

Amanda Shinzato

Diagnóstico de deficiência intelectual sindrômica por  
sequenciamento de nova geração em famílias  
consanguíneas

Syndromic intellectual disability diagnosis by next-  
generation sequencing in consanguineous families

São Paulo

2022

Amanda Shinzato

Diagnóstico de deficiência intelectual sindrômica por  
sequenciamento de nova geração em famílias  
consanguíneas

Syndromic intellectual disability diagnosis by next-  
generation sequencing in consanguineous families

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade de São Paulo,  
para a obtenção de Título de Mestre em  
Aconselhamento Genético e Genômica  
Humana.

Orientadora: Profa Dra. Carla Rosenberg

Coorientadora: Ana Cristina V. Krepischi

São Paulo

2022

Shinzato, Amanda

Diagnóstico de deficiência intelectual  
sindrômica por sequenciamento de nova geração em  
famílias consanguíneas / Amanda Shinzato; orientadora  
Carla Rosenberg; coorientadora Ana Cristina V.  
Krepischi -- São Paulo, 2022.

58 p.

Dissertação (Mestrado Profissional) -- Instituto  
de Biociências da Universidade de São Paulo.  
Programa de Mestrado Profissional em  
Aconselhamento Genético e Genômica Humana.

1. Deficiência intelectual. 2. Consanguinidade. 3.  
Exoma. 4. Aconselhamento Genético. I. Rosenberg,  
Carla, orient. II. Krepischi, Ana Cristina V., coorient.  
III. Título.

## Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

Dedico esse trabalho a minha mãe Vera, meu padrasto Paulo, minha irmã Carina e meu esposo Rafael, pois me permitem sonhar através do apoio que sempre me oferecem diante os desafios, me transmitindo segurança e fortalecendo minha confiança no Deus que sempre nos dá a vitória.

## Agradecimentos

A elaboração desse trabalho só foi possível devido a orientação das Professoras Carla Rosenberg e Ana Krepischi, que com carinho me dispensaram correções e instruções me acrescentando muito conhecimento científico da área, aumentando ainda mais minha admiração pelas profissionais que são.

Minha gratidão especial a doutoranda Laura Lara Carvalho pela dedicação na parte técnica desse trabalho, bem como sua paciência em me orientar na parte analítica.

Agradeço a Dra. Debora Bertola (Instituto da Criança, FMUSP) por disponibilizar a casuística desse trabalho e aos profissionais do Centro de Estudos do Genoma Humano e Células Tronco da USP pela assistência e colaboração no desenvolvimento desse trabalho.

E por fim e principal gratidão a Deus, por me dar a oportunidade de conhecer e aprender com pessoas e profissionais íntegros e dedicados.

# Sumário

1. Introdução .....	7
1.1 Genética da deficiência intelectual .....	10
2. Justificativa .....	19
3. Objetivo .....	20
4. Material e Métodos .....	21
4.1. Casuística .....	21
4.2. Métodos.....	22
4.2.1. Sequenciamento de exoma completo .....	22
4.2.2. Análise do exoma e chamada de variantes .....	22
4.2.3. Sequenciamento Sanger.....	23
5. Resultados .....	25
6. Resultados e Discussão.....	27
Paciente 1.....	27
Paciente 2.....	33
Paciente 3.....	37
Paciente 4.....	40
Paciente 5.....	42
7. Discussão e Conclusões.....	47
8. Resumo.....	51
9. <i>Abstract</i> .....	52
10. Referências Bibliográficas .....	53

## 1. Introdução

A deficiência intelectual (DI) é caracterizada por limitações significativas nas funções intelectuais e no comportamento adaptativo com manifestação antes dos 18 anos de idade (Vissers *et al.*, 2016). A função intelectual é definida como a habilidade global do indivíduo compreender e interagir com a realidade, a partir do raciocínio lógico e inteligência prática (resolução de problemas), capacidade de aprendizagem e habilidades verbais, sendo manifestada por meio de um conjunto de capacidades, comportamento, pensamentos e emoções. O comportamento adaptativo é expresso pela competência em habilidades sociais (responsabilidade, resolução de problemas, obediência a regras e leis), conceituais (entender tempo, finanças e linguagem) e práticas (usar ferramentas, atividades da vida diárias e interação social), aprendidas durante o desenvolvimento, em resposta aos problemas comuns (Lee *et al.*, 2021). Assim, o indivíduo com DI apresenta capacidade reduzida para a compreensão de informação nova ou complexa e limitação no aprendizado de novas habilidades (inteligência prejudicada), juntamente com redução da autonomia funcional (funcionamento social deficiente) (Musante & Ropers, 2015).

Para crianças com idade menor de 5 anos com comprometimento em duas ou mais áreas do desenvolvimento (através de avaliação pediátrica de habilidades de desenvolvimento), é designado o termo Atraso Global do Desenvolvimento (AGD); embora esse atraso possa ser transitório, estima-se que dois terços das crianças com AGD são diagnosticadas com DI após os 5 anos de idade (Purugganan, 2018).

A avaliação intelectual é caracterizada por um quociente de inteligência (QI), padronizado em testes psicométricos, ou por uma defasagem cognitiva em

relação às respostas esperadas para a idade e realidade sociocultural, que podem ser medidas por diferentes testes psicológicos. Estes testes possuem pontuação média de 100 para a população geral e indivíduos com QI com pontuação inferior a 70 (dois desvios padrão abaixo da média) são considerados com DI. O grau de deficiência intelectual que um indivíduo apresenta pode, ainda, ser classificado de acordo com o valor do QI, sendo leve (50 a 70), moderado (35 a 50), grave (20 a 35) ou profundo (menos que 20) (Vissers *et al.*, 2016).

Indivíduos com DI leve podem manifestar dificuldades no final da pré-escola ou nos primeiros anos de idade escolar, podem ter dificuldades no ambiente acadêmico (leitura, escrita, aritmética, tempo e dinheiro) e são mais socialmente imaturos em comparação com outras crianças de sua idade. Os indivíduos com DI moderada geralmente apresentam dificuldades de aprendizagem e linguagem nos anos pré-escolares, déficits sociais e de comunicação. Durante a idade adulta, eles podem ser empregados em ambientes que exigem habilidades simples de comunicação e cognitivas, podendo ser capazes de participar de todas as tarefas domésticas, geralmente com suporte contínuo e ensino. A DI grave confere ao indivíduo uma capacidade limitada de compreensão, linguagem, escrita e conceitos, necessitando de suporte constante. E indivíduos com DI profunda podem possuir habilidades que envolvem principalmente a manipulação de objetos e apresentam compreensão muito limitada de linguagem simbólica. Uma pessoa com DI profunda requer suporte abrangente e é dependente em todos os aspectos dos cuidados pessoais e da vida diária (Purugganan, 2018).

Aproximadamente, dois terços dos pacientes com DI apresentam nível de comprometimento leve a moderado e um terço desenvolve nível de grave a



profundo de deficiência. Além disso, esses pacientes possuem maior risco de desenvolver comorbidades, como deficiências sensoriais, distúrbios convulsivos, distúrbios comportamentais e doenças psiquiátricas (Quach *et al.*, 2021).

A DI pode ocorrer de modo isolado, classificada como não-sindrômica, na qual não há comorbidades óbvias presentes, sendo a DI a única característica evidente (Vissers *et al.*, 2016). Alternativamente, pode ser classificada como DI sindrômica (S), associada a outras características, tais como malformações congênitas, dismorfismos faciais, estatura desproporcional, deficiência visual/auditiva ou diagnósticos neurológicos e neuropsiquiátricos adicionais (Kvarnung *et al.*, 2017).

O desenvolvimento do cérebro humano é resultado de atividade altamente complexa e coordenada envolvendo genética e processos ambientais. Portanto, os fatores causais que levam à DI são de natureza heterogênea (Ilyas *et al.*, 2020), a partir de cascatas de sinalização intracelular alteradas, que surgem de estímulos ambientais ou fatores genéticos e culminam no desenvolvimento do fenótipo patológico. Os fatores ambientais mais comuns são a exposição abusiva de álcool pela mãe durante a gestação, infecções na gravidez, complicações ao nascimento e extrema desnutrição (Iwase *et al.*, 2017).

A DI tem prevalência mundial de 2-3% da população, comprometendo a vida dos afetados e de seus familiares (Maulik *et al.*, 2011). Globalmente, a DI causa problemas socioeconômicos e é a razão mais frequente do encaminhamento de pacientes aos serviços de aconselhamento genético (Hu *et al.* 2018).

## 1.1 Genética da deficiência intelectual

A apresentação clínica e a etiologia da DI são complexas e possuem alta heterogeneidade genética, devido aos diversos genes relacionados que se expressam em momentos e locais específicos do cérebro, tanto no pré-natal, pós-natal e adulto (Harripaul *et al.*, 2017).

Os fatores etiológicos da DI são amplos e em 50% dos indivíduos a causa da DI ainda é desconhecida. Sobretudo no caso da DI leve, herança multifatorial tem um papel preponderante e contribui para a dificuldade em conseguir um diagnóstico molecular. Geralmente entre os casos de DI mais acentuada e/ou sindrômica, é frequente a identificação de um único defeito genético subjacente (Ilyas *et al.*, 2020), como deleção ou mutação de um único gene ou alteração cromossômica microscópica ou submicroscópica (Goldenberg *et al.*, 2018). Achados laboratoriais em conjunto com dados clínicos sugerem que alteração nas atividades metabólicas, transcricionais, e nas vias de sinalização como os fatores mais comuns envolvidos no desenvolvimento das várias formas de ID (Zamboni *et al.*, 2018).

O catálogo online de genes e doenças genéticas humanas OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) lista aproximadamente 800 síndromes genéticas associadas a DI (Purugganan, 2018).

Inicialmente, a identificação de alterações genéticas na etiologia de DI ocorreu com a elucidação do cromossomo 21 como causa da Síndrome de Down em 1959 por Jérôme Lejeune (Lejeune *et al.*, 1959). O nome da síndrome foi dado em homenagem a John Langdon Down que descreveu pela primeira vez as características dessa síndrome em 1871, a partir de pacientes atendidos na Royal Eastwood Asylum for Idiots in Redhill onde era médico responsável (Ellis, 2013).

Depois da Síndrome de Down, que apresenta frequência de 1 para 800, a Síndrome do X frágil é a causa mais frequente de DI (1:4000), que teve a primeira observação de DI relacionada ao sexo em 1943, em uma família com 11 homens afetados e 2 mulheres parcialmente afetadas (Martin & Bell, 1943). Em 1966, o estudo cromossômico de dois irmãos com DI apresentou uma quebra distal no braço longo do cromossomo X (X frágil), ausente em sua mãe; durante a investigação familiar identificaram dois parentes maternos (primo e tio avô) afetados por DI que também apresentavam a mesma alteração no cromossomo X (Lubs, 1968). Em 1991 foi identificado o gene *FMR1*, responsável pela Síndrome do X frágil, cuja perda de função por expansão de trinucleotídeos ou mutação confere fenótipo de DI ligado ao cromossomo X (Lubs *et al.*, 2012).

Alterações cromossômicas estruturais equilibradas tais como, translocações recíprocas e inversões, são menos frequentes, explicando apenas 1% dos casos de DI (Hochstenbach *et al.*, 2009; Ropers, 2010). Atualmente, microdeleções e microduplicações cromossômicas, abaixo do nível de resolução do bandamento G, são reconhecidas como importantes causas de DI, bem como variantes em um único gene (Lee *et al.*, 2021).

Com os avanços tecnológicos foi possível determinar o diagnóstico e a etiologia genética da DI de forma mais precisa, inicialmente com a identificação microscópica por análise cromossômica e submicroscópica por FISH e MLPA, que resultam em diagnóstico molecular em 6 a 10% dos casos de DI. Os dados de variantes em número de cópias (CNVs) por microarrays aumentaram a taxa de identificação de variantes patogênicas para 15 a 20% dos pacientes nos últimos anos (Mir & Kuchay, 2019).

A partir do sequenciamento de Sanger e microarrays foram identificados mais de 300 genes para DI; com implementação de NGS, especialmente sequenciamento de genomas e exomas completos, mais de 1.500 genes já foram associados a DI e autismo (Leblond *et al.*, 2021), contribuindo com o diagnóstico molecular de 57% de casos com distúrbio de desenvolvimento (condição que inclui DI, TEA (Transtorno do Espectro Autista), TDAH (Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade) e atraso de desenvolvimento) em estudos com milhares de famílias (Martin *et al.*, 2018). Estes números tendem a crescer com o avanço do conhecimento, uma vez que cerca de 70% dos genes humanos codificadores de proteína não apresentam fenótipos bem estabelecidos (Wright *et al.*, 2018).

Quanto às variantes monogênicas em DI, estas apresentam herança ligada ao cromossomo X e autossômicas, tanto dominantes quanto recessivas.

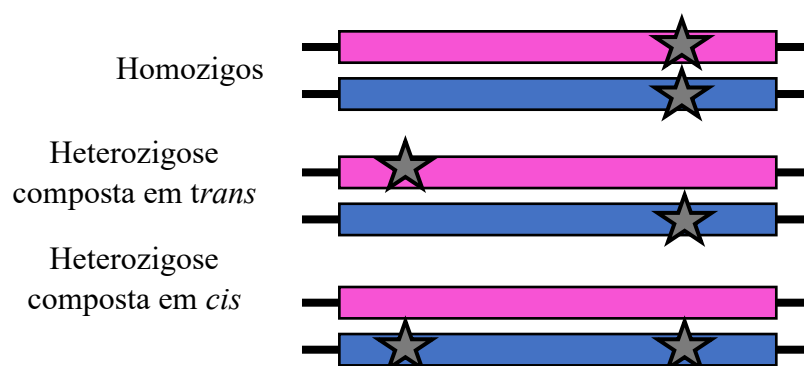
Em relação ao cromossomo X, o reconhecimento da importância dos genes desse cromossomo como causa da DI deveu-se inicialmente à existência de um excesso de 30% de homens afetados por DI em relação às mulheres (Vissers *et al.*, 2016). Em virtude de os homens possuírem apenas um cromossomo X, ou seja, os genes do cromossomo X estão em hemizigose no genoma, os homens portadores de alterações nesse cromossomo mais frequentemente apresentam comprometimento no desenvolvimento e função cerebral bem como em outros sistemas, (Lubs *et al.*, 2012); atualmente, aproximadamente 146 genes foram identificados como responsáveis pela expressão do fenótipo de DI (Vianna *et al.*, 2020). Esses genes em hemizigose e o estudo de famílias em que a DI segregava conforme o padrão de herança recessiva ligada ao X explicam 5 a 10% dos casos de DI em homens (Lubs *et al.*, 2012).

