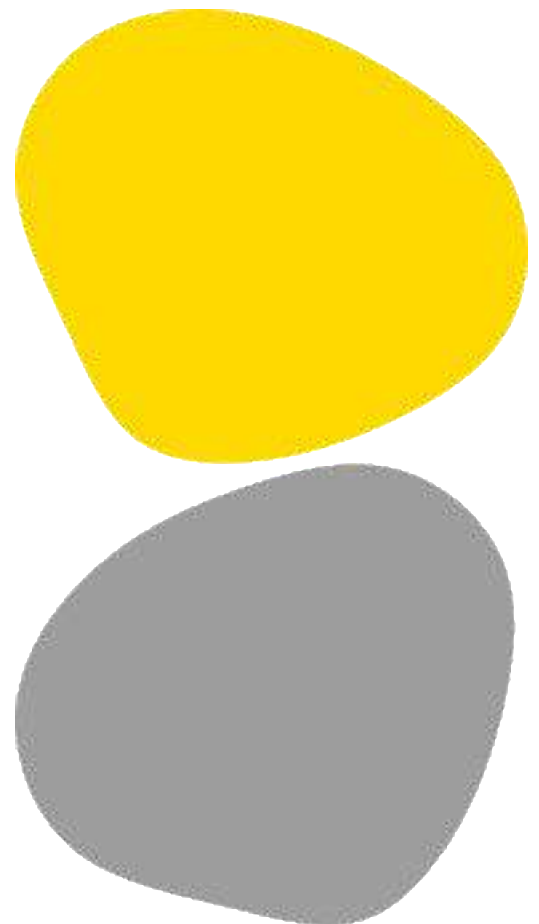


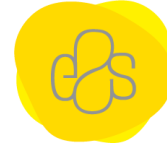


Diagnóstico molecular por sequenciação de nova geração em neuropediatria

Débora Eira Abelha

09/2025





Diagnóstico molecular por sequenciação de nova geração em neuropediatria

Autor

Débora Eira Abelha

Orientadores

Doutora Isabel Alonso, Genetyca, Grupo Atrys

Prof. Doutora Regina Silva, Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Técnicas Laboratoriais em Biopatologia – Ramo/Área de Especialização em Patologia Molecular pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.



Agradecimentos

Chegar até aqui foi um verdadeiro desafio, mas também uma enorme aprendizagem, pessoal e profissional. Esta etapa não teria sido possível sem o apoio de várias pessoas, às quais deixo o meu sincero obrigado.

Em primeiro lugar, agradeço ao laboratório Genetyca, grupo Atrys pela oportunidade de estágio, pela confiança e por todo o ambiente de trabalho que me proporcionaram. Um agradecimento muito especial à Doutora Isabel Alonso, por toda a orientação, paciência e disponibilidade ao longo deste percurso, com quem aprendi imenso.

À Professora Regina Silva, obrigada por toda a orientação, pelas sugestões sempre construtivas e pelo acompanhamento ao longo do projeto. Um agradecimento também à Professora Carla Pinto, pela sua disponibilidade e prestabilidade sempre que foi necessário ao longo do percurso.

Aos meus colegas do laboratório, obrigada por me receberem tão bem, por todo o apoio e boa disposição diária. Foram fundamentais para que esta experiência fosse tão positiva e enriquecedora.

Por fim, aos meus amigos e à minha família, obrigada por estarem sempre presentes com um apoio incondicional, pela paciência e por acreditarem em mim, mesmo nos momentos em que eu própria duvidei.



Resumo

As perturbações do neurodesenvolvimento são um conjunto de perturbações que comprometem a função neurocognitiva. Entre as manifestações mais prevalentes encontram-se o atraso no desenvolvimento e o défice intelectual, geralmente diagnosticadas durante a infância ou adolescência, com uma prevalência de 1-3% em crianças a nível global. Os testes genéticos são parte do protocolo padrão nos cuidados de várias perturbações do desenvolvimento neurológico e a sua utilização tem sido cada vez mais frequente.

Este projeto tem como objetivo o diagnóstico molecular em amostras de sangue total de doentes pediátricos com um quadro clínico de perturbação do desenvolvimento intelectual, utilizando sequenciação de nova geração. Foram analisadas 18 amostras de DNA, através de sequenciação de exoma completo. As variantes identificadas foram validadas por reação em cadeia da polimerase e sequenciação de Sanger.

Utilizando um painel de genes para perturbações do desenvolvimento intelectual, foram identificadas variantes em 10 dos 18 casos, correspondendo a um rendimento diagnóstico de 12%. Apenas uma variante patogénica foi identificada, tendo sido também detetados dois casos com múltiplas variantes. No entanto, na maior parte dos casos foram identificadas apenas variantes de significado clínico incerto.

Estes resultados refletem a elevada complexidade e heterogeneidade genética das perturbações do neurodesenvolvimento e os desafios associados à classificação e interpretação clínica das variantes.

Palavras-chave: Perturbações do neurodesenvolvimento; NGS; diagnóstico molecular; variantes genéticas; défice intelectual



Abstract

Neurodevelopmental disorders are a group of disorders that impair neurocognitive function. Among the most prevalent manifestations are developmental delay and intellectual disability, typically occurring during childhood or adolescence, with a prevalence of 1-3% in children globally. Genetic testing is part of the standard protocol in the care of several neurodevelopmental disorders and its use has become increasingly frequent.

This project aims to perform molecular diagnosis in whole blood samples from pediatric patients with clinical symptoms of intellectual developmental disorder, using next-generation sequencing. Eighteen DNA samples were analyzed through whole-exome sequencing. The identified variants were validated by polymerase chain reaction and Sanger sequencing.

Using a gene panel for intellectual developmental disorders, variants were identified in 10 of the 18 cases, corresponding to a diagnostic yield of 12%. Only one pathogenic variant was identified, and two cases with multiple variants were also detected. However, in most cases, only variants of uncertain clinical significance were identified.

These results reflect the high complexity and genetic heterogeneity of neurodevelopmental disorders, and the challenges associated with the classification and clinical interpretation of variants.

Keywords: Neurodevelopmental disorders; NGS; molecular diagnosis; genetic variants; intellectual disability



Índice

1.	Introdução.....	1
1.1.	Perturbações do desenvolvimento neurológico.....	1
1.1.1.	Principais Manifestações.....	1
1.1.2.	Etiologia e Prevalência.....	2
1.2.	O diagnóstico molecular.....	3
1.2.1.	Passado do diagnóstico molecular.....	3
1.2.2.	Avanços tecnológicos.....	5
1.3.	Sequênciação de Nova Geração (NGS).....	6
1.4.	Sequenciação completa do exoma (WES).....	6
1.5.	Tipos de Variantes Genéticas.....	7
1.6.	Classificação de variantes.....	8
2.	Objetivos.....	10
3.	Métodos.....	11
3.1.	Amostras.....	11
3.2.	Extração de DNA.....	11
3.3.	Preparação de bibliotecas para Next Generation Sequencing.....	11
3.4.	Classificação e interpretação das variantes.....	13
3.5.	Sequenciação de Sanger.....	14
4.	Resultados.....	15
4.1.	Informação clínica dos doentes.....	15
4.2.	Variantes genéticas detetadas.....	16
4.3.	Identificação e classificação das variantes patogénicas e provavelmente patogénicas.....	17
4.4.	Identificação e classificação das variantes de significado clínico incerto.....	19
4.5.	Identificação e análise de amostras com múltiplas variantes.....	22
4.6.	Associação das variantes com o fenótipo clínico.....	24
4.6.1.	Amostras com histórico familiar.....	25
5.	Discussão.....	27
5.1.	Casos com variantes patogénicas/provavelmente patogénicas.....	28
5.2.	Casos com variantes de significado clínico incerto.....	30



5.3. Casos com múltiplas variantes	33
5.4. Principais mecanismos associados às doenças do neurodesenvolvimento.....	34
6. Conclusão.....	36
7. Referências Bibliográficas	37
Anexo 1. Descrição dos critérios aplicados na interpretação das variantes deste estudo, de acordo com as diretrizes do ACMG	45
Anexo 2. Combinações dos critérios ACMG utilizadas para definição da classificação final das variantes	45
Anexo 3. Informação clínica completa dos pacientes com suspeita de perturbações do desenvolvimento intelectual.....	46
Anexo 4. Síntese dos fenótipos descritos na base de dados OMIM associados aos genes com variantes de significado clínico incerto identificadas neste estudo	48



Índice de Tabelas

Tabela 1. Comparação das principais metodologias genéticas aplicadas no diagnóstico molecular em neuropediatria: características, limitações e vantagens.....	4
Tabela 2. Programa de PCR utilizado para a amplificação do DNA fragmentado após a ligação dos adaptadores universais.	12
Tabela 3. Programa de amplificação utilizado após a captura por hibridação de sondas específicas.....	12
Tabela 4. Programa de amplificação por PCR utilizado para a validação de variantes por sequenciação de Sanger.....	14
Tabela 5. Informação clínica dos pacientes com suspeita de perturbações do desenvolvimento intelectual.....	15
Tabela 6. Variantes patogénicas identificadas por NGS em pacientes com suspeita de perturbação de desenvolvimento intelectual.....	18
Tabela 7. Variantes de significado incerto identificadas por NGS em pacientes com suspeita de perturbação de desenvolvimento intelectual.....	21
Tabela 8. Amostras com múltiplas variantes identificadas por NGS em pacientes com suspeita de perturbação de desenvolvimento intelectual.....	23
Tabela 9. Principais fenótipos observados nos pacientes com suspeita de perturbação de desenvolvimento intelectual e número de variantes identificadas em cada grupo fenotípico.	25
Tabela 10. Variantes identificadas por NGS em pacientes com histórico familiar de perturbações do desenvolvimento intelectual.....	26



Índice de Figuras

Figura 1. Distribuição das variantes encontradas por NGS em pacientes com suspeita de perturbação de desenvolvimento intelectual, segundo a classificação de ACMG.	16
Figura 2. Distribuição das variantes encontradas por NGS segundo a classificação ACMG, em pacientes com suspeita de perturbação de desenvolvimento intelectual, estratificados por idade (≤ 5 anos ou > 5 anos).	17



Lista de Abreviaturas

ACMG– American College of Medical Genetics and Genomics

AD– Atraso no desenvolvimento

AP– Complexos de proteínas adaptadoras

CMA– Microarray cromossómico (do inglês *Chromosomal Microarray*)

CNV– Variação do número de cópias (do inglês *Copy Number Variant*)

DI– Défice intelectual

DINS– Défice intelectual não síndrómico

DIS– Défice intelectual síndrómico

DNA– Ácido desoxirribonucleico

EDTA– Ácido etilenodiamino tetra-acético

MLPA– Amplificação em multiplex de sonda dependente de ligação (do inglês *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

NGS– Sequenciação de nova geração (do inglês *Next-Generation Sequencing*)

PCR– Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

PDAH– Perturbação de défice de atenção/hiperatividade

PEA– Perturbação do espectro de autismo

RNA– Ácido ribonucleico

SE– Sequenciação do exoma

SNV– Variantes de nucleótido único (do inglês *Single Nucleotide Variant*)

VUS– Variante de significado incerto (do inglês *Variant of Uncertain Significance*)

WES– Sequenciação completa do exoma (do inglês *Whole Exome Sequencing*)



1. Introdução

1.1. Perturbações do desenvolvimento neurológico

As perturbações do neurodesenvolvimento são um conjunto de perturbações que comprometem a função neurocognitiva devido a falhas no desenvolvimento cerebral.(1) Caracterizam-se por défices de desenvolvimento ao nível da cognição, da linguagem, do comportamento ou das capacidades motoras que têm impacto no desempenho pessoal, social, escolar ou profissional.(1) Estas perturbações, refletem alterações do desenvolvimento neurológico e, por essa razão, são geralmente diagnosticadas durante a infância ou adolescência, afetando aproximadamente 1-3% das crianças em todo o mundo. (1,2)

Uma vez que as alterações da função sináptica que ocorrem em qualquer fase do neurodesenvolvimento podem resultar em doença, há uma diversidade de causas genéticas associadas a estas perturbações. (3) Podem manifestar-se de forma isolada, como no défice intelectual não sindrómico (DINS) ou em conjunto com uma variedade de outros sinais e sintomas, sendo então designadas por défice intelectual sindrómico (DIS). (4)

Embora sujeitas a alterações relacionadas com o desenvolvimento, estas perturbações são, geralmente, não progressivas, seguindo um curso estável, sem ocorrer uma remissão ou recaída.(1)

1.1.1. Principais Manifestações

As principais manifestações de perturbações do neurodesenvolvimento são o atraso no desenvolvimento (AD) e o défice intelectual (DI) sendo a designação de atraso no desenvolvimento reservada a crianças com menos de cinco anos, enquanto o défice intelectual é aplicada a crianças mais velhas e adultos.(5,6) Ambas as condições são diagnosticadas quando os testes neurológicos padronizados se situam dois desvios-padrão abaixo da média adequada à idade.(5,6)

Estas manifestações clínicas estão frequentemente associadas a outras doenças, como a perturbação do espectro do autismo (PEA), a perturbação de défice de atenção/hiperatividade (PHDA), perturbações motoras do neurodesenvolvimento e



anomalias estruturais congénitas do desenvolvimento.(5) Além disso, outras perturbações comuns do neurodesenvolvimento, nomeadamente a epilepsia podem também afetar o desenvolvimento cerebral e vários aspectos da capacidade funcional diária durante a infância.(1,2) Crianças com estas perturbações, apresentam características fenotípicas com gravidade variável e diferentes alterações comportamentais. Fenótipos semelhantes podem estar associados a diferentes mecanismos genéticos, assim como, diferentes variantes no mesmo gene podem levar a diferentes fenótipos, o que aumenta a heterogeneidade clínica.(7,8) Muitas vezes, estas patologias resultam de variantes *de novo* em genes importantes para o desenvolvimento do sistema nervoso central.(8)

