
Camila Galvão Lopes

Caracterização de variantes *De novo* em exomas de indivíduos com Transtorno do Espectro Autista

Characterization of De novo variants in exomes of individuals with Autism Spectrum Disorder

Orientadora: Professora Dra Maria Rita Passos-Bueno

São Paulo
2023.

Camila Galvão Lopes

Caracterização de variantes *De novo* em exomas de indivíduos com Transtorno do Espectro Autista

Characterization of De novo variants in exomes of individuals with autism spectrum disorder

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Genética e Biologia Evolutiva

Orientador(a): Profa Dra Maria Rita Passos-Bueno

São Paulo

2023

EXEMPLAR CORRIGIDO

Essa versão do presente estudo foi gerada após as correções sugeridas pela banca avaliadora.

Maria Rte Carlos Bueno

Lopes, Camila Galvão

Caracterização de variantes *De novo* em exomas de indivíduos com Transtorno do Espectro Autista

58 páginas

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

Palavras - chave: 1. Autismo 2. Exomas 3. Neurodesenvolvimento Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Maria Rita Passos Bueno

Prof(a). Dr.(a). Maria Rita Passos-Bueno

Orientador(a)

Dedicatória

*A minha querida filha Clara, na esperança de que ela possa
entender as ausências.*

Epígrafe

Tudo evolui; não há realidades eternas: tal como não há verdades absolutas.

Humano, demasiado Humano, Friedrich Wilhelm Nietzsche.

Agradecimentos

Agradeço às agências de fomento a pesquisa, que não me financiaram diretamente, mas contribuíram para que todo esse trabalho fosse possível e que sobreviveram fortemente mesmo em tempos sombrios. Especialmente: a FAPESP (Projeto CEPID/FAPESP **2013/08028-1**).

Também fortemente aos indivíduos com TEA e seus familiares que acreditaram na pesquisa, e mesmo sem uma perspectiva de benefício individual direta, quiseram contribuir e ser parte dessa história.

Aos colegas de laboratório que me ajudaram especialmente: Naila e Simone, sempre gentis, solícitas e acolhedoras; a Elisa, Claudia, Ana Cristina, Gabriele e Jaque que ativamente contribuíram com os seus tempos individuais para meu aprendizado.

A Professora Maria Rita que me recebeu como sua aluna e me deu a oportunidade de aprender mais.

A Erika da CPG, sempre gentil e paciente, em todos os momentos que eu me senti perdida.

Aos meus amigos, principalmente Nayrob que sempre me apoiou bravamente.

A minha família, principalmente o *core*: Marcia, Luana, Clarinha pelo apoio incondicional, e Wagner por assumir muitas tarefas enquanto eu estava ausente.

A Marcela Lopes e Bruno Coelho por contribuir de forma inestimável para minha sanidade

Índice

I - Introdução.....	7
II - Objetivos.....	13
III - Metodologia.....	14
IV - Resultados.....	18
V - Discussão Geral e Conclusões.....	28
VI - Resumo / Abstract	36
VII - Referências Bibliográficas.....	38
VIII – Anexos.....	49

I. Introdução

I.1: Introdução geral, aspectos clínicos e epidemiológicos.

Os transtornos do neurodesenvolvimento (TND) manifestam-se precocemente, são caracterizados por déficits cognitivos, emocionais e do desenvolvimento dos marcos motores, os quais acarretam prejuízos ao funcionamento pessoal, social, acadêmico ou profissional.

Nos casos de TND há prejuízo dos eventos coordenados que levam ao desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). As alterações do desenvolvimento variam desde limitações muito específicas na aprendizagem ou no controle de funções executivas até prejuízos globais nas habilidades sociais ou no quociente de inteligência (Gilissen et al. 2014). Os TND incluem: transtorno do espectro autista (TEA), deficiência intelectual (DI), transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e outros distúrbios específicos da aprendizagem. Entre estes é frequente a comorbidade; por exemplo, o TEA pode estar associado a DI, TDAH, ou um transtorno específico da aprendizagem (Niemi et al., 2018; Tărlungeanu e Novarino et al., 2018).

Como o escopo deste estudo visa caracterizar variantes *De novo* deletérias em indivíduos com TEA, maiores detalhes serão relatados para essa condição.

Assim, caracteriza-se o TEA por déficits persistentes na comunicação e na interação em múltiplos contextos, o que inclui a reciprocidade social, em comportamentos não verbais de comunicação, e em habilidades para desenvolver, manter e compreender relacionamentos. Para o diagnóstico do transtorno do espectro autista é necessário também a presença de padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses ou atividades. Os critérios diagnósticos podem ser preenchidos com base em informações retrospectivas, embora a apresentação atual

deva causar prejuízo significativo. (**Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais, 2014**).

A Rede para Monitoramento do Autismo e Distúrbios do Desenvolvimento, fundada pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças norte americano, no seu relatório de 2018, apresentou que uma a cada 44 crianças de 8 anos (2,3%) apresentava diagnóstico de TEA. Isso representa dados crescentes da prevalência, o que representa um claro impacto social e para os serviços de saúde (Maenner et al., 2018). Apesar desse monitoramento dos Estados Unidos da América (EUA) ter iniciado em 1996 (Yeargin-Allsopp et al., 2003); apenas em 2022, o censo do Brasil, através do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) incluiu a pergunta sobre autismo no seu questionário. Os dados iniciais da pesquisa do IBGE estimam que a prevalência seja de 2 milhões de casos de autismo na população brasileira, informações a serem confirmadas ao final da pesquisa. Essa prevalência representaria 1% aproximadamente da população (Ferreira, 2022).

As primeiras descrições clínicas sobre autismo foram realizadas 1943 pelo psiquiatra austríaco Leo Kanner, embora o psiquiatra suíço Paul Eugen Bleuler em 1911, já houvesse cunhado o termo “autismo”, para descrever um sintoma da esquizofrenia infantil, definido como “desligamento da realidade combinado com a predominância relativa ou absoluta da vida interior” (Bleuler, 2005 apud Durval, 2011).

Kanner em 1943, portanto, descreveu o quadro clínico de 11 crianças entre 2 e 8 anos de idade, as quais apresentavam características comportamentais específicas: dificuldade nas relações afetivas com o meio, solidão "autista" extrema, incapacidade para o uso e entendimento da linguagem social, boas potencialidades cognitivas, aspecto físico normal, comportamentos ritualísticos, início precoce e maior frequência no sexo masculino.

- Em 1968, Rutter aborda os diferenciais entre esquizofrenia e autismo, a partir das descrições de Kanner, posteriormente, realiza uma revisão do conceito de autismo e estabelece algumas

características como critérios diagnósticos de autismo, tais como: incapacidade de desenvolver relações sociais, atraso na aquisição da linguagem, insistência obsessiva na mesma atividade, perda da habilidade imaginativa, brincadeiras estereotipadas e início na infância (Rutter, 1978). No entanto, apenas após a tradução para o inglês do artigo que descreve a Síndrome de Asperger, incluída nos TEA, é que houve maior notoriedade da descrição e quadro clínico do autismo (Asperger, 1991; Wing, 1981). Como resultado desses trabalhos iniciais sobre autismo, essa condição foi incluída no **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtorno Mentais - III** (DSM-III) em 1980 e mantido nas revisões seguintes. Na Atualização mais recente do **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtorno Mentais – DSM-V**, neste o transtorno autista, a Síndrome de Asperger e o transtorno global do desenvolvimento compuseram o transtorno do espectro autista. Os sintomas desses transtornos representam um *continuum* de prejuízos com intensidades que graduada entre leve e grave nos domínios de comunicação social e de comportamentos restritivos e repetitivos. Essa alteração foi implementada para melhorar a sensibilidade e a especificidade dos critérios para o diagnóstico de transtorno do espectro autista e para identificar alvos mais focados de tratamento para os prejuízos específicos observados nestes indivíduos. O transtorno do espectro autista caracteriza-se por déficits persistentes na comunicação social e na interação social em múltiplos contextos, incluindo déficits na reciprocidade social, em comportamentos não verbais de comunicação usados para interação social e em habilidades para desenvolver, manter e compreender relacionamentos. Além dos déficits na comunicação social, o diagnóstico do transtorno do espectro autista requer a manifestação de padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses ou atividades (**Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtorno Mentais – DSM-V**).

Ao diagnóstico de TEA, deve-se registrar as características clínicas individuais por meio do uso de especificadores:

- se há comprometimento intelectual concomitante;
- se apresenta comprometimento da linguagem concomitante;
- se está associado a alguma condição médica ou genética conhecida ou a fator ambiental;
- relatar os sintomas autistas: idade da primeira preocupação; com ou sem perda das habilidades estabelecidas e a gravidade.

Desde as primeiras descrições realizadas por Kanner em 1943 e os casos relatados por Asperger em 1944, há um predomínio do sexo masculino nos casos de TEA. O consenso atual relata a proporção de 4:1 (sexo masculino: sexo feminino) (Maenner et al., 2020). Entretanto, observa-se que o quociente de inteligência modifica essa proporção, ao trazer equivalência entre os sexos.

A literatura descreve que existam mais casos de homens de alta funcionalidade, entretanto, entre os casos com deficiência intelectual grave (DI), homens e mulheres são igualmente representados (Volkmar et al., 1993; Yeargin-Allsopp et al., 2003; Banach et al., 2009; Fombonne et al., 1999).

Além do viés masculino na prevalência do TEA, existem diferenças fenotípicas entre os sexos. A literatura aponta, portanto, que o sexo masculino externalize mais alterações do comportamento como: agressividade, comportamento hiperativo e pró-social reduzido, também aumento de interesses repetitivos e restritos (Hattier et al., 2011; Mandy et al., 2012., Szatmari et al., 2012; Bolte et al., 2011; Giarelli et al., 2010). Entretanto, o sexo feminino apresenta sintomas como ansiedade, depressão e outros sintomas emocionais relatados pelos pais, que são menos externalizados e podem ser menos detectados (Mandy et al., 2012; Solomon et al., 2012).

A proporção entre os sexos, com viés masculino, poderia ser explicada pelo quadro clínico mais exuberante ao diagnóstico, além dos elementos fenotípicos específicos relatos acima.

I.2: Aspectos relativos à genética do TEA

Mais estudos foram desenvolvidos, então, para compreender a fisiopatologia do TEA, Folstein e Rutter em 1977, descreveram suas observações sobre casos familiares, e enfatizaram o envolvimento genético, pois observara que a frequência entre irmãos era 50 vezes maior do que na população e a concordância entre gêmeos monozigóticos seria de 36%. Relatos sobre a hereditariedade em estudos familiares apontam que esta é estimada próxima de 90% e haveria pouca contribuição do meio ambiente (Tick et al., 2016; Sandin et al., 2017).

Adicionalmente aos estudos familiares foram iniciadas investigações sobre a genética molecular do TEA, o que aumentou o conhecimento sobre número de genes envolvidos, e cresceu a quantidade de ensaios relacionados à fisiopatologia (Huguet; Benabou; Bourgeron, 2016; Lord Et Al., 2020; Pinto Et Al., 2014; Rubeis Et Al., 2014) Após estudos relativos a genética do TEA, a arquitetura deste transtorno pode ser entendida como complexa e heterogênea.

Existem atualmente modelos para explicar a genética do autismo: modelo monogênico, no qual uma variante rara de alto impacto é suficiente para desencadear o fenótipo; o modelo oligogênico, o qual necessita da interação de poucos genes, com atuação sinérgica e o modelo poligênico ou multifatorial, o qual estabelece a interação entre variantes comuns e fatores ambientais (Bourgeron, 2015; Griesi-Oliveira e Sertié, 2017; Toma, 2020).

Há estudos de cariotipagem que já documentavam anormalidades cromossômicas em alguns casos de autismo (Gillberg e Wahlstrom, 1985). Após o sequenciamento do genoma humano (Lander et al. 2001; Venter et al. 2001) e a disponibilidade de *genotyping microarrays* outros loci de suscetibilidade foram assim identificados (IMGSAC, 1998; Barrett et al., 1999;

Buxbaum et al., 2001; *International Molecular Genetic Study of Autism Consortium* [IMGSAC], 2001; Liu et al., 2001; Auranen et al., 2002; Lamb et al., 2002; Shao et al., 2003; Risch et al., 2014).

As CNVs são variantes estruturais nos cromossomos, as quais incluem duplicações, deleções, translocações e inversões (Marshall et al., 2008), estas podem ser herdadas ou *De novo* (Thapar e Cooper, 2013). Estudos demonstraram que a presença de CNVs raras implicadas no autismo (Iafrate et al. 2004; Sebat et al. 2004; Feuk et al. 2006).

Em 2007 um ensaio identificou aumento de CNVs *De novo* em 195 casos de TEA versus 196 controles (Sebat et al. 2007). É importante observar que o aumento de CNVs *De novo* foi maior nas famílias, nas quais um único indivíduo é afetado por TEA, em comparação com famílias com múltiplos afetados por TEA. Esse ensaio com excesso de CNVs *De novo* em TEA foi replicado em várias coortes maiores e independentes (Pinto et al. 2010; Gilman et al. 2011; Sanders et al. 2011), incluindo a *Simons Simplex Collection* (SSC) de aproximadamente 2500 famílias com apenas 1 afetado (Fischbach e Lord 2010). Sebat et al., em 2007 publicaram um estudo sobre o papel das CNVs no TEA, este demonstra que as CNVs *De novo* são associadas ao autismo e foram encontradas em 10% dos pacientes da casuística.

A partir do desenvolvimento da captura do exoma com o *Next Generation Sequence* (NGS) resultou no sequenciamento completo do exoma (*whole exome sequencing* – WES). A redução dos custos de sequenciamento por amostra, portanto, foram o suficiente para permitir que vários indivíduos fossem analisados simultaneamente.

Assim, estudos iniciais destacaram o potencial do *WES* para identificar variantes de risco em famílias individuais ou pequenas coortes com atraso no desenvolvimento ou TEA (Aldahmesh et al. 2011; O'Roak et al. 2011; Sirmaci et al. 2011).

Artigos publicados no início de 2012, forneceram a primeira evidência robusta de que variantes de truncamento de proteínas de novo (PTVs) também estavam associadas ao TEA (Iossifov et al. 2012; Neale et al. 2012; O'Roak et al. 2012a; Sanders et al. 2012).

Aliado ao sucesso da descoberta de genes no TEA a produção crescente de estudos para entender a neurobiologia do TEA. A análise dos genes identificados aponta para dois grupos como: reguladores de expressão gênica e comunicação neuronal (Rubeis et al. 2014; Sanders et al. 2015). A relação entre esses dois grupos permanece incerta, embora a explicação mais simples seja que os reguladores da expressão gênica controlam a expressão dos genes envolvidos na comunicação neuronal (Sanders 2015).

Mesmo com o crescente número de estudos que ampliaram o conhecimento sobre os genes envolvidos, determinar precisamente quais áreas funcionais do SNC e os mecanismos que estão envolvidos no TEA, ainda são um desafio. Isto porque, as alterações na comunicação social, percepção e habilidade de integrar os estímulos sensoriais são elementos complexos que integram áreas diversas do cérebro. Para compreender melhor essa integração, estudos foram realizados e observaram o crescimento anormal do encéfalo (medidos pelo perímetro cefálico) e interconectividade neuronal alterada (Courchesne e Pierce, 2005; Just et al 2007).