O estudo Deciphering Developmental Disorders (DDD) estimou a fração de pacientes com variantes causal *de novo* em 40 a 45% tanto para genes conhecidos quanto para genes ainda desconhecidos para doenças que afetam o desenvolvimento, sendo a herança autossômica dominante observada na maioria dos casos (Deciphering Developmental Disorders Study, 2017). Entretanto, várias doenças bem conhecidas com padrão de herança autossômica dominante, tais como, neurofibromatose tipo 1 (frequência de 1:4000) e tuberculose esclerose (1:6000), são transmitidas através de gerações e associadas a DI (Nelson, 2009). Algumas doenças com herança autossômica recessiva que incluem quadro de DI são os erros inatos do metabolismo como fenilcetonúria, doença de Niemann-Pick tipo C, síndrome de Hurler, doença da urina do xarope de bordo, homocistinúria e galactosemia (Lee *et al.*, 2021). No entanto, ainda se sabe muito pouco sobre as variantes gênicas relacionadas à deficiência intelectual autossômica recessiva não-sindrômica.

Pesquisas com deficiência intelectual com herança autossômica recessiva (DIAR) são conduzidas para elucidação de genes causais pois, baseado na concentração de genes DIAR no X, se sugere que mais de 3 mil genes DIAR existam no genoma humano (Hu *et al.*, 2018). Porém, a investigação das alterações que acarretam a DIAR é dificultada pelo fato que nas sociedades ocidentais, onde a maior parte desses estudos são realizados, as famílias são geralmente pequenas e a maioria dos pacientes são casos isolados, e muitas vezes, a hipótese de DI ter causa genética nem chega a ser considerada, tornando difícil a identificação de variantes causais DIAR-NS (Riazuddin *et al.*, 2017; Ropers, 2010).

A herança recessiva na DI pode ser manifestada pela presença de variantes em homozigose, presença de um único tipo de alelo que em par confere a característica clínica; ou por heterozigose composta, presença de duas variantes alélicas deletérias distintas em diferentes alelos (em *trans*) de um único gene, contribuindo para o fenótipo clínico do indivíduo (figura 1). A consanguinidade, sabidamente, aumenta a probabilidade de portadores aparentados portarem alelos raros em homozigose, em comparação com casais selecionados aleatoriamente (Clark *et al.*, 2019). Em muitos países, compreendendo um sétimo da população mundial, as uniões consanguíneas entre primos em terceiro grau ou mais próximos variam entre 20% a 50% das uniões (Bittles, 2008).

Nos casos de uniões consanguíneas é necessário durante o Aconselhamento Genético a obtenção de um histórico médico familiar de 3 a 4 gerações, como uma importante ferramenta de avaliação (Bennett *et al.*, 2020), com intuito de prestar auxílio às pessoas, no entendimento e adaptações às implicações médicas, psicológicas e familiares das contribuições genéticas pertinentes a uma determinada doença (Resta *et al.*, 2006).

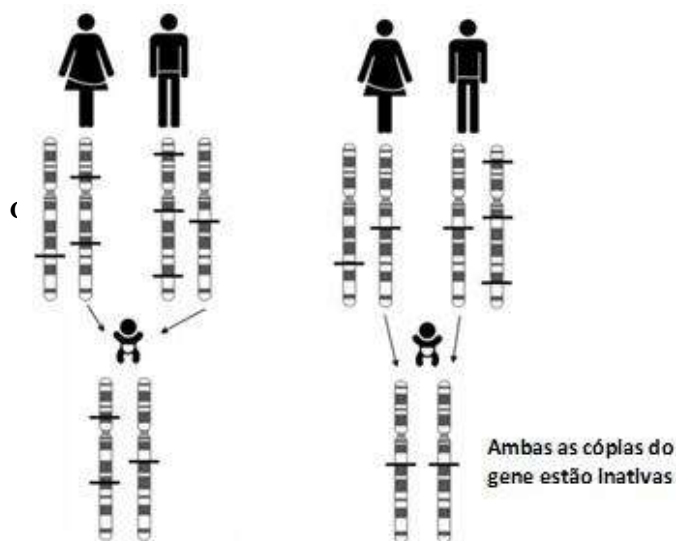


**Figura 1:** Diversidade de alterações autossômicas recessivas em um gene. Barra rosa e azul diferenciando os alelos maternos e paternos; estrela ilustrando uma variante gênica.

Em sociedades com prevalência de casamentos não consanguíneos, a DIAR é a causa de aproximadamente 3% dos casos, enquanto em populações

com taxas altas de consanguinidade observou incidência dez vezes maior, devido altas taxas de regiões em autozigose (Martin *et al.*, 2018).

A investigação gênica por mapeamento de homozigose em filhos de casais consanguíneos em populações com alta consanguinidade provou ser uma metodologia poderosa para descobrir variantes causais de doenças autossômicas recessivas (figura 2) (Erzurumluoglu *et al.*, 2016).



**Figura 2:** Descendentes de uniões não consanguínea e consanguínea. Imagem adaptada de Erzurumluoglu *et al.*, 2016.

A investigação de DIAR pelo sequenciamento de trios (afetado e pais) contribuiu com a identificação de mais de 400 genes de DI em populações com altos níveis de autozigose (Hu *et al.*, 2018) e também indicaram genes candidatos para DIAR, que são genes com variantes provavelmente causais descritos em caso isolado ou apenas em uma única família.

Em um estudo com 136 famílias consanguíneas Iranianas, foram identificadas 23 variantes em genes conhecidos além de outras 50 novas variantes em genes DIAR candidatos (Najmabadi *et al.*, 2011). Outro estudo utilizando exoma, investigaram 143 famílias consanguíneas da Arábia Saudita e

revelaram 33 novos genes candidatos envolvidos em diferentes transtornos neurológicos em mais de 73% das famílias estudadas (Alazami *et al.*, 2015). Em 192 famílias paquistanesas e iranianas com DI-NS em 51% foram identificadas variantes em 72 genes diferentes, sendo 26 não relatados anteriormente (Harripaul *et al.*, 2017).

A investigação de crianças afetadas com DI em 152 famílias consanguíneas de diversas localidades (Síria, Turquia, Egito, Jordânia e outros países), revelou que 51% dos casos apresentavam DI grave a profunda, 45% de leve a moderada e 92% dos portadores apresentavam DI-S, com hipotonia muscular, convulsão, microcefalia, baixa estatura e malformações associadas. O total de famílias identificadas com variantes causais foram 109 (71,7% das famílias estudadas), sendo 30% das variantes em genes DI e 31,6% em genes candidatos, e 46% das variantes encontradas foram observadas em casos com DI grave (Reuter *et al.*, 2017).

Em outros estudos utilizando sequenciamento de exoma, foram investigadas 121 famílias consanguíneas de origem paquistanesa, onde mais de 50% dos casamentos são consanguíneos, observaram variantes potencialmente patogênicas em 68 famílias estudadas, sendo 30 famílias com uma variante em homozigose em genes conhecidos de DI e outras 30 famílias com variante em homozigose ou heterozigose composta em genes candidatos para DI, além de 8 famílias com variantes homozigóticas em mais de um gene, sendo alguns relacionados com doenças neurológicas (Riazuddin *et al.*, 2017). E, em outro com 404 famílias consanguíneas Iranianas com pelo menos 2 afetados, observou-se em 219 famílias (54,2% das famílias estudadas) 77 variantes em genes DI e 77 em genes candidatos (Hu *et al.*, 2018).



Estudos foram aumentando a identificação de variantes causais para DI-S e DI-NS em famílias consanguíneas e a identificação de novos genes e variantes para DIAR, que adicionam conhecimentos sobre genes que atuam no funcionamento e desenvolvimento do cérebro humano, bem como o entendimento molecular de doenças do neurodesenvolvimento (Santos-Cortez *et al.*, 2018; Mir & Kuchay, 2019). Porém, nenhum desses grandes estudos envolvendo mais de 100 famílias mostrou qualquer gene particularmente prevalente em DIAR (Jamra, 2018).

Utilizando dados coletados de diversos bancos de dados, como OMIM e PubMed, foi elaborada uma base de dados que compila genes reconhecidamente associados às DIs síndrômica e não síndrômica, bem como genes candidatos, totalizando 650 genes possivelmente envolvidos em DI, sendo 400 (62%) de herança autossômica recessiva, 139 (21%) autossômica dominante (maioria *de novo*) e 103 (17%) ligados ao X (Kochinke *et al.*, 2016). Este banco de dados (<https://sysid.cmbi.umcn.nl/>) foi atualizado pela última vez e listava 1534 genes principais de DI e adicionais 1254 genes candidatos (dados atualizados em 18 de novembro de 2021). Todos os dados do SysID foram transferidos para o sucessor SysNDD (*Neurodevelopmental Disorders*), que compreende atraso no desenvolvimento, DI e TEA que é continuamente atualizado.

A partir das identificações das variantes causais em famílias consanguíneas cria-se imediatamente oportunidades para triagem de portadores, proporcionando assim um benefício direto às famílias, comunidades e saúde pública. Além disso, a identificação de causas genéticas para DI permite que indivíduos com DI sejam agrupados com base no gene ou via metabólica para melhor compreensão. Essa categorização pode ser direcionada para estratégias

terapêuticas, representando um passo em direção à medicina personalizada nessa importante população clínica (Harripaul *et al.*, 2017).

Com as tecnologias de sequenciamento genômico da última década a disponibilidade de testes genéticos e de acesso a eles aumentou expressivamente, devido a relação custo-benefício, permitindo novas descobertas relacionando genes e doenças a partir de testes genéticos para diversos diagnósticos, bem como a DI. Assim, os aconselhores genéticos são profissionais essenciais na interpretação de testes genéticos a contribuir na elaboração da medicina de precisão de maneira eficaz (Amendola *et al.*, 2021).

## **2. Justificativa**

A literatura atual indica que a grande maioria dos genes de deficiência intelectual de herança autossômica recessiva (DIAR) ainda não foram identificados. O uso de sequenciamento do exoma é uma estratégia eficiente para o diagnóstico molecular de DIAR. Além dos benefícios aos pacientes e familiares, a identificação de genes de DI poderá aumentar o conhecimento dos mecanismos envolvidos na DIAR. Enquanto famílias onde a DI segrega, parte de populações altamente consanguíneas, têm sido investigadas para a identificação de genes de DIAR, estudos de casos isolados ou famílias pequenas onde os pais são consanguíneos são escassos na literatura. O custo-benefício desta abordagem é investigado aqui.

### **3. Objetivo**

Este projeto de mestrado profissional teve como objetivo identificar a etiologia genética da deficiência intelectual em cinco indivíduos não relacionados, filhos de pais consanguíneos, visando a identificação de variantes em genes de DIAR.

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Casuística

Cinco pacientes com deficiência intelectual e filhos de genitores consanguíneos foram encaminhados pela Dra. Débora Bertola (Instituto da Criança, FMUSP) para investigação genética. Alterações patogênicas ou provavelmente patogênicas no número de cópias de segmentos de DNA (CNVs) foram previamente excluídos em projeto anterior do grupo. A Tabela 1 sumariza os principais sinais clínicos.

**Tabela 1:** Principais sinais clínicos dos cinco pacientes avaliados.

<b>Paciente 1</b>	Atraso cognitivo, dismorfismos leves, espinha bífida, bexiga neurogênica e pés com deformidades
<b>Paciente 2</b>	Atraso do Desenvolvimento Neuropsicomotor (ADNPM), convulsões, dismorfismos faciais, sinofre, fenda labial direita corrigida, pescoço curto, ventriculomegalia assimétrica, comunicação Interatrial (CIA) do tipo Forame Oval Patente (FOP), escoliose e hipertricrose generalizada
<b>Paciente 3</b>	ADNPM, DI, distúrbio de linguagem, distúrbio de deglutição, epilepsia de difícil controle, dismorfismos faciais, palidez de papila óptica, malformação de SNC (alteração da migração)
<b>Paciente 4</b>	Hipotonia ao nascimento, ADNPM, e surdez bilateral tipo mista
<b>Paciente 5</b>	ADNPM, transtorno do espectro autista (TEA), epilepsia, fenda palatina, cardiopatia complexa, micropênis e manchas café-com-leite

Os responsáveis pelos pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido, aplicado de acordo com o protocolo experimental. Este estudo tem aprovação do Comitê de Ética do Instituto de Biociências, parecer CAAE: 80921117.5.0000.5464.

## **4.2. Métodos**

### 4.2.1. Sequenciamento de exoma completo

Em projeto anterior do grupo, amostras de DNA de cinco pacientes filhos de pais consanguíneos foram sequenciadas com o uso dos *kits SureSelect Clinical Research Exome with SureSelectXT Target Enrichment e SureSelectXT Reagent, includes library post-capture processing on the HiSeq platform*, conforme instruções do fabricante (*Agilent Technologies*). A construção das bibliotecas genômicas e o sequenciamento foram realizados pelo Centro de Estudos do Genoma Humano com o uso do sequenciador *HiSeq 2500 Sequencing System (Illumina)*.

### 4.2.2. Análise do exoma e chamada de variantes

Arquivos BAM e vcf produzidos pela equipe de bioinformática do Centro de Estudos do Genoma Humano e Células Tronco serviram de base para a identificação de variantes que potencialmente explicam o fenótipo investigado.