1.1.2. Etiologia e Prevalência

As perturbações do neurodesenvolvimento são extremamente complexas, sendo o seu desenvolvimento e progressão influenciados por vários fatores genéticos e ambientais.(4) A patogénese está intimamente associada a alterações genéticas, e considera-se que as causas genéticas têm um papel preponderante.(2) Por exemplo, as variantes de nucleótido único (SNV), as variações do número de cópias (CNV) e as aneuploidias são responsáveis por cerca de 30% a 50% dos casos.(2) Devido ao avanço das tecnologias, é possível numa análise genética abrangente a deteção de SNVs e CNVs, em casos que anteriormente eram inexplicáveis.(2,9) Até ao momento, foram identificados mais de 1300 genes causadores de perturbações do neurodesenvolvimento e 1100 genes candidatos envolvidos nestas patologias, estando o número continuamente a aumentar.(2,9)

Embora muitos casos sejam causados por alterações genéticas, há também a teoria que sugere alterações nos estados funcionais das células nervosas, influenciadas por fatores ambientais que podem comprometer o desenvolvimento sináptico normal.(10) Além disso, existem outros fatores, potencialmente evitáveis, que ocorrem durante o desenvolvimento intrauterino, como a desnutrição materna e deficiências nutricionais, infeções durante a gestação, exposição materna a substâncias tóxicas (incluindo álcool, nicotina e drogas teratogénicas), parto prematuro e asfíxia perinatal, que podem também originar alterações como atraso na mielinização, redução da densidade sináptica e desequilíbrios na neurotransmissão. (4,5,11)



As doenças genéticas têm um impacto significativo nos encargos sociais e de saúde pública, com uma prevalência global estimada entre 3,5% e 5,9% da população, ou seja, cerca de 1 em cada 20 pessoas. (12) Contrariamente à mortalidade infantil precoce, que diminuiu significativamente 50% entre 1990 e 2016, a prevalência das perturbações do desenvolvimento manteve-se inalterada durante este tempo. (13)

1.2. O diagnóstico molecular

1.2.1. Passado do diagnóstico molecular

A abordagem diagnóstica tradicional para o estudo de doenças genéticas concentrava-se principalmente na síndrome do X frágil e nas variações do número de cópias, que eram detetadas por *microarray* cromossómico (CMA) ou *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA). (14) A metodologia CMA consegue apenas detetar deleções ou duplicações cromossómicas em cerca de 20% dos casos de doenças genéticas. (5,14) No entanto, a raridade dessas doenças, a sua variabilidade na expressão clínica, a heterogeneidade genética e a sobreposição parcial de muitos quadros clínicos além da possível ausência de marcadores relacionados com a idade, tornam o percurso de diagnóstico molecular dispendioso e frequentemente ineficaz, exigindo múltiplos testes genéticos para determinar um diagnóstico final. (15)

Os avanços genómicos trouxeram um aumento significativo dos conhecimentos sobre a etiologia genética das doenças neurodegenerativas. Diversas técnicas de estudo genético têm sido aplicadas, incluindo o cariótipo, a CMA, a sequenciação do exoma e a MLPA. Estes métodos diferem tanto nas taxas de diagnóstico alcançadas como nos tipos de alterações genéticas que conseguem detetar. (3,15) Assim, a obtenção de mais informações pode ser valiosa no diagnóstico dessas doenças. No entanto, nem todos os métodos são aplicáveis a todos os casos. Por isso, é necessário dar prioridade ao teste mais adequado para cada caso e complementá-lo com outros métodos. (3) Tendo em conta essa diversidade, a Tabela 1 resume as principais técnicas genéticas aplicadas no diagnóstico molecular em neuropediatria, destacando os tipos de alterações detetadas, limitações e vantagens.



Tabela 1. Comparação das principais metodologias genéticas aplicadas no diagnóstico molecular em neuropediatria: características, limitações e vantagens.

Metodologias	Tipo de Alteração Detetada	Limitações	Principais Vantagens
Cariótipo	Alterações cromossómicas grandes (aneuploidias, translocações)	Baixa resolução; não deteta mutações pontuais ou CNVs pequenas Não deteta mutações pontuais nem rearranjos equilibrados	Visão global do genoma; útil em anomalias estruturais evidentes
CMA	Variações no número de cópias	Limitada aos <i>loci</i> cobertos pelas sondas; não deteta variantes pontuais	Maior resolução que cariótipo
MLPA	Deleções/duplicações específicas em genes conhecidos	Pode falhar CNVs e não deteta nas regiões não codificantes	Análise dirigida, com execução simples e custo reduzido
Sequenciação do Exoma	Variantes pontuais e pequenas inserções/deleções nas regiões codificantes		Abordagem abrangente; útil em doenças genéticas raras

Legenda: CMA- microarray cromossómico; MLPA- Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification; CNV- variação do número de cópias

Os testes genéticos são atualmente parte do protocolo padrão nos cuidados para várias perturbações do desenvolvimento neurológico e a sua utilização tem sido cada vez mais frequente. Na prática, na ausência de uma síndrome clinicamente reconhecível, o diagnóstico advém de uma suspeita clínica que é confirmada por testes genéticos específicos, especialmente nos casos de suspeita de atraso no desenvolvimento ou de défice intelectual.⁽¹⁾ Como cerca de 70% destas doenças surgem ainda na infância, é importante que os clínicos pediátricos estejam mais sensibilizados para estes testes mais comuns e o seu papel no cuidado de crianças com perturbações do desenvolvimento neurológico.^(1,12) Identificar a causa permite não só ajustar o tratamento e o acompanhamento clínico, mas também proporcionar um suporte adequado às famílias.^(1,12)

Quando uma doença é identificada, o risco de recorrência para uma família individual varia consoante as variantes genómicas detetadas, permitindo aos profissionais de saúde fornecer um aconselhamento mais preciso sobre as decisões reprodutivas, oferecendo assim aos doentes e familiares uma melhor compreensão dos riscos envolvidos e a possibilidade de realizar um diagnóstico pré-natal.⁽¹⁾



1.2.2. Avanços tecnológicos

Em 2010, Miller DT *et al.* recomendaram o microarray cromossómico como teste de primeira linha para o diagnóstico clínico de doentes com atraso do desenvolvimento, deficiência intelectual, défice de atenção ou anomalias congénitas.(16) Em 2021, as diretrizes do *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)* foram atualizadas e passaram a recomendar a utilização da sequenciação da nova geração (NGS) como teste de primeira linha.(13) No entanto, apesar dos avanços tecnológicos nos testes genéticos, uma proporção significativa de doenças genéticas raras ainda carecem de diagnóstico definitivo.(14)

O rápido avanço tecnológico, nomeadamente o surgimento das técnicas de sequenciação do exoma (SE), juntamente com a análise baseada em trio, que consiste em sequenciar em paralelo o exoma do indivíduo afetado e dos seus progenitores, possibilita taxas de diagnóstico até 50%.(17) Recentemente, a SE baseada em trio foi proposta como a abordagem molecular mais eficaz para diagnóstico, mas o seu custo elevado limita a sua aplicação. (17,18) Uma alternativa é a realização da sequenciação apenas no probando (indivíduo afetado) e, posteriormente, avaliar a segregação das variantes detetadas nos progenitores, recorrendo à sequenciação de Sanger ou à SE em trio com NGS.(17,18)

O surgimento de estudos pela NGS, especialmente com o uso de painéis alargados de genes e pela sequenciação completa do exoma (WES), revolucionaram a identificação de variantes causais em perturbações do desenvolvimento neurológico, aumentando o sucesso do diagnóstico em mais 25%.(19) A WES tornou-se, com o passar do tempo, significativamente mais acessível, sendo, atualmente, uma opção altamente competitiva nos testes genéticos atuais.(7) Embora não sejam permutáveis, os avanços nas técnicas e nos algoritmos bioinformáticos, permitem que os painéis de genes NGS e WES identifiquem com precisão CNVs e aberrações cromossómicas anteriormente indetetáveis.(5)

No entanto, a WES ainda é realizada no final de uma abordagem diagnóstica de várias etapas em doentes ambulatoriais com suspeita de doenças genéticas, com exceção da sua utilização crescente como teste de primeira linha em bebés gravemente doentes, internados em unidades de cuidados intensivos.(15) Fatores como a perceção dos médicos sobre os custos elevados e o tempo de encaminhamento, o risco de encontrar variantes de significado incerto e o número reduzido de laboratórios que realizam WES podem explicar a sua aplicação limitada como teste inicial para o diagnóstico/terapia nesses doentes.(15)



Contudo, é importante destacar que a utilidade das tecnologias continuará a crescer, trazendo avanços tanto na terapia genética como no potencial para a edição de genes.(13)

1.3. Sequenciação de Nova Geração (NGS)

A sequenciação de nova geração (NGS), também conhecida como sequenciação de alto rendimento, é uma tecnologia que possibilita a sequenciação, em simultâneo, de milhões de seqüências de DNA ou RNA.(20) Comparada com os métodos tradicionais de sequenciação, a NGS tem diversas vantagens, como um maior rendimento através da multiplexação de amostras, maior sensibilidade na deteção de variantes com uma baixa frequência, tempo de resposta mais rápido para grandes volumes de amostras e custos mais reduzidos.(15,20)

Esta tecnologia tem uma ampla gama de aplicações na medicina laboratorial, muito utilizada no diagnóstico, prognóstico e na seleção de tratamentos para doenças genéticas, oncológicas e doenças infecciosas.(20) Nos últimos dez anos, o aumento da utilização da sequenciação do exoma e do genoma transformou significativamente a prática da genética clínica e a medicina de um modo geral.(13)

Embora a NGS tenha sido um sucesso na compreensão das causas genéticas das formas graves de atraso do desenvolvimento neurológico e do défice intelectual associado, as bases genéticas para os casos de atraso neurológico ligeiro a moderado ainda não foram completamente compreendidas.(21)

1.4. Sequenciação completa do exoma (WES)

A sequenciação completa do exoma consegue, simultaneamente, sequenciar toda a região codificante do genoma e filtrar as variantes com base nos seus efeitos na proteína e na transcrição e na compatibilidade com o fenótipo do doente, sendo esta a sua principal vantagem.(15) Além disso, esta técnica permite reanálises posteriores à medida que mais genes candidatos são associados ao AD e DI, permitindo também identificar novos locais de splicing potencialmente causadores de doença.(6)

Este método tem sido fundamental e eficiente no diagnóstico de doentes com atraso no desenvolvimento ou défice intelectual, assim como em malformações congénitas, doenças



multissistémicas e distúrbios monossistémicos específicos, como por exemplo, cardiomiopatias, síndromes epiléticas ou doenças hepáticas idiopáticas, entre outros.(4) Estudos recentes mostram que a sequenciação do exoma pode diagnosticar até 61% dos casos não diagnosticados de perturbações do neurodesenvolvimento, nomeadamente do transtorno do espectro do autismo (3–28% dos casos) e do défice intelectual (28–43% dos casos).(18)

1.5. Tipos de Variantes Genéticas

As mutações genéticas correspondem a alterações permanentes na sequência de DNA que ocorrem durante o processo de divisão celular, quando as células replicam o seu material genético. Estas alterações desempenham um papel fundamental na variabilidade genética, podendo, contudo, ter implicações patológicas relevantes quando interferem com a expressão génica ou com a estrutura e função das proteínas. (22,23) Certas condições genéticas resultam da herança de genes alterados transmitidos pelos progenitores, aumentando o risco de manifestação da doença, enquanto outras mutações podem surgir de forma aleatória, sem origem hereditária.(22)

As mutações pontuais, caracterizadas pela substituição de uma única base, classificam-se em três categorias principais: as mutações silenciosas ou sinónimas, que não provocam alterações na sequência de aminoácidos da proteína, embora possam afetar processos como o mecanismo de *splicing* ou a estabilidade do mRNA; as mutações *missense*, originam a substituição de um aminoácido por outro, o que pode comprometer a estrutura ou a função da proteína resultante; e por fim, as mutações *nonsense*, que introduzem um codão stop prematuro levando à formação de proteínas truncadas e geralmente não funcionais.(23–25)

Outro tipo relevante de mutações são as variantes *frameshift*, causadas por deleções ou inserções de um número de nucleótidos que não seja múltiplo de três. Estas alterações alteram a grelha de leitura dos codões, resultando na produção de proteínas aberrantes e com perda de função.(25) As mutações de *splicing* ocorrem em regiões reguladoras envolvidas na remoção dos intrões durante o processamento do pré-mRNA, podendo originar transcritos defeituosos, seja por exclusão de exões, inclusão de intrões ou ativação de locais de *splicing* alternativos.(26) Por fim, as mutações por expansão de repetições



consistem num aumento anómalo de sequências repetitivas associadas a várias doenças genéticas neurodegenerativas, como a repetição trinucleotídica CAG associada à doença de Huntington ou a repetição CGG associada à síndrome do X frágil. (27)

1.6. Classificação de variantes

Os termos “mutação” e “polimorfismo” são frequentemente utilizados, levando a suposições de efeitos patogénicos e benignos maioritariamente incorretos.(28) Ambos são definidos como uma alteração permanente na sequência de nucleótidos do DNA, contudo, designa-se por mutação qualquer alteração independente da sua frequência, e por polimorfismo aquelas variantes cuja frequência populacional é superior a 1%.(28) Posto isto, as diretrizes de práticas laboratoriais publicadas pelo American College of Medical Genetics (ACMG) recomendaram que ambos os termos sejam substituídos apenas pelo termo “variante”.

