Ter	HET			
CMT_32	FAM_32	INDICE	F	SIM	PAINEL/WES	POSITIVO	KIF1A	p.Arg316Gln	HET	LP	ESP.	SIM
CMT_33	FAM_33	INDICE	M	SIM	PAINEL/WES	POSITIVO	KIF5A	p.Asp996Gly	HET		ESP.	SIM
CMT_33F1	FAM_33	MAE	F	NÃO		NEGATIVO	KIF5A	p.Asp996Gly				
CMT_34	FAM_34	INDICE	M	SIM	WES	POSITIVO	LRSAM1	p.Glu312AlafsTer48 p.Arg315Leu	HET HET	LP VUS	ESP.	SIM

Fonte: Elaborada pela autora.

Notas: (Abreviações e explicações – ordem alfabética): ACMG: Classificação de patogenicidade; AD: Autossômico dominante; AR: Autossômico recessivo; DM: Diagnóstico molecular; ESP.: Esporádico; F: Feminino; FAMILIAR: Quando não sabíamos ao certo qual o grau de parentesco com o paciente índice.; HEM: Hemizigose; HET: Heterozigose; HGVSp.: Nomenclatura das variantes segundo as normas da Human Genome Variation Society.; HOM: Homozigose; ID: Identificação; LP: Provavelmente Patogênica; M: Masculino; NGS: Tipo de sequenciamento NGS realizado - Painel, WES (Sequenciamento de todo o exoma) ou os dois.; ND: Informação não disponível; P: Patogênica; PEDIGREE: Parentesco com o paciente índice; SANGER: Resultado do Sanger para a análise de segregação e confirmação das variantes encontradas por NGS.; SINT.: Sintomático; VUS: Variante de significado incerto; WES: Sequenciamento de todo exoma; XL: Ligado ao X; ZIG.: Zigosidade.

Tabela A1: Resultados moleculares dos pacientes e seus respectivos familiares.

(Continuação)

ID_PACIENTE	ID_FAMÍLIA	PEDIGREE	SEXO	SINT.	SEQ.	SANGER	GENE	HGVSp.	ZIG.	ACMG	HERANÇA	DIAG. MOL.
CMT_35	FAM_35	INDICE	F	SIM	WES	POSITIVO	MFN2	p.Ala220Thr	HET	LP	ESP.	SIM
CMT_35F1	FAM_35	MAE	F	NÃO		NEGATIVO	MFN2	p.Ala220Thr				
CMT_36	FAM_36	INDICE	F	SIM	WES	POSITIVO	MFN2	p.Ser249Cys	HET	LP	ESP.	SIM
CMT_36F1	FAM_36	PAI	M	NÃO		NEGATIVO	MFN2	p.Ser249Cys				
CMT_36F2	FAM_36	MAE	F	NÃO		NEGATIVO	MFN2	p.Ser249Cys				
CMT_36F3	FAM_36	IRMA	F	NÃO		NEGATIVO	MFN2	p.Ser249Cys				
CMT_37	FAM_37	INDICE	F	SIM	WES	POSITIVO	NAGLU	p.Arg177Gln	HET	LP	ESP.	SIM
CMT_37F1	FAM_37	MÃE	F	ND		POSITIVO	NAGLU	p.Arg177Gln	HET			
CMT_38	FAM_38	INDICE	M	SIM	WES	POSITIVO	SLC5A7	c.1113+2T>A	HOM	LP	ND	SIM
CMT_39	FAM_39	INDICE	F	SIM	PAINEL/WES	POSITIVO	ATP1A1	p.Gly549Arg	HET	VUS	ND	NÃO
CMT_39F1	FAM_39	MAE	F	ND		POSITIVO	ATP1A1	p.Gly549Arg	HET			
CMT_40	FAM_40	INDICE	M	SIM	WES	POSITIVO	DCTN1	p.Ala286Val	HET	VUS	ND	NÃO
CMT_40F1	FAM_40	IRMÃO	M	ND		POSITIVO	DCTN1	p.Ala286Val	HET			
CMT_40F2	FAM_40	MÃE	F	ND		NEGATIVO	DCTN1					
CMT_41	FAM_41	INDICE	M	SIM	WES	POSITIVO POSITIVO	DNM2 ATP7A	p.Val351Met p.Leu1474Val	HET HEM	VUS VUS	ND	NÃO
CMT_41F1	FAM_41	MÃE	F	ND		NEGATIVO POSITIVO	DNM2 ATP7A	p.Val351Met p.Leu1474Val	HET			
CMT_42	FAM_42	INDICE	M	SIM	WES	POSITIVO	KARS1	p.Arg507Gln	HET	VUS	ESP.	NÃO
CMT_42F1	FAM_42	PAI	M	ND		NEGATIVO	KARS1					
CMT_43	FAM_43	INDICE	M	SIM	WES	POSITIVO POSITIVO	KARS1 TTR	p.Thr419Ile p.Val142Ile	HET HET	VUS P	ND	NÃO
CMT_44	FAM_44	INDICE	F	SIM	WES	POSITIVO	MME	p.Glu172Asp	HET	VUS	ND	NÃO
CMT_44F1	FAM_44	MAE	F	ND		POSITIVO	MME	p.Glu172Asp	HET			
CMT_45	FAM_45	INDICE	F	SIM	PAINEL/WES	POSITIVO	MYH14	p.Glu1942Lys	HET	VUS	ND	NÃO
CMT_46	FAM_46	INDICE	F	SIM	WES	POSITIVO	SETX	p.Met386Val	HET	VUS	ND	NÃO

