

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

***Screening* mutacional de pacientes brasileiros adultos com a doença Charcot-Marie-Tooth axonal através da utilização do sequenciamento de nova geração**

Bianca Mara Alves de Andrade

Ribeirão Preto
2023

Bianca Mara Alves de Andrade

***Screening* mutacional de pacientes brasileiros adultos com a doença Charcot-Marie-Tooth axonal através da utilização do sequenciamento de nova geração**

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

Área de Concentração: Neurologia
Subárea: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Wilson Marques Júnior

“Versão corrigida”

**Ribeirão Preto
2023**

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

De Andrade, Bianca Mara Alves.

Screening mutacional de pacientes brasileiros adultos com a doença Charcot-Marie-Tooth axonal através da utilização do sequenciamento de nova geração. Ribeirão Preto, 2023.

125 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 adulto
3. Sequenciamento de nova geração
4. *Screening* mutacional

Folha de Aprovação

Bianca Mara Alves De Andrade.

Screening mutacional de pacientes brasileiros adultos com a doença Charcot-Marie-Tooth axonal através da utilização do sequenciamento de nova geração.

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

Área de Concentração: Neurologia
Subárea: Neurociências

Aprovado em: ___ / ___ / ___

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico esta Tese a minha mãe Maria Lucia e ao meu pai Luiz Carlos pelos ensinamentos ao longo de minha vida, por sempre estarem ao meu lado e por serem os meus maiores exemplos de vida.

Dedico também ao meu esposo William pelo amor, por acreditar em meus sonhos, pelo apoio e pela confiança em minhas escolhas.

Agradecimentos

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida por iluminarem meu caminho e possibilitarem a conclusão de mais essa etapa na minha formação profissional.

Aos meus pais, Luiz Carlos e Maria Lúcia, pelo amor incondicional e esforço despendido em minha formação pessoal e profissional.

Ao meu esposo, William, pela cumplicidade, amor, carinho e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos Luiz Henrique e Danilo por acreditarem em minhas escolhas e torcerem pela minha felicidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wilson Marques Júnior, ter tido a generosidade, a tranquilidade, pela oportunidade e por todos os ensinamentos que me proporcionou nos caminhos científicos e pelo apoio na construção do conhecimento. Pela confiança em meu trabalho.

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, especialmente a Daiana, Renato, Pedro, Rodrigo, M. Cristina, Silmara, Tatiane, Sirlene, Tamiris pela contribuição na realização das metodologias, vivências compartilhadas e, principalmente, pela amizade.

À Sandra Elisabete Marques, que me deu a oportunidade de estagiar no laboratório, me proporcionou os conhecimentos das técnicas do laboratório com comprometimento, zelo e dedicação, pelo apoio e pela construção de nossa amizade.

À Silvia, Larissa e a Vivian que além de colegas de trabalho tornaram-se minhas amigas. Obrigada por acreditarem em mim desde o começo, por todos os ensinamentos e conhecimentos que têm me passado, por toda a ajuda profissional e pela sincera amizade.

Aos colegas de pós-graduação Fernanda, Ivan e Manoela (residente em Neurologia), pelas experiências e conhecimento compartilhados;

À Lucy, secretária da Neurologia, pela disponibilidade, paciência e resolução de problemas;

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelos ensinamentos acadêmicos, científicos e pelo núcleo profissional de excelência.

À toda equipe do Centro de Medicina Genômica e ao International Centre of Genomic Medicine in Neuromuscular Diseases pela parceria durante a execução do trabalho.

Aos pacientes que participaram desta pesquisa, pois sem eles, nenhuma destas páginas estaria completa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa concedida durante os anos do curso; código de financiamento 001.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina

RESUMO

De Andrade, B. M. A. **Screening mutacional de pacientes brasileiros adultos com a doença Charcot-Marie-Tooth axonal através da utilização do sequenciamento de nova geração. 2023.** 125 folhas. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

A doença de Charcot Marie Tooth (CMT) é um tipo de neuropatia sensitivo motora hereditária (HMSN) que atinge o nervo periférico humano e que afeta tanto os neurônios motores como os sensoriais. A idade de início da CMT pode ser desde o nascimento à velhice e apresenta sintomatologia heterogênea quanto aos padrões da eletrofisiologia, neuropatia e transmissão genética. Ela pode ser classificada conforme a velocidade de condução dos nervos motores nas formas CMT1 (desmielinizante), CMT2 (axonal) e CMTI (intermediário), quanto ao padrão de herança (autossômico dominante, autossômico recessivo, ligado ao X e herança materna) e mutação/locus gênico. Vários exames complementares, diversas vezes desnecessários e de alto custo, são executados na tentativa de um diagnóstico definitivo e isto gera em um alto custo pessoal, familiar e social, mesmo sendo um grupo de doenças raras. O teste genético possibilita um diagnóstico definitivo e através da introdução das tecnologias de sequenciamento de nova geração permitiu um avanço na descoberta da vasta heterogeneidade genética da CMT, com mais de 130 genes causadores de mutações descritas até o momento. Mesmo com esse avanço, 60% das mutações dos pacientes com CMT2 permanecem desconhecidas, necessitando um diagnóstico molecular definitivo. A definição desses genes que causam CMT2 é importante porque esses podem identificar caminhos moleculares envolvidos na degeneração axonal e permitir o desenvolvimento de terapias para esses e a compreensão das desordens relacionadas com a CMT. O objetivo desse estudo foi realizar um rastreamento mutacional de pacientes brasileiros adultos (com a idade igual ou superior a 21 anos) com a doença Charcot-Marie-Tooth do tipo axonal através do sequenciamento de nova geração (painel multigênico e sequenciamento de todo exoma). Foram selecionados 26 pacientes com diagnóstico clínico-eletrofisiológico indicativo de Charcot-Marie-Tooth axonal com idade igual ou superior a 21 anos,

atendidos no Ambulatório de Neurogenética (ANGE) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP). O diagnóstico molecular foi através da utilização do sequenciamento de nova geração (painel multigênico e exoma) seguidamente, as variantes encontradas foram confirmadas por Sanger. O diagnóstico molecular foi alcançado em 38,5% dos pacientes (10/26) considerando apenas as variantes patogênicas e provavelmente patogênicas. Apenas quatro pacientes tiveram as variantes de significado incerto (VUS) (15,4%) e doze pacientes não tiveram variantes candidatas (46,1%). O gene mais frequente foi o *AARS* com duas variantes em dois pacientes. Os dez pacientes com diagnóstico molecular apresentaram variantes em alguns genes menos comuns, sendo eles, *PDK3*, *IGHMBP2*, *HSBP1*, *MORC2*, *DNM2*, *TRPV4*, *PDHA1*, *MME*, *AARS*, mostrando assim a heterogeneidade genética nesse estudo. Ademais, foram encontrados oito novas variantes, sendo elas, 1 patogênica, 3 provavelmente patogênicas, 4 variantes de significado incerto, que não foram descritas na literatura em genes já conhecidos e que acrescentam para o quadro genético do CMT2. Concluímos em nosso estudo, que foi possível alcançar o diagnóstico molecular definitivo a 10 dos pacientes adultos com CMT2 através das tecnologias NGS, especialmente WES. Foram identificadas variantes patogênicas conhecidas e variantes novas patogênicas/provavelmente patogênicas, ampliando a lista de variantes no quadro genético de CMT2. Destaca-se aqui, a variante encontrada no gene *PDK3*, que co-segregou em todos os indivíduos afetados da família. Ademais, a presente tese contribui para a ampliação do espectro fenotípico de CMT2 a partir da associação da variante encontrada em homozigose no gene *MME* ao desenvolvimento de CMT2 tardio e mais leve da doença. Esses resultados são importantes à medida que contribuem com o entendimento da correlação entre genótipo e fenótipo dos pacientes com CMT2.

Palavras-chave: Charcot-Marie-Tooth axonal; CMT adulto; Sequenciamento de nova geração: *Screening* mutacional.

ABSTRACT

De Andrade, B. M. A. **Mutational screening of adult Brazilian patients with axonal Charcot-Marie-Tooth disease using next-generation sequencing.** 2023. 125 pages. Tese (Doutorado). Ribeirão Preto School of Medicine, University of Sao Paulo, 2023.

Charcot Marie Tooth disease (CMT) is a type of hereditary sensory motor neuropathy (HMSN) affecting the human peripheral nerve that affects both motor and sensory neurons. The age of onset of CMT can be from birth to old age and presents heterogeneous symptomatology as to patterns of electrophysiology, neuropathy, and genetic transmission. It can be classified according to motor nerve conduction velocity into CMT1 (demyelinating), CMT2 (axonal), and CMTI (intermediate) forms, as to the pattern of inheritance (autosomal dominant, autosomal recessive, X-linked, and maternal inheritance) and mutation/gene locus. Several complementary exams, often unnecessary and expensive, are performed to reach a definitive diagnosis, generating a high personal, family, and social cost, even though it is a group of rare diseases. Genetic testing enables a definitive diagnosis and, by introducing next-generation sequencing technologies, has allowed a significant advance in the discovery of the vast genetic heterogeneity of CMT, with more than 130 genes causing mutations described to date. Even with this advance, 60% of the mutations in CMT2 patients remain unknown, needing a definitive molecular diagnosis. The definition of these CMT2-causing genes is important because these may identify molecular pathways involved in axonal degeneration and allow the development of therapies for these and the understanding of CMT-related disorders. This study aimed to perform a mutational screening of adult Brazilian patients (age 21 years or older) with Charcot-Marie-Tooth disease of the axonal type through next-generation sequencing (multigenic panel and whole exome sequencing). Twenty-six patients with clinical-electrophysiological diagnosis indicative of axonal Charcot-Marie-Tooth disease aged 21 years or older, seen at the Neurogenetics Outpatient Clinic (ANGE) of the Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP), were selected. Molecular diagnosis was made using next-generation sequencing (multigenic panel and exome), and then the variants found were confirmed by Sanger. The molecular diagnosis was reached in 38.5% of patients (10/26), considering only the pathogenic

and probably pathogenic variants. Only four patients had variants of uncertain significance (VUS) (15.4%), and twelve patients had no candidate variants (46.1%). The most frequent gene was *AARS*, with two variants in two patients. The ten patients with a molecular diagnosis had variants in some less common genes *PDK3*, *IGHMBP2*, *HSBP1*, *MORC2*, *DNM2*, *TRPV4*, *PDHA1*, *MME*, and *AARS*, thus showing the genetic heterogeneity in this study. Furthermore, eight new variants were found, including one pathogenic, three probably pathogenic, and four variants of uncertain significance, which have not been described in the literature in genes already known and which add to the genetic picture of CMT2. Our study concluded that it was possible to achieve a definitive molecular diagnosis for ten adult CMT2 patients using NGS technologies, especially WES. Known and novel pathogenic/probably pathogenic variants were identified, expanding the list of variants in the genetic picture of CMT2. Noteworthy here is the variant found in the *PDK3* gene, which is co-segregated in all affected individuals in the family. Moreover, this thesis contributes to broadening the phenotypic spectrum of CMT2 by associating the variant found in homozygosity in the *MME* gene with the development of late and milder CMT2 disease. These results are significant as they contribute to understanding the correlation between the genotype and phenotype of patients with CMT2.

Keywords: Charcot-Marie-Tooth axonal; adult CMT; next-generation sequencing; mutational screening.

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1.1 - O continuum das neuropatias hereditárias</i>	<i>23</i>
<i>Figura 1.2 - Diagrama da arquitetura molecular da fibra mielinizada e os genes envolvidos em neuropatias da CMT.....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 1.3 - Uma visão geral da classificação dos subtipos da doença de Charcot-Marie-Tooth.....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 1.4 - Algoritmo sugerido para testes genéticos na doença de Charcot-Marie-Tooth (CMT) e doenças relacionadas</i>	<i>30</i>
<i>Figura 1.5 - Ilustração de um pipeline de bioinformática e os seus componentes...33</i>	
<i>Figura 4.1 - Sequenciamento de nova geração (NGS) no sequenciador Illumina</i>	<i>46</i>
<i>Figura 4.2 - Fluxograma para análise bioinformática.....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 4.3 - Pipelines utilizados para análise dos dados resultantes do painel/ WES CMT2</i>	<i>48</i>
<i>Figura 4.4 - Etapas utilizadas para filtragem dos dados resultantes do NGS.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 4.5 - Diagrama utilizado para representar o efeito e a localização da variante no transcrito</i>	<i>51</i>
<i>Figura 4.6 - Perfil térmico</i>	<i>54</i>
<i>Figura 5.1 - Fluxograma da distribuição das amostras</i>	<i>58</i>
<i>Figura 5.2 - Classificação das variantes encontradas em todos os genes do trabalho</i>	<i>62</i>
<i>Figura 5.3 - Número dos tipos de variantes encontradas em todos os genes do trabalho</i>	<i>63</i>
<i>Figura 5.4 - Percentual das variantes encontradas nos pacientes</i>	<i>63</i>
<i>Figura 5.5 - Percentual dos locais para o diagnóstico molecular.....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 5.6 - Heredograma da família CMT2_P1</i>	<i>65</i>
<i>Figura 5.7 - Heredograma da família CMT2_P29.....</i>	<i>70</i>

<i>Figura 5.8 - Heredograma da família CMT_P31</i>	71
<i>Figura 6.1 - Grau de conservação da proteína Ser135Phe</i>	77
<i>Figura 6.2 - A estrutura do gene DNM2 mostrando os quatro domínios principais: dynamin_N, dynamin_M, pleckstrina (PH) e PRD</i>	80
<i>Figura 6.3 - Gene do gene MFN2 e a variante p.Arg364Trp</i>	82
<i>Figura 6.4 - Localização da variante (p. Arg269Cys) em um dos domínios do gene TRPV4</i>	84
<i>Figura 6.5 - Conservação do sitio da variante (p.R329H)</i>	87

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 4.1 – Relação dos Genes selecionados para o painel CMT2</i>	<i>43</i>
<i>Tabela 4.2 – Símbolos dos 296 genes utilizados para filtrar os arquivos WES.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabela 4.3 – Website utilizados para classificação das variantes</i>	<i>52</i>
<i>Tabela 4.4 – Protocolo touchdown da reação em cadeia da polimerase (PCR).....</i>	<i>53</i>
<i>Tabela 4.5 – Perfil térmico da PCR touchdown.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabela 4.6 – Protocolo reação de sequenciamento</i>	<i>54</i>
<i>Tabela 5.1- Distribuição dos pacientes e as características clínicas</i>	<i>60</i>
<i>Tabela 5.2 - Informações moleculares em NGS dos pacientes</i>	<i>61</i>
<i>Tabela A.1- Resultados moleculares dos pacientes e seus respectivos familiares</i>	<i>109</i>

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACMG American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology

AD Autossômico dominante

AMP Associação de Patologia Molecular

ANGE Ambulatório de Neurogenética

AR Autossômico recessivo

CMG Centro de Medicina Genômica

CMT Charcot-Marie-Tooth

CMT1 Charcot-Maire-Tooth desmielinizante

CMT2 Charcot-Maire-Tooth axonal

CMTi Charcot-Maire-Tooth intermediário

CMTNS *Neuropathy score*

CNV Variação no número de cópias

CVS Arquivo separado por vírgula

DHMN Neuropatia hereditária motora distal

DNA Ácido dextrorribonucleico

EDTA Ácido etilenodiaminotetracético

FAP Polineuropatia amiloidótica familiar

FISH Hibridização *in situ* por fluorescência

Gdna DNA genômico

HC-FMRP-USP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
– Universidade de São Paulo

HGVS *Human Genome Variation Society*

HMSN	Neuropatia sensitivo motora hereditária
HNPP	Neuropatia hereditária com sensibilidade à pressão
HSAN	Neuropatia hereditária sensitiva e/ou autonômica
HSN	Neuropatia hereditária sensitiva
HSPs	Paraplegias espásticas hereditárias
ICGNMD	<i>International Centre of Genomic Medicine in Neuromuscular Diseases</i>
LNAE	Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental
MLPA	Amplificação de sonda dependente de ligação multiplex
MNCV	Velocidade de condução dos nervos motores
MNCVm	Velocidade de condução dos nervo mediano
MNCVu	Velocidade de condução dos nervo ulnar
NGS	Sequenciamento de nova geração
NPH	Neuropatias periféricas hereditárias
PAMC	Potenciais de ação muscular compostos
PANS	Potenciais de ação sensitivos
PDC	Complexo piruvato desidrogenase
PMA	Atrofia muscular peroneal lentamente progressiva
SMAD1	Neuropatia hereditária motora distal do tipo 6
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SNPs	Polimorfismo de nucleotídeo único
SNV	Variante de nucleotídeo único (<i>Single-nucleotide variant</i>)
uL	Microlitro
VUS	Variante de significado incerto

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 Neuropatias hereditárias	23
1.2 A neuropatia de Charcot Marie Tooth.....	24
1.2.1 Classificação atual da CMT	26
1.2.2 Epidemiologia.....	27
1.2.3 Charcot Marie Tooth no adulto.....	28
1.3 Diagnóstico genético em Charcot Marie Tooth.....	29
1.3.1 Características dos testes genéticos para diagnosticar CMT	31
2. JUSTIFICATIVA	35
3. OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo Geral.	38
3.2 Objetivos Específicos.	38
4. PACIENTES E MÉTODOS	39
4.1 Considerações éticas	40
4.2 Pacientes.....	40
4.2.1 Critérios de inclusão.....	40
4.2.2 Critério de exclusão.....	40
4.2.3 Informações clínicas	41
4.3 Laboratório	41
4.3.1 Extração, quantificação e integridade do DNA.....	41
4.3.2 Técnicas de sequenciamento.....	42
4.3.2.1 Painel multigênico.	43
4.3.2.1.1 Desenho do painel.....	43
4.3.2.1.2 Preparação da biblioteca.....	45
4.3.2.1.3 Sequenciamento e análise bioinformática.....	46
4.3.2.2 WES – ICGNMD.....	47
4.3.2.3 Análise e interpretação dos resultados.....	48
4.3.2.4 Classificação das variantes.	51
4.3.2.5 Confirmação das variantes detectadas pelo NGS	52

4.3.2.5.1 Desenho dos primers e reação em cadeia da polimerase (PCR).	52
4.3.2.5.2 Sequenciamento.....	54
4.3.2.5.3 Precipitação, purificação e análise da reação de sequenciamento	55
5. RESULTADOS.....	57
5.1 Pacientes.....	58
5.2 Diagnóstico molecular e clínico	62
5.2.1 Paciente CMT_P1.....	64
5.2.2 Paciente CMT_P2.....	65
5.2.3 Paciente CMT_P4.....	66
5.2.4 Paciente CMT_P9.....	67
5.2.5 Paciente CMT_P12.....	67
5.2.6 Paciente CMT_P18.....	68
5.2.7 Paciente CMT_P19.....	68
5.2.8 Paciente CMT_P20.....	69
5.2.9 Paciente CMT_P29.....	69
5.2.10 Paciente CMT_P31.....	70
6. DISCUSSÃO	72
6.1 Paciente CMT_P1	74
6.2 Paciente CMT_P2	75
6.3 Paciente CMT_P4	76
6.4 Paciente CMT_P9	78
6.5 Paciente CMT_P12.....	79
6.6 Paciente CMT_P18.....	81
6.7 Paciente CMT_P19.....	82
6.8 Paciente CMT_P20.....	84
6.9 Paciente CMT_P29.....	85
6.10 Paciente CMT_P31.....	86
Considerações Gerais.....	87
7. CONCLUSÃO	90
8. REFERÊNCIAS.....	92
9. APÊNDICES	104

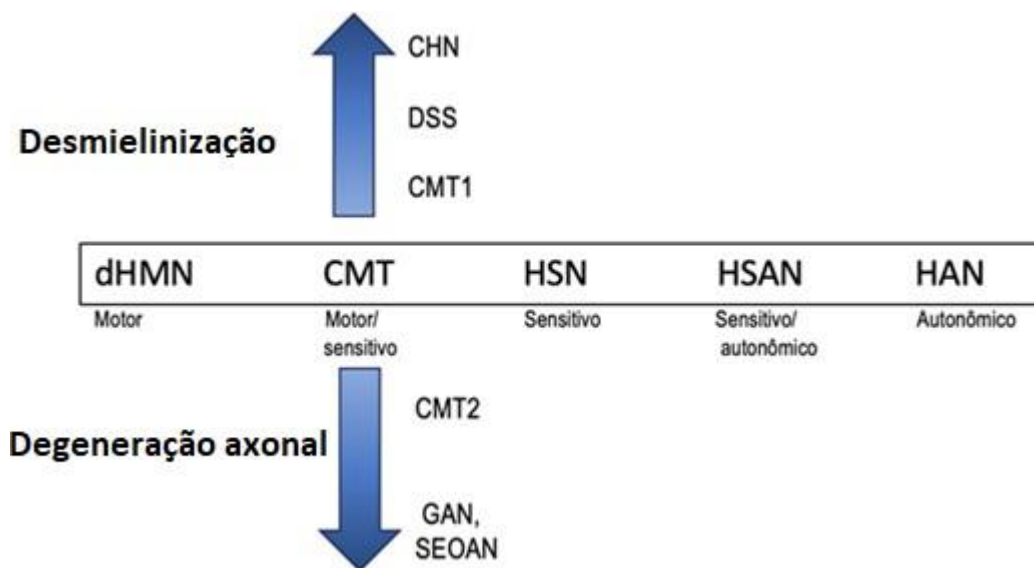
10.ANEXO	111
----------------	-----

1. INTRODUÇÃO

1.1 NEUROPATIAS HEREDITÁRIAS

As neuropatias hereditárias são um grupo muito diversificado de doenças que, em geral se manifestam lenta e progressivamente, comprometendo significativamente a funcionalidade e a qualidade de vida dos pacientes (MATHIS et al., 2015; STAVROU et al., 2021). Habitualmente são subdivididas em dois grandes grupos, aquele onde a neuropatia é a doença do paciente e aquele onde a neuropatia faz parte de um conjunto complexo de manifestações, podendo envolver não só outras estruturas do sistema nervoso como também outros órgãos. A primeira categoria corresponde à doença de Charcot-Marie-Tooth (CMT), também denominada de neuropatia hereditária sensitiva e motora (HMSN), e pelas neuropatias correlatas, incluindo a neuropatia hereditária com sensibilidade à pressão (HNPP), a neuropatia hereditária motora distal (dHMN), que tem envolvimento predominantemente motor, e a neuropatia hereditária sensitiva e autonômica (HSAN) também conhecida como neuropatia hereditária sensitiva (HSN), que envolve predominantemente os nervos sensitivos e autonômicos (ROSSOR; TOMASELLI; REILLY, 2016; TAGHIZADEH et al., 2020). Na prática, há uma grande sobreposição clínica e molecular da dHMN e das HSAN/HSN com a CMT (Figura 1.1) (PISCIOTTA; SHY, 2018).

Figura 1.1: O *continuum* das neuropatias hereditárias



Fonte: Adaptado de Carrol et.al., 2019. .

Notas: CHN, neuropatia hipomielinizante congênita; CMT, Charcot-Marie-Tooth; dHMN, neuropatia hereditária motora distal; DSS, síndrome de Dejerine-Sottas; GAN, neuropatia axonal gigante; HAN,

neuropatia hereditária autônoma; HSN, neuropatia hereditária sensitiva e/ou autônoma; HSN, neuropatia hereditária sensitiva; SEOAN, neuropatia axonal severamente precoce.