A classificação das variantes é fundamental, principalmente das variantes classificadas como provavelmente patogénicas ou patogénicas, uma vez que podem confirmar um diagnóstico clínico, determinar um prognóstico, orientar as abordagens para o tratamento e prevenção e estimar o risco para os membros da família.(29)

A classificação das variantes, é, usualmente, classificada, segundo as diretrizes ACMG. Para o efeito, são avaliados vários tipos de evidência, como a frequência populacional da variante, previsões computacionais, estudos funcionais, dados clínicos e familiares, bem como informação previamente reportada em bases de dados especializadas. Com base na combinação destes critérios, as variantes são classificadas em uma de cinco categorias: benigno, provavelmente benigno, variante de significado incerto (VUS), provavelmente patogénica ou patogénica.(29)

Mais de 40% das variantes clinicamente descritas estão classificadas como VUS ou apresentam classificações divergentes na base de dados ClinVar. Esta base de dados tem informações de todos os laboratórios do mundo.(29) A análise de variantes ainda apresenta limitações, a categoria atribuída reflete o conhecimento científico disponível no momento, mas pode ser alterada à medida que novos dados populacionais, clínicos ou funcionais se tornam disponíveis. Assim, a classificação não representa uma certeza absoluta. No contexto de diagnóstico pré-natal, onde uma família pode enfrentar decisões irreversíveis,



como por exemplo tratamento fetal ou interrupção da gravidez, é essencial considerar cuidadosamente as evidências do relatório e de outras fontes, como uma ecografia fetal, antes de qualquer decisão ser tomada.(28,30)



2. Objetivos

Este projeto teve como objetivo o diagnóstico molecular de doentes pediátricos com um quadro clínico de perturbação do desenvolvimento intelectual, utilizando amostras de sangue total e a metodologia da sequenciação de nova geração. Para tal, os objetivos específicos do presente trabalho foram:

1. Identificar variantes genéticas potencialmente associadas ao fenótipo clínico, utilizando um painel de genes específico aplicado a dados de sequenciação completa do exoma;
2. Analisar e classificar as variantes encontradas;
3. Efetuar amplificação por PCR e sequenciação de Sanger para confirmação de variantes potencialmente causais.



3. Métodos

3.1. Amostras

Neste estudo foram analisadas 18 amostras de DNA extraídas a partir de sangue total de doentes com perturbação do desenvolvimento intelectual selecionadas aleatoriamente a partir da base de dados do laboratório.

3.2. Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir de sangue periférico colhido em tubos com EDTA utilizando o extrator automático QIAasymphony™ (Qiagen, Hilden, Germany), que se baseia no método de extração e purificação de ácidos nucleicos com esferas magnéticas revestidas com sílica que tem afinidade para o DNA. Esta metodologia permite obter DNA de alta qualidade num volume final de 100µL.

O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria, utilizando o Qubit™ 4 Fluometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) que utiliza um método baseado em fluorescência, em que a intensidade da fluorescência emitida é proporcional à concentração do DNA.

Após quantificação todas as amostras foram normalizadas para uma concentração final de 10ng/µL e armazenadas a 4°C até a sua utilização.

3.3. Preparação de bibliotecas para *Next Generation Sequencing*

O DNA genómico foi submetido a fragmentação enzimática com *Fragmentation Enzyme* (Twist Bioscience, San Francisco, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida procedeu-se à ligação de adaptadores universais, utilizando o Twist Human Core Exome Kit (Twist Bioscience), durante 15 minutos a 20°C. As amostras resultantes foram purificadas com esferas magnéticas, garantindo a remoção de fragmentos indesejados e a recuperação dos fragmentos de interesse. Estes foram amplificados por PCR com *Twist UDI Primer e Equinox Library Amp Mix* (Twist Bioscience), utilizando as condições detalhadas na Tabela 2.



Tabela 2. Programa de PCR utilizado para a amplificação do DNA fragmentado após a ligação dos adaptadores universais.

	Passo	Temperatura (°C)	Duração (s)	Número de Ciclos
1	Iniciação	98	45	1
	Desnaturação	98	15	
2	<i>Annealing</i>	60	30	7
	Extensão	72	30	
3	Extensão Final	72	60	1
4	Final hold	4	∞	∞

Após a amplificação fez-se uma nova purificação com esferas magnéticas e uma nova quantificação no Qubit™ 4 Fluometer para avaliar a eficiência da amplificação.

Com base na concentração de cada amostra, foram preparadas *pools* de até 16 amostras. Estas *pools* foram submetidas a hibridação com o *Twist Exome 2.0* (Twist Bioscience), de acordo com as instruções do fabricante.

A captura e purificação dos fragmentos hibridados com as sondas de interesse foi realizada com *Streptavidin Binding Beads* (Twist Bioscience), e sucessivas lavagens com *Binding Wash Buffers* adequados, de forma a eliminar contaminantes e enriquecer a captura das regiões alvo.

Os fragmentos assim obtidos foram submetidos a uma segunda amplificação, utilizando *Amplification Primers* e *Equinox Library Amp Mix* (Twist Bioscience) segundo condições descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Programa de amplificação utilizado após a captura por hibridação de sondas específicas.

	Passo	Temperatura (°C)	Duração (s)	Número de Ciclos
1	Iniciação	98	45	1
	Desnaturação	98	15	
2	<i>Annealing</i>	60	30	9
	Extensão	72	30	
3	Extensão final	72	60	1
4	Final hold	4	∞	∞

Após a amplificação procedeu-se a uma nova purificação com esferas magnéticas e quantificação com o Qubit™ 4 Fluometer, bem como análise do tamanho dos fragmentos obtidos utilizando o E-Gel™ Power Snap (Thermo Fisher Scientific). Apenas as bibliotecas que apresentaram concentração e qualidade adequadas foram elegíveis para sequenciação.



Seguidamente as bibliotecas foram normalizadas para uma concentração final de 5 nM e agrupadas em *pools* finais que foram submetidas a desnaturação química com NaOH. A estas *pools* foi adicionado o controlo interno PhiX (Illumina, San Diego, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

As bibliotecas foram sequenciadas em modo *paired-end* num total de 300 ciclos (2x150 bp) no sequenciador AVITI™ System (Element Biosciences, San Diego, CA, EUA) utilizando uma *High Output flowcell*.

3.4. Classificação e interpretação das variantes

Os dados gerados pelo sequenciador foram alinhados com o genoma humano de referência hg38/GRCh38, e as variantes identificadas foram anotadas recorrendo à plataforma eVai@ EnGenome, que integra diversas bases de dados, como ClinVar, gnomAD e OMIM, entre outras, permitindo a aplicação de filtros personalizados que auxiliam na interpretação das variantes (31–34).

A classificação das variantes seguiu as diretrizes da *American College of Medical Genetics (ACMG)*, que classifica as variantes em cinco categorias: benigna, provavelmente benigna, variante de significado clínico incerto, provavelmente patogénica ou patogénica, com base em evidências genéticas, populacionais, funcionais e clínicas (28).

CrITÉrios específicos foram utilizados para atribuir pontos de evidência a cada variante, e a aplicação combinada desses crITÉrios permitiu definir a classificação final. A descrição detalhada de cada crITÉrio e a aplicação para a determinação da classificação final encontram-se no Anexo 1 e 2, respetivamente.

Para a análise específica das amostras deste estudo, foi utilizado um filtro personalizado desenvolvido pelo laboratório, direcionado para perturbações de desenvolvimento intelectual, contendo um painel de genes associados a estas patologias. As variantes foram agrupadas e analisadas segundo o tipo de mutação, de acordo com o seu impacto:

- Tier 1: variantes com elevado impacto funcional, incluindo *frameshift*, ganho ou perda de codão stop, perda do codão de iniciação, deleções/inserções *out-of-frame* ou deleção de exões;
- Tier 2: variantes de impacto moderado, como *missense* e inserções/deleções *in-frame*;



- Tier 3: variante de provável impacto reduzido, como sinónimas e alterações no codão de iniciação ou no codão stop;
- CNV: alterações no número de cópias dos genes.

3.5. Sequenciação de Sanger

Após a sequenciação de nova geração e da análise bioinformática dos dados obtidos, as variantes potencialmente patogénicas ou de interesse clínico, foram validadas por sequenciação de Sanger de forma a assegurar a fiabilidade dos resultados obtidos através da NGS. Para realizar a sequenciação de Sanger as amostras de DNA foram primeiramente amplificadas por PCR utilizando primers específicos para a região de interesse. As reações de PCR foram preparadas para um volume final de 12,5 μL , contendo 2 μL de DNA (10ng/ μL), 1,25 μL de água/*optimizer* (5x), 6,25 μL *Master mix* (2x) e 1,5 μL de cada *primer* (10 μM). O programa de amplificação encontra-se descrito na Tabela 4.

Tabela 4. Programa de amplificação por PCR utilizado para a validação de variantes por sequenciação de Sanger.

	Passo	Temperatura (°C)	Duração	Número de Ciclos
1	Iniciação	95	15 min	1
	Desnaturação	94	45 s	
2	<i>Annealing</i>	60	1 min	35
	Extensão	72	1 min	
3	Extensão Final	72	10 min	1
4	Final hold	15	∞	∞

Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados com o reagente ExoSAP-ITTM (Thermo Fisher Scientific), seguindo as condições recomendadas (37°C durante 5 minutos, seguido de 80°C durante 10 minutos).

As amostras de DNA amplificadas e purificadas foram submetidas a uma reação de sequenciação utilizando o kit BigDyeTM Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. Após esta reação, os produtos foram purificados com colunas Zymo-SpinTM IB (Zymo Research, Irvine, CA, EUA). As amostras finais foram sequenciadas, utilizando o sequenciador SeqStudioTM Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). A análise dos eletroferogramas foi efetuada manualmente.



4. Resultados

4.1. Informação clínica dos doentes

Foram analisadas amostras de 18 doentes com suspeita de perturbações do desenvolvimento intelectual, tendo sido solicitado a pesquisa de um painel de genes para perturbação do desenvolvimento intelectual baseado em sequenciação de exoma completo. Do total de pacientes, 12 (66,7%) eram do género masculino e 6 (33,3%) eram do género feminino, com idades compreendidas entre os 3 anos e os 26 anos, sendo a média de 8 anos e a mediana de 6,5 anos. As manifestações clínicas apresentadas foram diversas, sendo as mais frequentemente observadas: atraso global do desenvolvimento, perturbação do espectro de autismo, dismorfias (específicas e inespecíficas), atraso desenvolvimento psicomotor e perturbação da linguagem. A Tabela 5 apresenta um resumo da informação clínica de cada caso, a versão com a descrição mais detalhada encontra-se no Anexo 3.

Tabela 5. Informação clínica dos pacientes com suspeita de perturbações do desenvolvimento intelectual.

Amostra	Sexo	Idade (anos)	Informação Clínica
1	M	12	PDI ligeiro familiar; Microcefalia, Baixa estatura e Dismorfias ligeiras
2	F	11	PDI com histórico familiar
3	M	4	AGD e Ausência de Linguagem
4	M	4	AGD+PPS
5	F	5	AGD e Dismorfias
6	F	13	PDI e Dismorfias inespecíficas
7	M	6	AGD e PEA
8	F	26	Dismorfias e Irmã com PDI
9	M	6	Atraso global psicomotor; PEA e Dismorfias inespecíficas
10	M	8	Défice cognitivo; PEA e Fácies peculiar, mas inespecífica
11	M	7	PEA não síndrómico e HxF PDI e défice de atenção
12	M	10	PDI com muitas dificuldades de aprendizagem
13	F	3	AGD com suspeita de PEA
14	M	16	PDI com dificuldades de aprendizagem e talvez epilepsia
15	F	3	AGD com suspeita de PEA
16	M	6	Atraso desenvolvimento psicomotor; PEA e Dismorfias inespecíficas
17	M	3	PDAH; Perturbação linguagem e PEA
18	M	9	PEA



Legenda: HxF- histórico familiar; F- feminino; M- masculino; AGD- atraso global de desenvolvimento; PEA- perturbação do espectro de autismo; PDI- perturbação desenvolvimento intelectual; PDAH- Perturbações de défice de atenção/hiperatividade; PPS- Perturbação Processamento sensorial.

4.2. Variantes genéticas detetadas

Foram analisadas 18 amostras de doentes com suspeita de perturbação de desenvolvimento intelectual, com o objetivo de identificar variantes genéticas potencialmente associadas ao respetivo fenótipo clínico, utilizando um painel de genes específico. Das amostras analisadas, 10 (55,6%) apresentaram pelo menos uma variante genética, enquanto 8 (44,4%) não relevaram variantes consideradas relevantes nos genes incluídos no painel. Entre os casos com variantes identificadas, 1 (6%) foi classificada como provavelmente patogénica, 1 (6%) como patogénica e 6 (33,3%) como variantes de significado clínico incerto (VUS). Em dois doentes (11,1%) foram detetadas múltiplas variantes: um apresentou duas VUS e o outro, uma VUS em conjunto com uma variante provavelmente patogénica. As variantes identificadas por NGS foram posteriormente validadas por PCR e sequenciação de Sanger, tendo-se verificado uma concordância de 100% entre as metodologias. Os resultados da análise encontram-se sumarizados na Figura 1.

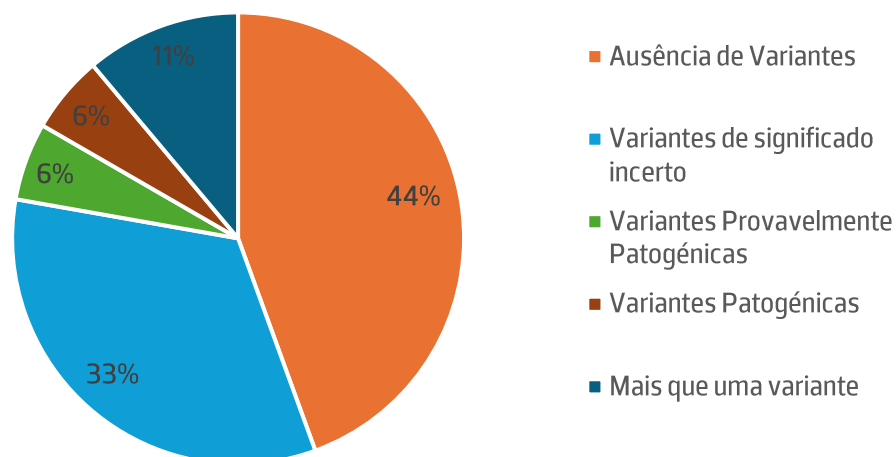


Figura 1. Distribuição das variantes encontradas por NGS em pacientes com suspeita de perturbação de desenvolvimento intelectual, segundo a classificação de ACMG.