Fonte: Elaborada pela autora.

Notas: (Abreviações e explicações – ordem alfabética): ACMG: Classificação de patogenicidade; AD: Autossômico dominante; AR: Autossômico recessivo; DM: Diagnóstico molecular; ESP.: Esporádico; F: Feminino; FAMILIAR: Quando não sabíamos ao certo qual o grau de parentesco com o paciente índice.; HEM: Hemizigose; HET: Heterozigose; HGVSp.: Nomenclatura das variantes segundo as normas da Human Genome Variation Society.; HOM: Homozigose; ID: Identificação; LP: Provavelmente Patogênica; M: Masculino; NGS: Tipo de sequenciamento NGS realizado - Painel, WES (Sequenciamento de todo o exoma) ou os dois.; ND: Informação não disponível; P: Patogênica; PEDIGREE: Parentesco com o paciente índice; SANGER: Resultado do Sanger para a análise de segregação e confirmação das variantes encontradas por NGS.; SINT.: Sintomático; VUS: Variante de significado incerto; WES: Sequenciamento de todo exoma; XL: Ligado ao X; ZIG.: Zigosidade.

# ANEXOS

## ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### A DOENÇA DE CHARCOT-MARIE-TOOTH NA CRIANÇA: ASPECTOS GENOTÍPICOS E FENOTÍPICOS

Prezado Sr (a).....RG:....., como já é do seu conhecimento, seu filho(a) é portador da Doença de Charcot-Marie-Tooth ou Neuropatia Hereditária Sensitivo-Motora, uma neuropatia de origem genética, causada por genes mutados (genes anormais), conforme já lhe foi explicado após as consultas clínicas, avaliação familiar, eletroneuromiografia.

Os testes genéticos realizados até o momento não identificaram o gene responsável pela doença de seu filho. Assim, gostaríamos de convidar seu filho para participar de um estudo onde serão feitas uma análise das manifestações clínicas da doença em seu filho(a) e um novo estudo genético, desta vez mais amplo, tentando identificar o gene responsável pela doença.

A identificação do gene não implicará, no atual momento, em nenhuma repercussão em termos de tratamento, mas permitirá: 1) diagnóstico preciso, 2) ter uma avaliação mais fidedigna de como será a evolução da doença e 3) calcular o risco de a doença recorrer na família. Em termos de investigação, os conhecimentos adquiridos serão muito importantes para que conheçamos melhor esta doença, que é ainda pouco conhecida. A identificação do gene permitirá, ainda, na participação em possíveis investigações sobre tratamento, desde que seja sua vontade.