Utilizando o software Varseq (Golden Helix), foram selecionadas variantes raras (frequência do alelo variante nas diferentes populações <1% em bancos de dados GNOMAD, 1K Genomes e ABRAOM) e não sinônimas. A partir deste grupo, foram priorizadas variantes consideradas patogênicas ou provavelmente

patogênicas, de acordo com critérios utilizados na rotina de análise de exoma do laboratório, listados abaixo:

- Qualidade da base variante (*Phred quality score*  $\geq 17$ )
- Cobertura da base (*read depth*  $\geq 20$ )
- Inspeção visual das variantes selecionadas em arquivos BAM
- Efeito: variantes de perda de função (*frameshift*, *nonsense*, códon iniciador de tradução, *splicing*) e mudança de aminoácido (*missense*), consideradas danosas de acordo com avaliação *in silico* por no mínimo dois diferentes algoritmos
- Priorização de variantes a partir da anotação de bancos de dados clínicos como OMIM e ClinVar
- Classificação das variantes utilizando critérios do Colégio Americano de Genética e Genômica Médica (*American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)*) (Richards *et al.*, 2015).

#### 4.2.3. Sequenciamento Sanger

A confirmação da variante detectada no sequenciamento do exoma completo e a determinação da segregação familiar foram realizados pela doutoranda do grupo Laura Carvalho, utilizando o sequenciamento Sanger do paciente e seus pais, a partir das sequências dos pares de *primers* descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Pacientes selecionados para Sanger, o gene avaliado e as sequências dos *primers* utilizados para confirmação da variante.

<b>Paciente</b>	<b>Variante no gene</b>	<b><i>Primers</i></b>
1	<i>DYNC1H1</i>	(F) GCATGTCATTTACATTATTCGTCCA (R) ATCTGTGCAGGTGCGTTTCTA
3	<i>DOCK7</i>	(F) AGCACCTACTGTGTATGTCCA (R) TCTAAAAGTAAGTAGCAGAAGCAGC
4	<i>DNAH3</i>	(F) GCAGGACCCCTTGAATCACT (R) ACGATTCACTCGCCATCTGA
5	<i>KMT2E</i>	(F) TCAAAAGCCTTGGTCTGACAGT (R) CGGTCATCTGCTTACTGACCTTC



## **5. Resultados**

Foram analisados exomas de cinco pacientes com DI, filhos de pais consanguíneos. As variantes detectadas no grupo podem ser encontradas na Tabela 3.

Variantes patogênicas foram detectadas no sequenciamento de exoma de dois dos cinco pacientes. O sequenciamento Sanger foi realizado em material dos pacientes 1, 3, 4 e 5 para determinação da segregação familiar e/ou confirmação da variante.

**Tabela 3:** Descrição de variantes clinicamente relevantes relacionadas a DI detectadas nos pacientes deste estudo, bem como suas características, condições clínicas associadas e classificação.

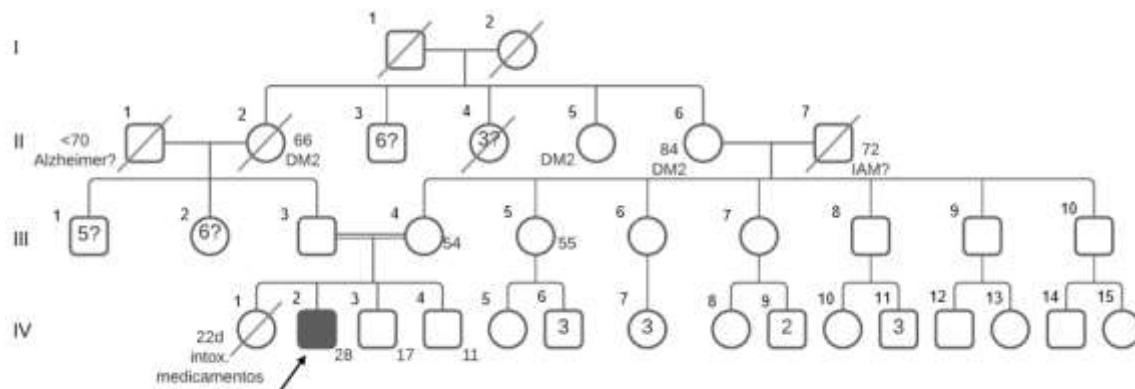
Pac.	Gene	Variante	Zigosidade	Efeito da variante	Herança da variante	Condições OMIM	Padrão de herança	Classificação	Crterios ACMG
1	ATAD3A	(NM_001170535.3):c.604G>A (p.Glu202Lys)	Homozigose	Missense	Biparental	Hipoplasia Pontocerebelar (#618810)	Autossômica recessiva	VUS	PM2
						Síndrome Harel-Yoon (#617183)	Autossômica dominante e recessiva		
	DYNC1H1	(NM_001376.5):c.4085A>G (p.Asn1362Ser)	Heterozigose	Missense	Paterna	Atrofia muscular espinal (#158600)	Autossômica dominante	VUS	PM1, PM2 e BP4
				Doença de Charcot-Marie-Tooth (#6142280)	Autossômica dominante				
					Retardo mental (#614563)	Autossômica dominante			
2	MTFMT	(NM_139242.4):c.994C>T (p.Arg332Ter)	Homozigose	Nonsense	Biparental	Deficiência do complexo mitocondrial I (#618248)	Autossômica recessiva	Patogênica	PVS1, PS3 e PM2
						Deficiência de fosforilação oxidativa combinado 15 (#614947)	Autossômica recessiva		
3	DOCK7	(NM_001367561.1):c.994dup (p.Ser332PhefsTer43)	Homozigose	Indel	Biparental	Encefalopatia epilética (#615859)	Autossômica recessiva	Patogênica	PVS1, PP2 e PP3
4	DNAH3	(NM_017539.2):c.6729C>A (p.Tyr2243Ter)	Heterozigose	Nonsense	Materna	*	*	VUS	PM2
5	KMT2E	(NM_182931.3):c.3794G>A (p.Ser1265Asn)	Heterozigose	Missense	Materna	Síndrome O'Donnell-Luria-Rodan (#618512)	Autossômica dominante	VUS	PP2 e PP3

\*Sem descrição de condição relacionada no OMIM.

## 6. Resultados e Discussão

### Paciente 1

Paciente masculino de 28 anos, apresenta atraso cognitivo, dismorfismos leves, espinha bífida, bexiga neurogênica e pés com deformidades. Já foi realizado exame de microarranjo genômico, sem CNVs patogênicas ou provavelmente patogênicas detectadas. Abaixo, o heredograma (figura 3) do paciente em investigação, identificado como indivíduo IV-2 (seta); os pais são primos em 1º grau de origens do Rio Grande do Norte e Paraíba.



**Figura 3:** Heredograma do Paciente 1 identificado pela seta (indivíduo 4.II), filho de primos em primeiro grau. DM2 = Diabetes Mellitus tipo 2; IAM = Infarto Agudo do Miocárdio; Intox. Medicamentos = Intoxicação por medicamentos.

No sequenciamento de exoma do DNA do paciente foram identificadas duas variantes. A primeira variante, identificada em homozigose, consiste em uma substituição não sinônima de aminoácido e está mapeada no éxon 6 dos 16 existentes no gene *ATAD3A* (OMIM\*612316), localizado na citobanda 1p36.33 (HGVS: *ATAD3A*(NM\_001170535.3):c.604G>A(p.Glu202Lys)). A variante foi classificada como de significado incerto (VUS – *Variant of Uncertain Significance*) com base nos critérios PM2 da ACMG. A imagem abaixo (figura 4) representa a

região da variante no arquivo BAM do exoma, e mostra a substituição de base no gene *ATAD3A* em homozigose.

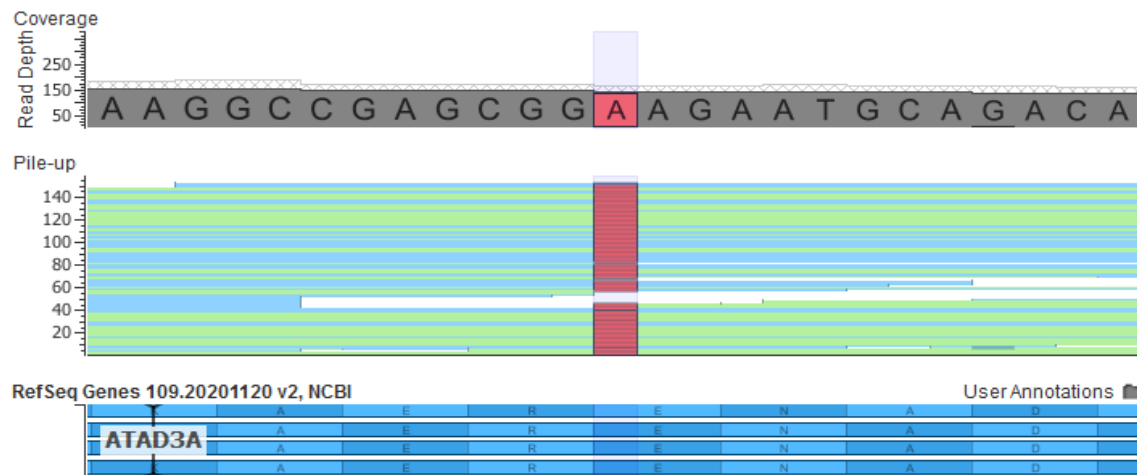


Imagem gerada no programa VarSeq (Golden Helix)

**Figura 4:** Imagem no arquivo BAM do sequenciamento de parte do gene *ATAD3A* do Paciente 1, mostrando o nucleotídeo adenina (A) em todos os *reads* (homozigose) (coluna rosa) na posição que seria uma guanina (G).

O gene *ATAD3A* tem padrão de herança autossômica recessiva e intolerância a variantes de perda de função (pLI = 0, segundo o gnomAD).

O gene *ATAD3A* é um gene que está envolvido em diversos processos celulares, incluindo atividades mitocondriais, manutenção e replicação do DNA mitocondrial, tradução de proteína, crescimento celular e metabolismo do colesterol (Harel *et al.*, 2016). Há duas condições às quais esse gene está associado, a Hipoplasia Pontocerebelar, com hipotonia, síndrome de insuficiência respiratória e letalidade neonatal (OMIM #618810), que apresenta padrão de herança autossômica recessiva, e a Síndrome Harel-Yoon (OMIM #617183), que cursa com cardiomiopatia, alterações esqueléticas como escoliose e displasia de quadril, hipotonia e atrofia muscular de membro distal, comprometimentos neurológicos como ataxia e neuropatia axonal. Características descritas na síndrome e também observadas no paciente são os dismorfismos faciais, DI e

deformidades dos pés. A síndrome possui padrão de herança autossômica dominante e recessiva.

Harel e colaboradores (2016) identificaram uma variante *missense* com predição patogênica, a partir de ferramentas de bioinformática, em cinco indivíduos de sete famílias avaliadas que apresentavam comprometimentos neurológicos, sendo DI uma das características evidentes. Observaram as variantes c.1582C>T com efeito antimórfico (antagonista ao alelo normal) com fenótipo mais severo, CNVs de deleção em *ATAD3A* causando efeito nulo (sem produto gênico funcional e variante c.158C>T com efeito hipomórfico (quantidade reduzida ou menor atividade gênica). Foram encontradas SNVs em *ATAD3A* em indivíduos não afetados heterozigotos; já as variantes em homozigose conferem ganho de função gênica (mecanismo dominante-negativo) e fenótipo de ADG, neuropatia, hipotonia entre outras características, enquanto alterações em CNVs recessivas levam à letalidade infantil através da perda de função gênica.

Estudos funcionais em células de indivíduos afetados e em *Drosophila melanogaster* evidenciaram significantes anormalidades mitocondriais, indicando que *ATAD3A* é necessário para a manutenção do tamanho adequado e número de mitocôndrias em neurônios e músculos (Harel *et al.*, 2016).

Outras características fenotípicas descritas em indivíduos com variantes em homozigose neste gene são atraso do desenvolvimento motor, atraso da fala, catarata congênita, convulsões, ataxia, hipotonia e redução da força muscular nas extremidades. Há diferentes variantes descritas em genes mitocondriais associadas com gravidades fenotípicas em diferentes órgãos; no caso do gene *ATAD3A*, há envolvimento principalmente do sistema nervoso e olho (Harel *et al.*, 2016).

A segunda variante do tipo *missense* foi observada em heterozigose no éxon 19 dos 78 do gene *DYNC1H1* (OMIM\*600112), localizado em 14q32.31, (HGVS: *DYNC1H1*(NM\_001376.5):c.4085A>G(p.Asn1362Ser)). A variante é classificada como VUS com base nos critérios da ACMG: PM1, PM2 e BP4. A imagem abaixo (figura 5) representa a região da variante no arquivo BAM do exoma, e mostra a substituição de base em heterozigose no gene *DYNC1H1*.

