

Katiane Sayão Souza Cabral

**Sequenciamento completo do exoma no diagnóstico de
defeitos do desenvolvimento cerebelar e da migração
neuronal cerebral**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção de título de Doutora em
Ciências

Programa de Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Kok

São Paulo

2022

Katiane Sayão Souza Cabral

**Sequenciamento completo do exoma no diagnóstico de
defeitos do desenvolvimento cerebelar e da migração
neuronal cerebral**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção de título de Doutora em
Ciências

Programa de Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Kok

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Cabral, Katiane Sayão Souza

Sequenciamento completo do exoma no diagnóstico de defeitos do desenvolvimento cerebelar e da migração neuronal cerebral / Katiane Sayão Souza Cabral. -- São Paulo, 2022.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Neurologia.

Orientador: Fernando Kok.

Descritores: 1.Malformações do desenvolvimento cortical do grupo II 2.Lissencefalias clássicas e heterotopias subcorticais em banda 3.Polimicrogiria 4.Doenças cerebelares 5.Neuroimagem 6.Sequenciamento completo do exoma

USP/FM/DBD-012/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Ao meu filho **Lucas**, nascido durante este trajeto, que se revelou minha maior fonte de aprendizado.

Ao meu esposo **Ramon**, pelo incentivo desde o início deste projeto.

À minha avó **Maria** (mesmo hoje sem lucidez, sua presença me inspira) e meu avô **Elias** (*in memoriam*), que sempre me incentivaram. Ao meu pai **Aluízio**, **irmãos** e **família** que, mesmo distantes, são alicerces.

Agradecimentos

Ao meu professor e orientador **Prof. Dr. Fernando Kok**, por dividir tão valiosos conhecimentos, sobretudo pela compreensão, apoio e paciência neste trajeto que foi interpelado por tantos obstáculos.

À querida amiga e excelente profissional **Lúcia Inês Macedo de Souza**, por toda a assessoria, o auxílio nos necessários conhecimentos de genética molecular e o incentivo à conclusão deste trabalho. Obrigada por tudo!

Às amigas **Luciana Midori Inuzuka**, por todo o apoio, incentivo e suporte (você foi essencial), mesmo atarefada com sua própria tese, e **Mariana Espíndola**, pela participação valiosa na coleta de dados.

Aos radiologistas **Maria das Graças Moraes Martin** e **Daniel Delgado** pela robusta participação, revisando os exames de neuroimagem e, inclusive, auxiliando na busca ativa dos mesmos. Vocês foram incríveis!

À secretária da Pós-Graduação em Neurologia / FMUSP, **Thais Figueira**, pelas orientações e apoio em todas as dificuldades do caminho. Obrigada!

Ao **Dr. Luiz Henrique Castro** e à chefe da Pós Graduação da USP, Ângela V. Silva Guedes, pela compreensão e atitude humana, possibilitando a conclusão deste trabalho dentro do tempo que foi necessário.

Às **Dras. Fernanda Góes, Eliana Garzón e Vanessa van der Linden** pelo compartilhamento de informações (previamente consentidas) sobre seus pacientes, gentilmente cedidas para esta obra.

A todos os **pacientes** e seus **responsáveis**, motivação primeira de todos os esforços de produção científica, por sua irrestrita doação a este trabalho, pela paciência, tempo e incrível disposição em contribuir com o seu bem mais precioso para a evolução do conhecimento científico. Vocês são a essência deste trabalho!

Ao meu filho **Lucas** e esposo **Ramon**, pela compreensão em tantos momentos da minha necessária ausência. À minha avó **Maria da Conceição**, pela presença em todos os momentos, mesmo hoje sem lucidez; ao meu pai **Aluizio, irmãos e família paterna**, por serem meus alicerces sempre. Todos vocês são essência do que sou!

*"Muitos afirmam que tudo o que sabemos
ainda é infinitamente menos do que tudo o
que ainda permanece desconhecido".*

Willian Harvey

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1	Introdução	1
2	Objetivos.	
	2.1 Objetivo principal	8
	2.2 Objetivos secundários	8
3	Revisão da Literatura	
	3.1 Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central.....	9
	3.1.1 Desenvolvimento Cerebelar Humano.....	9
	3.1.1.1 Período Embrionário.....	9
	3.1.1.2 Proliferação e Migração Neuronal Cerebelares.....	10
	3.1.1.3 Defeitos do Desenvolvimento Cerebelar.....	12
	3.1.2 Desenvolvimento Cerebral Humano.....	14
	3.1.2.1 Período Embrionário.....	14
	3.1.2.2 Proliferação e Migração Neuronal Cerebrais.....	15
	3.1.2.3 Distúrbios de Migração Neuronal Cortical.....	16
	3.1.2.4 Malformações do Desenvolvimento Cortical.....	17
	3.2 Conceitos Básicos de Genética e Expressão Gênica.....	24
	3.2.1 Estrutura dos genes humanos que codificam proteínas.....	25
	3.2.2 Processo de Tradução Proteica em humanos.....	26
	3.2.3 Conceito e Classificação dos Tipos de Mutação.....	27
	3.2.3.1 Classificação Estrutural.....	27
	3.2.3.1.1 Mutação de Ponto.....	27
	3.2.3.1.2 INDEL (inserção / deleção de nucleotídeos)...	28
	3.2.3.1.3 CNV (<i>Copy number variation</i> = variação no número de cópias).....	28
	3.2.3.2 Classificação Funcional.....	28
	3.2.3.3 Padrões de Herança.....	30
	3.3 Técnicas de Sequenciamento Genético.....	30
	3.3.1 Sequenciamento Sanger.....	31
	3.3.2 Sequenciamento de Nova Geração (NGS).....	31
	3.3.2.1 Painéis Genéticos.....	31
	3.3.2.2 Exoma Clínico.....	32
	3.3.2.3 Sequenciamento Completo do Exoma.....	32
	3.3.2.4 Sequenciamento Completo do Genoma.....	32

4	Métodos	
4.1	Desenho do Estudo.....	33
4.2	Local.....	33
4.3	Amostra.....	33
4.3.1	Critérios de inclusão.....	33
4.3.2	Critérios de exclusão.....	34
4.4	Procedimentos.....	34
4.4.1	Sequenciamento do exoma.....	34
4.4.2	Dados clínicos e de exames complementares.....	35
4.4.2.1	Dados clínicos.....	35
4.4.2.2	Dados de Neuroimagem.....	36
4.4.2.3	Interpretação do Sequenciamento Completo do Exoma.....	36
4.5	Aspectos éticos	37
5	Resultados	
5.1	Aspectos Gerais e Demográficos.....	38
5.2	Aspectos Genéticos.....	39
5.3	Casos Clínicos.....	47
5.3.1	<i>ARFGEF2</i> (ADP-Ribosylation Factor Guanine Nucleotide Exchange Factor 2, OMIM *605371).....	47
5.3.2	<i>ATP1A3</i> (ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, Alpha-3 polypeptide, OMIM *182350).....	48
5.3.3	<i>CASK</i> (Calcium/Calmodulin Dependent Serine Protein Kinase, OMIM *300172).....	50
5.3.4	<i>DYNC1H1</i> (Dynein Cytoplasmic 1 Heavy Chain 1, OMIM *600112).....	51
5.3.5	<i>EXOSC3</i> (Exosome Component 3, OMIM *606489).....	52
5.3.6	<i>L1CAM</i> (L1 Cell Adhesion Molecule, OMIM *308840).....	53
5.3.7	<i>MAST1</i> (Microtubule-Associated Serine/Threonine Kinase 1, OMIM *612256).....	54
5.3.8	<i>MTOR</i> (Mechanistic Target of Rapamycin, OMIM *601231).....	56
5.3.9	<i>PAFAH1B1</i> (Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase, OMIM *601545).....	57
5.3.10	<i>RARS2</i> (Arginyl-tRNA Synthetase 2, OMIM *611524).....	59
5.3.11	<i>RHOBTB2</i> (RHO-Related Broad Complex, Tramtrack, and Bric-a-brac Domain-Containing Protein 2, OMIM *607352).....	60
5.3.12	<i>SCN3A</i> (Sodium Voltage-Gated Channel, Alpha Subunit 3, OMIM *182391).....	62
5.3.13	<i>TUBA1A</i> (Tubulin alpha 1A, OMIM *602529).....	64
5.3.14	<i>TUBB</i> (Tubulin Beta, OMIM*191130).....	66
5.3.15	<i>TUBB3</i> (Tubulin Beta 3, OMIM *602661).....	67
5.3.16	<i>WDR73</i> (WD Repeat-Containing Protein 73, OMIM	

	*616144).....	68
6	Discussão	70
7	Conclusões	82
8	Anexos	83
9	Referências	90

Apêndice

Lista de Abreviaturas

ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
AD	autossômico dominante
AR	autossômico recessivo
BERA	<i>Brainstem Evoked Response Audiometry</i> - Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Encefálico
CDCBM1	<i>Cortical Dysplasia, Complex, With Other Brain Malformations 1</i> - Displasia cortical complexa com outras malformações cerebrais 1
CDCBM6	<i>Cortical Dysplasia, Complex, With Other Brain Malformations 6</i> - Displasia cortical complexa com outras malformações cerebrais 6
CNV	Copy Number Variation - Variação do número de cópias
DCF	Displasia cortical focal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPM	Desenvolvimento neuropsicomotor
EEIE62	<i>Epileptic Encephalopathy, Early Infantile, 62</i> - Encefalopatia epiléptica infantil precoce 62
EEIE64	<i>Epileptic Encephalopathy, Early Infantile, 64</i> - Encefalopatia epiléptica infantil precoce 64
EEIE99	<i>Epileptic Encephalopathy, Early Infantile, 99</i> - Encefalopatia epiléptica infantil precoce 99
FLAIR	<i>Fluid attenuated inversion recovery</i>
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>
HSB	Heterotopia subcortical em bandas
MCD	<i>Malformations of Cortical Development</i> - Malformações do Desenvolvimento Cortical
MICPCH	<i>Intellectual developmental disorder with microcephaly and pontine and cerebellar hypoplasia</i> - Deficiência intelectual com microcefalia e hipoplasia
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PC	Perímetro cefálico
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - Reação da Polimerase em Cadeia
RM	Ressonância magnética
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNA _t	RNA transportador
USG	Ultrassonografia
USTF	Ultrassonografia transfontanela
UTR	Untranslated region - Região não traduzida
VUS	Variant of uncertain significance
ZSV	Zona subventricular
ZV	Zona ventricular

Lista de Tabelas

Tabela 1	Principais estágios do desenvolvimento do SNC humano (modificada de ten Donkelaar, 2006).....	4
Tabela 2	Risco de Recorrência Empírico nas Malformações do Desenvolvimento Cortical (adaptado de Oegema et al., 2020)	22
Tabela 3	Dados demográficos e gene identificado.....	39
Tabela 4	Genes e características das variantes identificadas.....	41
Tabela 5	Variantes identificadas, frequência no GnomAD v2.1.1 e presença na literatura médica.....	44
Tabela 6	Manifestações clínicas nas malformações corticais e cerebelares estudadas nesta série.....	72
Tabela 7	Alterações estruturais encontradas na neuroimagem.....	75
Tabela 8	Função principal do produto dos genes identificados neste estudo.....	79

Lista de Figuras

Figura 1	RM do caso 1.1. Corte Axial FLAIR (A) evidenciando atrofia e hipersinal bilateral das porções posteriores do putâmen; Axial T1 (B), revelando heterotopia nodular subependimária da substância cinzenta e Coronal T2 (C), com atrofia e hipersinal hipocampal.....	48
Figura 2	RM de crânio do caso 2.1. Cortes Coronal T2 (A) e Axial T2 (B) evidenciando extensa malformação do desenvolvimento cortical, de aspecto polimicrogírico frontotemporoparietal direito.....	49
Figura 3	Caso 3.1. Sequências Sagital T1 (A), Coronal T1 (B) e Sagital FLAIR (C). Hipoplasia cerebelar, discreta hipoplasia da ponte, com conseqüente alargamento do espaço liquórico da fossa posterior em seu aspecto inferior.....	50
Figura 4	Caso 4.1. Imagens axial T1 (A), axial T2 (B) e coronal T2 (C), evidenciando simplificação giral, fissuras sylvianas rasas e cornos temporais amplos.....	51
Figura 5	RM de crânio do caso 5.1. Imagem Axial T2 (A) e (B). Alargamento dos espaços liquóricos entre as folias nos hemisférios cerebelares, redução volumétrica mais acentuada do vermis e tonsilas cerebelares, além de discreta alteração de sinal nos núcleos denteados.....	52
Figura 6	RM de crânio do caso 6.1. (A) Imagem sagital T2 (A) mostrando displasia da junção mesencéfalo-diencefálica, com estenose do aqueduto; afilamento do corpo caloso; e (B) e (C) Axial FLAIR, demonstram severa dilatação dos ventrículos laterais; afilamento do manto cerebral remanescente com escassez de sua substância branca, disgiria cerebral difusa e indistinção dos núcleos da base (B).....	54
Figura 7	RM da paciente 7.1. Mega Corpo caloso, predomínio anterior, com múltiplos pequenos espaços perivasculares na interface caloso septal identificados em imagem sagital T2 (C) e fibras com orientação anômala anteroposterior junto a sua margem superior identificadas em estudo de tratografia (D). Rotação incompleta hipocampal identificada em imagem coronal T2 (B). Núcleos da base com aspecto dismórfico identificados em	

	T1 axial (A), observando-se espessamento da porção anterior da cabeça do caudado, putamen e do núcleo accumbens.....	55
Figura 8	RM de crânio do paciente 8.1, evidenciando em imagens Coronal T2 (A) e Axial FLAIR (B): alterações focais de sinal na substância branca periventricular frontal (heterotopias); alteração de sinal na porção medial das cabeças dos núcleos caudados, simétricas, com hipersinal em T2; polimicrogiria frontal bilateral.....	56
Figura 9.1	Caso 9.1. RM com 1 ano de idade. Sequência em Sagital T1, evidenciando severa hipoplasia pontocerebelar e afilamento do corpo caloso.....	58
Figura 9.2	RM do sujeito 9.1 aos 7 anos de idade. Imagens Sagital T1 evidenciando a progressiva redução volumétrica pontocerebelar.....	58
Figura 10	RM de crânio, caso 11.1. Imagens pesadas em T2, Coronal (A) e Axial (B e C), evidenciando redução volumétrica e hipersinal no vermis cerebelar superior e hemisférios cerebelares mediais inferiores e superiores.....	60
Figura 11	RM de crânio, caso 12.1. (A) Corte Coronal T1, evidenciando acentuada redução volumétrica encefálica difusa, incluindo tronco e cerebelo e agenesia do vermis cerebelar. (B) Corte Axial T1, ressaltando-se a redução volumétrica córtico-subcortical cerebral e a dilatação ventricular supratentorial. (C) Em Corte Sagital T1, são evidentes a polimicrogiria, agenesia do corpo caloso com colpocefalia e a acentuada hipoplasia pontocerebelar.....	61
Figura 12	RM do caso 13.2. (A) Corte Axial FLAIR, evidenciando simplificação giral, com sulcos rasos e opercularização incompleta, bilateral e simétrica, substância branca cerebral escassa com alterações focais de sinal, mais acentuadamente bifrontal, junto às malformações corticais. (B) Corte Coronal T2, mostrando o aspecto polimicrogírico do córtex cerebral....	63
Figura 13	Caso 14.1. (A) e (B): Imagens em Axial T2 evidenciando o aspecto de paquigiria / polimicrogiria do córtex cerebral, e de colpocefalia dos ventrículos laterais. (C): Corte Sagital T1, evidenciando a disgenesia do corpo caloso.....	64

- Figura 14 RM de crânio do caso 15.1. FLAIR axial (A) e sagital (B) e T2 axial (C). Desproporção craniofacial; Mal-formação do tronco, com incisura na ponte(C); hipoplasia do vermis cerebelar inferior (B) e mais discreta dos hemisférios cerebelares; alteração difusa da foliação cerebelar, sugerindo displasia cerebelar (C); agenesia do corpo caloso (B) com colpocefalia (A); disgiria com simplificação giral cerebral difusa..... 65
- Figura 15 RM de crânio. Caso 16.1. Cortes na sequência Axial T2 evidenciando hipoplasia de ponte assimétrica (A), fusão de núcleos da base e encurtamento da ínsula (B). Corte em 3D TTT SENSE revelando hipoplasia de corpo caloso e ponte (C) 66
- Figura 16 RM de crânio do caso 18.1. Corte Axial T2 (A) evidenciando discreta assimetria da ponte, alteração da sulcação e foliação em hemisférios e principalmente no vermis cerebelar. (B) Corte Sagital T1 mostrando hipoplasia de tronco encefálico, com espessamento relativo do tecto mesencefálico e afinamento de corpo caloso. (C) Corte Axial T1 evidenciando a fusão dos núcleos estriados bilateralmente..... 68
- Figura 17 RM de crânio, caso 19.1. Cortes Axial T2 (A), Axial T1 (B) e Coronal T2 (C) evidenciando a redução volumétrica cerebelar, associada a discreta redução de volume na protuberância pontinha..... 69

Resumo

Cabral KSS. *Sequenciamento completo do exoma no diagnóstico de defeitos do desenvolvimento cerebelar e da migração neuronal cerebral* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

As malformações do sistema nervoso central são a segunda causa mais comum de anomalias congênitas, após as cardiopatias, sendo responsáveis por significativa morbi-mortalidade infantil. No Brasil, cerca de um terço dos óbitos infantis por essa causa correspondem a malformações cerebrais, muitas de etiologia ainda mal definida. O desenvolvimento do cérebro e do cerebelo ocorre em etapas como diferenciação, proliferação, migração e desenvolvimento pós-migracional, orientadas pelas mesmas proteínas do citoesqueleto, razão pela qual é comum a associação, por exemplo, de malformações do desenvolvimento cerebelar com distúrbios da migração neuronal cerebral. O sequenciamento do genoma, ou sua porção codificante, o exoma, tem permitido elucidar a etiologia genética de muitas malformações encefálicas, bem como sugerido novos fenótipos associados a mutações gênicas já descritas. O principal objetivo do presente estudo foi investigar a importância do sequenciamento completo do exoma no esclarecimento etiológico de malformações cerebrais e cerebelares, especificamente dos defeitos do desenvolvimento cerebelar e da migração neuronal cerebral. Trata-se de um estudo observacional de série de casos, descritivo e retrospectivo. Foi analisada uma amostra de 20 pacientes, com idades entre 1 e 12 anos, com defeitos do desenvolvimento cerebelar e da migração neuronal cerebral, submetidos a investigação genética no período de 19/02/2013 a 16/06/2020. Foram avaliados exames de neuroimagem já realizados, e revisados por radiologistas, com a finalidade de padronizar a análise das imagens. A proporção de prevalência entre os sexos foi de 1:1. Todos os pacientes avaliados apresentavam atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, sendo epilepsia de difícil controle a segunda manifestação clínica mais comum (75%). Ao exame clínico, hipotonia muscular global foi o achado mais frequente. À análise de neuroimagem, as alterações mais comuns foram hipoplasia pontocerebelar e cerebelar, coexistindo com distúrbios da migração neuronal cortical em apenas um paciente. Dos 16 genes encontrados neste estudo, 5 (31.2%) codificam proteínas relacionadas ao citoesqueleto, sendo que 3 (18.7% do total) codificam subunidades das tubulinas, proteínas dos microtúbulos. Do total de variantes encontradas, 33.3% jamais haviam sido descritas na literatura ou em bancos de dados de variantes. Em um caso, foi encontrada uma variante descrita em gene de lissencefalia (*PAFAH1B1*), sendo o fenótipo de hipoplasia pontocerebelar sem distúrbio de migração neuronal. Em outro, com fenótipo de polimicrogiria, foi encontrada variante (em *ATP1A3*) relatada como patogênica na literatura, sem descrição de fenótipo; no entanto, havia relato de malformações corticais associadas ao *ATP1A2*, que codifica outra subunidade da mesma proteína, sugerindo uma possível expansão do fenótipo associado ao *ATP1A3*, o que foi confirmado posteriormente com relato na literatura médica. Desta forma, conclui-se que o sequenciamento completo do exoma tem papel

fundamental no diagnóstico dos defeitos no desenvolvimento cerebelar e da migração neuronal cerebral, distúrbios por vezes coexistentes, tendo em comum a presença de mutações em genes relacionados ao citoesqueleto, entre outros. A descoberta e o aprimoramento desta técnica tem possibilitado confirmações diagnósticas a partir de correlações genótipo-fenótipo conhecidas, bem como sugerido novas correlações, com expansões de fenótipos associadas a determinados genes e de genótipos possíveis em determinadas doenças.

Descritores: Malformações do desenvolvimento cortical do grupo II; Lissencefalias clássicas e heterotopias subcorticais em banda; Polimicrogiria; Doenças cerebelares; Neuroimagem; Sequenciamento completo do exoma.

Abstract

Cabral KSS. *Whole exome sequencing in the diagnosis of cerebellar developmental and brain neuronal migration defects* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2022.

Malformations of the central nervous system are the second most common cause of congenital anomalies, after heart disease, and they are responsible for significant infant morbidity and mortality. In Brazil, about a third of infant deaths from this cause corresponds to brain malformations, many of which are still poorly defined. The development of the brain and cerebellum occurs divided into stages such as differentiation, proliferation, migration and postmigrational development, guided by the same cytoskeletal proteins. For this reason, the association, for example, of cerebellar development malformations with disorders of brain neuronal migration is common. The sequencing of the genome, or its coding portion, the exome, has allowed elucidating the genetic etiology of many encephalic malformations, as well as suggesting new phenotypes associated with known gene mutations. The main objective of the present study was to investigate the role of whole exome sequencing in the diagnosis of brain and cerebellar malformations, specifically cerebellar developmental and brain neuronal migration defects. This is an observational case series, descriptive, retrospective study. A sample of 20 patients, aged 1 to 12 years, with cerebellar developmental and cerebral neuronal migration defects who underwent genetic investigation from Feb. 19, 2013 to June 16, 2020 was analyzed. Neuroimaging exams already performed were evaluated, and reviewed by radiologists, in order to standardize the analysis of the images. The prevalence ratio between genders was 1:1. All patients evaluated presented delayed neuropsychomotor development, and difficult-to-control epilepsy was the second most common clinical manifestation (75%). On clinical examination, global muscular hypotonia was the most frequent finding. On neuroimaging analysis, the most common changes were pontocerebellar and cerebellar hypoplasia, coexisting with cortical neuronal migration disorders in only one patient. Of the 16 genes found in this study, 5 (31.2%) encode proteins related to the cytoskeleton, and 3 (18.7% of the total) encode subunits of tubulins, proteins of microtubules. Of the total number of variants found, 33.3% had never been described in the literature or in variant databases. In one case, a variant described in a lissencephaly gene (*PAFAH1B1*) was found, with a phenotype of pontocerebellar hypoplasia without neuronal migration disorder. In another one, with a polymicrogyria phenotype, a variant (in *ATP1A3*) reported as pathogenic in the literature was found, with no phenotype description; however, there had been reports of cortical malformations associated with the *ATP1A2* gene, which encodes another subunit of the same protein, suggesting a possible expansion of the phenotype associated with the *ATP1A3* gene, which could be confirmed later with a report in the medical literature. Thus, we conclude that whole exome sequencing plays a key role in the diagnosis of defects in cerebellar development and brain neuronal migration, disorders that sometimes coexist, having in common the presence of mutations in genes related

to the cytoskeleton, among others. The discovery and improvement of this technique has enabled diagnostic confirmation from known genotype-phenotype correlations, as well as suggesting new correlations, with expansions of phenotypes associated with certain genes and of possible genotypes in certain diseases.

Descriptors: Malformations of cortical development, group II; Classical lissencephalies and subcortical band heterotopias; Polymicrogyria; Cerebellar diseases; Neuroimaging; Whole exome sequencing.

1 Introdução

As malformações do sistema nervoso central constituem o segundo grupo mais frequente de anomalias congênitas de grandes sistemas, após as cardiopatias congênitas.

Sabe-se que aproximadamente 3% dos recém-nascidos apresentam anomalias congênitas, responsáveis por 3 a 5 % das causas de óbito infantil na população mundial (WHO, 2020; Liu et al., 2016). No Brasil, segundo os últimos dados estatísticos disponíveis no DATASUS, que são os dados preliminares de 2020, o grupo de malformações congênitas, deformidades e anomalias cromossômicas representam 23% das causas de óbitos infantis (em menores de 1 ano de idade), sendo que as malformações do sistema nervoso central representaram cerca de 2,3%. Destas últimas, 33% deveram-se a malformações cerebrais (DATASUS, 2021).

Os distúrbios do desenvolvimento cerebral são também a causa isolada mais comum de epilepsia intratável na infância, e constituem uma importante causa de atraso global do desenvolvimento neuropsicomotor (Liu, 2011; Shimojima et al., 2014). Compete ao médico assistente reconhecer o padrão radiológico dessas condições e suas causas genéticas, a fim de definir o melhor manejo clínico e orientar as famílias sobre o risco de recorrência.

As recentes descobertas sobre a sequência de eventos moleculares e estruturais que controlam o desenvolvimento cerebral, bem como sobre os efeitos da desregulação gênica na patogênese de muitas malformações, têm possibilitado o esclarecimento de diversas condições neurológicas até então pouco compreendidas.

Duas das mais importantes contribuições para o aprimoramento desse conhecimento são o maior detalhamento da neuroimagem e o avanço das técnicas de sequenciamento genômico. A neuroimagem tem permitido correlações mais

exatas entre o quadro clínico, a progressão da doença e os achados moleculares, e tem sido fundamental no agrupamento dos pacientes para estudos genéticos mais precisos. A possibilidade de sequenciamento do genoma, ou da sua porção codificante, o exoma, tem permitido significativos avanços na pesquisa genética, seja por meio da identificação de fenótipos clínicos associados a alterações em genes, seja por meio do reconhecimento de fatores genéticos associados à suscetibilidade a diversas condições clínicas. Todas as áreas da medicina sofreram um grande impacto advindo do aumento dos conhecimentos da genética e das suas novas estratégias de investigação.

Embora haja condições genéticas e clínicas associadas a malformações cerebrais cujos mecanismos moleculares já foram elucidados com testes genéticos diagnósticos específicos, ainda há muitas condições neurológicas de etiologia mal definida.

Entre os fatores etiológicos já descritos estão os fatores extrínsecos (como exposição intrauterina a infecções maternas, teratógenos ou distúrbios metabólicos maternos) e os fatores genéticos. Estes últimos, que vêm sendo amplamente estudados e elucidados, incluem condições decorrentes de alterações cromossômicas ou gênicas. Variantes gênicas isoladas podem causar malformações localizadas ou multissistêmicas. Essas variantes isoladas estão entre as mais graves e incluem aquelas responsáveis pela formação de proteínas truncadas, que se tornam inúteis, ou pelo bloqueio de uma via genética ou bioquímica. Condições multigênicas, nas quais variantes menos graves ocorrem em diversos genes diferentes, são mais difíceis de serem estudadas, por existirem poucos exemplos nos quais possam ser objetivamente demonstradas. Nos próximos anos, entretanto, à medida que o conhecimento fisiopatológico dessas condições avança, a frequência de diagnósticos moleculares das mesmas será cada vez maior. De outro lado do espectro de fatores etiológicos estão os distúrbios hereditários multifatoriais, nos quais a interação entre fatores genéticos e ambientais desempenha um papel claramente importante, porém essas condições estão entre as mais difíceis de serem compreendidas e descritas.

O desenvolvimento do córtex cerebral humano ocorre em diversos estágios, evoluindo de um epitélio pseudoestratificado na 5ª semana para um córtex complexo na 47ª semana. As conexões corticais se iniciam apenas no terceiro trimestre, com as conexões talamocorticais, e continuam até após o nascimento (Zanni et al., 2013a). Erros ocorridos ao longo desse processo levam a malformações específicas, na dependência da idade gestacional em que ocorrem e da etapa comprometida, conforme exemplificado no esquema simplificado na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais estágios do desenvolvimento do SNC humano (modificada de ten Donkelaar, 2006)

Estágio	Tempo de Ocorrência (semanas de gestação)	Principais eventos no cérebro	Principais distúrbios relacionados
Período Embrionário			
Formação e separação das camadas germinativas	2	Placa neural	Cistos enterógenos e fístulas; síndrome da fenda da notocorda
Indução Dorsal: neurulação primária	3–4	Tubo neural, crista neural and derivados; fechamento dos neuróporos rostral e caudal; placas alares pareadas	Anencefalia, encefalocele, mielosquise; mielomeningocele malformações de Chiari
Período fetal			
Indução Ventral: telencefalização	4–6	Desenvolvimento do prosencéfalo e face; Placóides olfatórios; lábios rômnicos aparecem; 'fusão' das placas cerebelares	Holoprosencefalia; Formação das vesículas cerebrais; malformação de Dandy–Walker e óptica; craniossinostose
Proliferação neuronal e glial	6–16	Proliferação celular nas zonas ventriculares e supraventriculares; Diferenciação precoce dos neuroblastos e glioblastos; morte celular (apoptose); Migração das células de Purkinje e do leito granular externo na formação do cerebelo; formação do corpo caloso	Microcefalia, megalencefalia

continua

Tabela 1 - Principais estágios do desenvolvimento do SNC humano (modificada de ten Donkelaar, 2006) (*conclusão*)

Estágio	Tempo de Ocorrência (semanas de gestação)	Principais eventos no cérebro	Principais distúrbios relacionados
Migração	12–24	Migração dos neurônios corticais; formação do corpo caloso	Distúrbios de migração neuronal (lissencefalias, polimicrogiria, esquizencefalia, heterotopia).
Período perinatal			
Desenvolvimento pós-migracional	24 a pós-natal	Migração tardia; organização e maturação do córtex neuronal; sinaptogênese; formação do leito granular interno no cerebelo	Displasias corticais menores
Mielinização	24 semanas a 2 anos		Distúrbios de mielinização, Lesões destrutivas (injúrias secundariamente adquiridas em período pós natal de estruturas normalmente formadas)

As malformações do desenvolvimento cortical são classificadas em distúrbios de proliferação/apoptose, de migração neuronal e de organização ou pós-migracionais (Fallet-Bianco et al., 2014; Barkovich et al., 2012). Entretanto, essa classificação é meramente didática, uma vez que todos os processos são interligados; ou seja, uma célula displásica, por exemplo, pode sofrer migração incompleta, não estabelecendo as conexões adequadas (Raybaud e Widjaja, 2011). Em todas essas etapas do desenvolvimento do sistema nervoso central, desde a

proliferação até a migração neuronal e eventos pós migracionais de organização, é fundamental o papel dos microtúbulos do citoesqueleto.