Outro fenômeno descrito relacionado à fisiopatologia do TEA, é a plasticidade neuronal em modelos animal e celular que observaram uma menor plasticidade das interconecções neuronais (Ebert e Greenberg, 2013; Neale et al., 2012; O'Roak et al., 2012; Krumm et al., 2014; Samocha et al., 2014; Iossifov et al., 2014; De Rubei et al., 2014).

Outros ensaios em modelo animal mostraram que genes de risco para o TEA regulam a atividade neuronal e seus produtos modulam a atividade sináptica e número de sinapses formadas (Sudhof, 2008; Auerbach et al., 2011; Toro et al., 2010; Ramocki et al., 2008; Markram et al., 2007). A hipótese relacionada a esses achados seria que as variantes levam à distorção da conectividade neuronal típica (Hahamy et al., 2015). Isto, portanto, aumentaria o

risco de TEA (Auerbach et al., 2011; Belmonte e Bourgeron, 2006), e desta forma, as alterações atípicas adaptativas ao estímulo, seriam percebidas durante as interações sociais (Toro et al., 2010; Ramocki et al., 2008; Markram et al., 2007).

A partir dos achados descritos é possível concluir que apesar da complexidade gênica observada nos estudos, algumas análises de enriquecimento revelaram que os genes envolvidos contribuem em vias específicas como: desenvolvimento do encéfalo, atividade neuronal, sinalização celular e regulação da transcrição (Pinto, et al., 2014; Krishnan et al., 2016; Wen et al., 2016; De Rubeis et al., 2014; Iossifov et al., 2014).

Há também a descrição de comprometimento nas funções sinápticas, vias de tradução e via de sinalização *WNT*, as quais foram identificadas como as três mais importantes vias afetadas pelas mutações em genes de risco para TEA (Bourgeron, 2015; Mullins et al., 2016; De la Torre-Ubieta et al., 2016).

A convergência de diversos genes relacionados ao TEA em vias moleculares comuns, poderia explicar como uma condição tão geneticamente heterogênea pode convergir em fenótipos similares (Quesnel-Vallières et al., 2019).

Recentemente, Trost et al., 2022, apresentaram um grande estudo a partir sequenciamento do genoma de 5100 indivíduos com TEA que visava contribuir para entendimento da arquitetura genética do TEA e possivelmente também para compreender a fisiopatologia através dos genes envolvidos. A partir do sequenciamento do genoma completo de 5100 indivíduos com TEA, foram identificadas 52% das variantes em genes nucleares, 46% eram variantes estruturais em genes nucleares e 2% variantes mitocondriais.

A partir destas evidências, o presente estudo pretende contribuir com a análise de uma casuística nacional, para o entendimento do TEA, a partir da apresentação de variantes *De novo*, de alto impacto no desenvolvimento do TEA e a análise de enriquecimento dos genes envolvidos em via moleculares relacionadas à fisiopatologia do TEA.

Banco de dados de variantes relacionadas ao TEA – o SFARI

O SFARI é um banco de dados que engloba informações sobre genes de risco relacionados ao autismo, é periodicamente atualizado com as novas informações disponíveis na literatura (Banerjee-Basu et al., 2010; Abrahams et al., 2013). É possível acessar as informações das seguintes maneiras:

- lista 1.231 genes implicados no autismo, com anotações e links para artigos publicados;
- Gene Scoring Module: oferece avaliação crítica da força da evidência para a associação de cada gene com o autismo;
- lista 17 loci de CNV recorrentes relatados em indivíduos com autismo;
- lista 1.353 linhagens de camundongos, incluindo modelos genéticos, linhagens endogâmicas, modelos induzidos por agentes biológicos ou químicos e linhagens de resgate (<https://www.sfari.org/resource/sfari-gene/#bottom>).

A lista de genes e o módulo Gene Scoring são importantes ferramentas para avaliar os genes já relacionados previamente, pois inclui qualquer gene associado ao risco de autismo, independentemente da natureza das evidências que apoiam seu vínculo com o TEA. Por incluir diversas fontes com número potencialmente grande de falsos positivos que foi estabelecido um sistema de classificação para a estimativa da força da evidência a favor de cada gene. As categorias deste escore são as que seguem:

-S: A categoria sindrômica inclui mutações que estão associadas a um grau substancial de risco aumentado e consistentemente ligadas a características adicionais não necessárias para um diagnóstico de TEA.

-Categoria 1: cada um desses genes foi claramente implicado no ASD, normalmente pela presença de pelo menos três variantes De novo relatadas na literatura que levam a uma proteína truncada ou códon prematuro de parada.

-Categoria 2: cada um dos genes apresenta duas variantes De novo relatadas na literatura que levam a uma proteína truncada ou códon prematuro de parada em um quadro clínico relacionado;

-Categoria 3: cada um dos genes apresenta uma variante De novo relatadas na literatura que levam a uma proteína truncada ou códon prematuro de parada em um quadro clínico relacionado;

-Categoria 4: para gene de pequena evidência;

-Categoria 5: para genes possivelmente relacionados, mas não testados; e

-Categoria 6: para genes que evidências não corroboram sua relevância para o TEA.

Para avaliação dos genes associados ao TEA são avaliadas variantes raras e comuns, e como há um número crescente de informação na literatura essa categorização permite a verificação das informações produzidas, portanto, a existência do módulo Gene Scoring iniciada pela Simons Foundation, contribuiu para padronização das informações entre os genes candidatos. Essa lista de genes foi utilizada para priorizar os genes na análise denominada neste estudo como análise SFARI.

Banco de dados de variantes relacionadas ao desenvolvimento – o DECIPHER

O DECIPHER (*Database of genomic variation and Phenotype in Humans using Ensembl Resources*) é um banco de dados que incorpora um conjunto de ferramentas projetadas para auxiliar na interpretação de variantes genômicas em doenças raras. Este banco contribui para aprimorar o diagnóstico clínico ao recuperar informações de uma variedade de recursos de bioinformática relevantes para uma variante encontrada em um paciente, é,, portanto, um

veículo para auxiliar os geneticistas clínicos na interpretação de resultados, para isso, existem mais de 270 centros que contribuem com informações e 36.000 casos no banco.

O estudo *Deciphering Developmental Disorders* (DDD), que é parte do DECIPHER, recrutou cerca de 14.000 crianças com graves distúrbios de desenvolvimento não diagnosticados e seus pais de todo o Reino Unido e Irlanda. As amostras foram avaliadas por *exon-array* CGH e exoma dos trios para investigar as causas genéticas do desenvolvimento anormal. Os resultados prováveis do diagnóstico foram relatados às equipes clínicas e disponibilizados publicamente via DECIPHER (<https://www.deciphergenomics.org/ddd/overview>).

O *Development Disorder Genotype - Phenotype Database* (DDG2P) é uma lista com curadoria dos genes relatados, associados a transtorno do desenvolvimento, compilada por médicos como parte do estudo DDD para facilitar a identificação clínica de prováveis variantes causais. O DDG2P é categorizado no nível de certeza de que o gene causa doença de desenvolvimento (por exemplo, Definitivo, Forte), a consequência de uma mutação (por exemplo, Produto de gene ausente, Estrutura do produto de gene alterada) e o status alélico associado à doença (por exemplo, Monoalélico, Bialélico) (<https://www.deciphergenomics.org/ddd/ddgenes>). Essa lista foi utilizada para priorizar os genes na análise de Transtornos do desenvolvimento (TD) no presente estudo.

Objetivos

O principal objetivo deste estudo foi verificar qual a relevância da contribuição de variantes patogênicas *De novo* em genes de risco para autismo em uma coorte de famílias brasileiras que apresentavam probandos diagnosticados com TEA.

Para atingirmos este objetivo, desenvolvemos as seguintes etapas:

1. Características epidemiológicas relacionadas ao fenótipo: gênero do acometido, idade parental no momento da concepção, marcos do neurodesenvolvimento dos probandos, comorbidades neuropsiquiátricas;
2. Identificação de variantes *De novo* deletérias em genes candidatos: genes *SFARI* e genes descritos no banco *DECIPHER*, relacionados ao neurodesenvolvimento.
3. Observação a partir dos genes que apresentaram variantes deletérias possíveis processos celulares relacionados, a partir de análises de enriquecimento.
4. Caracterização clínica dos indivíduos com variante patogênica de novo.

Metodologia

- Casuística:

O Comitê de ética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo aprovou o projeto e todos os participantes leram e consentiram através do termo de consentimento livre e esclarecido. Os 63 probandos preenchiam critérios diagnósticos do Manual de Diagnóstico e Estatística de Doenças Mentais (DSM-V) e *Childhood Autism Rating Scale* (CARS) que foi aplicada por psicólogos treinados. Todos os probandos do sexo masculino afetados por expansão do X Frágil foram excluídos da casuística.

- Dados descritivos da casuística:

Foi realizada análise descritiva da amostra de indivíduos participantes. Foram coletados dados do prontuário disponível no Centro de estudos do Genoma Humano, a partir dos atendimentos já realizados. Realizou-se coleta das seguintes informações: identificação, idade em anos na consulta, gênero, antecedente familiar TEA, antecedente familiar doença psiquiátrica, idade da mãe na concepção, idade do pai na concepção, atraso no desenvolvimento da linguagem, outros atrasos do DNPM, diagnóstico do probando de TDAH e Epilepsia, a classificação do prontuário: TEA síndrômico ou não-sindrômico (isolado) e a presença de dismorfismos craniofaciais. Os dados foram anotados em planilhas do Excel® e calculadas frequências numéricas e porcentagens. Também foram calculadas para as idades médias, desvio padrão e mediana.¹

- Sequenciamento completo do exoma e análise bioinformática

Realizou-se a análise de variantes *De novo* em dados de sequenciamento de exoma completo de 63 trios brasileiros atendidos no Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco (CEGH-CEL) entre 2011-2019.

Todas as amostras de DNA dos 63 trios (n= 189) foram processadas usando o kit *TruSeq Exome Library Prep* ou o kit *Nextera Rapid Capture Exome* (Illumina, Inc., Califórnia, EUA), ambos os kits cobrem 45Mb de conteúdo exônico ($\geq 98\%$ do conteúdo de codificação *RefSeq*, *CCDS* e *Ensembl*) e foram preparados seguindo as recomendações do fabricante. As bibliotecas foram sequenciadas com o sequenciador *Illumina HiSeq 2500* em leituras pareadas de

¹ Foram realizadas apenas coletas de dados a partir do prontuário.

aproximadamente 100pb. Alinhamentos de sequência para a referência do genoma humano (UCSC hg38) foram realizados com *Burrows-Wheeler Aligner*.

- Fluxograma para análise das variantes:



Figura 1 - metodologia: Apresenta o fluxograma da análise das variantes *De novo* neste estudo, modificado de Wang et al 2019.

A análise de variantes foi realizada segundo o fluxograma acima a partir do modelo já descrito anteriormente (Wang et al., 2019), foi realizado o *upload* dos dados brutos para o programa LOVD (Leiden Open Variation Database for Diagnostics), e neste, então, feito o procedimento de chamada das variantes *De novo* (*variants calling*), os dados foram anotados e realizada filtragem segundo critérios:

- frequência populacional menor que 1% (*gnomAD*¹ e *ABraOM*²);
- balanço alélico entre 0,2 - 0,8;
- localização das variantes no probando com profundidade de 15 *reads* ou mais;
- localização da variante nos pais com profundidade de 10 ou mais *reads*;
- analisadas variantes *De novo*, em sítio canônico de *splicing* canônico e regiões codificadoras de proteínas, como missense, ganho/perda de *stop códon* e frameshift;
- todas as variantes foram inspecionadas visualmente usando o *software Integrative Genomics Viewer (IGV)*.
- as variantes que apresentaram profundidade menor que 30 *reads* ou menos foram validadas pelo método de sequenciamento de Sanger.

Na primeira análise foram considerados genes descritos no banco de Dados *SFARI*³, o qual fornece escores como os descritos: (S) para genes associados a casos síndromicos de TEA; (1) para genes de alta confiança; (2) para genes candidatos fortes; (3) para genes com

evidências sugestivas; (4) para gene de pequena evidência; (5) para genes possivelmente relacionados, mas não testados; e (6) para genes que evidências não corroboram sua relevância para o TEA. Para as variantes ditas não-*SFARI*, foram priorizados genes relacionados ao desenvolvimento, que não estavam categorizados no banco *SFARI*, presentes no banco *DECIFER*⁴.

- Análise das variantes

Para a análise de predição deletéria das variantes *De novo*, foram utilizadas as seguintes ferramentas: *Varsome*⁴, *UniProt*⁵, *GeneCard*⁶, *CADD*⁷, *poliphen*⁸, *sift*⁹, *gnomAD*, *ABraOM*, *VEP/Revel*¹⁰, *ClinVar*¹¹, *Omin*¹² e os dados da literatura descritos no pubmed ou google scholar.

- Categorização das variantes missense

Foi considerada análise in silico como a maior parte dos preditores (cinquenta por cento mais 1) com efeito deletério. Preditores: *SIFT*, *SIFT4G*, *PROVEAN*, *MVP*, *MutPred*, *PrimateAI*, *FATHMM-MKL*, *FATHMM-XF*, *DEOGEN2*, *M-CAP*, *EIGEN*, *EIGEN PC*, *EVE*, *LIST-S2*, *MutationTaster*, *Mutation assessor*, *FATHMM*, *LRT*, *DANN*, *BLOSUM*, presentes no agregador *Varsome*.

- Classificação das variantes segundo o guia de padrões e *guidelines* para sequência de variantes:

A categorização das variantes seguiu o guia de orientação publicado pela *American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology* (Richards et al., 2015).

- Validação de variantes *De novo* pelo método Sanger

Variante *De novo* foram validadas pelo método Sanger usando *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, os amplicons foram sequenciados em um analisador de *DNA ABI 3730* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) e os dados foram analisados com o *Software Sequencher® DNA 5.1*.

- Análise de enriquecimento

As análises foram realizadas através do programa *Metascape* (Zhou et al., 2019) o qual permite análises bioinformáticas a partir de listas de genes e proteínas. O *Metascape* aplica um fluxo de trabalho de análise genérico chamado *CAME*, que é descrito a seguir:

C: conversão de identificação (ID), a qual converte identificadores do gene de entrada em IDs de gene de uma espécie-alvo, pois análises subsequentes dependem de IDs do gene.

A: a anotação extrai colunas para a lista de genes, incluindo descrições de genes, funções e classes de proteínas.

M: *membership*, sinaliza genes de interesse, por exemplo, genes que se enquadram nos termos do processo biológico que contém "invasão" como palavra-chave.

E: *enrichment analysis* / Análise de enriquecimento de função da lista de genes, identifica caminhos que possuem valores *p* estatisticamente significativos.

Os dados foram processados e anotados, primeiro para as variantes *De novo* patogênicas dos genes obtidos da análise *SFARI* e TND, posteriormente só para os genes obtidos da análise dos TND.

Resultados

Caracterização da casuística:

A partir dos dados avaliados dos indivíduos do estudo observou-se que a maior parte dos probandos eram meninos (N= 58/63, 92%), a minoria apresentava antecedente familiar de TEA (N=4/63, 6%). Nessa casuística, 40% (N=25/63) de crianças com atraso no desenvolvimento da linguagem, poucos apresentavam comorbidades como epilepsia e TDAH (N=6, 10% e N= 2, 3%; respectivamente) (Tabela 1).