Caso seu filho não tenha DNA extraído, o DNA será conseguido através do esfregão da bochecha com um cotonete. Passa-se o cotonete na bochecha de seu filho e a seguir o cotonete é colocado em um frasco com soro fisiológico. Esfregar o cotonete na bochecha pode deixar um gosto ruim na boca por alguns minutos, mas não há nenhum outro risco físico. Por outro lado, este procedimento apresenta um estresse psicológico inerente, principalmente se a criança for muito jovem. Todo cuidado será tomado para minimizar este estresse.

A participação de seu filho neste estudo é voluntária e não implica em custos de nenhuma natureza. Não há risco à sua integridade física. Há o risco em potencial de que seus dados sejam acessados e utilizados de maneira inapropriada, mas este risco é pequeno, já que o acesso aos dados é totalmente controlado pelo pesquisador responsável.

Em qualquer fase, poderá solicitar que seu filho seja retirado do estudo. O tratamento dele no Ambulatório de Neurogenética seguirá inalterado, ou seja, o tratamento independe da participação de seu filho no estudo e continuará a ser feito da mesma maneira que sempre foi, sem nenhuma consequência.

Uma vez que a avaliação será feita no dia do retorno ambulatorial, não há qualquer ressarcimento de despesas associada à participação no estudo.

Caso haja algum dano ao seu filho decorrente dos procedimentos envolvidos neste estudo, ele terá direito a indenização conforme as leis vigentes no país.

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

O sigilo e a privacidade relacionados à participação de seu filho neste estudo estão garantidos. Em nenhum momento ele terá sua identidade revelada e seus dados expostos. Os dados relacionados ao estudo serão coletados na consulta médica, não sendo necessário consultar o prontuário.

Este estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa deste Hospital. Este comitê tem por função garantir que as pesquisas sejam realizadas de maneira ética e pode ser contatado pelo telefone 3602-2228, de segunda a

sexta – feira, em horário comercial, e está sediado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Campus da USP, 14049-800.

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

Responsável pelo estudo: Prof. Dr. Wilson Marques Junior, que poderá ser contatado pelo telefone (16) 3602-2391 ou pelo e-mail [wmjunior@fmrp.usp.br](mailto:wmjunior@fmrp.usp.br).

Outros membros do estudo: Prof. Dr. Wilson de Araújo Junior, Dr. Charles Marques Lourenço, Dra. Silmara Gouvêa e a aluna de pós-graduação Fernanda Barbosa Figueiredo.

Caso concorde com a participação neste estudo, o Sr/Sra rubricará todas as páginas e assinará na página final. O mesmo fará o pesquisador principal. Isto será feito em duplicata, sendo que uma via ficará com o Sr/Sra e a outra com o pesquisador.

Nome do participante: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Nome do responsável: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Nome do pesquisador: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

---

**ANEXO B – FICHA DE AVALIAÇÃO DE NEUROPATIAS HEREDITÁRIAS DO  
AMBULATÓRIO DE NEUROGENÉTICA DO HCFMRP-USP**

**ANGE CASO NOVO**

Nome: \_\_\_\_\_ Registro: \_\_\_\_\_  
D.Nasc.: \_\_\_\_\_ Idade na consulta: \_\_\_\_ Tempo de doença: \_\_\_\_\_  
Naturalidade: \_\_\_\_\_ Procedência: \_\_\_\_\_  
Sexo: \_\_\_\_\_ Cor: \_\_\_\_\_ Raça: \_\_\_\_\_  
Profissão: \_\_\_\_\_

**Queixa principal**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**História da Moléstia Atual**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Heredograma**

**Interrogatório sobre os diferentes aparelhos**

Geral: \_\_\_\_\_  
Alterações cutâneas: \_\_\_\_\_  
Segmento Cefálico: \_\_\_\_\_  
Pescoço: \_\_\_\_\_  
Sistema cardio-vascular: \_\_\_\_\_