A amostra foi igualmente analisada em função da idade dos doentes, tendo sido os resultados agrupados em ≤ 5 anos ou > 5 anos. Dos 18 casos estudados, 6 (33,3%) eram de



crianças com idade igual ou inferior a 5 anos, enquanto os restantes 12 (66,7%) eram de crianças com mais de 5 anos. No grupo mais jovem, foram identificadas variantes de significado incerto em 3 casos (50%), não se tendo detetado qualquer variante relevante nos restantes 3 casos (50%). No grupo com idade superior a 5 anos, foi identificada 1 variante patogénica (8,3%), 1 variante provavelmente patogénica (8,3%), 3 variantes de significado incerto (25%), 5 casos sem variantes relevantes (41,7%) e 2 casos com múltiplas variantes (16,7%), conforme ilustrado na Figura 2.

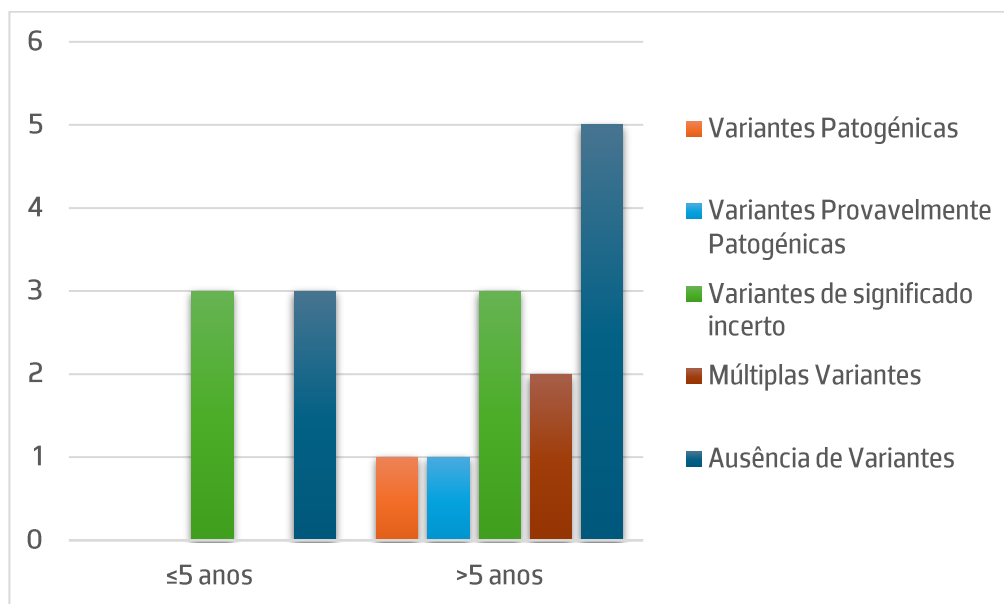


Figura 2. Distribuição das variantes encontradas por NGS segundo a classificação ACMG, em pacientes com suspeita de perturbação de desenvolvimento intelectual, estratificados por idade (≤5 anos ou >5 anos).

4.3. Identificação e classificação das variantes patogénicas e provavelmente patogénicas

Foram identificadas duas variantes classificadas como patogénicas ou provavelmente patogénicas (Tabela 6). A primeira foi detetada na amostra 1, correspondendo a uma variante localizada no local dador de *splicing* no gene *WDR62*. Esta variante foi detetada em homozigotia estando o gene *WDR62* associado a microcefalia primária tipo 2 (OMIM #604317). O fenótipo clínico do paciente inclui microcefalia, baixa estatura, perturbação do desenvolvimento intelectual ligeira e dismorfia facial ligeira, sendo bastante compatível com o quadro clínico descrito para a patologia associada ao gene *WDR62*.



Tabela 6. Variantes patogénicas identificadas por NGS em pacientes com suspeita de perturbação de desenvolvimento intelectual.

Amostra	Gene	Variante	Tipo de Mutação	Dados Populacionais	OMIM	ClinVar	Critérios de Classificação	Classificação (ACMG)
1	<i>WDR62</i>	c.3514+1G>A (NA)	Splice donor	gnomAD: Allele Frequency: 0.002293 %	Microcefalia 2, primária #604317	2 submissões: Patogénica e Provavelmente patogénica	PVS1 PM2 PM3	Patogénica
2	<i>AP1G1</i>	c.1135C>T (p.Arg379*)	Nonsense	Ausente no gnomAD	Síndrome de Usmani- Riazuddin #619467	Patogénica	PVS1 PM2	Provavelmente patogénica



A segunda foi identificada na amostra 2, no gene *AP1G1*, sendo uma variante *nonsense* (ganho de um codão de paragem). Esta variante foi detetada em heterozigotia, estando o gene *AP1G1* associado à síndrome de Usmani-Riazuddin (OMIM #619467). O doente apresenta perturbação do desenvolvimento intelectual com histórico familiar, que é compatível com o fenótipo descrito para esta síndrome, que inclui atraso global no desenvolvimento e défice cognitivo. Ambas as variantes apresentaram uma correlação genótipo-fenótipo consistente com os quadros clínico dos respetivos doentes, permitindo ser estabelecido um diagnóstico molecular.

As variantes foram analisadas segundo os critérios da ACMG (conforme descrito anteriormente e no Anexo 1 e 2), tendo sido consideradas múltiplas fontes de evidência. Ambas correspondem a variantes de perda de função (*nonsense* e *splice-site*), num contexto em que esse mecanismo é reconhecido como causador de doença para os respetivos genes, correspondendo ao critério PVS1. Relativamente aos dados populacionais, estas variantes ou estavam ausentes ou apresentavam uma frequência extremamente reduzida na base de dados gnomAD, justificando a aplicação do critério PM2. No caso da variante no gene *WDR62*, foram ainda consideradas duas submissões à base de dados ClinVar, com classificações patogénica e provavelmente patogénica, e foi aplicado o critério PM3, por se tratar de uma doença de transmissão recessiva e a variante ter sido identificada em homozigotia. Com base nestes critérios, a variante identificada no gene *WDR62* foi classificada como patogénica e a variante identificada no gene *AP1G1* foi classificada como provavelmente patogénica.

4.4. Identificação e classificação das variantes de significado clínico incerto

De entre as 10 amostras que apresentaram variantes, 6 (60%) continham variantes de significado clínico incerto. Estas variantes foram identificadas nas amostras 5, 9, 12, 13, 17 e 18. Todas as variantes detetadas são do tipo *missense* e localizam-se nos genes *SOX4*, *KDM6B*, *ANKRD17*, *TRRAP*, *CHD5* e *TNPO2*. A Tabela 7 apresenta, de forma detalhada, toda a informação relativa a estas variantes.

O quadro clínico observado nos doentes inclui, predominantemente, atraso global do desenvolvimento, perturbação do espectro do autismo, dificuldades cognitivas e dismorfias, sendo compatível com o quadro clínico descrito para cada gene na base de dados OMIM



(Anexo 4). No entanto, em alguns casos, a expressividade clínica observada foi mais suave do que a descrita na literatura para variantes patogénicas conhecidas nesses genes.

Relativamente à classificação das variantes, foi aplicado o critério PM2 a todas as variantes, uma vez que estas variantes estavam ausentes ou apresentavam uma frequência extremamente reduzida na base de dados gnomAD. Para além deste critério, foram aplicados outros critérios para a classificação das variantes.

Assim, na variante identificada no caso 5 foi também aplicado o critério PM1, dado que esta variante se localiza num domínio funcional crítico, apresentando o doente atraso global de desenvolvimento e dismorfias, características descritas em doentes com variantes causais no gene *SOX4*.

Na variante identificada no caso 9 foram aplicados os critérios PM2 e PP3, devido à previsão *in silico* de um efeito deletério na função da proteína. O doente apresenta atraso psicomotor, perturbação do espectro de autismo e dismorfias inespecíficas, achados compatíveis com os fenótipos descritos para a síndrome do neurodesenvolvimento de Stolerman.

Na variante identificada no caso 12 foi aplicado o critério PP2. O doente apresenta perturbação do desenvolvimento intelectual com dificuldades de aprendizagem, que faz parte do fenótipo descrito na síndrome de Chopra–Amiel–Gordon.

Também na variante identificada no caso 13 foi aplicado o critério PP2. O doente apresenta atraso global do desenvolvimento com suspeita de autismo, o que poderá ser compatível com alterações no gene *TRRAP*.



Tabela 7. Variantes de significado incerto identificadas por NGS em pacientes com suspeita de perturbação de desenvolvimento intelectual.

Amostra	Gene	Variante	Tipo de Mutação	Dados Populacionais	OMIM	ClinVar	Crítérios de Classificação	Classificação (ACMG)
5	<i>SOX4</i>	c.223C>T (p.Arg75Cys)	Missense	Ausente no gnomAD	Síndrome Coffin-Siris #618506	Nenhuma submissão	PM2 PM1	VUS
9	<i>KDM6B</i>	c.3679G>C (p.Gly1227Arg)	Missense	Allele Frequency: 0.000964 %	Síndrome do neurodesenvolvimento de Stolerman #618505	Nenhuma submissão	PM2 PP3	VUS
12	<i>ANKRD17</i>	c.4082C>T (p.Ala1361Val)	Missense	Ausente no gnomAD	Síndrome Chopra-Amiel-Gordon #619504	Nenhuma submissão	PM2 PP2	VUS
13	<i>TRRAP</i>	c.840C>G (p.Phe280Leu)	Missense	Ausente no gnomAD	Atraso no desenvolvimento #618454	Provavelmente benigna	PM2 PP2	VUS
17	<i>CHD5</i>	c.257C>T (p.Ser86Leu)	Missense	Allele Frequency: 0.00094 %	Síndrome do neurodesenvolvimento de Parenti-Mignot #619873	Provavelmente benigna	PM2 PP2	VUS
18	<i>TNPO2</i>	c.1495A>G (p.Ser499Gly)	Missense	Ausente no gnomAD	Transtorno do desenvolvimento intelectual #619556	Nenhuma submissão	PM2 PP3 PP2	VUS



Na variante identificada no caso 17 foram aplicados os critérios PM2 e PP2. O doente apresenta perturbação de hiperatividade e défice de atenção, perturbação da linguagem e autismo, características que são sobreponíveis com a síndrome de neurodesenvolvimento de Parenti-Mignot. Por fim, na variante identificada no caso 18 foram também aplicados os critérios PP2 e PP3, devido a um possível impacto no *splicing* pela localização da variante na penúltima base do exão 14. O doente apresenta perturbação do espectro de autismo, compatível com os escassos relatos clínicos associados a variantes no gene *TNPO2*.

Apesar dos critérios aplicados, todas as variantes foram classificadas como de significado clínico incerto, uma vez que os dados disponíveis não permitem uma classificação mais conclusiva. Assim, estas variantes podem ou não ser causais para os fenótipos observados.

4.5. Identificação e análise de amostras com múltiplas variantes

Foram identificadas múltiplas variantes em apenas dois dos casos analisados: 6 e 10 (Tabela 8). Na amostra 6, foram detetadas duas variantes *missense*: uma no gene *MED13* e outra no gene *USP7*. Ambas foram classificadas como variantes de significado clínico incerto.

Para a variante no gene *MED13*, foram aplicados os critérios PM2, por ausência na base de dados gnomAD, e PP3, com base em previsões *in silico* que sugerem um efeito deletério. Relativamente à variante no gene *USP7*, além do critério PM2, foram aplicados os critérios PP2, por se tratar de uma variante *missense* num gene em que este é um mecanismo comum de doença, e PM5, por ocorrer numa posição onde uma variante diferente *missense* já foi previamente classificada como patogénica.

Clinicamente, o doente apresenta perturbação do desenvolvimento intelectual e dismorfias, um quadro compatível com ambas as variantes. De acordo com o OMIM, alterações no gene *MED13* estão associadas a transtornos do neurodesenvolvimento, enquanto variantes no gene *USP7* podem causar a síndrome Hao-Fountain (33).



Tabela 8. Amostras com múltiplas variantes identificadas por NGS em pacientes com suspeita de perturbação de desenvolvimento intelectual.

Amostra	Gene	Variante	Tipo de Mutação	Dados Populacionais	OMIM	ClinVar	Crítérios de Classificação	Classificação (ACMG)
6	<i>MED13</i>	c.4237G>C (p.Asp1413His)	Missense	Ausente no gnomAD	Transtorno de desenvolvimento intelectual #618009	Nenhuma submissão	PM2 PP3	VUS
	<i>USP7</i>	c.1260G>T (p.Lys420Asn)	Missense	Ausente no gnomAD	Síndrome Hao-Fountain #616863	Provavelmente patogénica	PM2 PM5 PP2	VUS
10	<i>TCF20</i>	c.1531_1532dupCT (p.Lys512fs)	Frameshift	Ausente no gnomAD	Atraso no desenvolvimento #618430	Nenhuma submissão	PVS1 PM2	Provavelmente patogénica
	<i>UBE3A</i>	c.146A>G (p.Glu49Gly)	Missense	Ausente no gnomAD	Síndrome Angelman #105830	VUS	PM2 PP2	VUS



Na amostra 10, foram identificadas duas variantes: uma *frameshift* no gene *TCF20* e uma *missense* no gene *UBE3A*. Ambas estão ausentes na base de dados gnomAD, justificando a aplicação do critério PM2. A variante no gene *TCF20* foi classificada como provavelmente patogénica, pois, além do PM2, foi aplicado o critério PVS1, por corresponder a uma alteração de perda de função num gene em que este mecanismo é conhecido como causador de doença. A variante no gene *UBE3A* foi classificada como VUS, com base nos critérios PM2 e PP2. O doente apresenta défice cognitivo, perturbação do espectro de autismo e fácies peculiar, mas inespecífica, isto é, um conjunto de manifestações potencialmente compatíveis com alterações em ambos os genes. O gene *TCF20* tem sido associado a síndromes de neurodesenvolvimento, enquanto alterações no *UBE3A* estão ligadas à síndrome de Angelman, cuja apresentação clínica é mais específica e complexa. A sobreposição fenotípica dificulta, neste caso, a determinação da contribuição individual de cada variante para o quadro clínico do doente.