É possível observar também: há 6% (N=4/63) indivíduos com antecedente familiar de doenças psiquiátricas, 13% (N=8/63) de crianças que apresentaram algum atraso do DNPM, não seja o domínio linguagem, apenas 2% (N=1/63) foram classificados como síndromicos e 13% (N=8) dos pacientes apresentavam algum dismorfismo craniofacial (Tabela 1).²

Notou-se que a idade média da 1ª. Avaliação dos probandos foi de 11 anos. Observou-se adicionalmente que a idade parental média no momento da gestação do probando está em torno de 30 anos para ambos os genitores (29,7: idade materna e 32,5: idade paterna, respectivamente) (Tabela 1C).

Quanto à idade parental ainda é possível observar na figura 1, que 26,83% (N=11/63) possuíam idade entre 31 e 35 anos; 29,2% (N=12/63) deles apresentavam idade superior a 35 anos. Somados, então, seriam 56,03% (N=23/63) dos pais com idade acima de 30 anos. Observa-se na figura 2, em relação a idade materna: 31,71% (N=13/63) apresentava idade entre

² Os anexos do presente estudo apresentam o relato de cada indivíduo avaliado com variantes patogênicas e provavelmente patogênicas detalhadamente, segundo o prontuário disponível no CEGH.

31 e 35 anos, e 17,07% (N=7) idade superior a 35 anos. Assim é possível demonstrar que 48,78% das mães possuíam idade superior a 30 anos.

Na tabela 2, é possível observar os dados descritivos dos probandos que apresentam variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas. Todos são do sexo masculino, apresentam TEA isolado, dismorfismos craniofaciais não apresentam antecedente familiar de TEA ou outra doença psiquiátrica, apenas 1 não apresentou atraso no desenvolvimento da linguagem, idade dos genitores próxima de 30 anos.

Caracterização das variantes *De novo* e análise de enriquecimento

A partir dos casos avaliados nota-se que o número de variantes *De novo* é, nenhuma, 1 ou 2 duas variantes por indivíduo, de acordo com critérios estabelecidos na metodologia, em genes *SFARI* ou do TND.

A tabela 1 e 2 apresentam as variantes encontradas em genes *SFARI* e do Transtorno do Desenvolvimento (TD), classificadas segundo os critérios da *American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology* (Richards et al., 2015) em: patogênicas, provavelmente patogênicas, variantes de significado incerto (VUS).

A partir das variantes patogênicas e provavelmente patogênicas procedeu-se a análise enriquecimento gênico, para observar quais processos celulares estariam envolvidos. Há, portanto, quando analisados os genes tanto *SFARI* quanto TND com variantes deletérias um enriquecimento em vias relacionadas ao transporte intracelular de proteínas (figura 4). Genes que possuem vias enriquecidas: *NF1*, *BRSK2*, *DNAH17*, *HUWE1*.

Há correlações com quadro clínicos relacionados aos genes como: comportamento autístico, atraso no desenvolvimento da linguagem e deficiência intelectual (*autistic behavior*,

delayed speech language development, moderate intellectual disability, respectivamente), conforme demonstrado na figura 5.

Tabelas 1A, 1B e 1C:

		Dados descritivos da amostra						
1A	Gênero	F	M	total	F%	M%		
		5	58	63	8%	92%		
1B		sim	não	NI	total	sim%	não%	NI
	AFASD	4	52	7	63	6%	83%	11%
	AFDP	4	49	10	63	6%	78%	16%
	AD ling.	25	2	36	63	40%	3%	57%
	ADNMP	8	43	12	63	13%	68%	19%
	TDAH	6	53	4	63	10%	84%	6%
	Epilepsia	2	56	5	63	3%	89%	8%
	Sindrômico	1	59	3	63	2%	94%	5%
	Dism CF	8	51	4	63	13%	81%	6%
1C			criança	mãe	pai			
	Mediana		10	30	31			
	Média		11,3	29,7	32,5			
	Desvio padrão		5,87	5,91	6,44			

Legenda: (1A e 1B). As tabelas apresentam os dados clínicos da casuística estudada, conforme a legenda: F: sexo feminino; M: sexo masculino; NI: não informado nos registros do indivíduo; AFTEA: antecedente familiar de TEA. AF DP: antecedente familiar de outra doença psiquiátrica. AD ling.: atraso no desenvolvimento linguagem. ADNPM: outros atrasos do neurodesenvolvimento. Dism CF: dismorfismo craniofacial. (1C). Também apresenta as médias e medianas de idades da criança na consulta, mãe e pai na concepção.³

³ Nessa tabela foram incluídas todas as informações, assim como as não obtidas na revisão do prontuário pelo autor, há a tabela anexa 4, que subtrai essa informação. Foi considerado relevante a presença de informações não obtidas como parte de todo trabalho que realiza revisão dos dados já existentes.

	N	%
Total	41	100,00%
< ou = 30	18	43,90%
31-35	11	26,83%
> ou = 36	12	29,27%

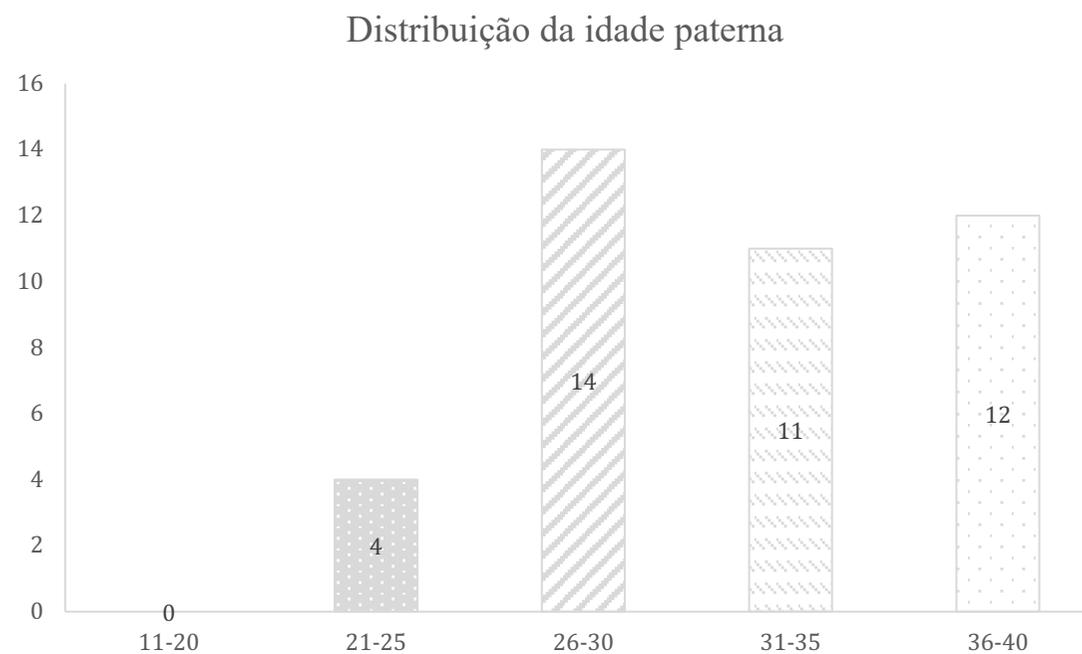


Figura 1: Apresenta a distribuição da idade paterna informada, é possível observar que 56,1% dos pais apresentavam idade maior que 30 anos.

Idade	N	%
Total	41	100,00%
< ou = 30	21	51,22%
31-35	13	31,71%
> ou = 36	7	17,07%

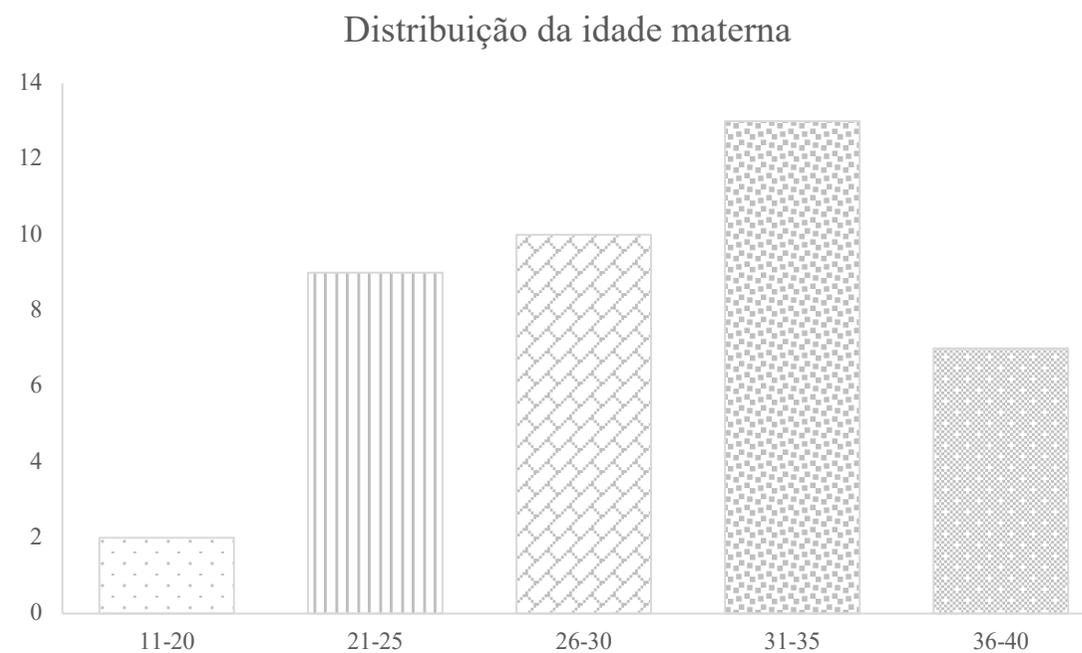


Figura 2: A figura 3 apresenta a distribuição das idades informadas maternas, observa-se que 48,78% das genitoras apresentavam idade superior a 30 anos de idade.

Tabela 2: Dados descritivos relacionados aos probandos com variantes patogênicas e provavelmente patogênicas:

Id	Id cons.	Gênero	AF TEA	AF PQ	Id mãe	Id Pai	AD ling.	ADNPM	TDAH	Epilepsia	TEA	Dism CF
15	10	M	N	N	-	-	S	N	N	S	I	N
23	7	M	N	N	31	39	S	N	N	N	I	N
35	2	M	N	N	32	37	S	S	N	N	I	N
54	17	M	N	N	32	29	S	N	S	N	I	N
55	10	M	N	S	39	45	S	N	N	N	I	N
62	12	M	N	N	-	-	S	N	N	N	I	N
21	15	M	N	N	-	-	N	S	N	N	I	N
23	7	M	N	N	31	39	S	N	N	N	I	N
45	8	M	N	N	-	-	S	N	N	N	I	N

Legenda: Id cons. – idade na consulta; AF TEA – antecedente familiar TEA; AF PQ – antecedente familiar de doença psiquiátrica; Id mãe – idade da mãe no momento da concepção; Id pai – Idade do pai no momento da concepção; AD ling. – atraso no desenvolvimento da linguagem; ADNPM – outros atrasos do desenvolvimento; TDAH – transtorno do déficit de atenção e hiperatividade; Dism CF – dismorfismo craniofacial.

Tabela 3: Resumo das características epidemiológicas.

- Maior parte não tem antecedente familiar de TEA e doença psiquiátrica;
- Aproximadamente 40% apresentam atraso no desenvolvimento da linguagem;
- Comorbidades como TDAH e epilepsia e dismorfismo crânio facial são pouco frequentes nessa casuística;
- Maior parte do TEA na casuística é idiopático (92%) – autismo não-sindrômico;
- Aproximadamente 60% dos pais têm acima de 30 anos e 30% acima de 35 anos;
- Aproximadamente 25% das mães apresentam idade acima de 30 anos.

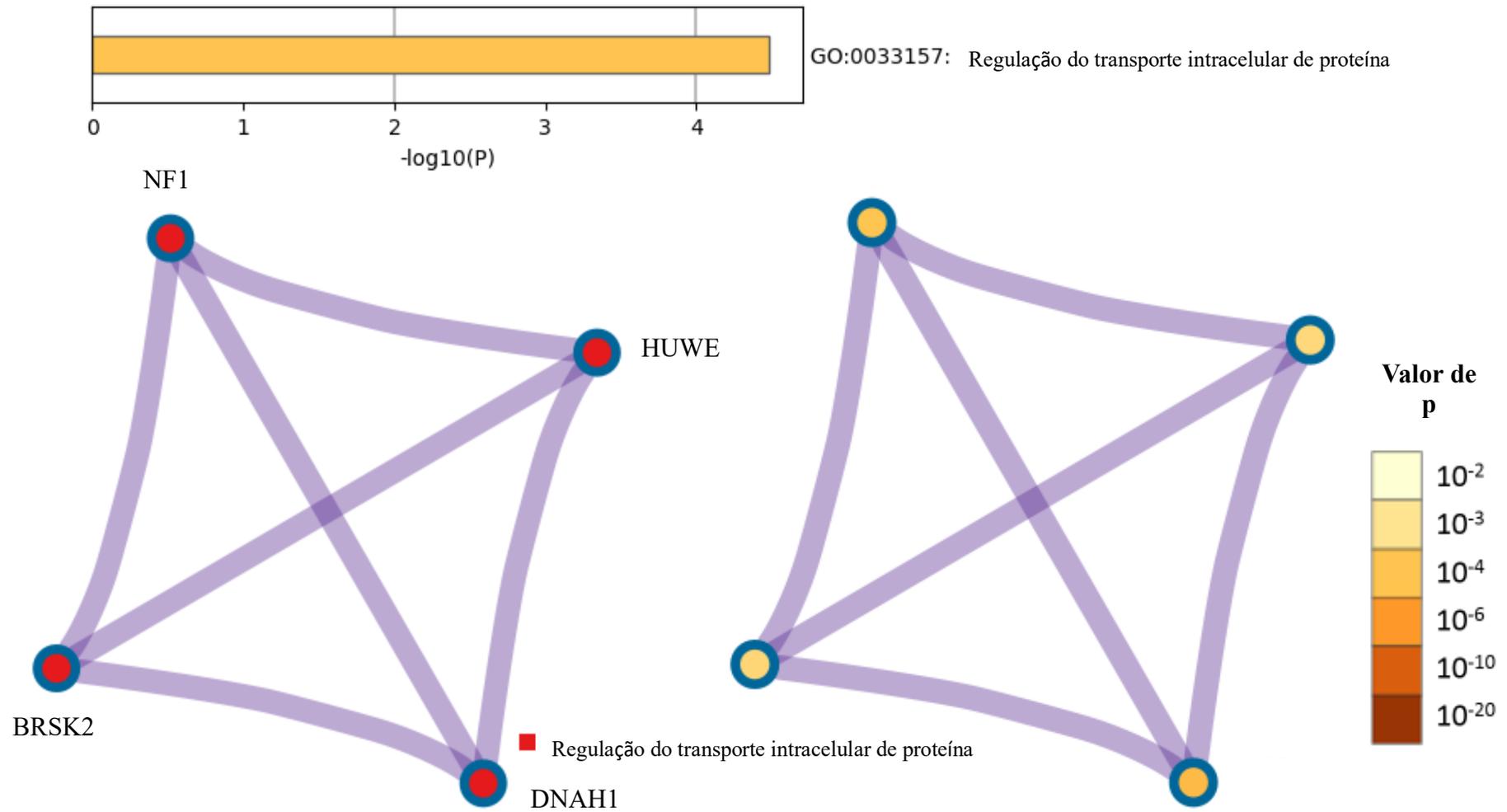


Figura 4: Apresenta a análise de enriquecimento dos genes analisados, que nesse caso estão relacionados a regulação do transporte intracelular de proteína, na legenda do valor de p, quanto mais intensa a cor, mais significativo é o valor de p.