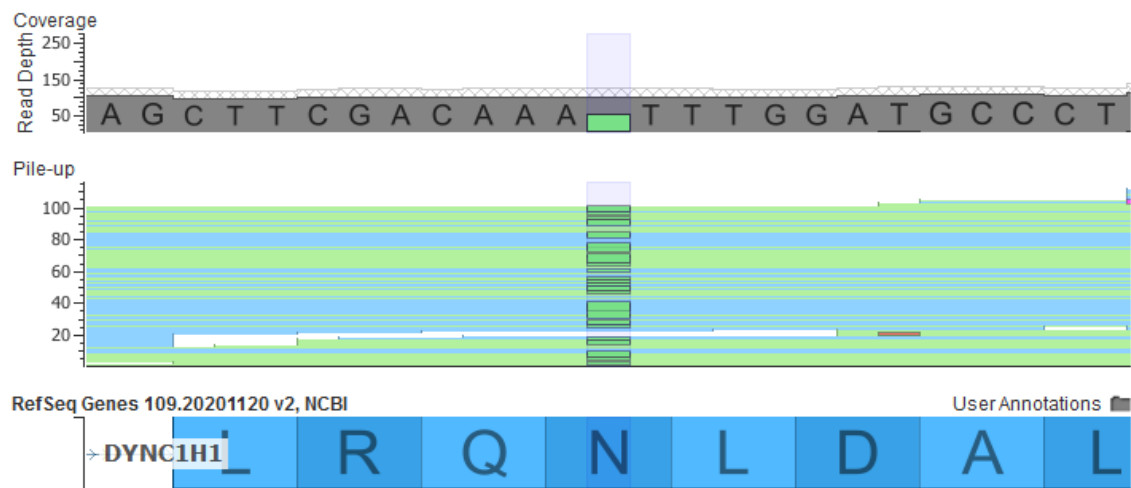


Imagem gerada no programa VarSeq (Golden Helix)

**Figura 5:** Imagem no arquivo BAM do sequenciamento de parte do gene *DYNC1H1* do Paciente 1, mostrando o nucleotídeo guanina (G) em metade 49% dos *reads* (heterozigose) (coluna verde) na posição que seria uma adenina (A).

O gene *DYNC1H1* codifica uma grande subunidade (mais de 530 kD) do complexo citoplasmático de dineína, de microtúbulos ativados por ATPases. Alterações no *DYNC1H1* estão relacionadas a defeitos de migração neuronal que resultam na malformação do córtex cerebral, especificamente do lisencéfalo, e agenesia do corpo caloso (Amabile *et al.*, 2020; Becker *et al.*, 2020).

Em publicação recente, quatro crianças foram descritas com dismorfias, hipotonia, fraqueza muscular, displasia de quadril, regressão motora, neuropatia e DI, entre outros sinais, com variantes em *DYNC1H1* como candidatas para o fenótipo. Em contraste com a variante identificada aqui, as reportadas nesse artigo eram todas *de novo*; metade foi classificada como VUS e a outra metade como

provavelmente patogênica. Em publicação anterior, foram descritas 103 variantes no gene *DYNC1H1* em 200 pacientes de 143 famílias, todos apresentando comprometimento de neurodesenvolvimento. Dessas variantes, 81 eram exclusivas de uma única família, enquanto 21 variantes foram identificadas em mais de uma família. Mais da metade das variantes era *de novo*; a maioria das demais não teve a herança avaliada e uma minoria de casos eram familiares (Amabile *et al.*, 2020).

Willensem e colaboradores (2014) sugerem que mutações *de novo* no domínio do gene *DYNC1H1* são causais de DI grave e neuropatias periféricas em dois pacientes, um deles apresentando deformidade nos pés e fenótipos variados. Outro estudo avaliou dez pacientes pediátricos apresentando variantes *missense de novo* em heterozigose em *DYNC1H1*, classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas com quadro de DI variável, atraso de desenvolvimento global e/ou malformações cerebrais; deformidades dos pés foram observadas em metade dos casos, deformidades na coluna em três casos, entre outras características morfológicas (Becker *et al.*, 2020).

Este gene está relacionado a três síndromes com herança autossômica dominante que apresentam alguns sinais clínicos semelhantes ao paciente em investigação. A Atrofia muscular espinal (OMIM #158600), que apresenta entre seus sinais clínicos o atraso cognitivo, deformidades nos pés, fraqueza muscular devido a neuropatia motora e atraso na marcha; Doença de Charcot-Marie-Tooth (OMIM #6142280), que cursa com dificuldade de aprendizagem, atraso de desenvolvimento motor, fraqueza muscular distal devido a neuropatia periférica e pé cavo; condição denominada Retardo mental autossômico dominante 13 (OMIM #614563), cujo quadro clínico inclui microcefalia, dismorfismos faciais, DI,

convulsão, em alguns pacientes com alterações morfológicas de sistema nervoso central, TEA, deformidades do pé e a maioria dos afetados apresenta variantes *de novo* no gene.

A variante identificada no gene *DYNC1H1* é uma mutação *missense* em heterozigose; este gene tem manifestação clínica reconhecida como dominante e apresenta alta intolerância para alterações *missense*, com Z score de 10.97 no gnomAD.

O sequenciamento Sanger da variante identificada no gene *DYNC1H1* foi realizado no paciente e seus genitores e demonstrou herança paterna (Figura 6), sendo o genitor clinicamente normal. Portanto, como os casos descritos são *de novo*, essa variante não foi considerada como variante causal, permanecendo como VUS.



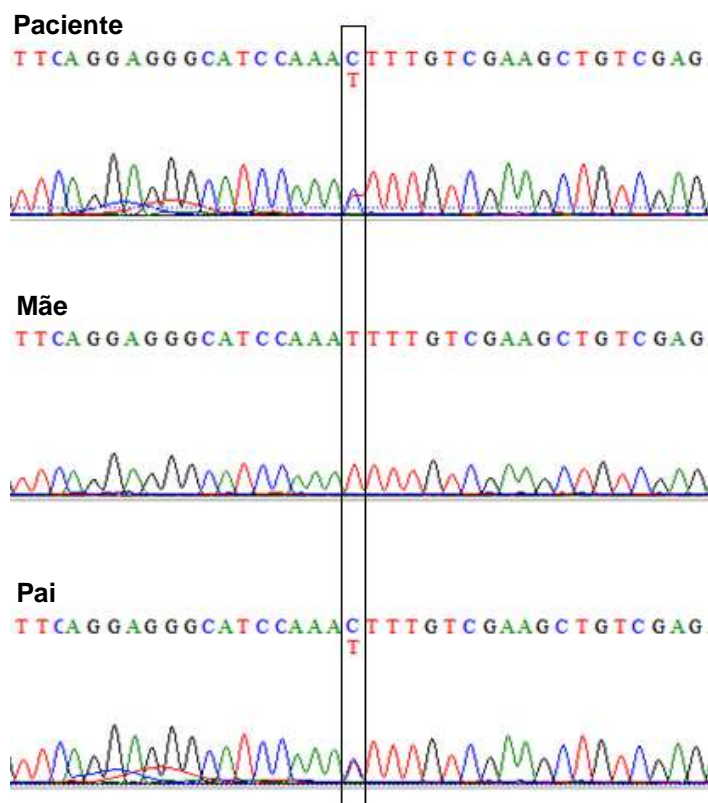


Imagem gerada no programa BioEdit

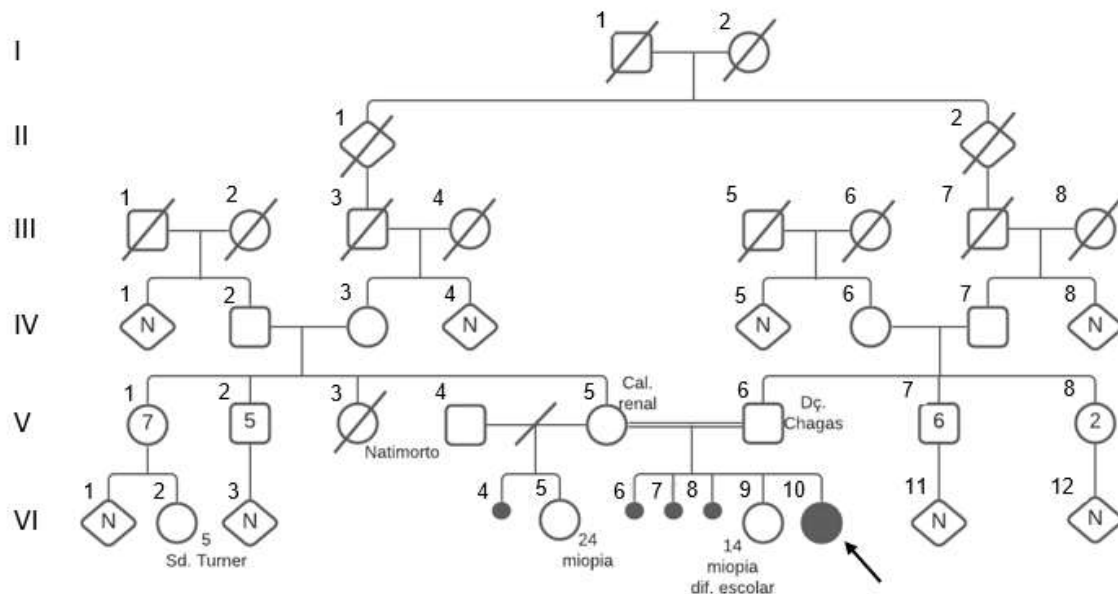
**Figura 6:** Imagem do eletroferograma da região do éxon 19 do gene *DYNC1H1* demonstrando a variante c.4085A>G (ou T>C) no paciente e em seu pai.

Finalizando a análise, o quadro clínico do paciente não abrange as principais características das condições associadas aos genes *ATAD3A* e *DYNC1H1*, compartilhando apenas a DI e deformidades do pé. Portanto, não foram identificadas variantes que explicassem o fenótipo do Paciente 1.

## Paciente 2

Paciente do sexo feminino de 12 anos, com Atraso do Desenvolvimento Neuropsicomotor (ADNPM), convulsões, dismorfismos faciais, sinofre, fenda labial direita corrigida, pescoço curto, ventriculomegalia assimétrica, comunicação Interatrial (CIA) do tipo Forame Oval Patente (FOP), escoliose e hipertricose generalizada. A figura 7 demonstra o heredograma da família da paciente,

identificada como indivíduo IV-10 (seta); seus pais são primos de 3º grau com histórico de abortamento espontâneo de repetição.



**Figura 7:** Heredograma da Paciente 2 identificada pela seta (indivíduo 6.X), filha de primos em terceiro grau. N = Normal; Cal. Renal = Cálculo renal; Dç. Chagas = Doença de Chagas; Sd. Turner = Síndrome de Turner; Espont = espontâneo; Dif. escolar = Dificuldade escolar.

Na análise de sequenciamento de exoma foi identificada uma variante em homozigose do tipo substituição de nucleotídeo que resultou em um códon prematuro de terminação na sequência de aminoácidos (mutação sem sentido ou *nonsense*), no último dos 9 éxons do gene *MTFMT* (OMIM\*611766), localizado em 15q22.31 (HGVS: *MTFMT*(NM\_139242.4):c.994C>T(p.Arg332Ter)). A variante é classificada como patogênica com base nos critérios PVS1, PS3, PM2 e PP3 da ACMG.

A imagem abaixo (figura 8) representa a região da variante no arquivo BAM do exoma e mostra a substituição de base em homozigose no gene *MTFMT*.



**Figura 8:** Imagem no arquivo BAM do sequenciamento do gene *MTFMT* da Paciente 2, mostrando o nucleotídeo adenina (A) em todos os *reads* (homozigose) (coluna rosa) na posição que seria uma guanina (G), resultando em um códon de parada.

O gene *MTFMT* codifica uma enzima com atuação no metabolismo mitocondrial, a metionil-tRNA formiltransferase, equilibrando as proporções das espécies de Met-tRNA para atender às necessidades de síntese de proteínas para o início da tradução nas mitocôndrias (Seo *et al.*, 2020). Esse gene está relacionado com duas condições autossômicas recessivas, a Deficiência do Complexo Mitocondrial I (OMIM #618248), que inclui atraso de desenvolvimento, entre outros sinais clínicos; e a Deficiência de Fosforilação Oxidativa combinada 15 (OMIM #614947), que apresenta alta variabilidade fenotípica, incluindo alterações cardiovasculares, como hipertrofia e defeito do septo ventricular, atraso global do desenvolvimento, deficiência cognitiva e convulsões.

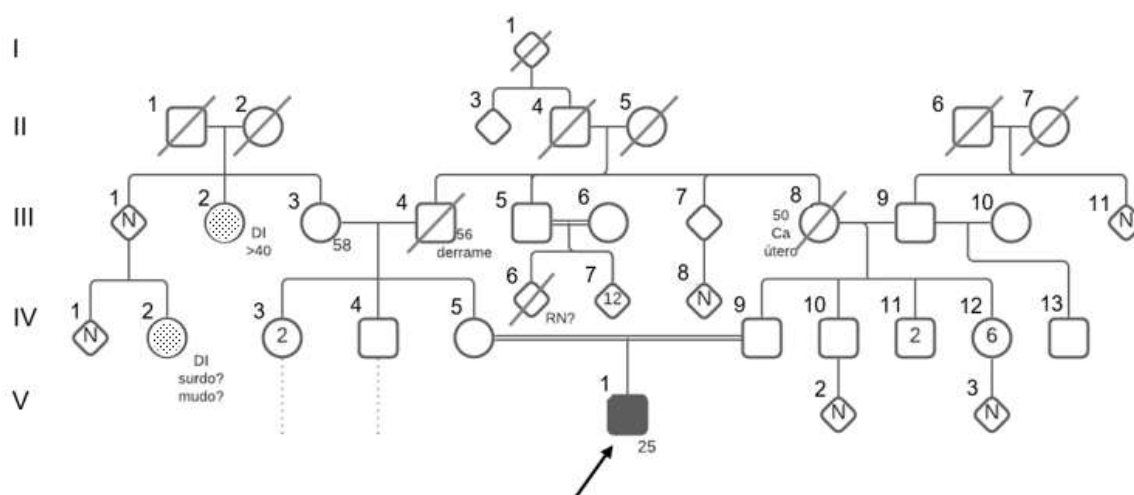
Haack e colaboradores (2014) descreveram nove variantes em heterozigose composta em *MTFMT* em oito famílias afetadas. A variante c.994C>T, identificada na paciente aqui investigada, foi previamente relatada em quatro casos, sendo duas irmãs, com sinais clínicos de atraso de desenvolvimento, hipotonia, ataxia, DI, estrabismo, atrofia óptica, disartria e acidose láctica, com idades de início entre 3 meses e 5 anos; foi demonstrada grande redução da proteína MTFMT nos tecidos, por análise de *Western blot*. Essa variante também foi descrita por Neeve e colaboradores (2013) em paciente com início dos sinais aos 3 anos de idade apresentando atraso de desenvolvimento, hipotonia, ataxia e disartria.