Vem sendo cada vez mais evidenciado que as malformações corticais humanas, como a lissencefalia, a polimicrogiria entre outras, sejam causadas por mutações em subunidades de microtúbulos ou em proteínas associadas aos mesmos, afetando a proliferação neuronal e a sobrevivência, conforme observado nas variantes patogênicas em genes relacionados à tubulina, como *TUBB2B* e *TUBA1A* (Stottmann et al., 2013; Bierhals et al., 2013; Schröter et al., 2021).

Dentre os distúrbios de migração neuronal, destaca-se a lissencefalia. Esta é caracterizada, em sua forma clássica, por uma superfície cerebral lisa, um córtex espesso com quatro camadas anormais, incluindo uma zona profunda de heterotopia neuronal difusa. Esta última, conhecida como heterotopia em bandas subcorticais, consiste em bandas simétricas e circunferenciais de substância cinzenta, formadas imediatamente abaixo do córtex e separadas do mesmo por uma fina camada de substância branca, por vezes com sulcos corticais anormalmente rasos (Di Donato et al., 2017; Severino et al., 2020).

Dentre as malformações do desenvolvimento cerebelar, foram abordadas neste estudo hipoplasias e displasias cerebelares, destacando-se particularmente o grupo das hipoplasias pontocerebelares.

A hipoplasia pontocerebelar (PCH) é um grupo heterogêneo de malformações de herança autossômica recessiva que envolvem o vermis cerebelar, os hemisférios cerebelares, a face ventral da ponte e os núcleos olivares inferiores, além de incluir alterações atróficas supratentoriais, como afinamento do corpo caloso, redução volumétrica da substância branca cerebral e atrofia cortical (Bierhals et al., 2013; Qian et al., 2014; Maricich et al., 2011; Rudnik-Schöneborn et al., 2014). Foram descritos, até o momento da redação desta tese, dezesseis subtipos de hipoplasia pontocerebelar, associados a vinte e quatro genes diversos, com diferentes fenótipos (OMIM #607596; Ucuncu et al., 2020; Appelhof, 2021).

Ainda há muito a ser estudado e espera-se que haja muitos outros genes a

serem descritos através dos novos métodos em genética molecular, como o sequenciamento do exoma ou do genoma.

Outro importante exemplo de malformação cortical humana é a polimicrogiria, um distúrbio da migração neuronal tardia e do desenvolvimento pós migracional, caracterizado por numerosos giros pequenos, parcialmente fundidos (Oegema et al., 2020). Mutações em diversos genes codificadores da tubulina têm sido associadas com polimicrogiria assimétrica predominante nas regiões fronto-temporo-parietais (*TUBB2B*, a primeira e mais grave mutação descrita na tubulina, também relatado como causa de grave atrofia cortical por aumento na apoptose, levando experimentalmente ao óbito pós-natal, em homozigotos, e a distúrbios comportamentais, em heterozigotos), polimicrogiria extensa bilateral (*TUBA8*) ou polimicrogiria multifocal predominantemente frontal e perisylviana (*TUBB3*) (Zanni et al., 2013b; Stottmann et al, 2013). Ainda é difícil de se estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo específica em cada variante, mas tem sido demonstrado que essas condições comprometem a função dos microtúbulos através de múltiplos mecanismos.

O presente estudo tem por finalidade contribuir com informações que possam confirmar correlações genótipo-fenótipo conhecidas e possivelmente sugerir outras novas, na dependência do desfecho do mesmo.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Principal

- Investigar o papel do sequenciamento completo do exoma no esclarecimento etiológico das malformações encefálicas, particularmente dos defeitos do desenvolvimento cerebelar e da migração neuronal cerebral.

2.2 Objetivos Secundários

- Descrever os aspectos do exame físico neurológico, bem como os achados de neuroimagem e moleculares que caracterizam as diferentes malformações encefálicas estudadas.

3 Revisão da Literatura

3.1 Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central

O desenvolvimento do sistema nervoso central humano é um processo prolongado, que se inicia na terceira semana de idade gestacional, com a diferenciação das células progenitoras, e se estende pelo menos até a adolescência tardia (Stiles e Jernigan, 2010).

A principal etapa desse desenvolvimento é a formação do tubo neural a partir da placa neural, que contém as células progenitoras, na terceira semana de gestação. Entre a quinta e a décima semana de gestação, o tubo neural origina três vesículas cerebrais primárias. A vesícula mais anterior é o prosencéfalo, que se subdividirá em telencéfalo e diencefalo; a vesícula do meio é o mesencéfalo, precursor das estruturas do tronco cerebral, e a vesícula mais posterior é o rombencéfalo, que se subdividirá em metencéfalo e mielencéfalo (Stiles, 2008; Stiles e Jernigan, 2010).

3.1.1 Desenvolvimento Cerebelar Humano

A evolução do conhecimento em genética molecular, embriologia e neuroimagem vem despertando um crescente interesse nos distúrbios do desenvolvimento embrionário do mesencéfalo e rombencéfalo, origens do tronco encefálico e do cerebelo (Barkovich et al., 2009).

3.1.1.1 Período Embrionário

A formação do cerebelo deriva principalmente das estruturas do rombencéfalo (metencéfalo e mielencéfalo), entre a quarta e a sexta semanas de gestação. O metencéfalo dará origem à ponte e ao cerebelo, enquanto o

mielencéfalo originará o bulbo. Porém, sabe-se ainda que o mesencéfalo exerce uma função no desenvolvimento do vermis cerebelar (Cotes et al., 2015), que ocorre pela fusão dos hemisférios cerebelares, por volta da nona semana de gestação. Estes continuam a se diferenciar até o segundo ano de vida (Cotes et al., 2015). Acredita-se que a maioria das malformações cerebelares resultem de alterações na proliferação celular nesta fase, incluindo as displasias cerebelares e as hipoplasias pontocerebelares (Barkovich et al., 2009).

3.1.1.2 Proliferação e Migração Neuronal Cerebelares

Muitas malformações resultam da proliferação celular anormal durante o desenvolvimento cortical cerebral e cerebelar, que pode ser diminuída, aumentada e/ou envolver células displásicas. Proliferação aumentada é rara e resulta no crescimento exagerado dos hemisférios cerebrais e cerebelares, podendo levar à herniação da tonsila cerebelar através do foramen magno (malformação de Chiari I adquirida).

A proliferação celular diminuída resulta em microcefalia e pode ser adquirida ou primária. A microcefalia primária normalmente tem uma causa genética, resultando de proliferação alterada ou apoptose de precursores neuronais. O cerebelo, nesses casos, é em geral desproporcionalmente pequeno comparado com os hemisférios cerebrais, o que resulta de padrões de herança autossômicos recessivos. Outras microcefalias primárias têm um cerebelo proporcionalmente pequeno, sugerindo que muitos dos mesmos processos que controlam a proliferação celular ou apoptose ocorrem supratentorial e infratentorialmente (Bertholdo et al., 2011).

Já a migração neuronal ocorre, principalmente, através de um direcionamento dos axônios em um sentido determinado, para o estabelecimento das sinapses (eventos pós-migracionais) no local de destino. O *TUBB3* é um gene amplamente expresso no sistema nervoso central, com um importante papel nesse direcionamento axonal. Acredita-se que se origina de um subgrupo de receptores-

guias de axônios e integra-se ao citoesqueleto para responder corretamente à sinalização posterior (Nugent et al., 2012).

É interessante notar que variantes patogênicas em *TUBB3* têm algumas características fenotípicas, como disgenesia do corpo caloso e distúrbios em núcleos da base, semelhantes a variantes *missense* em heterozigose em *TUBA1A* e *TUBB2B* (Schröter et al., 2021), todas amplamente expressas em neurônios maduros, sugerindo que suas funções se sobrepõem (Tischfield et al., 2010). No entanto, as variantes em *TUBA1A* e *TUBB2B* têm como principal característica o defeito de migração do córtex cerebral, como lissencefalias ou heterotopia de substância cinzenta subcortical, enquanto, nas síndromes relacionadas ao *TUBB3*, predominam os defeitos no direcionamento dos axônios (disgenesias do corpo caloso e hipoplasia dos nervos oculomotores) e alguns relatos de polimicrogirias e desorganização giral (Tischfield et al., 2010; Romaniello et al., 2014).

O destino final da migração neuronal no córtex cerebelar em desenvolvimento depende de muitos fatores: 1) programação genética 2) sinalização de desligamento ao final da migração; 3) sinalização molecular recebida das células vizinhas após o término da migração e 4) o estabelecimento de conexões axonais distantes e locais (Barkovich et al., 2009).

A última parte deste processo caracteriza-se pelo posicionamento final dentro do córtex e o desenvolvimento de dendritos e sinapses, o chamado desenvolvimento pós-migracional (Barkovich et al., 2012), antes conhecido por "organização cortical". Este processo inicia ainda durante a migração neuronal e continua no período pós natal, até o segundo ano de vida em humanos (Cotes et al., 2015). Essa lacuna temporal entre migração e organização cortical pós migracional é maior no cerebelo do que no cérebro, sendo que algumas anomalias do córtex cerebelar podem se desenvolver mais tardiamente na gestação ou mesmo após o nascimento (Barkovich et al., 2009; Moog et al., 2011).

3.1.1.3 Defeitos do Desenvolvimento Cerebelar

Dentre os principais defeitos do desenvolvimento cerebelar, cabe ressaltar aqui as hipoplasias e displasias, dentro do escopo do presente estudo.

Define-se hipoplasia como a característica de um tecido histologicamente normal, porém incompletamente desenvolvido a partir das células precursoras, sendo reduzido de volume e estável ao longo do tempo (Poretti et al., 2009; Cotes et al., 2015; Poretti e Boltshauser, 2015). Com frequência, há outras anomalias associadas, como mega cisterna magna e hidrocefalia (Cotes et al., 2015).

As hipoplasias pontocerebelares representam um grupo de desordens autossômicas recessivas caracterizadas por início prenatal, hipoplasia cerebelar, hipoplasia da porção ventral da ponte, além de alterações supratentoriais associadas, como microcefalia, disgenesia de núcleos da base, afilamento do corpo caloso, alargamento do sistema ventricular e alterações de sinal na substância branca ao exame de neuroimagem. Clinicamente, manifestam-se em geral com atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM), levando a deficiência intelectual grave, além de epilepsia farmacorresistente, dismorfismos e hipotonia muscular, por vezes associada a hipertonia apendicular (Budde et al., 2008; Appelhof et al., 2021).

Entre os subtipos já descritos (Anexo A), pode-se destacar alguns: PCH1 caracteriza-se por hipotonia muscular, atrofia cerebelar, microcefalia progressiva e atraso global de desenvolvimento neuropsicomotor, com a peculiaridade de um fenótipo de atrofia muscular espinhal por degeneração do corno anterior da medula espinhal (Wan et al., 2012); subdivide-se em 6 tipos (PCH 1A a PCH1F) de acordo com o gene envolvido. É digno de nota o subtipo 1B, decorrente de variante em *EXOSC3* (PCH1B), em que é comum haver hipoplasia cerebelar sem alteração pontina, além de espasticidade e distonia (Biancheri et al., 2013; Rudnik-Schöneborn et al., 2014, Eggens et al., 2014).

A PCH2, também subdividida em 4 tipos de acordo como o genótipo, caracteriza-se em geral por hipoplasia cerebelar mais proeminente nos hemisférios,

microcefalia e atrofia cerebral progressivas, discinesias, espasticidade, convulsões e órbita nos primeiros anos de vida (Bierhals et al., 2013), enquanto na PCH5, em que há registro de atividade convulsiva já no período fetal, o fenótipo assemelha-se ao da PCH 2, porém, com atrofia cerebelar mais evidente no vermis. A PCH 6 cursa com grave hipotonia muscular e epilepsia mioclônica, sendo que, em pelo menos 52% dos casos, há hipoplasia cerebelar com a ponte de tamanho normal, associada a atrofia cortical progressiva (Jiang et al., 2020). Já na PCH7 descreveu-se a combinação de hipogonadismo primário e hipoplasia pontocerebelar (Rudnick-Schöneborn et al., 2014).

Nos últimos anos, foram descritos vinte e quatro genes como responsáveis por dezesseis diferentes subtipos de hipoplasia ponto-cerebelar (Bierhals et al., 2013; Rüscher et al., 2020). O último gene associado a hipoplasia pontocerebelar (Ucuncu et al., 2020; Appelhof et al., 2021) foi o *MINPP1* (OMIM *605391), cursando com atraso de desenvolvimento, epilepsia, microcefalia e dismorfismos, sendo então descrito o fenótipo de PCH 16 (OMIM #619527).

É importante ressaltar a diferença entre os termos hipoplasia e atrofia cerebelar (Poretti et al., 2009, Poretti e Boltshauser, 2015). Esta última deriva de uma perda volumétrica devida a uma injúria progressiva e não uma de anormalidade do seu desenvolvimento. Essa diferenciação é possível pela identificação de fissuras de tamanho normal relativas às folias cerebelares (Patel e Barkovich, 2002), ou por estudos evolutivos demonstrando estabilidade da hipoplasia cerebelar ao invés da progressão esperada na atrofia (Poretti et al., 2009).

Outras malformações associadas às cerebelares, como distúrbios de migração, meningoencefalocelos, agenesia de corpo caloso e holoprosencefalia têm sido relatadas, e sua similaridade com a malformação de Dandy-Walker sugere uma origem semelhante no processo de desenvolvimento embrionário (Correa et al., 2011; Cotes et al., 2015).

Displasia cerebelar, caracterizada por anormalidades na foliação cerebelar, na arborização da substância branca e na junção cortico-subcortical, pode estar

associada a polimicrogiria relacionada ao *GPR56* (Bahi-Buisson et al., 2010) e, em algumas tubulinopatias, na forma de uma folia diagonal anômala no vermis cerebelar (Bahi-Buisson et al., 2014).

Há relatos ainda, na literatura médica, de associação dos defeitos do desenvolvimento cerebelar com malformações de outros órgãos e sistemas, como renais ou dermatológicos, a exemplo da alopecia biparietal na Síndrome de Gomez-Lopez-Hernandez e das alterações renais e oculares nas síndromes de Joubert e de Galloway-Mowat (Lindsay et al., 2020; Kim e Kim, 2020; Radha Rama Devi et al., 2020). Esta última, causada por variante patogênica em *WDR73*, cursa com atraso de desenvolvimento, microcefalia, retinopatia e síndrome nefrótica (Vodopiutz et al., 2015; Kim e Kim, 2020).

Na prática diária, a abordagem inicial de um paciente com uma malformação de tronco encefálico ou cerebelo baseia-se principalmente no padrão de reconhecimento da neuroimagem, portanto, um sistema de classificação onde essas condições sejam identificadas e comparadas faz-se muito necessário.

Barkovich et al., em 2009, reuniram a prática clínica e um conhecimento amplo acerca de neuroembriologia e biologia do desenvolvimento, imagem estrutural e genética molecular para apresentar um sistema de classificação coerente, flexível para esses transtornos (Anexo B).

3.1.2 Desenvolvimento Cerebral Humano

Segue-se uma breve revisão dos mecanismos de desenvolvimento embrionário do córtex cerebral humano, fundamentais para a compreensão da fisiopatogenia das malformações do desenvolvimento cortical.

3.1.2.1 Período Embrionário

O cérebro humano deriva da diferenciação do prosencéfalo, a vesícula mais rostral do tubo neural, que se subdivide em diencefalo (origem dos tálamos,

hipotálamo, epitálamo e núcleos subtalâmicos) e telencéfalo, origem do córtex e demais estruturas cerebrais.

3.1.2.2 Proliferação e Migração Neuronal Cerebrais

A proliferação neuronal no telencéfalo dorsal do feto humano começa em torno da quinta semana e termina em torno da vigésima segunda à vigésima quinta semana de idade gestacional (Bystron et al., 2008). Durante o estágio de proliferação celular e apoptose, as células neuroepiteliais na zona ventricular (ZV), adjacente ao ventrículo lateral, geram células precursoras da glia e dos neurônios piramidais. A seguir, as células neuroepiteliais diferenciam-se em células gliais radiais apicais.

Nos estágios mais tardios da neurogênese cortical, o compartimento proliferativo se expande em uma zona chamada “zona subventricular (ZSV) externa”. Por sua grande capacidade proliferativa, as ZSV externas são essenciais no desenvolvimento do córtex humano, provavelmente contribuindo para sua expansão e girificação (Astick e Vanderhaeghen, 2018). Nos casos de proliferação reduzida ou apoptose aumentada, pode ocorrer microcefalia; por outro lado, proliferação aumentada e apoptose reduzida podem causar megalencefalia.

Proliferação anormal (chamada de disgenesia) também pode ocorrer, resultando em neurônios dismórficos, como na displasia cortical focal (DCF) e na megalencefalia com malformações corticais. Essas condições têm sido recentemente reconhecidas como resultantes de mutações somáticas e germinativas ativando a via mTOR nos progenitores telencefálicos dorsais de neurônios excitatórios.

No cérebro humano, a migração neuronal inicia no momento em que surgem os primeiros neurônios (em torno da quinta semana gestacional), e termina em torno de 30 a 35 semanas de gestação, enquanto a migração cerebelar continua até o segundo ano de vida (Bystron et al., 2008). Diversos genes regulam o transporte de neurônios para o córtex, produzindo fatores de crescimento locais, potencializando

a sinalização de fatores de crescimento por proteínas da matriz extracelular, e ativando vias de auto-renovação (Cooper, 2014).

A última etapa da formação cortical, o chamado desenvolvimento pós-migracional, é caracterizado por axonogênese, dendritogênese, bem como iniciação, maturação e poda sináptica, envolvendo tanto os neurônios piramidais como os interneurônios corticais (Budday et al., 2015; Chu e Anderson, 2015). Esses processos são intimamente relacionados à formação de giros e sulcos (Budday et al., 2015).

3.1.2.3 Distúrbios de Migração Neuronal Cortical

Distúrbios da migração neuronal ocorrem quando a migração termina cedo ou tarde demais. Uma migração neuronal incompleta pode ocorrer quando neurônios produzidos na ZV não se conectam às células gliais radiais apicais, tornando-se, então, incapazes de migrar. Esses neurônios permanecem na borda ventricular ou próximos à mesma, formando aglomerados conhecidos como heterotopia nodular periventricular. Alternativamente, a migração neuronal pode ser interrompida por uma alteração no complexo aparato molecular necessário para mover os neurônios da ZSV para o córtex, incluindo as tubulinas, além de outras proteínas associadas aos microtúbulos (como PFAH1B1 e DCX) e actinas (Di Donato et al., 2018). Variantes nos genes que regulam esses processos resultam em um amplo espectro de malformações do desenvolvimento cortical (MCDs), incluindo as lissencefalias (Di Donato et al., 2017). Por outro lado, uma migração cortical maciça para as leptomeninges pode levar a defeitos na superfície pial do córtex, resultando em um espectro variável de polimicrogiria ou malformações em pedra de calçamento (cobblestone), como notado nas distroglicanopatias (Taniguchi-Ikeda et al., 2021), laminopatias (Jayakody et al., 2020) e doenças relacionadas ao *GPR56* (Bahi-Buisson et al., 2010; Vandervore et al., 2017). Uma hipótese é que, dependendo do tamanho do defeito nesta membrana, o córtex resultante pode ser polimicrogírico, se houver pequenos espaços entre os giros, ou

em pedras de calçamento, se houver grandes espaços (Barkovich et al., 2015; Desikan e Barkovich, 2016).

3.1.2.4 Malformações do Desenvolvimento Cortical

As Malformações do Desenvolvimento Cortical (MCDs) são um grupo heterogêneo de distúrbios da formação do córtex cerebral. Caracterizam-se por alterações na estrutura cortical ou pela presença de heterotopia da substância cinzenta, podendo ainda estar associadas a um tamanho anormal do cérebro (microcefalia ou megalencefalia). As manifestações clínicas têm início geralmente na primeira infância ou até o final da segunda década de vida, incluindo epilepsia, atraso de desenvolvimento, deficiência intelectual ou déficit motor (Severino et al., 2020; Barkovich et al., 2012; Raybaud e Widjaja, 2011). A etiologia pode ser genética, infecciosa, vascular ou metabólica. No entanto, os fatores genéticos têm sido reconhecidos como a etiologia primária em um número crescente de malformações corticais (Wong e Roper, 2016). Até o presente momento, por exemplo, já foram identificados pelo menos 132 genes associados a malformações do desenvolvimento cortical (Brock et al., 2021).

O diagnóstico das MCDs, na prática clínica, tem início com o fenótipo clínico e exames de neuroimagem, sendo complementado com os achados genéticos, e baseando-se nas classificações conhecidas (Severino et al., 2020). Neste ponto, surgem as dificuldades. Os esquemas de classificação mudam constantemente (Barkovich et al., 1996, 2001, 2005, 2012), baseados em novas descobertas genéticas e fisiopatológicas, aumentando a dificuldade em categorizar as MCDs em grupos bem definidos (Barkovich, 2013). Descrições mais específicas dos padrões de neuroimagem, bem como uma classificação precisa, poderiam direcionar a solicitação de testes genéticos e facilitar a comunicação entre as especialidades médicas. Desta forma, aumentariam a chance de diagnóstico e possibilitariam, inclusive, a descoberta de novas correlações genótipo-fenótipo (Severino et al., 2020).

A última versão de classificação, publicada em 2012 (Barkovich et al., 2012; Barkovich et al., 2015), sustenta o conceito fundamental de que as MCDs derivam de alterações dos três principais estágios do desenvolvimento cortical: proliferação celular e apoptose, migração celular e desenvolvimento pós-migracional. As MCDs têm sido classificadas nesses três grupos principais, baseando-se no estágio de desenvolvimento que foi primariamente afetado, conhecendo o fato de que a alteração dos eventos do desenvolvimento inicial frequentemente afetam os eventos posteriores (Barkovich et al., 2012). Cabe ainda ressaltar que os processos se estabelecem em tempos diferentes nas diversas regiões do cérebro, assim, durante toda a neurogênese, muitos processos distintos estão acontecendo simultaneamente (Barkovich et al., 2012; Barkovich, 2013).

O espectro das lissencefalias, que inclui agiria (ausência de giros corticais), paquigiria (giros alargados) e heterotopia subcortical em bandas (HSB), tem sido associado a variantes em genes como *PFAH1B1* (inicialmente conhecido como *LIS1*), *ARX*, *RELN*, *VLDLR*, *ACTB*, *ACTG1*, *TUBG1*, *KIF5C*, *KIF2A* e *CDK5* (Parrini et al., 2016).

Há diversos subtipos de lissencefalia, clássica, sem heterotopia subcortical, associada a agenesia de corpo caloso ou hipoplasia cerebelar grave, bem como parte de diversas síndromes genéticas, como a Síndrome de Miller-Dieker, por deleção da região cromossômica 17p13.3, caracterizada por lissencefalia clássica, facies típica e malformações cardíacas.

As variantes em *TUBA1A* são relacionadas tanto ao fenótipo de lissencefalia clássica como de lissencefalia com hipoplasia cerebelar (Zanni et al., 2013a; Fallet-Bianco et al., 2014). O fenótipo característico dessa condição pode ser resumido como uma paquigiria de padrão predominantemente posterior, podendo também acometer as regiões perisilvianas, associada a uma dilatação ventricular, disgenesia de corpo caloso e hipoplasia de tronco cerebral e cerebelo (Poirier et al., 2007; Jansen et al., 2011). Pode ainda haver microcefalia, outras malformações de tronco encefálico, hipocampos e núcleos da base (Schröter et al., 2021). No entanto,

há relato de fenótipos diferentes, como o padrão de polimicrogiria perisylviana (Sohal et al., 2012; Jansen et al., 2011).

A HSB consiste em uma banda de substância cinzenta separada do córtex e dos ventrículos laterais por faixas de substância branca. Em alguns casos, uma paquigiria frontal pode coexistir com a HSB posterior (Oegema et al., 2019; 2020). Raramente ocorre a heterotopia isolada, e a causa mais comum nesses casos é uma variante em heterozigose em *DCX*, no cromossomo X de mulheres "carreadoras" em famílias com lissencefalia ligada ao *DCX*. Este gene é responsável pela expressão de uma proteína estabilizadora dos microtúbulos, fundamental na migração neuronal (Fourniol et al., 2013). Malformações afetando apenas subgrupos de neurônios, como heterotopia nodular periventricular, têm sido associadas a variantes em *DCX*, *FLN1A* e *ARFGEF2*, e causam comprometimento neurológico de graus variáveis (Parrini et al., 2016). Há relatos recentes de heterotopia nodular periventricular associada a distúrbios de movimento e microcefalia, em pacientes com mutações em *ARFGEF2* (Tanyalçin et al., 2013; Bardón-Cancho et al., 2014).

O termo microlissencefalia define um outro subtipo desse espectro, no qual a lissencefalia, normalmente na forma de agiria ou paquigiria, coexiste com uma microcefalia congênita grave (Oegema et al., 2020).

Já a malformação em pedra de calçamento ou *cobblestone* foi inicialmente descrita como lissencefalia tipo 2, termo atualmente em desuso. Trata-se de um grave distúrbio da migração neuronal associado a distrofias musculares congênitas, como a síndrome Walker-Walburg, a doença muscular-cérebro-ocular e a Distrofia Muscular Congênita tipo Fukuyama, causadas por variantes em genes envolvidos na glicosilação O-ligada do alfa-distroglicano (Taniguchi-Ikeda et al., 2021). Essa malformação frequentemente é confundida com a polimicrogiria, diferenciação por vezes difícil, inclusive na literatura médica, considerando-se que muitas condições que cursam com malformação em pedra de calçamento foram reportadas como distúrbios associados a polimicrogurias, como a polimicrogiria associada ao *GPR56*

(Oegema et al., 2020).

A polimicrogiria é uma das mais frequentes malformações do desenvolvimento cortical e também umas das mais heterogêneas em sua etiologia (Oegema et al., 2020).

Afilamento do corpo caloso e disgenesia do rombencéfalo (ponte-bulbo) podem estar presentes em pacientes com malformação cortical devida a variantes em diversos genes, como *LIS1*, *DCX*, *ARX*, *RELN*, *VLDLR*, *CASK*, ou em pacientes com polimicrogiria devida a variantes em *GPR56* (Zanni et al., 2013a; Hayashi et al., 2017).

No entanto, a combinação de hipoplasia cerebelar e de tronco encefálico, disgenesia do corpo caloso e hipoplasia do ramo anterior da cápsula interna é altamente característica das variantes em genes codificadores da tubulina, muito mais do que a malformação cortical em si mesma, que pode variar de agiria ou paquigiria a heterotopias em bandas subcorticais, ou seja, do espectro das lissencefalias à polimicrogiria, sugerindo a triagem para esses genes (Parrini et al., 2016).

Distúrbios isolados do desenvolvimento pós-migracional incluem principalmente microcefalia secundária, displasia cortical focal tipo I (Barkovich et al., 2012) e certas formas de disgiria. Embora a polimicrogiria seja ainda classificada como um distúrbio pós-migracional (Barkovich et al., 2012), há crescentes evidências de que essa malformação seja principalmente a consequência de uma falha na migração neuronal tardia. De fato, além de ruptura na organização cortical com ou sem fusão do leito molecular suprajacente, recentes estudos histopatológicos têm mostrado que a polimicrogiria é frequentemente caracterizada por defeitos na membrana pial limitante e nas meninges suprajacentes, com heterotopia leptomeníngea associada (Squier e Jansen, 2014; Jansen et al., 2016). Esses achados sugerem uma reclassificação da polimicrogiria no grupo de anormalidades migracionais tardias, mais do que pós-migracionais.

Como o desenvolvimento cortical permanece um processo dinâmico na vida

pós natal, é provável que haja um vasto número de distúrbios associados a esse desenvolvimento, de etiologias variáveis, que podem não ser inicialmente detectadas pelos exames de imagem. Esses distúrbios podem impactar tanto o desenvolvimento da substância branca como da cinzenta (Severino et al, 2020).

Com base nos conhecimentos genéticos e do desenvolvimento cortical apresentados, é possível se estabelecer empiricamente um risco de recorrência das principais malformações do desenvolvimento cortical estudadas no presente trabalho, como evidenciado na Tabela 2.