4.6. Associação das variantes com o fenótipo clínico

De forma a explorar a relação entre os achados genéticos e a apresentação clínica dos doentes incluídos neste estudo, foi realizada uma análise dos principais fenótipos observados, nomeadamente perturbação do desenvolvimento intelectual, atraso global do desenvolvimento, atraso global psicomotor, dismorfias, perturbação do processamento sensorial, perturbação da linguagem, perturbações do espectro de autismo, epilepsia e perturbações de défice de atenção/hiperatividade.

Os fenótipos foram agrupados com base nas manifestações clínicas predominantes descritas nos processos clínicos. Importa salientar que, dada a frequência de fenótipos sobrepostos em doenças genéticas, um mesmo doente pode apresentar mais do que um fenótipo entre os listados. Por esse motivo, uma mesma variante genética identificada num doente pode estar representada em mais do que uma categoria fenotípica, quando aplicável. Assim, o número total de variantes listadas na tabela é superior ao número total de variantes identificadas no estudo, uma vez que algumas foram contabilizadas em múltiplos fenótipos para refletir a complexidade clínica dos casos. Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 9.

Tabela 9. Principais fenótipos observados nos pacientes com suspeita de perturbação de desenvolvimento intelectual e número de variantes identificadas em cada grupo fenotípico.

Principais Fenótipos	Nº de Casos	Patogénica	Provavelmente patogénica	VUS	Negativo
Perturbação desenvolvimento intelectual	6	1	2	2	1
Atraso global de desenvolvimento	6			2	4
Atraso global psicomotor	2			1	1
Dismorfias	8	1	1	3	3
Perturbação processamento sensorial	2			1	1
Perturbação da linguagem	2			1	1
Perturbação do espectro de autismo	9		1	5	3
Epilepsia	1				1
PDAH	1			1	

Legenda: PDAH- Perturbações de défice de atenção/hiperatividade.

Da análise dos dados apresentados na Tabela 9, observa-se que os fenótipos mais frequentemente associados à presença de variantes classificadas como patogénicas ou provavelmente patogénicas foram a perturbação do desenvolvimento intelectual, dismorfias e a perturbação do espectro do autismo. Por outro lado, fenótipos como o atraso global do desenvolvimento, dismorfias e perturbação do espectro de autismo apresentaram uma maior proporção de variantes classificadas como de significado clínico incerto ou com resultado negativo. Todos os outros fenótipos, como o atraso global psicomotor, perturbação processamento sensorial, perturbação da linguagem, epilepsia e PDAH apresentaram também variantes de significado clínico incerto ou com resultado negativo. Estes achados refletem, em parte, a heterogeneidade clínica e genética dos quadros avaliados, bem como a limitação atual na interpretação de algumas variantes, particularmente em contextos fenotípicos menos específicos. A presença de variantes patogénicas em fenótipos mais definidos poderá sugerir uma maior correlação genótipo-fenótipo nestes casos.

4.6.1. Amostras com histórico familiar

Relativamente ao histórico familiar, foi possível obter informação clínica em seis casos. Destes, dois apresentaram variantes classificadas como patogénicas ou provavelmente patogénicas, correspondendo aos casos com variantes causais identificadas no estudo.



Outros dois casos apresentaram variantes de significado incerto, e os restantes dois não revelaram qualquer alteração genética relevante. Embora o número de casos com dados disponíveis seja reduzido, a presença de histórico familiar positivo nos casos com variantes patogénicas pode sugerir uma possível relação causal. As amostras que continham variantes e histórico familiar estão exemplificadas na Tabela 10.

Tabela 10. Variantes identificadas por NGS em pacientes com histórico familiar de perturbações do desenvolvimento intelectual.

Amostra	Histórico Familiar	Tipo de Variante	Gene Afetado
1	PDI ligeiro	Patogénica	<i>WDR62</i>
2	PDI ligeiro	Provavelmente Patogénica	<i>AP1G1</i>
5	Irmão com atraso na fala Irmão morte súbita	VUS	<i>SOX4</i>
13	Pai com PDAH Irmão com PDAH	VUS	<i>TRRAP</i>

Legenda: PDI- Perturbação do desenvolvimento intelectual; PDAH- Perturbações de défice atenção/hiperatividade



5. Discussão

Neste trabalho, foi efetuada a análise molecular em 18 pacientes com suspeita de perturbação do desenvolvimento intelectual, onde foi utilizado um painel para perturbação do desenvolvimento intelectual baseado em sequenciação de exoma completo. A amostra, predominantemente composta por indivíduos do sexo masculino (66,7%), refletiu a tendência já descrita na literatura de maior prevalência de alterações do neurodesenvolvimento em rapazes, nomeadamente no défice intelectual, atraso global de desenvolvimento e perturbação do espectro de autismo (7,10,35,36). As manifestações clínicas observadas foram variadas, mas coerentes com os fenótipos geralmente associados às condições genéticas subjacentes, incluindo atraso do desenvolvimento psicomotor, dismorfias e perturbações da linguagem. Esta heterogeneidade clínica justifica, por si só, a utilização de abordagens de diagnóstico molecular abrangentes como a NGS, capazes de investigar múltiplos genes simultaneamente, aumentando assim a taxa diagnóstica em contextos complexos, como os casos acompanhados pela neuropediatria.

A taxa de diagnóstico global foi de 25%, considerando as variantes classificadas como patogénicas ou provavelmente patogénicas. Este valor encontra-se dentro do intervalo reportado em alguns estudos que exploraram a taxa de diagnóstico, através da aplicação de painéis genéticos, tendo sido registados valores entre os 11 e os 39% (1,36–38). Um outro estudo, em 2015, realizado por Grozeva *et al.* em que foi aplicado um painel de 253 genes associados a défice intelectual em 986 doentes com défice intelectual moderado a grave obteve uma taxa de diagnóstico de 11% (39). Em variados estudos foram examinadas as taxas de VUS entre doentes submetidos a sequenciação do exoma para uma variedade de indicações e encontraram taxas de 25 a 86% (1,40,41). A elevada proporção de variantes de significado clínico incerto (33,3%) reflete uma das principais limitações da genómica clínica atual: a dificuldade em interpretar alterações genéticas cuja relevância funcional ainda não está completamente estabelecida. Este desafio é particularmente evidente em doenças do neurodesenvolvimento, dada a sua heterogeneidade clínica e genética (8,15).

A estratificação dos resultados por idade revelou diferenças relevantes na distribuição das variantes identificadas. No grupo de crianças com ≤ 5 anos, não foram identificadas variantes patogénicas ou provavelmente patogénicas, tendo sido detetadas apenas variantes de significado clínico incerto (50%). Por contraste, no grupo > 5 anos, observou-se uma maior diversidade de classificações, incluindo variantes patogénicas (8,3%) e



provavelmente patogénicas (8,3%). No estudo de Arteché-López *et al.* 84% dos doentes com um diagnóstico genético tinham 5 anos ou mais, em contraste, apenas em 4% dos doentes com menos de 5 anos foi obtido um diagnóstico, os autores atribuem este baixo rendimento diagnóstico à natureza multifatorial das perturbações do espectro de autismo, em que tanto as variantes comuns como as raras contribuem para o risco para autismo (42). Por outro lado, num estudo feito em 90 crianças, os casos positivos eram em crianças ligeiramente mais velhas, embora a diferença não fosse significativa (43). Esta discrepância pode estar associada à evolução natural dos fenótipos clínicos, que se tornam mais definidos com o tempo, permitindo uma melhor correlação genótipo-fenótipo (44). De facto, nas crianças mais novas, a informação clínica disponível centrava-se sobretudo em manifestações inespecíficas como atraso global de desenvolvimento e suspeita de perturbação do espectro de autismo, enquanto nos doentes mais velhos era possível identificar diagnósticos mais estruturados, como défice intelectual, perturbações da linguagem, atraso psicomotor ou outros sinais neurológicos específicos. Esta maior especificidade clínica nos doentes mais velhos facilita a interpretação dos achados genéticos e a sua classificação. Além disso, reforça a importância de um seguimento clínico nestes casos, que permita reavaliar tanto o fenótipo como os dados genéticos, podendo assim aumentar a taxa de diagnóstico em 10 a 16% (37).

5.1. Casos com variantes patogénicas/provavelmente patogénicas

A identificação de variantes patogénicas e provavelmente patogénicas nos genes *WDR62* e *AP1G1* permitiu o estabelecimento de um diagnóstico molecular em dois casos (12%), que está em concordância com taxas de diagnóstico descritas em estudos com metodologias semelhantes, como referido anteriormente.

A variante no gene *WDR62*, identificada em homocigotia, está associada à microcefalia primária tipo 2, uma condição de transmissão autossómica recessiva bem descrita na literatura. O gene *WDR62* tem expressão predominante no cérebro fetal, e codifica uma proteína envolvida em processos fundamentais do neurodesenvolvimento, nomeadamente na regulação do ciclo celular das células progenitoras neuronais, na proliferação celular e na migração radial dos neurónios ao longo do córtex cerebral (45–47). Ou seja, o gene *WDR62* controla a forma como estas células se dividem durante o



desenvolvimento cerebral. Através da sua ação na organização do fuso mitótico, assegura que as divisões celulares ocorram corretamente, permitindo a formação de um número adequado de neurónios e a sua correta migração para o córtex. A disfunção deste gene pode, por isso, levar à redução do volume cerebral e a anomalias estruturais, como observado em casos de microcefalia primária (33,45,48,49). Zombor *et al.* (2019), relatou o caso de dois doentes, com a mesma mutação no gene *WDR62*, também em homozigotia, em que ambos tinham microcefalia congénita, baixa estatura e atraso grave no desenvolvimento (50). O tipo de variante e o quadro clínico apresentado pelo doente identificado é compatível com o descrito na literatura para variantes no gene *WDR62* (45,49,50). A variante encontrada, localizada no local dador de *splicing*, resultará, muito provavelmente, em perda de função, resultando no fenótipo clínico observado neste doente. O fenótipo apresentado por este doente com microcefalia, dismorfias, baixa estatura e défice intelectual ligeiro, mostra uma elevada correlação com os dados publicados, fortalecendo a classificação patogénica atribuída à variante.

No segundo caso, foi identificada uma variante *nonsense* no gene *AP1G1*, associada à síndrome de Usmani-Riazuddin, cuja relevância clínica tem vindo a ser progressivamente reconhecida (51). Este gene codifica a subunidade gama-1 do complexo proteico 1, integrante da família de complexos de proteínas adaptadoras (AP) que medeiam o tráfico vesicular intracelular e a localização polarizada de proteínas em neurónios. Alterações em diferentes subunidades destes complexos têm sido envolvidas em diversas doenças hereditárias, incluindo o défice intelectual (52,53). Esta síndrome, associada ao *AP1G1*, caracteriza-se por défice intelectual e atraso global no desenvolvimento (33,52). Gnazzo *et al.* (2024) descreveu o segundo caso conhecido de síndrome de Usmani-Riazuddin, associado a uma variante *de novo* no *AP1G1* classificada como provavelmente patogénica, à semelhança da identificada no presente trabalho (51). Contudo, nesse caso, o quadro clínico era mais acentuado contrastando com o observado no doente descrito neste estudo, para o qual apenas é referida a presença de défice intelectual. A existência de antecedentes familiares de défice intelectual neste caso sugere um possível padrão de hereditariedade autossómica dominante, compatível com o modo de transmissão da síndrome.



5.2. Casos com variantes de significado clínico incerto

As variantes de significado clínico incerto identificadas em seis doentes refletem um dos principais desafios na interpretação do papel causal de variantes identificadas pela aplicação de painéis de NGS aplicados a perturbações do neurodesenvolvimento. Tal como descrito na literatura, mesmo quando se obtêm achados moleculares relevantes, a sua interpretação pode permanecer ambígua devido à limitação de evidência funcional, baixa frequência populacional e heterogeneidade fenotípica (28,54).

Todas as variantes identificadas foram do tipo *missense*, um tipo de alteração frequentemente classificado como VUS devido à dificuldade em prever com confiança o seu impacto funcional. Os genes afetados, *SOX4*, *KDM6B*, *ANKRD17*, *TRRAP*, *CHD5* e *TNPO2*, estão todos descritos em bases de dados, como a OMIM, estando associados doenças do neurodesenvolvimento, ainda que com graus distintos de validação clínica (33).

O gene *SOX4* codifica um fator de transcrição com um papel fundamental na diferenciação neuronal e no desenvolvimento do sistema nervoso central (55,56). De acordo com Zawerton *et al.* (2019), variantes *de novo* neste gene estão associadas a uma síndrome do neurodesenvolvimento caracterizada por défice intelectual, atraso motor e da linguagem, dismorfias faciais, e em alguns casos, perturbação do espectro de autismo (57). Achados semelhantes foram também descritos por Angelozzi *et al.* (2022) e Grosse *et al.* (2023), que relataram casos com variantes *missense* e fenótipos predominantemente com atraso global do desenvolvimento e dismorfias leves (56,58). A semelhança fenotípica com o doente onde foi encontrada uma variante neste gene reforça a hipótese de que esta alteração possa ter um impacto clínico relevante.