Há outros sinais também descritos associados a outras variantes, demonstrando um fenótipo amplo causado por alterações nesse gene, como o caso de uma criança com disfunção neurológica semelhante a esclerose múltipla, com presença de variante patogênica em homozigose no gene *MTFMT* causando um truncamento prematuro levando a perda de função da proteína (Pena *et al.*, 2016).

Variantes no gene *MTFMT* explicam parte dos sinais clínicos da paciente, o que está de acordo com a alta variabilidade fenotípica da síndrome. A variante em homozigose classificada como patogênica pode ser considerada causal da condição clínica da paciente; os genitores, consanguíneos, devem portar a variante em heterozigose e há 25% de risco de recorrência de quadro clínico associado a esta variante em futura prole do casal.

### Paciente 3

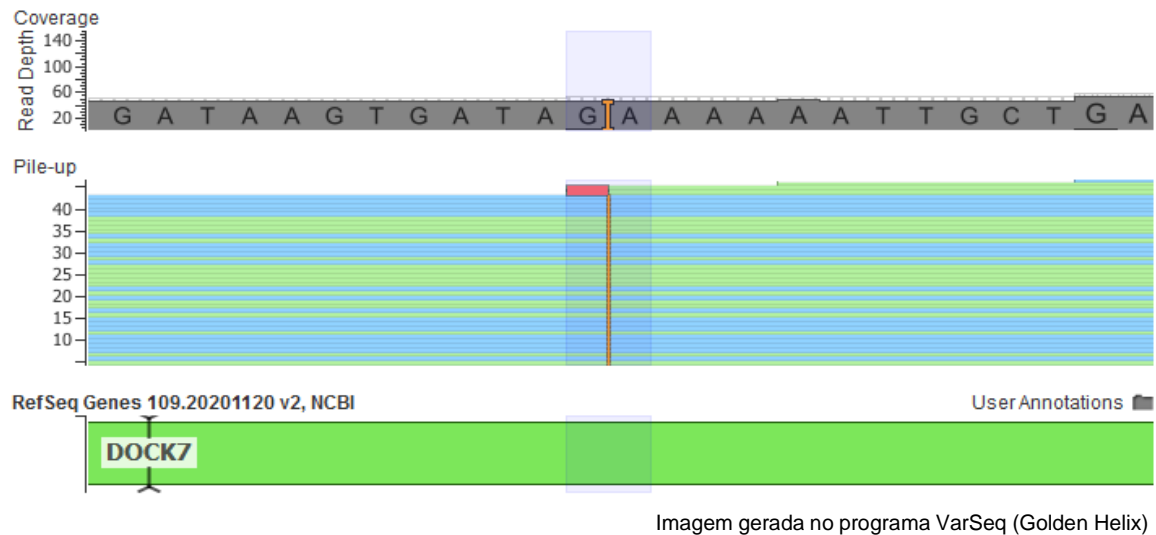
Paciente do sexo masculino de 25 anos, com ADNPM, DI, distúrbio de linguagem, distúrbio de deglutição, epilepsia de difícil controle, dismorfismos faciais, palidez de papila óptica, malformação de SNC. No heredograma abaixo (figura 9) da família do paciente identificado como V-1 (seta) é ilustrada a consanguinidade entre os pais, que são primos de 1º grau; o heredograma também evidencia outros casos de DI na família.



**Figura 9:** Heredograma da família do Paciente 3 identificado pela seta (indivíduo 5.I), filho de primos em primeiro grau. Ca útero = Câncer no útero; N = Normal; RN = Recém-nascido.

No exoma foi identificada uma variante em homozigose do tipo indel, correspondendo à inserção de uma base no éxon 9 dos 50 éxons do gene *DOCK7* (OMIM\*615730), localizado em 1p31.3 (HGVS: *DOCK7*(NM\_001367561.1):c.994dup(p.Ser332PhefsTer43)). A variante foi classificada como patogênica segundo os critérios PVS1, PP2 e PP3 da ACMG e o gene é intolerante à perda de função (pLI = 0).

A imagem abaixo (figura 10) representa a região da variante no arquivo BAM do exoma e mostra a inserção de A no gene *DOCK7*.

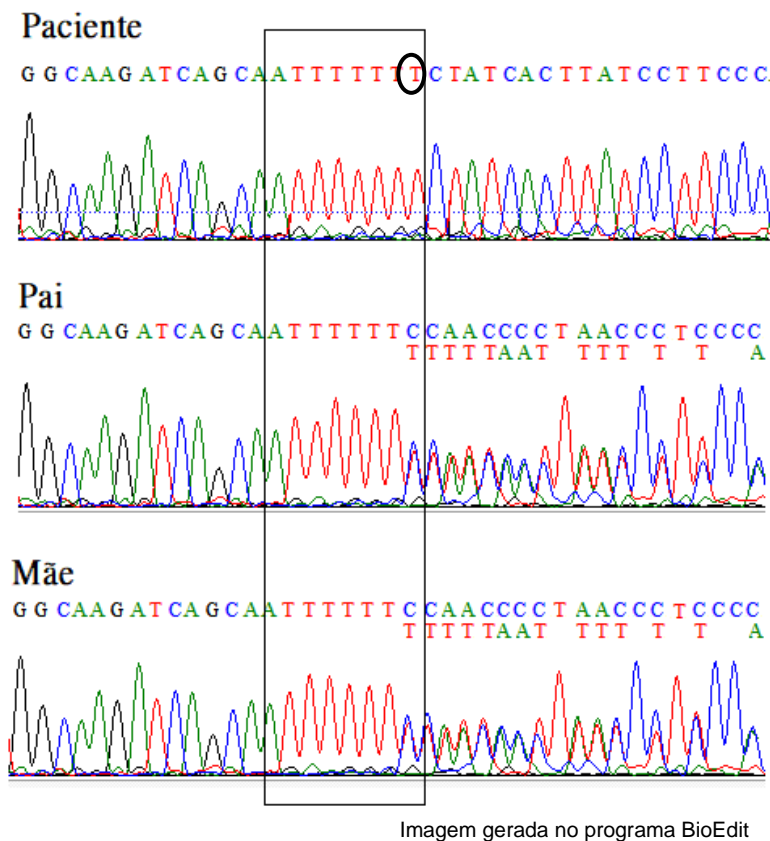


**Figura 10:** Imagem no arquivo BAM do sequenciamento de parte do gene *DOCK7* do Paciente 3, mostrando a duplicação de um nucleotídeo adenina (A) em todos os *reads* (homozigose) (linha laranja), parte da sequência de sete adeninas.

O gene *DOCK7* desempenha um papel fundamental na neurogênese, promovendo a diferenciação e transição das células gliais radiais para basais e neurônios. Em camundongos pós-natais também se observou a migração de neuroblastos tangenciais no prosencéfalo regulada por *DOCK7* (Turkdogan *et al.*, 2019).

Esse gene está relacionado à condição Encefalopatia Epiléptica e de Desenvolvimento 23 (OMIM#615859), de herança autossômica recessiva e que causa distúrbio neurológico caracterizado por crises convulsivas intratáveis iniciadas nos primeiros meses de vida (entre 2 a 6 meses) e atraso do desenvolvimento psicomotor. Os indivíduos afetados por variantes no gene *DOCK7* têm desenvolvimento psicomotor gravemente prejudicado e podem também apresentar deficiência ou ausência de fala, cegueira cortical e características faciais dismórficas (Perrault *et al.*, 2014).

Dado que a variante está em região de homopolímero, retângulo preto na figura 11, foi realizado o sequenciamento Sanger da variante no gene *DOCK7* em amostras de DNA genômico do paciente e de seus pais.



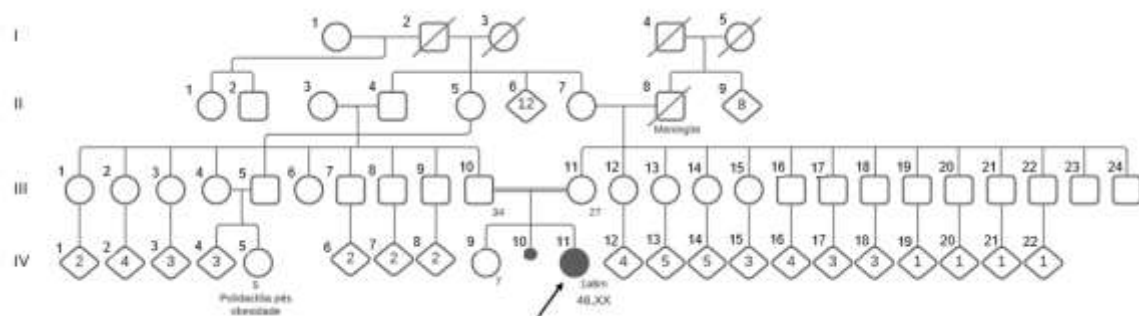
**Figura 11:** Imagem do eletroferograma do sequenciamento Sanger do gene *DOCK7* do Paciente 3, mostrando a duplicação do nucleotídeo timina (T) (círculo preto) presente em homozigose no paciente e em heterozigose nos genitores.

O paciente é homozigoto para um alelo no qual há sete bases T na região marcada pelo círculo preto, sendo que o alelo selvagem tem apenas seis, como pode ser detectado no alelo selvagem de seus pais (figura 11). Assim, a variante foi confirmada em homozigose (representada como círculo na sétima timina (base T)) no paciente e em heterozigose em seus pais.

A variante patogênica em homozigose no gene *DOCK7* é compatível com o quadro clínico do paciente, sendo considerada a causa da sua condição clínica. O teste de Sanger mostrou a presença em homozigose no paciente e em heterozigose nos genitores, havendo 25% de risco de recorrência de quadro clínico associado a mutações em homozigose de *DOCK7* em futura prole do casal.

## Paciente 4

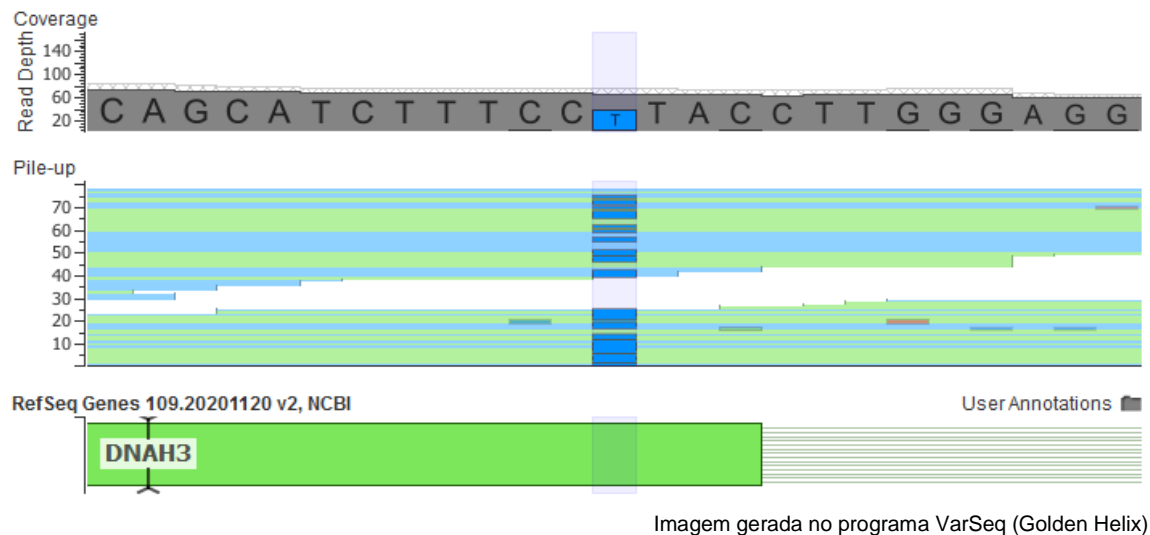
Na primeira consulta a paciente tinha de 1 ano e 8 meses de idade foi referida por apresentar ADNPM, hipotonia ao nascimento e surdez bilateral tipo mista. A paciente tem cariótipo normal. Os pais da paciente, identificada como IV-11 (seta), são primos de 1º grau com histórico de um aborto espontâneo, como ilustrado no heredograma abaixo (figura 12).



**Figura 12:** Heredograma da família da paciente 4, identificada pela seta (indivíduo IV-11), filha de primos em primeiro grau.

Na análise do sequenciamento de exoma foi identificada uma variante potencialmente relacionada ao quadro clínico, em heterozigose do tipo *nonsense* no éxon 46 de 62 do gene *DNAH3* (OMIM\*603334), localizado em 16p12.3 (HGVS: *DNAH3*(NM\_017539.2):c.6729C>A(p.Tyr2243Ter)). A variante foi classificada como VUS segundo os critérios PM2 da ACMG. A imagem abaixo (figura 13) representa a região da variante no arquivo BAM do exoma, e mostra a substituição da base em heterozigose no gene *DNAH3*.