Tabela 2 - Risco de Recorrência Empírico nas Malformações do Desenvolvimento Cortical (adaptado de Oegema et al., 2020)

MDC	Padrões de herança conhecidos	Risco de Recorrência Empírico
Lissencefalia: córtex > 10mm	AD, raramente ligada ao X ou AR	Provavelmente baixo para irmãos. Atenção em famílias com consanguinidade; há relatos de herança recessiva
Lissencefalia: córtex 5-10mm	AR, AD (tubulinopatia)	Risco para irmãos 25% exceto em fenótipo de tubulinopatia (AD). Risco para prole depende do status de carreador e/ou grau de parentesco com o parceiro (até 50% se o parceiro for carreador)
Lisencefalia: heterotopia em bandas subcorticais (HBS)	XL (HBS difusa) ou mosaico	Ligada ao X para irmãos - discute-se até 50% pois a mãe pode ser carreadora assintomática. Risco para a prole 50% (<ou = 50% se suspeita de mosaico pós-zigótico); não se conhece reprodução pelo sexo masculino
Malformação em Cobblestone	AR	Risco para irmãos 25%
Heterotopia nodular periventricular (HNPV)	XLD, AD, AR, não - genética	Sem estimativa confiável disponível; todos os padrões de herança devem ser discutidos; provavelmente baixo risco para nódulos isolados.

continua

Tabela 2 - Risco de Recorrência Empírico nas Malformações do Desenvolvimento Cortical (adaptado de Oegema et al., 2020) (*Conclusão*)

MDC	Padrões de herança conhecidos	Risco de Recorrência Empírico
Heterotopia subcortical (HS)	Minoria AR, a maioria desconhecida, possivelmente não-genética ou mosaico pós-zigótico.	Risco para irmãos provavelmente baixo exceto no distúrbio AR clinicamente reconhecido (25%) Risco para a prole provavelmente baixo (sem transmissão vertical documentada até o momento)
Polimicrogiria	AD, AR, XL, não genética	Sem estimativa confiável disponível; considerar que a polimicrogiria é facilmente confundida com malformação em Cobblestone
Tubulinopatias	AD	Se pais não afetados, risco para irmãos é baixo. Risco para a prole < ou = 50%

AD autossômica dominante ; AR autossômica recessiva; MDC: malformações do desenvolvimento cortical; XL ligada ao X; XLD: dominante ligada ao X

A heterogeneidade nas apresentações genéticas e fenotípicas relacionadas às MCDs tem sido um desafio à classificação desses distúrbios, somada à dificuldade em estabelecer prognóstico e manejo dessas doenças. No entanto, a crescente identificação das variantes genéticas tem contribuído para o conhecimento das vias moleculares comuns e dos processos celulares alterados nas malformações corticais. Modelos de ratos e camundongos, os mais frequentemente usados na investigação das etiologias das MCDs, têm elucidado o papel das mutações genéticas associadas a MCDs, mas não são capazes de reproduzir fielmente os fenótipos observados nas condições clínicas em humanos (Wong e Roper, 2016).

Dessa forma, o entendimento aprofundado do desenvolvimento cortical e cerebelar humano é necessário para se aplicar mais efetivamente os achados moleculares de modelos animais para o estado de doença humana (Subramanian et al, 2020).

Dois importantes conceitos, essenciais para a compreensão do desenvolvimento encefálico, são a expressão gênica (o que são os genes e como desempenham seu papel no desenvolvimento encefálico) e o resultado desse desenvolvimento, a formação e organização do encéfalo maduro.

Esses conceitos estão aprofundados a seguir, com base na literatura científica disponível até o momento.

3.2 Conceitos Básicos de Genética e Expressão Gênica

Alguns conceitos básicos precisam ser revisados para o entendimento da função da expressão gênica no desenvolvimento cortical.

As moléculas de DNA, que armazenam a informação genética humana, são compostas de nucleotídeos. Cada nucleotídeo contém um dentre quatro tipos de bases nitrogenadas (adenina, timina, citosina e guanina), um açúcar (desoxirribose) composto de 5 carbonos e um fosfato. Os nucleotídeos estão ligados em sequência, conectando o fosfato do carbono 5` de uma unidade com a hidroxila do carbono 3' do anterior, e assim sucessivamente. Desta forma, a síntese da cadeia de DNA (replicação), bem como a síntese da cadeia de RNA (transcrição), é feita sempre da extremidade 5` para a extremidade 3` a partir de uma fita molde de DNA. Por serem complementares, as duas fitas que compõem a dupla hélice do DNA são também antiparalelas, ou seja, a extremidade 5` de uma fita é pareada com a extremidade 3` da fita complementar. Convencionalmente, ao se representar a sequência de DNA de um indivíduo, representa-se a fita código (c), lida da extremidade 5` para a extremidade 3`. Porém, é a sequência das bases nitrogenadas que determina a identidade de um fragmento de DNA (Stratchan, 2013). Esse código é interpretado em trinucleotídeos (sequências de 3 nucleotídeos), que correspondem a

aminoácidos específicos em uma cadeia polipeptídica.

Nas células eucarióticas, a dupla-hélice do DNA linear se enovela em um complexo de proteínas com funções estruturais e regulatórias, formando a cromatina. Esta é, então, compactada em cromossomos. O número de cópias do conjunto cromossômico de uma célula é chamado de ploidia. Os gametas possuem apenas uma cópia de cada cromossomo - sendo por isso considerados haplóides - enquanto todas as demais células eucariotas possuem duas cópias - sendo então diplóides. Um conjunto haplóide de cromossomos é chamado de genoma da espécie. O genoma humano é composto de 22 cromossomos autossomos, os sexuais X e Y, além do DNA mitocondrial.

A constituição genética responsável pelas características de uma célula ou indivíduo é chamada de genótipo. As características observáveis desta célula ou indivíduo são definidas como fenótipo.

Um fenômeno que pode alterar essa correlação é o mosaicismos, conceituado como a existência de duas ou mais linhagens celulares geneticamente diferentes em um mesmo indivíduo, porém, provenientes de um mesmo zigoto, resultantes de um erro mitótico pós-zigótico. Quando ocorre em células somáticas, é chamado de mosaicismos somático, gerando um indivíduo com determinada proporção de células com mutação somática dentro de uma população total de células sem a mutação. Quando ocorre em células germinativas, chama-se mosaicismos germinativo ou gonadal, em que determinada mutação pode ser transmitida à prole ou não, a depender se o gameta envolvido será de linhagem com ou sem a mutação (Paskulin et al., 2011; Cook et al., 2021; Mefford, 2021).

3.2.1 Estrutura dos genes humanos que codificam proteínas

Os genes são fragmentos de DNA que se tornam moldes para a síntese de uma molécula de RNA complementar funcional. A maioria dos genes gera um RNA que será utilizado como molde para a produção de um polipeptídeo; as moléculas de RNA que não codificam polipeptídeos frequentemente auxiliam a regulação da

expressão de outros genes.

No presente texto, será abordada a estrutura dos genes que codificam proteínas, objeto de interesse deste estudo.

A maior parte do DNA humano não é constituída por genes que codificam proteínas. Apenas 2% do genoma humano é constituída por éxons, que são transcritos em RNA codificante de proteínas.

Um gene codificante de proteína é formado por uma região regulatória e uma unidade de transcrição - dentro dessa última existem as regiões chamadas éxons e as chamadas íntrons, sendo os íntrons removidos do RNA recém transcrito pelo processo chamado *splicing* -"recomposição do pré-RNA"). Éxon, portanto, é toda a sequência que está representada no RNA mensageiro maduro (após o processamento), sendo que um éxon pode incluir porções não traduzidas (conhecidas como "UTR"s = "Untranslated regions"), em seu início (região 5`UTR) e em seu final (região 3`UTR).

3.2.2 Processo de Tradução Proteica em Humanos

Assim como o DNA, as moléculas de RNA são polímeros de nucleotídeos, formados por uma base nitrogenada (adenina, uracila, guanina, citosina), um açúcar (ribose) e um fosfato, porém constituídos por uma fita simples.

Há diferentes tipos de RNA, classificados de acordo com sua função celular. O RNA mensageiro (RNAm), que serve de base para a formação da cadeia polipeptídica, representa apenas uma pequena porção do RNA celular. Cerca de 85% do RNA transcrito na célula está contido nos ribossomos (RNA ribossomal - RNAr), que formam um complexo chamado de polissoma, responsável pela leitura da sequência de trinucleotídeos do RNAm. Outros 10% do RNA celular são os RNA transportadores (RNAt), que exercem a função de transportar aminoácidos específicos até o sítio de tradução, onde o polissomo atua na construção da cadeia polipeptídica (Watson, 2014).

Como citado anteriormente, para se tornarem funcionais, os RNAs recém-transcritos são submetidos a uma série de etapas de maturação, como exclusão de sequências intervenientes não desejadas (íntrons) e alterações químicas de determinadas bases. Após o término desse processamento, a sequência de RNA resultante é então chamada de RNA mensageiro maduro.

Para o início e o término da tradução do RNAm, são necessárias sequências sinalizadoras. Em eucariontes, o início da tradução em todas as cadeias polipeptídicas é a primeiro códon AUG, que codifica a adição do aminoácido metionina. Para sinalizar o término do processo, existem três códons definidos (UAA, UAG e UGA), conhecidos como códons de parada (*stop códons* ou *códons nonsense*); esses não sinalizam a adição de um aminoácido, mas sim o fim da tradução (Watson, 2014).

Os peptídeos com frequência sofrem uma ampla gama de alterações químicas. Assim, as proteínas apresentam enorme diversidade estrutural e funcional (Strachan, 2013).

3.2.3 Conceito e Classificação dos Tipos de Mutação

Mutação é uma alteração estrutural do DNA não corrigida pelo sistema de reparo, tornando-se, portanto, definitiva. A mutação pode ser gênica - alterando a estrutura do gene (ex: mutações de ponto, expansões de trinucleotídeos) - ou cromossômica - alterando a estrutura do cromossomo (por exemplo, translocações, deleções, trissomias, monossomias). Neste trabalho, serão abordadas apenas as mutações gênicas. Os tipos de mutações gênicas podem ser divididos segundo uma classificação estrutural ou funcional:

3.2.3.1 Classificação Estrutural

3.2.3.1.1 Mutação de Ponto

Mudanças de um único nucleotídeo na sequência codificadora. Exceto metionina

e triptofano, todos os outros aminoácidos são codificados por mais de um códon, sendo que uma substituição de um nucleotídeo pode não alterar a sequência polipeptídica, caso resulte em um outro códon relacionado ao mesmo aminoácido (Stratchan, 2013).

- **Mutação Sinônima**- substituição de um único nucleotídeo que não altera o aminoácido codificado, resultando no mesmo produto proteico.
- **Mutação não-sinônima ou missense**: leva à substituição de um aminoácido por outro, alterando a sequência polipeptídica final.
- **Mutações sem sentido ou nonsense** - a troca de um nucleotídeo resulta em um códon de parada (*stop codon*) no interior da proteína, resultando em uma sequência polipeptídica incompleta, ou seja, uma proteína truncada. Esta, quando escapa aos mecanismos de reparo da célula, pode produzir um fenótipo muito mais grave do que a ausência da proteína, por prejudicar o funcionamento esperado do produto final.

3.2.3.1.2 INDEL (inserção / deleção de nucleotídeos)

Quando o número de pares de bases deletadas ou inseridas não é múltiplo de 3, essa mutação acarreta uma mudança no quadro de leitura dos códons (a chamada *frameshift*), alterando também o produto proteico.

3.2.3.1.3 CNV (*Copy number variation* = variação no número de cópias)

Deleções ou duplicações de fragmentos do genoma.

3.2.3.2 Classificação Funcional

- **Ganho de Função**: o produto proteico exerce uma função nova ou exacerbada. Herdada de forma autossômica dominante, levará a um efeito patogênico no indivíduo heterozigoto, ou seja, o heterozigoto apresentará um

fenótipo alterado.

- **Perda de Função:** o produto protéico apresenta sua função reduzida ou ausente.

A maioria das mutações de perda de função levam a fenótipos recessivos, ou seja, só há perda da função efetivamente se o indivíduo possuir as duas cópias do gene com a mutação; se houver apenas uma cópia mutada, a cópia normal será suficiente para manter a função do produto proteico. No entanto, quando apenas uma cópia normal não é suficiente para manter a função do produto final, tem-se um fenótipo alterado herdado como traço dominante - fenômeno denominado haploinsuficiência.

> Haplossuficiência - autossômica recessiva. Heterozigoto saudável.

> Haploinsuficiência - autossômica dominante. Heterozigoto doente.

> Dominante negativo - ocorre apenas em indivíduos heterozigotos, para mutações herdadas de forma autossômica dominante. O fenótipo do heterozigoto é alterado (a cópia mutada prejudica a expressão da cópia normal) - clássico de proteínas multiméricas - onde há cadeias polipeptídicas que vieram da cópia normal e outras advindas da cópia mutada.

O conhecimento do modo de herança auxilia na definição da patologia molecular subjacente. Por exemplo, em uma mutação de ganho de função, o funcionamento anormal só é visto em um indivíduo heterozigoto se o fenótipo for dominante.

À medida que as mutações se acumulam no DNA ao longo de muitas gerações, conferem variabilidade aos organismos, possibilitando a sua evolução através do tempo. Em quase todas as espécies, ao menos parte da variação observável tem base genética (Snustad e Simmons, 2017).

Se a mutação altera a função daquele gene que codifica proteína e, conseqüentemente, prejudica a função celular, chama-se variante patogênica.

3.2.3.3 Padrões de Herança

As mutações podem ser herdadas ou *de novo* (não herdadas), definindo o padrão de herança.

- Herança autossômica dominante: ocorre nos autossomos, onde o indivíduo recebe uma cópia mutada de um dos genitores (heterozigose), ou de ambos (homozigose). Em qualquer dessas situações, o fenótipo será alterado, pois, neste padrão de herança, basta haver uma cópia do gene para que este seja expresso.
- Herança autossômica recessiva: ocorre também nos autossomos. Neste padrão de herança, o gene só é expresso quando presente em dois alelos. Assim, o indivíduo só apresentará o fenótipo alterado se herdar duas cópias do gene contendo determinada mutação, uma de cada genitor. Se apenas uma das cópias herdadas possuir a mutação, o indivíduo apresentará fenótipo normal, porém será considerado portador de uma cópia mutada, que pode ser transmitida à sua prole.
- Herança sexual: ocorre nos cromossomos sexuais, sendo a mais comum a herança ligada ao X. Esta pode ser dominante (apenas uma cópia do gene é suficiente para que produza fenótipo), tanto em indivíduos do sexo feminino - em heterozigose ou em homozigose- quanto do sexo masculino - em hemizigose. E pode ser recessiva, sendo necessárias duas cópias do gene para seja expresso - nesse caso, o fenótipo será restrito ao sexo feminino.

3.3 Técnicas de Sequenciamento Genético

Para a identificação das mutações citadas, há uma diversidade de técnicas de sequenciamento genético disponíveis, desde métodos mais abrangentes, como o sequenciamento completo do genoma e o sequenciamento completo do exoma, até os métodos mais direcionados, como os painéis genéticos, os chamados exomas clínicos e o sequenciamento de gene específico. Há ainda o

sequenciamento pelo método Sanger, muito utilizado na confirmação da presença de variantes identificadas pelo sequenciamento do exoma.

3.3.1 Sequenciamento Sanger

A técnica utilizada no sequenciamento pelo método Sanger consiste na amplificação da região de interesse no gene, através da reação da polimerase em cadeia (PCR) e o seu sequenciamento. Trata-se de uma técnica de alta precisão e interpretação clara, tendo, porém, limitações, como a análise de apenas um gene por vez e a não identificação de regiões intrônicas distantes dos éxons ou de regiões promotoras, não sendo adequada ao estudo de condições em que não haja a forte suspeita de um único gene envolvido. É muito utilizada na confirmação de variantes identificadas no sequenciamento de nova geração.

3.3.2 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

Técnica de sequenciamento em que o DNA é fragmentado, ampliado, e os éxons de múltiplos genes de interesse são selecionados e sequenciados.

3.3.2.1 Painéis Genéticos

Sequenciamento de um conjunto pré-definido de genes relacionados a um grupo de fenotípico, por exemplo, painel de epilepsias ou painel de malformações do desenvolvimento cortical. Têm boa acurácia, custo acessível e interpretação simples. São úteis em casos de elevada suspeição ou confirmação de doença causada por múltiplos genes, bem como de fenótipos que se sobrepõem. Suas limitações são o fato de não permitirem reanálise, bem como o fato de haver divergência entre os genes incluídos no painel de diferentes laboratórios.

3.3.2.2 Exoma Clínico

Técnica de NGS que sequencia os éxons de genes previamente reportados na literatura médica ou em bases de dados como Human Gene Mutation Database (HGMD), Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) e ClinVar, como envolvidos em um grupo de fenótipos. É mais abrangente que os painéis de NGS, sendo útil em casos atípicos ou de difícil caracterização fenotípica. Tem custo mais acessível do que o sequenciamento completo do exoma e mais elevado do que os painéis genéticos. Também possui a limitação de não possibilitar a reanálise posterior.

3.3.2.3 Sequenciamento Completo do Exoma

Técnica de sequenciamento de todos os éxons dos 20.000 genes humanos. É útil em casos de fenótipos atípicos ou mal caracterizados, possibilita a identificação de novas variantes patogênicas associadas a determinados fenótipos e permite reanálises futuras à luz de novos conhecimentos científicos e atualizações em bases de dados.

3.3.2.4 Sequenciamento Completo do Genoma

Técnica de sequenciamento de todo o genoma, incluindo éxons, íntrons e regiões promotoras. Mais utilizada para fins de pesquisa, é útil nos casos em que o sequenciamento completo do exoma não foi conclusivo. Permite a identificação de variantes em regiões intrônicas, promotoras e não codificantes, bem como em mutações por CNVs, as quais em geral não têm boa cobertura com o sequenciamento do exoma. Porém, o custo elevado, superior ao das demais técnicas, constitui uma importante limitação do método.

4 Métodos

4.1 Desenho do Estudo

O presente estudo tem natureza transversal, descritiva e retrospectiva, sendo um estudo observacional de série de casos. A natureza transversal se deve ao fato de a causa (variante genética) estar presente junto ao efeito (defeito do desenvolvimento cerebelar ou da migração neuronal cerebral) no mesmo período de tempo, ou seja, o estudo descreve uma situação em um momento não definido, em que a exposição é constante no tempo e o efeito é crônico. O caráter retrospectivo do estudo permite analisar os dados de quadro clínico dos pacientes que levaram à investigação através do sequenciamento completo do exoma.

4.2 Local

Ambulatório de Neurogenética da Clínica Neurológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.3 Amostra

Foram incluídos neste estudo 20 pacientes com defeitos do desenvolvimento cerebelar e/ou da migração neuronal cerebral, que foram submetidos ao sequenciamento completo do exoma com finalidade diagnóstica na Mendelics Análise Genômica (São Paulo, SP).

4.3.1 Critérios de Inclusão

- Pacientes em investigação de defeitos do desenvolvimento cerebelar e da migração neuronal cerebral que realizaram o sequenciamento completo do

exoma, o qual possibilitou a confirmação de um diagnóstico genético.

- Faixa etária pediátrica (0 a 17 anos de idade)

4.3.2 Critérios de Exclusão

- Pacientes fora da faixa etária pediátrica
- Pacientes cuja análise genética não identificou variantes que pudessem estar associadas ao quadro clínico apresentado.
- Pacientes sem malformações encefálicas à neuroimagem atribuíveis a defeitos em genes relacionados ao desenvolvimento cerebelar ou à migração neuronal cerebral.

4.4 Procedimentos

4.4.1 Sequenciamento do exoma

Foi solicitada aos responsáveis dos pacientes a assinatura de um termo de consentimento prévio para a realização do sequenciamento de exoma com finalidade diagnóstica.

O sequenciamento do exoma foi realizado utilizando sequenciadores Illumina HiSeq 2500, Illumina HiSeq4000 ou Illumina NovaSeq (San Diego, CA, EUA).

A realização deste sequenciamento seguiu basicamente os seguintes passos:

- Extração do DNA de amostra de sangue periférico ou swab bucal.
- Fragmentação do DNA com o auxílio de enzimas de restrição.
- Captura de regiões exônicas do DNA, com o auxílio de aproximadamente 150.000 sondas com sequências complementares aos éxons, produzidas comercialmente. Por meio de hibridização e separação magnética, há um enriquecimento superior a 35 vezes de regiões exônicas no DNA a ser

sequenciado.

- Sequenciamento da amostra enriquecida em regiões exônicas em sequenciador de nova geração, capaz de gerar milhões de sequências curtas (de 100 a 150 bp) independentes.
- Alinhamento da sequência obtida e busca de variações com relação ao genoma de referência, com o auxílio de protocolos de bioinformática (GATK).
- Análise da lista de variantes detectadas, buscando alterações em genes que estejam associados a quadros compatíveis com o do paciente.

Como a interpretação do sequenciamento completo do exoma é orientada pelos dados clínicos, foram relatados apenas os achados que tinham alguma relação com os mesmos. Sempre que necessária, foi feita a confirmação pela técnica de Sanger do achado molecular identificado pelo sequenciamento de nova geração. Da mesma forma, sempre que necessário e em que amostra de material genético parental estivesse disponível, foi feito estudo de segregação da variante nos genitores, uma etapa importante para determinar a classificação da patogenicidade da variante.

4.4.2 Dados Clínicos e de Exames Complementares

Foram coletados dados clínicos dos pacientes e revisados os resultados de exames realizados no decorrer da investigação diagnóstica, como testes laboratoriais e exames de neuroimagem.

4.4.2.1 Dados Clínicos:

A avaliação clínica consistiu em anamnese, exame físico geral e exame neurológico.

Na anamnese, foram valorizados dados como: idade de percepção dos primeiros sinais do quadro clínico, tais como atraso de desenvolvimento

neuropsicomotor, alterações de tônus e/ou de força muscular, ataxia, movimentos involuntários, crises convulsivas.

O exame físico geral teve por objetivo evidenciar possíveis dismorfismos, déficits pondero-estaturais ou alterações nos sistemas cardiovascular, respiratório, digestivo, osteoarticular, dermatológico ou genitourinário.

No exame neurológico, foram avaliados perímetro cefálico e formato do crânio, presença e característica da marcha, equilíbrio estático e dinâmico, tônus muscular axial e apendicular, força muscular, reflexos superficiais e profundos, coordenação, sensibilidade superficial e profunda, avaliação de nervos cranianos e funções cognitivas (atitude, postura e comportamento, compreensão e expressão da linguagem verbal e não verbal, interação com o meio e com examinador).

4.4.2.2 Dados de Neuroimagem

Foram avaliados os exames de neuroimagem, preferencialmente ressonância magnética do encéfalo, já realizados. Foi analisado o padrão de sulcos e giros corticais, presença de alterações de sinal da substância branca e cinzenta, heterotopias corticais, alterações em substância cinzenta subcortical (núcleos da base), defeitos estruturais do cerebelo e tronco encefálico. Os exames foram revisados por dois neurorradiologistas, com a finalidade de padronizar a análise das imagens.

4.4.2.3 Interpretação do Sequenciamento Completo do Exoma

A interpretação do sequenciamento do exoma foi realizada por pelo menos dois médicos geneticistas com experiência em análise genômica e levou em conta o quadro clínico e o gene envolvido, o tipo de variante e seu provável efeito sobre a proteína, sua frequência em bancos populacionais como o GnomAD v2.1.1 (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), informações a respeito de publicações prévias da mutação ou de sua submissão a repositório de variantes por laboratórios clínicos

e de pesquisa (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

Os achados do sequenciamento do exoma foram relacionados aos tipos clínicos de malformações encefálicas em uma análise descritiva.

4.5 Aspectos Éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10/06/2015, Protocolo de Pesquisa número 231/15 (Anexo C).

Para a realização do sequenciamento completo do exoma, os responsáveis legais pelos pacientes assinaram um termo de consentimento previamente a este estudo.

Para a presente investigação, os responsáveis legais pelos pacientes selecionados para o projeto receberam informações sobre o que consiste o estudo, incluindo objetivos, métodos, riscos e benefícios. Foi solicitada ainda a autorização dos responsáveis para utilização das informações geradas pelo sequenciamento do exoma e para reavaliação clínica e dos exames complementares já realizados, por meio de um novo termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo D).

Após informações, todos os responsáveis dos pacientes incluídos até o momento leram e assinaram o termo de consentimento anexo.

5 Resultados

Os resultados deste estudo estão subdivididos em:

1. Aspectos gerais e demográficos, onde são caracterizados os sujeitos que compõem a amostra;
2. Aspectos genéticos, onde são descritas as variantes identificadas e os genes envolvidos;
3. Casos clínicos, onde são detalhados o quadro clínico, os achados da neuroimagem e os resultados genéticos de cada indivíduo, agrupados de acordo com o gene alterado.

5.1 Aspectos Gerais e Demográficos

No presente estudo, foram inicialmente incluídos 22 sujeitos, com idade entre 1 e 12 anos e que apresentavam quadro clínico compatível com distúrbio do desenvolvimento cerebelar e/ou da migração neuronal cerebral. Estes indivíduos haviam sido previamente submetidos a exames de neuroimagem e a investigação genética com finalidade diagnóstica, no período de 19/02/2013 a 16/06/2020.

Foram excluídos desta amostra dois indivíduos. No primeiro, com duas variantes em heterozigose em *AARS2* (Alanyl-tRNA synthetase 2, OMIM * 612035), a revisão subsequente do exame de imagem não confirmou a presença de alterações cerebelares ou de migração neuronal cerebral. No segundo caso, que apresentava um defeito da migração neuronal cortical com recorrência familiar, não foi possível confirmar a suspeita inicial de que a variante em *MAGEE1* (Melanoma Antigen, Family E, OMIM * 300759) seria responsável pelo quadro clínico.

Desta forma, permaneceram no estudo 20 indivíduos. Foi identificada uma proporção igual entre os gêneros: 10 sujeitos (50%) do sexo masculino e 10 do sexo

feminino (Tabela 3).

Tabela 3 - Dados demográficos e gene identificado

Caso	Sexo	Idade	Gene
1.1	F	4 a	<i>ARFGEF2</i>
2.1	M	2 a	<i>ATP1A3</i>
3.1	F	4 a	<i>CASK</i>
4.1	M	7 a	<i>DYNC1H1</i>
5.1	F	12 a	<i>EXOSC3</i>
6.1	M	10 a	<i>L1CAM</i>
7.1	F	8 a	<i>MAST1</i>
8.1	M	1 a	<i>MTOR</i>
9.1	M	7 a	<i>PAFAH1B1</i>
10.1	F	1 a 6 m	<i>PAFAH1B1</i>
11.1	F	1a 3 m	<i>RARS2</i>
12.1	M	9 a	<i>RHOBTB2</i>
13.1	M	8 a	<i>SCN3A</i>
13.2	M	1a 7 m	<i>SCN3A</i>
14.1	F	2 a	<i>SCN3A</i>
15.1	M	1a 3 m	<i>TUBA1A</i>
16.1	F	2 a	<i>TUBB</i>
17.1	M	3 a	<i>TUBB3</i>
18.1	F	2 a	<i>TUBB3</i>
19.1	F	7 a	<i>WDR73</i>

Legenda: F: feminino; M: masculino

5.2 Aspectos Genéticos

Foram identificadas 21 variantes com alta probabilidade de estarem

associadas ao quadro clínico, localizadas em 16 genes distintos, conforme demonstra a Tabela 4.

Tabela 4 - Genes e características das variantes identificadas

Caso	Gene	Posição Cromossômica GRCh37/hg19	DNA codificante	Transcrito (ENST)	Efeito sobre a proteína	Herança	Tipo de mutação	Classe (ACMG)
1.1	<i>ARFGEF2</i>	Chr20:47.588.928 GA>G	c.1492delA	00000371917	p.(Met498Trpfs*6)	AR	<i>frameshift</i>	P
		Chr20:47.649.632 C>T	c.5254C>T		p.(Arg1752*)		<i>nonsense</i>	P
2.1	<i>ATP1A3</i>	Chr19:42.472.985 A>G	c.810T>C	00000545399	p.(Leu937Pro)	AD	<i>missense</i>	LP
3.1	<i>CASK</i>	ChrX:41.413.035 C>T	c.1889G>A	00000421587	p.(Gly630Asp)	XL	<i>missense</i>	LP
4.1	<i>DYNC1H1</i>	Chr14:102.469.031 G>A	c.4700G>A	00000360184	p.(Arg1567Gln)	AD	<i>missense</i>	P
5.1	<i>EXOSC3</i>	Chr9:37.783.990 T>G	c.395A>C	00000327304	p.(Asp132Ala)	AR	<i>missense</i>	P
		Chr9:37.783.990 T>G	c.395A>C		p.(Asp132Ala)		<i>missense</i>	
6.1	<i>L1CAM</i>	ChrX:153.141262 AG>G	c.29delC	00000361981	p.(Pro10Leufs*22)	XL	<i>frameshift</i>	P
7.1	<i>MAST1</i>	Chr19:12.958.788 T>C	c.691T>C	00000251472	p.(Cys231Arg)	AD	<i>missense</i>	LP
8.1	<i>MTOR</i>	Chr1:11.217.230 C>T	c.4448 G>A	00000361445	p.(Cys1483Tyr)	AD	<i>missense</i>	LP
9.1	<i>PAFAH1B1</i>	Chr17:2.577.500 G>A	c.818G>A	00000397195	p.(Arg273Gln)	AD	<i>missense</i>	LP
10.1	<i>PAFAH1B1</i>	Chr17:2.575.939 T>C	c.569-10T>C	00000397195	p.?	AD	<i>splicing</i>	P
11.1	<i>RARS2</i>	Chr6:88.228.436 A>G	c.1327T>C	00000369536	p.(Ser443Pro)	AR	<i>missense</i>	P
		Chr6:88.258.338 T>C	c.422A>G		p.(His141Arg)		<i>missense</i>	VUS
12.1	<i>RHOBTB2</i>	Chr8:22.864.477 C>T	c.719C>T	00000251822	p.(Pro240Leu)	AD	<i>missense</i>	LP
13.1	<i>SCN3A</i>	Chr2:165.947.368 C >T	c.5295G>A	00000360093	p.(Met1765Ile)	AD	<i>missense</i>	LP

continua

Tabela 4 - Genes e características das variantes identificadas (*conclusão*)

Caso	Gene	Posição Cromossômica GRCh37/hg19	DNA codificante	Transcrito (ENST)	Efeito sobre a proteína	Herança	Tipo de mutação	Classe (ACMG)
13.2	SCN3A	Chr2:165.947.368 C>T	c.5295G>A	00000360093	p.(Met1765Ile)	AD	<i>missense</i>	LP
14.1	SCN3A	Chr2:165.986.748 A>G	c.2624T>C	00000283254	p.(Ile875Thr)	AD	<i>missense</i>	P
15.1	TUBA1A	Chr12:49.578.888 C>T	c.1242G>A	00000301071	p.(Ala421Thr)	AD	<i>missense</i>	LP
16.1	TUBB	Chr6:30.690.411 A>G	c.155A>G	00000327892	p.(Asn52Ser)	AD	<i>missense</i>	LP
17.1	TUBB3	Chr16:90.002.031 G>T	c.1172G>T	00000315491	p.(Arg391Leu)	AD	<i>missense</i>	P
18.1	TUBB3	Chr16:90.001.665 G>C	c.806G>C	00000315491	p.(Gly269Ala)	AD	<i>missense</i>	LP
19.1	WDR73	Chr15:85.188.874 A>AG	c.710_711insC	00000434634	p.(Gly238Trpfs*17)	AR	<i>frameshift</i>	P
		Chr15:85.188.874 A>AG	c.710_711insC		p.(Gly238Trpfs*17)		<i>frameshift</i>	

Legenda: AR: Autossômico recessivo; AD: Autossômico dominante; ACMG: American College of Medical Genetics and Genomics; P: Patogênica, LP: Provavelmente patogênica; VUS: Variante de significado incerto. XL: ligada ao cromossomo X

Entre as 21 variantes identificadas, 13 (66,7%) já haviam sido submetidas previamente ao repositório de variantes ClinVar, incluindo dez que adicionalmente haviam sido publicadas na literatura médica. Uma variante foi publicada mas não foi depositada no ClinVar e sete variantes (33,3%) nunca foram previamente reportadas, seja em base de dados, seja na literatura médica (Tabela 5).