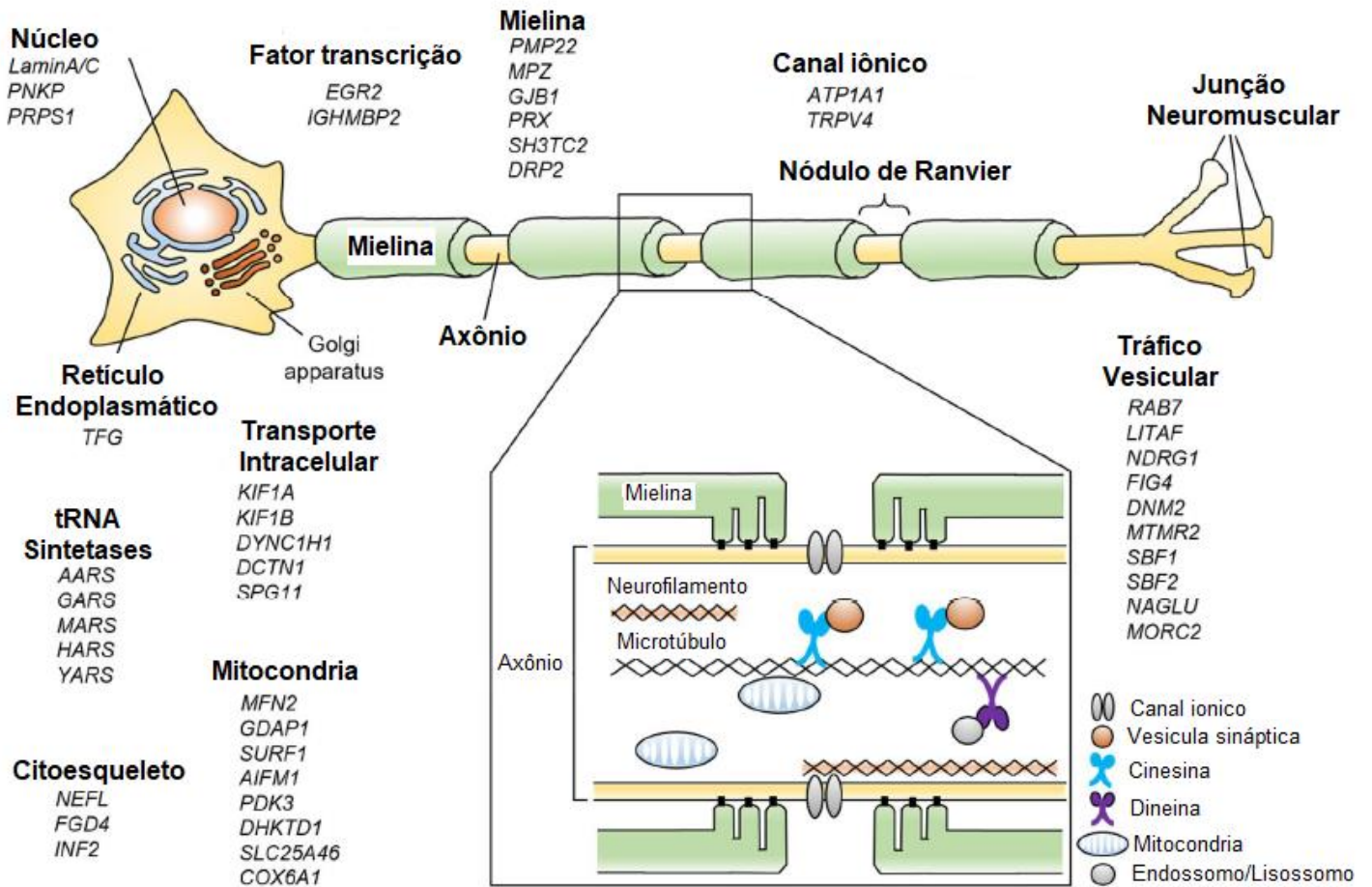
Na segunda categoria, a neuropatia faz parte de distúrbios neurológicos hereditários ou multissistêmicos, tais como as paraplegias espásticas hereditárias (HSPs), as ataxias hereditárias, as mitocondriopatias, porfiria, amiloidoses e doenças metabólicas (TAGHIZADEH et al., 2020).

1.2 A NEUROPATIA DE CHARCOT MARIE TOOTH

A CMT (OMIM 118300) é uma neuropatia hereditária degenerativa que atinge o sistema nervoso periférico e que afeta tanto as fibras sensitivas como as motoras, sendo considerado um grupo geneticamente heterogêneo e com fenótipos clínicos semelhantes, embora existam muitas exceções (KENNERSON et al., 2013; PAREYSON, 2007). Em 1886, a CMT foi descrita simultaneamente por Jean-Martin Charcot e Pierre Marie, na França, e por Howard Tooth, na Inglaterra (MATHIS et al., 2015; OUVRIER, 2010; YAMAGUCHI; TAKASHIMA, 2018). Eles descreveram um quadro de atrofia muscular peroneira lentamente progressiva, com comprometimento tardio dos membros superiores (MATHIS et al., 2015). Nos anos de 1956-1957, com a aplicação de técnicas neurofisiológicas no contexto clínico por Edward Lambert, Peter J. Dyck, Roger Gilliatt e P.K. Thomas, foi elaborada uma classificação baseada na velocidade de condução, onde CMT1 denominava a forma desmielinizante, com velocidade de condução reduzida (≤ 35 m/s) e CMT2 a forma axonal com velocidade de condução normal ou ligeiramente reduzida (ECHANIZ-LAGUNA, 2015; OUVRIER, 2010).

Atualmente, mais de 130 genes estão relacionados à CMT e desordens correlacionadas, resultantes de variantes pontuais ou variações do número de cópias em genes associados a múltiplas funções do sistema nervoso periférico, incluindo proteínas das células de Schwann e da mielina, desenvolvimento axonal, fatores de transcrição, componentes do citoesqueleto e proteínas mitocondriais (Figura 1.2) (BENARROCH et al., 2019; CANDAYAN; PARMAN; BATTALOĞLU, 2022; SAPORTA, 2014).

Figura 1.2: Diagrama da arquitetura molecular da fibra mielinizada e os genes envolvidos em neuropatias da CMT.



Fonte: Adaptado de Kitani-morii; Noto, 2020.

A idade de início da CMT varia do nascimento à velhice e os sintomas abrangem uma ampla gama de fenótipos (CANDAYAN; PARMAN; BATTALOĞLU, 2022). A característica marcante da doença, independente do tipo (CMT1/CMT2) é a degeneração axonal simétrica, comprimento-dependente e lentamente progressiva, comprometendo fibras motoras e sensitivas. A fraqueza muscular e atrofia se instalam distalmente nos membros inferiores e progridem proximalmente, acometendo tardiamente os membros superiores. A queda dos pés é usualmente a primeira manifestação motora. Associadamente, surge perda sensitiva distal, sendo as manifestações positivas são menos comuns (BAETS; DE JONGHE; TIMMERMAN, 2014; CANDAYAN; PARMAN; BATTALOĞLU, 2022). Interessantemente, a maioria

dos pacientes não tem queixas sensitivas significativas, embora 20-30% dos pacientes com CMT1 relatem dor (TAZIR et al., 2014). À medida que a doença progride, os membros superiores são acometidos. Deformidades esqueléticas, como pés cavos, dedos em martelo e cifoescoliose são comuns (CANDAYAN; PARMAN; BATTALOĞLU, 2022; MARQUES et al., 2005). A maioria dos pacientes com um fenótipo clássico permanece ambulatorial ao longo da vida, com uma vida útil normal, ainda que com algumas limitações. No entanto, a CMT pode ser clinicamente heterogênea, com variabilidade na idade de início, na velocidade de progressão e nos achados eletrofisiológicos (PISCIOTTA; SHY, 2018). Essa heterogeneidade clínica, juntamente com a diversidade genética em expansão, é o cenário complexo das neuropatias hereditárias (SIVERA et al., 2013).

Ocasionalmente a doença pode ser incapacitante, mas até o momento o tratamento é sintomático (MATHIS et. al., 2015; BIRD, 2020), envolvendo equipe multidisciplinar que inclui neurologistas, fisiatras, cirurgiões ortopédicos, psicólogos, fisioterapeutas e terapeutas ocupacionais. Nos últimos anos, houve uma melhora na condução de terapias para reabilitação e, em alguns casos, cirurgia corretiva é indicada, a fim de manter a qualidade de vida dos pacientes (MATHIS et. al., 2015; BIRD, 2020).

Apesar de não existir um tratamento curativo para CMT, descobertas das últimas décadas na área da genética molecular possibilitaram uma melhor compreensão genética da doença, com subseqüentes ensaios clínicos de genes específicos e, em última análise, individualização da terapia conforme o defeito molecular subjacente (HAREL; LUPSKI, 2014; MATHIS et al., 2015).

1.2.1 Classificação atual da CMT

A CMT é clinicamente dividida em subgrupos conforme a velocidade de condução dos nervos motores dos membros superiores (MNCV), o padrão de herança (autossômico dominante, autossômico recessivo, ligado ao X ou herança materna), e variante/locus gênico (KITANI-MORII; NOTO, 2020).

Na classificação mais utilizada atualmente, a CMT1 está associada a velocidade de condução (VC) <35 m/s, na CMT 2 a VC é ≥ 45 m/s (BACQUET et al., 2018; BIRD,

nerológicas hereditárias mais prevalentes, sendo a mais comum do sistema nervoso periférico, com prevalência de 1 caso por 2.500 indivíduos. Entretanto, alta variabilidade tem sido descrita, como a prevalência de 9,37 a 20,1 casos/100.000 habitantes em 12 estudos europeus ou de 10 a 28 casos/100.000 habitantes em estudos irlandeses (PAREYSON; SAVERI; PISCIOTTA, 2017) ou de 36 casos/100.000 habitantes na Noruega (GONDIM et al., 2014).

Quanto à prevalência dos subtipos, CMT1 é a forma mais comum, representando aproximadamente 60% dos casos (DIVINCENZO et al., 2014), seguida da CMT2, com 12 a 36% (BACQUET et al., 2018; BARRETO et al., 2016) e finalmente das formas intermediárias, que compõem cerca de 4% dos casos de CMT (MCCORQUODALE; PUCILLO; JOHNSON, 2016). As CMTs autossômicas dominantes são as formas mais frequentes na maioria dos países europeus e norte-americanos (TAZIR et al., 2014). Já as formas autossômicas recessivas (CMT-AR) representam menos de 10% das famílias europeias, mas são mais frequentes na bacia do Mediterrâneo e no Oriente Médio, onde a consanguinidade é mais pronunciada (DUBOURG et al., 2006). No Brasil, um estudo realizado na cidade de Ribeirão Preto, 53 famílias com suspeita de CMT1 foram identificadas entre 1998 e 2000, sendo a duplicação do *PMP22* presente em 42 casos (79%) (MARQUES et al., 2005).

1.2.3 Charcot Marie Tooth no adulto

O início da doença é geralmente na primeira ou segunda década de vida; embora, nem todos os pacientes sejam diagnosticados na infância (KITANI-MORII et al., 2020). Segundo as pesquisas epidemiológicas, a prevalência de neuropatias periféricas aumenta com a idade, chegando a até 8% entre indivíduos > 65 anos (SENDEREK et al., 2020). No entanto, não há informações precisas se os pacientes diagnosticados com CMT na idade adulta, principalmente na meia-idade ou avançada, desenvolvem a doença na primeira ou segunda década de vida (KITANI-MORII et al., 2020). Alguns autores relataram que a taxa de progressão da doença é relativamente constante, enquanto outros indicam que a deterioração é acelerada pelo envelhecimento (KITANI-MORII et al., 2020). Segundo o estudo de

Shy et al., (2018), os subtipos genéticos da forma axonal (CMT2) frequentemente se iniciam na fase adulta. Este conceito é importante, porque indica que pacientes adultos diagnosticados com neuropatia axonal idiopática possam ter uma causa genética para sua doença (SHY et al., 2018), sendo muito importante a identificação destes genes. Além da importância clínica, a identificação de genes adicionais que causam CMT2 é importante, já que podem contribuir para um melhor conhecimento da biologia do sistema nervoso periférico, da degeneração axonal e permitir o desenvolvimento de terapias para essas e para outras doenças relacionadas (SHY et al., 2018).

1.3 DIAGNÓSTICO GENÉTICO EM CHARCOT MARIE TOOTH

A abordagem diagnóstica da CMT requer uma avaliação cuidadosa da apresentação clínica, modo de herança, estudos de condução nervosa, testes de DNA e, ocasionalmente, biópsia de nervo (PAREYSON; MARCHESI, 2009).

Pacientes com CMT1 são os mais propensos a receberem um diagnóstico genético (>85% dos pacientes), seguido por aqueles com HSN (30-40%), CMT2 (25-35%) e HMN (15-25%) (PIPIS et al., 2019).

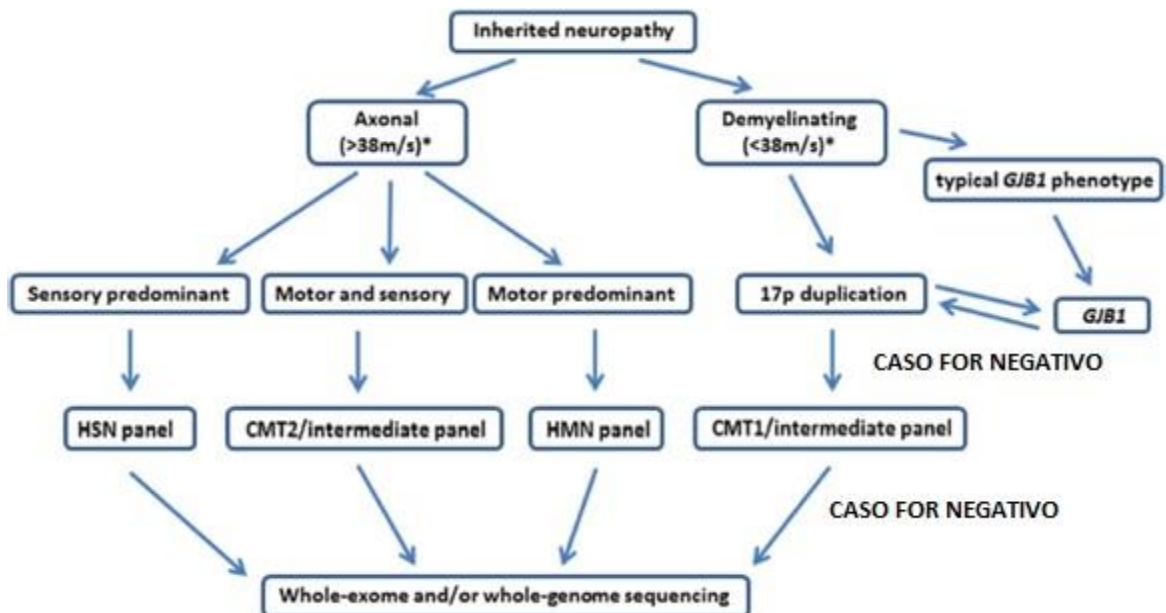
O subtipo mais comum de CMT é a CMT1A, que responde por >60% dos casos geneticamente diagnosticados (PIPIS et al., 2019). A CMT1A é causada por uma duplicação de 1,4 Mb no braço curto do cromossomo 17 (17p), que contém nove genes, incluindo o gene da proteína periférica da mielina 22 (*PMP22*) (PIPIS et al., 2019). Uma deleção de 1,4 Mb desta mesma região cromossômica causa outra neuropatia hereditária, a neuropatia hereditária com sensibilidade à pressão (HNPP), destacando a importância do nível de expressão da proteína PMP22 para o nervo periférico (PIPIS et al., 2019).

A abordagem tradicional das técnicas moleculares para investigação de genes específicos, como a duplicação/deleção do gene *PMP22*, é efetiva em termos de custo/tempo nas fases iniciais da investigação dos casos de CMT1. Entretanto, é muito menos efetiva na CMT2, onde 66% dos casos permanecem desconhecidos, (CARROLL et al., 2019; PIPIS et al., 2019).

Os avanços no diagnóstico genético, principalmente pelo uso do sequenciamento de nova geração (NSG), revelaram a vasta heterogeneidade genética da CMT, com mais de 130 genes associados à condição até o momento. Dentre eles, alterações nos genes *PMP22* (CMT1), *GJB1* (CMTX), *GDAP1*, *SH3TC2*, *MPZ* e *MFN2* (CMT2) são responsáveis por 80-90% dos casos de CMT (BENARROCH et al., 2019; CANDAYAN; PARMAN; BATTALOĞLU, 2022; ECHANIZ-LAGUNA, 2015; PIPIS et al., 2019).

Embora exista variabilidade conforme a população estudada e a metodologia de inclusão, já foi demonstrado que a taxa de diagnóstico genético varia de 18% a 31% em estudos que utilizam painéis genéticos, elevando-se para 45% a 60% em estudos que utilizam o sequenciamento completo do exoma *WES* (CANDAYAN; PARMAN; BATTALOĞLU, 2022). A figura 1.4 mostra um fluxograma sugerindo o direcionamento dos testes genéticos conforme a clínica e os achados eletroneuromiográficos de pacientes com suspeita de CMT.

Figura 1.4: Algoritmo sugerido para testes genéticos na doença de Charcot-Marie-Tooth (CMT) e doenças relacionadas.



Fonte: Adaptado de (Rossor; Evans; Reilly, 2015).

Notas: *Velocidade de condução do nervo motor. HMN, neuropatia hereditária motora; HSN, neuropatia hereditária sensitiva.

No Brasil, foram realizados pelo menos três estudos que utilizaram o sequenciamento de nova geração como diagnóstico molecular das neuropatias hereditárias. O primeiro estudo, realizado pelo nosso grupo, usando a tecnologia WES, foi capaz de diagnosticar 43,3% dos 30 pacientes avaliados com CMT (TOMASELLI, 2018). O segundo estudo por Padilha et al. (2020), um grupo do sul do Brasil, utilizou um painel gênico (com 104 genes relacionados a neuropatias hereditárias), sendo identificadas 45,4% de 11 pacientes com CMT2. O terceiro estudo por Cavalcanti et al., (2021), utilizou um painel gênico, sendo identificadas 68,88% de 197 pacientes com CMT. Os três estudos consideraram somente variantes patogênicas e provavelmente patogênicas como diagnóstico molecular definitivo.

1.3.1 Características dos testes genéticos para diagnosticar CMT

O espectro de variações do DNA em um genoma humano compreende pequenas mudanças de base (substituições, inserções e deleções de nucleotídeos, grandes deleções envolvendo éxons ou genes inteiros e rearranjos como inversões e translocações (BEHJATI; TARPEY, 2013). Na CMT, já foram descritas alterações do tipo estrutural (variação no número de cópias (CNVs) - duplicação/deleção), inserções/deleções (indels) e variantes de nucleotídeo único (SNVs) (DIVINCENZO et al., 2014).

No passado, a investigação molecular da CMT era realizada por meio de uma análise ordenada, em que genes eram testados individualmente e de maneira sequencial (TOMASELLI, 2018). As alterações sequenciais eram testadas sempre pelo sequenciamento tipo Sanger, uma estratégia robusta capaz de determinar se há uma variante pontual ou uma pequena deleção/duplicação presente no gene candidato (GOMES; KORF, 2018). A investigação do número de cópias era (e em algumas situações ainda é) testada por outras técnicas, tais como análise de microssatélites (Marques et al. 2005), a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) e amplificação de sonda dependente de ligação multiplex (MLPA) (GOMES; KORF, 2018).

Os sequenciadores de DNA como o de Sanger e NGS possibilitam a determinação da ordem exata dos nucleotídeos (A, T, C e G) em uma sequência de DNA; a diferença entre eles é a quantidade de sequenciamento realizado em um

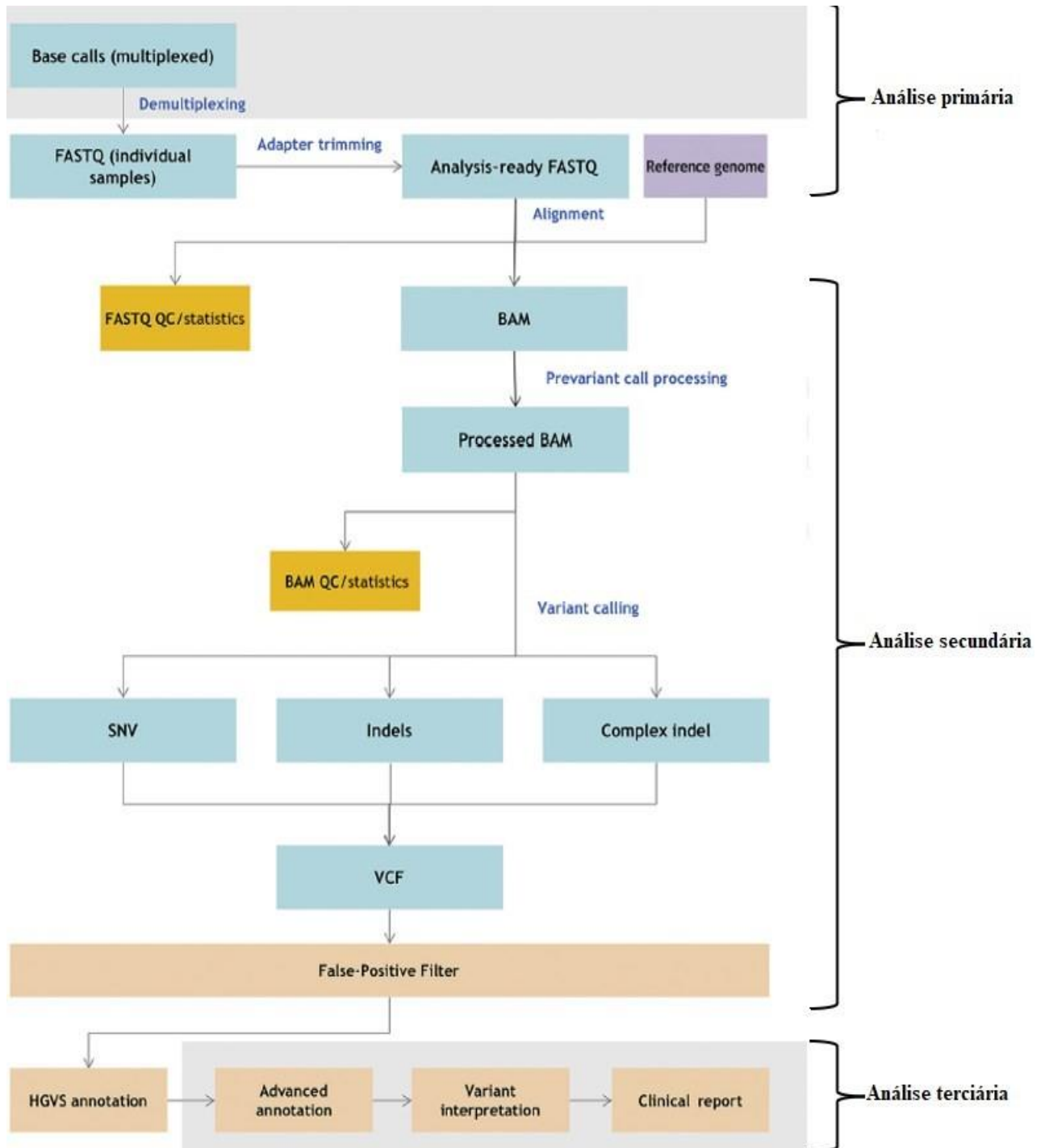
determinado período. Embora seja considerado o “padrão ouro” para diagnóstico molecular, o método de Sanger sequencia apenas um único fragmento de DNA por vez, apresentando algumas limitações para doenças heterogêneas, como na CMT (MARDIS, 2011). O NGS consegue sequenciar milhões de fragmentos de forma simultânea em uma única corrida e é especialmente útil para testar indivíduos que apresentam clínica indeterminada em que múltiplos genes podem ser a causa subjacente (GOMES; KORF, 2018; MARDIS, 2011) como na CMT2. As razões pelas quais a tecnologia NGS é particularmente adequada para o diagnóstico de CMT incluem: (i) CMT é uma neuropatia relativamente comum, (ii) várias dezenas de genes causam o fenótipo CMT e (iii) vários mecanismos de herança, incluindo fenótipos dominantes, recessivos e ligados ao X, são conhecidos por causar CMT (VERMA, 2014). Suas principais plataformas utilizam diferentes abordagens de sequenciamento, que são: (i) 459/Roche® - pirosequenciamento, (ii) Illumina® - sequenciamento por síntese (MiSeq/ HiSeq/NextSeq), (iii) SOLiD - sequenciamento por ligação e detecção de oligonucleotídeos e (iv) Ion Torrent - metodologia por semicondutores (GOMES; KORF, 2018). Essas plataformas realizam um processo dividido em 4 etapas: (i) extração e fragmentação de DNA, (ii) preparação da biblioteca, (iii) enriquecimento, (iv) sequenciamento (ROY et al., 2016).