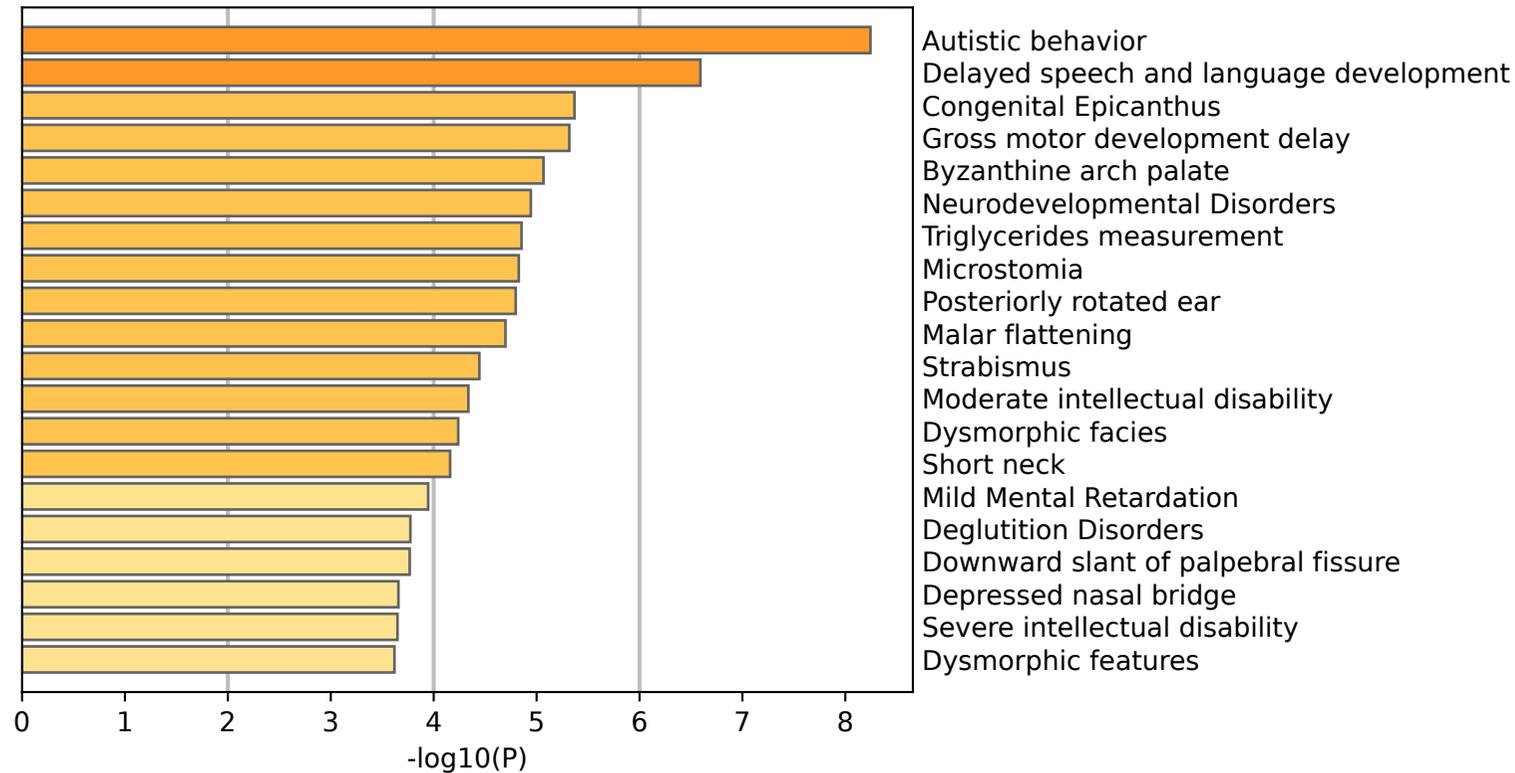


Figura 5: Os enriquecimentos da lista de genes são identificados nas seguintes categorias de ontologia: DisGeNET, Transcription_Factor_Targets. Termos com um valor $p < 0,01$, uma contagem mínima de 3 e um fator de enriquecimento $> 1,5$ (o fator de enriquecimento é a razão entre as contagens observadas e as contagens esperadas por acaso) são coletados e agrupados em *clusters* com base em suas semelhanças de associação na figura acima. Observa-se a correlação com comportamento autístico, atraso no desenvolvimento da linguagem e deficiência intelectual (*autistic behavior*, *delayed speech language development*, *moderate intellectual disability* respectivamente).

Tabela 4: (A) Variantes obtidas da análise realizada em genes SFARI.

Id	Cromossomo	Gene	Posição genômica (hg38 / GRCh38) ²	dbSNP	Tipo	Escore SFARI	GnomAD freq	ABraOM freq	Read depth probando	Read depth pai	Read depth mãe	Classificação ACMG
15	17	NF1	g.31181482T>C	rs199474756	SNV - missense	1S	-	-	46	37	34	Patogenica
23	14	ARHGAP5	g.32093953T>C	rs780538538	SNV - missense	2	-	-	81	36	37	P. Patogenica
35	17	TLK2	g.62481156C>T	-	SNV - missense	1S	-	-	32	38	35	Patogenica
54	X	HUWE1	g.53562896_53562910del	-	deleção - in frame	S	-	-	48	47	87	P. Patogenica
55	17	DNAH17	g.78428653_78428656del	-	deleção - in frame	2	-	-	125	67	48	Patogenica
59	4	CPZ	g.8607394_8607396del	rs765895956	deleção - in frame	2	-	-	55	37	45	VUS
62	11	BRSK2	g.1445436_1445437insT	-	inserção - frameshift	1S	-	-	220	96	112	Patogenica

(B) Variantes obtidas da análise em genes do TD.

Id	Cromossomo	Gene	Posição genômica (hg38 / GRCh38) ²	dbSNP	Tipo	GnomAD freq	ABraOM freq	Read depth probando	Read depth pai	Read depth mãe	Classificação ACMG
54	2	CPS1	g.210656519del	rs1227787744	deleção - não codificante	0,00156	-	41	71	69	VUS
57	22	DEPDC5	g.31822795C>T	rs867767866	SNV - não codificante	-	-	58	37	39	VUS
19	12	KMT2D	g.49027187T>G	rs1165012136	SNV - missense	0	-	41	65	80	VUS
21	8	ERLIN2	g.37741802G>A	-	SNV - missense	0,00000657	-	71	53	85	Patogenica
23	1	ST3GAL3	g.43736342C>T	rs751825349	SNV - missense	0,00000398	-	147	83	91	Patogenica
47	8	PLEC	g.143925589C>G	-	SNV - missense	-	-	193	136	124	VUS
46	2	FN1	g.215424331A>G	rs1465415211	SNV - não codificante	0,00000796	-	47	45	40	VUS
45	1	COL11A1	g.102962695_102962696insCCAGGAGGG	-	inserção - inframe	-	-	66	41	46	P. Patogenica
439	11	LTBP3	g.65540296G>A	-	SNV - missense	-	-	192	112	87	VUS

⁴ Foram consideradas as posições genômicas, referência hg38, pois não variam de acordo com o transcrito, há, portanto, menor risco de divergências. As análises das variantes são dinâmicas e podem se modificar ao longo do tempo a partir de novas evidências, nos anexos há uma tabela com a revisão mais recente (maio de 2023) das análises.

Discussão

Caracterização da coorte

Há um predomínio do sexo masculino (N=55, 86%) na casuística avaliada neste estudo; de forma semelhante, ao observado nas primeiras descrições publicadas sobre o TEA. Nas primeiras descrições o relato seria de 8 dos 11 casos descritos por Kanner em 1943, e todos os 4 casos descritos por Asperger em 1944 seriam do sexo masculino. Atualmente existe um consenso sobre a proporção de 4:1 (sexo masculino: sexo feminino) (Maenner et al., 2020). Importante observar que o quociente de inteligência modifica essa proporção, ao trazer equivalência entre os sexos, uma vez que há uma maior proporção de homens com alta funcionalidade, entretanto, homens e mulheres são mais igualmente representados entre os casos com deficiência intelectual grave (DI) (Banach et al., 2009; Fombonne et al., 1999; Volkmar et al., 1993; Yeargin-Allsopp et al., 2003;).

Há um viés masculino na prevalência do TEA, mas também existem diferenças fenotípicas entre os sexos. Os estudos nesta área sugerem que meninos externalizam mais alterações do comportamento como: maior agressividade, comportamentos hiperativos, e pró-social reduzido, também aumento de interesses repetitivos e restritos (Hattier et al., 2011; Mandy et al., 2012., Szatmari et al., 2012; Bolte et al., 2011; Giarelli et al., 2010) do que as meninas. Entretanto, as meninas apresentam sintomas mais internos como ansiedade, depressão e outros sintomas emocionais relatados pelos pais (Mandy et al., 2012; Solomon et al., 2012). Isto poderia explicar a diferença na proporção entre os sexos, com viés masculino, já que os homens apresentariam um quadro clínico mais claro para o diagnóstico. Importante relatar, que neste estudo não foram coletados de forma sistemática dados sobre o comportamento dos probandos.

Existem ainda estudos que relatam diferenças quanto ao limiar para a apresentação fenotípica, assim, as mulheres teriam maior limiar para atingir o *status* afetado que os homens

(Jacquemont et al., 2014; Robinson et al., 2013). Assim, a hipótese seria que as mulheres possuem maior “carga” de variantes do que os homens afetados (Werling e Geschwind, 2013).

Alguns estudos indicam que variantes *De novo* (Berg et al., 2012) estão mais presentes no sexo feminino e que estas se tratam de variações estruturais, apresentam assim sinais e sintomas mais diversos e não só o TEA, pois, as CNVs alteram um número maior de genes (Constantino et al., 2010., Sebat et al., 2007., Levy et al., 2011; Sanders et al., 2011;), e contribuem para um quadro clínico possivelmente mais complexo e grave.

Outra questão importante é que os indivíduos com TEA apresentam sobreposição com outros transtornos do neurodesenvolvimento (Lau-Zhu, et al., 2019 Sumner et al., 2016). De fato, verificou-se nos indivíduos com TEA uma frequência de 10% de TDAH. A literatura, também, relata a mesma sobreposição entre TEA e TDAH, entre 15 e 40% dos casos relatados em algumas casuísticas (Strømme et al., 2000; La Malfa et al., 2004; Bryson et al., 2008; de Bildt et al., 2004).

Outras condições, também, estão associadas ao TEA, além do TDAH, assim como outros transtornos neuropsiquiátricos. A epilepsia e a esquizofrenia são os transtornos mais relevantes associados; na amostra reportada neste estudo, há presença de 3% de epilepsia entre os probandos. Entretanto, na literatura há relatos variáveis, entre 5-46% dos indivíduos com TEA (Ewen et al., 2019). Mas, adicionalmente, é descrito que 30% das crianças com epilepsia preenchem critério para TEA (Keller et al., 2017).

Outra característica relacionada ao neurodesenvolvimento observada neste grupo foi o desenvolvimento da fala, uma das habilidades sociais de comunicação, a qual compõe o conjunto de sinais e sintomas do TEA. No grupo estudado observou-se que 40% das crianças apresentam atraso no desenvolvimento da linguagem, todos afetados do sexo masculino. Previamente, os estudos mostraram a relação entre as funções executivas e a linguagem, e que ambas teriam impacto nas habilidades de comunicação oral nos indivíduos com TEA (Akbar

et al., 2013; Friedman et al., 2019). Os indivíduos com TEA podem exibir grande variabilidade de comprometimento desses domínios cognitivos (Pellicano et al., 2016; Leung et al., 2014; Hill, 2004; Kenworthy et al., 2008).

Outra característica a se apontar seria o antecedente familiar de doenças psiquiátricas nos indivíduos estudados que estava presente em 6% da amostra. A literatura aponta associação familiar e genética, não apenas com outros transtornos do neurodesenvolvimento, mas também com outros transtornos psiquiátricos, como ansiedade, depressão e automutilação intencional com o TEA (Ghirardi et al., 2021; Jokiranta-Olkonieni et al., 2016; Xie et al., 2019).

Também se salienta o dado observado desta amostra em que há 13% dos indivíduos com algum atraso do DNPM forma semelhante ao que já foi descrito previamente. O atraso global do desenvolvimento ou desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM), o qual é definido como deficiência em crianças menores de 5 anos, que apresente aparecimento dos marcos do desenvolvimento mais tardiamente, em dois ou mais domínios que incluem: motor, fala/linguagem, cognitivo e social, atividades de vida diária (Shevell et al., 2003), podem estar presente de forma variável (Landa, 2007; Lord et al., 2004), e 30% podem ter deficiência intelectual associada (Baio et al., 2014).

A idade parental foi analisada no atual estudo, e foi possível avaliar que a idade média e mediana de ambos os genitores está próxima dos 30 anos. É possível observar um risco aumentado de apresentar filhos com TEA a partir dos 30 anos e um incremento maior para as mulheres acima dos 40 e pais acima dos 50 anos (Yu Gao et al., 2020). Isto coincide também com outros dados em que a idade avançada dos pais está associada ao risco aumentado de TEA em crianças (Durkin et al., 2008; Gretchen et al., 2009; Lampi et al., 2013; Parner et al., 2012).

A partir de ensaios sobre a idade parental são conhecidos diferentes mecanismos relacionados, à maior frequência de mutações *De novo* e alternâncias epigenéticas associados ao aumento da idade. Estes são os mecanismos mais frequentemente citados para explicar a

associação entre a idade paterna e o risco de TEA em crianças (Iossifov et al., 2012; Kong et al., 2012). Já para a idade materna e o risco de TEA em crianças estão associadas as seguintes alterações: altas taxas de anormalidades cromossômicas, complicações perinatais e obstétricas, e possíveis alterações genômicas e/ou epigenéticas induzidas pela exposição a toxinas ambientais (Sandin et al., 2012).

Caracterização das variantes *De novo* e análise de enriquecimento

Foram observadas 7 variantes em genes SFARI (4 Patogênicas, 2 Provavelmente patogênica, 1 VUS) e 9 variantes em genes do TD (2 Patogênicas, 1 Provavelmente patogênica e 6 VUS).

Considerando essas informações: foram observadas 4 variantes patogênicas, incidência 6,34% na casuística, nos genes NF1, TLK2, DNAH17, BRSK2 e 2 variantes provavelmente patogênicas em ARHGAP5 e HUWE1. Este dado é semelhante ao já descrito previamente na literatura (Sebat et al., 2007; Sanders et al., 2015; Sanders et al., 2012; Satterstrom et al., 2019).