Sistema respiratório: \_\_\_\_\_  
Sistema digestivo: \_\_\_\_\_  
Sistema genito-urinário: \_\_\_\_\_  
Sistema linfohematopoiético: \_\_\_\_\_  
Sistema osteo-articular: \_\_\_\_\_  
Sistema endócrino-vegetativo: \_\_\_\_\_  
Sistema Psíquico: \_\_\_\_\_  
Sistema nervoso: \_\_\_\_\_

**Sistema Nervoso Autonômico:**

- Intolerância ortostática: ao se levantar: "cabeça leve" ( ) tontura ( ) visão borrada ( ) náusea ( ) sensação de desmaio ( ) síncope ( ) tremor ( ) desequilíbrio ( ) ansiedade ( ) palidez ( )
- Sudorese excessiva ( ) pele seca ( ) boca seca ( ) intolerância ao calor ( )
- Sensação frialdade extremidades ( ) sensação calor extremidades ( ) alteração cor extremidades ( ) perda pelos ( ) mudança cor extremidades ( )
- Saciedade precoce ( ) anorexia ( ) plenitude gástrica ( ) eructação ( ) perda de peso ( )
- Diarreia alternando com constipação ( ) restos alimentares nas fezes ( ) diarreia noturna ( ) diarreia explosiva ( )
- Diurese infrequente ( ) demora iniciar micção ( ) esvaziamento incompleto ( ) perda pequenas quantidades urina ( ) falta controle vesical ( ) retenção urina ( )
- Ereção incompleta ( ) impotência ereção ( ) Falata ejaculação ( ) ejaculação retrógrada ( )
- Controle Esfíncter anal
- Dificuldade adaptação à luz ( )

**Antecedentes pessoais:**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Antecedentes familiares:**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**EXAME CLÍNICO GERAL**


---



---



---



---

**EXAME NEUROLÓGICO****1. SENSIBILIDADE**

(A = abolida; D = diminuída; N = normal; Dis = disestesia; H = hiperestesia)

	artelhos	tornozelo	1/3 d*	1/3 m*	1/3 p*	joelho	1/3 d#	1/3 m#	1/3 p#	abdômen	tronco
dor											
tacto											
calor											
frio											
CP											
Vibração											

D: distal; m: médio; p: proximal; \*: perna; #: coxa

	F d	F m	F p	Mã o	Punh o	1/3d *	1/3m *	cotovel o	1/3m #	1/3p #	fac e	vérte x
dor												
tacto												
calor												
frio												
CP												
Vibraçã o												

D: distal; m: médio; p: proximal; Fd: falange distal; Fm: falange média; Fp: falange proximal; \*: antebraço; #: braço

**2. MOTRICIDADE****Trofismo Muscular:**

EDB		APB	
MM intrínsecos pé		1º ID	
MM peroneira		Antebraço - distal	
Panturrilha		Antebraço - médio	
1/3 distal coxa		Antebraço - proximal	
1/3 médio coxa		Braço	
1/3 proximal coxa		Cintura escapular	
MM pélvicos		Face	

Atrofia: 0 = ausente, 1 = mínima; 2 = moderada; 3 = intensa

**Tônus:**

MMSS \_\_\_\_\_

MMII \_\_\_\_\_

**Marcha:**

Marcha na ponta dos pés \_\_\_\_\_

Marcha nos calcanhares \_\_\_\_\_

Marcha c/ olhos fechados \_\_\_\_\_

Marcha em linha reta \_\_\_\_\_

Marcha para frente e para trás c/ OF \_\_\_\_\_

Pular com os dois pés \_\_\_\_\_

Pular com o pé D \_\_\_\_\_

Pular com o pé E \_\_\_\_\_

**Força Muscular:**

D	movimento	E	D	Movimento	E
	flexão 1° artelho			APB	
	extensão 1° artelho			1° ID	
	flexão demais artelhos			Lumbricais	
	extensão demais artelho			flexão radial carpo	
	flexão plantar pé			flexão ulnar carpo	
	flexão dorsal pé			extensão radial carpo	
	inversão			extensão ulnar carpo	
	eversão			flexão braço sup	
	extensão perna			flexão braço pron/sup	
	flexão perna			extensão braço	
	extensão quadril			rotação lateral	
	flexão quadril			rotação medial	
	rotação interna			abdução até 15°	
	rotação externa			abdução acima 15°	
	abdução perna			flexão cabeça	
	adução perna			extensão cabeça	
	reto abdominal			rotação p/ E	
	oblíquos			rotação p/ D	
	intercostais				
	diafragma				