Tabela 5 - Variantes identificadas, frequência no GnomAD v2.1.1 e presença na literatura médica

Caso	Gene (Variante)	GnomAD v2.1.1	ClinVar	Publicação
1.1	<i>ARFGEF2</i> c.1492delA	0	-	-
	<i>ARFGEF2</i> c.5254C>T	0	ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000803611.1	-
2.1	<i>ATP1A3</i> c.810T>C	0	ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000520712.4	Miyatake et al., 2021
3.1	<i>CASK</i> c.1889G>A	0	ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000180215.1	Takanashi et al., 2012
4.1	<i>DYNC1H1</i> c.4700G>A	0	ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000208709.8	Demos et al., 2019
5.1	<i>EXOSC3</i> c.395A>C	115/282766	ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000031688.31	Le Duc et al., 2020
6.1	<i>L1CAM</i> c.29delC	0	-	-

continua

Tabela 5 - Variantes identificadas, frequência no GnomAD v2.1.1 e presença na literatura médica (*continuação*)

Caso	Gene (Variante)	GnomAD v2.1.1	ClinVar	Publicação
7.1	<i>MAST1</i> c.691T>C	0	-	-
8.1	<i>MTOR</i> c.4448G>A	0	ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000376453.3	Gordo et al., 2018
9.1	<i>PAFAH1B1</i> c.818G>A	0	ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000202172.1	Lo Nigro et al., 1997
10.1	<i>PAFAH1B1</i> c.569-10T>C	0	ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000021182.10	Philbert et al., 2017
11.1	<i>RARS2</i> c.1327T>C	15/251374	ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000402195.1	Karaca et al., 2015
	<i>RARS2</i> c.422A>G	4/281534	-	-
12.1	<i>RHOBTB2</i> c.719C>T	0	-	-

continua

Tabela 5 - Variantes identificadas, frequência no GnomAD v2.1.1 e presença na literatura médica (*conclusão*)

Caso	Gene (Variante)	GnomAD v2.1.1	ClinVar	Publicação
13.1; 13.2	SCN3A c.5295G>A	0	ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV001329938.1	Inuzuka et al., 2020
14.1	SCN3A c.2624T>C	0	ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000373960.15	Inuzuka et al., 2020
15.1	TUBA1A c.1242G>A	0	ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000802856.1	-
16.1	TUBB c.155A>G	0	-	Sferra et al., 2020
17.1	TUBB3 c.1172G>T	0	ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000265354.2	-
18.1	TUBB3 c.806G>C	0	-	-
19.1	WDR73 c.710_711insC	0	-	-

5.3 Casos Clínicos

Em virtude da heterogeneidade fenotípica da amostra, os indivíduos foram agrupados de acordo com o gene envolvido, com a finalidade de apresentação dos achados clínicos, neurorradiológicos e genéticos em cada caso.

5.3.1 *ARFGEF2* (ADP-Ribosylation Factor Guanine Nucleotide Exchange Factor 2, OMIM *605371)

Caso 1.1, feminino, 4 anos de idade, apresentou parada de crescimento intrauterino e oligoidramnia, parto cesáreo com 37 semanas, sem intercorrências. Apresentou ainda hipoglicemia e icterícia neonatais. Evoluiu com irritabilidade, hipotonia muscular global e, aos 7 meses de vida, iniciou epilepsia de difícil controle, associada a movimentos involuntários, refratários à farmacoterapia. Ao exame físico, apresentava hipotonia muscular global, coreoatetose e discinesias orofaciais.

A ressonância magnética (RM) de crânio (Figura 1) revelou: heterotopia nodular subependimária da substância cinzenta nas porções anteriores dos ventrículos laterais; hipersinal em T2/FLAIR na substância branca periventricular das regiões temporo-parieto-occipitais; atrofia e elevação de sinal nas porções posteriores de ambos os putâmens e menos evidentes nas cabeças dos núcleos caudados; atrofia e hipersinal em formações hipocampais.

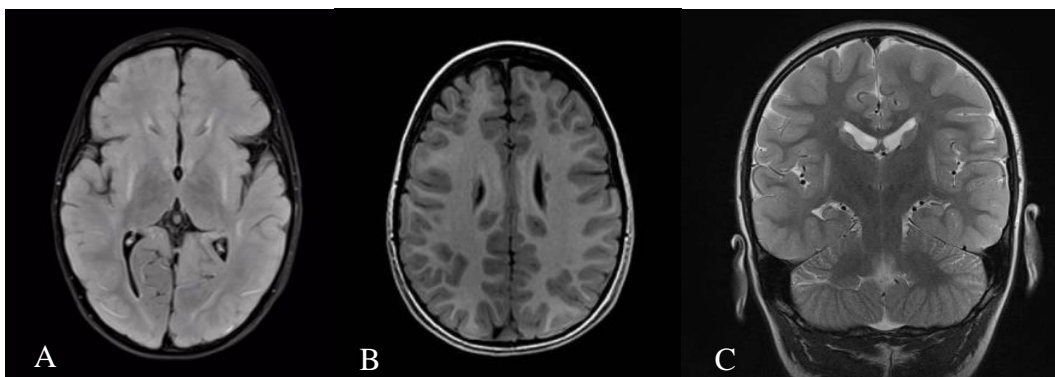


Figura 1- RM do caso 1.1. Corte Axial FLAIR (A) evidenciando atrofia e hipersinal bilateral das porções posteriores do putâmen; Axial T1 (B), revelando heterotopia nodular subependimária da substância cinzenta e Coronal T2 (C), com atrofia e hipersinal hipocampal

O sequenciamento do exoma evidenciou duas variantes em heterozigose em *ARFGEF2*; a variante c.1492delA levou a uma mudança no quadro de leitura a partir deste ponto, resultando em um códon de parada prematuro da tradução proteica (p.Met498Trp fs*6). Variante ausente em bancos de dados populacionais e em repositórios de variantes, não previamente reportada na literatura médica. E a outra variante, c.5254 C>T, determinou a substituição do aminoácido arginina por um códon de parada na posição 1752 da proteína (p.Arg1752*). Esta última não está presente entre 141.000 indivíduos da população mundial (GnomAD v2.1.1) e foi submetida no repositório de variantes ClinVar como patogênica, não tendo sido publicada na literatura médica até o momento da escrita desta tese. Trata-se de condição genética com herança autossômica recessiva. Variantes patogênicas em homozigose ou heterozigose composta em *ARFGEF2* estão relacionadas a Heterotopia Periventricular Nodular 2 (PVNH2, OMIM #608097).

5.3.2 *ATP1A3* (ATPase, Na⁺/K⁺ transporting, Alpha-3 polypeptide, OMIM *182350)

Caso 2.1, masculino, 2 anos de idade à época da avaliação, nascido de pais não consanguíneos, sem intercorrências perinatais, presença de pé torto congênito à esquerda. Aos 2 dias de vida, iniciou quadro de epilepsia farmacorresistente.

Clinicamente, apresentava significativo atraso do DNPM, hipotonia axial e apendicular, ausência de contato visual com o meio. Faleceu em 2021.

A RM de crânio (Figura 2) evidenciou extensa malformação do desenvolvimento cortical em hemisfério cerebral direito, com polimicrogiria acometendo a porção superior da ínsula, porção lateral do lobo temporal e convexidades frontoparietais, além de discreto hipersinal em T2 na cauda do hipocampo esquerdo. Aumento dos espaços extra-axiais fronto-temporo-parietais, bem como dos ventrículos laterais e III ventrículo.

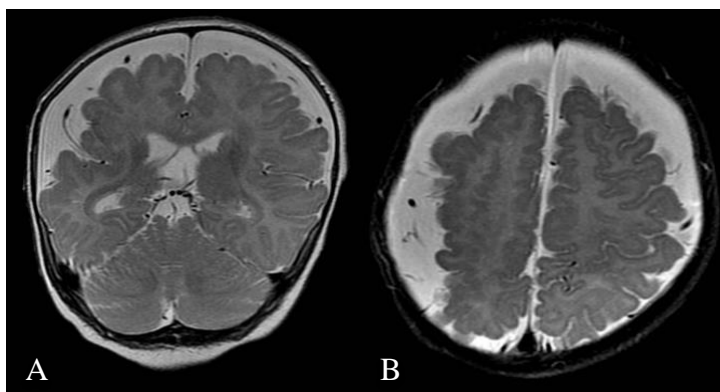


Figura 2 - RM de crânio do caso 2.1. Cortes Coronal T2 (A) e Axial T2 (B) evidenciando extensa malformação do desenvolvimento cortical, de aspecto polimicrogírico frontotemporoparietal direito

A análise genética identificou, em heterozigose em *ATP1A3*, a variante c.810T>C, promovendo a troca do aminoácido leucina no códon 937 por prolina (p.Leu937Pro). Variante confirmada pelo método Sanger no paciente e ausente nos genitores, indicando a ocorrência de um evento mutacional *de novo*. Ausente na base de dados populacional GnomAD v2.1.1 e presente no repositório de variantes ClinVar (tabela 5), foi publicada em 2021 por Miyatake S et al. como associada a polimicrogiria e epilepsia farmacorresistente, caracterizando a Encefalopatia Epiléptica e do Desenvolvimento 99 (DEE99, OMIM #619606).

5.3.3 *CASK* (Calcium/Calmodulin Dependent Serine Protein Kinase, OMIM *300172)

Caso 3.1, feminino, 4 anos de idade, pais não consanguíneos, ausência de intercorrências perinatais. A partir do segundo mês de vida houve desaceleração do crescimento cefálico, evoluindo para microcefalia, seguida de atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM) e déficit auditivo neurossensorial documentado. Ao exame clínico, apresentava estrabismo, microcefalia, hipotonia muscular global e ataxia de marcha.

A RM de crânio (Figura 3) evidenciou hipoplasia pontocerebelar, com alargamento do espaço liquórico inferiormente em fossa posterior e aparente comunicação com o quarto ventrículo.

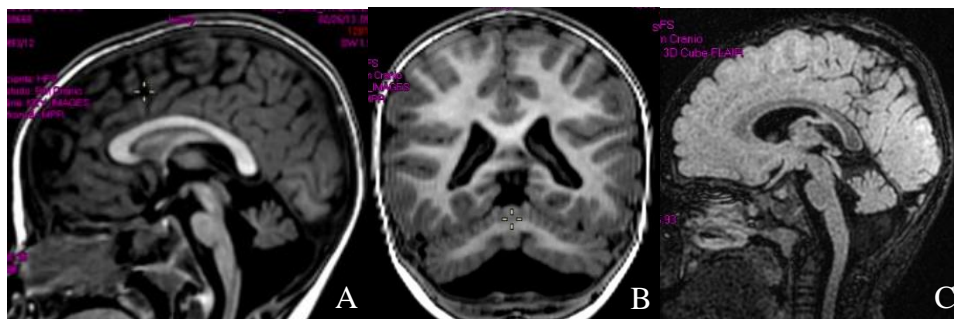


Figura 3- Caso 3.1. Sequências Sagital T1 (A), Coronal T1 (B) e Sagital FLAIR (C). Hipoplasia cerebelar, discreta hipoplasia da ponte, com conseqüente alargamento do espaço liquórico da fossa posterior em seu aspecto inferior

O sequenciamento do exoma revelou uma variante em heterozigose em *CASK*, levando à substituição do aminoácido glicina na posição 630 da proteína por aspartato (p.Gly630Asp). Essa variante ocorreu como evento mutacional *de novo*, não estando presente em bancos de dados populacionais nem reportada na literatura médica ou em repositórios de variantes. Classicamente, este gene está associado ao fenótipo de distúrbio do desenvolvimento intelectual com microcefalia e hipoplasia pontina e cerebelar (MICPCH, OMIM #300749).

5.3.4 *DYNC1H1* (Dynein Cytoplasmic 1 Heavy Chain 1, OMIM *600112)

Caso 4.1, masculino, 6 anos, nascido de pais não consanguíneos, sem intercorrências perinatais, apresentou atraso no DNPM e epilepsia de início aos 7 meses de idade, com crises do tipo espasmos em extensão. Achados clínicos e eletrográficos levaram ao diagnóstico de síndrome de West, de difícil controle farmacológico. Evento hipóxico durante sedação para exame levou à deterioração neurológica, com associação de hipertonia apendicular ao quadro preexistente de hipotonia axial. Tem ausência de controle esfinteriano ou de linguagem verbal. Na história familiar, um tio pelo lado materno tem quadro aparentemente semelhante.

A RM do crânio (Figura 4) mostrou fissuras sylvianas rasas, com simplificação giral temporo-insular bilateral e cornos temporais amplos.

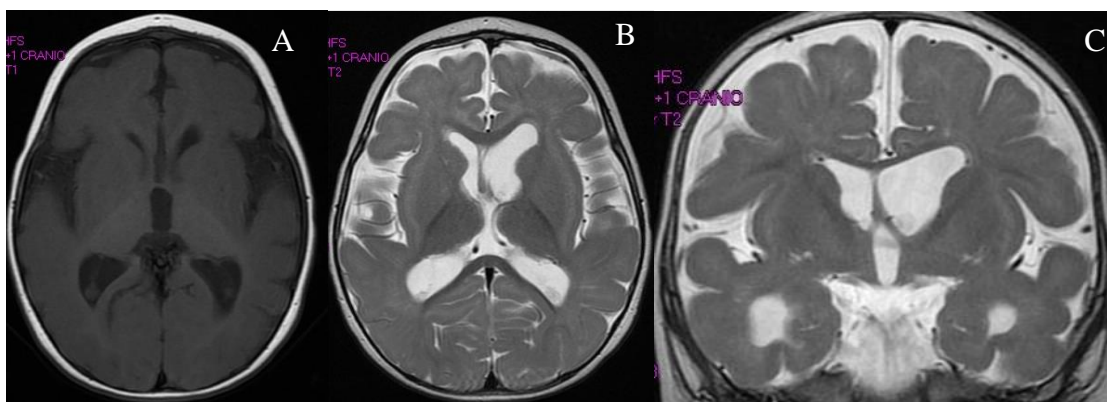


Figura 4 - Caso 4.1. Imagens axial T1 (A), axial T2 (B) e coronal T2 (C), evidenciando simplificação giral, fissuras sylvianas rasas e cornos temporais amplos

O sequenciamento do exoma evidenciou em heterozigose em *DYNC1H1*, a variante c.4700G>A, que determina a troca de uma arginina no códon 1567 por glutamina (p.Arg1567Gln). Esta variante está ausente na base de dados populacionais GnomAD v2.1.1 e já foi previamente descrita no repositório de variantes ClinVar (tabela 5) e na literatura médica (Poirier et al., 2013) associada à polimicrogiria, deficiência intelectual grave, dismorfismos faciais e dos pés, caracterizando a deficiência intelectual autossômica dominante tipo 13 (MRD13, OMIM #614563).

5.3.5 EXOSC3 (Exosome Component 3, OMIM *606489)

Caso 5.1, feminino, 12 anos de idade, sem intercorrências perinatais, consanguinidade parental presumida (pais oriundos de cidade com elevadas taxas de casamentos consanguíneos - Picos/Piauí, havendo primos com quadro clínico semelhante). Apresentava pé torto congênito e evoluiu com severo atraso dos marcos do desenvolvimento. Ao exame físico, identificavam-se microcefalia, dismorfismos (micrognatia, nariz proeminente), estrabismo convergente à esquerda, hipotrofia muscular global, hipotonia axial com sinais de liberação piramidal em membros inferiores e disartria.

RM de crânio (Figura 5) evidenciou redução volumétrica difusa dos hemisférios cerebelares e vermis, determinando alargamento dos espaços liquóricos locais e ectasia compensatória do IV ventrículo, além de discreto hipersinal em T2 nos núcleos denteados.

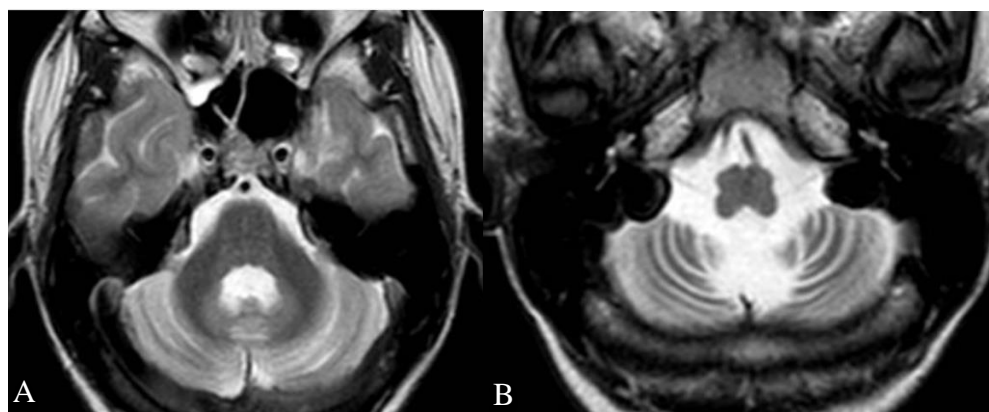


Figura 5 - RM de crânio do caso 5.1. Imagem Axial T2 (A) e (B). Alargamento dos espaços liquóricos entre as folias nos hemisférios cerebelares, redução volumétrica mais acentuada do vermis e tonsilas cerebelares, além de discreta alteração de sinal nos núcleos denteados

Foi identificada a variante c.395A>C, em homozigose, em *EXOSC3*, promovendo a substituição do aminoácido aspartato na posição 132 por alanina (p.Asp132Ala), variante previamente descrita na literatura (Schottmann et al., 2017;

Le Duc et al., 2020) como responsável pela Hipoplasia pontocerebelar tipo 1B (PCH1B, OMIM #614678).

5.3.6 L1CAM (L1 Cell Adhesion Molecule, OMIM *308840)

Caso 6.1, masculino, 10 anos de idade, filho de pais não consanguíneos. Ultrassonografia (USG) morfológica durante a gestação evidenciou hidrocefalia, sendo colocada válvula intraventricular intra-útero. Nasceu sem intercorrências, identificada malformação de quirodáctilos (primeiro e segundo) bilateralmente. Iniciou crises convulsivas tônicas aos 3 meses de idade, evoluindo com epilepsia de difícil controle e grave atraso no DNPM. Ao exame físico, apresentava alterações dermatológicas (dermatites e máculas vinhosas difusas), hipotonia axial com hipertonia espástica apendicular, linguagem verbal restrita e nistagmo multidirecional, além de hipoplasia e contratatura em adução de polegares, pior à direita.

RM de crânio (Figura 6) evidenciou displasia da junção mesencéfalo-diencefálica, com estenose do aqueduto; afinamento do corpo caloso; severa dilatação dos ventrículos laterais; afinamento do manto cerebral remanescente com severa escassez de sua substância branca; disgiria cerebral difusa; indistinção dos núcleos da base.

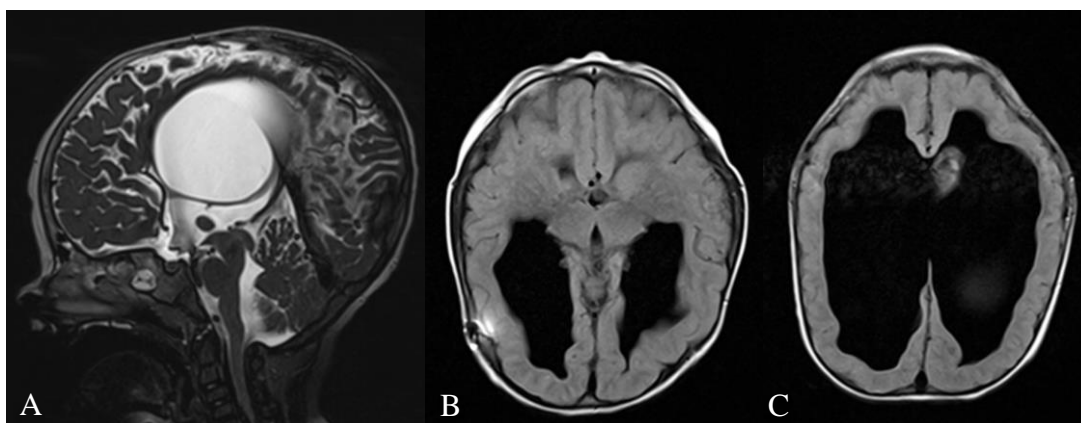


Figura 6 - RM de crânio do caso 6.1. (A) Imagem sagital T2 (A) mostrando displasia da junção mesencéfalo-diencefálica, com estenose do aqueduto; afinamento do corpo caloso; e (B) e (C) Axial FLAIR, demonstram severa dilatação dos ventrículos laterais; afinamento do manto cerebral remanescente com escassez de sua substância branca, disíria cerebral difusa e indistinção dos núcleos da base (B)

A análise genética identificou em hemizigose a variante c.29 del C, que promove mudança na matriz de leitura e terminação precoce da tradução proteica (p.Pro10Leufs*22) tendo, por isso, sido considerada patogênica. Esta variante está ausente na base de dados populacionais GnomAD v2.1.1 e no repositório de variantes ClinVar, nunca tendo sido descrita na literatura médica. Estudo de segregação confirmou sua presença na genitora que, desta forma, é portadora em heterozigose desta variante.

Variantes patogênicas em hemizigose em *L1CAM* estão associadas à hidrocefalia congênita por estenose do aqueduto mesencefálico ou aqueduto de Sylvius (HSAS, OMIM #307000).

5.3.7 *MAST1* (Microtubule-Associated Serine/Threonine Kinase 1, OMIM *612256)

Caso 7.1, feminino, 8 anos de idade, pais não consanguíneos, sem intercorrências perinatais. Aos 3 meses de vida, iniciou crises convulsivas focais e generalizadas de difícil controle farmacológico. Ao exame neurológico, apresentava dismorfismos, como facies alongada, monocelha, baixa implantação de orelhas e

palato ogival. Havia ainda atraso motor e de linguagem, hipotonia global acentuada, balanceio de cabeça e ataxia de tronco.

A RM (Figura 7) revelou corpo caloso com espessura difusamente aumentada, principalmente em segmentos mais anteriores, com múltiplos pequenos espaços perivasculares na interface caloso-septal; aspecto colpocefálico do sistema ventricular; rotação hipocampal incompleta bilateralmente; núcleos da base dismórficos, com alargamento da porção anterior da cabeça do caudado, putamen e do núcleo accumbens, espaço liquórico alargado na cisterna pontocerebelar direita, possivelmente por cisto aracnóide, e persistência do cavo do septo pelúcido.

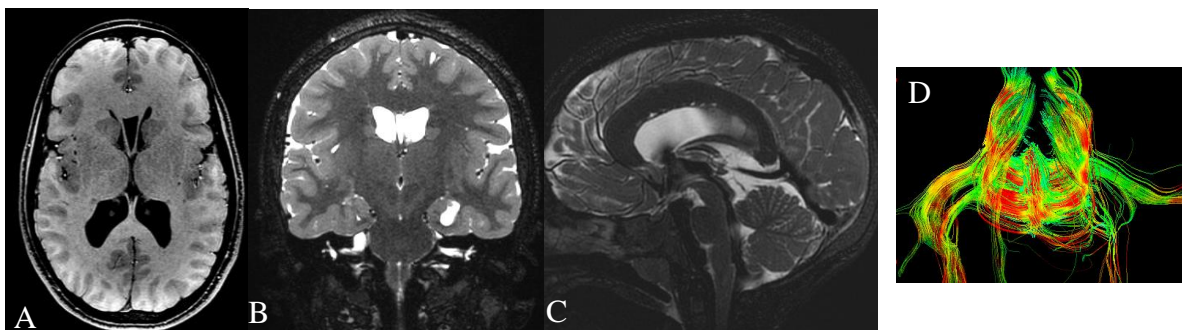


Figura 7 - RM da paciente 7.1. Mega Corpo caloso, predomínio anterior, com múltiplos pequenos espaços perivasculares na interface caloso septal identificados em imagem sagital T2 (C) e fibras com orientação anômala anteroposterior junto a sua margem superior identificadas em estudo de tratografia (D). Rotação incompleta hipocampal identificada em imagem coronal T2 (B). Núcleos da base com aspecto dismórfico identificados em T1 axial (A), observando-se espessamento da porção anterior da cabeça do caudado, putamen e do núcleo accumbens

Identificada, em heterozigose em *MAST1*, a variante c.691T>C, que promove a substituição do aminoácido cisteína no códon 231 por arginina (p.Cys231Arg), tendo ocorrido como um evento mutacional *de novo*. Esta variante está ausente da base de dados populacionais GnomAD v2.1.1 e do repositório de variantes ClinVar, não tendo sido reportada previamente na literatura científica.

Variantes patogênicas em heterozigose em *MAST1* estão relacionadas à Síndrome de mega corpo caloso com hipoplasia cerebelar e malformações corticais (MCCCHCM, OMIM #618273).

5.3.8 *MTOR* (Mechanistic Target of Rapamycin, OMIM *601231)

Caso 8.1, masculino, 1 ano de idade, epilepsia de difícil controle desde 4 meses, atraso no DNPM, refluxo gastroesofágico e comportamento autístico. Ao exame físico, observadas macrocrania, hipotonia axial e apendicular, ausência de contato visual, estereotipias manuais e presença de manchas hipocrômicas concêntricas em abdome e membros inferiores.

A RM (Figura 8) revelou substância cinzenta heterotópica na região subependimária adjacente aos cornos anteriores e corpos dos ventrículos laterais, associada a polimicrogiria frontal bilateral. Descritos ainda um afilamento na região do esplênio, com espessamento em joelho do corpo caloso e focos de hipersinal em T2 na cabeça dos núcleos caudados, bilaterais e simétricos.

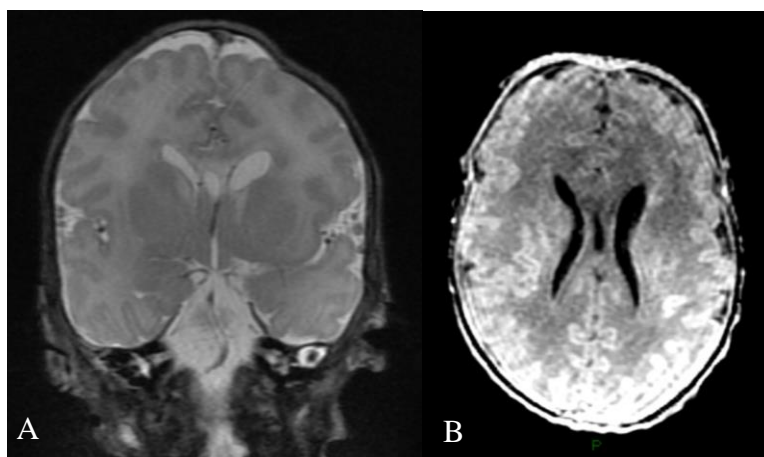


Figura 8 - RM de crânio do paciente 8.1, evidenciando em imagens Coronal T2 (A) e Axial FLAIR (B): alterações focais de sinal na substância branca periventricular frontal (heterotopias); alteração de sinal na porção medial das cabeças dos núcleos caudados, simétricas, com hipersinal em T2; polimicrogiria frontal bilateral

Foi identificada em *MTOR* a variante c.4448 G>A, que resulta na substituição do aminoácido cisteína por tirosina na posição 1483 (p.Cys1483Tyr). Esta variante estava presente em 30% das leituras do sequenciamento e a presença deste desbalanço alélico sugeriu a possibilidade de se tratar de um mosaicismismo somático.

No entanto, seria necessária a análise de outros tecidos para confirmar ou excluir esta suspeita. Esta variante está ausente da base de dados populacionais GnomAD v2.1.1, foi submetida ao repositório de variantes ClinVar (Tabela 5) e já foi previamente reportada na literatura médica (Gordo et al., 2018). Variantes patogênicas germinativas em *MTOR* cursam com a Síndrome de Smith-Kingsmore (SKS, OMIM #616638), caracterizada por hipotonia muscular e epilepsia, podendo haver comportamento autístico, alterações dermatológicas e dismorfismos, bem como megalencefalia e defeitos de migração neuronal à neuroimagem.

5.3.9 *PAFAH1B1* (Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase, OMIM *601545)

Foram identificados dois indivíduos com variantes provavelmente patogênicas em *PAFAH1B1*, apresentando fenótipos bem distintos.

Caso 9.1, masculino, nascido de parto vaginal com distocia de ombro e fratura de clavícula, ocorrendo asfixia perinatal. Apresentava estrabismo, hipoplasia testicular com criptorquidia e micropênis. Evoluiu com regressão no DNPM a partir do sexto mês de vida, desaceleração no crescimento pondero-estatural e cefálico, bem como aumento progressivo do tônus muscular apendicular. Na história familiar, uma tia materna com atraso no DNPM. Ao exame físico, notavam-se microcefalia, hipotonia axial e hipertonia apendicular, com sinais de liberação piramidal bilateralmente.