Para caracterização das variantes *De novo* foram observadas variantes deletérias em genes SFARI através do sequenciamento do exoma dos indivíduos, pois é conhecido que uma variante rara *De novo* em um gene altamente restrito pode conferir grande risco para um indivíduo portador dessa variante, como é possível observar nessa coorte (De Rubeis et al., 2014; Iossifov et al., 2014; Sanders et al., 2015, Dias et al., 2020).

Adicionalmente, como já citado previamente, os genes SFARI compõem um banco de dados em evolução para a comunidade de pesquisa em autismo, contendo informações atualizadas sobre genes associados a transtornos do espectro autista.

Os genes que são score 1 SFARI foram apresentam variantes relatadas na literatura com associação forte ao TEA, como para os genes NF1, TLK2 e BRSK2; esses genes também recebem a categoria "S", a qual trata-se da categoria sindrômica, pois inclui variantes que estão associadas ao TEA consistentemente ligadas a características adicionais, como há evidência independente que os implica em um quadro clínico de TEA idiopático, é categorizado como "S" e o score independente.

O gene NF1 codifica a neurofibromina, uma proteína citoplasmática predominantemente expressa em neurônios, células de Schwann, oligodendrócitos e leucócitos. É uma proteína com a capacidade de regular vários processos intracelulares, incluindo a via

RAS-AMP cíclico, a cascata *ERK/MAP kinase*, adenilil-ciclase e a montagem do citoesqueleto (Trovo-Marqui e Tajara, 2006). O diagnóstico de neurofibromatose 1 (NF1) é realizado através da presença de uma variante patogênica heterozigótica no gene NF1 em um quadro clínico compatível. Trata-se de uma doença multissistêmica caracterizada por múltiplas máculas café com leite, sardas intertriginosas, múltiplos neurofibromas cutâneos e dificuldades de aprendizagem ou problemas de comportamento. Manifestações menos comuns, mas potencialmente mais graves, incluem nervo óptico e outros gliomas do sistema nervoso central, tumores malignos da bainha do nervo periférico, escoliose, displasia tibial, vasculopatia e doença gastrointestinal, endócrina ou pulmonar (Friedman, 1998). Como observado no probando 15, em sua descrição pormenorizada anexa a este estudo, é possível notar as características clínicas compatíveis com o que já foi descrito previamente.

Além disso, é possível notar que a variante, uma missense, já foi descrita previamente (rs199474756), está anotada no *clinvar* como patogênica e provavelmente patogênica. Também se nota que é um gene score SFARI 1S, está relacionado ao TEA, como a literatura previamente demonstra através de vários estudos (Marui et al., 2004; Chisholm et al., 2022; Zhou et al., 2022).

Em outro probando, número 35, foi observado variante patogênica no gene TLK2. As variantes patogênicas heterozigóticas no gene TLK2 podem causar a MRD57, a qual é um distúrbio do neurodesenvolvimento autossômico dominante com um fenótipo altamente variável. A maioria dos indivíduos afetados apresenta atraso no desenvolvimento psicomotor aparente na infância ou na primeira infância, atraso no desenvolvimento da linguagem e anormalidades comportamentais. Características adicionais podem incluir dismorfismos craniofaciais (Reijnders et al., 2018). O probando em questão, 35, apresentava prejuízo no desenvolvimento da linguagem e atraso nos marcos motores, além de déficits na comunicação e interação social e movimentos repetitivos durante a avaliação. Não há registros sobre o

quociente de inteligência. O quadro clínico neste caso como previamente descrito é bastante variável.

Uma variante de perda de função (LoF) de novo e uma variante missense danosa no gene *TLK2* foram identificadas previamente em probandos com TEA da Simons Simplex Collection (ORoak et al., 2011; Iossifov et al., 2014;). Também uma outra variante missense danosa neste gene foi identificada em um probando com TEA japonês em Takata et al., 2018. Duas variantes LoF de novo em *TLK2* foram identificadas em pacientes com deficiência intelectual do Radboud University Medical Center (RUMC) em Lelieveld et al., 2016. É possível observar, portanto, que variantes missense já foram relatadas previamente como mecanismo envolvido ao gene *TLK2*, assim embora a variante não esteja descrita previamente, seu mecanismo de atuação está.

O probando 55, apresenta uma variante que é uma deleção *in frame* no gene *DNAH17*, o que levaria a uma proteína truncada. O gene *DNAH17* codifica uma cadeia pesada associada à dineína axonemal (Milisav e Affara, 1998), As dineínas são complexos de proteínas motoras associadas a microtúbulos compostos por várias cadeias pesadas, leves e intermediárias. Uma variante patogênica mutação homocigótica ou heterocigótica composta no gene *DNAH17* pode causar a falha espermatogênica-39 (SPGF39). Além disso, foi descrito que uma variante sem sentido *de novo* no gene *DNAH17* foi identificada em um probando ASD do *Autism Sequencing Consortium* (De Rubeis et al., 2014); esta variante foi posteriormente determinada como uma variante em mosaico pós-zigótico (PZM) (Lim et al., 2017). Um segundo PZM não sinônimo neste gene foi identificado em um probando com TEA (Lim et al., 2017). Variantes missense no gene *DNAH17* que foram previstas como danosas e identificadas em probandos com TEA da *Simons Simplex Collection* (O'Roak et al., 2012; Iossifov et al., 2014), embora essas variantes também estejam presentes em bancos de dados externos, como como dbSNP. O pli observado seja 0,75, o que pode representar um gene sensível a perda de função, é também

uma variante que não está presente nos bancos de variáveis comuns, pode estar correlacionada ao quadro de TEA, e este gene é relatado como escore 2 no banco SFARI o que prediz uma evidência mais fraca quando comparado aos dois casos anteriormente relatados.

O gene *BRSK2* (BR Serine/Threonine Kinase 2) codifica uma proteína serina/treonina kinase que tem um papel importante na polarização dos neurônios, formação dos axônios, progresso do ciclo celular e secreção de insulina.

Uma variante perda de função no gene *BRSK2* foi identificada em um probando com TEA do *Autism Sequencing Consortium* (De Rubeis et al., 2014). Enquanto uma outra variante a qual trata-se de uma deleção *in-frame de novo* neste gene, foi observada em um probando com TEA da *Simons Simplex Collection* (Iossifov et al., 2014). Outras duas variantes perda de função *de novo* no gene *BRSK2* foram identificadas em probandos com TEA da coorte *SPARK* posteriormente (Feliciano et al., 2019). Adicionalmente identificou-se nove indivíduos com variantes raras heterozigóticas no gene *BRSK2* que apresentavam transtorno do neurodesenvolvimento caracterizado por atraso na fala, deficiência intelectual, atraso motor, autismo e anormalidades comportamentais (Hiatt et al., 2019).

O probando 62 dessa coorte que apresenta uma variante patogênica no gene *BRSK2* apresenta atraso do desenvolvimento, caracterizado por atraso na aquisição da fala e não apresentar controle esfinteriano quando esperado. A avaliação neuropsicológica o coloca como autismo leve ou deficiência intelectual. Esse quadro clínico é semelhante ao que já foi descrito previamente como exposto acima. Assim, ao apresentar uma variante (deleção *frameshift*) com perda de função, é possível considerar que está relacionada ao quadro clínico da criança.

Em conjunto, é possível observar a partir dessa primeira parte da análise, que foram encontradas variantes deletérias em genes representativos do banco SFARI com evidência mais

robusta na associação com TEA. Também é possível concluir que há correlação entre o fenótipo descrito previamente e o dos probandos.⁵

A segunda parte das análises foi dedicada a observar variantes deletérias em outros possíveis genes candidatos a genes *SFARI*. Portanto, foram escolhidos genes que estão na base de dados de distúrbios do desenvolvimento do *DECIPHER (Deciphering Developmental Disorders Study, 2015)*, o qual estudou 1.133 crianças com distúrbios de desenvolvimento graves não-diagnosticados e seus pais, usando uma combinação de sequenciamento de exoma e *Array-based* para detecção de rearranjos cromossômicos. A partir dessa lista de genes obteve-se variantes patogênicas nos seguintes genes *ERLIN2*, *ST3GAL3* e provavelmente patogênica *COL11A1*.

Ao observar individualmente cada gene e variante patogênica, o componente do complexo *ERLIN1/ERLIN2* está relacionado à degradação do retículo endoplasmático (RE) a qual remove proteínas aberrantes e nativas reguladas metabolicamente do RE (Pearce et al., 2007).

O fenótipo descrito previamente para *ERLIN2* é a paraplegia espástica-18 (SPG18) é uma doença neurológica autossômica recessiva grave caracterizada pelo início na primeira infância de paraplegia espástica progressiva, resultando em incapacidade motora. A maioria dos indivíduos afetados apresenta retardo psicomotor grave, neste caso com padrão de herança autossômico recessivo.

A mudança de sequência na variante descrita neste estudo substitui a valina pela isoleucina no códon 74 da proteína *ERLIN2* (p. Val74Ile). O resíduo de valina é altamente conservado e há uma pequena diferença físico-química entre valina e isoleucina. Esta variante

⁵ Os relatos clínicos pormenorizados dos probandos com variantes patogênicas e provavelmente patogênicas estão em anexos.

não está presente nos bancos de dados populacionais. Também foi observada essa variante missense em indivíduos com características clínicas de paraplegia espástica hereditária, e está descrita no *Clinvar*. Adicionalmente, algumas ferramentas sugerem que essa mutação alteraria a função (SIFT, PolyPhen-2).

Além dos relatos descritos previamente sobre acometimento da paraplegia espástica relacionada a esse gene como autossômica recessiva há também a descrição nesse mesmo gene de uma variante missense autossômico dominante (Park, 2020); ainda há na literatura relato que correlaciona esse gene ao TEA (Casanova et al., 2016).

Assim, a partir de estudos funcionais *in vitro* seria possível estudar mais claramente o papel desse gene na fisiopatologia do TEA, assim como das mutações na funcionalidade da proteína determinada por esse gene.

O gene ST3GAL3 codifica a proteína beta-galactosídeo-alfa-2,3-sialiltransferase-III, localizada na membrana do complexo de Golgi que forma o epítipo sialil Lewis a (sLe-a) em glicoproteínas; formam o glicocálix, composto por ácidos siálicos que atuam como pontos-chave de uma variedade de processos de comunicação e reconhecimento celular (Hu et al., 2011).

Relacionado ao gene ST3GAL3 duas síndromes com padrão de transmissão autossômico recessivo foram relatadas: desordem do desenvolvimento intelectual, autossômica recessiva número 12 (DDI-12) e a encefalopatia epiléptica e do desenvolvimento número 15 (EED-15). Para DDI-12 foram relatadas 2 famílias iranianas consanguíneas, mas não relacionadas, com prejuízo do desenvolvimento intelectual de leve a moderado não-sindrômico (Najmabadi et al., 2007; e Hu et al., 2011). Também relataram previamente 2 primos de primeiro grau de uma família iraniana consanguínea com desenvolvimento intelectual gravemente prejudicado não-sindrômico (Farajollahi et al., 2020).

Anteriormente foi reportado casos de EED-15 tais como de uma família palestina consanguínea, na qual 4 membros apresentaram encefalopatia epiléptica e alteração do desenvolvimento grave consistente com diagnóstico clínico de síndrome de West (Edvardson et al., 2013).

Indellicato et al. em 2020 relataram um par de gêmeos masculino e feminino com EED-15. O menino apresentou leve atraso neuropsicomotor aos 4 meses e 7 meses de idade e hipocinesia motora. Ele apresentou episódios de parada comportamental e desvio ocular, quadro clínico compatível com crise epiléptica e teve 2 eletroencefalogramas (EEG) anormais. Aos 18 meses de idade, ele houve hipotonia global e atraso do desenvolvimento na linguagem, e continuou a ter crises epilépticas apesar de medicação otimizada. A menina apresentou leve atraso neuropsicomotor e hiperexcitabilidade aos 4 meses de idade. Aos 8 meses de idade, ela teve episódios semelhantes aos do irmão de crises epilépticas e alterações no EEG. Aos 18 meses de idade, apresentou hipotonia global e atraso no desenvolvimento da linguagem, e as crises epilépticas foram controladas com fármacos anticrise.

Para a variante descrita neste estudo a mudança de sequência substitui a alanina por valina no códon 27 da proteína ST3GAL3 (p. Ala27Val). O resíduo de alanina é moderadamente conservado e há uma pequena diferença físico-química entre alanina e valina. É uma variante rara nos bancos de dados populacionais. Essa variante não foi relatada na literatura em indivíduos afetados em condições relacionadas ao ST3GAL3, que incluem encefalopatia epiléptica e deficiência intelectual citados anteriormente.

Há, entretanto, reportado estudos *in vitro* que revelaram que camundongos heterozigotos, com apenas um alelo inativado *st3gal3* machos. Estes exibem déficits cognitivos, enquanto as fêmeas mostram atividade aumentada, bem como controle cognitivo aumentado, em comparação com seus irmãos de ninhada de tipo selvagem. Além disso, foram observadas alterações sutis na expressão de vários marcadores implicados na

oligodendrogênese, formação de mielina e sialilação de proteínas, bem como glicoproteínas-alvo sinápticas/de adesão celular de *st3gal3* em uma região cerebral e/ou sexo-específica. Em conjunto, esses achados podem indicar que a haploinsuficiência de *st3gal3* resulta em uma alteração sexo dependente da cognição, comportamento e marcadores de plasticidade cerebral em modelos animais (Rivero et al., 2021). Assim, esse gene pode também ser um candidato a estudos adicionais de sua função no TEA, a partir das evidências citadas sobre modelos animais.

Previamente, já foi descrito que os genes de risco para o TEA estão envolvidos principalmente no funcionamento sináptico, localizados nos dendritos, axônios e partes das membranas celulares neuronais e tem funções notáveis na formação das sinapses, plasticidade sináptica e na regulação da atividade dos canais iônicos (O’Roak et al., 2012; Levy et al., 2011; Parikshak et al., 2013; Ben-David et al., 2013; Willsey et al., 2013; Satterstrom et al., 2020). Ao realizar a análise de enriquecimento gênico na população estudada, o objetivo seria verificar quais vias estariam enriquecidas e correlacionar com o conhecimento já disponível.

O transporte intracelular de proteínas foi observado, então, como via enriquecida relacionada aos genes que apresentavam variantes deletérias, o que também já foi descrito previamente em coortes maiores (Murtaza et al., 2022).

Assim, este estudo avaliou uma amostra de indivíduos com TEA para identificar variantes genes *SFARI* já descritos como de risco, e complementar o que já foi descrito previamente. Também avaliou possíveis genes candidatos descritos no banco do desenvolvimento do DECIPHER, e ainda verificou a possibilidade de compartilharem vias enriquecidas de mecanismos celulares.

Conclusões

A partir do presente estudo é possível concluir que:

- O TEA caracterizado nesta amostra está mais relacionado ao TEA isolado (não sindrômico) e há correlação com o atraso do desenvolvimento da linguagem.
- A avaliação por *WES* ampliou a possibilidade de diagnóstico genético ao implicar variantes de nucleotídeo único, como descrito previamente, o que possibilitou a identificação de variantes deletérias em genes já conhecidos que compõem o banco *SFARI*.
- Foi possível ampliar a identificação de genes candidatos ao priorizar genes relacionados ao desenvolvimento como proposto no presente estudo.
- A fisiopatologia do TEA envolve genes enriquecidos em diversos processos celulares como regulação do transporte intracelular de proteínas, descrito neste trabalho, alvo interessante para estudos funcionais.