O gene *KDM6B* é responsável pela metilação e desmetilação das histonas que afeta a expressão génica durante o desenvolvimento (59). Alterações neste gene perturbam a regulação epigenética, afetando trajetórias do desenvolvimento neuronal, contribuindo, assim, para um fenótipo complexo. Um estudo recente, descrito por Rots *et al.* (2023), revelou que variantes em heterozigotia no gene *KDM6B*, maioritariamente *de novo*, estão associadas a atraso global do desenvolvimento, perturbação do espectro do autismo, anomalias comportamentais e dismorfias faciais variáveis (60). No presente caso clínico, as principais manifestações encontram-se em linha com o fenótipo descrito, embora também tenha presente baixa estatura e perturbações sensoriais ainda muito pouco



relatadas na literatura, podendo refletir alterações subtis e reforçar a variabilidade fenotípica associada às mutações neste gene.

A haploinsuficiência do gene *ANKRD17*, causada por variantes de perda de função em heterozigotia, está associada a uma síndrome do neurodesenvolvimento de transmissão autossómica dominante conhecida como síndrome Chopra–Amiel–Gordon (61). Estudos recentes descreveram doentes portadores de variantes heterozigóticas de perda de função, incluindo *nonsense*, *frameshift* e *splicing*, com fenótipos variados (61–63). Chopra *et al.* relataram 34 casos com défice intelectual leve a moderado, atraso na fala, dismorfias faciais típicas, alterações comportamentais, anomalias estruturais cerebrais e infeções recorrentes, mostrando grande variabilidade clínica (61). Por outro lado, Chen *et al.* descreveram um paciente com uma variante de *splicing-site* que apresentava atraso no desenvolvimento e de fala, evidenciando um fenótipo mais leve (62). Neste estudo, foi identificada uma variante em heterozigotia de significado clínico incerto, num doente que apenas apresentava défice intelectual com dificuldades na aprendizagem. A ausência desta variante nas bases de dados populacionais reforça a sua raridade e apoia a sua possível relevância clínica. O fenótipo atenuado observado, em comparação com a descrição da síndrome, não exclui uma relação com a variante, mas reforça a possibilidade de que o gene *ANKRD17* esteja associado a um espectro fenotípico mais amplo.

O gene *TRRAP* codifica uma proteína adaptadora essencial, moduladora de fatores de transcrição e que desempenha um papel crítico na regulação transcricional, reparação do DNA e desenvolvimento neuronal, logo alterações neste gene impactam a função neuronal e a homeostase eletrofisiológica (64). Cogné *et al.* (2019), associaram variantes *missense de novo* no gene *TRRAP* a dois fenótipos principais: um quadro sindrómico mais grave com dismorfias e malformações, e um quadro mais restrito com atraso global de desenvolvimento e epilepsia (64). No caso onde foi identificada uma variante neste gene, o doente apenas apresentava atraso global de desenvolvimento e suspeita de perturbação do espectro de autismo, mas sem malformações ou outras alterações fenotípicas marcantes. Continha também uma história familiar positiva, com o pai diagnosticado com perturbação do espectro de autismo e PDAH, além de um irmão com PDAH, sugerindo um padrão familiar de traços neurocomportamentais, levantando a hipótese de um efeito hereditário. Num outro estudo, efetuado por Huang *et al.* (2022), foram descritas múltiplas variantes raras, incluindo no gene *TRRAP*, presentes em irmãos afetados com atraso global



e psicose (65). Assim, a parcial concordância com o fenótipo clínico, a raridade da variante e o historial familiar apontam para um possível contributo funcional no contexto de um quadro clínico de alterações do neurodesenvolvimento hereditário.

O gene *CHD5* faz parte dos remodeladores da cromatina, e tem um papel essencial na regulação da expressão génica durante o neurodesenvolvimento, através da modulação da estrutura da cromatina e acetilação das histonas (66). Estudos demonstraram que este gene é fortemente expresso no sistema nervoso central humano, principalmente durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal, tendo a sua alteração sido descrita em modelos animais, tendo sido associada a alterações cognitivas e comportamentais (67,68). Parenti *et al.* (2021), descreveram um grupo de 16 pessoas com variantes *de novo* ou herdadas no gene *CHD5*, nos quais os sintomas mais frequentes eram atraso da linguagem (81%), défice intelectual (64%), epilepsia (62%) e perturbação do espectro de autismo (69%) (69). Neste estudo, o doente onde a variante neste gene foi detetada, tinha como fenótipo perturbação do desenvolvimento da linguagem, perturbação do espectro de autismo e PDAH. O fenótipo descrito na literatura está em concordância com o do doente do presente estudo, especialmente nos domínios comportamental e da linguagem, sugerindo que esta variante pode representar uma manifestação mais atenuada do espectro associado ao gene *CHD5*.

Por último, foi identificada uma variante de significado clínico incerto no gene *TNPO2*, ausente na base de dados populacional gnomAD, num doente com perturbação do espectro do autismo como manifestação clínica isolada. Este gene codifica a transportina-2, uma proteína envolvida no transporte ativo para o núcleo de proteínas essenciais ao neurodesenvolvimento, incluindo reguladores de expressão génica e da estabilidade do RNA (70,71). Goodman *et al.* (2021) descreveram variantes *de novo* patogénicas no *TNPO2*, associadas a um fenótipo com atraso global do desenvolvimento, dismorfias faciais, hipotonia, epilepsia e microcefalia. O estudo em *Drosophila* revelou que variantes no *TNPO2* perturbam significativamente a sua função da transportina-2, causando fenótipos neurológicos como défices de movimento, alterações na morfologia neuronal e redução da coordenação motora (70). O caso presente neste estudo tem um fenótipo demasiado simples comparado com o descrito na literatura, podendo dever-se a uma expressividade variável, ou a uma localização específica da variante fora dos domínios funcionais mais críticos. Embora esta variante esteja ausente nas bases de dados populacionais, as



evidências clínicas atuais são insuficientes para estabelecer uma associação causal definitiva.

Os critérios de classificação utilizados, permitiram aplicar evidências moderada e de suporte, mas não foram suficientes para classificar qualquer variante como (provavelmente) patogénica. Isto reforça a importância da integração entre dados genéticos, clínicos e funcionais, bem como da necessidade de reavaliação periódica destas variantes de modo a permitir uma eventual reclassificação das variantes identificadas.

Apesar de não se ter chegado a um diagnóstico conclusivo nestes casos, a identificação destas VUS tem valor clínico, pois poderá guiar futuras análises familiares, estimular estudos funcionais e uma reclassificação futura.

5.3. Casos com múltiplas variantes

Em dois dos casos analisados (amostras 6 e 10), foram identificadas múltiplas variantes genéticas. No caso da amostra 6, a presença de variantes *missense* nos genes *MED13* e *USP7* reflete um padrão compatível com síndromes já descritas (72–77). Variantes em *MED13* têm sido associadas a quadros clínicos com atraso global do desenvolvimento, dismorfias faciais, macrocefalia e baixa estatura (75,77). Adicionalmente, mutações *de novo* neste gene têm sido descritas em indivíduos com perturbação do espectro de autismo, reforçando a variabilidade fenotípica associada a este gene (74,76). A variante identificada no gene *USP7*, por outro lado, está relacionada com a síndrome de Hao-Fountain, caracterizada por défice intelectual, atraso na fala, comportamentos repetitivos e dismorfias suaves (72,73). Ambas as variantes poderão contribuir para o fenótipo observado no doente, perturbação do desenvolvimento intelectual e dismorfias inespecíficas.

Na amostra 10, uma variante *frameshift* no gene *TCF20* foi classificada como provavelmente patogénica. Estudos recentes demonstraram que mutações neste gene causam um fenótipo caracterizado por défice cognitivo, perturbação do espectro de autismo, hipotonia e dismorfias (78,79). Por outro lado, foi também identificada uma variante *missense* no gene *UBE3A*, que está relacionado com a síndrome de Angelman, caracterizada por défice cognitivo grave, ausência de fala e crises epilépticas (80–82). Contudo, variantes herdadas em *UBE3A* têm sido associadas a formas atenuadas da



perturbação do espectro de autismo, o que poderá justificar o quadro clínico do doente, que é caracterizado apenas por défice cognitivo, perturbação do espectro de autismo e fácies peculiar, mas inespecífica (83).

A identificação de múltiplas variantes genéticas nestes casos levanta a possibilidade de mecanismos genéticos associados, nomeadamente o efeito aditivo e o efeito modificador, ambos já descritos como relevantes em doenças do neurodesenvolvimento (84,85). O efeito aditivo ocorre quando várias variantes com impacto funcional moderado contribuem cumulativamente para o fenótipo (84). O efeito modificador implica que uma variante, embora não patogénica por si só, possa influenciar a expressão, gravidade ou características clínicas associadas a uma variante primária (85). No caso da amostra 6, a combinação das variantes VUS nos genes *MED13* e *USP7*, ambos associados a síndromes do neurodesenvolvimento, poderá ter um efeito aditivo, sendo o fenótipo do doente compatível com manifestações de ambos os genes. Por outro lado, a amostra 10, que apresenta uma variante *frameshift* no gene *TCF20* e uma variante *missense* no gene *UBE3A*, poderá ter um efeito modificador, em que *UBE3A*, pode modular a expressividade do quadro clínico associado a *TCF20*, contribuindo para a presença de traços de perturbação do espectro de autismo e dismorfias mais inespecíficas.

Assim, a presença de múltiplas variantes em genes associados com o neurodesenvolvimento, reforça a importância de considerar modelos genéticos mais complexos, sobretudo em casos em que o fenótipo não é completamente explicado por uma única variante.

5.4. Principais mecanismos associados às doenças do neurodesenvolvimento

Diversos mecanismos moleculares têm sido envolvidos nas doenças do neurodesenvolvimento. De entre estes, destacam-se a regulação epigenética e a expressão génica, a ubiquitinação e degradação proteica, o transporte intracelular de proteínas, a proliferação e migração neuronal e os mecanismos de transporte nuclear e estabilidade do RNA (81,86,87).

Um dos mecanismos no desenvolvimento cerebral é a divisão e migração das células progenitoras neuronais, essencial para a formação do córtex. Neste contexto, destaca-se o gene *WDR62*, onde foi identificada uma variante patogénica. Este codifica uma proteína



que atua na organização do fuso mitótico e migração neuronal, sendo bem estabelecida a sua associação com microcefalia primária e atraso no desenvolvimento. (45–47)

Neste estudo foram também identificadas variantes nos genes *KDM6B*, *TRRAP*, *CHD5*, *SOX4*, *MED13* e *TCF20* que estão relacionados com a regulação epigenética e o controlo da expressão génica, mecanismos fundamentais para a diferenciação e maturação neuronal. Por exemplo, o gene *KDM6B* atua na desmetilação de histonas, o gene *TRRAP* está envolvido na regulação transcricional, o gene *CHD5* participa no remodelamento da cromatina e o gene *TCF20*, onde foi identificada uma variante provavelmente patogénica, atua como cofator transcricional, estando todos eles associados a atraso do desenvolvimento (59,64,66,78).

Outro mecanismo envolvido nas doenças do neurodesenvolvimento é o transporte intracelular de proteínas, essencial para o correto funcionamento sináptico. O gene *AP1G1*, onde também foi identificada uma variante provavelmente patogénica, codifica uma subunidade do complexo adaptador AP-1, responsável pelo transporte de proteínas do complexo de Golgi para os endossomas e na manutenção da função sináptica, também crucial para a conectividade neuronal (52,53).

A ubiquitinação e regulação da degradação proteica constitui outro mecanismo relevante. A este grupo pertence o gene *UBE3A*, onde uma ubiquitina ligase tem como alvo as proteínas para degradação pelo proteossoma. Este gene é conhecido pela sua relação com a síndrome de Angelman, mas também tem sido associado a formas atenuadas do espectro do autismo quando variantes afetam parcialmente a sua função (80,81). Inclui-se ainda o gene *USP7*, codificante de uma desubiquitinase, que está associado à síndrome de Hao-Fountain, com défice intelectual e dismorfias suaves (72,73).

Por fim, mecanismos de transporte nuclear e estabilidade de RNA estão representados pelo gene *TNPO2*, onde foi identificada uma VUS. Este gene codifica a transportina-2, uma proteína envolvida no transporte ativo de proteínas reguladoras da transcrição e estabilidade do RNA para o núcleo (70,71).

Assim, este estudo reforça a complexidade dos transtornos do neurodesenvolvimento e a importância de considerar múltiplas vias celulares, bem como interações genéticas.



6. Conclusão

No presente estudo, foi possível identificar variantes em 10 dos 18 casos estudados, tendo sido identificada apenas uma variante patogénica e uma variante provavelmente patogénica nos genes *WDR62* e *AP1G1*, respetivamente. Foram também detetadas 6 variantes classificadas como variantes de significado clínico incerto, localizadas em genes previamente implicados em síndromes do neurodesenvolvimento, nomeadamente *SOX4*, *KDM6B*, *ANKRD17*, *TRRAP*, *CHD5* e *TNPO2*. Adicionalmente, dois casos apresentaram múltiplas variantes genéticas, levantando a hipótese de efeitos genéticos aditivos ou modificadores, reforçando a complexidade destas patologias.

Os resultados obtidos reforçam a natureza altamente heterogénea das perturbações do neurodesenvolvimento, e evidenciam a importância de considerar diferentes mecanismos moleculares na sua origem. Apesar das limitações à interpretação de variantes de significado clínico incerto e ao facto de não terem ainda sido efetuados os estudos de segregação familiar, este estudo contribui para o aprofundamento da caracterização genotípica destas patologias, com implicações relevantes para o diagnóstico.