As etapas subsequentes, de análise e interpretação desses dados requerem conhecimento múltiplo que envolve conversão de sinais em dados, dados em informação interpretável, e essa informação em conhecimento aplicável para fins diagnósticos, em um processo que envolve três fases analíticas (OLIVER; HART; KLEE, 2015). A análise primária consiste no processamento dos sinais brutos gerados pelo sequenciador NGS em base de nucleotídeos e dados de leitura curta (*reads*). A análise secundária envolve o alinhamento das *reads* a uma sequência de referência (genoma) ou montagem de novo da leitura do nucleotídeo e posterior detecção de variantes. Já análise terciária é a anotação das variantes encontradas durante o processo de sequenciamento e interpretação dessas variantes em seu contexto biológico (OLIVER; HART; KLEE, 2015).

Para realizar essas análises é necessário a utilização de um *pipeline* “guia” personalizado conforme a necessidade do laboratório. Nesse *pipeline* há componentes que processam dados de sequência massiva por uma série de transformações utilizando múltiplos componentes de *software*, bases de dados, e

funcionamento de ambientes (hardware e sistema operacional) (ROY et al., 2016). A figura 1.5 exemplifica esse processamento de dados gerados pelo NGS.

Figura 1.5: A figura ilustra um *pipeline* de bioinformática e os seus componentes que são tipicamente utilizados para o processamento de dados NGS.



Fonte: Adaptado de Roy et al., 2016.

Notas: BAM, mapa de alinhamento binário; HGVS, Sociedade de Variante do Genoma Humano; indel, inserção/deleção; QC, controle de qualidade; SNV, single nucleotídeo variante; VCF, formato de chamada de variante.

A interpretação de variantes geradas pelo NGS é um desafio devido ao elevado volume de variantes formadas, a heterogeneidade fenotípica e genética da CMT (PIPIS et al., 2019). Normalmente, 200.000 a 400.000 variantes são identificadas por paciente após o WES, ou 3.900.000 após o sequenciamento de todo genoma (WGS) (ZHANG et al., 2020). As estratégias de análise se baseiam nas características das variantes, concentrando-se em variantes raras em que se prevê patogenicidade. No entanto, mesmo após essa filtragem, cerca de 100-1000 variantes causadoras de doenças candidatas são encontradas em um único conjunto de dados WES, e métodos adicionais são necessários para prever quais delas podem ter sérias consequências funcionais e priorizá-las para validação (SMEDLEY et al., 2014).

O Colégio Americano de Genética Médica e Genômica (ACMG) e a Associação de Patologia Molecular (AMP) estabeleceram padrões para a classificação genética das variantes em cinco categorias: (i) patogênicas, (ii) provavelmente patogênicas, (iii) variantes de significado incerto (VUS), (iv) provavelmente benignas e (v) benignas (RICHARD et al., 2015). Essas classificações são baseadas na avaliação de múltiplos aspectos, a citar: (i) bancos de dados públicos e privados de frequência populacional (GnomAD, Exac, 1000 Genomes, NHLBI (National Heart, Lung Blood Institute) e ABRAOM), (ii) dados funcionais da proteína/grau e sua conservação e o impacto da variante na estrutura proteica, (iii) informações estruturais no gene, (iv) bancos de dados específicos de variantes/doença (Clinvar, OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), HGMD (Human gene mutation database), dbSnp (the Single Nucleotide Polymorphism DataBase), Ensembl Variation database) e, (v) outras informações sobre fenótipo do paciente, padrão de herança e análise de segregação (RICHARDS et al., 2015) (OLIVER, 2015).

2.JUSTIFICATIVA

A doença de Charcot Marie Tooth é um grupo de doenças raras com ampla diversidade clínica e genética, a qual um grande percentual de pacientes permanece não diagnosticado molecularmente, principalmente em casos de CMT do tipo axonal. Pelo melhor do nosso entendimento, não há estudos mutacionais sobre CMT axonal na idade adulta, principalmente na população de meia-idade ou de idade avançada. Torna-se, assim, relevante o estudo mutacional neste grupo populacional, determinando a epidemiologia genética desta faixa etária, além de possibilitar um diagnóstico genético preciso aos paciente e suas famílias.

3.OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é o de realizar um rastreamento mutacional de pacientes brasileiros adultos (com a idade igual ou superior a 21 anos) com a doença Charcot-Marie-Tooth do tipo axonal através do sequenciamento de nova geração (painel multigênico e sequenciamento de todo exoma).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar e classificar, conforme os critérios da ACMG, as variantes dos genes do tipo CMT2 encontradas no painel e exoma de cada paciente;
2. Correlacionar essas variantes com o fenótipo dos pacientes adultos com CMT2.

4.PACIENTES 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 HCRP n.º 12219/2004 (Anexo A).

4.2 PACIENTES

Foram selecionados 26 pacientes com diagnóstico eletrofisiológico indicativo de Charcot-Marie-Tooth axonal com idade igual ou superior a 21 anos, atendidos no Ambulatório de Neurogenética (ANGE) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP). Ademais, foi também coletada amostra dos familiares dos pacientes, a fim de se realizar o estudo de segregação na família quando necessário, mediante identificação de variante genética com potencial de justificar o quadro clínico.

4.2.1 Critérios de inclusão

Foram utilizados os seguintes critérios de inclusão:

1. Adultos com idade igual ou superior a 21 anos;
2. Diagnóstico clínico de CMT2;
3. Exame eletroneuromiográfico condizente com padrão axonal;
4. Tenham concordado em participar do estudo e tenham assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B).

4.2.2 Critério de exclusão

Foi utilizado o seguinte critério de exclusão:

- Exame clínico e/ou eletroneuromiográfico indicativo dos demais subtipos de CMT.

4.2.3 Informações clínicas

As informações clínicas dos pacientes foram obtidas através da revisão dos prontuários médicos físicos e/ou eletrônicos dos pacientes que consultaram no ANGE e de acordo com a ficha de avaliação de neuropatias hereditárias do Ambulatório de Neurogenética juntamente com o CMT *Neuropathy score* (CMTNS) (Murphy et al., 2013) (Anexos C e D). O CMTNS foi classificado em leve (CMTNS 0-10), moderado (CMTNS 11-20) e grave (CMTNS maior que 21).

Para a classificação da neuropatia como sendo axonal foram utilizados a velocidade de condução dos nervos ulnares (MNCVu) e/ou mediano (MNCVm) >38 m/, redução da amplitude dos potenciais de ação muscular compostos (PAMC) e dos potenciais de ação sensitivos (PANS).

4.3 LABORATÓRIO

4.3.1 Extração, quantificação e integridade do DNA

Foram coletados cerca de 10mL de sangue periférico dos pacientes para extração de DNA genômico (gDNA) em tubos Vacutainer com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). As amostras do gDNA foram extraídas no Centro de Medicina Genômica (CMG) do HC-FMRP-USP. O material passou pela centrifugação a 2.000 xg por 10 minutos para a formação do *buff coat*. Posteriormente, 300ul do *buff coat* foram recolhidos e adicionados à primeira

célula do cartucho do aparelho de extração Maxwell da Promega®, seguindo as instruções do fabricante.

Após a extração, o gDNA foi quantificado e armazenado a 20°C negativos no Laboratório de Neurogenética (LNAE). Para a quantificação do gDNA, foram utilizados 2 uL de cada amostra no equipamento espectrofotômetro NanoDrop® com software ND-1000 (Thermo Fisher Scientific®). Nesse método, é realizada a medição da quantidade de luz absorvida pelo gDNA em solução no comprimento de onda de 260nm. Quanto maior for a absorção de luz nesse comprimento de onda, maior a concentração de DNA na solução. Deste modo, para controle de qualidade, calcula-se a razão de absorbância entre 260/280nm e 260/230nm. Valores entre 1,8 (260/280) e 2,0 (260/230) apontam gDNA puro e valores inferiores sugerem a presença de contaminantes como proteínas, fenol, EDTA, etc.

A integridade do DNA foi verificada a partir da eletroforese de 15µl da amostra em gel de agarose a 1%, em tampão tris, ácido bórico e EDTA (TBE) 1X (*Invitrogen*). A visualização destes fragmentos foi feita por um transiluminador de luz ultravioleta.

4.3.2 Técnicas de sequenciamento

Para rastreamento genético inicial, as amostras dos pacientes selecionados foram submetidas a um estudo por painel multigênico realizado no Centro Medicina Genômica (CMG) do HCFMRP, incluindo 51 genes causadores de CMT axonal (Tabela 4.1). Entretanto, no decorrer do estudo, notou-se que melhor custo/benefício do sequenciamento completo do exoma (*WES*) em relação ao painel multigênico. Dessa forma, os pacientes com resultados negativados pelo painel, juntamente com o restante dos pacientes selecionados, foram encaminhados para a realização do *WES* em Londres, Inglaterra, no *International Centre of Genomic Medicine in Neuromuscular Diseases (ICGNMD), University College London* e analisado no local, entretanto apenas dois pacientes selecionados foi feito o exame *NGS* de todo exoma no laboratório comercial MENDELICS-SP e interpretado os resultados localmente.

4.3.2.1 Painel multigênico – (CMG)

4.3.2.1.1 Desenho do painel

Foi elaborado um painel com 51 genes relacionados a causas conhecidas de CMT axonal, empregando o *software* Design Studio da Illumina (Tabela 4.1). Os genes foram selecionados por pesquisas na literatura e em bancos de dados *online* como: **i. DesignStudio (Illumina)** - <https://designstudio.illumina.com/>; **ii. PanelApp** - <https://panelapp.genomicsengland.co.uk/>; **iii. OMIM** - <https://www.omim.org/> e **iv. Neuromuscular** - <https://neuromuscular.wustl.edu/naltbrain.html> e com o total de 996 sondas sintetizadas.

Tabela 4.1: Relação dos Genes selecionados para o painel CMT2.

(Continua)

Gene	Proteína	Localização Cromossômica
AARS1	Alanyl-tRNA Synthetase 1	16q22.1
AIFM1	Apoptosis Inducing Factor Mitochondria Associated 1	Xq26.1
ARHGEF10	Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 10	8p23.3
BSCL2	‘Bsc12 Lipid Droplet Biogenesis Associated, Seipin	11q12.3
COX6A1	Cytochrome C Oxidase Subunit 6a1	12q24.31
DCAF8	Ddb1 And Cul4 Associated Factor 8	1q23.2
DHTKD1	Dehydrogenase E1 And Transketolase Domain Containing 1	10p14
DNAJB2	Dnaj Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B2	2q35
DNM2	Dynamin 2	19p13.2
DYNC1H1	Dynein Cytoplasmic 1 Heavy Chain 1	14q32.31
GAN	Gigaxonin	16q23.2
GARS1	Glycyl-tRNA Synthetase	7p14.3
GDAP1	Ganglioside Induced Differentiation Associated Protein 1	8q21.11
GJB1	Gap Junction Protein Beta 1	Xq13.1
GJB3	Gap Junction Protein Beta 3	1p34.3

Continuação

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

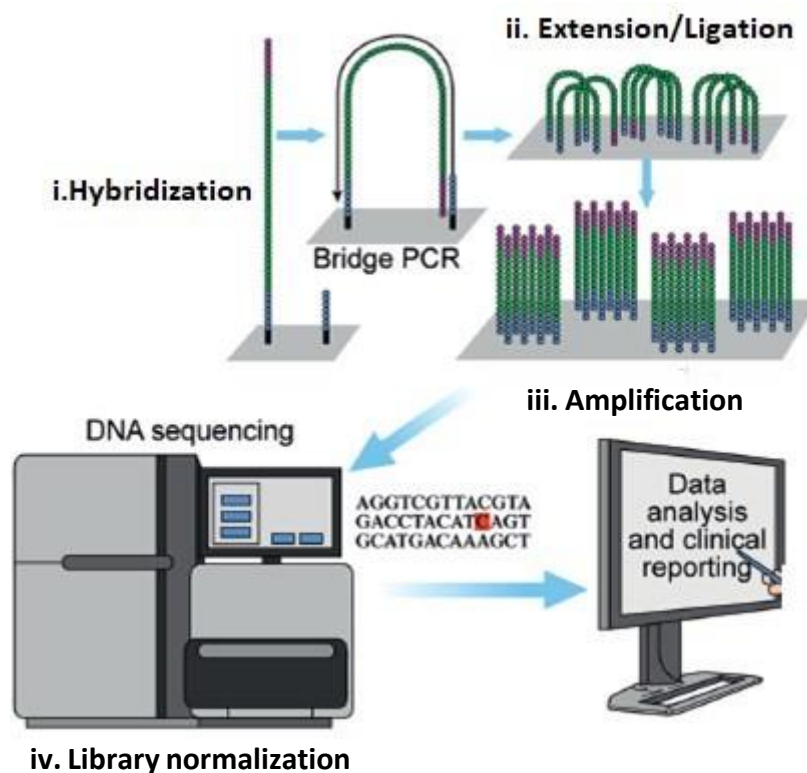
Fonte: Elaborada pela autora. Adaptada de Tweedie et al. (2021).

4.3.2.1.2 Preparação da biblioteca

O sequenciamento no equipamento Illumina é baseado na incorporação de terminadores reversíveis marcados por cor, que permitem a identificação de bases únicas à medida que são incorporadas às cadeias de DNA (ZOLET et al., 2017) (Figura 4.1). Em nosso trabalho, foi utilizado o kit TruSeq® Custom Amplicon v1.5 (Illumina®) para a preparação da biblioteca seguindo o protocolo recomendado com as seguintes etapas:

- i. Hibridização — Hibridiza um *pool* de oligonucleotídeos *upstream* e *downstream* às regiões de interesse. No final desse processo, um sistema de limpeza de três etapas com um filtro tamanho-dependente remove os oligonucleotídeos não incorporados ao DNA genômico.
- ii. Extensão/ligação — Conecta os oligonucleotídeos hibridizados de *downstream* a *upstream*. Uma polimerase de DNA se estende dos oligonucleotídeos a *downstream* pela região visada, seguida da ligação à extremidade 5' do oligonucleotídeo a *upstream* com o uso de DNA ligase. O resultado é a formação de produtos que contêm os oligonucleotídeos específicos para as regiões de interesse ladeadas por sequências exigidas para a amplificação.
- iii. Amplificação de PCR — Amplifica os produtos de extensão/ligação usando *primers* que adicionam sequências de índice para sequências de multiplexação de amostra e captura de lâminas de fluxo exigidas para a clusterização no sequenciador Illumina. No final do processo, um sistema de limpeza de PCR purifica os produtos de PCR (denominada biblioteca).
- iv. Normalização da biblioteca — Normaliza a quantidade de cada biblioteca para garantir uma representação mais igualitária na biblioteca final do *pool*. No final desse processo, o *pool* é colocado em um sequenciador Illumina, onde é realizado o sequenciamento por síntese.

Figura 4.1: Sequenciamento de nova geração (NGS) no sequenciador Illumina.



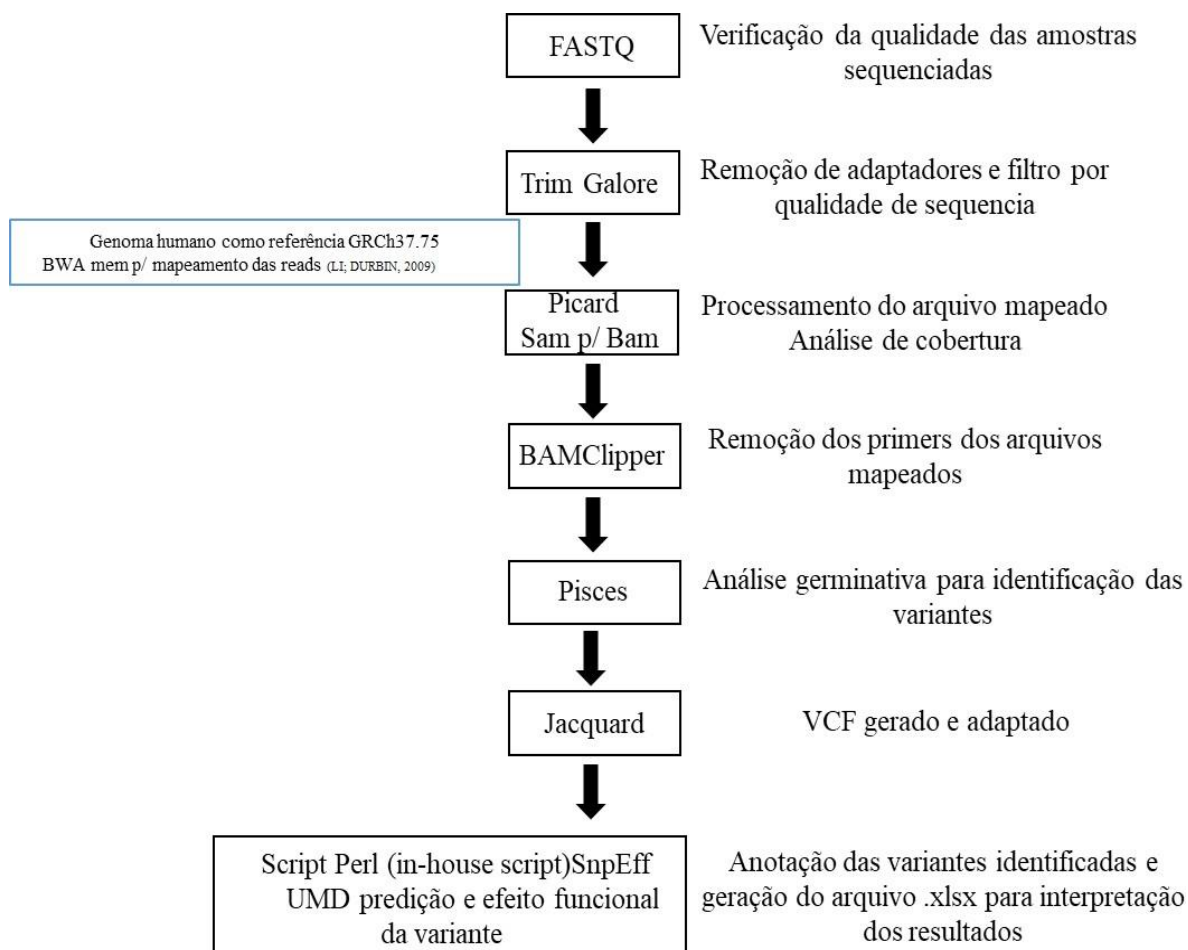
Fonte: Adaptada de Klein et al. (2017).

4.3.2.1.3 Sequenciamento e análise bioinformática

O sequenciamento foi realizado no equipamento MiSeq® (Illumina®) com o kit MiSeq Reagent Micro v2, utilizando o método *paired-end* (2x150pb) com cobertura média de 200 vezes com 24 amostras por corrida. Foram sequenciadas ambas extremidades de cada fragmento, produzindo dados de sequenciamento alinháveis, com parâmetros de qualidade recomendados pela Illumina.

Para a análise bioinformática, foi utilizado o seguinte fluxograma (Figura 4.2):

Figura 4.2: Fluxograma para análise bioinformática.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.2.2 WES – ICGNMD

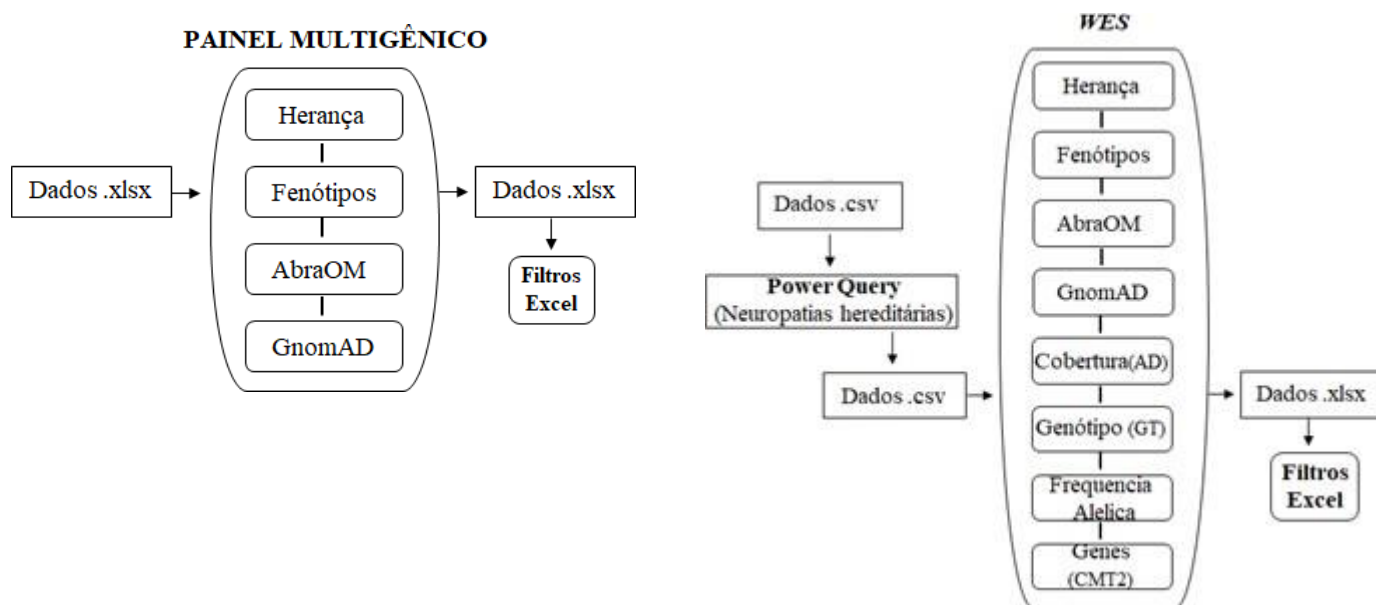
Os exomas feitos no ICGNMD foram realizados utilizando um kit para captura dos éxons customizados na plataforma *Nextera Illumina®* e foram sequenciados na plataforma *Illumina HiSeq 2000*.