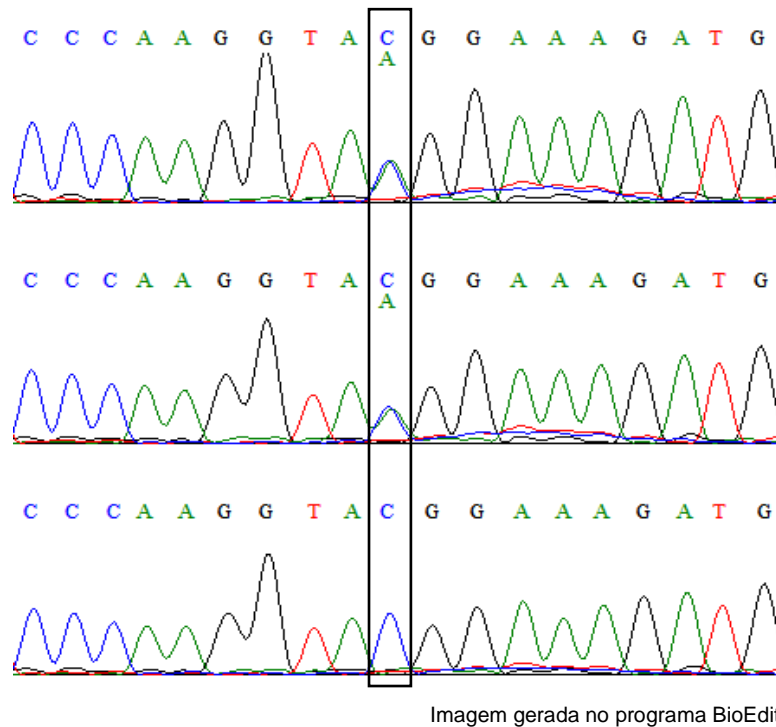




**Figura 13:** Imagem no arquivo BAM do sequenciamento de parte do gene *DNAH3* da Paciente 4, mostrando o nucleotídeo timina (T) em 56% dos *reads* (heterozigose) (coluna azul) na posição que seria uma guanina (G).

O gene *DNAH3* está associado à ciliogênese, pertence à família das dineínas, cujos membros codificam grandes proteínas que são constituintes do complexo de proteínas motoras associadas aos microtúbulos e expresso principalmente nos testículos e pulmões (Järvelä *et al.*, 2021). Tem descrição OMIM\*603334 sem condição relacionada, não é intolerante a perda de função gênica segundo o gnomAD utilizando o valor Pli (pLI = 0), embora a razão observado/esperado seja igual a 0,62, indicando alguma intolerância. No sysID há referência de herança autossômica dominante e recessiva relacionadas a DI, e estudos recentes em famílias consanguíneas com DI foram identificadas variantes herdadas e *de novo* no gene *DNAH3*, sendo considerado um potencial gene candidato para DI (Järvelä *et al.*, 2021; Kahrizi *et al.*, 2018).

Para avaliação da segregação da variante na família, foi realizado o sequenciamento Sanger, como demonstrado abaixo (figura 14).



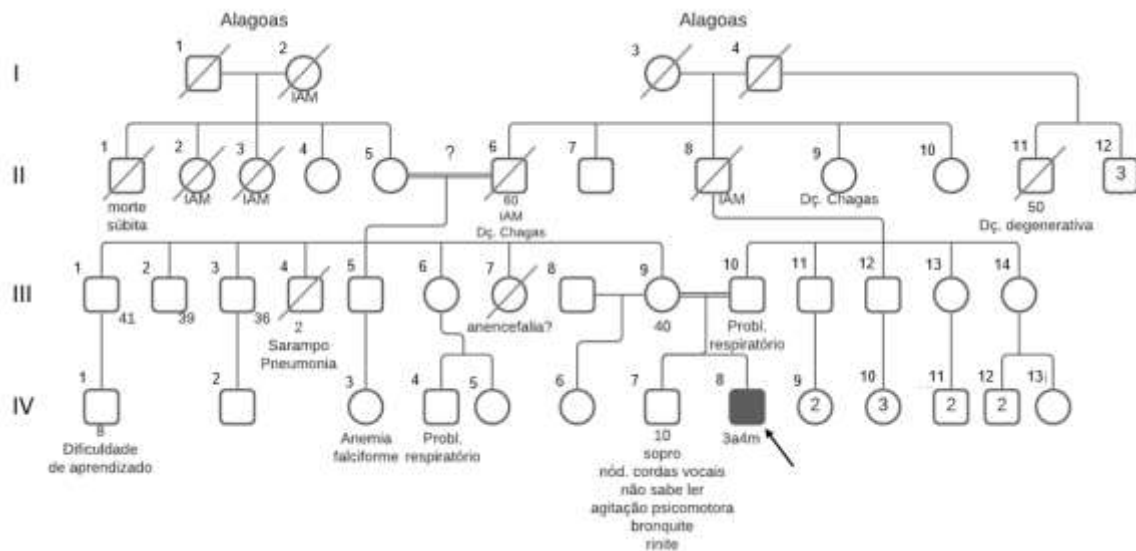
**Figura 14:** Imagem do eletroferograma da região do éxon 46 do gene *DNAH3* demonstrando a variante c.6729C>A em heterozigose no paciente e em sua mãe.

Os resultados evidenciam que a variante observada na paciente é de herança materna, e sua mãe é clinicamente normal. Portanto, a variante permanece como VUS, apenas considerando a possibilidade remota da variante ter penetrância incompleta.

### Paciente 5

Paciente do sexo masculino com 3 anos e 4 meses na primeira consulta e atualmente com 10 anos de idade, apresentando DI, transtorno do espectro autista (TEA), epilepsia, fenda palatina, cardiopatia complexa, micropênis e manchas café-com-leite. No heredograma (figura 15) se observa possível consanguinidade dos avós maternos do paciente em questão (seta, indivíduo IV.8) e

consanguinidade (primos em 1º grau) dos genitores; há outros casos de dificuldade de aprendizado na família, entre outras enfermidades.



**Figura 15:** Heredograma do Paciente 5 identificado pela seta (indivíduo IV-8), filho de primos em primeiro grau. Dç degenerativa = Doença degenerativa; Probl. Respiratório = Problema respiratório.

No sequenciamento de exoma do DNA do paciente foi identificada uma variante em heterozigose do tipo *missense* mapeada no éxon 24 dos 27 existentes no gene *KMT2E* (OMIM\*608444), localizado na citobanda 7q22.3 (HGVS: *KMT2E*(NM\_182931.3):c.3794G>A (p.Ser1265Asn)). A variante foi classificada como VUS segundo os critérios PP2 e PP3 da ACMG. A imagem abaixo (figura 16) representa a região da variante no arquivo BAM do exoma e mostra a substituição da base em heterozigose no gene *KMT2E*.

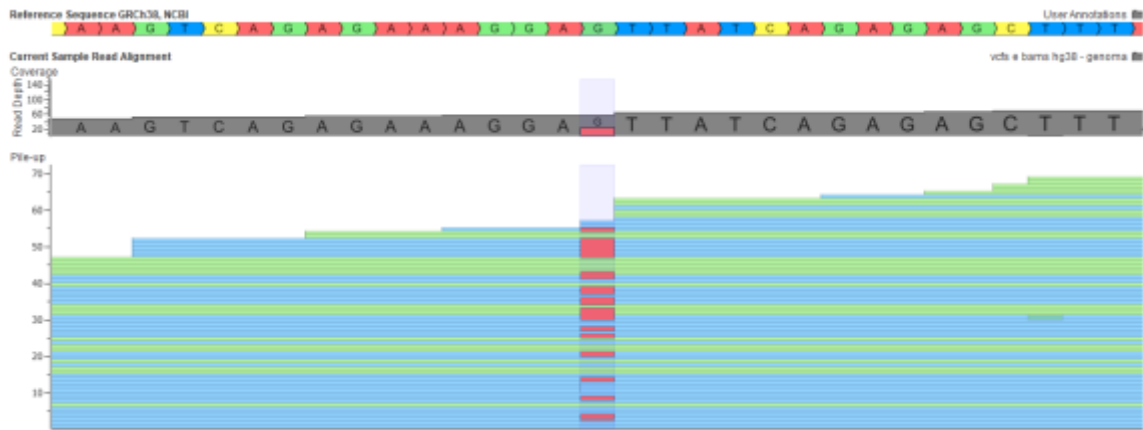


Imagem gerada no programa VarSeq (Golden Helix)

**Figura 16:** Imagem no arquivo BAM do sequenciamento do gene *KMT2E* do Paciente 5, mostrando a presença do nucleotídeo adenina (A) em 43% dos *reads* (heterozigose) (linha rosa) na posição que seria uma guanina (G).

Esse gene é altamente conservado entre as espécies e codifica uma enzima da família metiltransferase 2 envolvida na regulação da transcrição de vários genes através de metilação e remodelação da cromatina. (Zhang et al., 2017). A evidência funcional sugere que a proteína KMT2E é capaz de reconhecer e se ligar seletivamente às histonas metiladas, onde pode regular a ligação do fator de transcrição ou de outra forma regular a transcrição, estando envolvida na progressão do ciclo celular, estabilidade genômica, hematopoiese e espermatogênese, porém sua função precisa permanece obscura (Li et al., 2021; Velmans et al., 2021).

Alterações no gene *KMT2E* estão relacionados à Síndrome O'Donnell-Luria-Rodan (ODLURO) (OMIM#618512), descrita recentemente, em 2019, com herança autossômica dominante e sinais clínicos com início na infância de atraso global do desenvolvimento, TEA, convulsão; na maioria dos afetados, a variante é *de novo*. Estudos avaliando variantes em heterozigose com provável perda de função da proteína, devido ao truncamento da proteína, foram observadas em 38 pacientes com fenótipo recorrente de DI geralmente leve, macrocefalia, TEA e

epilepsia. Foi observado um fenótipo mais grave em pacientes com alterações *missense* em comparação com pacientes com variantes de truncamento do gene, sugerindo que as variantes *missense* em *KMT2E* tenham um efeito de ganho de função, porém mais dados são necessários (O'Donnell-Luria *et al.*, 2019).

Velmans e colaboradores (2021) descreveram um espectro fenotípico da Síndrome O'Donnell-Luria-Rodan em 18 pacientes e, entre as características citadas, foram observados: maior prevalência em homens (78%), características neurológicas como DI (50%), atraso motor (72%), atraso da fala (94%), macrocefalia (56%), testa larga (59%) e bochechas cheias (53%).

Camundongos com deficiência de *kmt2e* não apresentam fenótipo neurológico, apenas retardo de crescimento, aumento de mortalidade e hematopoiese prejudicada (Black *et al.*, 2012).

Li e colaboradores (2021) relataram uma menina de 5 meses com ADNPM, convulsões, hipotonia, microcefalia, falha de crescimento, atraso de desenvolvimento e mancha café-com-leite. Através da análise de sequenciamento de exoma foi identificada uma variante *missense* classificada como provavelmente patogênica. Em outro caso descrito de um menino de 5 anos de idade, com atraso global do desenvolvimento, autismo e DI leve e episódios de convulsão, foi identificada uma variante *de novo* sinônima em sítio de *splicing* alternativo, resultando em uma proteína de isoforma anormal, classificada como provavelmente patogênica (Li *et al.*, 2021). Outro estudo relata dois casos com variantes *missense* e quadro clínico de atraso global do desenvolvimento, TEA, convulsões, hipotonia, microcefalia e dismorfismos faciais (Sharawat *et al.*, 2020).

Para avaliar a segregação da variante c.3794G>A na família, foi realizado o sequenciamento Sanger. A variante foi herdada da mãe, clinicamente normal.

Portanto, a variante permanece como VUS e não foi considerada a causa do fenótipo (figura 17).

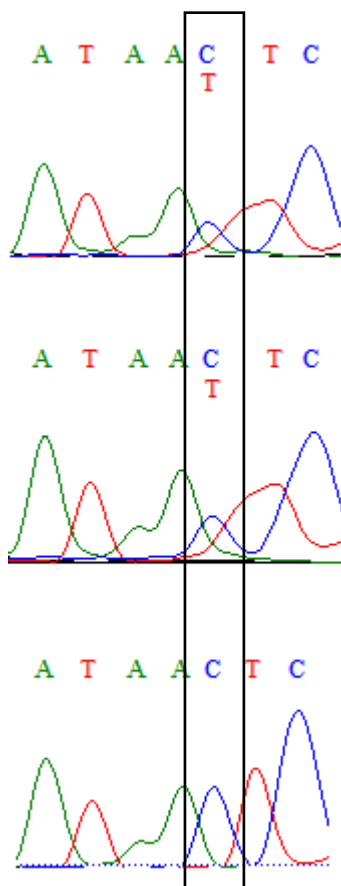


Imagem gerada no programa BioEdit

**Figura 17:** Imagem do eletroferograma da região do éxon 24 do gene *KMT2E* demonstrando a variante c.3794G>A (ou C>T) em heterozigose no paciente e em sua mãe.

## 7. Discussão e Conclusões

A consanguinidade é um fator importante na manifestação de condições autossômicas recessivas raras, como resultado de ambos genitores serem potencialmente heterozigotos para as mesmas variantes deletérias recessivas por ancestralidade comum. Em particular, a etiologia genética das DI vem sendo investigada em diversos estudos em populações que apresentam alta frequência de casamentos consanguíneos, onde 50 a 70% dos pacientes com DI sindrômica e/ou não sindrômica apresentam variantes causais em homozigose para genes já conhecidos e genes candidatos para DI (Najmabadi *et al.*, 2011; Alazami *et al.*, 2015; Harripaul R *et al.*, 2017; Reuter *et al.*, 2017; Riazuddin *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2018).

Neste projeto, o exoma dos cinco pacientes com DI, filhos de casais consanguíneos, foi analisado e as variantes clinicamente relevantes foram identificadas e avaliadas com relação ao potencial impacto fenotípico.

Em três pacientes a análise do exoma não foi conclusiva. As variantes de significado incerto (VUS) foram encontradas nos genes *ATAD3A*, *DYNC1H1*, *DNAH3* e *KMT2E*. Os genes *ATAD3A* e *DYNC1H1* apresentam funções relacionadas ao neurodesenvolvimento, e as principais características descritas nas condições OMIM causadas por variantes nesses genes não foram observadas no paciente estudado. O gene *DNAH3* possui participação na cilogênese e não tem ainda condição OMIM descrita, porém é considerado um gene candidato para o fenótipo de DI. O gene *KMT2E* com função de regulação transcricional de diversos genes possui condição OMIM recentemente descrita cursando com DI, epilepsia e TEA, características presentes no paciente em investigação, porém a variante gênica foi herdada da mãe, que não apresenta o fenótipo. Todas as

variantes foram excluídas como candidatas a causar os fenótipos após os estudos de segregação, que mostraram a presença das variantes em um dos genitores, clinicamente normais.