A RM de crânio (Figuras 9.1 e 9.2) realizada no primeiro ano de vida evidenciou hipoplasia do tronco encefálico e pedúnculos cerebelares, bem como severa hipoplasia do vermis e hemisférios cerebelares, notadamente em seu aspecto inferior, além do afinamento do corpo caloso e redução volumétrica difusa da substância branca. Um segundo exame realizado aos 7 anos de idade mostrou progressiva redução volumétrica ponto-cerebelar (inferindo atrofia associada).

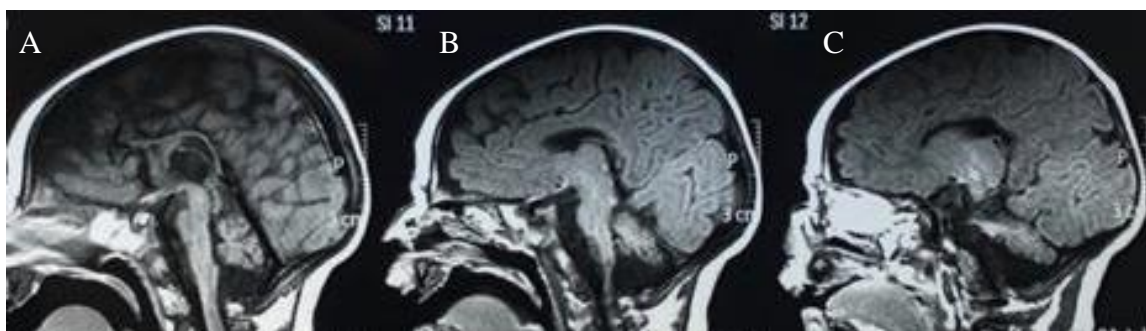


Figura 9.1 - Caso 9.1. RM com 1 ano de idade. Sequência em Sagital T1, evidenciano severa hipoplasia pontocerebelar e afilamento do corpo caloso

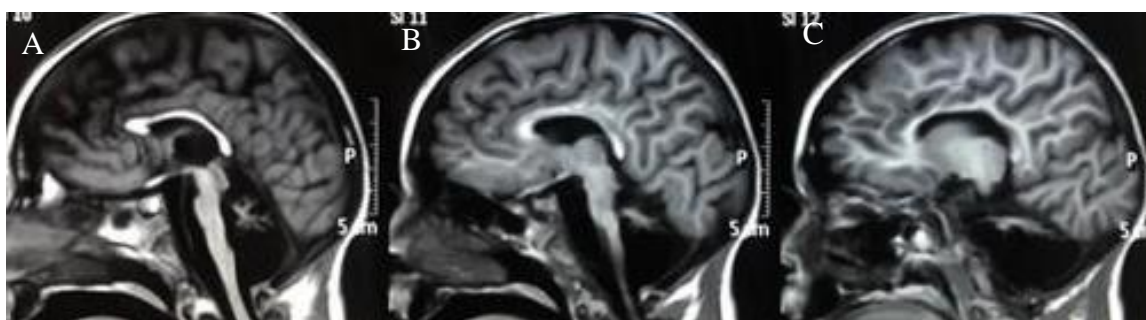


Figura 9.2- RM do sujeito 9.1 aos 7 anos de idade. Imagens Sagital T1 evidenciando a progressiva redução volumétrica pontocerebelar

Na análise genética, não foram encontradas variantes relacionadas à hipoplasia pontocerebelar, porém foi identificada em heterozigose, em *PAFAH1B1*, a variante c.818G>A, resultando na troca do aminoácido arginina no códon 273 por glicina (p.Arg273Gln). Esta variante ocorreu como um evento mutacional *de novo*, estando ausente dos genitores. Está ausente em 141.000 indivíduos da população mundial (GnomAD v2.1.1), foi submetida ao repositório de variantes ClinVar (tabela 5). Reportada na literatura médica relacionada a lissencefalia (Lo Nigro et al., 1997), com o presente caso, a variante foi publicada em associação ao fenótipo apresentado (Cabral et al., 2021).

Já o caso 10.1, feminino, 1 ano e 6 meses de vida, sem consanguinidade ou complicações perinatais, apresentou uma plagiocéfalia assimétrica. Evoluiu com atraso do DNPM e, com cerca de 1 ano de idade, iniciou crises de parada comportamental e espasmos em flexão, farmacorresistentes. Ao exame

neurológico, observavam-se fendas palpebrais oblíquas, contato limitado com o meio e hipotonia muscular global.

A neuroimagem evidenciou espessamento cortical difuso de aspecto paquigírico, predominante em regiões parieto-occipitais, com redução da substância branca correspondente e tênues bandas de hipersinal em T2, subjacentes ao córtex.

No sequenciamento do exoma, foi evidenciada em *PAFAH1B1* a variante c.569-10T>C, localizada em sítio acceptor de *splicing*, levando provavelmente à formação de RNAm anômalo. Está ausente da base de dados populacionais GnomAD v2.1.1 e presente no repositório de variantes ClinVar (Tabela 5), tendo sido previamente descrita na literatura médica (Philbert et al., 2017) em caso de lissencefalia 1 (OMIM #607432).

5.3.10 *RARS2* (Arginyl-tRNA Synthetase 2, OMIM *611524)

Caso 11.1, feminino, 1 ano e 3 meses de vida, pais não consanguíneos, sem intercorrências perinatais. Apresentou, nos primeiros meses de vida, hipotonia muscular e ausência de contato visual, evoluindo com atraso global do DNPM. No quinto mês, iniciou quadro de espasmos infantis, tendo sido diagnosticada síndrome de West. Exame oftalmológico identificou hipermetropia e astigmatismo. O exame físico revelava sobrepeso, hipotonia muscular global (sustento cervical incompleto) e ausência de dismorfismos. Evoluiu com epilepsia farmacorresistente e sucessivas hospitalizações por complicações infecciosas.

A RM (Figura 10) revelava alteração em vermis cerebelar superior e hemisférios cerebelares mediais, com redução volumétrica e hipersinal em T2 e FLAIR.

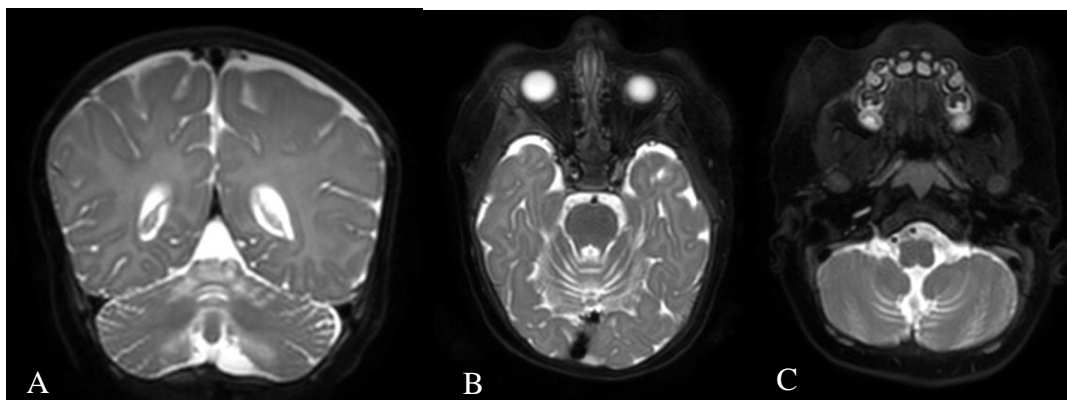


Figura 10 - RM de crânio, caso 11.1. Imagens pesadas em T2, Coronal (A) e Axial (B e C), evidenciando redução volumétrica e hipersinal no vermis cerebelar superior e hemisférios cerebelares mediais inferiores e superiores

A análise genética identificou, em heterozigose em *RARS2*, duas variantes: a primeira, c.1327 T>C, promovendo a substituição do aminoácido serina no códon 443 por prolina (p.Ser443Pro), presente com frequência alélica de 15/251374 na base de dados GnomAD (v2.1.1) e previamente descrita na literatura médica (Karaca et al., 2015) como associada a hipoplasia ponto-cerebelar 6 (PCH6, OMIM #611523), sendo classificada como patogênica. A segunda, c.422A>G, que promove a substituição do aminoácido histidina no códon 141 por arginina (p.His141Arg), encontrada com uma frequência alélica de 4/281534 no GnomAD v2.1.1, ausente em repositório de variantes e jamais descrita na literatura médica, foi classificada como sendo uma variante de significado incerto (VUS). Não foi possível verificar se as variantes identificadas estavam em cis (no mesmo alelo) ou em trans (em alelos distintos).

5.3.11 *RHOBTB2* (RHO-Related Broad Complex, Tramtrack, and Bric-a-brac Domain-Containing Protein 2, OMIM *607352)

Caso 12.1, masculino, 9 anos, sem consanguinidade parental, apresentou abalos clônicos na primeira hora de vida, evoluindo com epilepsia farmacorresistente. Apresentava ainda baixa acuidade visual e criptorquidia. Aos 2 anos de idade, após parada cardiorrespiratória por choque séptico, seguiu-se

deterioração neurológica. Ao exame físico, notava-se hipotonia axial com espasticidade apendicular, sem dismorfismos.

A RM (Figura 11) evidenciou redução volumétrica cortico-subcortical e polimicrogiria nos hemisférios cerebrais, dilatação ex-vacuo dos ventrículos laterais e terceiro ventrículo, agenesia de corpo caloso com aspecto colpocefalico e vermis cerebelar, além de hipoplasia de tronco encefálico, da ponte e quiasma óptico. Com a reanálise das imagens para este estudo, foram descritos ainda rotação hipocampal incompleta e alongamento das fissuras sylvianas.

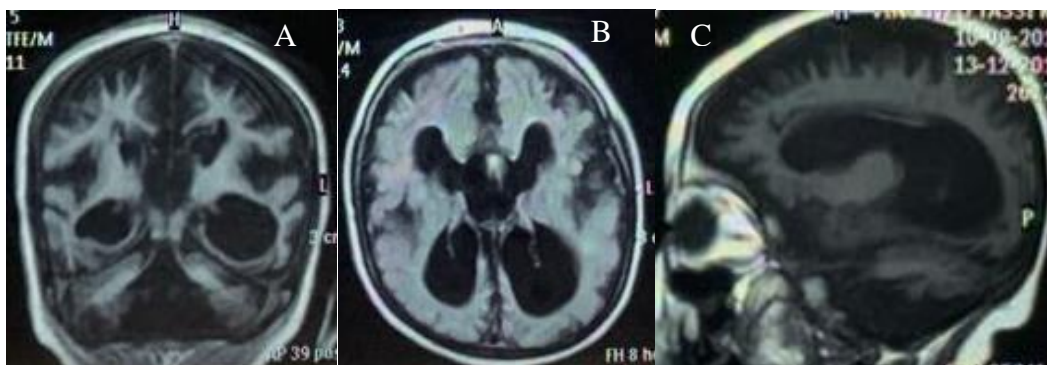


Figura 11 - RM de crânio, caso 12.1. (A) Corte Coronal T1, evidenciando acentuada redução volumétrica encefálica difusa, incluindo tronco e cerebelo e agenesia do vermis cerebelar. (B) Corte Axial T1, ressaltando-se a redução volumétrica córtico-subcortical cerebral e a dilatação ventricular supratentorial. (C) Em Corte Sagital T1, são evidentes a polimicrogiria, agenesia do corpo caloso com colpocefalia e a acentuada hipoplasia pontocerebelar

Foi identificada, em heterozigose em *RHOBTB2*, a variante c.719C>T, que promove a substituição do aminoácido prolina no códon 240 por leucina (p.Pro240Leu). Variante ausente na base de dados populacionais GnomAD e nunca reportada no repositório de variantes ClinVar, nem descrita previamente na literatura médica. Foi pesquisada e não encontrada nos genitores, ocorrendo, portanto, como um evento mutacional presuntivamente *de novo*, e classificada como provavelmente patogênica. Variantes patogênicas em heterozigose neste gene estão associadas à encefalopatia epilética e do desenvolvimento 64 (DEE64, OMIM #618004).

5.3.12 SCN3A (Sodium Voltage-Gated Channel, Alpha Subunit 3, OMIM *182391)

Foram identificados 3 sujeitos com fenótipo de lissencefalia e variantes em SCN3A, sendo dois irmãos com a mesma variante.

Os indivíduos 13.1 e 13.2, masculinos e filhos de casal não consanguíneo, sem intercorrências perinatais, iniciaram crises convulsivas na primeira semana de vida. O sujeito 13.1 desenvolveu epilepsia refratária às intervenções terapêuticas. Evoluiu com distonia de membros inferiores sobreposta à hipertonia apendicular. Ao exame neurológico, notavam-se ausência de contato visual com o meio, hipotonia axial e espasticidade apendicular, distonia acentuada em região cervical e membros, além de mioclonias generalizadas. Seguiram-se diversas complicações infecciosas e epiléticas até o óbito, aos 8 anos de idade.

A RM revelava espessamento cortical difuso com aspecto polimicrogírico nos hemisférios cerebrais, principalmente em regiões anteriores e têmporo-parietais, associado a paquigiria regiões frontobasais e insulares, alargamento das fissuras sylvianas e ectasia ventricular, com áreas confluentes de hipersinal em T2/FLAIR na substância branca cerebral, associadas a redução volumétrica.

O sujeito 13.2, masculino, 1 ano e 7 meses de vida, hipotônico ao nascer e internado para controle de convulsões neonatais, evoluiu com atraso severo do DNPM e epilepsia parcial contínua. Ao exame clínico, observados movimentos involuntários, com desvio ocular associado a clonias apendiculares assimétricas, mioclonias de língua e hipotonia muscular global.

A neuroimagem (Figura 12) exibiu aspecto de lissencefalia incompleta, com redução da sulcação hemisférica cerebral, associada a áreas de polimicrogiria de predomínio frontotemporoinssular, além de aspecto colpocefálico dos ventrículos laterais e sinais de agenesia incompleta do corpo caloso, não sendo identificada a presença do esplênio do mesmo.

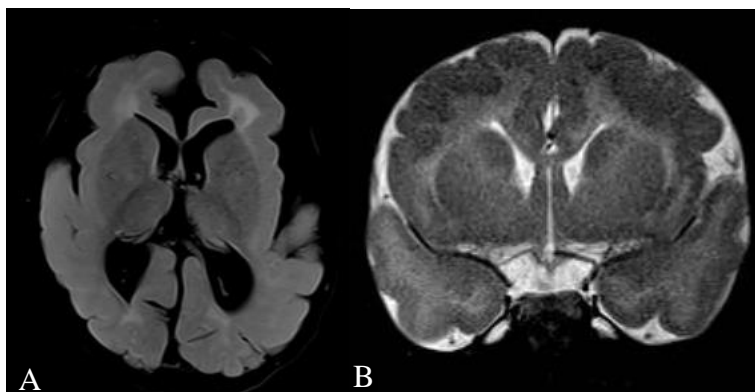


Figura 12 - RM do caso 13.2. (A) Corte Axial FLAIR, evidenciando simplificação giral, com sulcos rasos e opercularização incompleta, bilateral e simétrica, substância branca cerebral escassa com alterações focais de sinal, mais acentuadamente bifrontal, junto às malformações corticais. (B) Corte Coronal T2, mostrando o aspecto polimicrogírico do córtex cerebral

Nos casos 13.1 e 13.2 foi identificada, em heterozigose, em *SCN3A*, a mesma variante, c.5295G>A, que promove a substituição do aminoácido metionina no códon 1765 por isoleucina (p.Met1765Ile), com efeito deletério segundo programas de predição "in silico". Variante pesquisada e não encontrada nos genitores, em princípio sugerindo sua ocorrência como evento *de novo*. Ausente em bancos de dados populacionais, esta variante foi então registrada no ClinVar (tabela 5) e descrita na literatura médica (Inuzuka et al., 2020; Zaman et al., 2020; Inuzuka et al. 2021).

Já o caso 14.1, feminino, 2 anos de idade, sem história de consanguinidade, apresentou retardo do crescimento intra-uterino e desconforto respiratório ao nascer, diagnosticados laringomalácia e refluxo gastroesofágico. Evoluiu com crises convulsivas mioclônicas reentrantes, associadas a automatismos em mãos, farmacorresistentes. Ao exame neurológico, notava-se hipotonia axial e em membros superiores, hipertonia em membros inferiores, ausência de contato visual, mantendo crise convulsiva clônica, contínua, multifocal.

A RM revelou área extensa de alteração morfológica do córtex cerebral, caracterizando o aspecto de paquigiria/polimicrogíria, predominante em regiões

frontoparietoinculares, além de aspecto colpocefálico dos ventrículos laterais e acentuada disgenesia do corpo caloso.

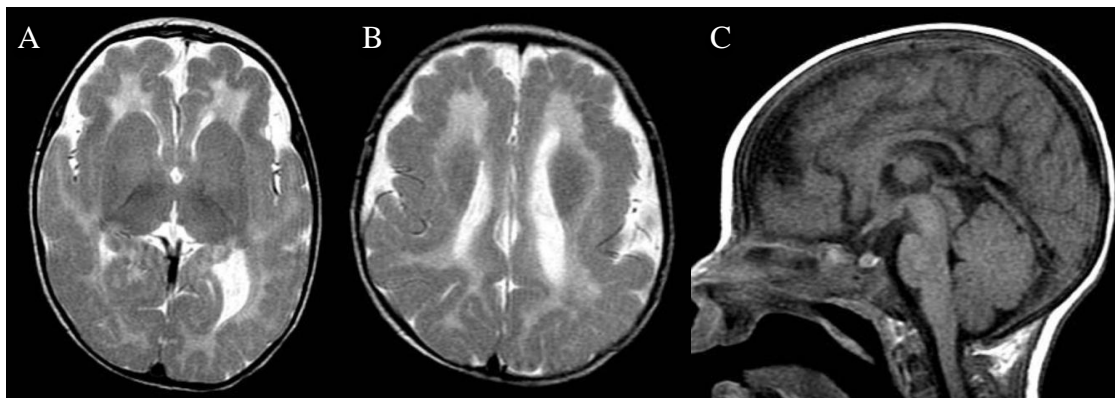


Figura 13 - Caso 14.1. (A) e (B): Imagens em Axial T2 evidenciando o aspecto de paquigiria / polimicrogria do córtex cerebral, e de colpocefalia dos ventrículos laterais. (C): Corte Sagital T1, evidenciando a disgenesia do corpo caloso

À análise genética, foi identificada, em heterozigose em *SCN3A*, a variante c.2624T>C, que promove a substituição do aminoácido isoleucina no códon 875 por treonina (p.Ile875Thr), deletéria segundo programas computacionais de predição “in silico”. Esta variante está ausente na base de dados populacionais GnomAD v2.1.1, presente no ClinVar (tabela 5) e foi descrita na literatura médica (Inuzuka et al., 2020), estando relacionada ao fenótipo de encefalopatia epiléptica e do desenvolvimento 62 (DEE62, OMIM #617938).

5.3.13 *TUBA1A* (Tubulin alpha 1A, OMIM *602529)

Caso 15.1, masculino, 1 ano e 3 meses de vida, fruto de fertilização in vitro, nasceu a termo, sem intercorrências. Aos 6 meses, iniciaram crises convulsivas, do tipo espasmos em flexão, de difícil controle. Evoluiu com grave atraso do DNPM e deficiência intelectual. Ao exame físico, notava-se microcefalia, hipotonia muscular global e ataxia de tronco.

A RM (Figura 14) evidenciou hipoplasia e rotação do vermis cerebelar, associadas a discreta hipoplasia e displasia dos hemisférios cerebelares, com imagem cística na fossa posterior e alteração difusa da foliação cerebelar, sugerindo displasia cerebelar. Havia ainda hipoplasia e malformação do tronco encefálico, principalmente da ponte e do mesencéfalo e disgenesia do corpo caloso, com colpocefalia, fusão dos núcleos da base, rotação hipocampal incompleta, fissuras sylvianas rasas e alongadas, bem como discreta paquigiria e heterotopia de substância cinzenta bilateralmente.

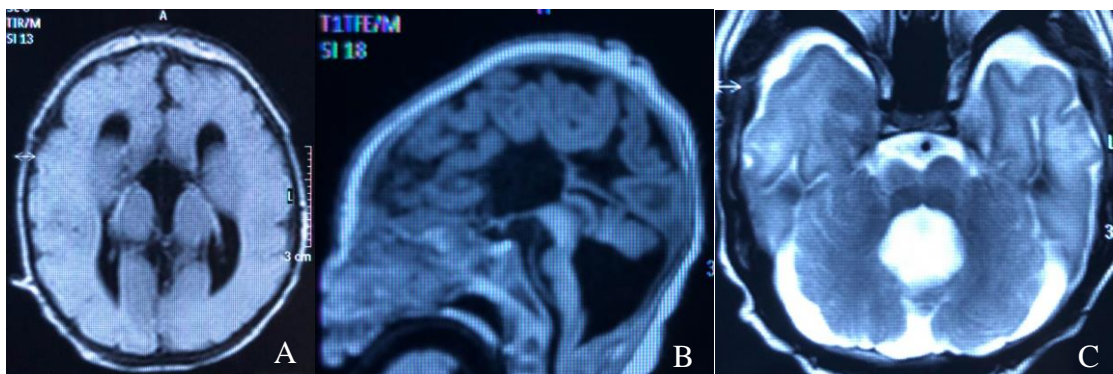


Figura 14 - RM de crânio do caso 15.1. FLAIR axial (A) e sagital (B) e T2 axial (C). Desproporção craniofacial; Mal-formação do tronco, com incisura na ponte(C); hipoplasia do vermis cerebelar inferior (B) e mais discreta dos hemisférios cerebelares; alteração difusa da foliação cerebelar, sugerindo displasia cerebelar (C); agenesia do corpo caloso (B) com colpocefalia (A); disgiria com simplificação giral cerebral difusa

Na análise genética, a variante c.1242 G>A foi identificada em heterozigose em *TUBA1A*, promovendo a substituição do aminoácido alanina no códon 421 pela treonina (p.Ala421Thr). Sua presença foi confirmada por sequenciamento pelo método Sanger no paciente, foi pesquisada e não encontrada nos genitores, indicando sua ocorrência como evento mutacional *de novo*, o que corrobora seu caráter deletério. Esta variante está ausente das bases de dados populacionais e foi submetida ao repositório de variantes ClinVar (tabela 5), porém não publicada na literatura médica. Variantes patogênicas em *TUBA1A* estão relacionadas à lissencefalia tipo 3 (OMIM # 611603).

5.3.14 *TUBB* (Tubulin Beta, OMIM*191130)

Caso 16.1, feminino, 2 anos de idade, sem consanguinidade parental, apresentou hipotonia ao nascimento, com discretos dismorfismos. Evoluiu com atraso motor, apesar de cognitivo adequado à idade. Ao exame físico, identificados dismorfismos, como fronte proeminente, ponte nasal deprimida, filtro nasal curto com lábio superior fino, palato ogival e hipertelorismo mamário, bem como discreta hipotonia muscular global.

O laudo da RM descrevia apenas hipoplasia de corpo caloso. A revisão das imagens (Figura 15), porém, revelou adicionalmente fusão parcial de núcleos da base, hipoplasia da ponte, assimetria dos hemisférios cerebrais e tronco, encurtamento das ínsulas e interdigitação frontal de giros.

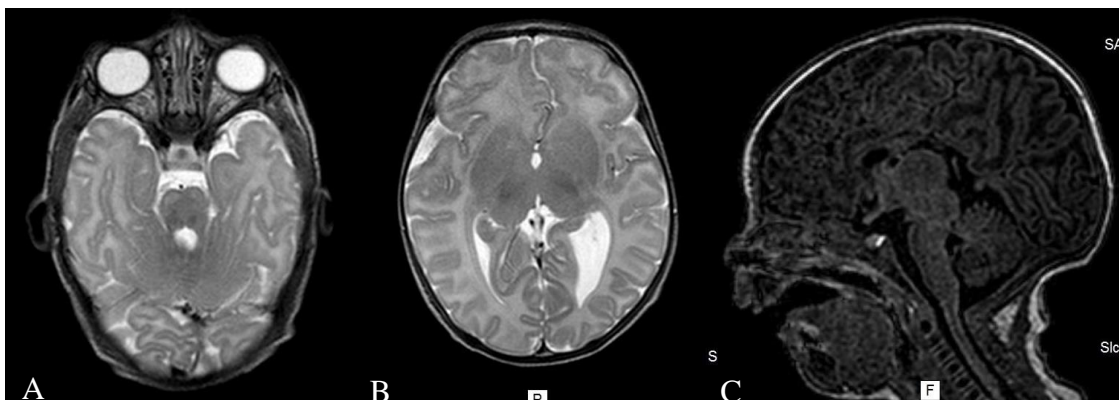


Figura 15 - RM de crânio. Caso 16.1. Cortes na sequência Axial T2 evidenciando hipoplasia de ponte assimétrica (A), fusão de núcleos da base e encurtamento da ínsula (B). Corte em 3D TTT SENSE revelando hipoplasia de corpo caloso e ponte (C)

A análise do exoma revelou a variante c.155A>G, promovendo a troca do aminoácido asparagina no códon 52 por serina (p.Asn52Ser), potencialmente deletéria segundo programas de predição de patogenicidade. Variante ausente em bancos de dados da população mundial e não previamente descrita na literatura. Confirmada pelo método Sanger, foi também pesquisada e não encontrada nos

genitores, indicando a mutação como evento *de novo* e reforçando, assim, seu caráter deletério. Variantes patogênicas em *TUBB* são responsáveis pela displasia cortical complexa com outras malformações cerebrais tipo 6 (CDCBM6, OMIM #615771).

5.3.15 *TUBB3* (Tubulin Beta 3, OMIM *602661)

Foram incluídos dois sujeitos (identificados como 17.1 e 18.1) com variantes em *TUBB3* e fenótipos semelhantes.

O sujeito 17.1, masculino, 3 anos de idade, sem intercorrências perinatais ou consanguinidade, evoluiu com atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, ausência de emissões otoacústicas em orelha direita e iniciou, aos 8 meses de vida, crises focais e generalizadas, incluindo espasmos infantis. Recebeu o diagnóstico inicial de Síndrome de West, evoluindo para Síndrome de Lennox-Gastaut. Ao exame neurológico, notavam-se hipotonia muscular global e deficiência intelectual grave, associadas a microcefalia e déficit visual.

A RM evidenciou hipoplasia cerebelar predominante em vermis, afilamento do corpo caloso e alterações em substância branca subcortical.

A análise genética identificou, em heterozigose em *TUBB3*, a variante c.1172 G>T, resultando na substituição do aminoácido arginina por leucina na posição 391 (p.Arg391Leu), classificada como patogênica no ClinVar (tabela 5). Variante ausente do GnomAD v2.1.1 e não descrita na literatura médica, foi pesquisada e não encontrada nos genitores, indicando sua ocorrência como evento mutacional *de novo*.

Da mesma forma, o caso 18.1, feminino, 2 anos de idade, sem intercorrências perinatais ou consanguinidade, apresentou atraso do DNPM. Aos 6 meses de vida, iniciou crises oculógiras, seguidas de espasmos em flexão. Foi diagnosticada a Síndrome de West, evoluindo com crises mioclônicas farmacorresistentes. Ao exame físico, notavam-se hipotonia muscular global, ataxia apendicular e distonia em hálux bilateralmente.

À neuroimagem (Figura 16), displasia cortical cerebelar, afilamento do corpo caloso, fusão dos núcleos estriados, sinais de displasia do teto mesencefálico e hipoplasia assimétrica do tronco encefálico, principalmente da ponte e pedúnculos cerebelares superiores e médios, bem como má rotação hipocampal.

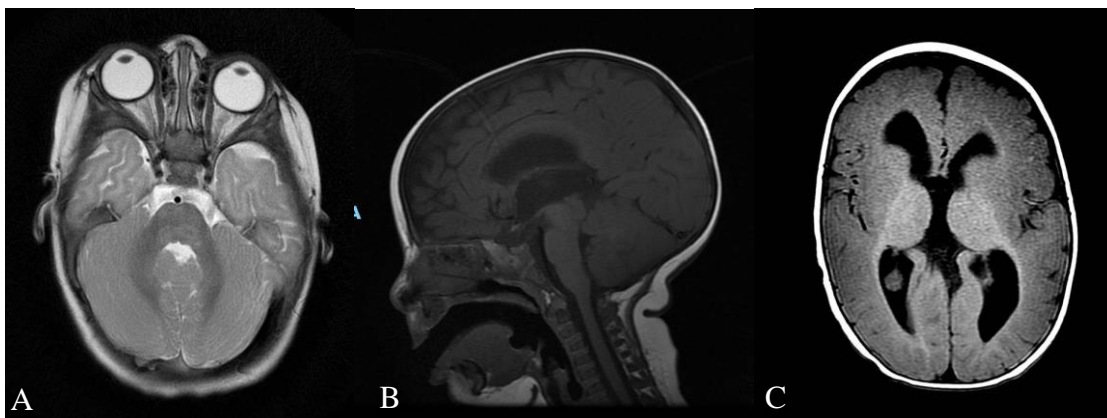


Figura 16 - RM de crânio do caso 18.1. Corte Axial T2 (A) evidenciando discreta assimetria da ponte, alteração da sulcação e foliação em hemisférios e principalmente no vermis cerebelar. (B) Corte Sagital T1 mostrando hipoplasia de tronco encefálico, com espessamento relativo do tecto mesencefálico e afilamento de corpo caloso. (C) Corte Axial T1 evidenciando a fusão dos núcleos estriados bilateralmente

À análise genética, foi identificada em heterozigose em *TUBB3* a variante c.806 G>C, determinando a troca de uma glicina por alanina no códon 269 (p.Gly269Ala), ausente do GnomAD v2.1.1 e do ClinVar, não reportada previamente na literatura médica. Programas de predição "in silico" sugeriram patogenicidade, e a ausência da mesma nos genitores indicou a ocorrência de evento mutacional *de novo*.

Variantes patogênicas em *TUBB3* estão relacionadas à displasia cortical complexa com outras malformações cerebrais tipo 1 (CDCBM1, OMIM #614039).