A análise bioinformática dos dados brutos do WES foi feita por meio de um pipeline comum de bioinformática interpretados por profissionais do ICGNMD.

4.3.2.3 Análise e interpretação dos resultados

No painel multigênico, os dados foram disponibilizados em formato .xlsx com todas as variantes detectadas e já anotadas. No WES, os dados foram disponibilizados em formato .csv, com todas as variantes detectadas e interpretadas localmente, porém sem anotação. Dessa forma, foram realizados dois *pipelines* para análise de cada um dos experimentos, mostrados na figura 4.3. No *pipeline* do WES, foi utilizado *Power Query*, uma ferramenta de preparação e organização dos dados que permitiu a consulta e filtragem dos dados.

Figura 4.3: *Pipelines* utilizados para análise dos dados resultantes do painel/ WES CMT2



Fonte: Elaborada pela autora.

Na tabela 4.2 está a relação dos genes selecionados para neuropatia hereditária.

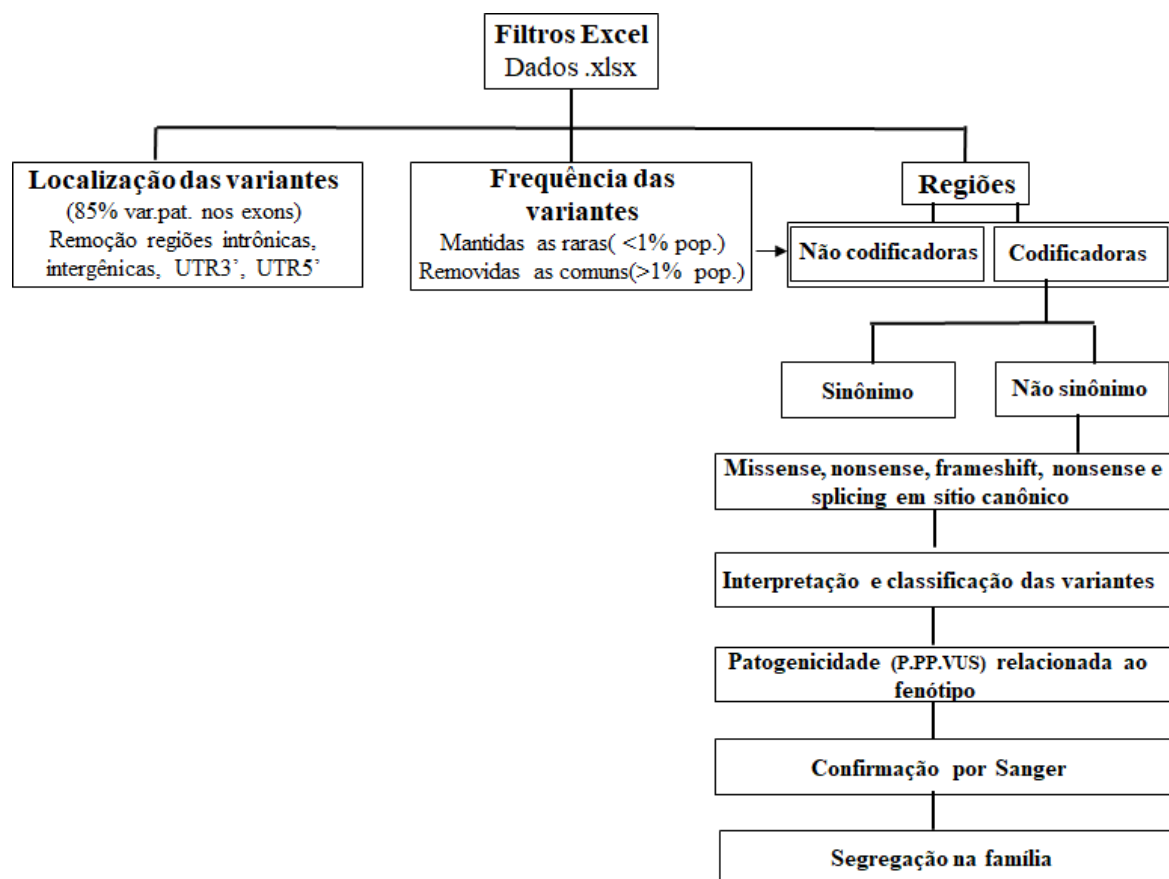
Tabela 4.2: Símbolos dos 296 genes utilizados para filtrar os arquivos WES.

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	MTTP	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
CSRP3	GDAP1	MCM3AP	PMP22	SMN1	ZFYVE27
CTDP1	GJB1	MED25	PNKP	SOS1	
CYP27A1	GJB3	MFN2	PNPLA6	SORD	
DARS2	GJC2	MMACHC	POLG	SOX10	

Fonte: Elaborada por Figueredo (2021) 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/>).

A primeira etapa de análise dos dados envolveu a utilização de filtros priorizando as variantes patogênicas/provavelmente patogênicas já conhecidas na literatura e que tenham maior possibilidade de ocasionar o fenótipo do paciente (Figura 4.4). As amostras negativadas na primeira etapa prosseguiram nos seguintes filtros: (i) alterações *nonsense* e *frameshift* envolvendo sítio de *splicing canônico* nos genes CMT, tais variantes, em genes recessivos e haploinsuficientes, têm maior probabilidade de serem deletérias, uma vez que causam perda da função da proteína codificada pelo gene alterado (BOTSTEIN, 2003; TOMASELLI, 2018;); (ii) em caso de suspeita de herança ligada ao X, todos os genes no cromossomo X foram analisados; (iii) e pesquisa por prováveis variantes patogênicas nas regiões não codificadoras (FIGUEIREDO, 2021).

Figura 4.4: Etapas utilizadas para filtragem dos dados resultantes do NGS.



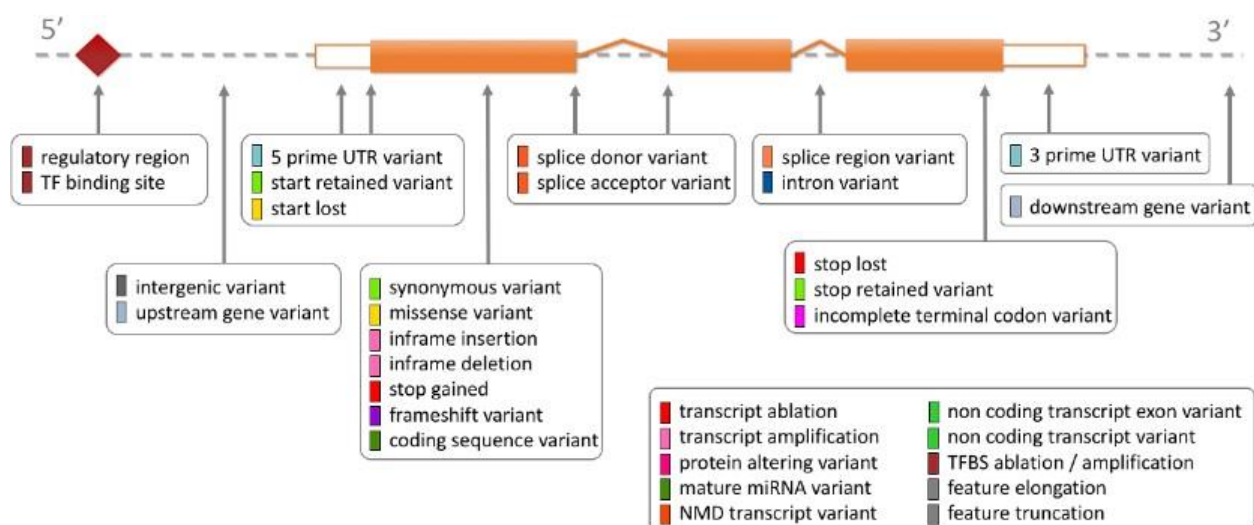
Fonte: Elaborada pela autora.

Notas: var: variante; pat: patogênica; pop. População; P: patogênica; PP: provavelmente patogênica; VUS: variante de significado incerto; (85% variantes patogênicas nos exons (Majewski et al., 2011); (MAF > 1% – *minor allele frequency*) nos bancos de dados populacionais (1000 genome; ABraOM e GnomAD).

4.3.2.4 Classificação das variantes

As variantes encontradas no presente trabalho foram classificadas como patogênicas, provavelmente patogênicas, VUS, provavelmente benignas e benignas conforme as normas e diretrizes recomendadas pelo ACMG-AMP (RICHARDS et al., 2015). Para tanto, diferentes critérios foram observados, a citar: tipo de variante (missense, nonsense, frameshift, indels, em sítio de splicing, intrônicas, sinônimas) (Figura 4.5), descrição na literatura ou embancos de dados de variantes, frequência populacional, grau de conservação do aminoácido em diferentes espécies e localização na proteína, associação com o fenótipo, fase das variantes (cis ou trans), estudos funcionais de segregação na família e ferramentas de predição de patogenicidade (FIGUEIREDO, 2021).

Figura 4.5: Diagrama utilizado para representar o efeito e a localização da variante no transcrito.



Fonte: Yates et al. (2020). Disponível em:
(http://www.ensembl.org/info/genome/variation/prediction/predicted_data.html#consequences).

Nota: Acesso entre 2020-2023.

Os websites utilizados para consulta destes critérios e para definição do impacto das variantes sobre o fenótipo dos indivíduos analisados estão listados na tabela 4.3.

Tabela 4.3: *Website* utilizados para classificação das variantes.

Categoria	Website
Bancos de dados populacionais	https://gnomad.broadinstitute.org/
	http://evs.gs.washington.edu/EVS
	http://abraom.ib.usp.br/search.php
Fenótipo e variantes genéticas	http://www.omim.org/
	https://neuromuscular.wustl.edu/naltbrain.html
	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
	http://www.ensembl.org/index.html
	https://ghr.nlm.nih.gov/
	http://www.hgmd.org
	http://hig.med.miami.edu/code/http/cmt/public_html/index.htm#
Proteína	http://www.uniprot.org/
Programas de predição	Mutationtaster: http://www.mutationtaster.org
	Polyphen2: http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2
	SIFT: http://sift.jcvi.org
	UMD predictor: http://umd-predictor.eu/
Varsome	https://varsome.com/

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: Acesso entre 2020 e 2023.

4.3.2.5 Confirmação das variantes detectadas pelo NGS

A confirmação de todas as variantes candidatas encontradas pelo NGS e o estudo de segregação da família foram realizados através do sequenciamento de Sanger.

4.3.2.5.1 Desenho dos primers e reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para o desenho dos *primers*, foi utilizado o software Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), juntamente com as ferramentas BLAST (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e Primer-blast (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), que integram uma forma de alinhamento global e verificam a especificidade dos *primers* pré-existent, identificando possíveis alvos de amplificação (ALTSCHUL et al., 1990; UNTERGASSER et al., 2007; YE et al., 2012). PCR *in-silico* (UCSC) (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>) foi realizada a fim de se avaliar a especificidade dos *primers* desenhados automaticamente pelas duas ferramentas em relação à região alvo (KENT et al., 2002). Para a verificação da

presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em cada *primer*, foi aplicado o programa SNPCheck V3 (<https://genetools.org/SNPCheck/snpcheck.htm>). Para amplificação das regiões alvos detectadas por NGS, foi utilizada a reação de PCR com o protocolo *touchdown*. Utilizou-se o kit da enzima Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) e as tabelas 4.4 e 4.5 descrevem, respectivamente, o protocolo e o perfil térmico da reação.

Tabela 4.4: Protocolo *touchdown* da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Reagentes	Para cada amostra (ul)
H2O free Dnase	5,5
10X High Fidelity Buffer	2,5
dNTPs (200 mM/μL)	1,0
MgCl2 (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.

Notas: Primer F: *Forward*; Primer R: *Reverse*.

Tabela 4.5: Perfil térmico da PCR *touchdown*

Temperatura	Tempo	Ciclo térmico
94°C	3 minutos	1x
94°C	10 segundos	2X
65°C	40 segundos	
72°C	40 segundos	2X
94°C	10 segundos	
63°C	40 segundos	2X
72°C	40 segundos	
94°C	10 segundos	2X
61°C	40 segundos	
72°C	40 segundos	2X
94°C	10 segundos	
59°C	40 segundos	2X
72°C	40 segundos	
94°C	10 segundos	2X
57°C	40 segundos	
72°C	40 segundos	32X
94°C	10 segundos	
55°C	40 segundos	1x
72°C	40 segundos	
72°C	3 minutos	1x
4°C	8	

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.2.5.2 Sequenciamento

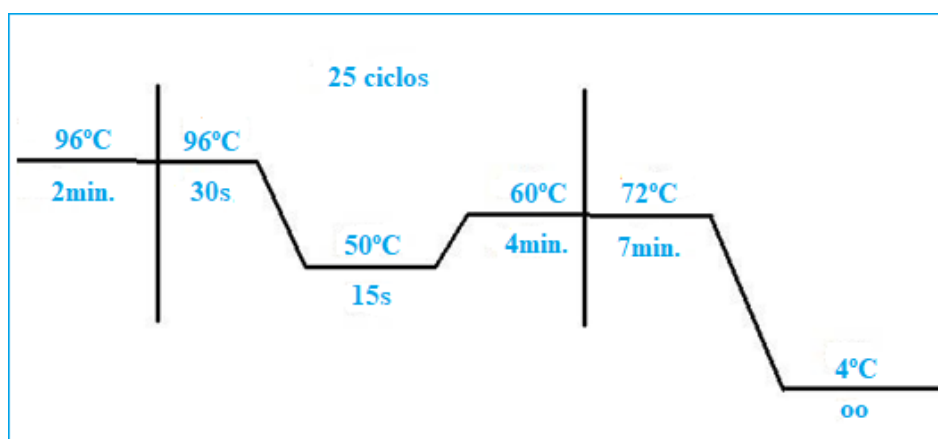
No sequenciamento, as amostras foram preparadas com kit de reação BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) na placa MicroAmp® Optical 96-Well. A reação foi montada à temperatura de aproximadamente 4°C (os reagentes foram mantidos em gelo). O protocolo da reação de sequenciamento e o perfil térmico utilizados são especificados na tabela 4.6 e na figura 4.6.

Tabela 4.6: Protocolo reação de sequenciamento.

Reagentes	Volume
H2O Milli-Q	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.

Figura 4.6: Perfil térmico.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.2.5.3 Precipitação, purificação e análise da reação de sequenciamento

Para precipitação e purificação da reação de sequenciamento foi utilizado o seguinte protocolo:

- i. Transferir o volume das reações para a placa de sequenciamento;
- ii. Adicionar 1,5µl de EDTA 125mM em cada well (poço);
- iii. Adicionar 1µ de ACETATO DE SÓDIO 3M em cada poço;
- iv. Homogeneizar as amostras por 1 minuto a 1.400rpm no aparelho Thermomixer comfront (Eppendorf®);
- v. Adicionar 30µl de ETANOL 100% gelado em cada poço;
- vi. Homogeneizar as amostras por 1 minuto a 1.400rpm no aparelho thermomixer;
- vii. Incubar à temperatura ambiente por 15 minutos;
- viii. Centrifugar na centrífuga Eppendorf® Centrifuge 5424 a 3.000 rpm por 30 min. Importante: Prosseguir para o próximo passo imediatamente. Se isto não for possível assim que voltar ao experimento, centrifugar a placa por mais 2 minutos, imediatamente antes de iniciar o próximo passo;
- ix. Inverter a placa e centrifugá-la a 190g (40 segundos);
- x. Adicionar 35µl de etanol gelado 70%e e centrifugar a placa a 2500 rpm por 15 minutos;
- xi. Inverter a placa e centrifugá-la a 190g (40 segundos) ;
- xii. Levar a placa ao termociclador (Veriti™ 96-Well Thermal Cycler) (60°C por 10 minutos) coberta com papel alumínio, para completa evaporação do etanol;
- xiii. Aguardar a completa secagem das amostras, ressuspendê-las em 10 uL de formamida (Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems®).) e aquecê-las a 95°C por 5 minutos. Depois colocá-las no gelo por 2 minutos e, em seguida, iniciar a corrida.

A análise do eletroferograma foi realizada através dos programas Sequencing Analysis Software 6 (Applied Biosystems) e do SeqMan (Lasergene – DNASTar ®). A nomenclatura de todas as variantes foi

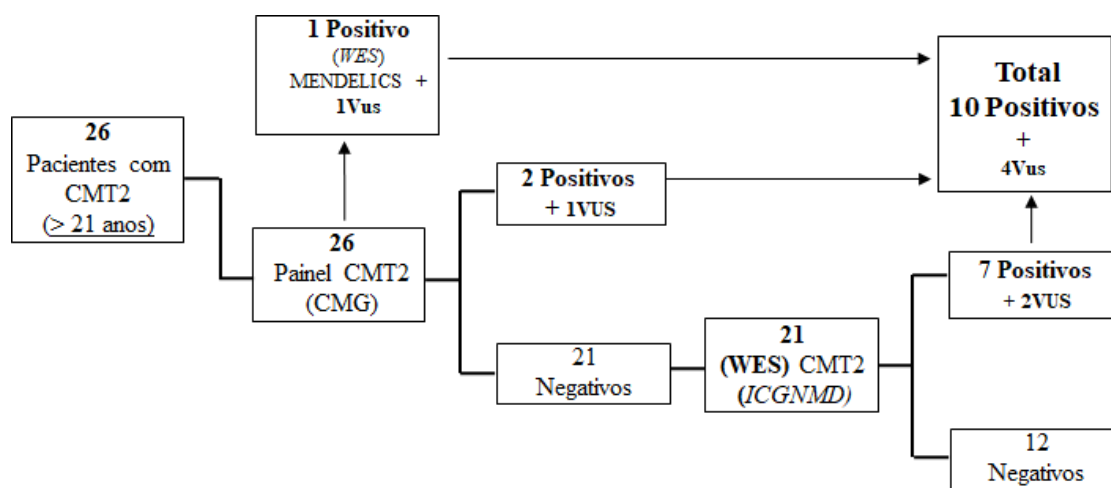
realizada conforme as diretrizes da *Human Genome Variation Society* (HGVS) (DEN DUNNEN et al., 2016), disponível no *website* <http://varnomen.hgvs.org/> e confirmadas com a ferramenta Mutalyzer (WILDEMAN et al., 2008), disponível em <https://mutalyzer.nl/>. Para análise da sequência da variante foram utilizados os seguintes sites: <https://genome.ucsc.edu/>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>; <http://www.ensembl.org/index.html>.

5.RESULTADOS

5.1 PACIENTES

Das 26 amostras analisadas, foram encontradas variantes de significado patogênico, provavelmente patogênico ou de variantes de significado incerto (VUS) em 14. O diagnóstico molecular definitivo (variantes patogênicas e/ou provavelmente patogênicas) foi obtido em 10 casos. Quatro outros pacientes apresentaram resultados inconclusivos (VUS) e 12 amostras foram negativas. A figura 5.1 ilustra o fluxograma diagnóstico em três diferentes centros (CMG, ICGNMD e MENDELICS-SP).

Figura 5.1 Fluxograma da distribuição das amostras.



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: VUS: variante de significado incerto. Sua abordagem será detalhada no decorrer do presente trabalho.

A Tabela 5.1 resume a distribuição dos pacientes com variantes encontradas (N =14), conforme as características e o local em que o sequenciamento das amostras foi realizado.

Na coorte estudada, a média de idade dos pacientes no momento da primeira consulta foi de 42 anos, variando de 25 anos (CMT_P3 e CMT_P8) a 63 anos (CMT_P1). Cinquenta por cento dos pacientes era do sexo masculino (n = 7) e sete probandos (50%) apresentavam forma moderada de CMT2 (CMTNS 11-20) e nenhum apresentou a forma grave da doença (CMTNS 21 - 30). Devido à pandemia, alguns pacientes perderam o seguimento e não conseguimos reconvocá-los e, conseqüentemente, não foram totalmente

caracterizados. Assim que possível, uma caracterização clínica mais detalhada e tentativa de correlacionar o genótipo como fenótipo será realizada. O resumo das informações dos resultados moleculares e tecnologia NGS utilizada para o diagnóstico dos pacientes, estão disponíveis na Tabela 5.2. Os resultados da análise de segregação (quando necessário e possível de ser realizada) e confirmação das variantes por Sanger estão apresentados no apêndice B.

Tabela 5.1 Distribuição dos pacientes e as características clínicas.

Fenótipo_ID	Gen.	Lab.	I.I	I.P.C	Sintomas de apresentação	Outros	CMTNSv2
CMT_P1	M	WES ICGNMD	10	63	Dificuldade para correr	Dor	15
CMT_P2	F	Painel CMG	<10	32	Dificuldade no equilíbrio	Nenhum	13
CMT_P3	F	Painel CMG	10	25	Caimbras	Dores frequentes	9
CMT_P4	M	WES ICGNMD	17	59	Entorses frequentes	Nenhum	12
CMT_P8	F	WES ICGNMD	0	25	Atraso no desenvolvimento motor	Babinsky bilateral e espasticidade em membros inferiores	16
CMT_P9	M	WES ICGNMD	15	34	Dificuldade de marcha	Neuropatia não comprimento dependente	15
CMT_P12	F	WES ICGNMD	<10	49	Dificuldade de marcha	Neutropenia Neutrofilos 1000 (1.7 - 2.8k)	10
CMT_P18	F	WES ICGNMD	4	31	Dificuldade de marcha	Distúrbio ventilatório restritivo grave, parou de andar aos 29 idade, disfagia	16
CMT_P19	M	WES ICGNMD	10	27	Dificuldade de marcha	ND	7
CMT_P20	F	WES ICGNMD	28	34	Perda de equilíbrio	Nenhum	5
CMT_P24	M	WES ICGNMD	Incerto	51	Dificuldade para andar	ND	10
CMT_P29	M	WES MENDELICS	50	53	Dificuldade para deambular	Parestesia em mãos há mais de 3 anos	5
CMT_P31	M	Painel CMG	20	56	Fraqueza e parestesias em mãos e pés	Nenhum	13
CMT_P34	F	WES MENDELICS	44	52	Dificuldade para andar	Ganglionopatia sensitiva	7

Fonte: Elaborada pela autora

Notas: Gen: gênero, Lab: laboratório, I.I=idade de início,I.P.C:idade da primeira consulta, ND: não determinado. CMTNSv2 leve (0-10),moderado (11-20) e grave (>21).