**Movimentos Involuntários**

Fasciculações \_\_\_\_\_

Mioquimia \_\_\_\_\_

Caimbras \_\_\_\_\_

Tremor de repouso \_\_\_\_\_

Tremor postural \_\_\_\_\_

Tremores de intenção \_\_\_\_\_

Coréia \_\_\_\_\_

Mioclonia \_\_\_\_\_

Outros \_\_\_\_\_

### 3. COORDENAÇÃO E EQUILÍBRIO

Index-nariz \_\_\_\_\_  
 Index-index \_\_\_\_\_  
 Diadococinesia \_\_\_\_\_  
 Calcanhar-joelho \_\_\_\_\_  
 Prova do Rechaço \_\_\_\_\_  
 Sentado com olhos abertos \_\_\_\_\_  
 Sentado com olhos fechados \_\_\_\_\_  
 Em pé com olhos abertos e pés separados \_\_\_\_\_  
 Em pé com olhos abertos e pés unidos \_\_\_\_\_  
 Em pé com olhos fechados e pés separados \_\_\_\_\_  
 Em pé com olhos fechados e pés unidos \_\_\_\_\_

### 4. REFLEXOS

#### Superficiais:

D	Reflexo	E
	cutâneo-abdominal superior	
	cutâneo-abdominal médio	
	cutâneo-abdominal inferior	
	palmo-mentoniano	
	cremastérico	
	Hoffman	
	cutâneo-plantar	

#### Profundos:

D	Reflexo	E
	tornozelo	
	patelar	
	adutor	
	estiloradial	
	estiloulnar	
	bicipital	
	tripcital	
	peitoral	
	costo-abdominal	
	médio-púbico	

#### Reflexos Axiais da Face:

D	Reflexo	E
	mandibular	
	oro-orbicular	
	glabellar	

**Outras Atividades Reflexas/Involuntárias:**

D	Atividade	E
	preensão	
	perseguição	
	clônus de pé	
	clônus patela	
	clônus mão	
	clônus mandíbula	

**5. NERVOS CRANIANOS****I NERVO**

Olfato: D \_\_\_\_\_ E \_\_\_\_\_

**II NERVO**

Fundoscopia D \_\_\_\_\_

Fundoscopia E \_\_\_\_\_

Acuidade visual D \_\_\_\_\_

Acuidade visual E \_\_\_\_\_

Campimetria D \_\_\_\_\_

Campimetria E \_\_\_\_\_

**III, IV E VI NERVOS**

	E	D
reto medial		
reto lateral		
reto superior		
reto inferior		
obliquo superior		
obliquo inferior		
mirada lateral		
convergência		
mirada vertical Sup		
mirada vertical Inf		
reflexo fotomotor D		
reflexo fotomotor I		

**V NERVO****SENSIBILIDADE**

	D	E
ramo oftálmico		
ramo maxilar		

ramo mandibular		
refl. córneo-palpebral		

**MOTRICIDADE**

	D		E	
	força	trofismo	força	trofismo
m. temporal				
m. masséter				
m. pterigoideo interno				
m. pterigoideo externo				

**VII NERVO****MOTRICIDADE**

	D	E
1/3 superior da face		
2/3 inferior da face		

**SENSIBILIDADE**

	D	E
táctil		
doce		
sal		
amargo		

**VIII NERVO**

	D	E
acuidade auditiva		
P. Weber		
P. Rinne		

nistagmo	
mov. perseguição	
mov. sacádicos voluntários	
mov. sacádicos reflexos	

**IX E X NERVOS**

elevação palato	
reflexo vômito	
voz anasalada	
voz rouca	

**XI NERVO**

	D	E
esternocleidomastoideo		
trapézio		

**XII NERVO**

motricidade língua	
trofismo língua	
Fasciculações língua	

**6. DEFORMIDADES ESQUELÉTICAS**

Escoliose \_\_\_\_\_  
 Pé cavo \_\_\_\_\_  
 Dedo em martelo \_\_\_\_\_  
 Mão em garra \_\_\_\_\_  
 Outras \_\_\_\_\_