5.3.16 *WDR73* (WD Repeat-Containing Protein 73, OMIM *616144)

Caso 19.1, feminino, 7 anos de idade, pais sem consanguinidade conhecida, porém oriundos de cidade (Monte Santo- BA) com alta incidência de casamentos

consanguíneos. Sem intercorrências perinatais, perímetro cefálico normal ao nascimento. Evoluiu com grave atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, miopia e, posteriormente, distúrbio de comportamento, sem alterações em outros órgãos ou sistemas. Ao exame neurológico, havia hipotonia axial com hipertonia e distonia apendiculares, sinais de liberação piramidal bilaterais, ausência de interação com o meio.

A RM (Figura 17) evidenciou redução volumétrica cerebelar, dos hemisférios e vermis, associada a discreta redução volumétrica da protuberância pontina e dos pedúnculos cerebelares, com dilatação compensatória do IV ventrículo.

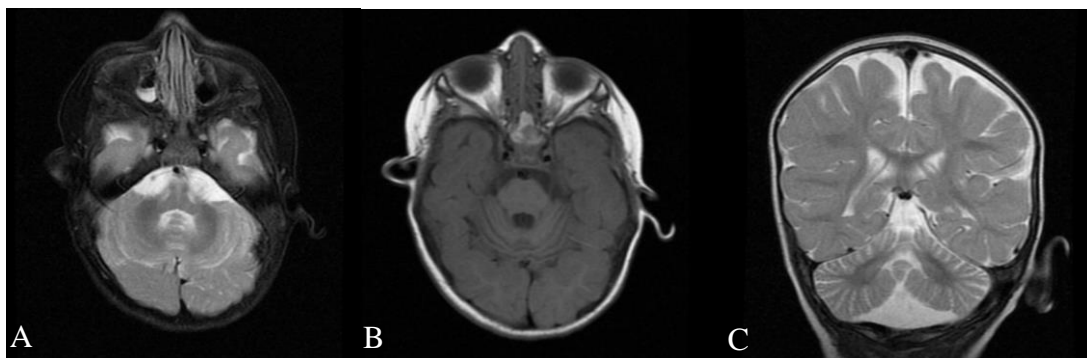


Figura 17 - RM de crânio, caso 19.1. Cortes Axial T2 (A), Axial T1 (B) e Coronal T2 (C) evidenciando a redução volumétrica cerebelar, associada a discreta redução de volume na protuberância pontina

À análise genética, identificada a variante c.710_711insC, promovendo a substituição do aminoácido glicina na posição 238 por triptofano e mudança na matriz de leitura a partir deste ponto, com a criação de códon de parada prematuro na tradução proteica (p.Gly238Trp fs*17). Variante ausente em bancos de dados da população mundial, não descrita em repositórios de variantes ou na literatura médica, porém suas características permitiram sua classificação como provavelmente patogênica. Variantes patogênicas em homozigose ou heterozigose composta neste gene cursam com a Síndrome de Galloway-Mowat tipo 1 (GAMOS1, OMIM #251300), de herança autossômica recessiva.

6 Discussão

Este estudo, que procurou investigar as bases genéticas dos defeitos do desenvolvimento cerebelar e da migração neuronal cortical, incluiu 20 sujeitos e identificou variantes patogênicas envolvendo 16 genes distintos. Estas condições apresentam uma grande variabilidade fenotípica e heterogeneidade genética, o que torna particularmente desafiador o estabelecimento do diagnóstico.

Em apenas um sujeito incluído nesta amostra havia uma suspeita envolvendo um único gene (*L1CAM*), pois se tratava de caso muito sugestivo de hidrocefalia ligada ao X. Em todos os demais, não havia uma suspeita prévia de um único gene e, desta forma, o sequenciamento completo do exoma era o exame mais claramente indicado para o estabelecimento do diagnóstico.

Clinicamente, todos os 20 sujeitos avaliados apresentavam atraso do desenvolvimento neuropsicomotor. Epilepsia de difícil controle farmacológico foi a segunda manifestação clínica mais frequente, presente em 15 indivíduos (75% da amostra). Microcefalia estava presente em cinco sujeitos (25%), sendo que, em dois deles (casos 3.1 e 9.1), foi decorrente de desaceleração pós-natal do crescimento cefálico. Este achado é comumente observado em heterozigotas para variante patogênica em *CASK* (como no caso 3.1), em que se descreve maior frequência de microcefalia pós-natal (Moog et al., 2011), bem como em variantes patogênicas em *PAFAH1B1*, com regressão do desenvolvimento, como ocorreu no indivíduo 9.1 (Brock et al., 2009). Macrocefalia foi reconhecida em dois sujeitos: em decorrência de hidrocefalia congênita relacionada a *L1CAM* (caso 6.1), e de megalencefalia na síndrome de Smith-Kingsmore associada a *MTOR* (caso 8.1).

Dos 20 indivíduos estudados, 12 (60%) apresentaram hipotonia muscular global e 8 (40%) apresentaram a associação de hipotonia axial com hipertonia apendicular. Ataxia cerebelar estava presente em 5 indivíduos (25%). Houve

também a presença de movimentos involuntários, como a coreoatetose e discinesias orofaciais no caso 1.1, com duas variantes em heterozigose em *ARFGEF2*, compatível com a imagem de atrofia e hipersinal em putâmen bilateralmente e com a literatura médica correspondente (Tanyalçin et al., 2013; Bardón-Cancho et al., 2014). Distonia localizada de membros inferiores também foi observada no caso 18.1, com variante patogênica em *TUBB3*, que apresentava neuroimagem com fusão em núcleos da base. Ainda os dois irmãos com variante em *SCN3A* apresentaram movimentos involuntários, sendo distonias em um e mioclonias em outro, em desacordo com a literatura médica que não descreve tais achados, e apesar da ausência de alterações em núcleos da base na neuroimagem.

Dismorfismos foram observados em 30% dos sujeitos nesta série, como a micrognatia, em 2 indivíduos (10%), palato ogival em 2 outros, e fenda palpebral oblíqua na mesma proporção. Outros dismorfismos isolados foram descritos (como pé torto congênito, monocelha, baixa implantação de orelhas, entre outros). Especificamente uma contratura em adução dos polegares no caso 6.1, com variante em *L1CAM*, está bem descrita na literatura relacionada a esse gene, particularmente em variantes do tipo *frameshift*, em associação com deficiência intelectual e espasticidade apendicular (Kong et al., 2020; Tully et al., 2014; Wang et al., 2021), também presentes neste indivíduo.

Houve associação de alterações em outros órgãos e tecidos, tais como micropênis com hipoplasia testicular e criptorquidia em indivíduo com variante em *PAFAH1B1* (caso 9.1), criptorquidia isolada no indivíduo 12.1, com variante em *RHOBTB2*, e alterações dermatológicas em 2 outros casos: manchas vinhosas na hidrocefalia ligada ao X (*L1CAM*) e manchas hipocrômicas confluentes na síndrome de Smith-Kingsmore (*MTOR*).

Esses achados clínicos estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6 - Manifestações clínicas nas malformações corticais e cerebelares estudadas nesta série

FENÓTIPO	GENE (caso)	FREQUÊNCIA
Atraso de DNPM	TODOS	100%
Epilepsia	<i>ARFGEF2, ATP1A3, DYNC1H1, L1CAM, MAST1, MTOR, PAFAH1B1 (10.1), RARS2, RHOTB2, SCN3A (13.1, 13.2 e 14.1), TUBA1A, TUBB3 (17.1 e 18.1)</i>	75%
Hipotonia muscular global	<i>ARFGEF2, ATP1A3, CASK, MAST1, MTOR, PAFAH1B1 (10.1), RARS2, SCN3A (13.2), TUBA1A, TUBB, TUBB3 (17.1 e 18.1)</i>	60%
Alterações visuais/oculares	<i>ATP1A3, CASK, EXOSC3, L1CAM, PAFAH1B1 (9.1), RARS2, RHOTB2, SCN3A (13.1), SCN3A (14.1), TUBB3 (17.1), WDR73</i>	55%
Hipotonia axial + hipertonia apendicular	<i>DYNC1H1, EXOSC3, L1CAM, PAFAH1B1 (9.1), RHOTB2, SCN3A (13.1 e 14.1), WDR73</i>	40%
Dismorfismos	<i>ATP1A3, EXOSC3, L1CAM, MAST1, PAFAH1B1 (10.1), TUBB</i>	30%
Ataxia cerebelar/ Disartria	<i>CASK, EXOSC3, MAST1, TUBA1A, TUBB3 (18.1)</i>	25%
Microcefalia	<i>CASK, EXOSC3, PAFAH1B1 (9.1), TUBA1A, TUBB3 (17.1)</i>	25%
Distúrbios de movimento	<i>ARFGEF2, SCN3A (13.1 e 13.2), TUBB3 (18.1), WDR73</i>	25%
Malformações de outros órgãos e tecidos	<i>L1CAM, MTOR, PAFAH1B1 (9.1), RHOTB2, SCN3A (14.1)</i>	25%
Déficit auditivo neurossensorial	<i>CASK, TUBB3 (17.1)</i>	10%
Distúrbios comportamentais	<i>MTOR, WDR73</i>	10%
Megalencefalia	<i>MTOR</i>	5%
Hidrocefalia	<i>L1CAM</i>	5%

Em relação aos aspectos neurorradiológicos da amostra, foram analisadas e revisadas as alterações presentes na ressonância magnética dos indivíduos. Entre os 20 indivíduos estudados, nove apresentaram malformações do desenvolvimento cerebelar, sendo que, destes, cinco tinham um fenótipo predominante de hipoplasia pontocerebelar. Em quatro sujeitos, foram identificadas variantes em genes classicamente relacionados a hipoplasias pontocerebelares (*CASK*, *EXOSC3*, *RARS2* e *WDR73*). No entanto, em outro caso (9.1), tratava-se de expansão fenotípica, uma vez que a hipoplasia pontocerebelar estava associada a um gene previamente relacionado à lissencefalia tipo 1 (*PAFAH1B1*).

Entre as apresentações clássicas de acordo com a literatura, pode-se ressaltar o caso 11.1, de variante patogênica em *RARS2*, descrita como associada à hipoplasia pontocerebelar tipo 6 (PCH6), em que a neuroimagem revelou hipoplasia cerebelar sem alteração pontina, aspecto comum em pelo menos 52 % dos casos de PCH6 (Jiang et al., 2020). Da mesma forma, no caso 5.1, a variante identificada em *EXOSC3* já havia sido reportada como responsável pela hipoplasia pontocerebelar 1B (PCH1B), com a peculiaridade de se apresentar com hipoplasia cerebelar sem alteração pontina, além de espasticidade e distonia (Biancheri et al. 2013; Rudnik-Schöneborn et al., 2014; Zanni et al, 2013b; Scotton et al., 2013; Eggens et al 2014), exatamente como no referido caso. Os casos relacionados a variantes em *TUBB3* (17.1 e 18.1), em concordância com a literatura (Tischfield et al., 2010; Romaniello et al., 2014), apresentaram fenótipos característicos deste gene, como disgenesias do corpo caloso e alterações visuais, em detrimento de disgirias corticais cerebrais, ausentes em ambos.

Dez dos indivíduos incluídos nesta série (50%) apresentavam defeitos da migração neuronal cerebral e presença de variantes em genes classicamente envolvidos com migração ou citoesqueleto.

Dentre esses, destaca-se um exemplo clássico de tubulinopatia, o caso 15.1 (*TUBA1A*, LIS3), que apresentou paquigiria associada a heterotopia de substância cinzenta subcortical, hipoplasia e displasia cerebelar, alargamento do sistema

ventricular e disgenesia do corpo caloso (Poirier et al., 2007; Jansen et al., 2011), bem como microcefalia e displasia de tronco encefálico, hipocampos e núcleos da base (Schröter et al., 2021), conforme documentado na literatura científica. Trata-se de uma correlação genótipo-fenótipo bem estabelecida de lissencefalia, envolvendo gene codificante de uma tubulina, integrante do citoesqueleto, em que há superposição de defeitos do desenvolvimento cerebelar e de migração neuronal cerebral. Evidencia-se, assim, a estreita correlação entre essas condições, que derivam de mecanismos moleculares comuns.

Um caso emblemático de expansão fenotípica, entre os distúrbios de migração neuronal cerebral, foi o do indivíduo 2.1, que apresentava polimicrogiria, grave atraso do DNPM e epilepsia refratária, em que se identificou variante *de novo* em *ATP1A3*, um gene que previamente havia sido associado à hemiplegia alternante da infância 2 (OMIM # 614820), à distonia 12 (OMIM # 128235) e à síndrome CAPOS (OMIM # 601338). O relato (Monteiro et al., 2020) de variantes bialélicas em *ATP1A2*, que codifica outra subunidade da mesma proteína, associadas a malformações corticais, reforçou a hipótese da relação desta variante com o fenótipo de polimicrogiria. Na época que o sequenciamento do exoma foi concluído, no entanto, este fenótipo não havia sido descrito, o que veio a ocorrer em 2021, quando Miyatake et al. publicaram uma série de 8 pacientes com polimicrogiria, epilepsia e retardo do DNPM/deficiência intelectual associados a variante patogênica *de novo* em *ATP1A3*, confirmada por estudo funcional. Esta expansão fenotípica foi denominada encefalopatia epiléptica e do desenvolvimento 99 (DEE99, OMIM # 619606).

Em outro caso, não havia, no momento do sequenciamento do exoma, dados que permitissem relacionar a clínica com o achado genético de variante em *RHOBTB2*, porém, com a atualização do conhecimento científico e revisão do exame à luz dos novos registros na literatura médica (Straub et al., 2018), tornou-se possível estabelecer o diagnóstico de encefalopatia epiléptica e do desenvolvimento 64 (DEE64, OMIM # 618004). Os principais achados em neuroimagem estão resumidos na Tabela 7.

Tabela 7 - Alterações estruturais encontradas na neuroimagem

NEUROIMAGEM	GENE (CASO)	FREQUÊNCIA
DISTÚRBIOS DE MIGRAÇÃO NEURONAL CORTICAL		
Polimicrogiria	<i>ATP1A3, MTOR, RHOBTB2, SCN3A (13.1), SCN3A (13.2), SCN3A (14.1)</i>	30%
Lissencefalias / Paquigirias	<i>DYNC1H1, PFAH1B1 (10.1), SCN3A (13.1), SCN3A (13.2), SCN3A (14.1), TUBA1A</i>	30%
Heterotopia nodular subependimária	<i>ARFGEF2, MTOR, TUBA1A</i>	15%
DISTÚRBIOS DO DESENVOLVIMENTO CEREBELAR		
Hipoplasia/Displasia cerebelar	<i>EXOSC3, RARS2, TUBA1A, TUBB3 (17.1, 18.1)</i>	25%
Hipoplasia pontocerebelar	<i>CASK, PFAH1B1 (9.1), RHOBTB2, TUBB3 (18.1), WDR73</i>	25%
OUTRAS MALFORMAÇÕES ENCEFÁLICAS		
Disgenesias (Afilamento / espessamento) de corpo caloso	<i>MAST1, MTOR, PFAH1B1 (9.1), RHOBTB2, SCN3A (13.1), SCN3A (13.2), SCN3A (14.1), TUBA1A, TUBB3 (17.1), TUBB3 (18.1)</i>	50%
Colpocefalia/ Alargamento do sistema ventricular	<i>ATP1A3, DYNC1H1, L1CAM, MAST1, RHOBTB2, SCN3A (13.1), SCN3A (13.2), TUBA1A, TUBB3 (18.1)</i>	45%
Alteração de sinal em substância branca	<i>ARFGEF2, PFAH1B1 (9.1), PFAH1B1 (10.1), SCN3A (13.1), TUBB3 (17.1), TUBB3 (18.1)</i>	30%
Alterações em núcleos da base	<i>ARFGEF2, MAST1, MTOR, TUBA1A, TUBB, TUBB3 (18.1)</i>	30%
Má rotação / alteração de sinal hipocampal	<i>ARFGEF2, ATP1A3, MAST1, RHOBTB2, TUBA1A, TUBB3 (18.1)</i>	30%
Outras malformações de tronco encefálico	<i>L1CAM, RHOBTB2, TUBA1A, TUBB3 (18.1)</i>	20%

As variantes descritas no laudo dos exames foram pesquisadas em banco de dados populacionais (GnomAD v2.1.1), repositório de variantes (ClinVar) e na literatura médica (pubmed.ncbi.nlm.nih.gov).

Foram identificadas 16 variantes do tipo *missense*, sendo uma delas recorrente em dois irmãos, três variantes do tipo *frameshift*, uma *nonsense* e uma em sítio de *splicing*. Das 21 variantes identificadas, 20 puderam ser classificadas, de acordo com os critérios do American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG), em patogênica ou provavelmente patogênica (Richards et al., 2015). Uma variante permaneceu classificada como sendo de significado clínico incerto (VUS) pela impossibilidade de se realizar estudo de segregação. Tratava-se do caso com duas variantes identificadas em *RARS2*, uma das quais patogênica, e clínica compatível com hipoplasia pontocerebelar.

O padrão de herança mais frequentemente identificado foi autossômico dominante, decorrente de variantes que estavam ausentes do material genético somático dos genitores e que ocorreram como um evento presuntivamente *de novo*. Este mecanismo foi observado em 12 pacientes (60%), pertencentes a 12 famílias.

Em uma família, em que dois irmãos compartilhavam a mesma variante em *SCN3A*, a sua pesquisa nos genitores foi negativa, tanto por sequenciamento pelo método Sanger como por sequenciamento de nova geração, o que sugere fortemente a existência de mosaicismos em células germinativas em um dos genitores. Este achado, embora incomum, já foi reportado previamente em outras condições (Frisk et al., 2022) e não tem como ser antecipado, devendo sempre ser considerado no aconselhamento genético de condições geneticamente determinadas decorrentes de variantes patogênicas presuntivamente *de novo*.

Em outro caso, com variante patogênica em *MTOR*, houve suspeita de haver um mosaicismos somático, pós-zigótico, uma vez que havia um desbalanço alélico, com presença da variante patogênica em 30% das leituras. No entanto, isto não pode ser comprovado, pois apenas uma amostra de swab bucal foi analisada e desbalanços alélicos podem ocorrer no sequenciamento de nova geração sem que

isto seja decorrente de mosaicismo.

Foram incluídos neste estudo dois casos que, apesar de não apresentarem anomalias clássicas do desenvolvimento cerebelar ou cortical, apresentaram variantes em genes codificantes de proteínas do citoesqueleto, envolvidas com a migração neuronal, e fenótipo compatível. São esses o caso 6.1, em que, apesar de malformação localizada em mesencéfalo, foi identificada variante em *L1CAM*, gene diretamente relacionado à migração neuronal, inclusive em córtex cerebral e cerebelar, tendo sido associado a hipoplasia cerebelar em estudo funcional em murinos (Itoh et al., 2015); e o caso 16.1, com hipoplasia pontina, fusão de núcleos da base, assimetria de hemisférios cerebrais e tronco, em que foi identificada, em *TUBB*, uma variante recentemente descrita como associada a disgenesia cerebelar e fusão de núcleos da base (Sferra et al., 2020) .

Em 4 sujeitos, ou 20% da amostra, foi identificado o padrão de herança autossômico recessivo, estando a variante em homozigose em dois indivíduos (pacientes 5.1 e 19.1) e em heterozigose em dois outros (pacientes 1.1 e 11.1). No paciente 1.1, identificou-se duas variantes patogênicas em *ARFGEF2*, porém não foi possível confirmar a fase das variantes; no entanto, tendo em vista o quadro clínico, é elevada a probabilidade de se tratar de uma heterozigose composta. Já a paciente 11.1 herdou duas variantes em *RARS2*, sendo uma definitivamente patogênica e outra classificada como de significado incerto, tratando-se também de uma provável heterozigose composta.

Dois indivíduos (10% da amostra) apresentaram padrão de herança ligado ao cromossomo X: a paciente 3.1, com variante patogênica em *CASK*, que ocorreu como um evento mutacional *de novo*, e o paciente com variante patogênica em *L1CAM*, herdada de sua genitora, portadora assintomática desta variante.

É de se notar a elevada frequência de variantes presuntivamente *de novo* identificadas nesta amostra (13/20 ou 65%), tanto com padrão de herança autossômica dominante, observada em 12 sujeitos, como de herança dominante ligada ao X, em outro (caso 3.1). Nos irmãos 13.1 e 13.2, o provável mecanismo

responsável pela recorrência da mesma variante em *SCN3A* é a existência de mosaicismo gonadal em um dos genitores, uma vez que a variante estava ausente de DNA extraído tanto de sangue como de swab bucal dos genitores. A suspeita de haver mosaicismo somático no caso 8.1 não pode ser comprovada.

Dos 16 genes identificados neste estudo como responsáveis pelo fenótipo de malformações encefálicas, 31,2% codificam proteínas relacionadas ao citoesqueleto, sendo que 3 (18,7% do total) codificam subunidades das tubulinas (*TUBB*, *TUBB3*, *TUBA1A*), proteínas que constituem os microtúbulos, em suas isoformas mais comuns (alfa e beta), e fazem parte do grupo de doenças conhecido como tubulinopatias. Essas últimas apresentam um padrão fenotípico sugestivo, porém não específico, não sendo possível inferir seu diagnóstico sem o sequenciamento do exoma.

Dois genes (12,5%) identificados codificam proteínas de sinalização. Na membrana celular, há proteínas codificadas por outros dois genes descritos neste estudo que participam do transporte transmembrana e um terceiro relacionado a um canal iônico de voltagem-dependente. Os produtos proteicos dos demais genes localizam-se na membrana citoplasmática, em organelas (mitocôndrias), na matriz extracelular ou como integrantes de um complexo responsável pelo processamento do RNA humano, o exossoma, como vemos na Tabela 8.

Tabela 8 - Função principal do produto dos genes identificados neste estudo

GENE	FUNÇÃO
<i>ARFGEF2</i>	Transporte vesicular no complexo de Golgi
<i>ATP1A3</i>	Transporte na transmembrana citoplasmática
<i>CASK</i>	Organização sináptica
<i>DYNC1H1</i>	Transporte axoplasmático
<i>EXOSC3</i>	Processamento de RNA
<i>L1CAM</i>	Migração e diferenciação neuronal
<i>MAST1</i>	Citoesqueleto
<i>MTOR</i>	Controle da proliferação celular
<i>PAFAH1B1</i>	Constituinte da matriz extracelular
<i>RARS2</i>	Síntese proteica mitocondrial
<i>RHOBTB2</i>	Não determinada: possivelmente divisão celular
<i>SCN3A</i>	Canal iônico voltagem-dependente
<i>TUBA1A</i>	Citoesqueleto
<i>TUBB</i>	Citoesqueleto
<i>TUBB3</i>	Citoesqueleto
<i>WDR73</i>	Citoesqueleto

Ressalta-se a vasta heterogeneidade genética identificada em fenótipos semelhantes, bem como a grande variabilidade fenotípica entre indivíduos com variantes no mesmo gene, tendo sido identificado o fenômeno de expansão fenotípica em três casos: o da hipoplasia pontocerebelar sem defeito de migração neuronal cortical associado, no sujeito 9.1, com variante em *PAFAH1B1*, clássico responsável pelo fenótipo de lissencefalias; o caso da encefalopatia epiléptica e do

desenvolvimento relacionada ao gene *RHOBTB2*, em que a correlação genótipo-fenótipo foi estabelecida seis anos após o primeiro sequenciamento do exoma, pela descrição na literatura médica (Straub et al., 2018); e no caso da polimicrogiria associada a variante patogênica em *ATP1A3*, somente descrita na literatura médica em um momento posterior (Miyatake et al., 2021).

Ainda nos casos de neuroimagem característica, como na Síndrome do mega corpo caloso com hipoplasia cerebelar e malformações corticais, não é possível afirmar com certeza que o gene identificado seja o único responsável pelo fenótipo. O mesmo ocorre com os irmãos (casos 13.1 e 13.2) com encefalopatia epiléptica e do desenvolvimento tipo 62, quadro clássico relacionado ao *SCN3A* na literatura médica, porém, com algumas características fenotípicas divergentes da mesma, como a presença de distúrbios de movimento.

A presente série de casos evidenciou a importância de se utilizar técnicas abrangentes de investigação genômica, tal como o sequenciamento completo do exoma. Painéis genéticos, que incluem somente os genes conhecidos em um determinado momento para uma condição clínica, tornam-se rapidamente obsoletos, pela expansão do fenótipo em questão para genes previamente não incluídos no painel. Da mesma forma, a realização do chamado exoma clínico, que rastreia um número limitado de genes para os quais hoje se conhece atualmente algum fenótipo, impossibilita a investigação no futuro de genes que vierem a ter uma associação fenotípica. Esta possibilidade de revisão do sequenciamento do exoma à luz de novos conhecimentos científicos foi evidente no caso 12.1, que apresentou variante em *RHOBTB2*, gene que não estava associado a algum fenótipo por ocasião da primeira interpretação do sequenciamento do exoma, que desta forma foi inconclusiva.

Todas as considerações supracitadas permitem inferir o papel fundamental do sequenciamento completo do exoma nas malformações do desenvolvimento cerebelar e cerebral, devido à vasta complexidade dos mecanismos envolvidos em sua patogênese, com uma extensa variabilidade de genótipos possíveis. Estes se

encontram em constante expansão fenotípica, à medida em que novas variantes são identificadas e reportadas na literatura, suscitando novos estudos funcionais, bem como descrições de séries de casos como esta ora apresentada.

7 Conclusões

A partir dos resultados do presente estudo, foi possível concluir que:

- 1) O sequenciamento completo do exoma tem papel fundamental no esclarecimento etiológico dos defeitos do desenvolvimento cerebelar e da migração neuronal cerebral, nas quais, devido à complexidade dos mecanismos moleculares e à heterogeneidade fenotípica, tornam-se limitados os métodos de estudo genético mais direcionado.
- 2) As malformações do desenvolvimento cerebelar e cortical cerebral exibem aspectos clínicos em comum, porém não específicos, como atraso neuropsicomotor, hipotonia muscular e epilepsia refratária, bem como padrões radiológicos sugestivos, porém não suficientes para o estabelecimento de relações genótipo-fenótipo definidas, as quais dependem de estudo genético abrangente.
- 3) Os distúrbios do desenvolvimento cerebelar e da migração neuronal cerebral constituem um grupo de malformações encefálicas em constante expansão fenotípica. Geneticamente, na amostra contemplada neste estudo, mostrou-se prioritariamente originado a partir de eventos mutacionais *de novo*, de herança autossômica dominante, que geraram variantes patogênicas, em sua maioria, do tipo *missense*.

8 Anexos

Anexo A - Subtipos de Hipoplasias Pontocerebelares

Subtipos de PCH e seus respectivos genes

PCH	GENE	OMIM (*)	OMIM (#)
1A	<i>VRK1</i>	602168	607596
1B	<i>EXOSC3</i>	606489	614678
1C	<i>EXOSC8</i>	606019	(616081)
1D	<i>EXOSC9</i>	606180	618065
1E	<i>SLC25A46</i>	610826	619303
1F	<i>EXOSC1</i>	606493	619304
2A	<i>TSEN54</i>	608755	277470
2B	<i>TSEN2</i>	608753	612389
2C	<i>TSEN34</i>	608754	612390
2D	<i>SEPSECS</i>	613009	613811
3	<i>PCLO</i>	604918	608027
4	<i>TSEN54</i>	608755	225753
5	<i>TSEN54</i>	608755	610204
6	<i>RARS2</i>	611524	611523
7	<i>TOE1</i>	613931	614969
8	<i>CHMP1A</i>	164010	614961
9	<i>AMPD2</i>	102771	615809
10	<i>CLP1</i>	608757	615803
11	<i>TBC1D23</i>	617687	617695
12	<i>COASY</i>	609855	618266
13	<i>VPS51</i>	615738	618606
14	<i>PPIL1</i>	601301	619301
15	<i>CDC40</i>	605585	619302
16	<i>MINPP1</i>	605391	619527

Anexo B - Classificação Genética e Embrionária das malformações do rombencéfalo/mesencéfalo (Adaptada de Barkovich, 2009)

I. Malformações secundárias aos defeitos de padronização anteroposterior precoce dorsoventral, ou de desdiferenciação das zonas terminais mesencéfalo-rombencefálicas

A. Defeitos de padronização anteroposterior

1. Ganho, perda ou transformação do diencéfalo e mesencéfalo
2. Ganho, perda ou transformação do mesencéfalo e rombômero 1
3. Ganho, perda ou transformação das estruturas inferiores do rombencéfalo.

B. Defeitos de padronização dorsoventral

1. Defeitos das zonas ventriculares alar e basal
2. Defeitos das zonas ventriculares alares
3. Defeitos das zonas ventriculares basais

II. Malformações associadas com transtornos generalizados do desenvolvimento mais tardios, que afetam significativamente o tronco encefálico e o cerebelo (com patogênese ao menos parcialmente conhecida)

- A. Encefalopatias do neurodesenvolvimento associadas a malformações do mesencéfalo e rombencéfalo
- B. Defeitos de sinalização mesenquimal-neuroepitelial associados com malformações do mesencéfalo e rombencéfalo
- C. Malformações da proliferação neuronal e glial que afetam predominantemente o tronco encefálico e o cerebelo.
- D. Malformações da migração neuronal que afetam predominantemente o tronco encefálico e o cerebelo
 1. Lissencefalia com hipoplasia cerebelar
 2. Heterotopia Neuronal com hipoplasia prominente de tronco encefálico e cerebelar
 3. Polimicrogiria com hipoplasia cerebelar
 4. Malformações com membrana basal e distúrbios de migração neuronal
- E. Displasias difusas tipo Dente Molar associadas a defeitos nas proteínas ciliares

1. Síndromes que afetam o cérebro com baixa frequência de envolvimento da retina e dos rins
2. Síndromes que afetam o cérebro, olhos, rins, fígado e diversos outros sistemas,

III. Malformações cerebrais localizadas que afetam o tronco encefálico e o cerebelo

(patogênese parcial ou amplamente conhecida, incluindo proliferação local, especificação, migração, e direcionamento axonal)

- A. Malformações de múltiplos níveis do rombencéfalo
- B. Malformações do mesencéfalo
- C. Malformações do rombômero 1 incluindo malformações cerebelares
- D. Malformações da ponte
- E. Malformações do bulbo

IV. Hipoplasia e atrofia combinadas em distúrbios degenerativos de início pré-natal

- A. Hipoplasia pontocerebelar
- B. Malformações do rombencéfalo com distúrbios congênitos da glicosilação
- C. Outros distúrbios metabólicos com atrofia ou hipoplasia cerebelar ou do tronco encefálico
- D. Hipoplasia hemisférica cerebelar (rara, mais comumente adquirida do que genética, frequentemente associada a malformação cortical ou das fissuras)

Anexo C - Aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo



APROVAÇÃO

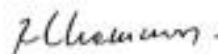
O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10/06/2015, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 231/15 intitulado: "SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO EXOMA NO DIAGNÓSTICO DE DEFEITOS DO DESENVOLVIMENTO CEREBELAR E DA MIGRAÇÃO NEURONAL CEREBRAL" apresentado pelo Departamento de NEUROLOGIA

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Fernando Kok

Pesquisador (a) Executante: Katiane Sayão Souza Cabral

CEP-FMUSP, 10 de Junho de 2015.



Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : **SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO EXOMA NO DIAGNÓSTICO DE DEFEITOS DO DESENVOLVIMENTO CEREBELAR E DA MIGRAÇÃO NEURONAL CEREBRAL.**

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: **Prof.Dr. Fernando Kok**

CARGO/FUNÇÃO: Médico Supervisor INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 32.255

PESQUISADOR EXECUTANTE: **Katiane Sayão Souza Cabral**

CARGO/FUNÇÃO: Médico INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 167680 (CREMESP)

UNIDADE DO HCFMUSP: Neurologia Clínica – Divisão de Clínica Neurológica

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : **4 anos**

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

2

1 – Estamos fornecendo estas informações com o intuito de solicitar que o senhor(a) ou seu dependente participe voluntariamente de um estudo descritivo que visa melhorar o entendimento de um grupo de doenças que se caracterizam por defeitos na formação do cerebelo ou na migração de neurônios durante a formação do cérebro. O objetivo do estudo é investigar as manifestações clínicas e de imagem do cérebro e cerebelo nesse grupo de doenças e estudar quais mutações genéticas podem levar a essas malformações .

2 – Não serão realizados, a princípio, novos exames além dos já realizados; será estudado o resultado do exame chamado sequenciamento completo do exoma, que foi realizado no laboratório Mendelics Análise Genômica.

3 – Para estudar as manifestações clínicas, a médica coletará informações a respeito da história da doença e fará perguntas além de examinar o paciente cuidadosamente, como é feito habitualmente em consultas médicas, mas com especial atenção à parte neurológica.
Os exames clínicos realizados preferencialmente no Hospital das Clínicas com horário previamente marcado.

4 – Não haverá desconforto físico ou risco para o paciente durante a execução do estudo, pois não se submeterá o paciente a nenhum procedimento invasivo nem a um novo exame.

5 – Não haverá inicialmente nenhum benefício direto para o (a) senhor(a). Como vantagem, terá acesso a uma reavaliação através de exame físico médico e a uma revisão de todos os exames realizados. A possibilidade de se conhecer melhor as correlações existentes entre os sintomas apresentados, as malformações encontradas e as mutações genéticas diagnosticadas pelo exame e, possivelmente, até mesmo de se sugerir novas correlações, poderá ter implicações futuras, uma vez que as malformações estudadas nesta investigação, tendo sua origem genética identificada, apresentam risco de se repetir na família. Para a comunidade científica, a produção e divulgação do conhecimento proposto neste trabalho facilita a suspeita precoce e a correta investigação das malformações congênitas estudadas, permitindo o adequado aconselhamento genético como forma de prevenção de novos casos dos eventos estudados, bem como criando um banco de dados para possíveis futuras intervenções genéticas que venham a ser desenvolvidas para esse grupo de malformações congênitas do sistema nervoso central.

6 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os principais investigadores são Prof.Dr. Fernando Kok / Dra. Katiane Sayão Souza Cabral, que podem ser encontrados na Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, 5º. Andar, Divisão de Clínica Neurológica - Cerqueira César – 05403-000, Telefone(s): (11)99828-1446, (11) 3069-6401 .

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP - FMUSP) – Rua Dr Arnaldo, 251 – Cerqueira César – São Paulo – SP – 21º andar – sala 36- CEP: 01246-000 – tel: 3893-4401/4407 – E-mail: cep.fm@usp.br

7 – É garantida a liberdade, a qualquer momento, da retirada deste consentimento e da saída do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do tratamento na Instituição;

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____
Rubrica do pesquisador _____

9 Referências

Appelhof B, Wagner M, Hoefele J, Heinze A, Roser T, Koch-Hogrebe M, et al. Pontocerebellar hypoplasia due to bi-allelic variants in MINPP1. *Eur J Hum Genet*. 2021 Mar;29(3):411-421. doi: 10.1038/s41431-020-00749-x. Epub 2020 Nov 9.

Astick M, Vanderhaeghen P. From human pluripotent stem cells to cortical circuits. *Curr Top Dev Biol* 2018; 129: 67–98.

Bahi-Buisson N, Poirier K, Boddaert N, Fallet-Bianco C, Specchio N, Bertini E, et al. GPR56-related bilateral frontoparietal polymicrogyria: further evidence for an overlap with the cobblestone complex. *Brain*. 2010;133(11):3194–209.

Bahi-Buisson N, Poirier K, Fourniol F, Saillour Y, Valence S, Lebrun N, et al. The wide spectrum of tubulinopathies: what are the key features for the diagnosis? *Brain*. 2014;137(Pt 6):1676–700.

Bardón-Cancho EJ, Muñoz-Jiménez L, Vázquez-López M, Ruíz-Martín Y, García-Morín M, Barredo-Valderrama E. Periventricular nodular heterotopia and dystonia due to an ARFGEF2 mutation. *Pediatr Neurol*. 2014 Sep;51(3):461-4. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2014.05.008. Epub 2014 May 15.

Barkovich AJ, Dobyns WB, Guerrini R. Malformations of cortical development and epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015 May 1;5(5):a022392. doi: 10.1101/cshperspect.a022392.

Barkovich AJ, Guerrini R, Kuzniecky RI, Jackson GD, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. *Brain* 2012; 135: 1348–69.

Barkovich AJ, Kuzniecky R, Jackson GD, Guerrini R, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for malformations of malformations of cortical development. *Neurology* 2005; 65: 1873–87.

Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Dobyns WB, Jackson GD, Becker LE, Evrard P. A classification scheme for malformations of cortical development. *Neuropediatrics* 1996; 27: 59–63.

Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Jackson GD, Guerrini R, Dobyns WB. Classification system for malformations of cortical development: update 2001. *Neurology* 2001; 57: 2168–78.

Barkovich AJ, Millen KJ, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for midbrain-hindbrain malformations. *Brain* 2009; 132: 3199–3230 (Barkovich AJ, Millen KJ, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for midbrain-hindbrain malformations. *Brain*. 2009 Dec;132(Pt 12):3199-230.

Barkovich J. Complication begets clarification in classification. *Brain* 2013; 136: 368–73.

Bertholdo D, de Carvalho Neto A, Castillo M. Posterior fossa malformation associated with cerebral anomalies: genetic and imaging features. *Top Magn Reson Imaging*. 2011 Dec;22(6):295-302.

Biancheri R, Cassandrini D, Pinto F, Trovato R, Di Rocco M, Mirabelli-Badenier M, et al. EXOSC3 mutations in isolated cerebellar hypoplasia and spinal anterior horn involvement. *J Neurol*. 2013 Jul;260(7):1866-70. doi: 10.1007/s00415-013-6896-0. Epub 2013 Apr 7.

Bierhals T, Korenke GC, Uyanik G, Kutsche K. Pontocerebellar hypoplasia type 2 and TSEN2: review of the literature and two novel mutations. *Eur J Med Genet*. 2013 Jun;56(6):325-30.

Brock S, Cools F, Jansen AC. Neuropathology of genetically defined malformations of cortical development—A systematic literature review. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2021;00:1–18.

Brock S, Dobyns WB, Jansen A. *PAFAH1B1*-Related Lissencephaly/Subcortical Band Heterotopia. 2009 Mar 3 [updated 2021 Mar 25]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Mirzaa GM, Amemiya A, editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2022.

Budday S, Steinmann P, Kuhl E. Physical biology of human brain development. *Front Cell Neurosci* 2015; 9: 257.

Budde BS, et al. tRNA splicing endonuclease mutations cause pontocerebellar hypoplasia. *Nat Genet*. 2008^[1]_{SEP};40(9):1113-8.

Bystron I, Blakemore C, Rakic P. Development of the human cerebral cortex: boulder Committee revisited. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 110–22.

Cabral KSS, Inuzuka LM, Lucato LT, Kok F. Pontocerebellar Hypoplasia Caused by De novo Mutation in *PAFAH1B1* (*LIS1*) Gene. *Biomed J Sci & Tech Res* 40(3)-2021. BJSTR. MS.ID.006443. doi: 10.26717/BJSTR.2021.40.006443

Chu J, Anderson SA. Development of cortical interneurons. *Neuropsychopharmacol* 2015; 40: 16–23.

Cook CB, Armstrong L, Boerkoel CF, Clarke LA, du Souich C, Demos MK, et al. Somatic mosaicism detected by genome-wide sequencing in 500 parent-child trios with suspected genetic disease: clinical and genetic counseling implications. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*. 2021 Dec 9;7(6):a006125. doi: 10.1101/mcs.a006125.

Cooper JA. Molecules and mechanisms that regulate multipolar migration in the intermediate zone. *Front Cell Neurosci* 2014; 8: 386.

Correa GG, Amaral LF, Vedolin LM. Neuroimaging of Dandy-Walker malformation: new concepts. *Top Magn Reson Imaging*. 2011 Dec;22(6):303-12. doi: 10.1097/RMR.0b013e3182a2ca77.

Cotes C, Bonfante E, Lazor J, Jadhav S, Caldas M, Swischuk L et al. Congenital basis of posterior fossa anomalies. *Neuroradiol J*. 2015 Jun;28(3):238-53.

DATASUS. www2.datasus.gov.br/DATASUS (acesso em 15/01/2022)

Demos M, Guella I, DeGuzman C, McKenzie MB, Buerki SE, Evans DM, et al. Diagnostic Yield and Treatment Impact of Targeted Exome Sequencing in Early-Onset Epilepsy. *Front Neurol*. 2019 May 21;10:434.

Desikan RS, Barkovich AJ. Malformations of cortical development. *Ann Neurol* 2016; 80: 797–810.

Di Donato N, Chiari S, Mirzaa GM, Aldinger K, Parrini E, Olds C, et al. Lissencephaly: expanded imaging and clinical classification. *Am J Med Genet A* 2017; 173: 1473–88.

Di Donato N, Timms AE, Aldinger KA, Mirzaa GM, Bennett JT, Collins S, et al. Analysis of 17 genes detects mutations in 81% of 811 patients with lissencephaly. *Genet Med* 2018; 20: 1354–64.

Eggens VR, Barth PG, Niermeijer JM, Berg JN, Darin N, Dixit A, et al. EXOSC3 mutations in pontocerebellar hypoplasia type 1: novel mutations and genotype-phenotype correlations. *Orphanet J Rare Dis*. 2014 Feb 13;9:23. doi: 10.1186/1750-1172-9-23.

Fallet-Bianco et al. Mutations in tubulin genes are frequent causes of various foetal malformations of cortical development including microlissencephaly. *Acta Neuropathologica Communications* 2014 2:69.

Fourniol F, Perderiset M, Houdusse A, Moores C. Methods in Cell Biology. Volume 115, 2013, Pages 27-48. Microtubules, in Vitro Chapter 3 - Structural Studies of the Doublecortin Family of MAPs.

Frisk S, Wachtmeister A, Laurell T, Lindstrand A, Jääntti N, Malmgren H, et al.. Detection of germline mosaicism in fathers of children with intellectual disability

syndromes caused by de novo variants. *Mol Genet Genomic Med*. 2022 Feb 4:e1880. doi: 10.1002/mgg3.1880. Epub ahead of print.

Gordo G, Tenorio J, Arias P, Santos-Simarro F, García-Miñaur S, Moreno JC, et al. mTOR mutations in Smith-Kingsmore syndrome: Four additional patients and a review. *Clin Genet*. 2018 Apr;93(4):762-775. doi: 10.1111/cge.13135. Epub 2018 Feb 13.

Hayashi S, Uehara DT, Tanimoto K, Mizuno S, Chinen Y, Fukumura S, et al. (2017) Comprehensive investigation of CASK mutations and other genetic etiologies in 41 patients with intellectual disability and microcephaly with pontine and cerebellar hypoplasia (MICPCH). *PLoS ONE* 12 (8): e0181791.

Inuzuka LM, Macedo-Souza LI, Della-Ripa B, Cabral KSS, Monteiro F, Kitajima JP, de Souza Godoy LF, de Souza Delgado D, Kok F, Garzon E. Neurodevelopmental disorder associated with de novo SCN3A pathogenic variants: two new cases and review of the literature. *Brain Dev*. 2020 Feb;42(2):211-216. doi: 10.1016/j.braindev.2019.09.004. Epub 2019 Oct 31. Erratum in: *Brain Dev*. 2021 May;43(5):671.

Inuzuka LM, Macedo-Souza LI, Guerra-Peixe M, Cobas Pedreira C, Della-Ripa B, Souza Delgado D, Monteiro F, Kitajima JP, Garzon E, Kok F. Parental germline mosaicism in SCN3A-related severe developmental disorder. *Brain Dev*. 2021 May;43(5):669-670.

Itoh K, Fushiki S. The role of L1cam in murine corticogenesis, and the pathogenesis of hydrocephalus. *Pathol Int*. 2015 Feb;65(2):58-66.

Jansen AC, Oostra A, Desprechins B, De Vlaeminck Y, Verhelst H, Régál L, Verloof P, Bockaert N, Keymolen K, Seneca S, De Meirleir L, Lissens W. TUBA1A mutations: from isolated lissencephaly to familial polymicrogyria. *Neurology*. 2011 Mar 15;76(11):988-92. doi: 10.1212/WNL.0b013e31821043f5.

Jansen AC, Robitaille Y, Honavar M, Mullatti N, Leventer RJ, Andermann E, et al. The histopathology of polymicrogyria: a series of 71 brain autopsy studies. *Dev Med Child Neurol* 2016; 58:39–48.

Jayakody H, Zarei S, Nguyen H, Dalton J, Chen K, Hudgins L, et al. Cobblestone Malformation in LAMA2 Congenital Muscular Dystrophy (MDC1A). *J Neuropathol Exp Neurol*. 2020 Sep 1;79(9):998-1010. doi: 10.1093/jnen/nlaa062.

Jiang HF, Deng J, Fang F, Li H, Wang XH, Dai LF. [Early onset epileptic encephalopathy caused by mitochondrial arginyl-tRNA synthetase gene deficiency: report of two cases and literature review]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2020 Nov 2;58(11):893-899. Chinese. doi: 10.3760/cma.j.cn112140-20200716-00729.

Karaca E, Harel T, Pehlivan D, Jhangiani SN, Gambin T, Coban Akdemir Z, et al. Genes that Affect Brain Structure and Function Identified by Rare Variant Analyses of Mendelian Neurologic Disease. *Neuron*. 2015 Nov 4;88(3):499-513. doi: 10.1016/j.neuron.2015.09.048.

Kim Y, Kim SH. WD40-Repeat Proteins in Ciliopathies and Congenital Disorders of Endocrine System. *Endocrinol Metab* (Seoul). 2020 Sep;35(3):494-506. doi: 10.3803/EnM.2020.302. Epub 2020 Sep 8.

Kong W, Wang X, Zhao J, Kang M, Xi N, Li S. A new frameshift mutation in L1CAM producing X-linked hydrocephalus. *Mol Genet Genomic Med*. 2020 Jan;8(1):e1031. doi: 10.1002/mgg3.1031. Epub 2019 Nov 22.

Le Duc D, Horn S, Jamra RA, Schaper J, Wieczorek D, Redler S. Novel EXOSC3 pathogenic variant results in a mild course of neurologic disease with cerebellum involvement. *Eur J Med Genet*. 2020 Feb;63(2):103649. doi: 10.1016/j.ejmg.2019.04.006. Epub 2019 Apr 12.

Lindsay F, Anderson I, Wentzensen IM, Suhrbier D, Stevens CA. Genetic evaluation including exome sequencing of two patients with Gomez-Lopez-Hernandez syndrome: Case reports and review of the literature. *Am J Med Genet A*. 2020 Apr;182(4):623-627. doi: 10.1002/ajmg.a.61496. Epub 2020 Jan 31.

Liu JS. Molecular genetics of neuronal migration disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2011 Apr;11(2):171-8. doi:10.1007/s11910-010-0176-5.

Liu L, Oza S, Hogan D, Chu Y, Perin J, Zhu J, et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet*. 2016 Dec 17;388(10063):3027-3035. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31593-8. Epub 2016 Nov 11. Erratum in: *Lancet*. 2017 May 13;389(10082):1884.

Lo Nigro C, Chong CS, Smith AC, Dobyns WB, Carrozzo R, Ledbetter DH. Point mutations and an intragenic deletion in LIS1, the lissencephaly causative gene in isolated lissencephaly sequence and Miller-Dieker syndrome. *Hum Mol Genet*. 1997 Feb;6(2):157-64. doi: 10.1093/hmg/6.2.157.

Maricich SM, Aqeeb KA, Moayed Y, Mathes EL, Patel MS, Chitayat D, et al. Pontocerebellar hypoplasia: review of classification and genetics, and exclusion of several genes known to be important for cerebellar development. *J Child Neurol*. 2011 Mar;26(3):288-94.

Mefford HC. Mosaicism in clinical genetics. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*. 2021 Dec 9;7(6):a006162. doi: 10.1101/mcs.a006162.

Miyatake S, Mitsuhiro KM, Kumamoto T, Hirose T, Koshimizu E, Matsui T, et al. De novo ATP1A3 variants cause polymicrogyria. *Sci Adv*. 2021; 7 : eabd2368

Monteiro FP, Curry CJ, Hevner R, Elliott S, Fisher JH, Turocy J, et al. Biallelic loss of function variants in ATP1A2 cause hydrops fetalis, microcephaly, arthrogryposis and extensive cortical malformations. *Eur J Med Genet.* 2020 Jan;63(1):103624. doi: 10.1016/j.ejmg.2019.01.014. Epub 2019 Jan 25.

Moog U, Kutsche K, Kortum F, Chilian B, Bierhals T, Apeshiotis N, et al.. Phenotypic spectrum associated with CASK loss-of-function mutations. *J. Med. Genet.* 48: 741-751, 2011.

Nugent AA, Kolpak AL, Engle EC. Human disorders of axon guidance. *Curr Opin Neurobiol.* 2012;22:837Y843.

Oegema R, Barakat TS, Wilke M, Stouffs K, Amrom D, Aronica E, et al. International consensus recommendations on the diagnostic work-up for malformations of cortical development. *Nat Rev Neurol.* 2020 Nov;16(11):618-635. doi: 10.1038/s41582-020-0395-6. Epub 2020 Sep 7.

Oegema R, Barkovich AJ, Mancini GMS, Guerrini R, Dobyns WB. Subcortical heterotopic gray matter brain malformations: classification study of 107 individuals. *Neurology.* 2019;93:e1360–e1373. doi: 10.1212/WNL.00000000000008200.

OMIM. <https://www.omim.org> (acesso em 22/01/2022)

Parrini E, Conti V, Dobyns WB, Renzo Guerrini R. Genetic Basis of Brain Malformations. *Mol Syndromol* 2016;7:220–233.

Paskulin GA, Lorenzen MB, Rosa RFM, Graziadio C, Zen PRG. Importância da análise cromossômica dos fibroblastos em casos suspeitos de mosaicismo: experiência de um serviço de Genética Clínica. *Rev Paul Pediatr* 2011;29(1):73-9.

Patel S, Barkovich AJ. Analysis and classification of cerebellar malformations. *Am J Neuroradiol* 2002; 23: 1074–1087.

Philbert M, Maillard C, Cavallin M, Goldenberg A, Masson C, Boddaert N, et al. A novel recurrent LIS1 splice site mutation in classic lissencephaly. *Am J Med Genet A.* 2017 Feb;173(2):561-564. doi: 10.1002/ajmg.a.38041. Epub 2016 Nov 27.

Poirier K, Keays DA, Francis F, Saillour Y, Bahi N, Manouvrier S, et al. Large spectrum of lissencephaly and pachygyria phenotypes resulting from de novo missense mutations in tubulin alpha 1A (TUBA1A). *Human Mutation* 2007; 28: 1055–64.

Poirier K, Lebrun N, Broix L, Tian G, Saillour Y, Boscheron C, et al. Mutations in TUBG1, DYNC1H1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly. *Nat Genet.* 2013 Jun;45(6):639-47. doi: 10.1038/ng.2613. Epub 2013 Apr 21. Erratum in: *Nat Genet.* 2013 Aug;45(8):962.

Poretti A, Boltshauser E. Terminology in morphological anomalies of the cerebellum does matter. *Cerebellum Ataxias* 2, 8 (2015). doi.org/10.1186/s40673-015-0027-x

Poretti A, Prayer D, Boltshauser E. Morphological spectrum of prenatal cerebellar disruptions. *Eur J Paediatr Neurol* 2009; 13: 397–407.

Qian Y, Wang H, Jin T, Wang Y, Fang L, Chen Y, Chen L. "A familial late-onset hereditary ataxia mimicking pontocerebellar hypoplasia caused by a novel TSEN54 mutation." *Molecular Medicine Reports Molecular Medicine Reports* 10.3 (2014): 1423-1425.

Radha Rama Devi A, Naushad SM, Lingappa L. Clinical and Molecular Diagnosis of Joubert Syndrome and Related Disorders. *Pediatr Neurol.* 2020 May;106:43-49. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2020.01.012. Epub 2020 Feb 4.

Raybaud C, Widjaja E. Development and Dysgenesis of the Cerebral Cortex: Malformations of Cortical Development. *Neuroimaging Clinics*. Volume 21, Issue 3 , Pages 483-543, August 2011.

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; 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. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5.

Romaniello R, Arrigoni F, Cavallini A, Tenderini E, Baschiroto C, Triulzi F, et al. Brain malformations and mutations in a- and b-tubulin genes: a review of the literature and description of two new cases. *Developmental Medicine & Child Neurology* 2014, 56: 354–360.

Rudnik-Schöneborn S, Barth PG, Zerres K. 2014. Pontocerebellar hypoplasia. *Am J Med Genet Part C* 166C:173–183.

Rüsch CT, Bölsterli BK, Kottke R, Steinfeld R, Boltshauser E. Pontocerebellar Hypoplasia: a Pattern Recognition Approach. *Cerebellum.* 2020 Aug;19(4):569-582. doi: 10.1007/s12311-020-01135-5. PMID: 32410094.

Schottmann G, Picker-Minh S, Schwarz JM, Gill E, Rodenburg RJT, Stenzel W, Kaindl AM, Schuelke M. Recessive mutation in EXOSC3 associates with mitochondrial dysfunction and pontocerebellar hypoplasia. *Mitochondrion.* 2017 Nov;37:46-54. doi: 10.1016/j.mito.2017.06.007. Epub 2017 Jul 4.

Schröter J, Döring JH, Garbade SF, Hoffmann GF, Kölker S, Ries M, Syrbe S. Cross-sectional quantitative analysis of the natural history of TUBA1A and TUBB2B tubulinopathies. *Genet Med.* 2021 Mar;23(3):516-523. doi: 10.1038/s41436-020-01001-z. Epub 2020 Oct 21.

Severino M, Geraldo AF, Utz N, Tortora D, Pogledic I, Klonowski W et col. Definitions and classification of malformations of cortical development: practical guidelines. *Brain* 2020; 143; 2874–2894.

Sferra A, Petrini S, Bellacchio E, Nicita F, Scibelli F, Dentici ML, Alfieri P, Cestra G, Bertini ES, Zanni G. TUBB Variants Underlying Different Phenotypes Result in Altered Vesicle Trafficking and Microtubule Dynamics. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 18;21(4):1385. doi: 10.3390/ijms21041385.

Shimajima et al.: Whole-exome sequencing identifies a de novo TUBA1A mutation in a patient with sporadic malformations of cortical development: a case report. *BMC Research Notes* 2014 7:465.

Snustad, DP, Simmons MJ. Fundamentos de genética. [revisão técnica Cláudia Vitória de Moura Gallo]. Tradução de: Principles of genetics. 7. ed. – Rio de Janeiro Guanabara Koogan, 2017

Sohal AP, Montgomery T, Mitra D, Ramesh V. TUBA1A mutation-associated lissencephaly: case report and review of the literature. *Pediatr Neurol.* 2012 Feb;46(2):127-31.

Squier W, Jansen A. Polymicrogyria: pathology, fetal origins and mechanisms. *Acta Neuropathol Commun* 2014; 2: 80.

Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. *Neuropsychol Rev* 2010;20:237–48.

Stiles, J. The fundamentals of brain development: Integrating nature and nurture. Cambridge: MA, Harvard University Press. (2008).

Stottmann RW, Donlin M, Hafner A, Bernard A, Sinclair DA, Beier DR. A mutation in *Tubb2b*, a human polymicrogyria gene, leads to lethality and abnormal cortical development in the mouse. *Human Molecular Genetics*, Oxford Journals (2013). Volume 22, Issue 20 pp. 4053-4063.

Strachan T, Read AP. Genética molecular humana. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

Straub J et al. Missense Variants in *RHOBTB2* Cause a Developmental and Epileptic Encephalopathy in Humans, and Altered Levels Cause Neurological Defects in *Drosophila*. *Am J Hum Genet.* 2018;102(1):44-57.

Subramanian L, Calcagnotto ME and Paredes MF (2020) Cortical Malformations: Lessons in Human Brain Development. *Front. Cell. Neurosci.* 13:576. doi: 10.3389/fncel.2019.00576

Takanashi J, Okamoto N, Yamamoto Y, Hayashi S, Arai H, Takahashi Y, et al.

Clinical and radiological features of Japanese patients with a severe phenotype due to CASK mutations. *Am J Med Genet A*. 2012 Dec;158A(12):3112-8. doi: 10.1002/ajmg.a.35640. Epub 2012 Nov 19.

Taniguchi-Ikeda M, Koyanagi-Aoi M, Maruyama T, Takaori T, Hosoya A, Tezuka H, et al. Restoration of the defect in radial glial fiber migration and cortical plate organization in a brain organoid model of Fukuyama muscular dystrophy. *iScience*. 2021 Sep 17;24(10):103140. doi: 10.1016/j.isci.2021.103140.

Tanyalçın I, Verhelst H, Halley DJ, Vanderhasselt T, Villard L, Goizet C, et al. Elaborating the phenotypic spectrum associated with mutations in ARFGEF2: case study and literature review. *Eur J Paediatr Neurol*. 2013 Nov;17(6):666-70. doi: 10.1016/j.ejpn.2013.05.002. Epub 2013 Jun 4.

ten Donkelaar H, van der Vliet T. Overview of the Development of the Human Brain and Spinal Cord (2006). ten Donkelaar HJ, Lammens M, Hori A. Clinical Neuroembryology: Development and Developmental Disorders of the Human Central Nervous System Medicine (Springer-11650; ZDB-2-SME).Springer, 2006.

Tischfield MA, et al. Human TUBB3 mutations perturb microtubule dynamics, kinesin interactions, and axon guidance. *Cell*. 2010 Jan 8;140(1):74-87.

Tully HM, Dobyns WB. Infantile hydrocephalus: a review of epidemiology, classification and causes. *Eur J Med Genet*. 2014 Aug;57(8):359-68. doi: 10.1016/j.ejmg.2014.06.002. Epub 2014 Jun 13.

Ucuncu E, Rajamani K, Wilson MSC, et al. MINPP1 prevents intracellular accumulation of the chelator inositol hexakisphosphate and is mutated in Pontocerebellar Hypoplasia. *Nat Commun* 11, 6087 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19919-y>

Vandervore L, Stouffs K, Tanyalçın I, Vanderhasselt T, Roelens F, Holder-Espinasse M, et al. Bi-allelic variants in COL3A1 encoding the ligand to GPR56 are associated with cobblestone-like cortical malformation, white matter changes and cerebellar cysts. *J Med Genet* 2017; 54: 432–40.

Vodopiutz J, Seidl R, Prayer D, Khan MI, Mayr JA, Streubel B, et al. WDR73 Mutations Cause Infantile Neurodegeneration and Variable Glomerular Kidney Disease. *Hum Mutat*. 2015 Nov;36(11):1021-8. doi: 10.1002/humu.22828. Epub 2015 Aug 6.

Wan J, Yourshaw M, Mamsa H, Rudnik-Schöneborn S, Menezes MP, Hong JE, et al. Mutations in the RNA exosome component gene EXOSC3 cause pontocerebellar hypoplasia and spinal motor neuron degeneration. *Nat Genet*. 2012 Apr 29;44(6):704-8.

Wang R, Chen H, Wang X, Huang S, Xie A, Wu X. Prenatal diagnosis of a nonsense

mutation in the L1CAM gene resulting in congenital hydrocephalus: A case report and literature review. *Exp Ther Med.* 2021 Dec;22(6):1416. doi: 10.3892/etm.2021.10807. Epub 2021 Oct 8.

Watson, JD. Molecular biology of the gene. Seventh Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 2014

WHO. Congenital anomalies WHO 2020. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs370/en/> .(acesso em 06/02/2022).

Wong, M., and Roper, S. N. (2016). Genetic animal models of malformations of cortical development and epilepsy. *J. Neurosci. Methods* 260, 73–82. doi: 10.1016/j.jneumeth.2015.04.007

Zaman T, Helbig KL, Clatot J, Thompson CH, Kang SK, Stouffs K, et al. SCN3A-Related Neurodevelopmental Disorder: A Spectrum of Epilepsy and Brain Malformation. *Ann Neurol.* 2020 Aug;88(2):348-362. doi: 10.1002/ana.25809. Epub 2020 Jul 9.