Tabela 5.2 Informações moleculares em NGS dos pacientes

ID	Fenótipo	PH	Cons.	Gene	RsID	Transcrito	Zig.	Chr	HGVSc.	HGVSp.	Classif. ACMG	LIT.	
CMT_P1	CMT2	XL	N	PDK3	rs867468579	ENST00000379162	Hem.	X	c.485 G>A	p.Arg162His	PP	PM2, PP1_forte	N
CMT_P2	CMT2	ND	N	IGHMBP2	rs145226920	ENST00000255078	Het.	11	c.1488C>A/c.791G>A	p.Cys496*/p.Arg264His	P e PP	p.Cys496*:PVS1, PM3_forte; p.Arg264His:PM2_suporte,PM3,PM5,PP3	S e N
CMT_P3	CMT2	ND	N	MARS1	ND	ENST00000262027	Het.	12	c.1705C>G	p.Leu569Val	VUS	PM2	N
CMT_P4	CMT2	E	N	HSPB1	rs28939680	ENST00000248553	Het.	7	c.404C>T	p.Ser135Phe	P	PS3, PS4_forte, PM2, PM5, PP1_muito forte, PP3	S
CMT_P8	CMT2	ND	N	SLC25A46	rs200566665	ENST00000355943	Het.	5	c.1183C>T	p.Gln395*	VUS	PVS1_moderado, PM2	N
CMT_P9	CMT2	E	N	MORC2	rs864309503	ENST00000397641	Het.	22	c.568C>T	p.Arg190Trp	P	PS4, PS3,PM1, PM2, PM6, PP1_moderado, PP3	S
CMT_P12	CMT2	E	N	DNM2	rs1599620408	ENST00000389253	Het.	19	c.1684_1686del	p.Lys562del	P	PS4_moderado, PM2, PM4,PM6, PP1_forte	S
CMT_P18	CMT2	E	N	MFN2	rs119103265	ENST00000235329	Het.	1	c.1090C>T	p.Arg364Trp	P	PS3, PS4, PM2, PM5, PP3	S
CMT_P19	CMT2	E	N	TRPV4	rs267607146	ENST00000261740	Het.	12	c.805C>T	p.Arg269Cys	P	PS3, PS4, PM2_suporte, PM5, PM6, PP1	S
CMT_P20	CMT2	E	N	PDHA1	ND	ENST00000422285	Hom.	X	c.74_75insG	p.Ala26SerfsTer4	PP	p.Ala26Serfs*4: PVS1_forte; PM2	N
CMT_P24	CMT2	ND	N	MPZ	ND	ENST00000533357	Het.	1	c.136G>C	p.Val46Leu	VUS	PM2	N
CMT_P29	CMT2	ND	S	MME	rs1402177037	ENST00000360490	Hom.	3	c.838G>T	p.Glu280*	P	PVS1, PM2_suporte, PM3_suporte	N
CMT_P31	CMT2	AD	S	AARS	rs267606621	ENST00000261772	Het.	16	c.986G>A	p.Arg329His	P	PS4,PS3, PM1,PM2, PP1_forte, PP3	S
CMT_P34	CMT2	ND	N	RAB7	ND	ENST00000265062	Het.	3	c.548A>G	p.Tyr283Cys	VUS	PM2	N

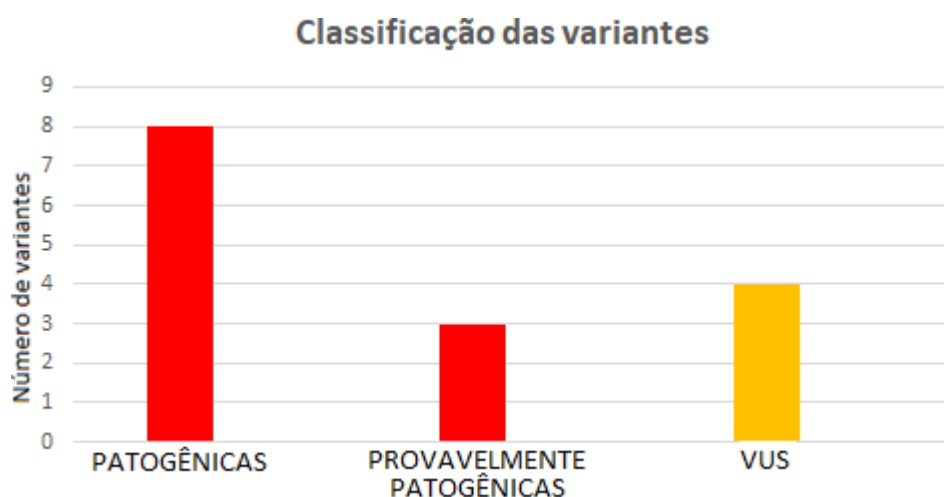
Fonte: Elaborada pela autora

Notas: ID:identificação; PH:padrão de herança; AD: autossômico dominante; ND: não determinado; E: esporádico; Cons:consanguinidade; RsID (Reference SNP ID): é uma identificação usada para se referir a um SNP específico; Zig:zigosidade; 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.); Classif: classificação; P: Patogênica / PP: provavelmente patogênica / VUS: variante de significado incerto/. ACMG: critérios de pontuação de variantes (Apêndice A); Lit: variantes descritas na literatura.

5.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR E CLÍNICO

Dos 26 pacientes analisados, foram encontradas oito variantes classificadas como patogênicas, três provavelmente patogênicas e quatro variantes de significado incerto (VUS), sendo que em um paciente, foram encontradas uma variante patogênica e uma provavelmente patogênica, em um total de 15 variantes diferentes em 14 genes conhecidos por causarem neuropatia (Figura 5.2). A classificação de cada variante foi realizada com base nas diretrizes do American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology (ACMG-AMP) (Richards et al., 2015) (Apêndice A).

Figura 5.2 Classificação das variantes encontradas em todos os genes do trabalho.



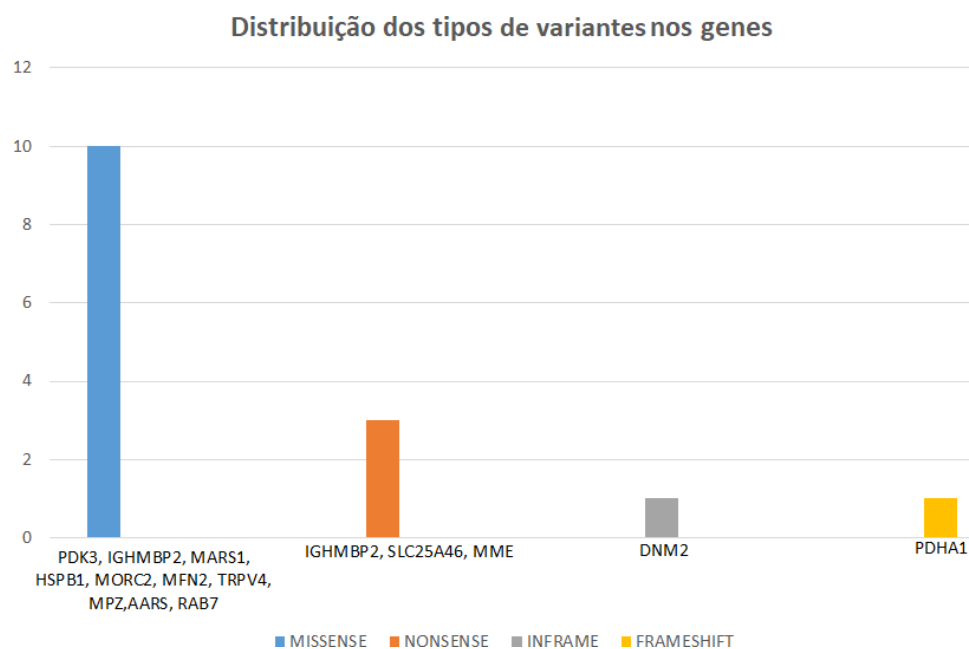
Fonte: Elaborada pela autora

A maioria das variantes encontradas são SNVs do tipo *missense* (66,7%; 10/15), enquanto 26,7% são variantes nulas (1 *frameshift* e 3 *stop codon*) e uma variante é uma pequena deleção *inframe*. Das 15 variantes, 8 são novas, ainda não descritas na literatura (1 patogênica, 3 provavelmente patogênicas e 4 VUS).

Nenhuma variação do número de cópias (CNV) potencialmente patogênica foi identificada. Todas as variantes estão descritas na tabela 5.2.

Na figura 5.3, estão representadas todas as quantidades dos tipos de variantes candidatas encontradas neste estudo.

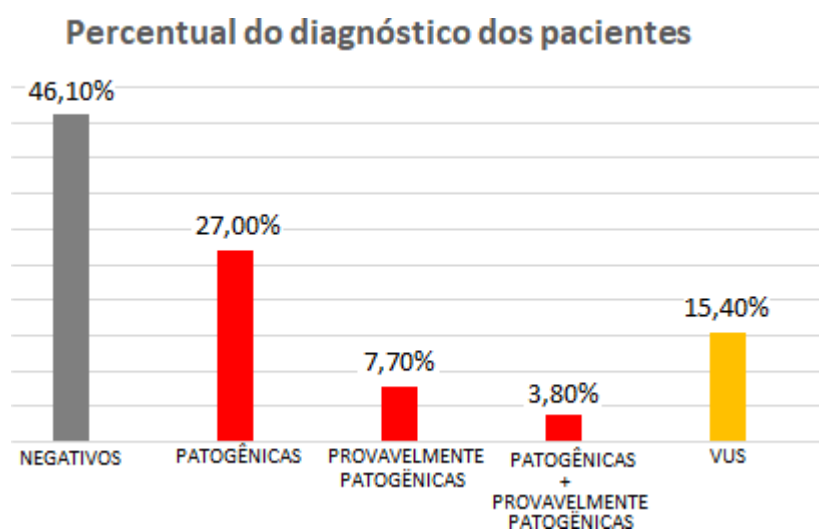
Figura 5.3 Número dos tipos de variantes encontradas em todos os genes do trabalho.



Fonte: Elaborada pela autora

Em nosso estudo, consideramos apenas as variantes patogênicas e provavelmente patogênicas, a figura 5.4 demonstra esses dados.

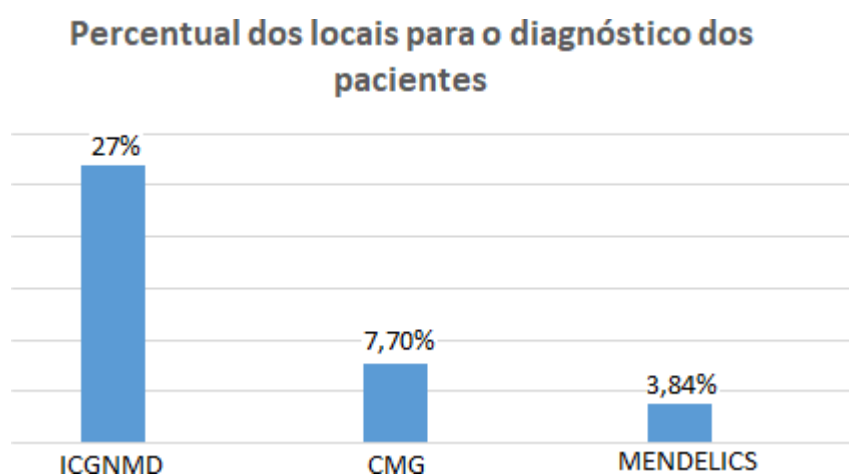
Figura 5.4 Percentual das variantes encontradas nos pacientes.



Fonte: Elaborada pela autora

Da totalidade de pacientes incluídos, apenas dois (7,7%) tiveram diagnóstico molecular definitivo por painéis moleculares, com variantes patogênica e provavelmente patogênicas nos genes *AARS1* e *IGHMBP2*. Dentre os 21 pacientes com resultados negativos no painel, oito (31%) probandos receberam um diagnóstico molecular utilizando *WES*, com variantes patogênicas e provavelmente patogênicas nos genes *PDK3*, *HSBP1*, *MORC2*, *DNM2*, *MFN2*, *TRPV4*, *PDHA1*, *MME*. A figura 5.5 demonstra o percentual de diagnóstico molecular definitivo entre painéis moleculares e *WES*.

Figura 5.5 Percentual dos locais para o diagnóstico molecular.

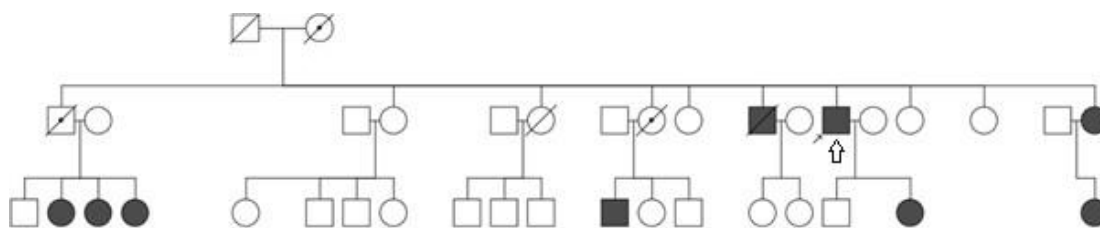


Fonte: Elaborada pela autora

5.2.1 Paciente CMT_P1

O paciente é do sexo masculino, com quadro de perda de força muscular desde a primeira década de vida. Apresenta longo histórico de dor neuropática, e suas mãos foram afetadas aos 50 anos. Apresentou piora nos últimos anos e necessidade de calçados com palmilha (próprias do calçado) devido aos pés cavos. Seus pais não eram consanguíneos e, na família, há três afetados do sexo masculino e seis do sexo feminino (Figura 5.6).

Figura 5.6: Heredograma da família CMT_P1.



Fonte: Adaptada de Maciel et al. (2023).

Nota: O probando está indicado na seta.

Ao exame clínico apresenta pés cavos, fraqueza distal simétrica grave nos membros inferiores e leve nos superiores. O CMTNS foi moderado. O exame eletroneuromiográfico evidencia neuropatia sensitivo motora axonal comprimento dependente de grave intensidade e redução da velocidade de condução motora do nervo ulnar esquerdo no segmento do cotovelo.

O sequenciamento por *WES* detectou uma alteração *missense* em hemizigose no éxon 4 do gene *PDK3*, onde houve uma troca do nucleotídeo G para A na posição 485 (c.485G>A), resultando na troca do aminoácido arginina para histidina na posição 162 p.(Arg162His). Por estar localizada em região altamente conservada (PhyloP100=9.968 e PhastC=1), não estar presente nos bancos de dados populacionais GenomaD e AbraOm e co-segregar em 9 integrantes na família (Apêndice B), pontuou os critérios PM2 e PP1 forte sendo classificada como provavelmente patogênica (classe 4) conforme as diretrizes da ACMG (RICHARDS et al., 2015).

5.2.2 Paciente CMT_P2

A paciente é do sexo feminino, com 32 anos e iniciou os sintomas com idade inferior à primeira década de vida quando apresentou dificuldade no equilíbrio. O CMTNS foi moderado. Ao exame eletroneuromiográfico foi detectada neuropatia sensitivo motora axonal, comprimento dependente com desnervação crônica de grave intensidade nos membros inferiores.

O painel molecular identificou, duas variantes, ambas em heterozigose e sem fase definida (*cis ou trans*) no gene *IGHMBP2*. A primeira variante é

missense com troca do nucleotídeo G para A na posição 791 (c.791G>A) do éxon 6, resultando em uma substituição do aminoácido arginina por histidina no resíduo 264 (p.Arg264His). A variante apresenta frequência de 0,002% no GenomAD (5/251468), está localizada em região altamente conservada (PhyloP100= 9.059 e PhastC=1) e a análise *in silico* a prediz, com efeito, patogênico (*Polyphen: probably-damaging, SIFT: deleterious e Mut-assessor: high*). Essa variante foi classificada como provavelmente patogênica (classe4), com os critérios PM3, PM5, PM2 suporte e PP3 da ACMG (RICHARDS et al., 2015).

A segunda variante é *nonsense*, onde houve a troca do nucleotídeo C para A na posição 1488 (c.1488C>A), gerando um códon de parada prematuro no resíduo 496 (p.C496*) do éxon10. A variante prediz degradação de mRNA mediada por alteração sem sentido (NMD- *Nonsense-mediated decay*, em inglês) em gene cuja perda de função é mecanismo de patogênese bem estabelecida. A alteração apresenta frequência de 0,016% no banco de dados GenomAD (42/264858) e foi classificada como patogênica (classe 5) através dos critérios PVS1 e PM3 forte das diretrizes da ACMG (RICHARDS et al., 2015).

Embora não tenha sido possível fazer um estudo de segregação para determinar a fase das mutações, a presença de duas variantes é compatível com herança autossômica recessiva, portanto, com a AR-CMT2S.

5.2.3 Paciente CMT_P4

O paciente é do sexo masculino, com 59 anos e sintoma inicial aos 17 anos com entorses frequentes. Os pais não são consanguíneos e avaliação clínica tinha pés caídos, câimbras nas panturrilhas e fraqueza proximal nos membros inferiores e superiores. O CMTSN foi moderado.

Realizado o sequenciamento por WES, identificamos a variante *missense* p.(Ser135Phe) onde houve a troca do nucleotídeo C para T na posição 404 (c.404C>T) em heterozigose no éxon2 do gene *HSPB1*. A variante está ausente dos bancos de dados populacionais GenomAD e no AbraOm, está localizada em um local conservado (PhyloP100= 5.219 e PhastC=1) e a análise *in silico* prediz essa variante como patogênica (*Polyphen: possibly-damaging, SIFT: deleterious*

e *Mut-assessor: médium*). Conforme as diretrizes da ACMG, essa variante foi classificada como patogênica (classe 5), pontuando os critérios PS3, PS4 forte, PM2, PM5, PP1 muito forte e PP3.

5.2.4 Paciente CMT_P9

O paciente é do sexo masculino, 34 anos, com sintoma inicial de dificuldade de marcha aos 15 anos. Ao exame clínico apresenta atrofia muscular nos membros inferiores e superiores e fraqueza distal nos membros inferiores. O CMTSN foi moderado e ao exame eletroneuromiográfico mostrou neuropatia sensitiva motora de caráter axonal moderada, com reduções proporcionais da velocidade de condução em alguns nervos.

Realizado o sequenciamento por *WES*, nós identificamos a variante *missense* p.(Arg190Trp) onde houve a troca do nucleotídeo C para T na posição 568 (c.568C>T) em heterozigose no éxon 10 do gene *MORC 2*. A variante está ausente dos bancos de dados populacionais GenomAD e no AbraOm, está localizada em região cujo grau de conservação foi mensurado em PhyloP100= 3.139 e PhastC=1 e pelo menos dois preditores *in silico* apontam para a patogenicidade da variante (*Polyphen: possibly-damaging, SIFT: deleterious-low confidence, Mut-assessor: médium*). De acordo com as diretrizes da ACMG, essa variante recebe a pontuação PS4, PS3, PM1, PM2, PM6, PP1 moderado e PP3, sendo classificada como patogênica (classe 5) (RICHARDS et al., 2015).

5.2.5 Paciente CMT_P12

A paciente é do sexo feminino, com 49 anos e iniciou os sintomas na primeira década de vida quando apresentou dificuldade de marcha. Apresentou neutropenia, o CMTSN foi leve e ao exame eletroneuromiográfico evidenciou polineuropatia sensitiva motora axonal.

Feito o sequenciamento por *WES*, nós identificamos a deleção *inframe* p.(Lys 562del) onde houve uma deleção na posição c.1684_1686del em heterozigose no éxon 16 do gene *DNM2*. A variante está ausente dos bancos de dados populacionais GenomAD e no AbraOm e está localizada em região

altamente conservada (PhyloP11=9.234 e PhastC=1). De acordo com as diretrizes da ACMG, essa variante recebe a pontuação PS4 moderado, PM2, PM4, PM6 e PP1 forte, sendo classificada como patogênica (classe 5) (RICHARDS et al., 2015).

5.2.6 Paciente CMT_P18

A paciente é do sexo feminino, com 31 anos e iniciou os sintomas aos 4 anos com dificuldade de marcha. Parou de andar aos 29 anos e apresentou distúrbio ventilatório restritivo grave. Ao exame clínico, foram observados *pes cavus* invertidos, atrofia muscular distal global, fraqueza nos membros inferiores, disfagia e diplopia. O CMTSN foi moderado e o exame eletroneuromiográfico evidenciou neuropatia sensitiva motora axonal simétrica de grave intensidade e sem atividade.

Feito o sequenciamento por WES, nós identificamos a variante *missense* p.(Arg364Trp), onde houve a troca do nucleotídeo C para T na posição 1090 (c.1090C>T) em heterozigose no éxon 11 do gene *MFN2*. A variante está ausente dos bancos de dados populacionais GenomAD e no AbraOm, está localizada em região conservada (PhyloP=5.117 e PhastC=1) e a análise *in silico* prediz como patogênica (*Polyphen: possibly-damaging, SIFT: deleterious e Mut-assessor: médium*). Conforme as diretrizes da ACMG, essa variante foi classificada como patogênica (classe 5), pontuando os critérios PS3, PS4, PM2, PM5, PP3 (RICHARDS et al, 2015).

5.2.7 Paciente CMT_P19

O paciente é do sexo masculino, com 27 anos e iniciou os sintomas aos 10 anos com dificuldade de marcha. Ao exame clínico foram observados dedos em garra e as queixas do paciente eram de dor nos pés e câimbras. O CMTSN foi leve, o exame eletroneuromiográfico evidenciou comprometimento parcial axonal dos nervos fibular comum direito e fibular profundo esquerdo.

Realizado o sequenciamento por *WES*, nós identificamos a variante *missense* p.(Arg269Cys), onde houve a troca de nucleotídeo C para T na posição 805 (c.805C>T) em heterozigose no éxon 5 do gene *TRPV4*. A variante apresenta frequência de 0,0031% no GenomAD (1/31406), está localizada em região cujo grau de conservação é PhyloP=1.026 e PhastC=0.535 e os preditores *in silico* são conflitantes entre si (*Polyphen: probably-damaging, SIFT:deleterious e Mut-assessor: neutral*). Conforme as diretrizes da ACMG, essa variante foi classificada como patogênica (classe 5), pontuando os critérios PS3,PS4, PM2 suporte, PM5, PM6 e PP1 (RICHARDS et al., 2015).

5.2.8 Paciente CMT_P20

A paciente é do sexo feminino, com 34 anos e iniciou os sintomas aos 28 anos com perda de equilíbrio. O CMTSN foi leve e o exame eletroneuromiográfico evidenciou polineuropatia sensitivo motora axonal crônica, distal e simétrica.

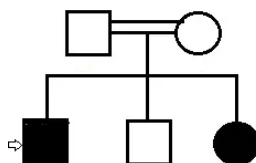
Feito o sequenciamento por *WES*, nós identificamos a variante *frameshift* (c.74_75insG, p.(Ala26Serfs*4) em homozigose no éxon 2 do gene *PDHA1*. A variante é ausente dos bancos de dados populacionais GnomAD e no AbraOM e está localizada em região conservada (PhyloP=6.691 e PhastC=1). Conforme os critérios da ACMG, essa variante foi classificada como provavelmente patogênica (classe 4), pontuando os critérios PVS1 forte e PM2 (RICHARDS et al, 2015).

5.2.9 Paciente CMT_P29

O paciente é do sexo masculino, com 53 anos e iniciou os sintomas aos 50 anos com dificuldade para deambular. Apresenta parestesia em mãos há mais de 3 anos. Os pais são consanguíneos, sem sintomas de CMT e tem uma irmã afetada (Figura 5.7). O CMTSN foi leve, o exame eletroneuromiográfico

evidenciou neuropatia sensitivo motora, com reduções intermediárias da velocidade de condução.

Figura 5.7: Heredograma da família CMT_P29.



Fonte: Elaborada pela autora.

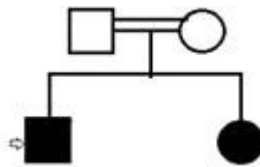
Nota: O probando está indicado com a seta.