Resumo

O presente ensaio teve como objetivo principal contribuir com a caracterização da arquitetura genética do TEA a partir de uma análise de uma casuística brasileira, que é ainda pouco estudada. Para atingirmos este objetivo, verificou-se qual a proporção de casos de TEA causados por variantes *de novo* em genes de neurodesenvolvimento (genes do banco *SFARI* e associados ao neurodesenvolvimento descritos no banco *DECIPHER*). Foram avaliados 63 trios, compostos pelos genitores e probandos com diagnóstico de TEA atendidos no Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco (CEGH-CEL, USP). A genealogia, os dados clínicos, sexo, idade na consulta, idade parental foram coletados. O sequenciamento de exoma completo foi realizado por meio de uma colaboração com Mount Sinai, NY, US (colaboração com o Autism Sequencing Consortium-ACS). A identificação de variantes *De novo* em genes candidatos para TEA foi realizada pelo programa LOVD (*LOVD v.3.0 - Leiden Open Variation Database*). Observou-se que a maior parte dos probandos eram meninos (N= 55, 86%) e a minoria apresentava antecedentes familiares de TEA (N=4, 6%). Também se verificou que 40% (N=25) dos indivíduos apresentavam atraso no desenvolvimento da linguagem e uma pequena porcentagem apresentava comorbidades como TDAH e epilepsia (N=6, 10% e N= 2, 3%; respectivamente). A idade parental média no momento da gestação foi próxima de 30 anos para ambos os genitores (29,7 e 32,5, da mãe e do pai respectivamente). Foram identificadas nove variantes de novo patogênicas ou potencialmente patogênicas em genes candidatos: para o TEA: seis em genes *SFARI* (quatro variantes patogênicas nos genes NF1, TLK2, DNAH17, BRSK2 e duas variantes provavelmente patogênicas em ARHGAP5 e HUWE1) e três em genes do neurodesenvolvimento do *DECIPHER* (*Deciphering Developmental Disorders Study, 2015*) (duas variantes patogênicas nos genes ERLIN2, ST3GAL3 e uma provavelmente patogênica no COL11A1). Ao realizar a análise de enriquecimento gênico dos genes com variantes patogênicas ou potencialmente patogênicas, observa-se o enriquecimento de genes de transporte intracelular de proteínas. O quadro clínico dos indivíduos com variantes patogênicas ou potencialmente patogênicas foi esperado, como descrições prévias da literatura. Este estudo sugere que variantes de novo são também um mecanismo importante para a etiologia de TEA no Brasil, explicando a arquitetura genética de 9,5 % dos casos. (Projeto CEPID/FAPESP 2013/08028-1).

Abstract

The main objective of this essay was to contribute to the characterization of the genetic architecture of ASD based on an analysis of a Brazilian series, which is still little studied. To achieve this goal, we verified the proportion of cases of ASD caused by de novo variants in neurodevelopment genes (genes from the SFARI bank and those associated with neurodevelopment described in the DECIPHER bank). Sixty-three trios were evaluated, composed of parents and probands diagnosed with ASD treated at the Human Genome and Stem Cell Studies Center (CEGH-CEL, USP). Genealogy, clinical data, gender, age at the consultation, and parental age were collected. Whole-exome sequencing was performed through a collaboration with Mount Sinai, NY, US (collaboration with the Autism Sequencing Consortium-ACS). Identification of De novo variants in candidate genes for ASD was performed using the LOVD program (LOVD v.3.0 - Leiden Open Variation Database). It was observed that most of the probands were boys (N= 55, 86%), and the minority had a family history of ASD (N=4, 6%). It was also found that 40% (N=25) of individuals had a delay in language development, and a small percentage had comorbidities such as ADHD and epilepsy (N=6, 10% and N= 2, 3%, respectively). The mean parental age at the time of pregnancy was close to 30 years for both parents (29.7 and 32.5 for the mother and father, respectively). Nine de novo pathogenic or potentially pathogenic variants were identified in candidate genes: for TEA: six in SFARI genes (four pathogenic variants in NF1, TLK2, DNAH17, BRSK2 genes, and two probably pathogenic variants in ARHGAP5 and HUWE1) and three in genes of neurodevelopment of DECIPHER (Deciphering Developmental Disorders Study, 2015) (two pathogenic variants in the ERLIN2, ST3GAL3 genes and one probably pathogenic in COL11A1). When performing the gene enrichment analysis of genes with pathogenic or potentially pathogenic variants, we observed the enrichment of genes for intracellular protein transport. The clinical picture of individuals with pathogenic or potentially pathogenic variants was expected, as previously described in the literature. This study suggests that de novo variants are also an essential mechanism for the etiology of ASD in Brazil, explaining the genetic architecture of 9.5% of cases. (Projeto CEPID/FAPESP **2013/08028-1**).

Referências Bibliográficas

Referências:

1. <https://gnomad.broadinstitute.org/>
2. <https://abraom.ib.usp.br/https://gene.sfari.org/>
3. <https://www.deciphergenomics.org/>
4. <https://varsome.com/>
5. <https://www.uniprot.org/>
6. <https://www.genecards.org/>
7. <https://cadd.gs.washington.edu/score>
8. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
9. <https://sift.bii.a-star.edu.sg/>
10. <https://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html>
11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
12. <https://www.omim.org/>
13. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
14. <https://scholar.google.com.br/>

Akbar, Maysa, et al. “The interplay of language on executive functions in children with ASD.” *Research in Autism Spectrum Disorders.*, vol. 7, 2013, pp. 494-501. doi.org/10.1016/j.rasd.2012.09.001.

Aldahmesh, Mohammed A., et al. “Recessive mutations in ELOVL4 cause ichthyosis, intellectual disability, and spastic quadriplegia.” *American journal of human genetics*, vol. 89, no. 6, 2011, pp. 745-750. doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.10.011.

American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 3rd ed., Washington DC, 1980.

American Psychiatric Association. *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - DSM-5*. 5ª ed., Artmed, 2014.

Aspenger, Hans, and Uta Frith. “Autistic psychopathy' in childhood.” *Autism and Asperger syndrome*, 1991, pp. 37-92. doi.org/10.1017/CBO9780511526770.002.

Auerbach, Benjamin D., et al. "Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology." *Nature*, vol. 480, 2011, pp. 63–68. doi.org/10.1038/nature10658.

Banach, Ryan, et al. "Brief Report: Relationship Between Non-verbal IQ and Gender in Autism." *J Autism Dev Disord*, 2009, pp. 188-193. doi.org/10.1007/s10803-008-0612-4.

Belmonte, Matthew K., and Thomas Bourgeron. "Fragile X syndrome and autism at the intersection of genetic and neural networks." *Nature neuroscience*, vol. 9, no. 10, 2006, pp. 1221-1225. doi.org/10.1038/nn1765.

Ben-David, E., and S. Shifman. "Combined analysis of exome sequencing points toward a major role for transcription regulation during brain development in autism." *Molecular Psychiatry*, 2013, pp. 1054-1056. doi.org/10.1038/mp.2012.148.

Berg, Jamee M., and Daniel H. Geschwind. "Autism genetics: searching for specificity and convergence." *Genome Biology*, vol. 13, no. 247, 2012. doi.org/10.1186/gb4034.

Bildt, Annelies de, et al. "Interrelationship between Autism Diagnostic Observation Schedule-Generic (ADOS-G), Autism Diagnostic Interview-Revised, and the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders classification in children and adolescents with mental retardation." *Journal of autism and developmental disorders*, vol. 34, no. 2, 2004, pp. 129-137. doi.org/10.1023/b:jadd.0000022604.22374.5f.

Bleuler, Eugen. *Dementia Praecox ou Grupo das Esquizofrenias*. 1^a ed., Climepsi Editores, 2005.

Bolte, Sven, et al. "Sex differences in cognitive domains and their clinical correlates in higher-functioning autism spectrum disorders." *Autism: the international journal of research and practice*, vol. 15, no. 4, 2011, pp. 497-511. doi.org/10.1177/1362361310391116.

Bourgeon, Thomas. "From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder." *Nature reviews. Neuroscience*, vol. 16, no. 9, 2015, pp. 551–563. doi.org/10.1038/nrn3992.

Bryson, Susan E., et al. "Prevalence of autism among adolescents with intellectual disabilities." *Canadian journal of psychiatry*, vol. 53, no. 7, 2008, pp. 449-459. doi.org/10.1177/070674370805300710.

Casanova, Emily L., et al. "Genes with high penetrance for syndromic and non-syndromic autism typically function within the nucleus and regulate gene expression." *Molecular autism*, vol. 7, no. 18, 2016. doi.org/10.1186/s13229-016-0082-z.

Constantino, John N., et al. "Sibling recurrence and the genetic epidemiology of autism." *The American journal of psychiatry*, vol. 167, no. 11, 2010, pp. 1349-1356. doi.org/10.1176/appi.ajp.2010.09101470.

Courchesne, Eric, and Karen Pierce. "Why the frontal cortex in autism might be talking only to itself: local overconnectivity but long-distance disconnection." *Current opinion in neurobiology*, vol. 15, no. 2, 2005, pp. 225–230. doi.org/10.1016/j.conb.2005.03.001.

Craig, Francesco, et al. "A review of executive function deficits in autism spectrum disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder." *Neuropsychiatric disease and treatment*, vol. 12, 2016, pp. 1191-1202. doi.org/10.2147/NDT.S104620.

De la Torre-Ubieta, Luis, et al. "Advancing the understanding of autism disease mechanisms through genetics." *Nature medicine*, vol. 22, 2016, pp. 345–361. doi.org/10.1038/nm.4071.

De Rubeis, Silvia, et al. "Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism." *Nature*, vol. 515, 2014, pp. 209–215. doi.org/10.1038/nature13772.

Dias, Caroline M., and Christopher A. Walsh. "Recent Advances in Understanding the Genetic Architecture of Autism." *Annual review of genomics and human genetics*, vol. 21, 2020, pp. 289-304. doi.org/10.1146/annurev-genom-121219-082309.

Durkin, Maureen S., et al. "Advanced parental age and the risk of autism spectrum disorder." *American journal of epidemiology*, vol. 168, no. 1, 2008, pp. 1268-1276. doi.org/10.1093/aje/kwn250.

Ebert, Daniel H., and Michael E. Greenberg. "Activity-dependent neuronal signalling and autism spectrum disorder." *Nature*, vol. 493, 2013, pp. 327-337. doi.org/10.1038/nature11860.

Ewen, Joshua B et al. "Epilepsy and Autism Severity: A Study of 6,975 Children." *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research* vol. 12,8 (2019): 1251-1259.

Ferreira, Rosana. "Perguntas sobre autismo no Censo 2022: vitória e preocupação." *Terra*, 13 May 2022, <https://www.terra.com.br/nos/perguntas-sobre-autismo-no-censo-2022-vitoria-e-preocupacao,67bf03a10cbabd48ece97929e419f2bb3v460y32.html>. Accessed 10 February 2023.

Feuk, Lars, et al. "Structural variation in the human genome." *Nature reviews. Genetics*, vol. 7, no. 2, 2006, pp. 85-97. doi.org/10.1038/nrg1767.

Fischbach, Gerald D., and Catherine Lord. "The Simons Simplex Collection: a resource for identification of autism genetic risk factors." *Neuron*, vol. 68, no. 2, 2010, pp. 192-195. doi.org/10.1016/j.neuron.2010.10.006.

Folstein, S., and M. Rutter. "Genetic influences and infantile autism." *Nature*, vol. 265, 1977, pp. 726-728. doi.org/10.1038/265726a0.

Fombonne, E. "The epidemiology of autism: a review." *Psychological medicine*, vol. 29, no. 4, 1999, pp. 769-786. doi.org/10.1017/s0033291799008508.

Friedman, Laura, and Audra Sterling. "Review of Language, Executive Function, and Intervention in Autism Spectrum Disorder." *Seminars in speech and language*, vol. 40, no. 4, 2019, pp. 291-304. doi:10.1055/s-0039-1692964.

Ghirardi, Laura, et al. "Familial and genetic associations between autism spectrum disorder and other neurodevelopmental and psychiatric disorders." *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*, vol. 62, no. 11, 2021, pp. 1274-1284. doi:10.1111/jcpp.13508.

Giarelli, Ellen, et al. "Sex differences in the evaluation and diagnosis of autism spectrum disorders among children." *Disability and health journal*, vol. 3, no. 2, 2010, pp. 107-116. doi.org/10.1016/j.dhjo.2009.07.001.

Gilissen, Christian, et al. "Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability." *Nature*, vol. 511, no. 7509, 2014, pp. 344-347. doi.org/10.1038/nature13394.

Grether, Judith K., et al. "Risk of autism and increasing maternal and paternal age in a large north American population." *American journal of epidemiology*, vol. 170, no. 9, 2009, pp. 1118-1126. doi.org/10.1093/aje/kwp247.

Griesi-Oliveira, Karina, and Andréa Laurato Sertié. "Autism spectrum disorders: an updated guide for genetic counseling." *Einstein*, vol. 15, no. 2, 2017, pp. 233-238. doi.org/10.1590/S1679-45082017RB4020.

Hahamy, Avital, et al. "The idiosyncratic brain: distortion of spontaneous connectivity patterns in autism spectrum disorder." *Nature neuroscience*, vol. 18, 2015, pp. 302-309. doi.org/10.1038/nn.3919.

Hattier, Megan A., et al. "The effects of gender and age on repetitive and/or restricted behaviors and interests in adults with autism spectrum disorders and intellectual

disability.” *Research in developmental disabilities*, vol. 32, no. 6, 2011, pp. 2346-2351. doi.org/10.1016/j.ridd.2011.07.028.

Hill, Elisabeth L. “Executive dysfunction in autism.” *Trends in Cognitive Sciences*, vol. 8, no. 1, 2004, pp. 26-32. doi.org/10.1016/j.tics.2003.11.003.

Iafate, A. John, et al. “Detection of large-scale variation in the human genome.” *Nature genetics*, vol. 36, no. 9, 2004, pp. 949-951. doi.org/10.1038/ng1416.

Iossifov, Ivan, et al. “The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder.” *Nature*, vol. 515, 2014, pp. 216-221. doi.org/10.1038/nature13908.

Iossifov, Ivan, et al. “De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum.” *Neuron*, vol. 74, no. 2, 2012, pp. 285-299. doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.009.

Jokiranta-Olkonemi, Elina, et al. “Risk of Psychiatric and Neurodevelopmental Disorders Among Siblings of Proband With Autism Spectrum Disorders.” *JAMA Psychiatry*, vol. 73, no. 6, 2016, pp. 622-629. doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2016.0495.

Just, Marcel Adam, et al. “Functional and anatomical cortical underconnectivity in autism: evidence from an FMRI study of an executive function task and corpus callosum morphometry.” *Cerebral cortex*, vol. 17, no. 4, 2007, pp. 951–961. doi.org/10.1093/cercor/bhl006.