Variantes patogênicas foram identificadas em dois pacientes, afetando os genes *MTFMT* e *DOCK7*, com participação no metabolismo mitocondrial e com função importante na neurogênese, respectivamente. Estes pacientes apresentam fenótipos compatíveis aos descritos nas condições OMIM relacionadas, que incluem ADNPM, DI, quadros convulsivos, dismorfias e outras características específicas de cada gene. Ambas as variantes patogênicas identificadas ocorreram em homozigose, conferindo um risco de recorrência de 25% para futura prole de seus genitores, considerando o quadro clínico associado aos genes. Nesses casos, os quadros clínicos estão certamente associados à presença de consanguinidade entre os genitores.

Estudos de genômica clínica relatam taxa de diagnóstico molecular de doenças monogênicas entre 40% e 60% dos casos (Field *et al.*, 2021). Recentes estudos confirmam essa taxa de diagnóstico molecular, através de análise de exoma, obtidos para casos de DI em famílias consanguíneas (Rasheed *et al.*, 2021; Taşkıran *et al.*, 2021). Nossos resultados demonstram uma taxa de 2/5, ou seja, aproximadamente 40% dos pacientes investigados com diagnóstico molecular para a DI, embora o número seja muito pequeno para ter significado estatístico.

Os casos não conclusivos podem apresentar alterações genéticas não identificadas pelo exoma. que nesse estudo focou na identificação de variantes em genes codificadores, em particular naqueles presentes em regiões homozigóticas (Rasheed *et al.*, 2021). Alterações cromossômicas, microscópicas



e submicroscópicas são uma causa possível (Milani *et al.*, 2021), previamente excluídas nessa coorte. Causas não identificáveis pelo sequenciamento do exoma incluem variantes não codificantes que afetam a regulação ou splicing gênico (Field *et al.*, 2021), expansão de repetições curtas em tandem (*short tandem repeats - STRs*) (Malik *et al.*, 2021), mecanismos epigenéticos (Tseng *et al.*, 2021), entre outros mecanismos que podem explicar a falta de um diagnóstico genético.

Avaliando a consanguinidade e os riscos de doenças recessivas, ALAbdi e colaboradores (ALAbdi *et al.*, 2021), estimaram em 3% o risco residual de duas ou mais doenças recessivas ocorrem a cada filho(a) de casal consanguíneo, além do risco de recorrência de uma doença recessiva previamente documentada em famílias consanguíneas. Outros estudos que corroboram esse achado são Monies e colaboradores (2017) e Mor-Shaked e colaboradores (2021), que demonstraram que 10% dos casais consanguíneos compartilham variantes classificadas como patogênica ou provavelmente patogênica diferentes da variante observada em seu filho(a) afetado(a), sendo recomendado a realização de sequenciamento do exoma/genoma de casais consanguíneos, investigando não apenas variantes já conhecida na família.

O risco de ocorrência da prole de um casal consanguíneo ser afetada por alguma condição genética é estimada em 6% (Bittles, 2013); quando uma variante já foi identificada na família, há que considerar mais o risco de recorrência da variante identificada e adicional de 3% de risco de ocorrência de duas ou mais condições recessivas que podem ser transmitidas. Assim, no Aconselhamento Genético para os casais consanguíneos é possível conferir um risco real para a futura prole baseado nos resultados de exoma do trio (filho(a) afetado(a) e

genitores), bem como oferecer ao casal opções reprodutivas, protocolos de triagem e instruções de acompanhamento e tratamento do paciente índice.

Nosso estudo, embora modesto, ilustra que a consanguinidade deve desempenhar papel importante revelando novas variantes e genes DIAR também na investigação de casos isolados.

## 8. Resumo

Estima-se que entre 2 e 3% da população mundial apresente deficiência intelectual e suas formas mais severas são geralmente decorrentes de anomalias cromossômicas ou defeitos em genes específicos. Defeitos em genes autossômicos recessivos são considerados responsáveis por 3% dos casos de deficiência intelectual idiopática (DIAR). Pesquisas voltadas para este tipo de variação hereditária através de estudos de ligação com mapeamento de regiões em homozigose em famílias consanguíneas contribuíram muito para o avanço de estudos de genes relacionados à DIAR. No entanto, a heterogeneidade etiológica torna a correlação fenótipo-genótipo difícil. O número de genes relacionados a DI cresce constantemente e até o momento 2.841 genes primários e candidatos já foram identificados, no entanto, estima-se que somente para DIAR existam cerca de 3 mil genes.

Por meio do sequenciamento de exoma completo, este projeto propôs identificar a etiologia da DI em 5 indivíduos filhos de casamentos consanguíneos. O diagnóstico e conhecimento da causa genética da deficiência intelectual permitem identificar portadores na família, estimar risco de recorrência e eventualmente oferecer diagnóstico pré-natal. Além do benefício para as famílias estudadas com identificação de variantes sabidamente patogênicas nos pacientes, este projeto identificou novas variantes em genes já descritos e, eventualmente, um novo gene relacionado a DI.

## **9. Abstract**

It is estimated that between 2 and 3% of the world population has intellectual disability and most severe forms of that condition are usually due to chromosomal anomalies or damaged in specific genes. Damages in autosomal recessive genes are considered responsible for 3% of cases of idiopathic intellectual disability (ARID). Research focused on this type of hereditary variation through linkage studies with mapping of regions in homozygosity in consanguineous families has a strong contribution to the advancement of studies of genes related to ARID. However, the etiological heterogeneity makes the phenotype-genotype correlation difficult. The number of genes related to DI is constantly rising and so far 2,841 primary and candidate genes have been identified, however, it is estimated that there are around 3,000 genes for ARID.

Through whole-exome sequencing, this project proposed to identify the etiology of ID in 5 individuals born of consanguineous marriages. The diagnosis and knowledge of the genetic cause of intellectual disability make it possible to identify carriers in the family, estimate the risk of recurrence and eventually offer prenatal diagnosis. In addition to the benefit for the families studied with the identification of known pathogenic variants in patients, this project identified new variants in genes already described and eventually, a new gene related to ID.

## 10. Referências Bibliográficas

- AlAbdi L, Alrashseed S, Alsulaiman A, Helaby R, Imtiaz F, Alhamed M, Alkuraya FS (2021) - Residual risk for additional recessive diseases in consanguineous couples. *Genet Med.* 23(12):2448-2454.
- Alazami AM, Patel N, Shamseldin HE, Anazi S, Al-Dosari MS, Alzahrani F (2015) - Accelerating novel candidate gene discovery in neurogenetic disorders via whole exome sequencing of prescreened multiplex consanguineous families. *Cell Rep.* 10(2):148–61.
- Amabile S, Jeffries L, McGrath JM, Ji W, Spencer-Manzon M, Zhang H, Lakhani SA (2020) - DYNC1H1-related disorders: A description of four new unrelated patients and a comprehensive review of previously reported variants. *Am J Med Genet.* 182(9):2049-2057.
- Amendola LM, Golden-Grant K, Scollon S (2021) - Scaling Genetic Counseling in the Genomics Era. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* 22:339–55.
- Becker LL, Dafsari HS, Schallner J, Abdin D, Seifert M, Petit F, Smol T, Bok L, Rodan L, Krapels I, Spranger S, Weschke B, Johnson K, Straub V, Kaindl AM, Donato ND, Hagen M, Cirak S (2020) - The clinical-phenotype continuum in DYNC1H1-related disorders - genomic profiling and proposal for a novel classification. *Journal of Human Genetics* 65(11):1003-1017.
- Bennett RL, Malleda NR, Byers PH, Steiner RD, Barr KM (2020) - Genetic counseling and screening of consanguineous couples and their offspring practice resource: Focused Revision. *J Genet Couns.* 30:1354–1357.

- Bittles AH (2008) - A community genetics perspective on consanguineous marriage. *Community Genet.* 11(6):324-30.
- Bittles AH (2013) - Consanguineous marriages and congenital anomalies. *Lancet.* 382:1316–1317.
- Black JC, Van Rechem C, Whetstone JR (2012) - Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Mol Cell.* 48(04):491–507.
- Brunet M, Vargas C, Larrieu D, Torrisani J, Dufresne M (2020) - E3 Ubiquitin Ligase TRIP12: Regulation, Structure, and Physiopathological Functions. *Int. J. Mol. Sci.* 21(22):8515.
- Clark DW, Okada Y, Moore K, Mason D, Pirastu N, Gandin I, *et al.* (2019) - Associations of autozygosity with a broad range of human phenotypes. *Nat Commun.* 10(1):4957.
- Deciphering Developmental Disorders Study (2017) - Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders. *Nature* (542):433–438.
- Ellis H (2013) - John Langdon Down: Down's syndrome. *J Perioper Pract.* 23(12):296-7.
- Erzurumluoglu AM, Shihab HA, Rodriguez S, Gaunt TR, Day INM (2016) - Importance of Genetic Studies in Consanguineous Populations for the Characterization of Novel Human Gene Functions. *Annals of Human Genetics.* 80(3):187–196.
- Field MJ, Kumar R, Hackett A, Kayumi S, Shoubridge CA, Ewans LJ, Ivancevic AM, Dudding-Byth T, Carroll R, Kroes T, Gardner AE, Sullivan P, Ha TT, Schwartz CE, Cowley MJ, Dinger ME, Palmer EE, Christie L, Shaw M, Roscioli T, Gecz J, Corbett MA (2021) - Different types of disease-causing noncoding variants revealed by

- genomic and gene expression analyses in families with X-linked intellectual disability. *Human Mutation*. 1–13.
- Goldenberg P (2018) - An Update on Common Chromosome Microdeletion and Microduplication Syndromes. *Pediatr Ann*. 47(5):e198-e203.
- Haack TB, Gorza M, Danhauser K, Mayr JA, Haberberger B, Wieland T, Kremer L, Strecker V, Graf E, Memari Y, Ahting U, Kopajtich R, Wortmann SB, Rodenburg RJ, Kotzaeridou U, Hoffmann GF, Sperl W, Wittig I, Wilichowski E, Schottmann G, Schuelke M, Plecko B, Stephani U, Stroma TM, Meitinger T, Prokisch H, Freisinger P (2014) - Phenotypic spectrum of eleven patients and five novel MTFMT mutations identified by exome sequencing and candidate gene screening. *Molecular Genetics and Metabolism*. *Mol Genet Metab*. 111(3):342-352.
- Harel T, Yoon WE, Garone C, Gu S, Coban-Akdemir Z, Eldomery MK, Posey JE, Jhangiani SN, Rosenfeld JA, Cho MT, Fox S, Withers M, Brooks SM, Chiang T, Duraine L, Erdin S, Yuan B, Shao Y, Moussallem E, Lamperti C, Donati MA, Smith JD, McLaughlin HM, Eng CM, Walkiewicz M, Xia F, Pippucci T, Magini P, Seri M, Zeviani M, Hirano M, Hunter JV, Srour M, Zanigni S, Lewis RA, Muzny DA, Lotze TE, Boerwinkle E, Gibbs RA, Hickey SE, Graham BH, Yang Y, Buhas D, Martin DM, Potocki L, Graziano C, Bellen HJ, Lupski JR (2016) - Recurrent De Novo and Biallelic Variation of ATAD3A, Encoding a Mitochondrial Membrane Protein, Results in Distinct Neurological Syndromes. *The American Journal of Human Genetics* 99(4):831–845.
- Harripaul R, Vasli N, Mikhailov A, Rafiq MA, Mittal K, Windpassinger C, Sheikh TI, Noor A, Mahmood H, Downey S, Johnson M, Vleuten K, Bell L, Ilyas M, Khan FS, Khan

- V, Moradi M, Ayaz M, Naeem F, Heidari A, Ahmed I, Ghadami S, Agha Z, Zeinali S, Qamar R, Mozdhipanah H, John P, Mir A, Ansar M, French L, Ayub M and Vincent JB (2017) - Mapping autosomal recessive intellectual disability: combined microarray and exome sequencing identifies 26 novel candidate genes in 192 consanguineous families. *Mol Psychiatry* 23(4):973-984.
- Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, Nieuwint A, Polstra A, Poddighe P, Ruivenkamp C, Sikkema-Raddatz B, Smeets D, Poot M (2009) - Array analysis and karyotyping: workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *Eur J Med Genet.* 52(4):161-9.
- Hu H, Kahrizi K, Musante L, Fattahi Z, Herwig R, Hosseini M, Oppitz C, Abedini SS, Suckow V, Larti F, Beheshtian M, Lipkowitz B, Akhtarkhavari T, Mehvari S, Otto S, Mohseni M, Arzhang S, Jamali P, Mojahedi F, Taghdiri M, Papari E, Banavandi MJS, Akbari S, Tonekaboni SH, Dehghani H, Ebrahimpour MR, Bader I, Davarnia B, Cohen M, Khodaei H, Albrecht B, Azimi S, Zirn B, Bastami M, Wieczorek D, Bahrami G, Keleman K, Vahid LN, Tzschach A, Gärtner J, Gillessen-Kaesbach G, Varaghchi JR, Timmermann B, Pourfatemi F, Jankhah A, Chen W, Nikuei P, Kalscheuer VM, Oladnabi M, Wienker TF, Ropers HH, Najmabadi H (2018). - Genetics of intellectual disability in consanguineous families. *Mol Psychiatry* 24(7):1027-1039.
- Ilyas M, Mir A, Efthymiou S, Houlden H (2020). The genetics of intellectual disability: advancing technology and gene editing. *F1000Res.* 16:9:F1000 Faculty Rev-22.