Realizado o sequenciamento por *WES*, nós identificamos a variante nonsense p.(Glu280*), onde houve a troca do nucleotídeo G para T na posição 838 (c.838G>T) em homozigose no éxon 9 do gene *MME*. A variante apresenta frequência de 0,0003% no GnomAD (1/250806), e está localizada em região altamente conservada (PhyloP100= 8.386 e PhastC=1) e co-segregar em 2 integrantes na família (Apêndice B). Conforme as diretrizes da ACMG, essa variante foi classificada como patogênica (classe5), pontuando os critérios PVS1, PM2 suporte e PM3 suporte (RICHARDS et al., 2015).

5.2.10 Paciente CMT_P31

O paciente é do sexo masculino, com 56 anos e iniciou os sintomas aos 20 anos com fraqueza e parestesias em mãos e pés. Os pais são consaguíneos e tem uma irmã afetada (Figura 5.8) (Apêndice B). O CMTSN foi moderado e ao exame clínico foram observados piora leve de força nos membros inferiores, principalmente à direita, *pes cavus* e dedos em martelo.

Figura 5.8 Heredograma da família CMT_P31



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: O probando está indicado com a seta.

Feito o sequenciamento por *WES*, nós identificamos a variante *missense* p.(Arg329His), onde houve a troca do nucleotídeo G para A na posição 986 (c.986G>A) em heterozigose no éxon 8 do gene *AARS*. A variante está ausente dos bancos de dados populacionais GnomAD e no AbraOM, está localizada em região altamente conservada (PhyloP100=7.905 e PhastC=1), a análise *in silico* a prediz como patogênica (*Polyphen: probably-damaging, SIFT: deleterious e Mut-assessor: high*) e co-segregar em 2 integrantes na família (Apêndice B). Conforme as diretrizes da ACMG, essa variante foi classificada como patogênica (classe5), pontuando os critérios PS4, PS3, PM1, PM2, PP1 forte e PP3 (RICHARDS et al, 2015).

6.DISSCUSSÃO

Por meio da utilização do sequenciamento de nova geração (painel e exoma), foi possível o *screening* molecular de 26 casos índices adultos (≥ 21 anos) com diagnóstico clínico de neuropatia hereditária sensitivo motora axonal (HMSN2 ou CMT2). Recentemente o advento das técnicas de sequenciamento de nova geração têm possibilitado um aumento considerável no número de pacientes que recebem um diagnóstico molecular e também na descoberta de novos genes e variantes relacionados às neuropatias hereditárias (PIPIS et al., 2019). Embora existam progressos, a maioria dos pacientes com a forma axonal (CMT2) ($\sim 60\%$) permanece sem um diagnóstico molecular definitivo, sugerindo que a maioria dos genes ou variantes para esse subtipo clínico ainda precisam ser descobertas e/ou que outras metodologias de investigação, como a análise de todo o genoma ou de fragmentos longos precisem ser utilizados (CORTESE et al., 2020; PIPIS et al., 2019; ROSSOR et al., 2013).

O presente estudo iniciou-se com a análise de um painel virtual contendo somente genes relacionados a CMT axonal. Com apenas dois casos positivos (7,7%) identificados, seguindo-se a utilização do *WES*. Com essa abordagem, a identificação de variantes patogênicas/provavelmente patogênicas foi possível em mais oito pacientes, alcançando um rendimento diagnóstico de (38,5%; 10/26). Essa porcentagem é maior que a taxa reportada em outro estudo que avaliou o uso de *WES* na prática clínica (30%), entre pacientes com <40 anos e com quadro clínico de neuropatia (KLEIN et al., 2016). É possível que nos casos em que o *WES* não foi capaz de identificar a variante, a variação no material genético esteja localizada em uma região não codificadora como observado em cerca de 11% dos casos de CMTX1 (TOMASELLI et al., 2017) ou mesmo seja secundária a variações estruturais, como nos casos de CMTX3 e dHMN (BREWER et al., 2016; DREW et al., 2016).

Os trabalhos que utilizam *WES* para diagnóstico das neuropatias hereditárias não especificam, na maiorias das vezes, o número de pacientes que receberam o diagnóstico molecular em cada subtipo específico da doença (FIGUEIREDO, 2021). Esse dado foi possível em dois estudos, um realizado na Austrália e outro no Canadá, obtendo 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).

Destacamos 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 frequentemente alterado em pacientes com CMT2 (DREW et al., 2015; HARTLEY et al., 2018).

6.1 Paciente CMT_P1

Foi encontrada a variante p.(Arg162His) em hemizigose no gene *PDK3* como sendo a causa do fenótipo CMT axonal apresentado pelo paciente índice. Por estar ausente em banco de controles populacionais, a variante recebeu pontuação PM2, conforme as diretrizes da ACMG. Adicionalmente, pontuou-se PP1 forte por co-segregar em 3 indivíduos do sexo masculino e 6 do sexo feminino nesta família (Apêndice B). Como o esperado em uma doença com herança ligada ao X, todos os 3 homens da família portadores da variante apresentam neuropatia sensitivo motora e as mulheres da mesma família apresentam um fenótipo mais brando da doença.

O gene *PDK3* (HGNC:8811; OMIM: 300906) foi identificado como um gene causador da CMT em 2013 em uma grande família de duas gerações na Austrália (KENNERSON et al., 2013). Posteriormente, a variante (p.Arg158His) foi encontrada em dois pacientes do sexo masculino de uma família coreana não relacionada (KENNERSON et al., 2016). Adicionalmente, em resíduo próximo, uma família alemã foi identificada a variante p.(His168Asn) (DOHRN et al., 2017).

O gene *PDK3*, localizado no cromossomo X, é responsável pela codificação da enzima piruvato desidrogenase quinase 3. Essa enzima desempenha um papel crucial na inativação reversível do complexo mitocondrial piruvato desidrogenase (DOHRN et al., 2017; PATEL & KOROTCHKINA, 2001). O referido complexo é fundamental para a regulação mitocondrial, enquanto as necessidades energéticas dos neurônios motores dependem dos mecanismos de transporte axonal presente em seus longos compartimentos axonais. Essa dependência sugere que níveis de energia desempenham um papel importante para a manutenção axonal (SILES et al., 2016).

O estudo de SILES et al., 2020, mostrou que variantes no gene *PDK3* causam alterações nas características morfológicas e na distribuição das mitocôndrias nos neurônios motores do paciente. Esse experimento sugere que a fragmentação da mitocôndria pode ser uma consequência subjacente da variante p.(Arg.158His) no gene *PDK3*. Funcionalmente, essas observações se correlacionam com a disfunção mitocondrial nos neurônios motores do paciente, conforme demonstrado pela capacidade reduzida das células mutantes em sustentar a respiração mitocondrial, sugerindo assim que os déficits de energia podem ser uma causa primária de patologia em CMTX6. Consequentemente, sugere-se que o suprimento ineficiente de ATP no terminal nervoso leva a déficits sinápticos, podendo ser a causa subjacente da degeneração axonal em CMTX6 (SILES et al., 2020). Assim, a identificação de variantes no gene *PDK3* como causa subjacente do CMTX6 destaca a importância desse gene na manutenção do sistema nervoso periférico.

6.2 Paciente CMT_P2

O gene *IGHMBP2* (HGNC:5542; OMIM:600502) está funcionalmente ligado à maquinaria translacional e variantes provavelmente patogênicas ou patogênicas em seu domínio helicase interferem nessa função em pacientes com neuropatia hereditária motora distal do tipo 6 (SMAD1) (GUENTHER et al.,2009). Localizado no cromossomo 11, variantes nesse gene são responsáveis pelos fenótipos relacionados a CMT axonal tipo 2S (AR; OMIM:616155), neuropatia hereditária motora distal do tipo 6 ou SMAD1 (AR; OMIM:604320) e também a uma forma de amiotrofia espinhal de início tardio, de leve intensidade, mas com hipoventilação no sono.

No paciente CMT_P2, foram identificadas duas variantes (*missense* e *nonsense*) no gene *IGHMBP2*, ambas em heterozigose sem fase definida (*cis* ou *trans*). Conforme as diretrizes da ACMG, a variante p.(Cys496*) pontua PVS1 por ser *nonsense*, em região onde é predito ocorrer NMD e em gene cuja perda de função é mecanismo estabelecido de doença (COTTENIE et al.,2014, GROHMANN et al.,2003; SCHOTTMANN et al.,2015). Ademais, a variante recebe PM3 forte porque já foi relatada em pelo menos seis indivíduos na literatura, estando em homozigose ou em heterozigose com outras variantes

patogênicas, ou provavelmente patogênicas (CORTESE et al., 2020; GROHMANN et al., 2003; FLAGSHIP et al., 2020; MILLAN et al., 2016;). O estudo de Cottenie et al., (2014) demonstrou que fibroblastos e células linfoblastóides de pacientes apresentavam níveis de proteína IGHMBP2 inferiores aos controles, mas superiores aos observados em pacientes com SMAD1, sugerindo que o fenótipo mais leve em CMT2S pode estar relacionado aos níveis residuais de proteína (COTTENIE et al., 2014).

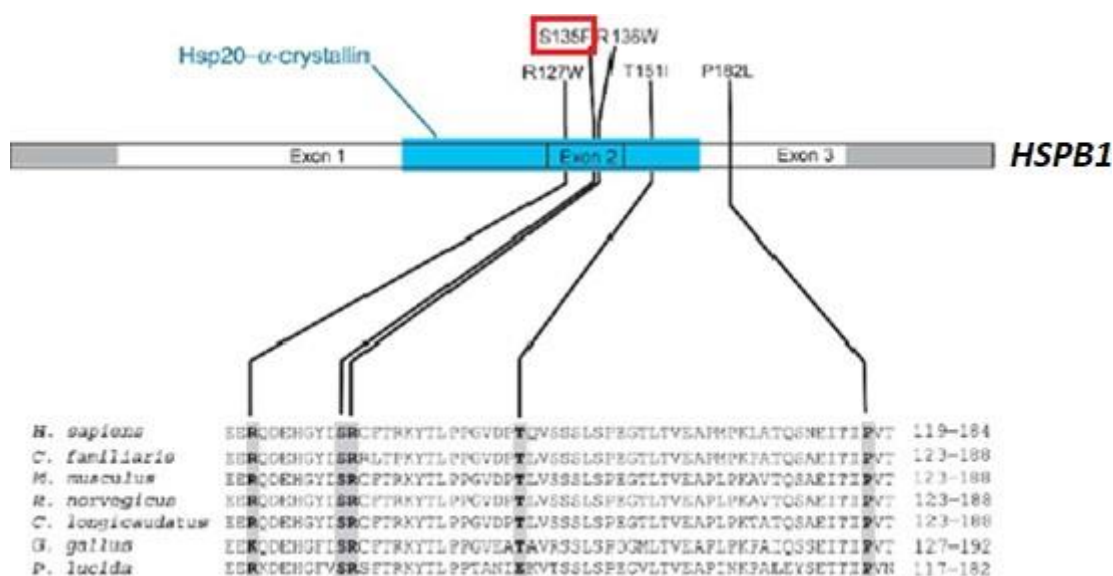
A variante *missense* p.(Arg264His) provavelmente patogênica, apresenta aminoácido altamente conservado e está localizada em um *loop* funcionalmente relevante na subunidade 1a do domínio helicase do gene *IGHMBP2* (DOHRN et al., 2017). A variante recebeu a pontuação PM2 suporte por ser encontrada em frequência extremamente baixa em banco de controles populacionais. Ademais, pontuou-se PM3 porque a mesma variante foi relatada no estudo de Dohrn et al., (2017) em heterozigose com outra alteração patogênica. Foi também atribuído PM5 porque o mesmo códon 264 já havia sido descrito na variante patogênica p. (Arg264Leu) relatada por Antoniadi et al., (2015) e a análise *in silico* a prediz, com efeito patogênico (PP3).

6.3 Paciente CMT_P4

Foi identificada a variante p.(Ser135Phe) no gene *HSPB1* como sendo a causa do fenótipo CMT axonal apresentado pelo paciente índice.

O gene *HSPB1* (HGNC: 5246; OMIM: 602195) está localizado no cromossomo 7 e variantes nesse gene são responsáveis pelos fenótipos relacionados a CMT axonal tipo 2F (AD; OMIM: 606595) e neuropatia hereditária motora distal tipo 2B (AD; OMIM: 608634). Ele codifica a proteína chaperona de choque térmico beta 1 (*HSPB1*) que é expressa de forma ubíqua e é importante na proteção das células contra lesões celulares (KATZ et al., 2020). O estudo de Evgrafov et al., (2004) demonstrou que a variante p.(Ser135Phe) ocorre no domínio Hsp20- α -cristalina, que é altamente conservado entre as quinze pequenas proteínas de choque térmico humano, como mostra na (Figura 6.1) Nesse mesmo estudo, a variante reduziu a viabilidade das células neuronais *in vitro*, sugerindo que ela é responsável pela degeneração axonal prematura, a causa direta tanto do CMT2 quanto do HMN.

Figura 6.1: Grau de conservação da proteína Ser135Phe.



Fonte: Adaptada de Evgrafov et al., 2004

A alteração p.(Ser135Phe) heterozigótica está previamente associada a apresentações clínicas graves (ABATI et al., 2021), mas no estudo de Houlden et al., 2008, todos os probandos que tiveram alterações no gene *HSPB1* apresentaram uma evolução lentamente progressiva da CMT2. Tinham fraqueza e a atrofia muscular predominante nos músculos distais dos membros inferiores. Ao longo de vários anos a fraqueza e a atrofia muscular progrediram para os membros superiores juntamente com danos proximais nos membros inferiores. Condizente com esses dados, o nosso paciente CMT_P4 apresentou um fenótipo de CMT2 moderado de início aos 17 anos com entorses frequentes e uma evolução lentamente progressiva com apresentação clínica de fraqueza proximal nos membros inferiores e superiores.

Conforme as diretrizes da ACMG, a presente variante pontua o critério PS3 devido a pelo menos seis estudos funcionais *in vitro* e *in vivo* (D'YDEWALLE et al., 2011; HOLMGREN et al., 2013; KALMAR et al., 2017; KANG et al., 2019; LAGUNA et al., 2017; SOUZA et al., 2010; SOUZA et al., 2011). Ademais, é atribuído PS4 forte, uma vez que a variante p.(Ser135Phe) é a causa mais frequente de neuropatia relacionada ao *HSPB1*, com pelo menos 40 pacientes relatados (ABATI et al., 2021; EVGRAFOV, et al., 2014;

HOULDEN, et al., 2008). Também recebe o critério PP1 muito forte, pois foi observada segregando com a doença em 49 indivíduos da mesma família no estudo de Houlden et al. (2008). Outras variantes que interrompem o mesmo resíduo 135 foram consideradas patogênicas (PM5) (YLIKALLIO, et al., 2014). Adicionalmente, a variante está ausente dos bancos de dados populacionais (PM2) e a análise *in silico* prediz patogenicidade (PP3).

6.4 Paciente CMT_P9

O gene *MORC 2* (HGNC: 23573; OMIM: 616661) está localizado no cromossomo 22 e variantes nesse gene são responsáveis pelos fenótipos relacionados a CMT axonal tipo 2Z (AD; OMIM: 616688) e ao atraso do desenvolvimento com neuropatia axonal (DIGFAN; OMIM: 619090). No estudo de Sevilla et al. (2016), o gene *Morc2* é expresso tanto nos axônios quanto nas células de Schwann do nervo periférico de camundongos. Ele codifica a proteína *zinc finger* tipo 2, que é um modificador da cromatina envolvido na regulação do reparo do DNA, bem como na transcrição do gene (ALBULYM et al., 2016). Uma nova função citoplasmática do *MORC2* foi descrita, na qual regula a atividade da enzima ATP-citrato liase (ACLY). A ACLY catalisa a formação de acetil-coenzima A (CoA) e oxaloacetato a partir do citrato e CoA derivados da mitocôndria. Acetil-CoA é um substrato importante para muitas reações biológicas, principalmente a produção do neurotransmissor acetilcolina (ALBULYM et al., 2016).

A variante p.(Arg190Trp) identificada no presente paciente possui uma isoforma codificada pelo transcrito NM 001303256, reportada como c.754C>T, p.(Arg252Trp) e encontrada no éxon 9 do gene *MORC2* (MIRESSI et al., 2020). A variante p.(Arg190Trp) possui a isoforma de proteína curta (NP 055756) e a variante p.(Arg252Trp) possui a isoforma de proteína longa (NP 001290185, 1032 aa) (SANCHO et al., 2019). Trata-se de variante conhecidamente patogênica e já foi descrita em pelo menos cinco famílias não correlatas, recebendo a pontuação PS4 dos critérios da ACMG (ALBULYM et al., 2016; ANDO et al., 2017; BANSAGI et al., 2017; HYUN et al., 2016; LASSUTHOVÁ et al., 2016; SEVILLA et al., 2016). Em pelo menos dois estudos, a variante foi encontrada *de novo*, com paternidade confirmada (ALBULYM et al., 2016) e não

confirmada (LASSUTHOVÁ et al., 2016) (PM6). Também foi observada segregando na família no estudo de Sevilla et al. (2016), com cinco familiares afetados e genotipados (PP1 moderado). No estudo de Miressi et al., (2020), uma paciente de 58 anos apresentou neuropatia assimétrica proximal e distal atípica, os quais os sintomas iniciais apresentaram-se aos 2 anos com distúrbios de marcha. A eletroneuromiografia revelou neuropatia sensitiva motora axonal assimétrica.

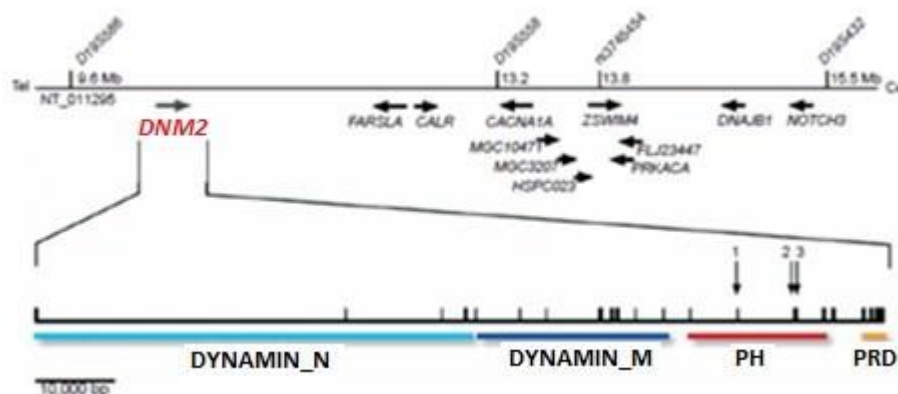
Por estar localizada em um *hot spot* mutacional, a variante também pontua PM1. O nucleotídeo citosina (c.754C) está localizado em uma ilha CpG e já é sabido que ilhas CpG são *hot spot* para alterações devido à instabilidade do 5-metilcitosina (forma metilada de citosina) no DNA (SANCHO et al., 2019). Adicionalmente, a presente variante também pontua PS3, pois foi estudada em vários ensaios *in vitro* e *in vivo*, demonstrando um efeito prejudicial de ganho de função (DOUSE et al., 2018; SANCHO et al., 2019; TCHASOVNIKAROVA et al., 2017). Por estar ausente dos bancos de dados populacionais e análise *in silico* predizer patogenicidade, a variante também pontua, respectivamente, os critérios PM2 e PP3.

6.5 Paciente CMT_P12

O gene *DNM2* (HGNC: 2974; OMIM: 602378) está localizado no cromossomo 19 e variantes nesse gene são responsáveis pelos fenótipos relacionados à miopatia centronuclear do tipo 1 (AD; OMIM: 160150), CMT axonal do tipo 2M (AD; OMIM: 606482), CMT intermediário do tipo B (AD; OMIM: 606482) e síndrome de contratura congênita letal do tipo 5 (AR; OMIM: 615368). O *DNM2* é expresso no sistema nervoso periférico e central e é composto por diferentes domínios, ilustrados na figura 6.2: GTPase N-terminal, intermediário, de homologia à pleckstrina que medeia a ligação à membrana e região C-terminal rica em prolina que interage com numerosas outras proteínas (CLAEYS et al., 2009). Uma vez que o *DNM2* é um componente do centrosomo, variantes patogênicas/provavelmente patogênicas em *DNM2* podem levar a uma desestabilização da rede de microtúbulos induzindo alterações no transporte axonal e no tráfego intracelular de proteínas, o que tem sido descrito como um

mecanismo fisiopatológico em diferentes subtipos da CMT (CLAEYS et al., 2009).

Figura 6.2: A estrutura do gene *DNM2* mostrando os quatro domínios principais: dynamin_N, dinamin_M, pleckstrina (PH) e PRD.



Fonte: Adaptada de Zuchner et al., 2005.

A variante de deleção *inframe* p(Lys 562del) encontrada na paciente CMT_P12 é conhecidamente patogênica e já foi descrita em pelo menos três famílias não correlatadas (PS4 moderado) (HARRIS et al., 2017; FELICE; WHINTAKER; KHORASANIZADHEH 2021; ZUCHENER et al., 2005,). Essa variante foi descrita anteriormente usando a nomenclatura alternativa c.1672_1674del, p.(Lys558del) (FELICE; WHINTAKER; KHORASANIZADHEH 2021). No estudo de Zuchner et al. (2005), foi observado que as duas famílias que apresentaram a variante no códon Lys562 tiveram baixa contagem de linfócitos, eritrócitos e plaquetas, sugerindo que esse resíduo tenha alguma função na maturação ou sobrevivência das células sanguíneas periféricas. O estudo de Claves et al. (2009) sugere que a neutropenia não é uma característica geral da CMTB intermediária, mas pode estar associada a variantes específicas, como pacientes onde são identificadas alterações no resíduo 562. Em nosso estudo, a paciente CMT_P12 apresentou também a neutropenia, além dos sintomas relacionados a CMT axonal.

Ademais, a presente variante foi observada segregando em sete indivíduos afetados de uma grande família belga com CMT e neutropenia (PP1forte) (CLAYES et al., 2009) e também foi identificada *de novo* (PM6) em

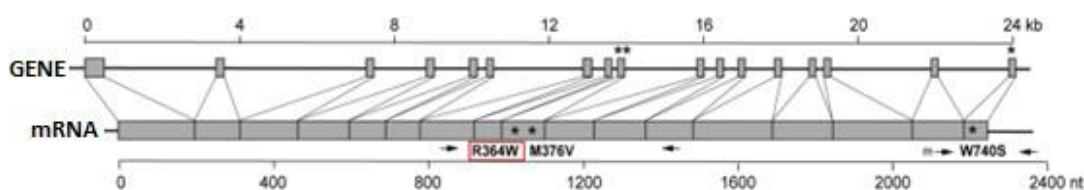
um paciente com fraqueza muscular de início na infância e creatino-quinase elevada (HARRIS et al., 2017). Por estar ausente dos bancos de dados populacionais e por ocasionar alteração no comprimento da proteína devido à deleção de um aminoácido em uma região não repetida, a variante também pontua PM2 e PM4.

6.6 Paciente CMT_P18

O gene *MFN2* (HGNC:16877 ; OMIM: 608507) está localizado no cromossomo 1 (Figura 6.3) e codifica a proteína mitofusina 2 que regula a fusão mitocondrial e auxilia manter o contato entre as organelas (retículo endoplasmático (RE) e mitocôndria (DAS et al., 2022). As variantes no gene *MFN2* afetam a morfologia mitocondrial e desestabilizam a associação entre o RE e mitocôndria, e são associadas a doenças degenerativas, resultam em degeneração axonal e neuropatias debilitantes (DAS et al., 2022; GOWRISANKARAN et al., 2011). Elas são responsáveis pelos fenótipos relacionados a CMT axonal do tipo 2A2A (AD; OMIM: 609260), CMT axonal do tipo 2A2B (AR; OMIM: 617087) e neuropatia hereditária sensitiva e motora do tipo 6A (AD; OMIM: 601152). O subtipo CMT 2A apresenta grande heterogeneidade fenotípica (envolvimento tanto do sistema nervoso periférico quanto do sistema nervoso central) e genotípica (mais de 200 variantes descritas) (FIGUEIREDO, 2021). Sendo assim, é difícil fazer uma correlação entre fenótipo e genótipo porque uma mesma alteração genética pode estar relacionada a diferentes sintomas e idade de início (FIGUEIREDO, 2021). Quando o CMT2A autossômico dominante ocorre na infância, a predição é de maior gravidade da doença em comparação ao CMT2A autossômico dominante de início adulto, estando associado a taxas significativamente mais altas de uso de órteses tornozelo-pé, uso de cadeira de rodas em tempo integral e dificuldades de destreza (PIPIS et al., 2019). A paciente CMT_P18 apresentou um quadro moderado de CMT axonal quando os sintomas iniciaram-se aos 4 anos, mas que se tornou grave quando começou a apresentar distúrbio respiratório e, com 29 anos, parou de andar.

A alteração *missense* p.(Arg364Trp) foi observada múltiplas vezes em indivíduos com CMT2A e neuropatia sensitivo motora hereditária tipo VI (PS4) (CHUNG et al., 2006; DREW et al., 2015; FEELY et al., 2011; GOWRISANKARAN et al., 2011; LASSUTHOVA et al., 2016; LIN et al., 2011; SAPORTA et al., 2015; SCHON et al., 2017; SITARZ et al., 2012; ZUCHNER et al., 2006). Estudos funcionais demonstram efeito prejudicial na proteína, com redução do limiar do potencial de ação e alteração das propriedades de corrente de canal em neurônios motores (PS3) (SAPORTA et al., 2015). Esta variante está ausente dos bancos de dados populacionais (PM2) e outras variantes que interrompem o mesmo resíduo do aminoácido p.Arg364 foram consideradas patogênicas (PM5)(FEELY et al., 2011; LIN et al., 2011). Os preditores computacionais suportam um efeito deletério no gene ou no produto gênico (PP3).

Figura 6.3: Gene do gene MFN2 e a variante p.(Arg364Trp).



Fonte: Adaptada de Larrea 2019.

6.7 Paciente CMT_P19

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 tipo 2C (AD; OMIM: 606071).

A variante encontrada no presente trabalho p.(Arg269Cys) já foi descrita em pelo menos seis famílias não correlatas (PS4) (BERCIANO et al., 2011; DENG et al., 2019; EVANGELISTA et al., 2015; LAGUNA et al., 2014; LANDOURE et al., 2010; VILL et al., 2015; ZIMON et al., 2010) (Figura 6.4) Todas as variantes do gene *TRPV4* causadoras de neuropatia (exceto Val620Ile) são variantes de superfície que não afetam o dobramento de proteínas (ZIMON et al., 2010). Elas se agrupam na superfície convexa

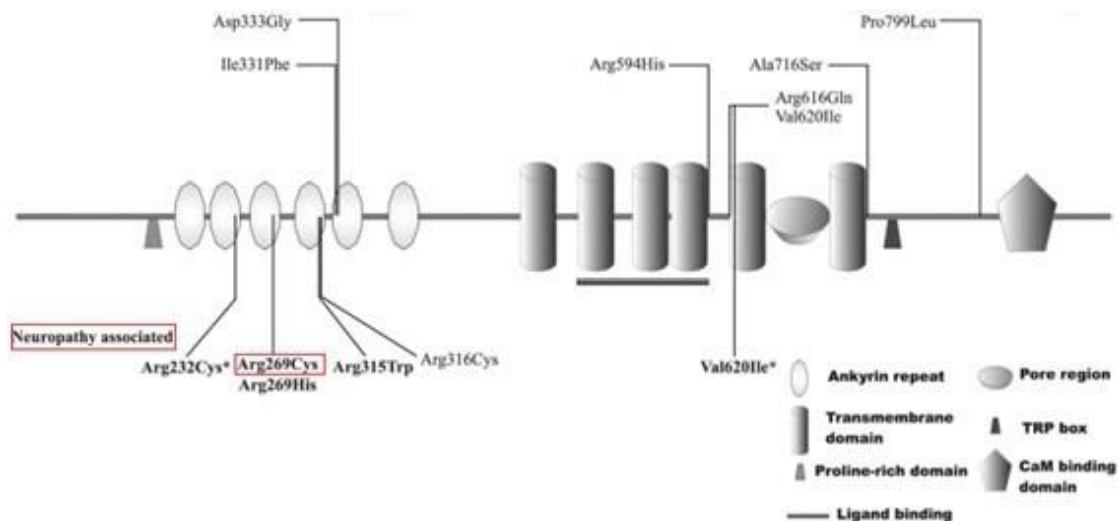
altamente carregada positivamente e visam os resíduos de arginina, estritamente conservados do gene *TRPV4* (ZIMON et al., 2010). Assim, todas as variantes no estudo de Zimon et al. (2010) são recorrentes em pelo menos duas famílias, apontando para a presença de *hot spots*.

De fato, a variante do presente estudo interrompe o resíduo de aminoácido p.Arg269Cys e outras variantes que interrompem este mesmo resíduo também foram consideradas patogênicas (PM5) (BIASINI et al., 2016; DENG et al., 2010; FLEMING, QUAN et al., 2016; GRUMBACH et al., 2010; LOIUS et al., 2104; OONK et al., 2014). Estudos de expressão funcional *in vitro* mostraram que esta proteína alterada causou morte celular em decorrência do aumento intracelular de cálcio em células neuronais cultivadas e em células HEK293 (PS3) (LANDOURE et al., 2010).

A presente alteração foi relatada como sendo *de novo* em indivíduos com displasia esquelética e atrofia muscular espinal escapuloperoneal e neuropatia motora hereditária distal (PM6) (EVANGELISTA et al., 2015; LAGUNA et al., 2014). Também foi observado segregar com a doença em indivíduos relacionados (PP1). Esta variante é encontrada com frequência baixa nos bancos de dados de controles populacionais (PM2 suporte).

O fenótipo clínico dos pacientes descritos no estudo de Zimon et al. (2010) é altamente variável entre as famílias, pois estudos de condução nervosa mostraram uma neuropatia axonal com velocidades de condução nervosa preservadas ou apenas ligeiramente atenuadas em todos os pacientes estudados. O paciente CMT_P19 apresentou um quadro leve de CMT axonal e ao exame eletroneuromiográfico apresentou comprometimento axonal parcial dos nervos fibulares.

Figura 6.4: Localização da variante (p. Arg269Cys) em um dos domínios do gene *TRPV4*.



Fonte: Adaptada de Zimon 2010.

6.8 Paciente CMT_P20

O gene *PDHA1* (HGNC:8806; OMIM: 312170) está localizado no cromossomo X e codifica o complexo piruvato desidrogenase (PDC). As deficiências da (PDC) são distúrbios hereditários do metabolismo energético mitocondrial, tipicamente caracterizados por acidose láctica e danos ao sistema nervoso central ou periférico (DEBROSSE et al., 2012). O espectro fenotípico da deficiência de PDC é amplo, incluindo acidose láctica congênita grave com morte neonatal, hipotonia, atraso no desenvolvimento, encefalopatia e/ou convulsões e ataxia intermitente com início na infância ou neuropatia isolada com funcionamento cognitivo normal (DEBROSSE et al., 2012). Há hipótese de que o padrão de inativação do X é o principal determinante das características clínicas em mulheres heterozigóticas (FUJII et al., 1994; WILLEMSSEN et al., 2006). Em 1994, Fujii e colaboradores descreveram um caso feminino com uma variante no gene *PDHA1* e sintomas relativamente leves pelo fato de haver um amplo fenótipo causado pela deficiência de PDC, em nosso estudo a paciente CMT_P20 apresenta um quadro de CMT axonal leve, sem comprometimento

cognitivo e a variante (p.Ala26Serfs*4) encontrada está em estado de homozigose.

Embora não seja predito ocorrer NMD, é previsto que a presente variante ocasione perda ou interrupção da função normal da proteína em gene onde a perda de função é mecanismo de doença bem estabelecido (PVS1 forte). Ademais, a variante é ausente dos bancos de dados populacionais (PM2).

6.9 Paciente CMT_P29

O gene *MME* (HGNC:7154; OMIM:120520) está localizado no cromossomo 3 e codifica a neprilisina (NEP), que é bem conhecida por ser uma das mais proeminentes enzimas degradadoras de beta-amilóide (A β) (HIGUCHI et al., 2016). A NEP foi encontrada não apenas no sistema nervoso central (SNC), mas também no sistema nervoso periférico (SNP) em mamíferos (HIGUCHI et al., 2016). As variantes nesse gene são responsáveis pelo fenótipo CMT axonal do tipo 2T(AD/AR; OMIM: 617017). No estudo de Higuchi et al. (2015), de dez probandos japoneses, seis nasceram de pais consanguíneos e apresentaram variantes recessivas no gene *MME*. Os autores observaram fenótipo semelhante e consistente com neuropatia axonal de início tardio, com fraqueza muscular, atrofia e alterações sensitivas nas extremidades inferiores, sem evidência de doença de Alzheimer. No estudo de Jamiri et al. (2021), foi identificada uma variante homozigótica segregando com a doença em uma grande família consanguínea de seis gerações e vários pacientes afetados. Foi observada grande variedade de fenotípica, com fraqueza muscular, dificuldade para caminhar, queda do pé, atrofia muscular e redução da sensação de dor e temperatura, particularmente nas extremidades superiores e inferiores. Condizente com esses dados, o nosso paciente CMT_P29 apresentou um fenótipo de CMT2 leve de início tardio, aos 50 anos.

A variante c.838G>T, p.(Glu280*) cria um códon de parada prematuro no gene *MME*, sendo predito resultar em um produto proteico ausente ou interrompido (PVS1). A variante é encontrada em frequência extremamente baixa em banco de dados de controles populacionais (PM2 suporte). Devido à

homoziguidade da variante no presente paciente, também pontuou-se PM3 suporte.

6.10 Paciente CMT_P31

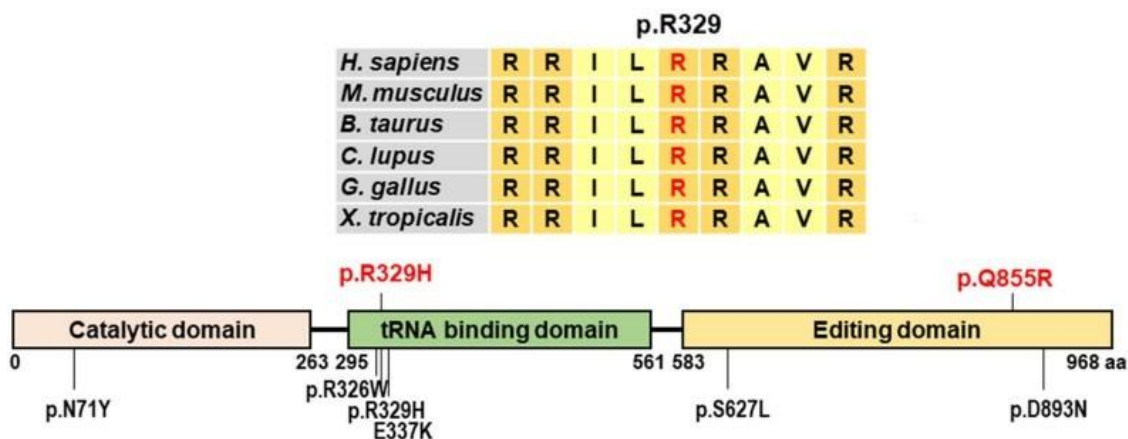
O gene *AARS1* (HGNC:20; OMIM: 601065) está localizado no cromossomo 16 e codifica as aminoacil-tRNA sintetases (ARSs) que catalisam uma reação de aminoacilação em duas etapas, ligando e ativando aminoácidos e conjugando-os com suas moléculas de tRNA cognatas (BANSAGI et al., 2015). Seu papel é essencial em manter a fidelidade do código genético durante a tradução de proteínas (BANSAGI et al., 2015).

As variantes nesse gene são responsáveis pelo fenótipo de CMT2N, uma forma autossômica dominante de CMT2 (AD; OMIM: 613287). Variantes patogênicas/provavelmente patogênicas neste gene estão associadas à variabilidade fenotípica, com idades de início variando de 6 a mais de 50 anos (LEE et al., 2020).

A variante p.(Arg329His) encontrada no paciente CMT_P29, é altamente conservada (Figura 6.5), possui um sítio CpG altamente metilado e é considerado um *hot spot* mutacional (PM1)(BANSAGI et al., 2015). É conhecida patogênica, descrita em pelo menos 13 famílias não correlatadas (PS4) com uma vasta heterogeneidade fenotípica, inclusive entre os membros da mesma família (BANSAGI et al., 2015; BACQUET et al., 2018; JAUREGUI et al., 2015; LEE et al., 2020; LASSUTHOVA et al., 2016; LATOUR et al., 2010; MCLAUGHLIN et al., 2012, DATT, SHARMA et al., 2014). Também foi observada segregando com a doença em 17 indivíduos de uma grande família francesa (PP1 forte). Geralmente, os pacientes com a variante p.(Arg329His) apresentam CMT2 com envolvimento predominantemente de membros inferiores e pés cavos bilateral (BANSAGI et al., 2015; LATOUR et al., 2010; MCLAUGHLIN et al., 2012). Nosso paciente CMT_29 apresentou um fenótipo de CMT2 moderado aos 20 anos.

Ademais, a presente variante está ausente de banco de dados populacionais (PM2), estudos funcionais demonstram efeito prejudicial na atividade enzimática (PS3) (MCLAUGHLIN et al., 2012) e a análise *in silico* suporta um efeito deletério (PP3).

Figura 6.5: Conservação do sitio da variante p.(Arg329His) entre as espécies de vertebrados e estrutura do domínio e as posições das variantes na proteína.



Fonte: Adaptada de LEE et al., 2020

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Nesse estudo, encontramos oito novas variantes, não descritas previamente na literatura, sendo uma patogênica, três provavelmente patogênicas e quatro variantes de significado incerto, ampliando o espectro genético do CMT2. Esses achados são importantes para auxiliar o entendimento dos mecanismos genéticos envolvidos em CMT e uma correlação entre genótipo e fenótipo dos pacientes. A interpretação das quatro variantes de significado incerto (VUS) (15,4%) que foram encontradas neste estudo é um desafio no diagnóstico do NGS. Consideramos as variantes VUS nos pacientes (CMT_P3, CMT_P8, CMT_24 e CMT_P34) com (PM2) por estarem ausentes de banco de dados populacionais e a variante Gln395* encontrada no CMT_P8 com (PVS1 moderado), pois está no último éxon onde não é predito NMD, não há variante patogênica e provavelmente patogênica downstream, e que remove <10% da proteína.

Assim, a classificação incorreta dessas variantes como patogênicas ou benignas pode ter implicações clínicas e jurídicas importantes, especialmente no aconselhamento genético (CORTESE et al., 2020).

Quanto à epidemiologia molecular, a comparação dos dados deste estudo com outros estudos semelhantes é difícil e não pode ser feito de maneira direta. Primeiramente, neste estudo foi utilizado um critério de seleção de pacientes não

usual, ou seja, pacientes com neuropatia axonal que procuram auxílio na fase adulta, quer sua doença tenha se iniciado antes ou depois dos 20 anos. Pacientes com esta caracterização clínica constituem um problema diagnóstico que só tem recentemente chamado a atenção de médicos e pesquisadores (SENDEREK et al.,2020; ROSSOR, 2020). Adicionalmente, os estudos de epidemiologia molecular da CMT fazem uma avaliação global das neuropatias desmielinizantes, axonais e intermediárias, sem nenhuma outra particularização e com diferentes critérios de seleção. Desta maneira, uma comparação direta é praticamente impossível. Tentamos extrair de estudos recentes dados que pudessem se aproximar dos nossos. Encontramos dois estudos brasileiros avaliando a epidemiologia molecular da CMT. No estudo de Cavalcanti et al. (2021), foram avaliados 111 pacientes com CMT axonal, tendo sido feito o diagnóstico molecular de 43, ou seja, de 38,7% dos pacientes. Não foi possível identificar no artigo os genes associados especificamente ao CMT axonal, mas pela lista geral, mutações no gene *MFN2* foram as predominantes (6%), seguindo-se, provavelmente, *GDAP1*, *NEFL*, e *SBF2*. O segundo estudo, de Padilha et al., (2020), foram encontrados os genes de 5 dos 11 casos axonais (45%). Interessantemente, um destes casos apresentava mutação no gene *PMP22*, que é a causa mais frequente de neuropatia mielínica. Nenhuma descrição pormenorizada foi apresentada. Os outros genes foram: *MFN2*, *GDAP1*, *MARS* e *HARS*, cada um com apenas um paciente. (PADILHA et al.,2020).

A porcentagem diagnóstica observada nestes estudos é muito semelhante à nossa (38,5%), mas a sequência de genes mutados é relativamente diferente, provavelmente por que não incluímos pacientes jovens, onde mutações nos genes *MFN2* e *GDAP1*, dentre outros, são frequentes.

Em relação a estudos internacionais recentes, observa-se que a taxa de positividade varia de 22% (CORTESE et al., 2020; YOSHIMURA et al., 2019) a valores ao redor de 40% (BAQUET et al., 2018). No estudo de Cortese et al., (2020) os 220 pacientes já haviam sido submetidos a uma série de investigações moleculares preliminares pelo método Sanger, o que provavelmente explica a baixa positividade e também a sequência de genes encontrados (*MFN2* – 11 casos, 3.6%; *GDAP1* - 4 casos, 1,8% dos casos) enquanto o estudo de Bacquet

et al., 2018, o gene mais frequentemente mutado foi *MFN2* (7,7%) seguido por *SH3TC2* (6,4%), *NEFL* (5,1%), *GDAP1* (5,1%) e *GAN* (5,1%).

7. CONCLUSÃO

Nosso estudo proporcionou o diagnóstico molecular definitivo a 10 dos pacientes adultos com CMT2 através das tecnologias NGS, especialmente WES.

Foram identificadas variantes patogênicas conhecidas nos genes (*IGHMBP2*, *HSBP1*, *MORC2*, *DNM2*, *MFN2*, *TRPV4* e *AARS*). Variantes novas patogênicas/provavelmente patogênicas também foram identificadas nos genes *PDK3*, *IGHMBP2*, *PDHA1* e *MME* ampliando a lista de variantes no quadro genético de CMT2. Destaca-se aqui, a variante encontrada no gene *PDK3*, que co-segregou em todos os indivíduos afetados da família.

Ademais, a presente tese contribui para a ampliação do espectro fenotípico de CMT2 a partir da associação da variante encontrada em homozigose no gene *MME* ao desenvolvimento de CMT2 tardio e mais leve da doença. Esses resultados são importantes à medida que contribuem para a elucidação genotípica dos pacientes com CMT2 e para um melhor conhecimento da correlação entre genótipo e fenótipo dos pacientes com CMT2.

8. REFERÊNCIAS

ABATI, E. *et al.* Charcot-Marie-Tooth disease type 2F associated with biallelic HSPB1 mutations. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v.8, n.5, p.1158-1164, 2021.

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, 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.84, p.1-11, 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. 1-14, 2018.

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

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.

BANSAGI, B. *et al.* Genetic heterogeneity of motor neuropathies. **Neurology**, v.88, n. 13, p. 1226-1234, 2017.

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, 2016.

BEHJATI, S.; TARPEY, P. S. What is next generation sequencing? **Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition**, v. 98, n. 6, p. 236-238, 2013.

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, 2019.

BERCIANO, J. *et al.* Reduced penetrance in hereditary motor neuropathy caused by TRPV4 Arg269Cys mutation. **J. Neurol**, v.258, n.8, p.1413-21, 2011.

BIRD, T. D. Charcot-Marie-Tooth (CMT) Hereditary Neuropathy Overview 1 . Clinical Characteristics of Charcot-Marie-Tooth (CMT) Hereditary Neuropathy. **GeneReviews**, p. 1-22, 2020.

BIASINI, F. *et al.* TRPV4 related scapulo-peroneal spinal muscular atrophy: Report of an Italian Family and review of the literature. **Neuromuscul. Disord**, v. 26, n. 4-5, p. 312-5, 2016.

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

BREWER, M.H. *et al.* Whole Genome Sequencing Identifies a 78 kb Insertion from Chromosome 8as the Cause of Charcot-Marie-Tooth Neuropathy CMTX3. **PLoS Genet**, p.20-12, n.7, 2016.

CHARCOT- MARIE- TOOTH ASSOCIATION. Understanding CMT. **Charcot-Marie-Tooth Association**.Disponível em:<<https://www.cmtausa.org/understanding-cmt/>>. Acesso em 02 maio.2022.

CANDAYAN, A.; PARMAN, Y.; BATTALOĞLU, E. Clinical and Genetic Survey for Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Based on the Findings in Turkey, a Country with a High Rate of Consanguineous Marriages. **Balkan Medical Journal**, v. 39, n. 1, p. 3-11, 2022.

CARROLL, A. S. *et al.* Inherited Neuropathies. **Seminars in Neurology**, v. 39, n. 5, p. 620-639, 2019.

CAVALCANTI, E. B. U. *et al.* Charcot-Marie-Tooth disease: Genetic profile of patients from a large Brazilian neuromuscular reference center. **J. Peripher Nerv Syst**, p.1-8, 2021.

CHUNG, K. W. *et al.* Early onset severe and late-onset mild Charcot-Marie-Tooth disease with mitofusin 2(MFN2) mutations. **Brain**, v.129, p.2103-18, 2006.

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

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, 2020.

COTTENIE, E. *et al.* Truncating and missense mutations in *IGHMBP2* cause Charcot-Marie Tooth disease type 2. **The American Journal of Human Genetics**, v. 95, p. 590-601, 2014.

DAS, R. *et al.* CMT2A-linked mitochondrial hyperfusion-driving mutant MFN2 perturbs ER-mitochondrial associations and Ca²⁺ homeostasis. **Biol. Cell**, v.114, p.309-319, 2022.

DATT, M.; SHARMA, A. Evolutionary and structural annotation of disease-associated mutations in human aminoacyl-Trna synthetases. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1-20, 2014.

DEBROSSE, S.D. *et al.* Spectrum of neurological and survival outcomes in pyruvate dehydrogenase complex (PDC) deficiency: Lack of correlation with genotype. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.107, p.394-402, 2012.

DENG, H. X. *et al.* Scapuloperoneal spinal muscular atrophy and CMT2C are allelic disorders caused by alterations in TRPV4. **Nat. Genet**, v.42, n.2, p.165-9, 2010.

DENG, S. *et al.* Incidence and clinical features of *TRPV4*-linked axonal neuropathies in a USA cohort of Charcot-Marie-Tooth disease type2. **Neuromolecular med**, v. 22, n. 1, p. 68-72, 2019.

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, 2016.