Kanner, Leo. “Autistic disturbances of affective contact.” *Nervous Child*, vol. 2, 1943, pp. 217-250.

Keller, Roberto, et al. “Autism, epilepsy, and synaptopathies: a not rare association.” *Neurological Sciences : Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology.*, vol. 38, no. 8, 2017, pp. 1353-1361. 10.1007/s10072-017-2974-x.

Kenworthy, Lauren, et al. "Understanding executive control in autism spectrum disorders in the lab and in the real world." *Neuropsychology review*, vol. 18, no. 4, 2008, pp. 320-338. doi.org/10.1007/s11065-008-9077-7.

Kong, Augustine, et al. "Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk." *Nature*, vol. 488, 2012, pp. 471-475. doi.org/10.1038/nature11396.

Krishnan, Arjun, et al. "Genome-wide prediction and functional characterization of the genetic basis of autism spectrum disorder." *Nature neuroscience*, vol. 19, 2016, pp. 1454-1462. doi.org/10.1038/nn.4353.

Krumm, Niklas, et al. "A de novo convergence of autism genetics and molecular neuroscience." *Trends in neurosciences*, vol. 37, no. 2, 2014, pp. 95-105. doi.org/10.1016/j.tins.2013.11.005.

Lampi, Katja M., et al. "Parental age and risk of autism spectrum disorders in a Finnish national birth cohort." *Journal of autism and developmental disorders*, vol. 43, no. 11, 2013, pp. 2526-2535. doi.org/10.1007/s10803-013-1801-3.

Lander, E. S., et al. "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature*, vol. 409, no. 6822, 2001, pp. 860-921. doi.org/10.1038/35057062.

Lau-Zhu, Alex et al. "Overlaps and distinctions between attention deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder in young adulthood: Systematic review and guiding framework for EEG-imaging research." *Neuroscience and biobehavioral reviews* vol. 96 (2019): 93-115. doi:10.1016/j.neubiorev.2018.10.009

Levy, Dan, et al. "Rare de novo and transmitted copy-number variation in autistic spectrum disorders." *Neuron*, vol. 70, no. 5, 2011, pp. 886-897. doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.015.

Maenner, Matthew J., et al. "Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities

Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2018.” *Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries*, vol. 70, no. 11, 2021, pp. 1-16. doi.org/10.15585/mmwr.ss7011a1.

Malfa, G. La, et al. “Autism and intellectual disability: A study of prevalence on a sample of the Italian population.” *ournal of intellectual disability research : JIDR*, vol. 48, no. 3, 2004, pp. 262-267. doi.org/10.1111/j.1365-2788.2003.00567.x.

Mandy, William, et al. “Sex differences in autism spectrum disorder: evidence from a large sample of children and adolescents.” *Journal of autism and developmental disorders*, vol. 42, no. 7, 2012, pp. 1304-1313. doi.org/10.1007/s10803-011-1356-0.

Markram, Henry, et al. “The intense world syndrome — an alternative hypothesis for autism.” *Frontiers in neuroscience*, vol. 1, no. 1, 2007, pp. 77-96. doi.org/10.3389/neuro.01.1.1.006.2007.

Mullins, Caitlin, et al. “Unifying views of autism spectrum disorders: a consideration of autoregulatory feedback loops.” *Neuron*, vol. 89, no. 6, 2016, pp. 1131-1156. doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.017.

Murtaza, Nadeem, et al. “Neuron-specific protein network mapping of autism risk genes identifies shared biological mechanisms and disease-relevant pathologies.” *Cell reports*, vol. 41, no. 8, 2022, p. 111678. doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111678.

Neale, Benjamin M., et al. “Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders.” *Nature*, vol. 485, no. 7397, 2012, pp. 242-246. doi.org/10.1038/nature11011.

Niemi, Mari E. K., et al. “Common genetic variants contribute to risk of rare severe neurodevelopmental disorders.” *Nature*, vol. 562, 2018, pp. 268-271. doi.org/10.1038/s41586-018-0566-4.

O’Roak, Brian J., et al. “Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations.” *Nature genetics*, vol. 43, no. 6, 2011, pp. 585-589. doi.org/10.1038/ng.835.

O’Roak, Brian J., et al. “Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations.” *Nature*, vol. 485, 2012, pp. 246-250. doi.org/10.1038/nature10989.

Parikshak, Neelroop N., et al. “Integrative functional genomic analyses implicate specific molecular pathways and circuits in autism.” *Cell*, vol. 155, no. 5, 2013, pp. 1008-1021. doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.031.

Park, Jin-Mo, et al. “An autosomal dominant ERLIN2 mutation leads to a pure HSP phenotype distinct from the autosomal recessive ERLIN2 mutations (SPG18).” *Scientific Reports*, vol. 10, no. 3295, 2020. doi.org/10.1038/s41598-020-60374-y.

Parner, Erick Thorlund, et al. “Parental Age and Autism Spectrum Disorders.” *Annals of Epidemiology*, vol. 22, no. 3, 2012, pp. 143-150. doi.org/10.1016/j.annepidem.2011.12.006.

Pearce, Margarete M P, et al. “SPFH2 mediates the endoplasmic reticulum-associated degradation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and other substrates in mammalian cells.” *The Journal of biological chemistry*, vol. 282, no. 28, 2007, pp. 20104–20115. doi.org/10.1074/jbc.M701862200.

Pellicano, Elizabeth. “The development of executive function in autism.” *Autism research and treatment*, vol. 2012, 2012, p. 146132. doi.org/10.1155/2012/146132.

Pinto, Dalila, et al. “Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders.” *American journal of human genetics*, vol. 94, no. 5, 2014, pp. 677-694. doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.03.018.

Quesnel-Vallières, Mathieu, et al. "Autism spectrum disorder: insights into convergent mechanisms from transcriptomics." *Nature reviews genetics*, vol. 20, 2019, pp. 51-63. doi.org/10.1038/s41576-018-0066-2.

Ramocki, Melissa B., and Huda Y. Zoghbi. "Failure of neuronal homeostasis results in common neuropsychiatric phenotypes." *Nature*, vol. 455, 2008, pp. 912-918. doi.org/10.1038/nature07457.

Rivero, Olga, et al. "Haploinsufficiency of the Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Risk Gene *St3gal3* in Mice Causes Alterations in Cognition and Expression of Genes Involved in Myelination and Sialylation." *Frontiers in genetics*, vol. 12, no. 688488, 2021. doi.org/10.3389/fgene.2021.688488.

Richards et al; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24.

Rutter, M. "Concepts of autism: a review of research." *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*, vol. 9, no. 1, 1968, pp. 1-25. doi.org/10.1111/j.1469-7610.1968.tb02204.x.

Rutter, M. "Diagnosis and definition of childhood autism." *Journal of autism and childhood schizophrenia*, vol. 8, no. 2, 1978, pp. 139-161. doi.org/10.1007/BF01537863.

Samocha, Kaitlin E., et al. "A framework for the interpretation of de novo mutation in human disease." *Nature genetics*, vol. 46, no. 9, 2014, pp. 944-950. doi.org/10.1038/ng.3050.

Sanders, Stephan J., et al. "Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71 Risk Loci." *Neuron*, vol. 87, no. 6, 2015, pp. 1215-1233. doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.016.

Sanders, Stephan J., et al. "Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism." *Neuron*, vol. 70, no. 5, 2011, pp. 863-885. doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.002.

Sanders, Stephen J., et al. "De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism." *Nature*, vol. 485, 2012, pp. 237-241. doi.org/10.1038/nature10945.

Sandin, Sven, et al. "Advancing maternal age is associated with increasing risk for autism: a review and meta-analysis." *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, vol. 51, no. 5, 2012, pp. 477-486. doi:10.1016/j.jaac.2012.02.018.

Sandin, Sven et al. "The Heritability of Autism Spectrum Disorder." *JAMA* vol. 318,12 (2017): 1182-1184. doi:10.1001/jama.2017.12141

Satterstrom, F. Kyle, et al. "Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism." *Cell*, vol. 180, no. 3, 2020, pp. 568-584. doi:10.1016/j.cell.2019.12.036.

Sebat, Jonathan, et al. "Large-scale copy number polymorphism in the human genome." *Science (New York, N.Y.)*, vol. 305, no. 5683, 2004, pp. 525-528. doi.org/10.1126/science.1098918.

Sebat, Jonathan, et al. "Strong association of de novo copy number mutations with autism." *Science (New York, N.Y.)*, vol. 316, no. 5823, 2007, pp. 445-449. doi.org/10.1126/science.1138659.

Shevell, M., et al. "Practice parameter: evaluation of the child with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and The Practice Committee of the Child Neurology Society." *Neurology*, vol. 60, no. 3, 2003, pp. 367-380. doi.org/10.1212/01.wnl.0000031431.81555.16.

Sirmaci, Asli, et al. "Mutations in ANKRD11 Cause KBG Syndrome, Characterized by Intellectual Disability, Skeletal Malformations, and Macrodonia." *American journal of human genetics*, vol. 89, no. 2, 2011, pp. 289-294. doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.06.007.

Solomon, Marjorie, et al. "Autism symptoms and internalizing psychopathology in girls and boys with autism spectrum disorders." *Journal of autism and developmental disorders*, vol. 42, no. 1, 2012, pp. 48-59. doi.org/10.1007/s10803-011-1215-z.

Stromme, Petter, and Trond H. Diseth. "Prevalence of psychiatric diagnoses in children with mental retardation: Data from a population-based study." *Development Medicine and Child Neurology*, vol. 42, no. 4, 2007, pp. 266-270. doi.org/10.1111/j.1469-8749.2000.tb00083.x.

Südhof, Thomas C. "Neuroligins and neuexins link synaptic function to cognitive disease." *Nature*, vol. 455, no. 7215, 2008, pp. 903-911. doi.org/10.1038/nature07456.

Sumner, Emma et al. "Overlapping Phenotypes in Autism Spectrum Disorder and Developmental Coordination Disorder: A Cross-Syndrome Comparison of Motor and Social Skills." *Journal of autism and developmental disorders* vol. 46,8 (2016): 2609-2620.

Szatmari, Peter, et al. "Sex differences in repetitive stereotyped behaviors in autism: implications for genetic liability." *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics: the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, vol. 159B, no. 1, 2012, pp. 5-12. doi.org/10.1002/ajmg.b.31238.

Tărlungeanu, Dora C., and Gaia Novarino. "Genomics in neurodevelopmental disorders: an avenue to personalized medicine." *Experimental & molecular medicine*, vol. 50, 2018, pp. 1-7. doi.org/10.1038/s12276-018-0129-7.

Tick, Beata, et al. "Heritability of autism spectrum disorders: a meta-analysis of twin studies." *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*, vol. 57, no. 5, 2016, pp. 585-595. doi.org/10.1111/jcpp.12499.

Toma, Claudio. "Genetic Variation across Phenotypic Severity of Autism." *Trends in genetics : TIG*, vol. 36, no. 4, 2020, pp. 228-231. doi.org/10.1016/j.tig.2020.01.005.

Toro, Roberto, et al. "Key role for gene dosage and synaptic homeostasis in autism spectrum disorders." *Trends in genetics : TIG*, vol. 26, no. 8, 2010, pp. 363-372. doi.org/10.1016/j.tig.2010.05.007.

Trost, Brett, et al. "Genomic architecture of autism from comprehensive whole-genome sequence annotation." *Cell*, vol. 185, no. 23, 2022, pp. 4409-4427. doi.org/10.1016/j.cell.2022.10.009.

Venter, J. C., et al. "The sequence of the human genome." *Science (New York, N.Y.)*, vol. 291, no. 5507, 2001, pp. 1304-1351. doi.org/10.1126/science.1058040.

Volkmar, F R, et al. "Sex differences in pervasive developmental disorders." *Journal of autism and developmental disorders*, vol. 23, no. 4, 1993, pp. 579-591. doi.org/10.1007/BF01046103.

Wang W, Corominas R, Lin GN. *De novo* Mutations from Whole Exome Sequencing in Neurodevelopmental and Psychiatric Disorders: From Discovery to Application. *Front Genet*. 2019 Apr 3;10:258.

Wen, Ya, et al. "Pathway Network Analyses for Autism Reveal Multisystem Involvement, Major Overlaps with Other Diseases and Convergence upon MAPK and

Calcium Signaling.” *PloS one*, vol. 11, no. 4, 2016. doi.org/10.1371/journal.pone.0153329.

Werling, Donna M., and Daniel H. Geschwind. “Sex differences in autism spectrum disorders.” *Current opinion in neurology*, vol. 26, no. 2, 2013, pp. 146-153. doi.org/10.1097/WCO.0b013e32835ee548.

Willsey, Jeremy A., et al. “Coexpression networks implicate human midfetal deep cortical projection neurons in the pathogenesis of autism.” *Cell*, vol. 155, no. 5, 2013, pp. 997-1007. doi:10.1016/j.cell.2013.10.020.

Wing, L. “Asperger's syndrome: a clinical account.” *Psychological medicine*, vol. 11, no. 1, 1981, pp. 115-129. doi.org/10.1017/s0033291700053332.

Xiao, Rui, and Michael Boehnke. “Quantifying and correcting for the winner’s curse in genetic association studies.” *Genetic epidemiology*, vol. 33, no. 5, 2009, pp. 453-462. doi.org/10.1002/gepi.20398.

Xie, Sherlly, et al. “Family History of Mental and Neurological Disorders and Risk of Autism.” *JAMA network open*, vol. 2, no. 3, 2019, p. e190154. doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.0154.

Yeargin-Allsopp, Marshalyn, et al. “Prevalence of autism in a US metropolitan area.” *JAMA*, vol. 289, no. 1, 2003, pp. 49-55. doi.org/10.1001/jama.289.1.49.

Anexos

Essa sessão refere-se à descrição clínica dos indivíduos que apresentaram variantes classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas. Assim seguem abaixo:

Descrição clínica indivíduo 15:

Identificação: VAAB, DN 02/06/2011, sexo masculino, 1o consulta CEGH - 2016, aos 5 anos, natural João Pessoa, segundo filho, destro. Na concepção, pai 40 anos e mãe 32 anos, não aparentados.

Antecedentes perinatais e gestacionais: gestação desejada pelos pais, apresentou descolamento de placenta no início da gestação, primeiro trimestre. Nasceu a termo, com 38 semanas, Apgar do primeiro minuto 9 e do quinto minuto 10. Amamentando exclusivamente até 4 meses.

Antecedentes pessoais: Crises epilépticas aos 2 anos, início do tratamento com valproato de sódio. Manchas café-com-leite, mais de 80, menores que 3 cm. Apresenta um neurofibroma intracraniano/medular, sendo o principal de longa data localizado na região epidural com crescimento para forame neural D ao nível entre C2-C3 (RM de 2021, dimensões 2,58 x 1,6 x 0,9cm); a princípio lesão sem indicação cirúrgica.

DNPM: Engatinhou aos 8 meses, e começou a andar aos 1 ano e 6 meses. Começou a falar as primeiras palavras com 1 ano e aos 2 anos formava frases completas. Controle esfínteriano vesical e anal, tanto diurno quanto noturno por volta de 4-5 anos de idade. Apresenta dificuldades atencionais, comportamento pouco flexível e estereotípias. Não apresenta isolamento social importante.

AF: Quanto ao histórico familiar relativo à saúde mental, existem familiares com quadros de ansiedade, depressão, transtorno de personalidade e esquizofrenia.