**7. ALTERAÇÕES FALA/LINGUAGEM**

Disfonia \_\_\_\_\_  
 Disartria \_\_\_\_\_

**8. SISTEMA NERVOSO AUTONÔMICO**

Maturidade sexual \_\_\_\_\_  
 Hipotermia Palidez \_\_\_\_\_  
 Desenvolvimento corporal \_\_\_\_\_  
 PA deitado \_\_\_\_\_  
 PA em pé \_\_\_\_\_ (1 min) \_\_\_\_\_ (2 min) \_\_\_\_\_ (3 min) \_\_\_\_\_  
 Extremidades: acrocianose ( ) Temperatura N ( ) fria ( ) quente ( ) cor ( )  
 alterações tróficas \_\_\_\_\_  
 Pele: alopecia ( ) hipertricose ( ) atrófica ( ) lipodistrofia ( )  
 Junta de Charcot \_\_\_\_\_  
 Alodinia \_\_\_\_\_  
 Hiperalgesia \_\_\_\_\_  
 Pupilas: tamanho \_\_\_\_\_ simetria \_\_\_\_\_ resposta à luz \_\_\_\_\_  
 resposta após retirada da luz \_\_\_\_\_

---

**OUTROS**

---

---

---

---

**Impressão Diagnóstica**

---

---

---

---

**Condutas**

---

---

---

---

DNA \_\_\_\_\_

EMG ( )

BIÓPSIA ( )



**ANEXO C – CMT NEUROPATHY SCORE (CMTNS)**

PARÂMETROS	0	1	2	3	4
<b>Sintomas sensitivos</b>	Nenhum	Artelhos	Até tornozelo	Acima tornozelo; até joelho	Acima joelho
<b>Sintomas motores (pernas)</b>	Nenhum	Tropeços, martelo	Órtese, pelo menos 1 perna	Bengala, andador, cirurgia tornozelo	Cadeira rodas > parte tempo
<b>Sintomas motores (braços)</b>	Nenhum	Dificuldade abotoar, uso zípers	Incapacidade abotoar ou uso zípers, mas escreve	Não escreve	Dificuldade proximal
<b>Sensibilidade à Dor</b>	Normal	Diminuídas artelhos / quirod	Diminuída até tornozelo / punho	Diminuída até cotovelo / joelho	Diminuída acima cotovelo / joelho
<b>Vibração</b>	Normal	Diminuída artelhos / quirod	Diminuída até tornozelo / punho	Diminuída até cotovelo / joelho	Diminuída acima cotovelo / joelho
<b>Força (pernas)</b>	Normal	4+, 4, 4- dorsiflexão pés	< ou = 3 dorsiflexão pés	= 2 + < ou = 3 flex plant pés	Fraqueza proximal
<b>Força (braços)</b>	Normal	4+, 4, 4- ext dedos ou intrínscos	< ou = 3 ext dedos ou intrínscos	< 5 extensões punho	Fraqueza acima cotovelo
<b>PAMC Ulnar (mediano)</b>	>6mV >4mV	4,0-5,9 2,8-3,9	2,0-3,9 1,2-2,7	0,1-1,9 0,1-1,1	Ausente Ausente
<b>PANS Ulnar (mediano)</b>	>9,0uV >22uV	6,0-8,9 14,0-21,9	3,0-5,8 7,0-13,9	0,1-2,9 0,1-6,9	Ausente Ausente

Fonte: Traduzido e modificado de Shy et al. (SHY et al., 2005).

Notas: PAMC: potencial de ação muscular composto; PANS: potencial de ação do nervo sensitivo.