DIVINCENZO, C. *et al.* The allelic spectrum of charcot-marie-tooth disease in over 17,000 individuals with neuropathy. **Molecular Genetics and Genomic Medicine**, v. 2, n. 6, p. 522-529, 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.507-22.2017.

DOUSE, C. H. *et al.* Neuropathic *MORC2* mutations perturb GHKL ATPase dimerization dynamics and epigenetic silencing by multiple structural mechanisms. **Nat. Commun**, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03045-x>.

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, 2015.

DREW, A.P. *et al.* A 1.35 Mb DNA fragment is inserted into the DHMN1 locus on chromosome 7q34-q36.2. **Hum Genet**, v.135, n.11, p.1269-1278, 2016.

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

D'YDEWALLE, C. *et al.* HDAC6 inhibitors reverse axonal loss in a mouse model of mutant *HSBP1*- induced Charcot-Marie-Tooth disease. **Nature Medicine**, v. 17, n.8, p.968- 974, 2011.

ECHANIZ-LAGUNA, A. The shifting paradigm of Charcot-Marie-Tooth disease. **Revue Neurologique**, v. 171, n. 6-7, p. 498-504, 2015.

EVANGELISTA, T. *et al.* Phenotypic variability of *TRPV4* related neuropathies. **Neuromuscul Disord**, v.25, n.6, p.516-21, 2015.

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

FEELY, S. M. E. *et al.* *MFN2* mutations cause severe phenotypes in most patients with CMT2A. **Neurology**, v. 76, n. 20, p. 1690-6, 2011.

FELICE, K. J.; WHINTAKER, C. H.; KHORASANIZADHE, S. Diagnostic yield of advanced genetic testing in patients with hereditary neuropathies: A retrospective single-site study. **Muscle & Nerve**, p.1-8, 2021.

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. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo,2021.

FLAGSHIP. *et al.* Feasibility of ultra-rapid exome sequencing in critically ill infants and children with suspected monogenic conditions in the Australian Public Health Care System. **Jama**, v.323, n.24, p. 2503-2511, 2020.

FLEMING, J. QUAN, D. *et al.* A case of congenital spinal muscular atrophy with pain due to a mutation in *TRPV4*. **Neuromuscul. Disord**, v.26, n. 12, p. 841-843, 2016.

GOMES, A.; KORF, M. S. B. **Genetic Testing Techniques**. [s.l.] Elsevier Inc., [s.d.].

GONDIM, F. DE A. A. *et al.* Fenótipos raros de neuropatia hereditária: Charcot-Marie-Tooth tipo 4. **Revista Neurociências**, v. 22, n. 1, p. 84-94, 2014.

GOWRISANKARAN, S. *et al.* Structural and functional measures of inner retinal integrity following visual acuity improvement in a patient with hereditary motor and sensory neuropathy type VI. **Ophthalmic Genet**, v.32, n.3, p.188-192, 2011.

GROHMANN, K. *et al.* Infantile Spinal Muscular Atrophy with Respiratory Distress Type 1 (SMARD1). **Ann Neurol**, v.54, p.719-724, 2003.

GRUMBACH, M.A. *et al.* Alterations in the ankyrin domain of TRPV4 cause congenital distal SMA, scapuloperoneal SMA and HMSN2C. **Nat. Genet**, v. 42, n.2, p. 160-4, 2010.

GUENTHER, U. *et al.* IGHMBP2 is a ribosome-associated helicase inactive in the neuromuscular disorder distal SMA type 1 (DSMA1). **Human Molecular Genetics**, v.18, n.7, p. 1288-1300, 2009.

HAREL, T.; LUPSKI, J. R. Charcot-Marie-Tooth disease and pathways to molecular based therapies. **Clinical Genetics**, v. 86, n. 5, p. 422-431, 2014.

HARRIS, E. *et al.* Exome sequence versus sequential testing in the UK highly specialised Service for Limb Girdle Muscular Dystrophy. **Orphanet J. Rare Diseases**, p. 1-12, 2017.

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, 2018.

HIGUCHI, Y. *et al.* Mutations in *MME* cause an autosomal-recessive Charcot-Marie-Tooth disease type 2. **Ann. Neurol**, v.79, p.659-672, 2016.

HOLMGREN, A. *et al.* Charcot-Marie-Tooth causing *HSBP1* mutations increase Cdk5-mediated phosphorylation of neurofilaments. **Acta Neuropathol**, v. 126, p. 93-108, 2013.

HOULDEN, H. *et al.* Mutations in the HSP27 (HSPB1) gene cause dominant, recessive, and sporadic distal HMN/CMT type 2. **Neurology**, v.71, p.1660-1668, 2008.

HYUN, Y. S. *et al.* Clinico genetics in Korean Charcot-Marie-Tooth disease type 2Z with *MORC2* mutations. **Brain**, p.1-4, 2016.

JAMIRI, Z. *et al.* A nonsense mutation in *MME* gene associated with autosomal recessive late-onset Charcot-Marie-Tooth disease. **Molecular Genetics & Genomic Medicine**, v.10, p.1-11, 2022.

JAUREGUI, C. G. *et al.* Exome sequence analysis suggests that genetic burden contributes to phenotypic variability and complex neuropathy. **Cell Rep**, v. 12, n. 7, p. 1169-83, 2015.

KALMAR, B. *et al.* Mitochondrial deficits and abnormal mitochondrial retrograde axonal transport play a role in the pathogenesis of mutant Hsp27-induced Charcot Marie Tooth Disease. **Hum. Mol. Genet**, v. 26, n. 17, p. 3313-3326, 2017.

KANG, K.H. *et al.* Human HSPB1 mutation recapitulates features of distal hereditary motor neuropathy (dHMN) in drosophila. **Biochem Biophys Res Commun**, v.521, n.1, p.220-226, 2019.

KATZ, M. *et al.* Mutations in heat shock protein beta-1 (HSPB1) are associated with a range of clinical phenotypes related to different patterns of motor neuron dysfunction: A case series. **Journal of the Neurological Sciences**, <https://doi.org/10.1016/j.jns.2020.116809>, 2020.

KENNERSON, M. L. *et al.* A new locus for X-linked dominant charcot-marie-tooth disease (CMTX6) is caused by mutations in the pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 3 (PDK3) gene. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 7, p. 1404-1416, 2013.

KENNERSON, M.L. *et al.* "X-Linked Charcot-Marie-Tooth Disease Type 6 (CMTX6) Patients with a p.R158H Mutation in the Pyruvate Dehydrogenase Kinase Isoenzyme 3 Gene." **Journal of the Peripheral Nervous System**. <https://doi.org/10.1111/jns.12160>, 2016.

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

KITANI-MORII, F. *et al.* Rate of Changes in CMT Neuropathy and Examination Scores in Japanese Adult CMT1A Patients. **Frontiers in Neurology**, v. 11, n. July, p. 1-6, 2020.

KITANI-MORII, F.; NOTO, Y. I. Recent advances in drosophila models of charcot-marie-tooth disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 1-19, 2020.

KLEIN, C.J.; FOROUD, T.M. Neurology individualized medicine: When to use next-generation sequencing panels. **Mayo Clin Proc**, v.92, n.2, p.292-305, 2017.

LAGUNA, A. E. *et al.* Phenotypic spectrum and incidence of *TRPV4* mutations in patients with inherited axonal neuropathy. **Neurology**, v.82, p.1919-1926, 2014.

LAGUNA, A. E. *et al.* Axonal neuropathies due to mutations in small heat shock proteins: clinical, genetic, and functional insights into novel mutations. **Hum. Mutations**, v. 38, n.5, p. 556-568, 2017.

LANDOURE, G. *et al.* Mutations in *TRPV4* cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2C. **Nat. Genet**, v.42, n.2, p.170-174, 2010.

LARREA, D. *et al.* *MFN2* mutations in Charcot-Marie-Tooth disease alter mitochondria-associated ER membrane function but do not impair bioenergetics. **Human Molecular Genetics**, v.28, n.11, p. 1782-1800, 2019.

LASSUTHOVA, P. *et al.* Improving diagnosis of inherited peripheral neuropathies through gene panel analysis. **Orphanet J. Rare Dis**, v.118, p. 1-10, 2016.

LASSUTHOVA, P. *et al.* Severe axonal Charcot-Marie-Tooth disease with proximal weakness caused by de novo mutation in the *MORC2* gene. **Brain**, v.139, p. 1-4, 2016.

LATOURE, P. *et al.* A Major Determinant for binding and aminoacylation of tRNA^{Ala} in cytoplasmic Alanine-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.

LEE, A. J. *et al.* Alanyl-Trna synthetase 1 (AARS) gene mutation in a family with intermediate Charcot-Marie-Tooth neuropathy. **Genes & Genomics**, v. 42, n. 6, p. 663-672, 2020.

LIN, K. P. *et al.* The mutational spectrum in a cohort of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 among the Han chinese in Taiwan. **Plos One**, v. 6, p.1-9, 2011.

LOUIS, E. D. *et al.* Essential tremor in a Charcot-Marie-Tooth type 2C kindred does not segregate with the *TRPV4* R269H mutation. **Neurol**, v. 6, n.1, p. 1-6, 2014.

MACIEL, V. A. Z. *et al.* Unveiling the clinical and electrophysiological profile of CMTX6: Insights from two Brazilian families. **Peripheral Nerve Society**, p. 1-6, 2023.

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

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

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

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

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

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

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 Mutat**, v.33, n.1, p.244-253, 2012.

MILLAN, B. S. *et al.* Spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). **Clinical neuropathology**, v.35, n.2, p. 58-65, 2016.

MIRESSI, F. *et al.* One multilocus genomic variation is responsible for a severe Charcot-Marie-Tooth axonal form. **Brain Sci.**, <https://doi:10.3390/brainsci10120986,2020>.

MOSS, K. R. *et al.* New evidence for secondary axonal degeneration in demyelinating neuropathies. **Neuroscience Letters**, v.744, p. 135-195, 2021.

MURPHY, S. M. *et al.* Reliability of the CMT neuropathy score (second version) in Charcot- Marie- Tooth disease. **J. Peripher Nerv Syst**, v.16, n.3, p.191-198, 2013.

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

OONK, A. M. M. *et al.* Intrafamilial variable hearing loss in *TRPV4* induced spinal muscular atrophy. **Ann. Otol Rhinol Laryngol**, v. 123, n. 12, p.859-65, 2014.

OUVRIER, R. What can we learn from the history of Charcot-Marie-Tooth disease?. **Developmental Medicine & Child Neurology** 2010, 52: p.405-406, 2016.

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, 2020.

PAREYSON, D. Axonal Charcot-Marie-Tooth disease: The fog is only slowly lifting. **Neurology**, v. 68, n. 20, p. 1649-1650, 2007.

PAREYSON, D.; MARCHESI, C. Diagnosis, natural history, and management of Charcot-Marie-Tooth disease. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 7, p. 654-667, 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, 2017.

PATEL, M. S.; KOROTCHKINA, L. G. 2001. "Regulation of Mammalian Pyruvate Dehydrogenase Complex by Phosphorylation: Complexity of Multiple Phosphorylation Sites and Kinases." **Experimental & Molecular Medicine**, v. 33, n.4, p.191-97.2001.

PEREZ-SILES, G. *et al.* 2016. "Pathogenic Mechanisms Underlying X-Linked Charcot-Marie-Tooth Neuropathy (CMTX6) in Patients with a Pyruvate Dehydrogenase Kinase 3 Mutation." **Neurobiology of Disease**, v.94, p. 237-44.2016.

PEREZ-SILES, G. *et al.* Energy metabolism and mitochondrial defects in X-linked Charcot-Marie-Tooth (CMTX6) Ipsc-derived motor neurons with the p.R158H *PDK3* mutation. **Narute Research**, p.1-13, 2020.

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, 2019.

PISCIOTTA, C.; SHY, M. E. Neuropathy. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 148, p. 653-665, 2018.

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

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

ROSSOR, A. M.; EVANS, M. R. B.; REILLY, M. M. A practical approach to the genetic neuropathies. **Practical Neurology**, v. 15, n. 3, p. 187-198, 2015.

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

ROSSOR, A. M. Lessons from late onset Charcot-Marie-Tooth disease. **J. Periph. Nerv. Syst**, v. 25, n.3, p.222, 2020.

ROY, S. *et al.* Next-generation sequencing informatics: Challenges and strategies for implementation in a clinical environment. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 140, n. 9, p. 958-975, 2016.

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, M.A.; SHY, M.E. Inherited Peripheral Neuropathies. **Neurol Clin**, v. 31, n.2, p. 597-619, 2013.

SAPORTA, M. A. Charcot-marie-tooth disease and other inherited neuropathies. **CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology**, v. 20, n. 5, p. 1208-1225, 2014.

SAPORTA, M. A. *et al.* Axonal Charcot-Marie-Tooth disease patient-derived motor neurons demonstrate disease-specific phenotypes including abnormal electrophysiological properties. **Exp. Neurol**, v. 263, p.190-199, 2015.

SCHON, K. *et al.* Mosaicism for a pathogenic *MFN2* mutation causes minimal clinical features of CMT2A in the parent of a severely affected child. **Neurogenetics**, v.18, n.1, p. 49-55, 2017.

SCHOTTMANN, G. *et al.* Recessive truncating IGHMBP2 mutations presenting as axonal sensorimotor neuropathy. **Neurology**, p.1-9, 2015.

SENDEREK, J. *et al.* The genetic landscape of axonal neuropathies in the middle-aged and elderly: Focus on MME. **Neurology**, v. 95, n. 24, p. e3163-e3179, 2020.

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

SHY, M. E. Mutations in BAG3 Cause Adult Onset Charcot-Marie-Tooth Disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v.89, n.3, p.313-315, 2018.

SITARZ, K. S. *et al.* *MFN2* mutations cause compensatory mitochondrial DNA proliferation. **Brain**, v. 135, p.1-3, 2012.

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, 2013.

SMEDLEY, D. *et al.* Walking the interactome for candidate prioritization in exome sequencing studies of Mendelian diseases. **Bioinformatics**, v. 30, n. 22, p. 3215-3222, 2014.

SOUZA, L. A. *et al.* Increased monomerization of mutant *HSPB1* leads to protein hyperactivity in Charcot-Marie-Tooth neuropathy. **The journal of biological chemistry**, v.285, n.17, p. 12778 - 12786, 2010.

SOUZA, L. A . *et al.* Small heat-shock protein *HSPB1* mutants stabilize microtubules in Charcot-Marie-Tooth neuropathy. **Neurobiology of Disease**, v.31, n. 43, p. 15320-15328, 2011.

STAVROU, M. *et al.* Genetic mechanisms of peripheral nerve disease. **Neuroscience Letters**, v. 742, p. 135357, 2021.

TAGHIZADEH, S. *et al.* Molecular diagnosis of hereditary neuropathies by whole exome sequencing and expanding the phenotype spectrum. **Archives of Iranian Medicine**, v. 23, n. 7, p. 426-433, 2020.

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

TCHASOVNIKAROVA, I. A. *et al.* Hyperactivation of Hush complex function by Charcot-Marie-Tooth disease mutation in MORC2. **Nat. Genet**, v.49, n. 7, p. 1035-1044, 2017.

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, 2017.

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.

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

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

VAETH, S. *et al.* Genetic analysis of Charcot-Marie-Tooth disease in Denmark and the implementation of a next generation sequencing platform. **European Journal of Medical Genetics**, v. 62, n. 1, p. 1-8, 2019.

VERMA, A. Next-generation sequencing and genetic diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v. 17, n. 4, p. 383-386, 2014.

VILL, K. *et al.* Long-Term observations in na affected Family with neurogenic scapuloperoneal syndrome caused by mutation R269C in the TRPV4 gene. **Neuropediatrics**, v. 46, n.4, p. 282-286, 2015.

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, 2008.

WILLEMSSEN, M. *et al.* Females with PDHA1 gene mutations: A diagnostic challenge. **Mitochondrion**, v.6, p. 155-159, 2006.

YAMAGUCHI, M.; TAKASHIMA, H. Drosophila charcot-marie-tooth disease models. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1076, p. 97-117, 2018.

YATES, A. D. *et al.* Ensembl 2020. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D682-D688, 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, 2012.

YLIKALLIO, E. *et al.* Targeted next-generation sequencing reveals further genetic heterogeneity in axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathy and a mutation in HSPB1. **Eur J. Hum. Genet**, v. 22, n. 4, p. 522-7, 2014.

YOSHIMURA, A. *et al.* Genetic profile and onset features of 1005 patients with Charcot-Marie-Tooth disease in Japan. **Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 90, p. 195-202, 2019.

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

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

ZOLET, A. C. T. *et al.* Marcadores moleculares na era genômica: Metodologias e aplicações. **Sociedade Brasileira de genética**, p.181, 2017.

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.

ZUCHNER, S. *et al.* Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin2. **Ann Neurol**, v. 59, n.2, p. 276-81, 2006).

9. APÊNDICE

APÊNDICE A – 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.
- Corroboração de 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 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 inframe 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).

APÊNDICE B – Resultados moleculares da co-segregação dos pacientes e seus familiares.

Todos os pacientes estão identificados pelo código “CMT_P” seguido por um número (1,2,3 ...) e seus familiares pelo mesmo código e número, seguidos por “P” (paciente) e acompanhado por um número (1,2,3 ...). Por exemplo, CMT_P1 representa o paciente 1 e CMT_1P1 representa o familiar 1 do paciente 1 e assim sucessivamente. Todos pertencem a mesma família (FAM_1).

Tabela A.1 Resultados moleculares dos pacientes e seus respectivos familiares.

ID-Paciente	ID-Familia	Pedigree	Sexo	Sintom.	Seq.	Sanger	Gene	PH	Zig.	HGVSc.	HGVSp.	ACMG
CMT_P1	FAM_1	Índice	M	Sim	WES ICGNMD	Positivo	PDK3	XL	Hem.	c.485 G>A	p.Arg162His	PP
CMT_P1-1	FAM_1	Pai	M	Não		Negativo	PDK3			c.485 G>A	p.Arg162His	
CMT_P1-2	FAM_1	Filha	F	Sim		Positivo	PDK3		Het.	c.485 G>A	p.Arg162His	PP
CMT_P1-3	FAM_1	Filho	M	Não		Negativo	PDK3			c.485 G>A	p.Arg162His	
CMT_P1-4	FAM_1	Irmã	F			Negativo	PDK3			c.485 G>A	p.Arg162His	
CMT_P1-5	FAM_1	Irmã	F			Negativo	PDK3			c.485 G>A	p.Arg162His	
CMT_P1-6	FAM_1	Sobrinho	M			Positivo	PDK3		Hem.	c.485 G>A	p.Arg162His	PP
CMT_P1-7	FAM_1	Irmão	M			Positivo	PDK3		Hem.	c.485 G>A	p.Arg162His	PP
CMT_P1-8	FAM_1	Irmã	F			Positivo	PDK3		Het.	c.485 G>A	p.Arg162His	PP
CMT_P1-9	FAM_1	Sobrinho	M			Negativo	PDK3			c.485 G>A	p.Arg162His	
CMT_P1-10	FAM_1	Sobrinha	F			Positivo	PDK3		Het.	c.485 G>A	p.Arg162His	PP
CMT_P1-11	FAM_1	Sobrinha	F			Positivo	PDK3		Het.	c.485 G>A	p.Arg162His	PP
CMT_P1-12	FAM_1	Sobrinho	M			Negativo	PDK3			c.485 G>A	p.Arg162His	
CMT_P1-13	FAM_1	Sobrinho	M			Negativo	PDK3			c.485 G>A	p.Arg162His	
CMT_P1-14	FAM_1	Sobrinho	M			Negativo	PDK3			c.485 G>A	p.Arg162His	
CMT_P1-15	FAM_1	Sobrinha	F			Negativo	PDK3			c.485 G>A	p.Arg162His	
CMT_P1-16	FAM_1	Sobrinho	M			Negativo	PDK3			c.485 G>A	p.Arg162His	
CMT_P1-17	FAM_1	Sobrinha	F			Positivo	PDK3		Het.	c.485 G>A	p.Arg162His	PP
CMT_P1-18	FAM_1	Sobrinha	F			Positivo	PDK3		Het.	c.485 G>A	p.Arg162His	PP
CMT_P1-19	FAM_1	Irmã	F			Negativo	PDK3			c.485 G>A	p.Arg162His	
CMT_P1-20	FAM_1	Irmã	F			Negativo	PDK3			c.485 G>A	p.Arg162His	
CMT_P29	FAM_2	Índice	M	Sim	WES Mendelics	Positivo	MME	ND	Hom.	c.838G>T	p.Glu280*	P
CMT_P29-1	FAM_2	Irmã	F			Positivo	MME	ND	Hom.	c.838G>T	p.Glu280*	P
CMT_P31	FAM_3	Índice	M	Sim	Painel	Positivo	AARS	AD	Het.	c.986G>A	p.Arg329His	P
CMT_P31-1	FAM_3	Irmã	F			Positivo	AARS		Het.	c.986G>A	p.Arg329His	P

Fonte: Elaborada pela autora.

Notas: ID: Identificação; Pedigree: Representa o parentesco com o paciente índice; Sintom: sintomático; Seq: tipo de sequenciamento realizado; Sanger: Resultado do Sanger para a análise de segregação e confirmação das variantes encontradas por NGS; PH: padrão de herança; Zig: zigosidade; 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.); ACMG: critérios de pontuação de variantes (Apêndice A); M: masculino; F: feminino; XL: ligado ao X; ND: não determinado; AD: Autossômico dominante; Hem: hemizigose; Hom: homozigose; Het: heterozigose P: Patogênica / PP: provavelmente patogênica.

10.ANEXO

ANEXO A

PARECER: Aprovação de realização de pesquisa pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Usp).



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

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


Ribeirão Preto, 10 de dezembro de 2004

Ofício nº 3397/2004
CEP/SPC

Prezada Senhora:

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

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


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

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



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

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

Ribeirão Preto, 09 de fevereiro de 2006

Ofício nº 326/2006
CEP/SPC

PROCESSO HCRP nº 12219/2004

Prezada Senhora:

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

Aproveito a oportunidade para renovar protestos de estima e consideração.

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

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

ANEXO B

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

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

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

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

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

pesquisador responsável. Caso deseje ter seu nome retirado. Isto será feito de imediato, mas os dados obtidos até o momento de sua saída serão utilizados. Seu tratamento e seguimento no Ambulatório de Neurogenética independe de sua participação, ou seja, participando ou não deste **Registro** seu tratamento médico continuará a ser feito da mesma maneira que sempre foi.

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

Este estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa deste Hospital. Este comitê tem por função garantir que as pesquisas sejam realizadas de maneira ética e pode ser contatado pelo telefone 3602-2228, de segunda a sexta-feira, em horário comercial, e está sediado no Hospital das 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 **Registro**: Prof. Dr. Wilson Marques Junior.

Caso concorde em participar, o Sr/Sra assinará duas vias deste documento chamado termo de consentimento livre e esclarecido. Uma via ficará com o Sr/Sra, devidamente assinada pelo pesquisador responsável.

Nome do paciente:.....

Assinatura do paciente:.....

Prof. Dr. Wilson Marques Jr.

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

ANEXO C

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 Autônomo:

- 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 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												
Vibração												

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 AUTÔNOMICO

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 D

CMT ESCORE DE NEUROPATIA – VERSÃO 2 (CMTNS)

CMT neuropathy score – Version 2.

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

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

^{*}Use the picture below to discriminate the level of the symptoms.

Fonte: Murphy, et al. 2013.