Numa perspetiva futura, será fundamental incorporar dados de segregação familiar para uma melhor interpretação, principalmente das variantes de significado clínico incerto, contribuindo assim para a reclassificação de variantes, para o estabelecimento de um diagnóstico molecular e de correlações genótipo-fenótipo mais precisas.



7. Referências Bibliográficas

1. Savatt JM, Myers SM. Genetic Testing in Neurodevelopmental Disorders. *Front Pediatr.* 2021;9:526779.
2. Wu R, Li X, Meng Z, Li P, He Z, Liang L. Phenotypic and genetic analysis of children with unexplained neurodevelopmental delay and neurodevelopmental comorbidities in a Chinese cohort using trio-based whole-exome sequencing. *Orphanet J Rare Dis.* 19 de maio de 2024;19(1):205.
3. Shin S, Lee J, Kim YG, Ha C, Park JH, Kim JW, et al. Genetic Diagnosis of Children With Neurodevelopmental Disorders Using Whole Genome Sequencing. *Pediatr Neurol.* dezembro de 2023;149:44–52.
4. Ilic N, Maric N, Maver A, Armengol L, Kravljanc R, Cirkovic J, et al. Reverse Phenotyping after Whole-Exome Sequencing in Children with Developmental Delay/Intellectual Disability—An Exception or a Necessity? *Genes.* junho de 2024;15(6):789.
5. Shchubelka K, Turova L, Wolfsberger W, Kalanquin K, Williston K, Kurutsa O, et al. Genetic determinants of global developmental delay and intellectual disability in Ukrainian children. *J Neurodev Disord.* 27 de março de 2024;16(1):13.
6. Xu J, Su W, Wang Y, Luo Y, Ye F, Xu Y, et al. Genetic analysis of 280 children with unexplained developmental delay or intellectual disability using whole exome sequencing. *BMC Pediatr.* 25 de novembro de 2024;24(1):766.
7. Álvarez-Mora MI, Sánchez A, Rodríguez-Revenga L, Corominas J, Rabionet R, Puig S, et al. Diagnostic yield of next-generation sequencing in 87 families with neurodevelopmental disorders. *Orphanet J Rare Dis.* 19 de fevereiro de 2022;17(1):60.
8. Trinh J, Kandaswamy KK, Werber M, Weiss MER, Oprea G, Kishore S, et al. Novel pathogenic variants and multiple molecular diagnoses in neurodevelopmental disorders. *J Neurodev Disord.* 25 de junho de 2019;11(1):11.
9. Kim J, Lee J, Jang DH. Combining chromosomal microarray and clinical exome sequencing for genetic diagnosis of intellectual disability. *Sci Rep.* 20 de dezembro de 2023;13(1):22807.
10. Zhang J, Xu Y, Liu Y, Yue L, Jin H, Chen Y, et al. Genetic Testing for Global Developmental Delay in Early Childhood. *JAMA Netw Open.* 5 de junho de 2024;7(6):e2415084.
11. Chiurazzi P, Kiani AK, Miertus J, Paolacci S, Barati S, Manara E, et al. Genetic analysis of intellectual disability and autism. *Acta Bio-Medica Atenei Parm.* 9 de novembro de 2020;91(13-5):e2020003.
12. Nguengang Wakap S, Lambert DM, Olry A, Rodwell C, Gueydan C, Lanneau V, et al. Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *Eur J Hum Genet EJHG.* fevereiro de 2020;28(2):165–73.



13. Manickam K, McClain MR, Demmer LA, Biswas S, Kearney HM, Malinowski J, et al. Exome and genome sequencing for pediatric patients with congenital anomalies or intellectual disability: an evidence-based clinical guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. novembro de 2021;23(11):2029–37.
14. Alvarez-Mora MI, Rodríguez-Revenga L, Jodar M, Potrony M, Sanchez A, Badenas C, et al. Implementation of Exome Sequencing in Clinical Practice for Neurological Disorders. *Genes*. 28 de março de 2023;14(4):813.
15. Rosina E, Pezzani L, Apuril E, Pezzoli L, Marchetti D, Bellini M, et al. Comparison of first-tier whole-exome sequencing with a multi-step traditional approach for diagnosing paediatric outpatients: An Italian prospective study. *Mol Genet Genomic Med*. janeiro de 2024;12(1):e2316.
16. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet*. 14 de maio de 2010;86(5):749–64.
17. Malinowski J, Miller DT, Demmer L, Gannon J, Pereira EM, Schroeder MC, et al. Systematic evidence-based review: outcomes from exome and genome sequencing for pediatric patients with congenital anomalies or intellectual disability. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. junho de 2020;22(6):986–1004.
18. Sánchez Suárez A, Martínez Menéndez B, Escolar Escamilla E, Martínez Sarries FJ, Esparza Garrido MI, Gil-Fournier B, et al. Whole Exome Sequencing and Panel-Based Analysis in 176 Spanish Children with Neurodevelopmental Disorders: Focus on Autism Spectrum Disorder and/or Intellectual Disability/Global Developmental Delay. *Genes*. outubro de 2024;15(10):1310.
19. Bruno LP, Doddato G, Valentino F, Baldassarri M, Tita R, Fallerini C, et al. New Candidates for Autism/Intellectual Disability Identified by Whole-Exome Sequencing. *Int J Mol Sci*. janeiro de 2021;22(24):13439.
20. Zhong Y, Xu F, Wu J, Schubert J, Li MM. Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine. *Ann Lab Med*. janeiro de 2021;41(1):25–43.
21. Le Duc D, Giulivi C, Hiatt SM, Napoli E, Panoutsopoulos A, Harlan De Crescenzo A, et al. Pathogenic WDFY3 variants cause neurodevelopmental disorders and opposing effects on brain size. *Brain J Neurol*. 1 de setembro de 2019;142(9):2617–30.
22. Samir S. Human DNA Mutations and their Impact on Genetic Disorders. *Recent Pat Biotechnol*. 2024;18(4):288–315.
23. Stefl S, Nishi H, Petukh M, Panchenko AR, Alexov E. Molecular mechanisms of disease-causing missense mutations. *J Mol Biol*. 1 de novembro de 2013;425(21):3919–36.



24. Wagner RN, Wießner M, Friedrich A, Zandanell J, Breitenbach-Koller H, Bauer JW. Emerging Personalized Opportunities for Enhancing Translational Readthrough in Rare Genetic Diseases and Beyond. *Int J Mol Sci.* 23 de março de 2023;24(7):6101.
25. Romero Romero ML, Landerer C, Poehls J, Toth-Petroczy A. Phenotypic mutations contribute to protein diversity and shape protein evolution. *Protein Sci.* 2022;31(9):e4397.
26. Anna A, Monika G. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *J Appl Genet.* 2018;59(3):253–68.
27. Tabolacci E, Nobile V, Pucci C, Chiurazzi P. Mechanisms of the FMR1 Repeat Instability: How Does the CGG Sequence Expand? *Int J Mol Sci.* 12 de maio de 2022;23(10):5425.
28. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* maio de 2015;17(5):405–24.
29. Kobayashi Y, Chen E, Facio FM, Metz H, Poll SR, Swartzlander D, et al. Clinical Variant Reclassification in Hereditary Disease Genetic Testing. *JAMA Netw Open.* 6 de novembro de 2024;7(11):e2444526.
30. Durkie M, Cassidy EJ, Berry I, Owens M, Turnbull C, Taylor RW, et al. ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification in Rare Disease 2024.
31. National Center for Biotechnology Information (NCBI). ClinVar: Aggregated information about genomic variation and its relationship to human health [Internet]. [citado 13 de maio de 2025]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
32. Broad Institute. gnomAD: Genome Aggregation Database [Internet]. [citado 13 de maio de 2025]. Disponível em: <https://gnomad.broadinstitute.org/>
33. Johns Hopkins University. OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man [Internet]. [citado 13 de maio de 2025]. Disponível em: <https://www.omim.org/>
34. EnGenome Srl. eVai: Clinical variant interpretation platform [Internet]. [citado 13 de maio de 2025]. Disponível em: <https://engenome.com/evai/>
35. Mellone S, Puricelli C, Vurchio D, Ronzani S, Favini S, Maruzzi A, et al. The Usefulness of a Targeted Next Generation Sequencing Gene Panel in Providing Molecular Diagnosis to Patients With a Broad Spectrum of Neurodevelopmental Disorders. *Front Genet.* 11 de agosto de 2022;13:875182.
36. Pekeles H, Accogli A, Boudrahem-Addour N, Russell L, Parente F, Srour M. Diagnostic Yield of Intellectual Disability Gene Panels. *Pediatr Neurol.* março de 2019;92:32–6.
37. AlMutiri R, Malta M, Shevell MI, Srour M. Evaluation of Individuals with Non-Syndromic Global Developmental Delay and Intellectual Disability. *Children.* 21 de fevereiro de 2023;10(3):414.



38. Chérot E, Keren B, Dubourg C, Carré W, Fradin M, Lavillaureix A, et al. Using medical exome sequencing to identify the causes of neurodevelopmental disorders: Experience of 2 clinical units and 216 patients. *Clin Genet.* março de 2018;93(3):567–76.
39. Grozeva D, Carss K, Spasic-Boskovic O, Tejada MI, Gecz J, Shaw M, et al. Targeted Next-Generation Sequencing Analysis of 1,000 Individuals with Intellectual Disability. *Hum Mutat.* dezembro de 2015;36(12):1197–204.
40. Srivastava S, Cohen JS, Vernon H, Barañano K, McClellan R, Jamal L, et al. Clinical whole exome sequencing in child neurology practice. *Ann Neurol.* outubro de 2014;76(4):473–83.
41. Vears DF, Niemiec E, Howard HC, Borry P. Analysis of VUS reporting, variant reinterpretation and recontact policies in clinical genomic sequencing consent forms. *Eur J Hum Genet EJHG.* dezembro de 2018;26(12):1743–51.
42. Arteché-López A, Gómez Rodríguez MJ, Sánchez Calvin MT, Quesada-Espinosa JF, Lezana Rosales JM, Palma Milla C, et al. Towards a Change in the Diagnostic Algorithm of Autism Spectrum Disorders: Evidence Supporting Whole Exome Sequencing as a First-Tier Test. *Genes.* 12 de abril de 2021;12(4):560.
43. Boyarchuk O, Volianska L, Smashna O, Makukh H. Exome sequencing in 90 children with developmental delay: a single-center experience. *Front Genet.* 29 de novembro de 2024;15:1505254.
44. Bowling KM, Thompson ML, Amaral MD, Finnila CR, Hiatt SM, Engel KL, et al. Genomic diagnosis for children with intellectual disability and/or developmental delay. *Genome Med.* 30 de maio de 2017;9(1):43.
45. Nicholas AK, Khurshid M, Désir J, Carvalho OP, Cox JJ, Thornton G, et al. WDR62 is associated with the spindle pole and is mutated in human microcephaly. *Nat Genet.* novembro de 2010;42(11):1010–4.
46. Zhi Y, Yu J, Zhong Y, Fu H, Zhou X, Yi W, et al. WDR62 controls cortical radial migration and callosal projection of neurons in the developing cerebral cortex. *Neurobiol Dis.* julho de 2025;211:106951.
47. Shohayeb B, Ho UY, Hassan H, Piper M, Ng DCH. The Spindle-Associated Microcephaly Protein, WDR62, Is Required for Neurogenesis and Development of the Hippocampus. *Front Cell Dev Biol [Internet].* 11 de setembro de 2020 [citado 3 de julho de 2025];8. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2020.549353/full>
48. Bilgüvar K, Oztürk AK, Louvi A, Kwan KY, Choi M, Tatli B, et al. Whole-exome sequencing identifies recessive WDR62 mutations in severe brain malformations. *Nature.* 9 de setembro de 2010;467(7312):207–10.
49. Yu TW, Mochida GH, Tischfield DJ, Sgaier SK, Flores-Sarnat L, Sergi CM, et al. Mutations in WDR62, encoding a centrosome-associated protein, cause microcephaly with



- simplified gyri and abnormal cortical architecture. *Nat Genet.* novembro de 2010;42(11):1015–20.
50. Zombor M, Kalmár T, Nagy N, Berényi M, Telcs B, Maróti Z, et al. A novel WDR62 missense mutation in microcephaly with abnormal cortical architecture and review of the literature. *J Appl Genet.* 1 de maio de 2019;60(2):151–62.
51. Gnazzo M, Pascolini G, Parlapiano G, Petrizelli F, Perrino D, Porco L, et al. Usmani-Riazuddin syndrome can have a recognizable phenotype: Report of a novel AP1G1 variant. *Clin Genet.* julho de 2024;106(1):109–13.
52. Usmani MA, Ahmed ZM, Magini P, Pienkowski VM, Rasmussen KJ, Hernan R, et al. De novo and bi-allelic variants in AP1G1 cause neurodevelopmental disorder with developmental delay, intellectual disability, and epilepsy. *Am J Hum Genet.* 1 de julho de 2021;108(7):1330–41.
53. Bowman P, Grimes H, Dallosso AR, Berry I, Mullin S, Rankin J, et al. Whole genome sequencing for copy number variant detection to improve diagnosis and management of rare diseases. *Dev Med Child Neurol.* janeiro de 2025;67(1):126–31.
54. Wright CF, McRae JF, Clayton S, Gallone G, Aitken S, FitzGerald TW, et al. Making new genetic diagnoses with old data: iterative reanalysis and reporting from genome-wide data in 1,133 families with developmental disorders. *Genet Med.* 1 de outubro de 2018;20(10):1216–23.
55. Zhang D, Gong B, Zhao Q, Li Z, Tan X, Hua Z. SOX4 Mediates ATRA-Induced Differentiation in Neuroblastoma Cells. *Cancers.* 17 de novembro de 2022;14(22):5642.
56. Angelozzi M, Karvande A, Molin AN, Ritter AL, Leonard JMM, Savatt JM, et al. Consolidation of the clinical and genetic definition of a SOX4-related neurodevelopmental syndrome. *J Med Genet.* novembro de 2022;59(11):1058–68.
57. Zawerton A, Yao B, Yeager JP, Pippucci T, Haseeb A, Smith JD, et al. De Novo SOX4 Variants Cause a Neurodevelopmental Disease Associated with Mild Dysmorphism. *Am J Hum Genet.* 7 de fevereiro de 2019;104(2):246–59.
58. Grosse M, Kuechler A, Dabir T, Spranger S, Beck-Wödl S, Bertrand M, et al. Novel Variants of SOX4 in Patients with Intellectual Disability. *Int J Mol Sci.* 9 de fevereiro de 2023;24(4):3519.
59. Stolerman ES, Francisco E, Stallworth JL, Jones JR, Monaghan KG, Keller-Ramey J, et al. Genetic variants in the KDM6B gene are associated with neurodevelopmental delays and dysmorphic features. *Am J Med Genet A.* julho de 2019;179(7):1276–86.
60. Rots D, Jakub TE, Keung C, Jackson A, Banka S, Pfundt R, et al. The clinical and molecular spectrum of the KDM6B-related neurodevelopmental disorder. *Am J Hum Genet.* 1 de junho de 2023;110(6):963–78.
61. Chopra M, McEntagart M, Clayton-Smith J, Platzer K, Shukla A, Girisha KM, et al. Heterozygous ANKRD17 loss-of-function variants cause a syndrome with intellectual