- Iwase S, Bérubé NG, Zhou Z, Kasri NN, Battaglioli E, Scandaglia M, Barco A (2017). Epigenetic Etiology of Intellectual Disability. *The Journal of Neuroscience* 37(45):10773–10782.
- Jamra R (2018). Genetics of autosomal recessive intellectual disability. *Med Genet.* 30(3):323-327.
- Järvelä I, Määttä T, Acharya A, Leppälä J, Jhangiani SN, Arvio M, Siren A, Kankuri-Tammilehto M, Kokkonen H, Palomäki M, Varilo T, Fang M, Hadley TD, Jolly S, Linnankivi T, Paetau R, Saarela R, Kälviäinen R, Olme J, Nouel-Saied LM, Cornejo-Sanchez DM, Llaci L, Lupski JR, Posey JE, Leal SM, Schrauwen (2021) - Exome sequencing reveals predominantly de novo variants in disorders with intellectual disability (ID) in the founder population of Finland. *Hum Genet.* 140(7):1011-1029.
- Kahrizi K, Hu H, Hosseini M, Kalscheuer VM, Fattahi Z, Beheshtian M, Suckow V, Mohseni M, Lipkowitz B, Mehvari S, Mehrjoo Z, Akhtarkhavari T, Ghaderi Z, Rahimi M, Arzhanghi S, Jamali P, Chian MF, Nikuei P, Kermani FS, Sadeghinia F, Jazayeri R, Tonekaboni SH, Khoshaeen S, Habibi H, Pourfatemi F, Mojahedi F, Khodaie-Ardakani MR, Najafipour R, Wienker TF, Najmabadi H, Ropers HH (2018) - Effect of inbreeding on intellectual disability revisited by Trio sequencing. *Clin Genet.* 95(1):151-159.
- Kochinke K, Zweier C, Nijhof B et al. (2016) - Systematic phenomics analysis deconvolutes genes mutated in intellectual disability into biologically coherent modules. *Am J Hum Genet.* 7;98(1):149-64.

- Kvarnung M, Nordgren A (2017) - Intellectual Disability & Rare Disorders: A Diagnostic Challenge. *Adv Exp Med Biol.* 1031:39-54.
- Leblond CS, Le TL, Malesys S, Cliquet F, Tabet AC, Delorme R, Rolland T, Bourgeron T (2021) - Operative list of genes associated with autism and neurodevelopmental disorders based on database review. *Molecular and Cellular Neuroscience* 113:103623.
- Lee K, Cascella M, Marwaha R (2021) - Intellectual Disability. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Lejeune J, Gautier M, Turpin R (1959) - Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *C R Hebd Seances Acad Sci* 248(11):1721–1722.
- Li Y, Fan L, Luo R, Yang Z, Yuan M, Zhang J, Gan J (2021) - Case Report: De novo Variants of KMT2E Cause O'Donnell-Luria-Rodan Syndrome: Additional Cases and Literature Review. *Front Pediatr.* 9:641841.
- Lubs HA (1968) - Marker X Chromosome. *Am J Hum Genet* :21(3):231-44.
- Lubs HA, Stevenson RE, Schwartz CE (2012) - Fragile X and X-linked intellectual disability: Four decades of discovery. *Am J Hum Genet* 90(4):579–590.
- Malik I, Kelley CP, Wang ET, Todd PK (2021) - Molecular mechanisms underlying nucleotide repeat expansion disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (22): 589–607.
- Martin HC, Jones WD, McIntyre R, Sanchez-Andrade G, Sanderson M, Stephenson JD, Jones CP, Handsaker J, Gallone G, Bruntraeger M, McRae JF, Prigmore E, Short P, Niemi M, Kaplanis J, Radford EJ, Akawi N, Balasubramanian M, Dean J, Horton R, Hulbert A, Johnson DS, Johnson K, Kumar D, Lynch SA, Mehta SG, Morton J,

- Parker MJ, Splitt M, Turnpenny PD, Vasudevan PC, Wright M, Bassett A, Gerety SS, Wright CF, FitzPatrick DR, Firth HV, Hurles ME, Barrett JC, The Deciphering Developmental Disorders Study (2018) - Quantifying the contribution of recessive coding variation to developmental disorders. *Science* 362(6419):1161-1164.
- Martin JP & Bell J (1943) - A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *J Neurol Psychiatry* 6(3-4):154–157.
- Maulik PK, Mascarenhas MN, Mathers CD, Dua T, Saxena S. (2011) - Prevalence of intellectual disability: a meta-analysis of population-based studies. *Res Dev Disab* 32(2):419 –436.
- Milani DAQ, Tadi P (2022) - Genetics, Chromosome Abnormalities. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Mir YR, Kuchay RAH (2019). Advances in identification of genes involved in autosomal recessive intellectual disability: a brief review. *J Med Genet.* 56(9):567-573.
- Monies D, Abouelhoda M, AISayed M, Alhassnan Z, Alotaibi M, Kayyali H, et al. (2017) - The landscape of genetic diseases in Saudi Arabia based on the first 1000 diagnostic panels and exomes. *Hum Genet.* 136(8):921-939.
- Mor-Shaked H, Rips J, Gershon Naamat S, Reich A, Elpeleg O, Meiner V, et al. (2021) - Parental exome analysis identifies shared carrier status for a second recessive disorder in couples with an affected child. *Eur J Hum Genet.* 29(3):455-462.
- Musante L, Ropers HH (2015) – Genetics of recessive cognitive disorders. *Trends Genet.* 30(1):32-9.
- Najmabadi, H. et al. (2011) - Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature* 21;478(7367):57-63.

- Neeve VCM, Pyle A, Boczonadi V, Gomez-Duran A, Griffin H, Santibanez-Koref M, Gaiser U, Bauer P, Tzschach A, Chinnery PF, Horvath R (2013) - Clinical and functional characterisation of the combined respiratory chain defect in two sisters due to autosomal recessive mutations in MTFMT. *Mitochondrion* 13(6):743–8.
- Nelson B. (2009) – Mental retardation and intellectual disability. *Vogel and Motulsky's Human Genetics*. New York: Springer. 4th ed: 663-680.
- O'Donnell-Luria AH, Pais LS, Faundes V, Wood JC, Sveden A, Luria V, Jamra RA, Accogli A, Amburgey K, Anderlid BM, Azzarello-Burri S, Basinger AA, Bianchini C, Bird LM, Buchert R, Carre W, Ceulemans S, Charles P, Cox H, Culliton L, Currò A, Demurger F, Dowling JJ, Duban-Bedu B, Dubourg C, Eiset SE, Escobar LF, Ferrarini A, Haack TB, Hashim M (2019) - Heterozygous Variants in KMT2E Cause a Spectrum of Neurodevelopmental Disorders and Epilepsy. *Am J Hum Genet* 104(6):1210–1222.
- Pena JA, Lotze T, Yang Y, Umana L, Walkiewicz M, Hunter JV, Scaglia F (2016) - Methionyl-tRNA Formyltransferase (MTFMT) Deficiency Mimicking Acquired Demyelinating Disease. *J Child Neurol*. 31(2):215-9.
- Perrault I, Hamdan FF, Rio M, Capo-Chichi JM, Boddaert N, Décarie JC, Maranda B, Nabbout R, Sylvain M, Lortie A, Roux PP, Rossignol E, Gérard X, Barcia G, Berquin P, Munnich A, Rouleau GA, Kaplan J, Rozet JM, Michaud JL (2014) - Mutations in DOCK7 in Individuals with Epileptic Encephalopathy and Cortical Blindness. *Am J Hum Genet*. 94(6):891-7.
- Purugganan O (2018) - Intellectual Disabilities. *Pediatr Rev*. 39(6):299-309.

- Quach TT, Stratton HJ, Khanna R, Kolattukudy PE, Honnorat J, Meyer K, Duchemin AM (2021) - Intellectual disability: dendritic anomalies and emerging genetic perspectives. *Acta Neuropathol.* 141(2):139-158.
- Rasheed M, Khan V, Harripaul R, Siddiqui M, Malik MA, Ullah Z, Zahid M, Vincent JB, Ansar M (2021) - Exome sequencing identifies novel and known mutations in families with intellectual disability. *BMC Med Genomics* 14:211.
- Resta R, Biesecker BB, Bennett RL, Blum S, Hahn SE, et al (2006) - A new definition of genetic counseling: National Society of Genetic Counselors' task force report. *J. Genet. Couns.* 15:77–83.
- Reuter MS, Tawamie H, Buchert R, Gebiril OH, Froukh T, Thiel C, Uebe S, Ekici AB, Krumbiegel M, Zweier C, Hoyer J, Eberlein K, Bauer J, Scheller U, Strom TM, Hoffjan S, Abdelraouf ER, Meguid NA, Abboud A, Khateeb MAA, Fakher M, Hamdan S, Ismael A, Muhammad S, Abdallah E, Sticht H, Wieczorek D, Reis A, Jamra RA (2017) - Diagnostic Yield and Novel Candidate Genes by Exome Sequencing in 152 Consanguineous Families with Neurodevelopmental Disorders. *JAMA Psychiatry.* 74(3):293-299.
- Riazuddin S, Hussain M, Razzaq A, Iqbal Z, Shahzad M, Polla DL, Song Y, Beusekom E, Khan AA, Tomas-Roca L, Rashid M, Zahoor MY, Wissink-Lindhout WM, Basra MAR, Ansar M, Agha Z, Heeswijk K, Rasheed F, Vorst MV, Veltman JA, Gilissen C, Akram J, Kleefstra T, Assir MJ, Grozeva D, Carss K, Raymond FL, O'Connor TD, Riazuddin SA, Khan SN, Ahmed ZM, Brouwer APM, Bokhoven H, Riazuddin S (2017) - Exome sequencing of Pakistani consanguineous families identifies 30

- novel candidate genes for recessive intellectual disability. *Molecular Psychiatry* 22(11):1604–1614.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL (2015) - 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.* 17(5):405-24.
- Ropers HH (2010) - Genetics of Early Onset Cognitive Impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 11:161-87.
- Santos-Cortez RLP, Khan V, Khan FSS, Mughal ZN, Chakchouk I, Lee K, Rasheed M, Hamza R, Acharya A, Ullah E, Saqib MAN, Abbe I, Ali G, Hassan MJ, Khan S, Azeem Z, Ullah I, Bamshad MJ, Nickerson DA, Schrauwen I, Ahmad W, Ansar M, Leal SM (2018) - Novel candidate genes and variants underlying autosomal recessive neurodevelopmental disorders with intellectual disability. *Hum Genet* .137(9):735–752.
- Seo JH, Hwang CS, Yoo JY (2020) - MTFMT deficiency correlates with reduced mitochondrial integrity and enhanced host susceptibility to intracellular infection. *Sci Rep.* 10(1):11183
- Sharawat IK, Panda PK, Dawman L (2020) - Clinical Characteristics and Genotype–Phenotype Correlation in Children with KMT2E Gene-Related Neurodevelopmental Disorders: Report of Two New Cases and Review of Published Literature. *Neuropediatrics* 52(2):98-104.

- Taşkıran EZ, Karaosmanoğlu B, Koşukcu C, Ürel-Demir G, Akgün-Doğan O, Şimşek-Kiper PO, Alikaşifoğlu M, Boduroğlu K, Utine GE (2021) - Diagnostic yield of whole-exome sequencing in non-syndromic intellectual disability. *Journal of Intellectual Disability Research* 65(6):577-88.
- Tseng CEJ, McDougle CJ, Hooker JM, Zürcher NR (2021) - Epigenetics of Autism Spectrum Disorder: Histone Deacetylases. *Biol Psychiatry* (21)01832-1.
- Turkdogana D, Turkyilmazb A, Gormezc Z, Sagera G, Ekincid G (2019) – A novel truncating mutation of DOCK7 gene with an early-onset nonencephalopathic epilepsy. *Seizure: European Journal of Epilepsy* 66:12–14.
- Velmans C, O'Donnell-Luria AH, Argilli E, Mau-them FT, Vitobello A, Chan MCY, Fung JLF, Rech M, Abicht A, Mucca MA, Carmichael J, Chassaing N, Clark R, Coubes C, Denommé-Pichon AS, Dios JK, England E, Funalot B, Gerard M, Joseph M, Kennedy C, Kumps C, Willems M, Laar IMBH, Aarts-Tesselaar C, Slegtenhorst M, Lehalle D, Leppig K, Lessmeier L, Pais LS, Paterson H, Ramanathan S, Rodan LH, Superti-Furga A, Chung BHY, Sherr E, Netzer C, Schaaf CP, Erger F (2021) - O'Donnell-Luria-Rodan syndrome: description of a second multinational cohort and refinement of the phenotypic spectrum. *J Med Genet.* jmedgenet-2020-107470.
- Vianna EQ, Piergiorgio RM, Gonçalves AP, Santos JM, Calassara V, Rosenberg C, Krepischi ACV, Silva RTB, Santos SR, Ribeiro MG, Machado FB, Medina-Acosta E, Pimentel MMG, Santos-Rebouças CB (2020) - Understanding the Landscape of X-linked Variants Causing Intellectual Disability in Females Through Extreme X Chromosome Inactivation Skewing. *Mol Neurobiol.* 57(9):3671-3684.

- Vissers LE, Gilissen C, Veltman JA (2016) - Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nat Rev Genet.* 17(1):9-18.
- Willemsen MH, Vissers LEL, Willemsen MAAP, Bon BWM, Kroes T, Ligt J, Vries BB, Schoots J, Lugtenberg D, Hamel BCJ, Bokhoven H, Brunner HG, Veltman JA, Kleefstra T (2014) - Mutations in *DYNC1H1* cause severe intellectual disability with neuronal migration defects. *J Med Genet* (49):179-183.
- Wright CF, FitzPatrick DR, Firth HV (2018) - Paediatric genomics: diagnosing rare disease in children. *Nat Rev Genet.* 19(5):253-268.
- Zamboni V, Jones R, Umbach A, Ammoni A, Passafaro M, Hirsch E, Merlo GR (2018) - Rho GTPases in Intellectual Disability: From Genetics to Therapeutic Opportunities. *Int J Mol Sci.* 19(6):1821.
- Zhang X, Novera W, Zhang Y, Deng LW (2017) - *MLL5 (KMT2E)*: structure, function, and clinical relevance. *Cell Mol Life Sci* 74(13):2333-2344.