Zanni G, Colafati GS, Barresi S, Randisi F, Talamanca LF, Genovese E, et al. Description of a novel TUBA1A mutation in Arg-390 associated with asymmetrical polymicrogyria and mid-hindbrain dysgenesis. *Eur J Paediatr Neurol.* 2013 Jul;17(4):361-5. doi: 10.1016/j.ejpn.2012.12.006. Epub 2013 Jan 11(a).

Zanni G, Scotton C, Passarelli C, Fang M, Barresi S, Dallapiccola B, et al. Exome sequencing in a family with intellectual disability, early onset spasticity, and cerebellar atrophy detects a novel mutation in EXOSC3. *Neurogenetics.* 2013 Nov;14(3-4):247-50. doi: 10.1007/s10048-013-0371-z. Epub 2013 Aug 24 (b).

Apêndice

Endereços eletrônicos dos artigos científicos relacionados a esta tese publicados em revistas indexadas, em ordem cronológica

Inuzuka LM, Macedo-Souza LI, Della-Ripa B, Cabral KSS, Monteiro F, Kitajima JP, de Souza Godoy LF, de Souza Delgado D, Kok F, Garzon E. Neurodevelopmental disorder associated with de novo SCN3A pathogenic variants: two new cases and review of the literature. *Brain Dev.* 2020 Feb;42(2):211-216. doi: 10.1016/j.braindev.2019.09.004. Epub 2019 Oct 31. Erratum in: *Brain Dev.* 2021 May;43(5):671.

Cabral KSS, Inuzuka LM, Lucato LT, Kok F. Pontocerebellar Hypoplasia Caused by De novo Mutation in PFAH1B1 (LIS1) Gene. *Biomed J Sci & Tech Res* 40(3)-2021. BJSTR. MS.ID.006443. doi: 10.26717/BJSTR.2021.40.006443

Case Report

Neurodevelopmental disorder associated with de novo SCN3A pathogenic variants: two new cases and review of the literature

Luciana Midori Inuzuka^{a,d,†}, Lúcia Inês Macedo-Souza^d, Bruno Della-Ripa^d,
Katiane S.S. Cabral^d, Fabíola Monteiro^c, João Paulo Kitajima^c,
Luis Filipe de Souza Godoy^b, Daniel de Souza Delgado^b, Fernando Kok^{c,d},
Eliana Garzon^{a,d}

^aEpilepsy Clinic, Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, Brazil

^bRadiology Department, Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, Brazil

^cMendelics Genetic Analysis, São Paulo, Brazil

^dDepartment of Neurology, University of São Paulo School of Medicine, Brazil

Received 2 May 2019; received in revised form 28 August 2019; accepted 10 September 2019

Abstract

SCN3A was recently recognized as a gene associated with neurodevelopmental disorder and epilepsy. We present two additional patients with a novel de novo SCN3A pathogenic variant, and a review of all published cases of de novo variants. In one of our patients brain magnetic resonance imaging (MRI) disclosed a severe polymicrogyria and in the other it was normal. The clinical phenotype was characterized by a severe developmental delay and refractory epilepsy in the patient with polymicrogyria and intellectual disability with autistic features and pharmaco-responsive epilepsy in the subject with normal MRI. Polymicrogyria, a disorder of progenitor cells proliferation and migration, is an unanticipated finding for an ion channel dysfunction.
© 2019 The Japanese Society of Child Neurology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: SCN3A; Epilepsy; Epileptic encephalopathy; Polymicrogyria

1. Introduction

Ion channels are highly expressed in the brain, and pathogenic variants in voltage-gated sodium channels have been associated with epilepsies of variable severity. Deteriorous pathogenic variants in SCN1A, SCN2A, and SCN8A coding genes for ion channels subunits are associated with a variety of epileptic syndromes, including familial febrile seizures (FS), generalized epilepsy with FS, and West, Ohtahara, or Dravet syndromes. SCN2A and SCN8A are also associated with neurodevelopmental disorders without epilepsy. Only

[†] Corresponding author at: Department of Neurology, University of São Paulo School of Medicine Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 255 - Cerqueira César, São Paulo - SP, 05403-000

E-mail addresses: ludiana.minakaharada@hsl.org.br (L.M. Inuzuka), inesgenetica@gmail.com (L.I. Macedo-Souza), bruno.dellaripa@irisp.com.br (B. DellaRipa), kate_souza@yahoo.com.br (K.S.S. Cabral), fabiola.monteiro@mendelics.com.br (F. Monteiro), joao.kitajima@mendelics.com.br (J.P. Kitajima), filgodoy@gmail.com (L.F. de Souza Godoy), ds.delgado64@gmail.com (D. de Souza Delgado), fernandokok@mendelics.com.br (F. Kok), eliana.garzon@irisp.com.br (E. Garzon), eliana.garzon@irisp.com.br (E. Garzon).

<https://doi.org/10.1016/j.braindev.2019.09.004>

0887-7604/© 2019 The Japanese Society of Child Neurology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

recently have *de novo* epilepsy-associated pathogenic variants in *SCN3A* (Sodium Channel, Voltage Gated, Type III, Alpha Subunit, OMIM * 182391) been reported. This gene codes for a sodium-selective, pore-forming subunit, also known as Nav1.3. Interestingly, polymicrogyria, a feature not previously reported in other channelopathies, was present in some patients with pathogenic variants in this gene [1,4,5]. As with other channelopathies, the severity of the epilepsy was also quite variable. In this study, we report two additional patients with novel variants of *SCN3A* (one missense and one in frame deletion of a single amino acid), which are not inherited from their parents, with epilepsy and developmental delay/intellectual disability. Including those two new variants, a total of only 7 apparent *de novo* pathogenic variants in *SCN3A* are currently known [1–5]. Inherited pathogenic variants of *SCN3A* have also been reported in two groups of patients: individuals initially assessed for epilepsy, with normal MRI; and in patients evaluated for polymicrogyria with oral dyspraxia and/or intellectual disability but without epilepsy [5–9].

2. Case report

We report two individuals with early-onset epilepsy that were evaluated at the Epilepsy Clinic, Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, Brazil. This report was approved by the local Ethical Committee, and those legally responsible for the patients consented to their participation in this study.

Patient 1 is a 5-year-old boy, who was born at term after an uneventful pregnancy and delivery, from non-consanguineous parents. Focal and generalized seizures, accompanied by myoclonus and epileptic spasms, have occurred since 5 weeks of age. He had hypotonia, severe developmental delays, and dystonic movements. He was totally dependent in self-care, did not make eye contact with others, and did not establish any type of communication. His epilepsy was refractory to therapeutic doses of different associations of phenobarbital, valproate, levetiracetam, topiramate, vigabatrin, valproate, carbamazepine, ketogenic diet, and vagus nerve stimulation. MRI revealed an abnormal cortical development, with areas of polymicrogyria (Figure 1). An initial electroencephalogram (EEG) presented multifocal and generalized epileptiform paroxysms and suppression of background activity (Figure 2a). Whole exome sequencing (WES) disclosed a heterozygous variant in *SCN3A* [c.5265G > A ENST00000360093, p.(Met1765Ile)], which was also confirmed by Sanger sequencing in the patient and was absent in his parents (*de novo* variant). Methionine at codon 1765 is highly conserved among biological species; its substitution for isoleucine is not found in population databases (1000 Genomes, ExAC, GnomAD and TopMed) and is predicted to be patho-

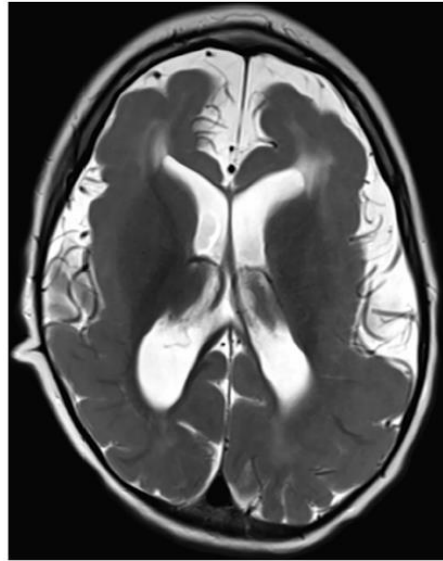


Fig. 1. Patient 1 (2 years old), axial T2 MRI image showing extensive, bilateral and symmetric polymicrogyria, predominantly frontoparietal with incomplete insula opercularization and slightly dysplastic Sylvian fissures. Additionally, the periventricular and deep white matter of frontal lobes show high-intensity signal.

genic by several computer programs (Provean, Mutation Taster, PolyPhen).

Patient 2 is a 3-year-old girl, also born at term after an uneventful pregnancy and delivery, from nonconsanguineous parents. At 5 months of age, she presented with generalized seizures and epileptic spasms, which were controlled with vigabatrin. Later, she developed autistic behavior, ataxia, and severe insomnia. The brain MRI appeared normal. An initial EEG showed frequent multifocal and generalized epileptiform paroxysms, intermixed with hypsarrhythmia (Figure 2b). WES identified a heterozygous variant in *SCN3A* [c.2950_2952delTTG ENST00000360093, p.(Leu984del)], which was also confirmed by Sanger sequencing in the patient and was not present in her parents (*de novo* event). Leucine at codon 984 is highly conserved among biological species; its deletion is not found in population databases (1,000 Genomes, ExAC, GnomAD and TopMed) and is predicted to be pathogenic by several computer programs (Provean, Mutation Taster).

3. Discussion

SCN3A encodes the type III voltage-gated Na⁺ channel alpha subunit, also known as Nav1.3. This

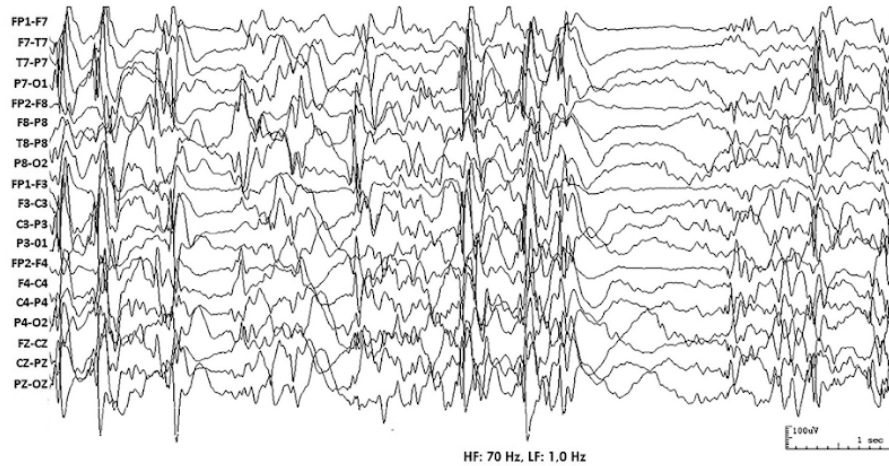


Fig. 2a. Patient 1 (3 years old), Electroencephalogram showing multifocal and generalized epileptiform paroxysms and suppression of background activity.

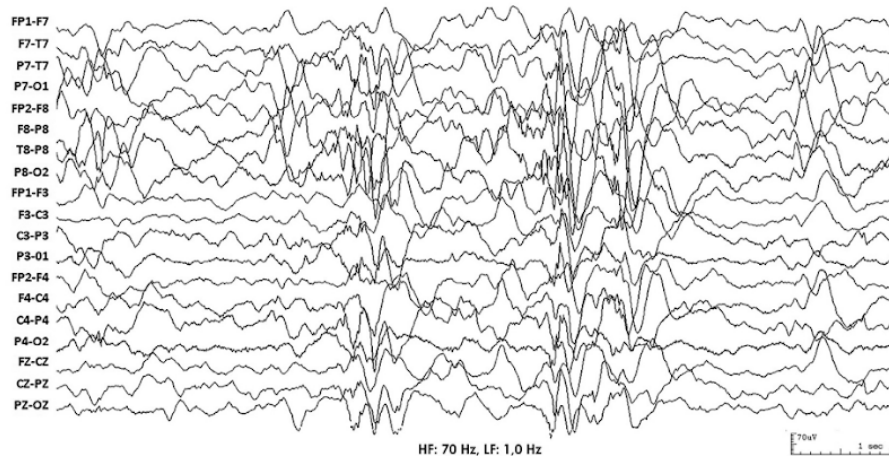


Fig. 2b. Patient 2 (7 months), Electroencephalogram showing multifocal and generalized epileptiform paroxysms, intermixed with hypsarrhythmia.

channel is formed by a single polypeptide with 1951 amino acids and contains 4 repeated domains (D1–D4), each of them being comprised of 6 transmembrane segments (S1–S6). *SCN3A* is highly intolerant to loss-of-function variants, as suggested by its elevated PLI of 1.0 (<http://gnomad.broadinstitute.org/gene/ENSG00000153253>). Nevertheless, the neurophysiological consequences of the reported deleterious variants in this gene are not clear, and both loss or gain of function might be involved in its pathogenesis. The most remark-

able aspect of this condition is the association of an ion channel dysfunction and cortical development disorder.

Only 11 patients with 5 different *de novo* variants in *SCN3A* have been reported to date: p.(Ile875Thr) was detected in 6 individuals, including a pair of siblings [1,4,5]; p.(Pro1333Leu) was reported in 2 patients [1,3]; p.(Val769Ala) [1], p.(Leu247Pro), and p.(Leu850Pro) were individually seen in 1 patient, [2,5]. We reported two additional variants: p.(Met1765Ile) and p.(Leu984-del). Those variants were present in any of the 4 protein

Table 1
Epilepsy-associated *SCN5A* de novo pathogenic variants: present reports and review of the literature.

Author	Variant	Domain	Epilepsy Age of onset	Type of seizures	Other features	Initial EEG	MRI
Patient 1 This study	p.(Met176Ile)	4, transmembrane	1 wk	Focal (clonic, tonic) and generalized seizures (tonic-clonic, myoclonic, spasms)	Microcephaly, severe global developmental delay, hypotonia, cortical malformations, cortical blindness, spastic tetraparesis.	Multifocal	Bilateral PMG, white matter thickening and thin corpus callosum
Patient 2 This study	p.(Leu984del)	2, cytoplasmatic	5 mo	Epileptic spasms and generalized seizures	Global developmental delay, insomnia, ataxia, autistic behavior	Hypsarhythmia and multifocal, with elevated amplitude	Normal
Patient 3 Lamar et al	p.(Leu247Pro)	1, cytoplasmatic	1 wk	Focal seizures	Microcephaly, global developmental delay, hypotonia and mid-face hypoplasia, autonomic nervous system dysfunction.	Focal temporal	Normal
Patient 4 Zaman et al	p.(Val1769Ala)	4, transmembrane	>1 yr	NR	Developmental delay	Multifocal	NR
Patient 5 Trujillo et al	p.(Pro1333Leu)	3, cytoplasmatic	NR	Generalized tonic-clonic, febrile seizures	NR	NR	Delayed myelination
Patient 6 Zaman et al	p.(Pro1333Leu)	3, cytoplasmatic	1–3 days	Focal and generalized seizures	Severe global developmental delay, hypotonia, cortical blindness	Hypsarhythmia and multifocal	Thin corpus callosum
Patient 7* Zaman et al	p.(Ile875Thr)	2, cytoplasmatic	2 wk	Tonic and myoclonic seizures	Nonverbal and non-ambulatory, dysphagia	NR	Frontoparietal PMG
Patient 8* Zaman et al	p.(Ile875Thr)	2, cytoplasmatic	2 wk	Generalized tonic seizures	Severe global developmental delay, central hypotonia, spasticity, tetraparesis	NR	Diffuse bilateral PMG
Patient 9 Miyatake et al	p.(Ile875Thr)	2, cytoplasmatic	1 day	Tonic seizures, focal motor and tonic motor seizures	Microcephaly, severe global developmental delay, cortical blindness	Focal parieto-occipital	Bilateral cortical atrophy with PMG
Patient 10 Miyatake et al	p.(Ile875Thr)	2, cytoplasmatic	1.5 mo	Epileptic spasms, tonic seizures	Microcephaly, developmental delay	Hypsarhythmia	Bilateral frontal PMG

Pontocerebellar Hypoplasia Caused by *De Novo* Mutation in *PAFAH1B1* (*LIS1*) Gene

Katiane Sayão Souza Cabral^{3*}, Luciana Inuzuka-Nakaharada³, Leandro Tavares Lucato² and Fernando Kok^{1,3}

¹*Mendelics Genomic Analysis, Brazil*

²*Department of Radiology, University of Sao Paulo (USP) School of Medicine, Brazil*

³*Department of Neurology, USP School of Medicine, Brazil*

***Corresponding author:** Katiane Sayão Souza Cabral, Department of Neurology, USP School of Medicine, Sao Paulo, Brazil **ARTICLE INFO ABSTRACT**

Received: 📅 November 26, 2021 **Published:** 📅 December 06, 2021

Citation: Katiane Sayão Souza Cabral, Luciana Inuzuka-Nakaharada, Leandro Tavares Lucato, Fernando Kok. Pontocerebellar Hypoplasia Caused by *De novo* Mutation in *PAFAH1B1* (*LIS1*) Gene. *Biomed J Sci & Tech Res* 40(3)-2021. BJSTR. MS.ID.006443.

Keywords: Pontocerebellar Hypoplasia; *PAFAH1B1*; *LIS1*; Whole Exome Sequencing; Brain Malformation



Introduction

Background: Pontocerebellar hypoplasia (PCH) is a genetically heterogeneous condition, characterized by malformation of the cerebellum, the ventral portion of the pons and inferior olivary nucleus, as well as supratentorial atrophic alterations. Cortical migration defects such as lissencephaly may be associated. To date, at least thirteen subtypes of PCH with distinct genotypes and phenotypes have been described.

Case Report: We report a case of classical PCH, without cortical Subunit 2; *SEPSECS*: O-Phosphoserine t-RNA Selenocysteine migration defect, presented with severe global developmental tRNA Synthase; *CLAM*: Cerebellar Atrophy With Progressive delay, spasticity and dystonia. Whole exome sequencing detected Microcephaly; *RARS2*: Arginyl-tRNA Synthetase 2; *VRK1*: Vaccinia a missense heterozygous mutation in exon 8 of *PAFAH1B1* gene. Related Kinase 1; *CASK*: X-Linked Calcium/Calmodulin-Dependent Parental analysis confirmed that it was a novel *de novo* mutational Serine Protein Kinase; *WD40*: Water Displacement 40th Formula event, supporting its association with PCH.

Conclusion: Pathogenic variants in *PAFAH1B1*, which have been widely associated with laminar heterotopia and lissencephaly, had never been linked to isolated PCH. However, we present a case report in which this association was found. Does this case report bring a new phenotype for an “old” gene, or an “old” phenotype with a “new” gene?

Abbreviations: PCH: Pontocerebellar Hypoplasia; *PAFAH1B1*: Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase IB Subunit Alpha Gene; *LIS1*: Lissencephaly 1 Gene; *DCX*: X-Linked Doublecortin Gene; *ARX*: Aristaless-Related Homeobox X-Linked Gene; tRNA: Transfer Ribonucleic Acid; *TSEN2*: tRNA- Splicing Endonuclease

The advance of gene sequencing techniques has made it possible to determine the genetic origin of an increasing number of central nervous system malformations which previously did not have a defined etiology. Pontocerebellar hypoplasia (PCH) is a robust example of great variability of phenotypes associated with a specific group of malformations, characterized by atrophic changes of the cerebellar vermis and hemispheres, the ventral portion of the pons and inferior olivary nucleus, often associated with defects in

Copyright@ Katiane Sayão Souza Cabral | Biomed J Sci & Tech Res | BJSTR. MS.ID.006443. 32207

Volume 40- Issue 3 DOI: [10.26717/BJSTR.2021.40.006443](https://doi.org/10.26717/BJSTR.2021.40.006443)

cortical development and derived from mutations in a wide range of genes. To date, at least thirteen subtypes of pontocerebellar hypoplasia with distinct genotypes and phenotypes have been described, but none of them were caused by variants on platelet activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha gene (*PAFAH1B1*), related to lissencephaly [1]. Lissencephaly is a spectrum of cortical development malformations, characterized by neuronal migration defects, which comprises agyria, pachygyria and subcortical band heterotopia [2,3]. *PAFAH1B1*, also known as Lissencephaly 1 gene (*LIS1*), was the first gene identified as being related to lissencephaly, followed by X-linked doublecortin gene (*DCX*) [4].

Classical lissencephaly (or type 1 - lissencephaly), characterized by the presence of a thick cortex (composed of four abnormal layers) and the absence of other associated brain

abnormalities (e.g severe congenital microcephaly, agenesis of the corpus callosum, or cerebellar hypoplasia) [4], is caused by mutations in some specific genes: *PAFAH1B1*, *DCX* (in males; in females, *DCX* mutations are associated with subcortical band heterotopia) and Aristaless-related homeobox, X-linked gene (*ARX*), in this case, characterized by a three-layered cortex [4].

There are other

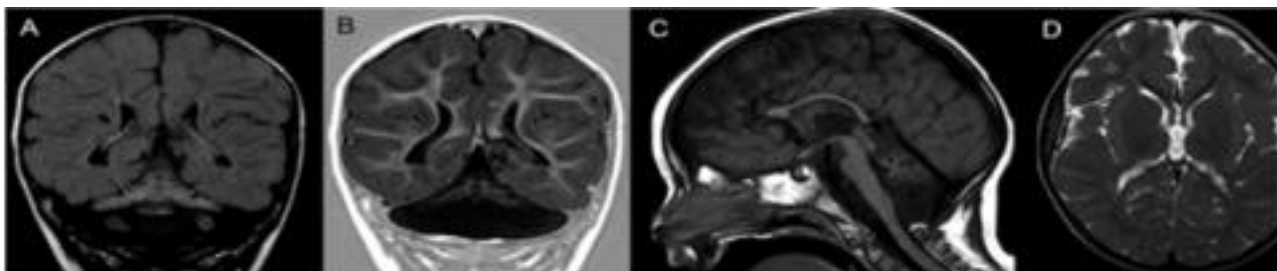
phenotypes of lissencephaly, associated with microcephaly (called “microlissencephaly”), agenesis of the corpus callosum or even cerebellar hypoplasia. However, until the present moment, there has been no record of mutations in *PAFAH1B1* presented with pontocerebellar hypoplasia without cortical malformations, as we describe in this report.

Case Report

The proband is an 8-year-old male, first-child of nonconsanguineous parents, who was born after an uneventful pregnancy, labor and perinatal period (Birth weight: 3,960 g;

occipitofrontal circumference: 33 cm). He presented micropenis and surgically corrected bilateral cryptorchidism. He has presented severe global developmental delay, a failure to thrive and deceleration of occipitofrontal circumference growth. Currently he has profound intellectual deficiency, inconstant eye contact,

bilateral strabismus, inability to maintain his head up and presents spasticity and dystonia. His occipitofrontal circumference is 47.5 cm (z-score<-3) and fundoscopy is normal. Brain MRI (Figure 1) at 18 months of age disclosed a classic PCH with reduced white matter but normal cortical gyration pattern.



Note: Brain MRI at 18 months of age. Coronal FLAIR (A) and T1 inversion--recovery (B) images disclose a butterfly-type cerebellum, characterized by severe proportional hypoplastic vermis and cerebellar hemispheres. FLAIR image also shows diffuse cerebellar hyperintensity. A sagittal T1-weighted image (C) demonstrates thinning of the corpus callosum, attenuation of the pons, which is almost flat, and a small hypoplastic cerebellar vermis. Axial T2-weighted image (D) shows bilateral reduction of cerebral white matter with unremarkable cortical gyration pattern.

Figure 1: Neuroimaging of Pontocerebellar Hypoplasia.

Genetic Study

Whole exome sequencing was performed in order to identify genetic abnormalities that might be responsible for the clinical and radiological phenotype. No deleterious variants were detected in genes previously associated to PCH, but the patient harbors a missense heterozygous variant p. Arg273Gln (c.818G>A, NM_000430.3; Chr17:2,577,500) in exon 8 of *PAFAH1B1*, a highly conserved (PhyloP>2) region and classified by SIFT and Polyphen as deleterious. This variant was neither present in 123,115 individuals from the Genome Aggregation Database (gnomad.broadinstitute.org) nor had been reported before. The variant

c.818G>A was confirmed by Sanger sequencing in the index case and his parents were also examined, but it was not present in them.

Discussion

Volume 40- Issue 3 DOI: [10.26717/BJSTR.2021.40.006443](https://doi.org/10.26717/BJSTR.2021.40.006443)

microcephaly (*CLAM*), arginyl-tRNA synthetase 2 (*RARS2*), vaccinia related kinase 1 (*VRK1*) and the X-linked

Pontocerebellar hypoplasia (PCH) is inherited as an autosomal recessive or X-linked trait, and it is characterized by profound congenital size reduction of the pons and cerebellum. Several genes have been implicated in PCH, including the autosomal transfer ribonucleic acid (tRNA) splicing endonuclease subunit 2 (*TSEN2*), *TSEN15*, *TSEN34*, *TSEN54*, O-phosphoserine t-RNA selenocysteine tRNA synthase (*SEPSECS*), cerebellar atrophy with progressive

Copyright@ Katiane Sayão Souza Cabral | Biomed J Sci & Tech Res | BJSTR. MS.ID.006443.

32208

Calcium/Calmodulin Dependent Serine Protein Kinase (*CASK*) [5,6]. Up to now, no dominant inheritance has been associated with PCH. Herein, we report a case of classical PCH, associated with decreased white matter volume, although there is no cortical migration defect. However, molecular testing revealed a novel *de*

*nov*o heterozygous mutation in *PAFAH1B1* (*LIS1*). This gene has been associated with laminar heterotopia and lissencephaly, occasionally combined with PCH [7,8]. In a comprehensive investigation of a large series of PCH, only 60% of cases have their molecular basis unraveled [5]. *PAFAH1B1* product plays a critical role in neuronal migration during brain development [7,9].

Haploinsufficiency of *PAFAH1B1* leads to neuronal migration defects of variable degrees of severity of the lissencephaly spectrum (OMIM # 607432), including Miller-Dieker syndrome (OMIM#247200). The p. Arg273Gln occurs in the hinge between two of the seven Water Displacement 40th Formula (*WD40*) domains, which are supposed to form a ring propeller-like structure. No missense mutations in any of the hinge regions of *WD40* domains have been reported so far (The Human Gene Mutation Database). The variant Arg273*, leading to premature stop codon, has been reported several times associated with lissencephaly. *De novo* mutations in coding regions leading to protein structural change occur on average once at every generation [10]. Finding this type of change in a highly conserved 6 gene that is active during central nervous system formation strongly supports its association with PCH. As WES becomes more widespread, the number of genes associated with PCH will probably increase, and *PAFAH1B1* might be one of these newcomers. A “new” phenotype for an “old” gene, or an “old” phenotype with a “new” gene?

Conflict of Interest Disclosures

This study has no sponsorship or funding of any kind. There are no conflicts of interest to disclose.

ISSN: 2574-1241

DOI: [10.26717/BJSTR.2021.40.006443](https://doi.org/10.26717/BJSTR.2021.40.006443)

Katiane Sayão Souza Cabral. Biomed J Sci & Tech Res



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 License

Submission Link: <https://biomedres.us/submit-manuscript.php>

Ethics

This report complies with Brazilian law. The family gave written permission to publish this report. Whole exome sequencing has been performed for clinical diagnosis only, so an institution's ethics committee's approval is not required for this purpose.

Acknowledgement

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES/PROEX) - Finance Code 001 - according to process number 23038.018285/2019-21/PROEX PPGN/FMUSP.

References

1. Van Dijk T, Baas F, Barth PG, Poll-The BT (2018) What's new in pontocerebellar hypoplasia? An update on genes and subtypes. *Orphanet J Rare Dis* 13(1): 92.
2. Di Donato N, Timms AE, Aldinger KA, Mirzaa GM, Bennett JT, et al. (2018) Analysis of 17 genes detects mutations in 81% of 811 patients with lissencephaly. *Genet Med* 20(11): 1354-1364.
3. Saillour Y, Carion N, Quelin C, Leger PL, Boddaert N, et al. (2009) *LIS1*-Related Isolated Lissencephaly Spectrum of Mutations and Relationships with Malformation Severity. *Arch Neurol* 66(8): 1007-15.
4. Fry AE, Cushion TD, Pilz DT (2014) The genetics of lissencephaly. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 166C(2): 198-210.
5. Namavar Y, Barth PG, Kasher PR, Van Ruissen F, Brockmann K, et al. (2011) Clinical, neuroradiological and genetic findings in pontocerebellar hypoplasia. *Brain* 134(Pt 1): 143-156.
6. Najm J, Horn D, Wimplinger I, Golden JA, Chizhikov VV, et al. (2008) Mutations of *CASK* cause an X-linked brain malformation phenotype with microcephaly and hypoplasia of the brainstem and cerebellum. *Nat Genet* 40(9): 1065-1067.
7. Coquelle FM, Caspi M, Cordelières FP, Domplere JP, Dujardin DL, et al. (2020) *LIS1*, CLIP-170's key to the dynein/dynactin pathway. *Mol Cell Biol* 22(9): 3089-3102.
8. Uyanik G, Morris-Rosendahl DJ, Stiegler J, Klapecki J, Gross C, et al. (2007) Location and type of mutation in the *LIS1* gene do not predict phenotypic severity. *Neurology* 69(5): 442-447.
9. Tanaka T, Serneo FF, Higgins C, Gambello MJ, Wynshaw-Boris A, et al. (2004) *LIS1* and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. *J Cell Biol* 165(5): 709-721.
10. Veltman JA, Brunner HG (2012) *De novo* mutations in human genetic disease. *Nat Rev Genet* 13: 565-575.



Assets of Publishing with us

- Global archiving of articles
- *Immediate*, unrestricted online access
- Rigorous Peer Review Process
- Authors Retain Copyrights
- Unique DOI for all articles

Copyright@ Katiane Sayão Souza Cabral | Biomed J Sci & Tech Res | BJSTR. MS.ID.006443.

32209