- disability, speech delay, and dysmorphism. *Am J Hum Genet.* 3 de junho de 2021;108(6):1138–50.
- 62.Chen J, Yang S, Wang H, Wang H, Xiao Y, Liu S. Case report: Whole exome sequencing reveals a novel splicing variant of ANKRD17 gene in a Chinese male juvenile with developmental delay and transient tic disorder. *Front Genet.* 2024;15:1422469.
- 63.Tinatin T, Kakha B, Mikheil G, Tamari SD, Elene A. A case of Chopra–Amiel–Gordon syndrome with a novel heterozygous variant in the ANKRD17 gene: A case report. *SAGE Open Med Case Rep.* 2023;11:2050313X231186496.
- 64.Cogné B, Ehresmann S, Beauregard–Lacroix E, Rousseau J, Besnard T, Garcia T, et al. Missense Variants in the Histone Acetyltransferase Complex Component Gene TRRAP Cause Autism and Syndromic Intellectual Disability. *Am J Hum Genet.* 7 de março de 2019;104(3):530–41.
- 65.Huang YS, Fang TH, Kung B, Chen CH. Two Genetic Mechanisms in Two Siblings with Intellectual Disability, Autism Spectrum Disorder, and Psychosis. *J Pers Med.* 20 de junho de 2022;12(6):1013.
- 66.Egan CM, Nyman U, Skotte J, Streubel G, Turner S, O’Connell DJ, et al. CHD5 Is Required for Neurogenesis and Has a Dual Role in Facilitating Gene Expression and Polycomb Gene Repression. *Dev Cell.* 12 de agosto de 2013;26(3):223–36.
- 67.Bishop B, Ho KK, Tyler K, Smith A, Bonilla S, Leung YF, et al. The chromatin remodeler chd5 is necessary for proper head development during embryogenesis of *Danio rerio*. *Biochim Biophys Acta.* agosto de 2015;1849(8):1040–50.
- 68.Pisansky MT, Young AE, O’Connor MB, Gottesman II, Bagchi A, Gewirtz JC. Mice lacking the chromodomain helicase DNA-binding 5 chromatin remodeler display autism-like characteristics. *Transl Psychiatry.* 13 de junho de 2017;7(6):e1152.
- 69.Parenti I, Lehalle D, Nava C, Torti E, Leitão E, Person R, et al. Missense and truncating variants in CHD5 in a dominant neurodevelopmental disorder with intellectual disability, behavioral disturbances, and epilepsy. *Hum Genet.* julho de 2021;140(7):1109–20.
- 70.Goodman LD, Cope H, Nil Z, Ravenscroft TA, Charng WL, Lu S, et al. TNPO2 variants associate with human developmental delays, neurologic deficits, and dysmorphic features and alter TNPO2 activity in *Drosophila*. *Am J Hum Genet.* 2 de setembro de 2021;108(9):1669–91.
- 71.Moriyama T, Yoneda Y, Oka M, Yamada M. Transportin–2 plays a critical role in nucleocytoplasmic shuttling of oestrogen receptor– α . *Sci Rep.* 29 de outubro de 2020;10:18640.
- 72.Wimmer MC, Brennenstuhl H, Hirsch S, Dötsch L, Unser S, Caro P, et al. Hao–Fountain syndrome: 32 novel patients reveal new insights into the clinical spectrum. *Clin Genet.* maio de 2024;105(5):499–509.



73. Zheng H, Mei S, Li F, Wei L, Wang Y, Huang J, et al. Expansion of the mutation spectrum and phenotype of USP7-related neurodevelopmental disorder. *Front Mol Neurosci.* 2022;15:970649.
74. Pantalone G, Mancardi MM, Rossi A, Romanelli R, Marasco E, Carla M. A de novo frameshift variant in MED13 gene in a patient with autism spectrum disorder and magnetic resonance imaging abnormalities mimicking tuberous sclerosis. *Am J Med Genet A.* agosto de 2024;194(8):e63611.
75. Rogers AP, Friend K, Rawlings L, Barnett CP. A de novo missense variant in MED13 in a patient with global developmental delay, marked facial dysmorphism, macroglossia, short stature, and macrocephaly. *Am J Med Genet A.* agosto de 2021;185(8):2586–92.
76. Rivera MD, Aponte SN, Rivera F, Arciniegas NJ, Carlo S. MED13 Gene Mutation Related to Autism Spectrum Disorder: A Case Report. *Cureus.* maio de 2024;16(5):e59904.
77. Poot M. Mutations in Mediator Complex Genes CDK8, MED12, MED13, and MEDL13 Mediate Overlapping Developmental Syndromes. *Mol Syndromol.* janeiro de 2020;10(5):239–42.
78. Torti E, Keren B, Palmer EE, Zhu Z, Afenjar A, Anderson IJ, et al. Variants in TCF20 in neurodevelopmental disability: description of 27 new patients and review of literature. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* setembro de 2019;21(9):2036–42.
79. Poquérousse J, Whitford W, Taylor J, Gregersen N, Love DR, Tsang B, et al. Germline mosaicism in TCF20-associated neurodevelopmental disorders: a case study and literature review. *J Hum Genet.* abril de 2025;70(4):215–22.
80. Elgersma Y, Sonzogni M. UBE3A reinstatement as a disease-modifying therapy for Angelman syndrome. *Dev Med Child Neurol.* julho de 2021;63(7):802–7.
81. Lopez SJ, Segal DJ, LaSalle JM. UBE3A: An E3 Ubiquitin Ligase With Genome-Wide Impact in Neurodevelopmental Disease. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:476.
82. Biagioni M, Baronchelli F, Fossati M. Multiscale spatio-temporal dynamics of UBE3A gene in brain physiology and neurodevelopmental disorders. *Neurobiol Dis.* 15 de outubro de 2024;201:106669.
83. Roy B, Amemasor E, Hussain S, Castro K. UBE3A: The Role in Autism Spectrum Disorders (ASDs) and a Potential Candidate for Biomarker Studies and Designing Therapeutic Strategies. *Dis Basel Switz.* 27 de dezembro de 2023;12(1):7.
84. Klei L, Sanders SJ, Murtha MT, Hus V, Lowe JK, Willsey AJ, et al. Common genetic variants, acting additively, are a major source of risk for autism. *Mol Autism.* 15 de outubro de 2012;3:9.
85. Rylaarsdam L, Guemez-Gamboa A. Genetic Causes and Modifiers of Autism Spectrum Disorder. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:385.



86. Salinas RD, Connolly DR, Song H. Epigenetics in Neurodevelopment. *Neuropathol Appl Neurobiol.* fevereiro de 2020;46(1):6–27.
87. Nussbacher JK, Tabet R, Yeo GW, Lagier-Tourenne C. Disruption of RNA Metabolism in Neurological Diseases and Emerging Therapeutic Interventions. *Neuron.* 17 de abril de 2019;102(2):294–320.



Anexo 1. Descrição dos critérios aplicados na interpretação das variantes deste estudo, de acordo com as diretrizes do ACMG

Critérios utilizados	Tipo de evidência	Descrição resumida
PVS1	Muito forte	Perde de função num gene onde perda de função é um mecanismo conhecido de doença
PM1	Moderada	Localizada numa região funcional crítica
PM2	Moderada	Variante ausente ou muito rara em bases de dados populacionais
PM3	Moderada	Distúrbios recessivos, detetados em <i>trans</i> com uma variante patogénica
PM5	Moderada	Nova alteração num aminoácido, onde uma alteração diferente determinada como patogénica já foi observada antes
PP2	Suporte	Variante missense num gene que tem uma baixa taxa de variantes missense benignas e em que são um mecanismo comum de doença
PP3	Suporte	Evidências computacionais suportam um efeito deletério no gene

Anexo 2. Combinações dos critérios ACMG utilizadas para definição da classificação final das variantes

Categoria Final	Combinação típica dos critérios
Patogénica	PVS1 + 2 Moderadas (PM2, PM3)
Provavelmente patogénica	PVS1 + 1 Moderada (PM2)
Variante significado clínico incerto	Evidências contraditórias ou insuficientes



Anexo 3. Informação clínica completa dos pacientes com suspeita de perturbações do desenvolvimento intelectual

Amostra	Sexo	Idade (anos)	Informação Clínica
1	Masculino	12	PDI ligeiro familiar Microcefalia Baixa estatura <i>borderline</i> Pé boto unilateral corrigido Dismorfia facial ligeira e inespecífica Hiperlipidemia (RSE) X-Frágil compatível com "grey zone"
2	Feminino	11	Perturbação do desenvolvimento intelectual História familiar de PDI
3	Masculino	4	Atraso Global de Desenvolvimento Ausência de Linguagem Óculos (que não usa) Epicanto, noção de telecanto Loiríssimo, olho azul Estereotipias (movimentos repetitivos) Restrições Alimentares
4	Masculino	4	AGD+PPS (Pert. processamento sensorial) Antecedentes de hipotonia X-frágil negativo arr[hg19]- VUS (genes EXOC2; HUS1B)
5	Feminino	5	Atraso Global de Desenvolvimento Dismorfia Irmão com morte súbita nascença Irmão 3A com atraso da fala
6	Feminino	13	Perturbação desenvolvimento intelectual Facies peculiar inespecífica, sem dismorfias major
7	Masculino	6	Atraso Global de Desenvolvimento Perturbação espectro de autismo não síndromico Array e X-Frágil normais
8	Feminino	26	Membro de 4 irmãos, irmã com PDI Dismorfias KBG-like Hirsutismo Ptose congénita bilateral Pestanas longas Dentes desalinhados e macrodontia incisivos Biscupidia aórtica Microcefalia Baixa Estatura Camptodactilia 5º dedo mão bilateralmente Sindactilia 2-3 pés Sindactilia 5dedo direito Encurtamento 4º dedo pé esquerdo Painel FRAXA sem alterações
9	Masculino	6	Atraso global psicomotor com regressão Perturbação espectro de autismo Pert. processamento sensorial Baixa estatura Obstipação



Amostra	Sexo	Idade (anos)	Informação Clínica
			Dismorfias inespecíficas (sobrancelhas espessas, filtro longo) X-frágil e array sem alterações
10	Masculino	8	Défice cognitivo e PEA Facies peculiar, mas inespecífica Crescimento normal História familiar irrelevante
11	Masculino	7	PEA não sindrómico HxF PDI e défice de atenção (ramo paterno) (História Familiar) X-frágil e array normais
12	Masculino	10	PDI com muitas dificuldades de aprendizagem
13	Feminino	3	AGD com suspeita de PEA Não dismórfica Pai com PEA+PDAH Irmão com PDAH Array com alterações
14	Masculino	16	Sem dismorfias major PDI com dificuldades de aprendizagem Epilepsia generalizada idiopática? (2 episódios) AP prematuridade 33 semanas Gestação gemelar Array com alterações
15	Feminino	3	AGD com suspeita de PEA
16	Masculino	6	Atraso desenvolvimento psicomotor Perturbação espectro de autismo Obesidade Dismorfias inespecíficas: fronte alta, face plana, fendas palpebrais rasgadas X-Frágil negativo Array normal
17	Masculino	3	PDAH Perturbação linguagem Cognição não verbal em caracterização Perturbação do espectro de autismo
18	Masculino	9	Perturbação do espectro de autismo



Anexo 4. Síntese dos fenótipos descritos na base de dados OMIM associados aos genes com variantes de significado clínico incerto identificadas neste estudo

Gene	OMIM
<i>SOX4</i>	Perturbação do desenvolvimento intelectual ligeiro a grave Atraso global do desenvolvimento Dimorfismo facial ligeiro
<i>KDM6B</i>	Atraso global do desenvolvimento com atraso motor e na fala Perturbação do desenvolvimento intelectual ligeiro Perturbação do espectro de autismo Dismorfias ligeiras e inespecíficas Atraso global de desenvolvimento
<i>ANKRD17</i>	Perturbação desenvolvimento intelectual Atraso na fala Dismorfias faciais
<i>TRRAP</i>	Atraso global de desenvolvimento Perturbação do espectro de autismo Perturbação do desenvolvimento intelectual
<i>CHD5</i>	Atraso motor e na fala Perturbação do espectro de autismo Epilepsia (em alguns pacientes) Atraso global de desenvolvimento
<i>TNPO2</i>	Dismorfias inespecíficas Dificuldades na fala ou ausente Anormalidades comportamentais, características autistas



P.PORTO

ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE



M

MESTRADO

TÉCNICAS LABORATORIAIS EM BIOPATOLOGIA