Exame físico - sem alterações do desenvolvimento pondero-estatural, embora perímetro cefálico esteja acima do percentil 97 para idade. Múltiplas manchas café-ao-leite (nenhuma maior que 3cm) e alguns neurofibromas cutâneos, não são observadas efélides; apresenta testículos tópicos. Não apresenta outras alterações do exame físico somático. Apresenta

dificuldade atencional. Faz movimentos repetitivos com as mãos (abre e fecha, olhando-as). Tem hipotonia; porém não mais apresenta quedas ao correr. Evidencia menor sensibilidade à dor e ao frio e incômodo ou irritabilidade (quando pego de surpresa) diante de sons intensos (ex: eletrodomésticos, motos ou fogos de artifício).

Ao considerarmos os critérios diagnósticos de Neurofibromatose tipo 1, dever ser considerada em indivíduos que apresentam qualquer uma das seguintes características clínicas:

- Seis ou mais máculas café com leite maiores que 5 mm de maior diâmetro em indivíduos pré-púberes e maiores que 15 mm de maior diâmetro em indivíduos pós-púberes;
- Sardas nas regiões axilares ou inguinais
- Dois ou mais neurofibromas de qualquer tipo ou um neurofibroma plexiforme
- Glioma da via óptica
- Dois ou mais nódulos de Lisch identificados por exame de lâmpada de fenda ou duas ou mais anormalidades coroidais (nódulos brilhantes e irregulares visualizados por tomografia de coerência óptica/imagem de reflectância infravermelha próxima)
- Uma lesão óssea distinta, como displasia esfenoidal, arqueamento anterolateral da tíbia ou pseudartrose de um osso longo
- Um dos pais que atendam aos critérios de diagnóstico para NF1
- Uma variante patogênica NF1 da linhagem germinativa

O diagnóstico de NF1 é estabelecido em um probando com duas ou mais das características descritas¹.

1. Friedman JM. Neurofibromatosis 1. 1998 Oct 2 [Updated 2022 Apr 21]. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2023.

Descrição clínica indivíduo 21:

Identificação: MSSA, sexo masculino, DN 31/12/2006 - 10 anos na consulta CEGH, Idade da mãe na gestação: 25 anos, pai: 24 anos. Não há dados sobre a dominância manual.

Antecedentes perinatais e gestacionais: a mãe apresentou hemorragia no primeiro trimestre, infecção do trato urinário, na trigésima segunda semana ameaça de parto prematuro, necessitou de internação. Nasceu de 37 semanas, a termo de parto cesárea, com peso e tamanho adequados para idade gestacional. Não apresentou outras complicações.

Antecedentes pessoais: Nega epilepsia.

DNPM: Primeiros passos 1 ano e 2 meses, começou a falar palavras aos 2 anos. Controle esfinteriano próximo dos 2 anos.

História clínica: Os pais notaram que a criança apresentava movimentos repetitivos com as mãos, caminhava na ponta dos pés, e não atendia quando chamado pelo nome, próximo dos 2 anos de idade.

Exame físico: É colaborativo, interage de forma adequada. Faz movimentos com as mãos (*flapping*) e balança o tronco e todo o corpo. Demonstra irritabilidade quando as coisas saem diferente da sua expectativa, apresentando pensamentos autodepreciativos. Demonstra incômodo com sons intensos. Exibe olhar fixo e distante. Demonstra hipersensibilidade à dor. Apresenta interesses restritos e intensos.

Descrição clínica indivíduo 23:

Identificação: EPS, sexo masculino, 20/02/2014 - 3 anos na consulta CEGH, Idade materna na gestação: 31 anos, paterna: 39 anos, não há dados da dominância manual.

Antecedentes perinatais e gestacionais: mãe apresentou hemorragia de primeiro trimestre, nasceu de parto normal, a termo, 39 semanas, sem intercorrências, peso e tamanho adequados para idade gestacional, perímetro cefálico: 34 cm (entre percentil 15 e 50). Amamentação exclusiva até 6 meses de idade.

Antecedentes pessoais: Nega epilepsia.

DNPM: Primeiros passos: 1 ano e 2 meses. Primeiras palavras: 2 anos e meio. Controle esfinteriano: 3 anos.

História clínica: notaram atraso no desenvolvimento da fala em 2016, aos 2 anos e 3 meses, não interagiu com outras crianças e não respondia ao ser chamado pelo nome.

Exame físico: Mantém pouco contato visual nas interações e por vezes atende quando chamado, especialmente nas situações de seu interesse. Frequentemente exhibe risos sem motivo evidente, especialmente ao repetir frases ouvidas. Faz corridas rápidas e, por vezes, corre em círculos. Faz movimentos com as mãos de modo a desenhar letras e números no ar. Quando contrariado, leva os dedos à boca, chora, grita e se joga no chão. Por vezes parece mais resistente à dor.

Descrição clínica indivíduo 35:

Identificação: HCC, sexo masculino, 29/06/2015 - apresentava 2 anos na consulta, Idade Materna na Gestação: 32 anos e paterna 37 anos, não há dados da dominância manual.

Antecedentes perinatais e gestacionais: durante a gestação a mãe apresentou descolamento prematuro de placenta e necessitou de repouso por 30 dias. Nasceu a termo com 39 semanas de parto cesárea, não há relato do Apgar do primeiro e quinto minuto. Sem outras intercorrências perinatais. Amamentação exclusiva até os 3 meses de idade.

Antecedentes pessoais: nada digno de nota.

DNPM: Até os sete meses fazia contato visual, depois disso parou. Firmou o pescoço com 2 meses. Sentou-se 9-10 meses. Apresenta movimentos repetitivos, não responde quando chamado. Aos 2 anos de idade não desenvolveu a linguagem e não apresenta controle esfinteriano. Assumiu ortostase aos 2 anos e os primeiros passos.

AF: nada digno de nota.

Exame físico - Sem alterações do desenvolvimento pondero-estatural. Apresenta hipotonia global. Sem outros achados no exame físico somático. Não interage com examinador, não responde quando chamado, não imita gestos, não faz contato visual. Apresenta movimentos repetitivos com as pernas e os braços. Apresenta hipersensibilidade a estímulos sonoros.

Descrição Clínica indivíduo 45:

Identificação: JFK, 9 anos no momento da consulta, DN: 09/07/2013 - Idade: 4 anos na consulta, não há dados da dominância manual.

Antecedentes perinatais e gestacionais: Mãe apresentou hipertensão entre sexto e sétimo mês de gestação, necessitou de medicamentos para controle. Nega infecções, diabetes ou outros problemas de saúde neste período. Quando apresentava 36 semanas de gestação bolsa rota e necessitou realizar cesariana para resolver a gestação. A criança necessitou de uma semana na unidade de terapia intensiva para restabelecimento, pois apresentou problemas respiratórios. Os pais desconhecem o Apgar do primeiro e quinto minuto. Foi amamentado até 2 anos e 4 meses de idade.

História clínica – Apresentou atraso no desenvolvimento da linguagem o que preocupou os pais, também tinha comportamentos incomuns como enfileirar objetos. Nega outras alterações como sono e crises epiléticas.

DNPM – atraso do desenvolvimento da linguagem, não apresentou atrasos motores, primeiros passos com 1 ano e 2 meses.

AF: Nada digno de nota.

Exame físico: Entende os comandos básicos. Monta quebra-cabeça sem dificuldades. Apresenta ecolalia. Não tem dismorfismos faciais. Sem alterações sugestivas de déficit do desenvolvimento pondero-estatural.

Descrição clínica indivíduo 54:

Identificação: DMG, sexo masculino, DN 13/03/2004 - idade na consulta: 13 anos, Idade materna na gestação 32 anos, paterna 29 anos, não há dados da dominância manual.

Antecedentes perinatais: gestação planejada, realizado pré-natal, mãe fazia uso regular de levotiroxina, nasceu de parto cesárea a termo, 40 semanas, perímetro cefálico 37 cm (entre percentil 85 e 97) com peso e estatura adequados para idade. Apgar no primeiro minuto: 8 e quinto minuto: 9.

Antecedentes pessoais: TDAH. Nega epilepsia. Medicamentos: risperidona e metilfenidato.

DNPM: Primeiros passos: 1 ano e dois meses. Primeiras palavras: aos 3 anos. Controle esfinteriano: diurno - 2 anos e noturno: 7 anos.

História clínica: Pais notaram que a criança apresentou atraso no desenvolvimento da linguagem, as primeiras palavras foram aos 3 anos, notaram também que não atendia quando chamado pelo nome, apresentava isolamento social.

Exame físico: Por vezes exibe risos imotivados, fala baixo sozinho, fica emburrado e chega a chorar. Frequentemente pula, anda e corre de um lado para o outro. Demonstra irritabilidade e agitação, evidencia incômodo diante dos sons altos. Sente calor com mais frequência e evidencia resistência à dor. Foram cessados os movimentos com as mãos (*flapping*) e o comportamento de proteger as orelhas com as mãos após introdução das medicações, assim como outros sinais de irritabilidade.

Descrição clínica indivíduo 55:

Identificação: GO, sexo masculino, DN 21/06/2011- 6 anos na consulta, idade materna na gestação 39 anos e paterna 45 anos, sem informações sobre dominância manual.

Antecedentes perinatais e gestacionais: Nasceu de parto cesárea a termo, 38 semanas. Amamentação exclusiva até 6 meses.

Antecedentes pessoais: nada digno de nota. Nega crises epiléticas.

DNPM: Primeiros passos 1 ano e 1 mês. Primeiras palavras aos 3-4 anos. Controle esfíncteriano vesical e anal 3 anos e 6 meses.

AF:

Exame físico - sem alterações do desenvolvimento pondero-estatural, sem outros achados no exame físico somático. Mantém o contato visual nas interações somente com os familiares. Por vezes há a necessidade de se insistir para que atende quando chamado. Fala palavras isoladas e forma frases simples, com trocas/omissões de letras/sílabas. Frequentemente repete frases ditas por outras pessoas. Por vezes apresenta gargalhadas motivadas, comportamento de girar objetos e sensibilidade aumentada aos estímulos auditivos.

Descrição clínica indivíduo 62:

Identificação: LMS, DN: 17/12/2009, sexo masculino, DN 21/06/2011- 6 anos na consulta, idade materna na gestação 39 anos e paterna 45 anos, sem informações sobre dominância manual.

Antecedentes perinatais e gestacionais: gestação sem intercorrência, nasceu de parto cesárea, a termo, com 37 semanas, por opção materna. Apgar do primeiro minuto: 7 e do quinto minuto: 9. Amamentação exclusiva até os 6 meses.

Antecedentes pessoais: Apresentou 1 episódio de crise epiléptica, sem medicação de manutenção.

DNPM: Primeiros passos 1 ano. Primeiras palavras aos 5-6 anos. Não apresenta controle esfinteriano vesical e anal.

AF:

Exame físico - sem alterações do desenvolvimento pondero-estatural, sem outros achados no exame físico somático. Evita o contato e desvia o olhar, pouca interação social.

Obs - Avaliação neuropsicológica: 30 pontos na escala CARS (limite entre as classificações "sem autismo" e "autismo leve a moderado") e percentil 60 no teste de Raven (inteligência não verbal com classificação média).

Tabela anexa 1: Apresenta Z score e pLi dos genes com variantes deletórias:

Gene	Z score	pLi
NF1	6.54	0.9
TLK2	4.49	1
BRSK2	2.95	0.95
DNAH17	-3,13	0,75
ARHGAP5	2.21	1
HUWE1	8.87	1
ERLIN2	1.88	0
ST3GAL3	1.5	0
COL11A1	1.02	1

Na Tabela acima: pLi: *probability of being loss-of-function intolerant* - probabilidade de ser intolerante a perda de função. Os transcritos que estão significativamente depletados de sua variação esperada, possuem uma pontuação *Z score* positiva o que indica restrição aumentada (intolerância à variação) e, portanto, o transcrito tem menos variantes do que o esperado (Lek et al., 2016).

Lek, Monkol et al. "Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans." *Nature* vol. 536,7616 (2016): 285-91. doi:10.1038/nature19057.

Tabela anexa 2: Revisão recente (maio de 2023) das variantes.

Na tabela:

Id	HGVS	Id CLINVAR	1ª análise	2ª análise	ACMG - 2ª aval
15	<u>NF1(ENST00000358273.9):c.647T>C</u>	<u>rs199474756</u>	P	P. P	PP3 PM2 PP5 PS2 BP1
23	<u>ARHGAP5(NM_001030055.2):c.3284T>C</u>	<u>rs780538538</u>	PP	VUS	PM2 PS2 BP1 BP4
35	<u>TLK2(ENST00000346027.10):c.31C>T</u>	-	P	P	PVS1 PP5 PM2 PS2
54	HUWE1(NM_031407.7):c.7125_7139del	-	PP	P	PM2 PM4 PS2
55	<u>DNAH17(NM_173628.4):c.12457_12460del</u>	-	P	PP	PVS1 PM2 PS2
62	<u>BRSK2(ENST00000528841.6):c.954_955insT</u>	-	P	P	PVS1 PM2 PS2
23	<u>ST3GAL3(ENST00000644922.1):c.2C>T</u>	-	P	P	PVS1 PM2 PS2
21	<u>ERLIN2(NM_007175.8):c.220G>A</u>	-	P	PP	PM2 PP2 PS2
45	<u>COL11A1(ENST00000370096.9):c.2982_2983insCCCTCCTGG</u>	-	PP	PP	PM2 PM4 PS2

P: patogênica, PP: provavelmente patogênica.

PP3 – múltiplas avaliações computacionais dão suporte ao efeito deletério no gene ou produto do gene.

PM2 – ausente nos controles ou presente em extrema baixa frequência se recessivo nos bancos populacionais de referência.

PP5 – recursos de reputação confiável relataram a presença de variante patogênica, mas a evidência não está disponível para uma avaliação independente.

PS2 – variante *De novo*, com paternidade confirmada, sem história familiar.

BP1 – variante missense em um gene que primariamente variantes truncadas são mecanismo conhecido de doença.

BP4 – Múltiplas análises computacionais sugerem que não há impacto no gene ou produto.

PVS1 – variante nula em um gene onde a perda de função é um mecanismo conhecido de doença.

PP5 – recurso com reputação conhecida relatou recentemente variantes patogênicas, mas a evidência não está disponível para análise independente.

PM4 – o tamanho da proteína muda devido a uma deleção ou inserção in frame em uma região não repetida ou região que gere um códon de parada.

PP2- variante missense em um gene que tem uma baixa taxa de variantes missense benignas, e as variantes missense são um mecanismo conhecido de doença.

Tabela anexa 3: dados descritivos, foram excluídos os não avaliados ou informados.

	sim	não	total	sim	não
AFASD	4	52	56	7,14%	92,86%
AFDP	4	49	53	7,55%	92,45%
AD ling.	25	2	27	92,59%	7,41%
ADNMP	8	43	51	15,69%	84,31%
TDAH	6	53	59	10,17%	89,83%
Epilepsia	2	56	58	3,45%	96,55%
Sindrômico	1	59	60	1,67%	98,33%
Dism CF	8	51	59	13,56%	86,44%

Tabela anexa 4: Genes banco DECIPHER relacionados ao desenvolvimento: