

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

**ESTUDO GENÉTICO DE PACIENTES BRASILEIROS COM
MIOPATIAS RELACIONADAS À SELENOPROTEÍNA N1**

ERALDA LUÍZA CONCENTINO SLOMP

Belo Horizonte

2016

ERALDA LUÍZA CONCENTINO SLOMP

**ESTUDO GENÉTICO DE PACIENTES BRASILEIROS COM
MIOPATIAS RELACIONADAS À SELENOPROTEÍNA N1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti.

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina da UFMG
Agosto de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitora: Prof^a. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof^a. Denise Maria Trombert de Oliveira

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof^a. Adelina Martha dos Reis

Diretor da Faculdade de Medicina: Tarcizo Afonso Nunes

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: Humberto José Alves

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Luiz Armando C. de Marco

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Edson Samesima Tatsuo

Chefe do Departamento de Pediatria: Profa. Cláudia Regina Lindgren Alves

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente: Prof. Eduardo Araújo Oliveira

Subcoordenador do Programa de Pós-Graduação em Medicina - Área de concentração em pediatria: Prof. Jorge Andrade Pinto

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Área de concentração em Saúde da Criança e do Adolescente:

Profa. Ana Cristina Simões e Silva – Titular / Prof. Leandro F. M. Diniz – Suplente

Prof. Eduardo Araújo de Oliveira – Titular / Profa. Eleonora M. Lima – Suplente

Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira – Titular / Prof. Cássio da C. Ibiapina – Suplente

Prof. Jorge Andrade Pinto – Titular / Profa Helena Maria G. Becker – Suplente

Profa. Juliana Gurgel – Titular / Profa Ivani Novato Silva – Suplente

Profa. Maria Cândida F. B. Viana – Titular / Profa Luana C. dos Santos – Suplente

Prof. Sérgio V. B. Pinheiro – Titular / Prof. Marcos José B. de Aguiar – Suplente

Profa Roberta M.C. Romanelli – Titular / Profa. Débora M. de Miranda – Suplente

Dedico esta, como todas as
minhas conquistas passadas
e futuras à minha
querida mãe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por abençoar constantemente meus projetos e sonhos. Por guiar as minhas escolhas e colocar pessoas tão especiais na minha vida, às quais também devo meus sinceros agradecimentos.

À minha orientadora, Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti, agradeço cada oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

À Dr^a. Mariz Vainzof, por todo o apoio dado a nesta pesquisa, pela oportunidade de trabalho e aprendizado junto à sua equipe e também pela oportunidade de enriquecer este trabalho através da inclusão dos pacientes do Centro de Estudos do Genoma Humano-USP.

Ao Prof. Luiz Armando e à equipe do Laboratório de Medicina Molecular da FM-UFMG pela parceria e apoio neste trabalho.

Aos doutores Charles Marques Lourenço e Vanessa Van Der Linden pela oportunidade de enriquecimento deste trabalho através da inclusão de seus pacientes.

Ao Instituto Hermes Pardini pelas colaborações estabelecidas neste trabalho.

Aos meus irmãos, Luciana e Luis, pelo carinho e apoio.

Ao meu marido Rolf Slomp, pela admiração e incentivo constantes.

À minha sobrinha, Maria Eduarda, por ser elemento motivador para a conclusão desta etapa em minha vida profissional.

À minha amada mãe, por todo o seu amor e dedicação. Por ser meu grande exemplo de perseverança e fé. Obrigada, mamãe, por fazer de mim quem eu sou.

Ao meu querido pai, pelo amor, confiança e apoio.

Aos pais e pacientes que aceitaram participar deste trabalho.

NOTA EXPLICATIVA

Seguindo os critérios estabelecidos pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (FM-UFMG), esta tese foi elaborada na forma de artigos científicos, contendo um artigo de revisão e outro original.

E de acordo com a resolução 03/2010 que regulamenta o formato de teses e dissertações do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da UFMG a apresentação desta tese seguirá o esquema:

1. Considerações iniciais
2. Artigo I - Sequenciamento de nova geração no estudo de miopatias relacionadas à selenoproteína N1.
3. Objetivos
4. Metodologia
5. Artigo II - Aplicação do Sequenciamento de Nova Geração (NGS) no estudo de mutações em pacientes brasileiros com miopatias relacionadas à selenoproteína N1.
6. Considerações finais
7. Apêndices e Anexos

RESUMO

Introdução: Diferentes formas de miopatias estão relacionadas ao gene da selenoproteína N1, entre as quais a distrofia muscular congênita tipo espinha rígida (DMER), miopatia multiminicore (Mm), desmiopatia com *mallory body* e miopatia com desproporção congênita de fibras (MDCF). Até o momento, não há estudos nacionais sobre mutações no gene *SEPN1* em pacientes brasileiros com miopatias relacionadas à selenoproteína N1. O presente estudo é uma tese de doutorado apresentada na forma de dois artigos científicos: o primeiro, uma revisão da literatura sobre o sequenciamento de nova geração no estudo de miopatias relacionadas à selenoproteína N1; e o segundo apresenta os resultados da aplicação do sequenciamento de nova geração no estudo de mutações em pacientes brasileiros portadores de miopatias relacionadas à selenoproteína N1, assim como o estudo destes pacientes para outros genes relacionados a doenças neuromusculares. **Objetivo:** Avaliar a presença e caracterizar as mutações no gene *SEPN1* em pacientes brasileiros com miopatias relacionadas à selenoproteína N1, correlacionando tais mutações aos achados clínicos e histopatológicos, assim como realizar a verificação de possíveis mutações em outros genes relacionados a doenças neuromusculares que apresentam características fenotípicas semelhantes aos das selenopatias. **Metodologia:** Incluíram-se 19 pacientes portadores de miopatias relacionadas à selenoproteína N1 de 16 famílias diferentes. Desses, 14 foram classificados como portadores de DMER, quatro com Mm e um com MDCF. Foram avaliados os aspectos clínicos, histopatológicos musculares (reações histológicas e histoquímicas musculares) e moleculares. O estudo genético foi feito através de sequenciamento de Sanger afim de detectar mutações no gene *SEPN1*. Os demais genes foram avaliados através de sequenciamento de nova geração realizado em painel contendo 61 principais genes relacionados a doenças neuromusculares. Realizou-se estudo de segregação familiar em alguns familiares por sequenciamento de Sanger. **Resultados:** O estudo molecular revelou mutações em 12 famílias. Família 1: um paciente com fenótipo clássico de Mm, apresentou uma mutação nova (c.1010G>T) em heterozigose composta com uma mutação patogênica já descrita (c.1384T>G) no gene *SEPN1*. Famílias 2, 3, 4 e 15: quatro pacientes não aparentados, com fenótipo de DMER, apresentaram a inserção de uma base fora de fase (c.713-714insA), três deles em heterozigose composta com outras mutações patogênicas, sendo uma delas uma mutação nova (3'UTR:c.53G>T) e um em homozigose (caso 18). Família 5: um paciente com Mm forma pré-natal com artrogripose e mutação com sentido trocado em heterozigose (c.583G>A), cuja alteração complementar não foi identificada. Família 16: um paciente com Mm no qual foi encontrada uma mutação patogênica (c.1406G>A) em heterozigose composta com uma mutação nova (c.1396C>T) no gene *SEPN1*. Família 14: um paciente com MDCF com inserção de 12 bases em fase (c.316-317ins12bp) no gene *SEPN1*, esta alteração foi considerada como um polimorfismo, neste paciente foram detectadas mutações em heterozigose composta (c.6469G>A/c.9457G>A) no gene *RYR1*. Família 12: três irmãos afetados com quadro de miopatia e rigidez cervical, nos quais foi identificada uma inserção em fase, de três pares de base, em heterozigose (c.438-439ins3bp) no gene *SEPN1*, esta alteração foi considerada como um polimorfismo e posteriormente foi detectada uma mutação patogênica no gene *LAMA2* em heterozigose composta com uma mutação nova (c.1259delA). Na Família 10 e 11 foram detectadas mutações em heterozigose composta nos genes *COL6A1* e

COL6A3, sendo na família 10 ambas já descritas como patogênicas (c.6859delG/c.6064_5G>A) e na família 11 uma mutação patogênica (c.850G>A) em heterozigose com uma mutação nova (c.2959G>A). **Conclusão:** As miopatias relacionadas à selenoproteína N1 apresentam ampla variabilidade fenotípica e genotípica. Foram detectadas 12 mutações patogênicas no gene *SEPN1* em 7 pacientes com DMER e Mm, dentre estas 4 não haviam registros na literatura médica. Além disso, foi possível detectar 10 mutações em 7 pacientes em outros 5 genes relacionados a doenças musculares incluídos no painel de NGS, sendo 8 descritas como patogênicas e duas mutações novas. A análise molecular pôde ajudar a confirmar o diagnóstico de doenças complexas que apresentam ampla variabilidade genética e fenotípica, bem como no aconselhamento genético das famílias .

Palavras-chave: Miopatias relacionadas à selenoproteína N1. Distrofia muscular congênita tipo espinha rígida. Miopatia multiminicore. Miopatia com desproporção congênita de fibras. Sequenciamento de nova geração.

ABSTRACT

Introduction: Different kinds of myopathy are related to the selenoprotein N1 gene, among which: congenital muscular dystrophy with rigid spine (RSMD) multimincore myopathy (Mm), desminopathy with Mallory body and congenital fiber-type disproportion myopathy (CFTD). Until the present moment there are not any national studies that evaluated mutations in the gene *SEPN1* in Brazilian patients with myopathy related to selenoprotein N1. This study is a PhD thesis and will be presented in the form of two scientific articles: the first is a literature review about the next generation sequencing in the study of the myopathies related to selenoprotein N1 and the second shows the results of the the next generation sequencing in the study of Brazilian patients with myopathies related to selenoprotein N1, and the study of these patients for others genes related to neuromuscular diseases. **Objective:** To evaluate the presence and characterize the mutations in the *SEPN1* gene in Brazilian patients with myopathies related to selenoprotein N1, correlate the mutations to clinical and histopathological findings, thereby checking mutations in some others genes related to neuromuscular diseases that can show similar phenotypic characteristics to the myopathies related to selenoprotein N1. **Methodology:** 19 patients were included with myopathies related to *SEPN1* from 16 different families. Among these, 14 were classified as RSMD, four with Mm, and one with CFTD. The clinical, muscular histopathologies (histological reactions and muscle histochemical) and molecular findings were evaluated for the characterization of mutations in the *SEPN1* gene to research and identify mutations in the *SEPN1* gene as well as in others genes included in the next generation sequencing technique that include the 61 principal genes related to neuromuscular diseases. We conducted family segregation studies of some families by Sanger sequencing. **Results:** The molecular study revealed mutations in 12 families. Family 1 : one patient with classic phenotype Mm , with one new mutation (c.1010G>T) in compound heterozygous with one pathogenic mutation already described (c.1384T>G) in *SEPN1* gene. Families 2, 3 , 4, and 15: four unrelated patients with RSMD phenotype, showed insertion of a base out of phase (c.713-714insA) , three of them in compound heterozygous with other pathogenic mutations, one being a new mutation (3'UTR: c.53G>T) and homozygous (case 18) Family 5: One patient with Mm prenatal form with arthrogyriposis showed a missense mutation in heterozygous (c.583G>A) in which the complementary change was not identified. Family 16: A patient with Mm was detected with a pathogenic mutation (c.1406G>A) in compound heterozygosity with a new mutation c.1396C>T. Family 14: One patient with CFTD showed insertion of 12 bases in phase (c.316-317 Ins.12bp), this insertion was considered a polymorphism. In this patient was a mutation detected in compound heterozygosity (c.6469G>A/c.9457G>A) in the *RYR1* gene. Family 12: three siblings with with RSMD phenotype , were identified with an insertion in frame, three base pairs, in heterozygous (c.438-439ins3bp), it was considered as a polymorphism. In this family a pathogenic mutation was detected in *LAMA2* gene in compound heterozygosity with a new mutation (c.1259delA). In the families 10 and 11 were mutations detected in compound heterozygosity in the *COL6A1* e *COL6A3* genes, in the family 10, both mutations were described as pathogenic (c.6859delG/ c.6064-5G>A) and in family 11 was one pathogenic mutation (c.850G>A) detected in compound heterozygous with a new mutation (c.2959G>A). **Conclusion:** myopathies related to selenoprotein N1 showed wide phenotypic and genotypic

variability. 12 pathogenic mutations were detected in SEPNI gene in 7 patients with RSMD and Mm, among them 4 didn't have registers in the medical literature. In Addition, it was possible to detect 10 mutations in 7 patients in 5 others genes related to neuromuscular diseases that were included in a NGS panel, being, 8 already described as a pathogenic mutations and, two were considered as new mutations. The molecular analysis could help to confirm the diagnosis of complex diseases that show wide genetic and phenotypic variability, as well as genetic counseling of the families.

Keywords: Myopathies related to selenoprotein N1. Congenital muscular dystrophy with rigid spine. Multiminicore myopathy. Congenital fiber-type disproportion myopathy. Next generation sequencing.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACD	Associação de Assistência à Criança Deficiente
AD	Autossômico dominante
AR	Autossômico recessiva
BP	<i>Base Pair</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CG	Citosina-Guanina
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COL6A1	Gene do Colágeno tipo VI alfa 1
COL6A3	Gene do Colágeno tipo VI alfa 3
DMER	Distrofia muscular congênita tipo espinha rígida
DNM	Doença neuromuscular
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
ERS	Elemento de redefinição da selenocisteína
FM	Faculdade de Medicina
Gomori	Tricrômico de gomori modificado
HC	Hospital das Clínicas
KB	<i>Kilobase</i>
LAMA2	Gene da Laminina alfa
LMNA	Gene da Lamina
MC	Miopatia congênita
MDCF	Miopatia com desproporção congênita de fibras
Mm	Miopatia multiminicore
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNA_t	Ácido ribonucleico transportador
RYR1	<i>Ryanodine Receptor Intracellular gene</i>
SEC	Selenocisteína
SECIS	Sequência de inserção da selenocisteína
SECISBP2	<i>Selenocysteine insertion sequence-binding protein 2</i>
SEPN1	Selenoproteína N1
SEPN1-MR	Miopatias relacionadas à selenoproteína N1

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais

USP

Universidade de São Paulo

SUMÁRIO¹

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	15
REFERÊNCIAS.....	17
2 ARTIGO 1 - SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO NO ESTUDO DAS MIOPATIAS RELACIONADAS À SELENOPROTEÍNA N1.....	18
3 OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4 METODOLOGIA.....	37
5 ARTIGO 2 - APLICAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS) NO ESTUDO DE MUTAÇÕES EM PACIENTES BRASILEIROS COM MIOPATIAS RELACIONADAS À.....	49
SELENOPROTEÍNA N1	
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93
APÊNDICES E ANEXOS.....	94

¹ Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas aprovadas pelo Acordo Ortográfico assinado entre os países que integram a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP), em vigor no Brasil desde 2009.

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A selenopatias são afecções que integram um grupo de miopatias relacionadas à selenoproteína N1. Esta é uma proteína da família das selenoproteínas, que são caracterizadas pela presença da selenocisteína (Sec) em sua estrutura primária. A selenocisteína representa a principal forma biológica do *selenium* (MOGHADASZADEH; BEGGS, 2006).

A selenoproteína N1 é codificada pelo gene *SEPN1*, que está localizado na décima terceira sub-banda, da sexta banda, da terceira região do braço curto do cromossomo 1 (1p36.13) e é uma glicoproteína integral de membrana de 70 kDa localizada no retículo endoplasmático de diversos tecidos e se expressa precocemente durante a embriogênese (MOGHADASZADEH et al. 2001; PETIT et al., 2003).

As primeiras mutações no gene da selenoproteína N1 (*SEPN1*) foram identificadas em pacientes com distrofia muscular congênita tipo espinha rígida (DMER) no ano de 2001, posteriormente mutações neste gene foram associadas à outras três formas de doenças musculares autossômicas recessivas, sendo elas, a miopatia multiminicore (Mm), a desminopatia com *Mallory body* e a miopatia com desproporção congênita de fibras (MDCF) (FERREIRO et al. 2002; 2004).

Contudo, apesar de apresentarem mutações em um mesmo gene e compartilharem algumas características semelhantes, estas quatro doenças musculares são descritas na literatura como condições com fenótipos clínicos e histopatológicos bem definidos (MOGHADASZADEH; BEGGS, 2006).

Devido a tais achados, pesquisas avaliando a associação desses fenótipos ao gene *SEPN1* têm sido realizadas em todo o mundo, porém ainda não havia estudos descritos envolvendo pacientes na população brasileira.

No entanto, realizou-se no período de 2009 a 2011 o primeiro estudo nacional, tratou-se de uma dissertação de mestrado na qual foram detectadas, através de sequenciamento de Sanger, mutações em 8 dos 18 pacientes incluídos no estudo.

Porém, dentre os pacientes nos quais identificou-se mutações no gene *SEPN1*, foi possível concluir o diagnóstico molecular de apenas um deles, pois apenas este apresentou mutação em heterozigose composta, nos demais foram

identificadas mutações em apenas um alelo, gerando a necessidade de um estudo mais aprofundado destes pacientes.

Desta forma, a presente tese de doutorado, teve como objetivo uma melhor caracterização do genótipo dos pacientes previamente estudados na dissertação de mestrado, assim como a verificação de mutações relacionadas a outros genes no espectro das doenças neuromusculares através da inclusão destes pacientes em um estudo realizado por sequenciamento de nova geração (NGS) utilizando um painel, contendo os 61 principais genes relacionados a doenças neuromusculares, como ferramenta molecular.

Esta tese de doutorado será apresentada sob a forma de artigos, conforme orientado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Para tal objetivo, foram elaborados dois artigos: o primeiro consiste em uma revisão da literatura sobre as miopatias relacionadas à selenoproteína N1, o gene *SEPN1*, o seu produto gênico e sobre as aplicações do sequenciamento de nova geração no estudo destas miopatias. O segundo artigo foi elaborado utilizando os resultados dos estudos clínicos, histopatológicos musculares e genéticos moleculares realizados em pacientes previamente classificados como portadores de miopatias relacionadas à *SEPN1* acompanhados no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), no Centro de Estudos do Genoma Humano da USP, na AACD de Recife e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Riberão Preto-USP, a partir de colaboração estabelecida entre a orientadora deste projeto e a Professora Dra. Mariz Vainzof, Dra. Vanessa Van Der Linden e Dr. Charles Marques Lourenço, respectivamente.

REFERÊNCIAS

MOGHADASZADEH, B.; BEGGS, A.H. Selenoproteins and their impact on human health through diverse physiological pathways. **Physiology (Bethesda)**, v. 21, p. 307-15, Oct. 2006.

MOGHADAZADEH, B. *et al.* Mutations in *SEPN1* cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome. **Nat Genet**, v. 29, p. 17-18, 2001.

PETIT, N. *et al.* Selenoprotein N: an endoplasmic reticulum glycoprotein with an early developmental expression pattern. **Hum Mol Genet**, v. 12, n. 9, p. 1045-53, May, 2003.

FERREIRO, A. *et al.* Mutations of the selenoprotein N gene, which is implicated in rigid spine muscular dystrophy, cause the classical phenotype of multiminicore disease: reassessing the nosology of early-onset myopathies. **Am J Hum Genet**, v. 71, p. 739-749, 2002.

FERREIRO, A. *et al.* Desmin-related myopathy with Mallory body-like inclusions is caused by mutations of the selenoprotein N gene. **Ann Neurol**, v. 55, n. 5, p. 676-86, 2004.

2 ARTIGO 1 – SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO NO ESTUDO DAS MIOPATIAS RELACIONADAS À SELENOPROTEÍNA N1

RESUMO

Este artigo refere-se a uma revisão bibliográfica sobre as selenopatias e as técnicas de estudo por sequenciamento de nova geração. **Fonte de dados:** revisão bibliográfica não sistemática, referente ao período de 1956 a 2016, utilizando as base de dados PubMed/ MEDLINE e LILACS, a partir das seguintes palavras-chave: miopatias relacionadas à selenoproteína N1, sequenciamento de nova geração, gene *SEPN1* e equipamentos de segunda geração. **Síntese dos dados:** as miopatias relacionadas à selenoproteína N1 representam um grupo heterogêneo do ponto de vista clínico e histopatológico. São reconhecidas quatro diferentes formas de miopatias, a distrofia muscular congênita forma espinha rígida, a miopatia multiminicore, a deminopatia com *mallory body* e a miopatia com desproporção congênita de fibras. Todas as quatro formas apresentam também grande heterogeneidade genética e fenotípica, fato que pode dificultar o diagnóstico destas doenças. O advento do sequenciamento de nova geração pode ser de grande utilidade na elucidação destes casos.

Palavras-chave: Miopatias relacionadas à selenoproteína N1. Distrofia muscular congênita tipo espinha rígida. Miopatia multiminicore. Deminopatia com *mallory body*. Miopatia com desproporção congênita de fibras. Sequenciamento de nova geração.

ABSTRACT

This article refers to a literature review about selenopathies, and the techniques for the study by next generation sequencing. **Data source:** non-systematic literature review, covering the period 1956 to 2016, using the database PubMed / MEDLINE and LILACS, from the following keywords: myopathies related to selenoprotein N1, SEPN1 gene, next generation sequencing, second generation equipment. **Data synthesis:** Myopathies related to selenoprotein N1 represent a heterogeneous group in terms of clinical and histopathological study. Four different types of myopathies are recognized, congenital muscular dystrophy with rigid spine. Multiminicore myopathy. Desminopathy with Mallory-body. Congenital fiber-type disproportion myopathy. All four forms also show wide genetic phenotypic and heterogeneity, a reason that can make the diagnosis of these diseases more difficult. The next generation sequencing can be of a good tool for these cases.

Keywords: Myopathies related to selenoprotein N1. Congenital muscular dystrophy with rigid spine. Multiminicore myopathy. Desminopathy with Mallory-body. Congenital fiber-type disproportion myopathy. Next generation sequencing.

2.1 Introdução

As miopatias relacionadas à selenoproteína N1 (SEPN1-MR), também denominadas como selenopatias, compreendem um grupo de miopatias relacionadas ao gene *SEPN1* recentemente reconhecido no qual se incluem três formas de miopatias congênitas e uma distrofia muscular congênita, sendo elas, a distrofia muscular congênita tipo espinha rígida (DMER), a miopatia multiminicore (Mm), a desminopatia com *mallory body* e a miopatia com desproporção congênita de fibras (MDCF)¹⁻⁴.

As miopatias congênitas consistem em um grupo de miopatias que se caracterizam por hipotonia e fraqueza muscular de início nos primeiros anos de vida. A biópsia muscular revela padrão miopático associado a alterações estruturais como cores, multiminicores, corpos nemalínicos entre outras^{5,6}. Por outro lado, as distrofias musculares congênitas apresentam-se clinicamente com sinais de fraqueza e hipotonia precocemente, porém a biópsia apresenta um padrão distrófico^{7,8}.

Nos últimos anos, a medida que os defeitos genéticos de grande número das miopatias e distrofias congênitas vem sendo identificados, surgiram algumas tentativas de classificações baseadas no defeito genético e no seu produto gênico⁶⁻⁸.

Os autores que sugerem esta classificações ressaltam que um mesmo defeito genético pode ser a causa de diferentes padrões histopatológicos, podendo as selenopatias serem caracterizadas como um exemplo da variabilidade fenotípica ligada a um mesmo gene por englobarem tanto formas de miopatias congênitas como de distrofias musculares congênitas⁶⁻⁸.

Miopatias congênitas	Distrofias musculares congênitas
Miopatia com desproporção congênita de fibras	DMC tipo 1: B, C e D
Miopatia de multiminicore	DMC Fukuyama
Miopatia miotubular	DMC <i>Muscle eye brain</i>
Miopatia centronuclear	Síndrome <i>walker-walburg</i>
Miopatia de central core	DMC tipo espinha rígida
Miopatia nemalínica	DMC tipo Ulrich
Miopatia com corpos nemalínicos associados a <i>cores</i>	DMC tipo Bethlem
Miopatia com corpos nemalínicos associados a <i>caps</i>	DMC com def. primária ou secundária daIntegrina
Miopatia com cardiopatia fatal	DMC com deficiência de Merosina
Miopatia com agregados de actina	
Miopatia com corpos nemalínicos	
<i>cap disease</i>	
Miopatia com corpos redutores	
Miopatia com corpos esferoides	
Miopatia congênita com miocardiopatia fatal	
Miopatia congênita por envolvimento distal ou artrogripose distal ou ambos	

Tabela 1 – Relação da principais miopatias e distrofias musculares congênitas⁶⁻⁷.

A selenoproteína N1 (SEPN1) pertence à família das selenoproteínas, sendo caracterizada dentre elas devido à presença da selenocisteína (SEC) em sua estrutura primária⁹. A selenocisteína representa a principal forma biológica do *selenium*. Esta é uma glicoproteína integral de membrana de 70 kDa localizada no retículo endoplasmático de diversos tecidos, incluindo pâncreas, fígado, coração, pulmão, cérebro e músculo-esquelético e que se expressa precocemente durante o desenvolvimento tecidual (Figura 1)⁹.

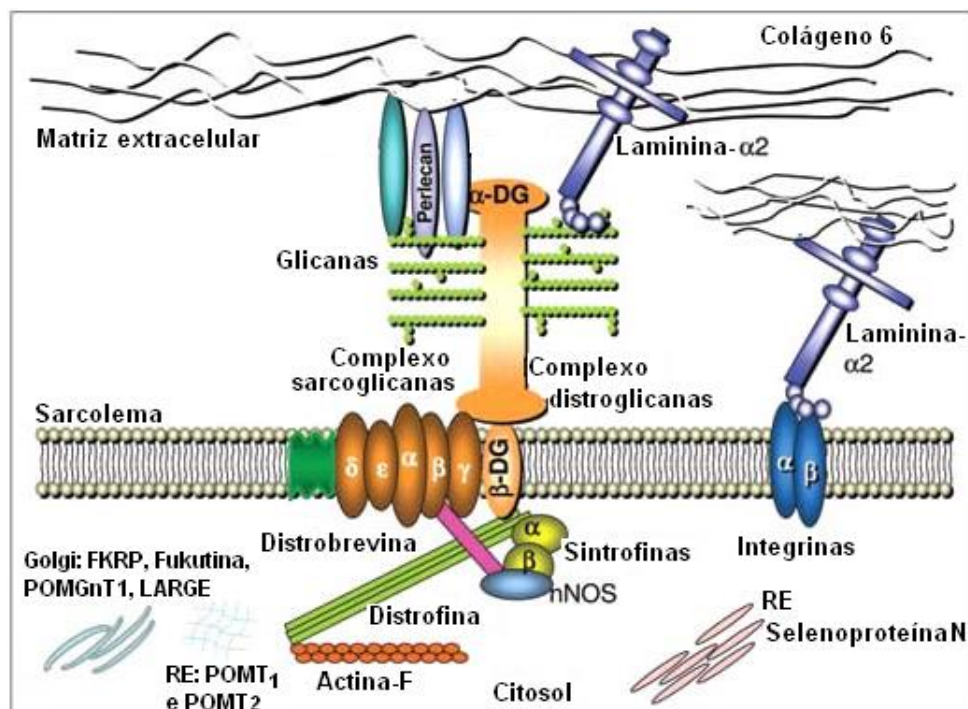


Figura 1 - Localização celular da selenoproteína N1. Adaptado-fontes:^{7,10}.

Somente duas, dentre as 25 selenoproteínas já identificadas em seres humanos, estão associadas a doenças genéticas, sendo a selenoproteína N1 a primeira delas⁹. Ainda não existe um sólido conhecimento em relação à função específica das selenoproteínas, nem mesmo a respeito da selenoproteína N1, porém, sabe-se que estas possuem relações com as reações de oxidação e redução e parece possuir função enzimática, porém o seu papel na patogênese das doenças musculares ainda não é bem estabelecido⁹. Estudos celulares recentes sugerem que células com deficiência de SEPN1 são mais suscetíveis ao estresse oxidativo^{11,12}.

A selenoproteína N1 contém 590 aminoácidos e possui duas isoformas, a 1 e a 2. A isoforma 1 consiste em uma proteína de comprimento total, já na isoforma 2 a sequência referente à região do exon 3 não está presente. As duas isoformas da proteína podem estar presentes, porém a isoforma 2 é sempre predominante, não havendo prejuízo da falta do produto do exon 3, pois este corresponde a um *splice* alternativo e não participa da codificação da proteína^{9,13}.

O gene da selenoproteína N1 (*SEPN1*) foi mapeado na décima primeira sub-banda, da sexta banda, da terceira região do braço curto do cromossomo 1 (1p36.11) em 1998 por Moghadaszadeh e colaboradores (*locus RSMD1*)¹⁴.

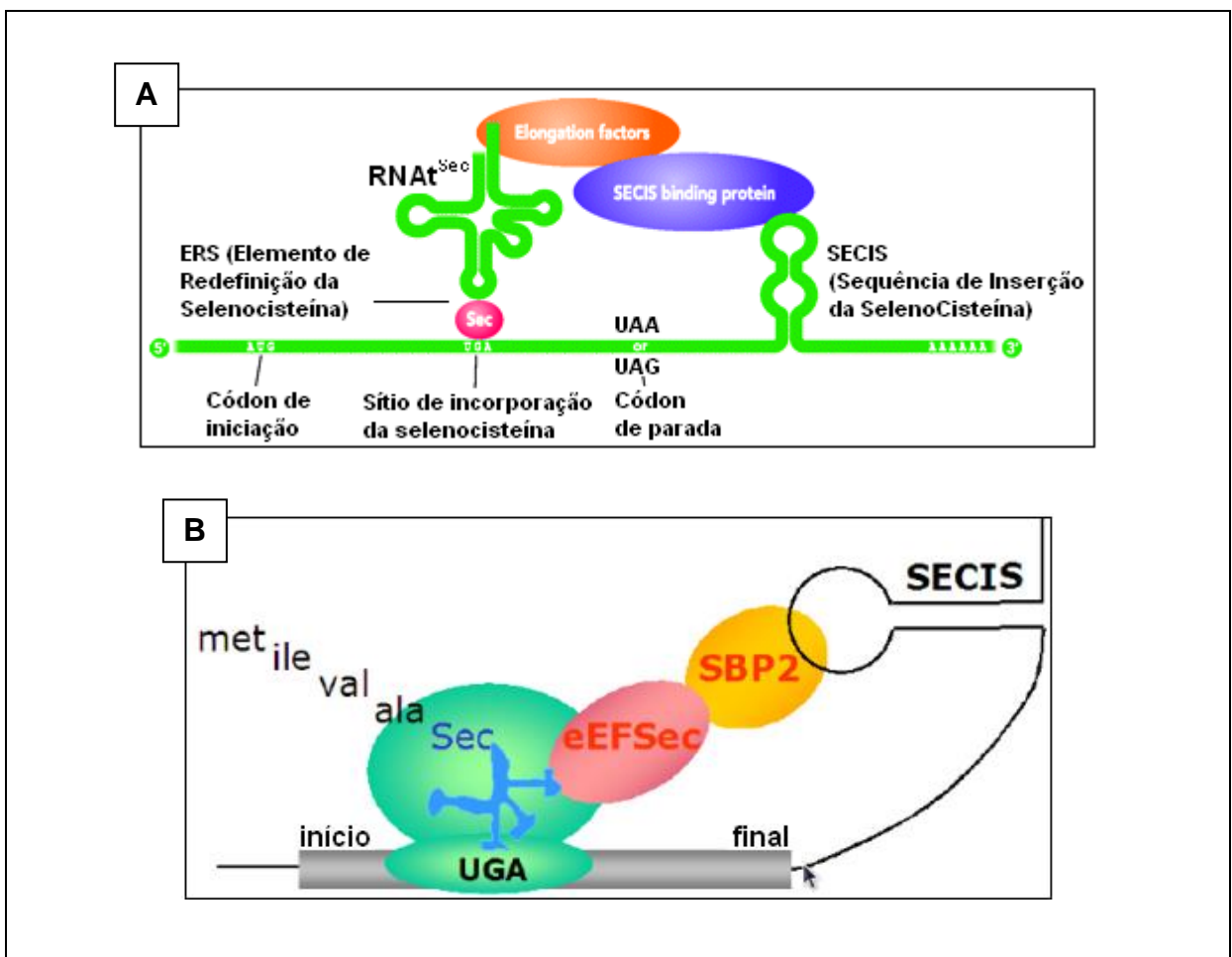


Figura 2 - Constituintes e mecanismo de inserção da SEC do gene *SEPN1* (A e B).
Fonte: Adaptado⁹.

Constituído de 13 exons, o gene *SEPN1* abrange uma região de 18.5 kb e seu transcrito é de 4.5 kb e se expressa principalmente no músculo-esquelético. O *selenium* é incorporado nas selenoproteínas como selenocisteínas¹⁴⁻¹⁶.

A selenocisteína possui um sítio de atividade catalítica e é codificada por um códon UGA presente no exon 10, localizado na região 1384 do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA)¹⁴. O códon UGA geralmente constitui um códon de parada, porém para que seja reconhecido como um códon da selenocisteína, ele depende de estruturas secundárias presentes em sua constituição^{14,15}.

Tais estruturas correspondem ao elemento de redefinição da selenocisteína (ERS) localizado adjacente ao códon UGA no exon 10 e a sequência de inserção da selenocisteína (SECIS), que está localizado na região 3'UTR dos transcritos desse gene (Figura 1 A e B)^{16,17}.

O ERS promove a incorporação da selenocisteína devido à redefinição do códon UGA durante a tradução^{16,17}.

O elemento SECIS, assim como o ERS, é crucial para a inserção da selenocisteína ao códon UGA do exon 10¹⁶⁻¹⁷. Tal inserção ocorre a partir de um mecanismo complexo que envolve o recrutamento da proteína *Selenocysteine insertion sequence-binding protein 2* (SECISBP2), do fator de alongação da selenocisteína e do ácido ribonucleico transportador (RNAt) da selenocisteína¹⁶⁻²⁰.

Sendo assim, o gene *SEPN1* possui um códon de iniciação (ATG) presente no exon 1, um códon de parada (TAG) presente no exon 13, e apresenta o códon da selenocisteína (TGA) no exon 10. Além do códon TGA que é redefinido em selenocisteína, o gene *SEPN1* também possui um segundo códon TGA no exon 3, porém este não é lido como um códon da selenocisteína, pois não está envolvido nos mecanismos necessários para tal redefinição^{16,19-20}.

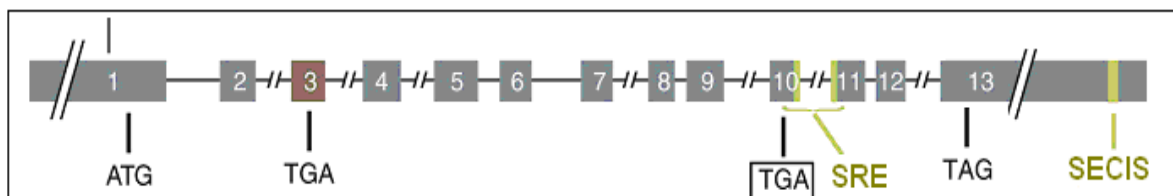


Figura 3 - Esquema representativo da localização dos exons e principais constituintes do gene *SEPN1*^{16,19}.

As primeiras mutações neste gene foram detectadas em 2001 em pacientes com DMER e em seguida, novas mutações foram detectadas associadas às formas de DMER e Mm¹⁻⁴.

Em meados de 2004, mutações no gene *SEPN1* foram identificadas em pacientes com desminopatia com *mallory body* e em seguida, em 2006 foram identificadas mutações em paciente com a forma de MDCF e esta foi incluída como sendo a quarta miopatia associada ao gene *SEPN1*^{2,4}.

Apesar destas quatro doenças musculares apresentarem algumas características semelhantes, elas são descritas na literatura como condições com fenótipos clínicos e histopatológicos distintos¹⁻⁴.

A DMER é uma afecção de início na infância, com fraqueza muscular predominando em musculatura axial e limitação acentuada da movimentação da coluna torácica e cervical. Com o avançar dos anos, diversos estudos descreveram mutações no gene *SEPN1* como responsáveis pela DMER¹. Assim como, ocorreram diversos registros literários de pacientes que apresentavam características de síndrome da espinha rígida, porém não apresentaram mutações relacionadas ao cromossomo 1p36¹.

Contudo, destaca-se que a espinha rígida é um achado inespecífico por ocorrer em várias miopatias distintas, pois a limitação da flexão da coluna pode se desenvolver devido a substituição dos músculos extensores da coluna vertebral por tecido fibroso e gorduroso, resultando no seu encurtamento, podendo ser citadas as miopatias: distrofia muscular tipo *Emery-Dreifuss*, a atrofia muscular neurogênica, a distrofia fâcios-ecapulooperoneal, a miopatia nemalínica, a miopatia minicore, como exemplo, entre outras miopatias que também cursam com este comprometimento cervical^{5,7,8}.

Além disso, a DMER pode muito provavelmente estar associada à heterogeneidade genética, porém até o presente momento não há relatos de mutações em outros genes associados a essa forma de miopatia^{1,6}.

A Mm é caracterizada principalmente por fraqueza e hipotonia nos primeiros anos de vida. Esta forma de miopatia apresenta mutações comuns às encontradas em pacientes com a forma de DMER, além de apresentar grande heterogeneidade fenotípica, sendo inclusive classificada em quatro formas, a clássica, a moderada, a forma com envolvimento das mãos e a forma pré-natal com artrogripose²²⁻²⁶.

Além da marcante variabilidade clínica, a doença multiminicore também é geneticamente heterogênea, tendo sido relacionada a mutações recessivas tanto ao gene da *SEPN1* quanto aos genes *RYR1*, *TITIN*, *SCAD*, *SECISBPS* e *MEGF10*^{3,22-31}. Sendo os genes *SEPN1* e o *RYR1* responsáveis por 50% das

mutações causadoras desta forma de miopatia^{27,28}.

A MDCF é uma desordem muscular caracterizada por fraqueza e hipotonia desde os primeiros anos de vida⁴. O gene *SEPN1* foi associado a esta forma de miopatia no ano de 2006, ocasião na qual se identificou uma mutação que já havia sido previamente associada à miopatia multiminicore⁴. Considerando o defeito primário, ressalta-se que a MDCF também é uma miopatia que apresenta heterogeneidade genética, já tendo tido mutações associada aos genes *SEPN1*, *ACTA1*, *TPM3*, *CFTD2* e *RYR1*^{4,32-33}.

Contudo, conclui-se que apesar das correlações genótipo-fenótipos ainda não estarem completamente estabelecidas, pacientes com mutações no gene *SEPN1* geralmente apresentam escoliose grave e progressiva associada a distúrbios respiratórios que requerem suporte ventilatório precoce, rigidez cervical e a biópsia muscular revela *cores* pequenos e múltiplos^{3,5,34,35}.

Observa-se que as quatro miopatias relacionadas à seleproteína N1, compreendem um grupo heterogêneo de miopatias e distrofias musculares congênitas nos quais o fenótipo clínico e os achados histopatológicos apresentam grande variabilidade¹⁻⁴.

Desta forma, a investigação diagnóstica destas doenças depende de uma boa análise da histopatologia muscular, que pode sugerir o envolvimento de um ou mais genes^{5,7,8}. A partir destas informações clínicas e histopatológicas, deve ser realizado o estudo molecular, afim de identificar o gene envolvido em cada caso, o que permitirá realizar o aconselhamento genético familiar, bem como, a predizer possíveis complicações clínicas e estabelecer um prognóstico^{5,7,8,36}.

Até o momento, os registros da literatura médica descrevem mais de 40 mutações entre a sequência codificante do gene da *SEPN1* e a sequência de inserção da selenocisteína (SECIS). Além disso, cerca de 200 pacientes já foram identificados em várias partes do mundo apresentando mutações neste gene^{1-4,20,26,34-44}.

Todas as mutações descritas até o presente momento no gene *SEPN1* estão detalhadas na tabela 2, demonstrada a seguir, que inclui informações detalhadas associadas a estas alterações.

Nº	Exon	Mudança de Nucleotídeo	Mudança de aminoácido	Homozigose-Heterozigose	Nº de Pacientes
1	1	c.1A>G	Desconhecido	Homozigose	(4) ³
2	1	c.1-2insT	Desconhecido	Homozigose	(1) ²⁰
3	1	c.12_21dup10	<i>Frameshift</i>	Homozigose	(1) ⁴³
4	1	c.13-22dup10	p.Q8P - FSX77	Heterozigose: c.48-51del99	(1) ⁴¹
5	1	c.INV13-2:A>G		Heterozigose: c.878A>G	(1) ⁴
6	1	c.19-73del92	Perda do códon de iniciação (ATG)	Homozigose	(3) ²
				Heterozigose: c.1176delA	(1) ⁴¹
				Heterozigose: c.1A>G	(1) ⁴
7	1	c.22dup10bp	<i>Frameshift</i> no G7	Homozigose	(4) ¹
				Homozigose	(1) ³
8	1	c.-48-+51del99	Perda da 1ª metionina	Heterozigose: c.13-22dup10	(1) ⁴¹
9	1	c.80-99dup20bp	<i>Frameshift</i> no R27	Homozigose	(1) ²⁰
10	1	c.23_32dup	p.P12TfsX85	Homozigose	(1) ⁴
11	1	c.25_69del	Desconhecido	Heterozigose: c.1388G>T	(1) ⁴⁰
12	1	c.8_12dup	p.R5GfsX63	-----	(--) ¹⁵
13	1	c.2dupT	Desconhecido	-----	(--) ¹⁵
14	1	c.69_76dup	p.R26HfsX43	-----	(--) ¹⁵
15	5	c.583G>A	p.A195T	-----	(--) ¹⁵
16	5	c.683_689dup7	Códon de parada	Heterozigose: c.1397G>A	(1) ³⁷
17	5	c.713-714insA	<i>Frameshift</i> no N238	Homozigose	(1) ³
				Heterozigose: c.1397G>A	(1) ³
				Heterozigose: c.1370C>T	(1) ³⁸
				Heterozigose: missing	(2) ⁴³
				Heterozigose: c.943G>A	(1) ⁴³
				Heterozigose: c.1397G>A	(1) ⁴³
18	5	c.715G>A	p.G239R	Homozigose	(1) ⁴²
19	5	c.726_727insTCC		Homozigose	(1) ²⁶
20	6	c.817G>A	p..G273R	Homozigose	(6) ¹
				Homozigose	(3) ⁴³
21	6	c.863-864delTG	<i>Frameshift</i>	Heterozigose: c.1469G>T	(1) ⁴³
22	7	c.878A>G	p.H293R	Heterozigose: c.1397G>A	(2) ¹
				Heterozigose: c.1019A>T	(2) ³
				Heterozigose: c.INV13-2:A>G	(1) ⁴
23	7	c.943G>A	p.G315S	Homozigose	(4) ³
				Heterozigose: c.1397G>A	(1) ³
				Heterozigose: c.713-714insA	(2) ⁴³
				Heterozigose: c.1315C>T	(1) ⁴³
				Homozigose	(5) ⁴³
Homozigose	(1) ³⁵				
24	8	c.1019A>T	p.N340I	Heterozigose: c.878A>G	(2) ³
25	9	c.1176delA	-----	Heterozigose: c.19_73del92	(4) ^{26,41}
26	10	c.1385G>A	p.U462stop	Homozigose	(1) ¹
27	10	c.1315C>T	p.R439 stop	Heterozigose: c.943G>A	(2) ⁴³
28	10	c.1358G>C	p.W453S	Heterozigose: c.1397G>A	(1) ³
29	10	c.1370C>T	p.R439stop	Heterozigose: c.713-714insA	(1) ³⁸
30	10	c.1384T>G	p.U462G	Homozigose	(2) ³
31	10	c.1282-2A>G	<i>aberrant splicing</i>	-----	(--) ¹⁵

32	11*	c.1388-2A>G	Desconhecido	-----	(--) ¹⁵
33	11*	c.1388-1G>C	Desconhecido	-----	(2) ⁴¹
33	11	c.1397G>A	p.R466Q	Heterozigose: c.878A>G	(1) ¹
				Heterozigose: c.1358G>C	(1) ³
				Heterozigose: c.943G>A	(1) ³
				Heterozigose: c.713-714insA	(1) ³
				Heterozigose: c.713-714insA	(1) ⁴³
				Homozigose	(1) ³⁴
				Heterozigose: c.713-714insA	(3) ⁴⁰
Heterozigose: c.943G>A	(3) ⁴⁰				
35	11(ERS)	c.1388G>T	p.G463V	Heterozigose: c.1-25_69Del	(1) ⁴⁰
36	11(ERS)	c.1405C>T	p.R469W	Homozigose	(1) ⁴⁰
37	11(ERS)	c.1406G>A	p.R469Q	Homozigose	(2) ⁴⁰
38	11	c.1446delC	Frameshift no L482	-----	(1) ¹
39	11	c.1469G>T	p.W490L	Heterozigose:c.863_864delTG	(1) ⁴³
40	13*	c.1603-2A>G	Desconhecido	-----	(--) ¹⁵
41	SECIS	c.1207T>C	-----	-----	(--) ¹⁵
42	3'UTR	g.17195T>C	Inserção:SECIS	Homozigose	(2) ³⁹

Tabela 2 - Relação de mutações detectadas no gene *SEPN1*.

Conforme descrição prévia as miopatias relacionadas à *SEPN1* apresentam achados clínicos e histopatológicos que sobrepõe outras formas de miopatias classificadas entre as distrofias musculares congênitas e miopatias congênitas³⁶. Portanto, nota-se que o diagnóstico diferencial é amplo e pode envolver mais de 20 locis incluindo genes extremamente grandes, como no caso dos genes *TTN*, *NEB* e *RYR1*, tornando o estudo molecular destas doenças musculares um grande desafio³⁶. Neste sentido a utilização de novas ferramentas moleculares que empregam uma tecnologia massiva de sequenciamento paralelo, combinada a uma análise simultânea de diversos genes relacionados a um grupo de doença tem se mostrado uma estratégia mais rápida e mais efetiva³⁶.

Desta forma, cita-se o trabalho de Oliveira J. e colaboradores, em 2016, no qual detectaram 2.534 variantes em um estudo que incluiu 12 pacientes em um painel contendo 20 genes relacionados às principais formas de miopatias congênitas³⁶. Neste trabalho os autores conseguiram identificar 14 mutações patogênicas distribuídas entre genes extensos como o *RYR1*, *DNM2*, *NEB*, *TTN* e gene *SEPN1*. Ressalta-se ainda que a maioria das mutações detectadas neste estudo não haviam sido previamente descritas na literatura. Desta forma este estudo permitiu a elucidação do diagnóstico, bem como, a identificação de mutações novas relacionadas às miopatias congênitas³⁶.

Assim observa-se que a tendência atual é a utilização do sequenciamento de nova geração no estudo das miopatias e distrofias musculares congênitas, uma

vez que esta estratégia possibilita uma análise ampliada, rápida e mais eficaz para tais afecções em comparação ao estudo gene a gene realizado pelo sequenciamento tradicional de Sanger³⁶.

2.2 Sequenciamento de Sanger X Sequenciamento de Nova Geração

O sequenciamento de Sanger, também denominado inicialmente como método didesoxi ou de terminação da cadeia, foi criado em 1978 por Fred Sanger e colaboradores. Este método baseia-se na produção de um conjunto de fitas simples de DNA que são separadas pelo princípio de eletroforese inicialmente em gel e posteriormente em capilares de um aparelho sequenciador automático que realiza leitura por eletroforese capilar e possui a capacidade de processar a quantidade máxima de 96 fragmentos por vez, gerando uma leitura de bases nitrogenadas do DNA. Além disso, através desta metodologia é possível obter a cada reação de sequenciamento, ou seja a cada par de primer, o sequenciamento de boa qualidade de um número aproximado de 200 pares de bases, variando de acordo com o tipo de sequenciador e a região sequenciada⁴⁴.

O sequenciamento de nova geração também denominado como NGS (do inglês – Next Generation Sequencing) pode ser caracterizado em termos amplos como uma técnica molecular que corresponde ao processo de sequenciamento de DNA baseado no processamento concomitante de uma extensiva quantidade de fragmentos de DNA gerando informações sobre milhões de pares de bases em uma única corrida⁴⁴⁻⁴⁶.

Trata-se de uma técnica relativamente nova que se divide em subtipos de acordo com os equipamentos utilizados para tal finalidade, sendo estes equipamentos de sequenciamento de nova geração classificados em 1ª geração, nos quais são utilizados os equipamentos de degradação química e interrupção da cadeia-Sanger, os de 2ª geração nos quais são utilizados os equipamentos 454 da Roche, o *Illumina Genome Analyser-HiSeq/MiSeq* e o *SOLID*, já os equipamentos utilizados para os sequenciamentos classificados como de 3ª geração são o *Ion Torrent* e o *PacBio RS* e finalmente o sequenciamento de 4ª geração que utiliza o equipamento *Nanopore*⁴⁵⁻⁴⁶.

Apesar de se diferenciarem consideravelmente entre si, todos os sequenciadores de nova geração se baseiam no processamento paralelo massivo

de fragmentos de DNA⁴⁵⁻⁴⁶.

Comparando o sequenciamento tradicional de Sanger, no qual é utilizado um sequenciador automático, que realiza uma leitura por eletroforese capilar, aos sequenciadores de nova geração, verificamos que enquanto um sequenciador automático possui a capacidade de processar pela técnica de Sanger, a quantidade máxima de 96 fragmentos por vez, os sequenciadores de nova geração por sua vez, são capazes de realizar a leitura de bilhões de fragmentos ao mesmo tempo. Deste modo, as técnicas de Sanger e NGS apresentam vantagens e desvantagens, assim como limitações de custo/benefício para obter e gerar dados, sendo a escolha do método baseada principalmente no objetivo do trabalho proposto⁴⁴⁻⁴⁶.

No entanto, devido ao fato dos sequenciadores de nova geração produzirem uma quantidade expressivamente maior de informações sucessivamente, as plataformas de sequenciamento de nova geração se tornaram uma alternativa poderosa para estudos de genômica estrutural e funcional⁴⁶.

Assim, ressalta-se que o advento do sequenciamento de nova geração contribui expressivamente para o avanço da tecnologia dos sequenciamentos, ampliando muito a capacidade dos sequenciadores e permitindo inclusive o sequenciamento de mais de um genoma em uma única corrida^{36,44-46}. Por outro lado, o custo de operação do equipamento ainda é elevado, o que limita a utilização deste método rotineiramente⁴⁵⁻⁴⁶.

Porém, vale ressaltar a necessidade da confirmação por sequenciamento de Sanger de uma mutação encontrada inicialmente através do sequenciamento de nova geração. Fato que não permite que a técnica de Sanger seja descontinuada, além de demonstrar a sua contínua importância e confiabilidade na confirmação de diagnósticos genéticos. Assim o sequenciamento de nova geração pode ser visto como uma importante ferramenta para otimização e triagem direta de mutações, principalmente nos casos onde há grande heterogeneidade genética^{36,44-46}.

2.3 Sequenciadores de segunda geração

Conforme mencionado anteriormente, o sequenciamento de nova geração por equipamentos de segunda geração pode ser realizado utilizando os equipamentos 454 da Roche, o *Illumina Genome Analyser-HiSeq/MiSeq* e o *SOLID*. Cada equipamento apresenta uma tecnologia de sequenciamento a partir

de uma estratégia diferente, porém, em geral, é possível identificar etapas comuns entre todos os sequenciadores, nas quais descrevemos as etapas de preparo da amostra, de amplificação das bibliotecas e a de sequenciamento⁴⁵⁻⁴⁶.

A principal vantagem em relação aos métodos de segunda geração consiste na construção de bibliotecas genômicas *in vitro* sem que ocorra a necessidade de amplificação de fragmentos de DNA⁴⁵⁻⁴⁶.

Fabricado no ano de 2006, o sequenciador *Illumina Genome Analyzer*, baseia-se no conceito de “sequenciamento por síntese” o qual requer que as sequências a serem determinadas sejam convertidas inicialmente em numa biblioteca de sequenciamento especial, permitindo a amplificação e imobilização das sequências para serem submetidas ao sequenciamento. Para este propósito, dois adaptadores diferentes são adicionados às terminações 5' e 3' de todas as moléculas⁴⁵⁻⁴⁶.

Primeiramente o DNA é fragmentado de forma aleatória em pequenas partes que são denominadas como *templates*, esta fragmentação pode ser realizada por processo químico, mecânico ou enzimático. Após a fragmentação são incorporados adaptadores ao DNA, contendo sequências artificiais conhecidas aos *templates*. Já nesta fase do sequenciamento é possível combinar amostras de diferentes pacientes em uma mesma reação de sequenciamento devido do uso destes adaptadores que se diferem apenas por uma pequena parte inicial⁴⁵⁻⁴⁶.

Depois de ligados a estes adaptadores, as amostras são misturadas, amplificadas e sequenciadas juntas. Ao final da corrida, no processo de sequenciamento, essa parte do adaptador é lida e as amostras são separadas computacionalmente⁴⁵.

A amplificação a partir das bibliotecas de DNA tem como principal objetivo a geração de milhares de cópias de cada fragmento de DNA produzido na etapa de preparo da amostra em um curto espaço de tempo. O objetivo dessa amplificação é aumentar a fonte de sinal que será detectado na etapa de sequenciamento⁴⁵⁻⁴⁶.

2.4 Sequenciamento de nova geração na pesquisa de doenças raras

O sequenciamento de nova geração têm sido utilizado como uma ferramenta alvo na elucidação de doenças que apresentam padrão de herança mendelianas e também naquelas consideradas raras³⁶.

As selenopatias relacionadas ao gene *SEPN1* estão incluídas nos grupos das miopatias congênitas e das distrofias musculares congênitas, que representam doenças mendelianas raras³⁶. Além disso compreendem um grupo de doenças neuromusculares que cursam com características clínicas e histopatológicas variáveis, nas quais a fraqueza muscular e deformidades ósseas são achados gerais³⁶.

Destaca-se que alguns fatores como locus e heterogeneidade alélica, bem como sintomatologia muitas vezes inespecíficas podem dificultar uma correlação correta entre o fator causador da doença e, assim, diminuir as chances de se esclarecer o diagnóstico de uma doença³⁴. Neste sentido, outros fatores também podem ser descritos tais como a variabilidade na manifestação fenotípica em relação à idade de início e a variabilidade na gravidade dos sintomas apresentados^{36,42}.

Além disso, em alguns casos ainda mais raros, a ocorrência de duas ou mais doenças etiologicamente distintas em um mesmo indivíduo, com sintomas sobrepostos, pode gerar uma dificuldade maior de distingui-las ou até mesmo detectá-las. Em um trabalho realizado no ano de 2015, Dennis e colaboradores descreveram uma família consanguínea apresentando dois distúrbios etiologicamente distintos, que segregaram independentemente, sendo um deles relacionado a mutações no gene *SEPN1* e outro relacionado a mutações no gene *SLC34A3*. Ou seja, a co-ocorrência de raquitismo hereditários hipofosfatêmico e uma miopatia congênita do grupo das selenopatias foi estabelecida a partir da utilização do sequenciamento de nova geração⁴².

Desta forma, conclui-se que o advento relativamente recente das tecnologias do sequenciamento de nova geração, facilitaram a detecção do defeito genético de doenças mendelianas e raras, mas também na identificação da coexistência de duas doenças³⁶.

Referências

1. Moghadazadeh B, Petit N, Jaillard C, Brockington M, Roy SQ, Merlini L, *et al.* Mutations in *SEPN1* cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome. *Nat Genet* 2001, 29:17-18.
2. Ferreiro A, Ceuterick de Groote C, Marks JJ, Goemans N, Schreiber G, Hanefeld F, *et al.* Desmin-related myopathy with Mallory body-like inclusions is caused by mutations of the selenoprotein N gene. *Ann Neurol* 2004; 55 (5):676-86.
3. Ferreiro A, *et al.* Mutations of the selenoprotein N gene, which is implicated in rigid spine muscular dystrophy, cause the classical phenotype of multiminicore disease: reassessing the nosology of early-onset myopathies. *Am J Hum Genet* 2002, 71: 739-749.
4. Clarke NF, *et al.* SEPN1: associated with congenital fiber-type disproportion and insulin resistance. *Ann Neurol* 2006 Mar; 59 (3):546-52.
5. Sewry CA, Jimenez-Mallebrera C, Muntoni F. Congenital myopathies. *Current Opinion in Neurology* 2008; 21(5):569-575.
6. Goebel HH, Fidzianska A. Classification of congenital myopathies. *In:* Lane RJM. ed. *Handbook of muscle disease*, New York, Marcel Dekker, 1996: 165-175.
7. Reed UC. Congenital muscular dystrophy. Part I: a review of phenotypical and diagnostic aspects. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 2009; 67(1):144-168.
8. Reed UC. Congenital muscular dystrophy. Part II: a review of pathogenesis and therapeutic perspectives. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 2009; 67(2-A):343-362.
9. Moghadaszadeh B, Beggs AH. Selenoproteins and their impact on human health through diverse physiological pathways. *Physiology (Bethesda)* 2006 Oct; 21:307-15.
10. Lisi MT, Cohn RD. Congenital muscular dystrophies: new aspects of an expanding group of disorders. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772:159-172.
11. Rederstorff M, Krol A, Lescure A. Understanding the importance of selenium and selenoproteins in muscle function. *Cell Mol Life Sci* 2006 Jan; 63(1):52-9.
12. Arbogast S, Ferreiro A. Selenoprotein and protection against oxidative stress: selenoprotein N as a novel player at the crossroads of redox signaling and calcium homeostasis. *Antioxid Redox Signal* 2010; 12(7):893-904.
13. Gene Tests. Disponível em: <http://www.genetests.org>. Acesso em: janeiro de 2016.
14. Moghadaszadeh B, *et al.* Identification of a new *locus* for a peculiar form of congenital muscular dystrophy with early rigidity of the spine, on chromosome 1p35-36. *Am J Hum Genet* 1998 Jun; 62(6):1439-45.

15. Lescure A, Rederstorff M, Krol A, Guicheney P, Allamand V. Selenoprotein function and muscle disease. *Biochim Biophys Acta* 2009 Nov; 1790(11):1569-74.
16. Berry MJ, Banu L, Harney JW, Larsen PR. Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons. *EMBO J.* 1993 Aug;12(8):3315-22.
17. Gu QP, Beilstein MA, Vendeland SC, Lugade A, Ream W, Whanger PD. Conserved features of selenocysteine insertion sequence (SECIS) elements in selenoprotein W cDNAs from five species. *Gene.* 1997 Jul 9; 193(2):187-96.
18. Schoenmakers E, Agostini M, Mitchell C, Schoenmakers N, Papp L, Rajanayagam O, *et al.* Mutations in the selenocysteine insertion sequence-binding protein 2 gene lead to a multisystem selenoprotein deficiency disorder in humans. *J Clin Invest* 2010 Dec 1; 120(12):4220-35.
19. Lescure A, Fagegaltier D, Carbon P, Krol A. Protein factors mediating selenoprotein synthesis. *Curr Protein Pept Sci* 2002 Feb; 3(1):143-51.
20. Okamoto Y, Takashima H, Higuchi I, Matsuyama W, Suehara M, Nishihira Y, *et al.* Molecular mechanism of rigid spine with muscular dystrophy type 1 caused by novel mutations of selenoprotein N gene. *Neurogenetics* 2006 Jul; 7(3):175-83.
21. Tein I, Elpeleg O, Ben-Zeev B, Korman SH, Lossos A, Lev D, *et al.* Short-chain acyl-CoA dehydrogenase gene mutation (c.319C>T) presents with clinical heterogeneity and is candidate founder mutation in individuals of Ashkenazi Jewish origin. *Mol Genet Metab* 2008 Feb; 93(2):179-89.
22. Ferreira A, Estournet B, Chateau D, Romero NB, Laroche C, Odent S, Toutain A, *et al.* Multi-minicore disease-searching for boundaries: phenotype analysis of 38 cases. *Ann Neurol* 2000 Nov; 48(5):745-57.
23. Nucci A, Queiroz LS, Zambelli HJ, Martins Filho J. Multi-minicore disease revisited. *Arq Neuropsiquiatr* 2004 Dec; 62(4):935-9.
24. Treves S, Jungbluth H, Muntoni F, Zorzato F. Congenital muscle disorders with cores: the ryanodine receptor calcium channel paradigm. *Curr Opin Pharmacol* 2008 Jun; 8(3):319-26.
25. Zorzato F, Jungbluth H, Zhou H, Muntoni F, Treves S. Functional effects of mutations identified in patients with multiminicore disease. *IUBMB Life* 2007 Jan; 59(1):14-20.
26. Ardisson et al. SEPN1-related myopathy in three patients: novel mutations and diagnostic clues. *Eur J Pediatr.* 2016. Jan 16.
27. Liewluck T. et al. Adult-onset respiratory insufficiency, scoliosis, and distal joint hyperlaxity in patients with multiminicore disease due to novel Megf10 mutations. *Muscle Nerve.* 2016 Jun;53(6):984-8.

28. Boyden S. et al. Mutations in the satellite cell gene MEGF10 cause a recessive congenital myopathy with minicores. *Neurogenetics*. 2012 May;13(2):115-24
29. Carmignac V, Salih MA, Quijano-Roy S, Marchand S, Al Rayess MM, Mukhtar MM, et al. C-terminal titin deletions cause a novel early-onset myopathy with fatal cardiomyopathy. *Ann Neurol* 2007 Apr; 61(4):340-51.
30. Tein I, Haslam RH, Rhead WJ, Bennett MJ, Becker LE, Vockley J. Short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: a cause of ophthalmoplegia and multicore myopathy. *Neurology* 1999 Jan 15; 52(2):366-72.
31. PubMed. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: setembro de 2015.
32. Clarke NF, Kolski H, Dye DE, Lim E, Smith RL, Patel R, et al. Mutations in TPM3 are a common cause of congenital fiber type disproportion. *Ann Neurol* 2008, 63(3):329-37.
33. Laing NG, Clarke NF, Dye DE, Liyanage K, Walker KR, Kobayashi Y, et al. Actin mutations are one cause of congenital fibre type disproportion. *Ann Neurol* 2004 Nov; 56(5):689-94.
34. Peat RA, Smith JM, Compton AG, Baker NL, Pace RA, Burkin DJ, et al. Diagnosis and etiology of congenital muscular dystrophy. *Neurology* 2008 Jul 29; 71(5):312-21.
35. Venance SL, Koopman WJ, Miskie BA, Hegele RA, Hahn AF. Rigid spine muscular dystrophy due to SEPN1 mutation presenting as cor pulmonale. *Neurology* 2005 Jan 25; 64(2):395-6.
36. Oliveira J et al. New massive parallel sequencing approach improves the genetic characterization of congenital myopathies. *J Hum Genet*. 2016. doi: 10.1038/jhg.2016.2.
37. Rudenskaia GE, Kadnikova VA, Poliakov AV. Rigid spine congenital muscular dystrophy produced by SEPN1 mutations (RSMD1)]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova* 2014;114(5):70-4. Russian.
38. Tajsharghi H, Darin N, Tulinius M, Oldfors A. Early onset myopathy with a novel mutation in the Selenoprotein N gene (*SEPN1*). *Neuromuscul Disord* 2005 Apr; 15(4):299-302.
39. Allamand V, Richard P, Lescure A, Ledeuil C, Desjardin D, Petit N, et al. A single homozygous point mutation in a 3'untranslated region motif of selenoprotein N mRNA causes SEPN1-related myopathy. *EMBO Reports* 2006; 7(4):450-4.
40. Maiti B, Arbogast S, Allamand V, Moyle MW, Anderson CB, Richard P, et al. A mutation in the SEPN1 selenocysteine redefinition element (SRE) reduces selenocysteine incorporation and leads to SEPN1-related myopathy. *Hum Mutat* 2009, Mar; 30(3):411-6.

41. Cagliani R, Fruguglietti ME, Berardinelli A, D'Angelo MG, Prella A, Riva S, *et al.* New molecular findings in congenital myopathies due to selenoprotein N gene mutations. *J Neurol Sci* 2011 Jan 15; 300(1-2):107-13.
42. Dennis et al. Increased Probability of Co-Occurrence of Two Rare Diseases in Consanguineous Families and Resolution of a Complex Phenotype by Next Generation Sequencing. 2015. *PLoS ONE* 11(1):
43. Schara U, Kress W, Bönnemann CG, Breitbach-Faller N, Korenke CG, Schreiber G, *et al.* The phenotype and long-term follow-up in 11 patients with juvenile selenoprotein N1-related myopathy. *Eur J Paediatr Neurol* 2008 May; 12(3):224-30.
44. Savarese et al. MotorPlex provides accurate variant detection across large muscle genes both in single myopathic patients and in pools of DNA samples. *Acta Neuropathologic Communications Neuroscience of Disease* 2014; 2:100.
45. Matthew W. and Iris Schrijver. Next Generation DNA Sequencing and the Future of Genomic Medicine. 2010, *Genes* 1, 2073-442 538-69;
41. Buermans and Dunnen. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014. 1932–1941

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar o estudo genético molecular dos pacientes brasileiros com características clínicas e histopatológicas de miopatias relacionadas à selenoproteína N1.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar o estudo genético molecular de pacientes com miopatias e distrofias musculares congênitas através de sequenciamento de nova geração (NGS) utilizando painel contendo 61 principais genes relacionados a doenças neuromusculares.
- Incluir novos pacientes brasileiros com características clínicas e histopatológicas de distrofia muscular congênita tipo espinha rígida, miopatia multiminicore e miopatia por desproporção congênita de fibras para a detecção de mutações no gene *SEPN1*.
- Correlacionar o genótipo com o fenótipo clínico e histopatológico dos pacientes incluídos neste estudo.
- Identificar, descrever e comparar as mutações encontradas em pacientes brasileiros com aquelas descritas na literatura.

4 Metodologia

4.1 Pacientes e métodos

Nesta tese foi realizado um estudo transversal envolvendo 19 pacientes brasileiros, com diagnóstico clínico e histopatológicos de miopatias relacionadas à SEPN1 (SEPN1-MR).

Dentre os pacientes deste estudo, 13 foram incluídos desde a sua fase de mestrado que ocorreu no período de 2008 a 2011. Os 6 demais pacientes foram incluídos posteriormente, ou seja, na fase do doutorado, compreendida de entre os anos de 2012 a 2016.

Os pacientes deste estudo são proveniente de grupos de referência no acompanhamento de doenças neuromusculares do Brasil, sendo eles; o Grupo de Doenças Neuromusculares do Hospital das Clínicas da UFMG, do Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo, da AACD de Recife e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Riberão Preto-USP, a partir de uma colaboração estabelecida entre a orientadora deste projeto e a Professora Dra. Mariz Vainzof, Dra. Vanessa Van Der Linden e Dr. Charles Marques Lourenço, respectivamente.

4.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos pacientes com miopatias relacionadas à selenoproteína N1 que apresentavam mutações provavelmente patogênicas no gene *SEPN1*, detectadas através do sequenciamento de Sanger.

Além destes, foram incluídos novos pacientes com manifestações clínicas e achados histopatológicos compatíveis com miopatias relacionadas à selenoproteína N1, sendo elas:

- Distrofia muscular congênita tipo espinha rígida: pacientes com história de fraqueza e hipotonia nos primeiros anos de vida, hipotrofia generalizada associada com a limitação da movimentação da coluna cervical e/ou torácica. Biópsia muscular sem anormalidades estruturais, exceto pela presença de minicores ou *moth eaten*.

- Miopatia multiminicore: pacientes com história de fraqueza e hipotonia nos primeiros anos de vida e biópsia muscular evidenciando minicores (áreas com reatividade diminuída nas reações histoquímicas oxidativas), associados ao predomínio de fibras do tipo I.
- Miopatia com desproporção congênita de fibras: pacientes com história de fraqueza e hipotonia nos primeiros anos de vida e biópsia muscular evidenciando hipotrofia de fibras tipo I, cujo diâmetro das fibras tipo I deve ser pelo menos 12% inferior ao das fibras tipo II.

4.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos desta fase do estudo pacientes que não apresentavam fenótipo clínico e histopatológico compatível com miopatias associadas ao gene *SEPN1* e os pacientes que se recusaram a participar.

4.2 Aspectos éticos

Este projeto possui aprovação para a sua realização pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da UFMG sob o nº ETIC 555/08, tendo sido aprovado pela Câmara do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG, pela diretoria da FM-UFMG, pelas unidades funcionais onde foram realizados os procedimentos e pelo Departamento de Ensino Pesquisa e Extensão do HC-UFMG (ANEXOS A ao C).

Termos de consentimento pós-informado foram elaborados de acordo com a faixa etária e orientação do Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) (APÊNDICE 2).

Os pacientes novos incluídos neste estudo foram admitidos após receberem as informações necessárias e assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido e a autorização para foto e vídeo (APÊNDICE 2 e 3).

4.3 Procedimentos

As avaliações clínicas e as coletas de sangue foram feitas no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Ambulatório São Vicente.

As demais etapas desta pesquisa ocorreram nas dependências do Hospital das Clínicas da UFMG e no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo, nos quais, os estudos moleculares e de proteína muscular foram realizados no Laboratório de Investigação em Doenças Neuromusculares da Faculdade de Medicina da UFMG em parceria com o Laboratório de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG e no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo CEGH-USP. Todos os pacientes receberam um relatório e o aconselhamento genético familiar no final do estudo.

4.3.1 Avaliação clínica

Os novos pacientes incluídos nesta pesquisa foram submetidos a uma reavaliação clínica realizada pelo mesmo neurologista responsável pelo encaminhamento do paciente, tendo sido preenchido um protocolo elaborado com base em aspectos clínicos e neurológicos relevantes (APÊNDICE 4).

Além disso, os pais de alguns dos pacientes incluídos na pesquisa também foram avaliados clinicamente, na tentativa de se detectarem manifestações menores da doença.

4.3.2 Estudo em tecido muscular

4.3.2.1 Reações histológicas e histoquímicas

Nesta fase do estudo, apenas um paciente, o caso 17 precisou ser convidado a realizar a biópsia muscular para a realização do estudo histológico e histoquímico. Contudo, a realização do estudo histológico e histoquímico dos pacientes novos incluídos na segunda fase deste estudo foi realizada através de uma nova análise das lâminas das biópsias musculares realizadas por ocasião dos

diagnósticos destes pacientes, esta nova análise foi realizada pelo médico responsável pelo encaminhamento do paciente.

Para tal objetivo, foram reanalisadas as colorações histológicas e as reações enzimáticas histoquímicas: hematoxilina-eosina (HE), tricômico de Gomori modificado (GOMORI), ácido periódico de Schiff (PAS) e *Oil Red O* (ORO) e as reações histoquímicas oxidativas: succinato desidrogenase (SDH), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), citocromo C oxidase (COX) e adenosina trifosfatase (ATPases) 9,4 e 4,3.

4.3.2.2 Estudo por Western-blot

O estudo por Western-Blot (WB) utilizou fragmentos musculares congelados em nitrogênio líquido e conservado em freezer -80°C , mediante a autorização do paciente e/ou responsável. Esta parte do estudo foi padronizada conforme metodologia estabelecida pelo Laboratório de Proteínas do Centro de Estudos do Genoma Humano da USP (CEGH-USP), tendo sido necessária a realização de treinamento específico pela doutoranda neste Centro de Pesquisa. Tal treinamento foi realizado em março de 2014.

O estudo por Western-Blot foi realizado parcialmente, tendo sido realizada a padronização da técnica através da extração de proteínas e realização da técnica utilizando inicialmente um anticorpo de teste para a proteína calpaína. Os fragmentos testados inicialmente foram provenientes de restos de biópsia musculares estocadas a -80°C que perderam sua identificação. Os testes realizados com a calpaína apresentaram resultados satisfatórios, porém, não conseguimos o mesmo resultado ao testarmos a mesma técnica padronizada utilizando o anticorpo específico para a proteína SEPN1 (anti-SEPN1: ABCAM - Cód. ab1059430).

Ocorre que não havia disponível no mercado outro fabricante para este anticorpo, não tendo sido possível demais testes a partir de outros anticorpos para esta mesma proteína.

Contudo, não foi possível dar continuidade a esta parte do estudo devido a tal fato, de não disponibilizarmos de outros anticorpos provenientes de outros fabricantes, para demais testes. Vale ressaltar que até o momento há registros bibliográficos de somente um experimento demonstrando a eficiência da técnica de

WB utilizando anticorpo para SEPN1, porém este foi sintetizado “in house” (Okamoto et al, 2011).

4.3.3 Estudo genético molecular

O estudo molecular foi realizado a partir das técnicas de sequenciamento do DNA genômico (gDNA) e do DNA complementar (cDNA) pela metodologia de Sanger e do Sequenciamento de Nova Geração (do inglês: Next Generation Sequencing - NGS).

Para este estudo foram utilizadas amostras de DNA e de RNA extraídas a partir da coleta de 10 mL de sangue periférico dos pacientes e dos seus pais.

As amostras foram colhidas em tubos contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Para a extração do DNA genômico utilizou-se o *kit* de extração *Wizard Genomic DNA Purifications Kit* – (Promega CAT # A1125) e para a extração do RNA utilizou-se o kit de extração QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen CAT # 52904).

A - Amplificação do DNA genômico

A amplificação do DNA genômico para posterior sequenciamento por Sanger foi realizado para o estudo dos novos pacientes incluídos (06, 07, 08, 09, 18 e 19), assim como, para a confirmação das mutações detectadas inicialmente por NGS e para o estudo de segregação familiar das mutações encontradas a partir da análise do genoma dos pais dos pacientes que apresentaram mutações tanto no gene *SEPN1* quanto nos demais genes do painel de doenças neuromusculares de NGS.

Para o estudo de mutações no gene *SEPN1* dos novos pacientes incluídos, as amostras de DNA dos pacientes foram amplificadas através da técnica de PCR de todos os exons codificantes do gene *SEPN1*. Para tal finalidade, foram desenhados 12 pares de *primers* (*forward* e *reverse*) com o uso programa *primer 3*, que foram sintetizados pela empresa *IDT - Prodimol Ltda*. As especificações e condições de cada um destes primers esta relacionada no quadro abaixo. Não foi realizada a amplificação do exon 3, pois este corresponde a um *splice* alternativo e não participa da codificação da proteína³².

Primer	Sequência do primer	Tamanho do Produto de PCR	Temperatura de <i>Anealing</i>
SEPN1 - 1F	CTTGGCGTTCCGGTGTAG	456 bp	60°C
SEPN1 - 1R	ACTCGTCCATGCCCATGTC		
SEPN1 - 2F	CAGTCTCTCCTCCCAAGCAG	198 bp	60°C
SEPN1 - 2R	TCAGTGAAGACACCGTTGG		
SEPN1 - 4F	GGTGAGCCCTGTAGCATAAG	232 bp	58°C
SEPN1 - 4R	TCGGGATACACACAGATGAC		
SEPN1 - 5F	ACCCACATGGTACAGGAGAC	298 bp	60°C
SEPN1 - 5R	CACCCAGCTGTCCTCAC		
SEPN1 - 6F	ACCCAGCAAGCCAGTACG	180 bp	60°C
SEPN1 - 6R	CCAGTGTGGCCCACTCAC		
SEPN1 - 7F	AAGGTGGGCAGCTCTGGT	232 bp	60°C
SEPN1 - 7R	AGCAGGACAAGCTGTAGGAG		
SEPN1 - 8F	TGATGATGGTGTCACTCTGC	207 bp	58°C
SEPN1 - 8R	TAGAGACCCTCCAAAATGCT		
SEPN1 - 9F	CCCCTACCACTGACCTCTG	248 bp	60°C
SEPN1 - 9R	CCTGACCCTGGCCTTCAC		
SEPN1 - 10F	CTTCGCTCTGTCTCGGTGT	196 bp	60°C
SEPN1 - 10R	TCTGGTACCCACAAGGTGT		
SEPN1 - 11F	CGCCTCACCTTCTGTCTT	182 bp	60°C
SEPN1 - 11R	ACTGTTCCGGACGCTCCT		
SEPN1 - 12bF	AGTGTGCAACTGTCCCCACA	220 bp	58°C
SEPN1 - 12bR	CGAAGCCTGATGAAGTCTGC		
SEPN1 - 13F	CCCATAGAAGAGAGGGGCACA	269 bp	60°C
SEPN1 - 13R	TGCATCAGATCCCGTCCAG		

Tabela 1 - Informações sobre os *primers* *SEPN1*, produto de PCR e temperatura de *anealing*.

Para a amplificação dos exons do gene *SEPN1*, utilizou-se a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), com os seguintes ciclos térmicos:

	Temperatura	Tempo	Etapa
	94°C,	1 minuto	Desnaturação
35 ciclos	94°C,	30 segundos	
	Ver tabela 1.	1 minuto	Anelamento
	72°C	30 segundos	
	72°C	30 segundos	Extensão final
	4° C	∞	

Os exons 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 foram amplificados utilizando-se o *kit* PCR *Master Mix* (Promega CAT # M7502), de acordo com o protocolo a seguir:

Para o volume total 25 μ L para cada amostra, usou-se aproximadamente:

DNA (20 ng) _____ 2,0 μ L

Água miliQ _____ 8,5 μ L

Primer F (2,0 Mm ou 20 Mm)** ____ 1,0 μ L

Primer R (2,0 MM ou 20 Mm)** ____ 1,0 μ L

*Mix _____ 12,5 μ L

*(Mix contendo todos os desorribonucleotídeos trifosfatados - dNTPs - e a taq polimerase)

**Para amplificação dos exons 2, 10 e 13 foi necessária a utilização do *primer* a uma concentração de 20 Mm; para os demais usou-se concentração de 2,0 Mm.

O exon 1 continha regiões ricas em citosina-guanina (CG) e para sua amplificação foi necessária a utilização de uma segunda Taq. Empregou-se a *Go taq Colorless Master Mix* (Promega CAT # M7133), de acordo com o seguinte protocolo:

DNA (20ng) _____ 1,0 μ L

Água miliQ _____ 0,0 μ L

Primer F (20 Mm) ____ 1,0 μ L

Primer R (20 Mm) ____ 1,0 μ L

DMSO _____ 2,5 μ L

*Mix _____ 19,5 μ L

*(Mix contendo todos os dNTPs e a *Go taq*).

A verificação da amplificação do produto de PCR foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo 2 μ L de brometo de etídio em cuba horizontal a uma voltagem de cerca de 100 volts.

Depois de verificada a PCR, os produtos de PCR foram purificados com *kit* de purificação Qiagen (Qiagen CAT#28106) com base em metodologia rotineira, para posterior sequenciamento.

B - Sequenciamento de Sanger para o gene *SEPN1*

O sequenciamento dos produtos de PCR dos 12 exons codificantes do gene *SEPN1* foi realizado no sequenciador ABI 3730 DNA Sequencer (*Applied Biosystem*) de 48 capilares do Laboratório de Medicina Molecular da FM-UFMG,

em parceria com o Prof. Luiz Armando, de acordo com as especificações do fabricante.

O sequenciamento dos produtos de PCR seguiu o seguinte protocolo:

Para o volume total de 10 μ L para cada amostra, utilizou-se aproximadamente:

Big Dye _____ 2,0 μ L

Primer F ou *R* _____ 2,5 μ L

Buffer _____ 1,0 μ L

Água miliQ _____ 2,5 μ L

Produto de PCR purificado ____ 2,0 μ L

Para a reação de sequenciamento do gene, utilizaram-se os seguintes ciclos térmicos em termociclador:

- Temperatura de desnaturação: - 96°C, durante 1 minuto.
 Seguido por 25 ciclos de: - 96°C, durante 10 segundos.
 - 50°C, durante 5 segundos.
 - 60°C, durante 4 minutos.

Após a reação de sequenciamento, os produtos de sequenciamento foram purificados precipitados e aplicados em sequenciador.

C - Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

As amostras de DNA dos pacientes nos quais foram detectadas apenas mutações em um alelo ou que não apresentaram mutações no gene *SEPN1*, verificadas pelo sequenciamento de Sanger, foram encaminhadas para realização de sequenciamento de nova geração.

Esta metodologia foi realizada na Plataforma *HiSeq 2500* da *Illumina*, após preparação e quantificação das bibliotecas. Esta fase do estudo foi realizada no Centro de Estudos do Genoma Humano - USP.

As bibliotecas, ou seja, o “pool” contendo as amostras, foram injetadas em uma lâmina, contendo uma superfície composta por oligonucleotídeos complementares aos adaptadores das bibliotecas e em seguida inserida no

equipamento, onde ocorreu a incorporação dos nucleotídeos marcados com fluorescência e em seguida o sequenciamento por síntese de base a base. Ao ocorrer a incorporação de um nucleotídeo, a fluorescência é excitada por uma série de lasers e captada por câmeras que capturam as imagens a cada ciclo.

O estudo do gene *SEPN1* por sequenciamento de nova geração foi realizado juntamente com um painel para o estudo dos 61 principais genes relacionados a doenças neuromusculares. A análise bioinformática para este gene foi realizada através de programa bioinformático, criado e patenteado pelo CEGH-USP, que permite a seleção de filtros de pesquisa incluindo critérios de verificação para cada amostra de acordo com sua herança genética e perfis específicos de análise.

Através deste programa é possível comparar as alterações encontradas com as descritas nos bancos de dados: 1.000 genomas, 6.500 genomas e ExAC, além de fazer buscas em bancos de dados de mutações (OMIM; ClinVar; HGMD).

Ressalta-se que utilizou-se ainda um banco de 1000 exomas de idosos (acima de 60 anos) brasileiros normais. Os genes incluídos neste painel estão citados na tabela abaixo:

GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE
TPM3	PLEC1	FKRP	DYSF	TTN	DNM2	ITGA7	DNM2
TPM2	GDF8	POMGNT1	SGCG	GNE	KLHL9	DNM2	BIN1
ACTA1	CAV3	LARGE	SGCA	MYH7	FLNC	TCAP	MEGF10
KBTBD13	FHL1	DMD	SGCB	MATR3	VCP	LMNA	TRIM32
CFL2	LAMA2	EMD	SGCD	TIA1	FKTN	POMT1	CRYAB
SEPN1	COL6A1	DNAIB6	TCAP	MYOT	DAG1	POMT2	DES
RYR1	COL6A2	HNRPDL	TRIM32	NEB	AN05	FLNC	MYOT
MTM1	COL6A3	CAPN3	LAMP2	LDB3			

Tabela 2 – Genes incluídos no painel de doenças neuromusculares para NGS.

D - Sequenciamento de Sanger para demais genes

Para o estudo das mutações novas detectadas em outros genes incluídos no painel de doenças neuromusculares, através da técnica de sequenciamento de nova geração (NGS), foram confeccionados pares de *primers* (*forward e reverse*) com o uso programa *primer 3*, que foram sintetizados pela empresa *IDT - Prodimol Ltda.* e padronizadas reações de PCR para cada uma destas mutações com a

finalidade de avaliar a segregação destas mutações entre os pais dos pacientes. A sequência dos primers desenhados e o detalhamento de cada um deles esta relacionado na tabela abaixo:

Gene	Primer	Sequência 5´ - 3´	Fragmento	Localização
COL6A	COL6A_2959F	AGTGGAGGTGTGGAGGAAGT	446 pb	Crh:2
	COL6A_2959R	ACAACCCCACTCTGCTTCAG		
LAMA2	LAMA2_2461F	AGCAGTAGTGGAGAGAGAGAAATGA	274 pb	Crh:6
	LAMA2_2461R	TTCTCAAAGGATGATGCAAAGGAT		
	LAMA2_1259F	GTTTTCTCAATAATTTGCTGCTCTGT	516 pb	Crh:6
	LAMA2_1259R	ACAGATTTGTGATTGACTCTCTCTCT		
RYR1	RYR1_9457F	CCCACTCCCACCATCATCGG	501 pb	Crh:19
	RYR1_9457R	AGCTCGCGTCCTCATTAACTCATT		
	RYR1_6469F	GTGGTAGTAACTGGGAAAATTCTG	512 pb	Crh:19
	RYR1_6469R	AGAGACTGAGATCACCCAGAGGAT		
	RYR1_8341F	GGGCTGGGAGACAGAGAGGAAG	492 pb	Crh:19
	RYR1_8341R	CCCAAGGCCTGGTCACCTTCT		

Tabela 3 - Informações sobre os *primers*, produto de PCR e temperatura de *anealing*.

Para este estudo, foi realizada uma coleta de sangue periférico dos pais dos pacientes que apresentaram mutações a para extração do DNA. Posteriormente foi padronizada uma reação de PCR, demonstrada abaixo, para cada gene e em seguida foi realizado o sequenciamento de Sanger para tais fragmentos.

As etapas realizadas tanto para a reação de PCR, quanto para a purificação e a reação de sequenciamento para os demais genes a serem sequenciados para o estudo de segregação familiar foram padronizadas com os mesmos ciclos térmicos, reagentes e condições estabelecidas para a amplificação dos exons do gene *SEPN1*, sendo necessário que fossem padronizadas apenas as temperaturas de anelamento para cada par de primers, estas temperaturas estão detalhadas na tabela a seguir:

Gene	Primers	Anealing
COL6A	COL6A_2959F	58Cº
	COL6A_2959R	
LAMA2	LAMA2_2461F	58Cº
	LAMA2_2461R	
	LAMA2_1259F	55Cº
	LAMA2_1259R	
RYR1	RYR1_9457F	61Cº
	RYR1_9457R	
	RYR1_6469F	55Cº
	RYR1_6469R	
	RYR1_8341F	62Cº
	RYR1_8341R	

Tabela 4 – Anealing dos primers para estudo de segregação familiar.

Após a reação de sequenciamento, os produtos de sequenciamento foram purificados, precipitados e aplicados em sequenciador ABI3730.

E - Análise do sequenciamento

As análises dos cromatogramas foram realizadas inicialmente de forma manual por dois observadores diferentes (pesquisadora e sua orientadora) e conferidas posteriormente através do programa *SeqScape* da *Life Technologies*.

F - Estudo da predição da patogenicidade das mutações

As mutações foram identificadas em bancos de dados de genes LOVD, afim de verificar se já haviam sido descritas na literatura.

Todas as mutações que ainda não haviam sido descritas, encontradas tanto por sequenciamento por Sanger quanto por NGS, foram analisadas através dos programas de predisposição de patogenicidade *Polyphen-2* e *Mutation Taster*.

G - Estudo do cDNA

Para este estudo foi realizada a extração de RNA através do kit de extração *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen CAT # 52904) e em seguida foi realizada uma reação de transcriptase reversa para a sua conversão em cDNA, tanto para RNA

total (*Random Hexamer*) quanto para RNA mensageiro (OligodT), com kit comercial *SuperScript® III Reverse Transcriptase (ThermoScript™ RT-PCR Systems CAT# 18080044)*. Para a amplificação do cDNA foram desenhados 6 pares de primers (*forward e reverse*) com o uso programa *primer 3*, que foram sintetizados pela empresa *IDT - Prodimol Ltda*. As especificações e condições de cada um destes primers estão relacionadas no quadro abaixo:

Primer	Sequência 5' - 3'	Fragmento
SEPN1-1F cDNA	CTGAAGACCCTGGGGACAGAT	190pb
SEPN1-1R cDNA	ATCAATTGAGCCAGGGAAGTT	
SEPN1-2F cDNA	CTCAGCCTCCTGAGGTCAACT	370pb
SEPN1-2R cDNA	GGTGGATGATGACCTCCTTG	
SEPN1-3F cDNA	AGCATGTTCACTGGCTACCTG	348pb
SEPN1-3R cDNA	CTCCATGTCCACATTCAGAGAC	
SEPN1-4F cDNA	CCACATCATCCTCTCCAAAGAC	342pb
SEPN1-4R cDNA	GAGACCTTCTTGAAGGGGTACA	
SEPN1-5F cDNA	TGTGTTTGAGGAGATCAAGTGG	327pb
SEPN1-5R cDNA	GACGAGTTCTCCTGGTTGTTCT	
SEPN1-6F cDNA	CAACGAGAGCTTCATCAGCAC	249pb
SEPN1-6R cDNA	AGGTGGATGAGAAGCTGAAGAG	

Tabela 5 – Prímers para estudo por cDNA.

Este estudo não foi finalizado devido a ocorrência de um equívoco no desenho do experimento, os procedimentos realizados estão detalhados no apêndice 1.

5 ARTIGO 2 – APLICAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS) NO ESTUDO DE MUTAÇÕES EM PACIENTES BRASILEIROS COM MIOPATIAS RELACIONADAS À SELENOPROTEÍNA N1.

RESUMO

Introdução: Selenopatias são diferentes formas de miopatias que estão relacionadas ao gene da selenoproteína N1, entre elas a distrofia muscular congênita tipo espinha rígida (DMER), a miopatia multimínico (Mm), a desminopatia com mallory body e a miopatia com desproporção congênita de fibras (MDCF). Até o momento não havia estudos nacionais que avaliaram mutações no gene *SEPN1* em pacientes brasileiros com miopatias relacionadas à selenoproteína N1. **Objetivo:** realizar o estudo molecular de pacientes brasileiros com diferentes formas de miopatias através do sequenciamento de nova geração a fim de avaliar mutações nos principais genes relacionados a doenças neuromusculares, principalmente no gene relacionado à selenopatias, o gene *SEPN1*. **Metodologia:** Foram incluídos 19 pacientes portadores de miopatias relacionadas à selenoproteína N1 de 16 famílias diferentes. Incluíram-se pacientes portadores de características clínicas e histopatológicas de miopatias relacionadas ao gene *SEPN1*. Realizou-se protocolo de pesquisa com dados clínicos, revisão da histopatologia muscular e estudo genético molecular dos pacientes e de alguns de seus familiares através de sequenciamento de Sanger a fim de detectar mutações no gene *SEPN1*. Os demais genes foram avaliados através de sequenciamento de nova geração realizado em painel contendo 61 principais genes relacionados a doenças neuromusculares. Realizou-se estudo de segregação familiar em alguns familiares por sequenciamento de Sanger. **Resultados:** O estudo molecular revelou mutações em 12 famílias. Família 1: um paciente com fenótipo clássico de Mm, apresentou uma mutação nova (c.1010G>T) em heterozigose composta com uma mutação patogênica já descrita (c.1384T>G) no gene *SEPN1*. Famílias 2, 3, 4 e 15: quatro pacientes não aparentados, com fenótipo de DMER, apresentaram a inserção de uma base fora de fase (c.713-714insA), três deles em heterozigose composta com outras mutações patogênicas, sendo uma delas uma mutação nova (3'UTR:c.53G>T) e um em homozigose (caso 18). Família 5: um paciente com Mm forma pré-natal com artrogripose e mutação com sentido trocado em heterozigose (c.583G>A), cuja alteração complementar não foi identificada. Família 16: um paciente com Mm no qual foi encontrada uma mutação patogênica (c.1406G>A) em heterozigose composta com uma mutação nova (c.1396C>T) no gene *SEPN1*. Família 14: um paciente com MDCF com inserção de 12 bases em fase (c.316-317ins12bp) no gene *SEPN1*, esta alteração foi considerada como um polimorfismo, neste paciente foram detectadas mutações em heterozigose composta (c.6469G>A/c.9457G>A) no gene *RYR1*. Família 12: três irmãos afetados com quadro de miopatia e rigidez cervical, nos quais foi identificada uma inserção em fase, de três pares de base, em heterozigose (c.438-439ins3bp) no gene *SEPN1*, esta alteração foi considerada como um polimorfismo e posteriormente foi detectada uma mutação patogênica no gene *LAMA2* em heterozigose composta com uma mutação nova (c.1259delA). Na Família 10 e 11

foram detectadas mutações em heterozigose composta nos genes *COL6A1* e *COL6A3*, sendo na família 10 ambas já descritas como patogênicas (c.6859delG/c.6064_5G>A) e na família 11 uma mutação patogênica (c.850G>A) em heterozigose com uma mutação nova (c.2959G>A). **Conclusão:** as miopatias relacionadas à selenoproteína N1 apresentaram amplo fenótipo clínico e histopatológico além de grande heterogeneidade genética. Entre as 12 mutações encontradas no gene *SEPN1*, oito já haviam sido descritas na literatura como patogênicas, em pacientes com DMER e Mm e quatro não foram encontrados registros (c.583G>A; c.1010G>T; c.1396C>T e 3'UTR:53G>T). Foram detectadas mutações em outros 5 genes relacionados a miopatias que apresentam características fenotípicas similares às selenopatias, totalizando 10 mutações, dentre elas havia 8 mutações já descrita como patogênicas e outras duas mutações não foram encontrados registros (c.2959G>A no gene *COL6A3* e c.1259delA no gene *LAMA2*). A avaliação clínica e histopatológica, apesar de fundamental, não é suficiente devido à grande variabilidade fenotípica e genética que envolvem estas formas de miopatias. O estudo molecular é essencial para identificação do defeito genético e consequente aconselhamento genético. O estudo concomitante de genes é uma estratégia rápida e de grande utilidade no diagnóstico de doenças que apresentam ampla heterogeneidade genética e fenotípica.

Palavras-chave: Miopatias relacionadas à selenoproteína N1. Heterogeneidade genética. Heterogeneidade fenotípica. Sequenciamento de nova geração.

ABSTRACT

Introduction: Selenopathies are different forms of myopathies that are related to the selenoprotein N gene, among which: congenital muscular dystrophy with rigid spine (RSMD) multimimicore myopathy (Mm), desminopathy and congenital fiber-type disproportion myopathy (CFTD). Until the present moment there isn't any description in national studies that evaluated the presence of mutations in the gene *SEPN1* in Brazilian patients with myopathy related to selenoprotein N. **Objective:** Carry out a molecular study of Brazilian patients with different types of myopathies through the next generation sequencing to analyze mutations of the principal genes related to neuromuscular diseases, mainly in the gene related to selenopathies. **Methodology:** 19 patients with myopathies related to *SEPN1* from 16 different families were included. The clinical, muscular histopathologies (histological reactions and muscle histochemical) and molecular findings for the characterization of mutations in the *SEPN1* gene were evaluated to research and identify mutations in the *SEPN1* gene as well in others genes included in the next generation sequencing technique that includes the 61 principal genes related to neuromuscular diseases. We conducted family segregation study of some families by Sanger sequencing. **Results:** The molecular study revealed mutations in 12 families. Family 1 : one patient with classic phenotype Mm , with one new mutation (c.1010G>T) in compound heterozygous with one pathogenic mutation already described (c.1384T>G) in *SEPN1* gene. Families 2, 3 , 4, and 15: four unrelated patients with RSMD phenotype, showed insertion of a base out of phase (c.713-714insA) , three of them in compound heterozygous with other pathogenic mutations, one being a new mutation (3'UTR: c.53G>T) and homozygous (case 18) Family 5: One patient with Mm prenatal form with arthrogyrosis showed a missense mutation in heterozygous (c.583G>A) in which the complementary change was not identified. Family 16: A patient with Mm were detected a pathogenic mutation (c.1406G>A) in compound heterozygosity with a new mutation c.1396C>T. Family 14: One patient with CFTD showed insertion of 12 bases in phase (c.316-317 Ins.12bp), this insertion was considered a polymorphism. A mutation in compound heterozygosity (c.6469G>A/c.9457G>A) in the *RYR1* gene was detected in this patient. Family 12: three siblings with with RSMD phenotype, were identified with an insertion in frame, three base pairs, in heterozygous (c.438-439ins3bp), it was considered as a polymorphism. A pathogenic mutation was detected in this family in *LAMA2* gene in compound heterozygosity with a new mutation (c.1259delA). Mutations in compound heterozygosity in the *COL6A1* e *COL6A3* genes were detected in families 10 and 11, in the family 10, both mutations were described as pathogenic (c.6859delG/ c.6064-5G>A) and in the family 11 one pathogenic mutation (c.850G>A) was detected in compound heterozygous with a new mutation (c.2959G>A). **Conclusion:** The selenoprotein N1 related to myopathies shows a wide clinical and histologic phenotype and genetic heterogeneity. Among the 12 mutations found in the *SEPN1* gene, 8 had previously been described in the literature as pathogenic in patients with RSMD and Mm and the other four changes were not related in the literature (c.583G>A; c.1010G>T; c.1396C>T e 3'UTR:53G>T). Mutations were detected in 5 other genes related to myopathies that show phenotypical characteristics similar with selenoprotein N1 gene. In a total of 10 mutations, 8 mutation were described and the others 2 were not described in the literature (c.2959G>A no gene *COL6A3* e c.1259delA in *LAMA2* gene). The clinical and histopathological findings, although essential, is not sufficient due to

high phenotypic and genetic variation this form of myopathies. The molecular analysis is essential to identify the genetic defect and consequent genetic counseling. The study concomitant of genes is a quick strategy and has a big utility for the diagnosis of diseases that show a wide genetic and phenotypic variation.

Keywords: Myopathies related to selenoprotein N1. Genetic heterogeneity. heterogeneity phenotypic. Next generation sequencing

5.1 Introdução

Identificado em 1998 por Moghadaszadeh *et al*, o gene da selenoproteína N1 (*SEPN1*) codifica uma proteína pertencente a uma família de proteínas que apresentam como principal característica a presença da selenocisteína na sua estrutura primária, sendo a selenocisteína a principal forma biológica do *selenium*. A selenoproteína N1 é caracterizada como sendo uma glicoproteína integral de membrana de 70 kDa localizada no retículo endoplasmático e que possui expressão precoce durante o desenvolvimento tecidual^{1,5}.

Posteriormente à sua identificação, foram detectadas mutações no gene *SEPN1*, sendo estas mutações caracterizadas como sendo as responsáveis pela doença muscular congênita denominada como distrofia muscular congênita tipo espinha rígida (DMER). A detecção destas primeiras mutações ocorreram no ano de 2001 e em seguida novas mutações foram detectadas neste gene associando-o a outras três formas de doenças musculares congênitas^{1,6-8}.

A selenoproteína N1 pertence a um grupo no qual estão incluídas cerca de 25 selenoproteínas já identificadas em humanos e foram os primeiros membros da família de selenoproteínas a serem associadas a doenças genéticas. No entanto, estudos têm demonstrado que a função desta selenoproteína está relacionada com reações de oxidação e redução sugerindo assim, que células com deficiência de *SEPN1* são mais suscetíveis ao estresse oxidativo. Porém, apesar de já haver alguns conhecimentos em relação a esta proteína, a sua função ainda permanece desconhecida²⁻⁴.

Devido ao fato da *SEPN1* estar envolvida com mais de uma doença muscular congênita, foi estabelecido um grupo de miopatias relacionadas à selenoproteína N1, no qual estão incluídas as quatro formas de doenças musculares relacionadas a este gene, sendo elas, a distrofia muscular congênita tipo espinha rígida (DMER), a miopatia multiminicore (Mm), desminopatia com *mallory body* e a miopatia com desproporção congênita de fibras (MDCF) e denominaram este grupo como sendo o grupo das selenopatias. Em todas estas formas de doenças a herança é autossômica recessiva⁶.

Assim, as selenopatias são descritas como sendo afecções musculares que apresentam algumas características fenotípicas semelhantes, porém, apesar das

semelhanças as quatro formas de selenopatias são descritas na literatura como condições com fenótipos clínicos e histopatológicos distintos⁸.

A DMER pertence ao grupo das distrofias musculares congênitas, sendo caracterizada por apresentar o início dos sintomas na infância, com sinais de fraqueza muscular mais evidente em musculatura axial, levando na grande maioria dos casos à limitação da movimentação da coluna torácica e cervical. Este achado clínico é referido como espinha rígida, característica que é considerada como a mais marcante para esta forma de distrofia muscular congênita. No entanto, ressalta-se que este sinal também pode ser observado em outras formas de doenças musculares, sendo assim, considerado um achado inespecífico, que surge devido a substituição dos músculos extensores da coluna vertebral por tecido fibroso e gorduroso, resultando no seu encurtamento¹⁷⁻²¹. No curso da doença é comum o surgimento de escoliose e insuficiência respiratória também consideradas características frequentes da DMER. A biópsia muscular pode revelar proliferação de tecido muscular conjuntivo e alterações da citoarquitetura das fibras musculares, classificadas como *moth eaten* ou minicores. No estudo imuno-histoquímico observa-se imunomarcação preservada para proteína merosina⁹.

A Mm pertence ao grupo das miopatias congênitas e é caracterizada por fraqueza muscular e hipotonia, na qual ocorre o acometimento da musculatura da face, proximal de membros e da coluna cervical, gerando rigidez da coluna cervical, assim como na DMER⁷. A biópsia muscular revela alterações caracterizadas por falhas como marcação arredondadas na reação de NADH, reconhecidas como minicores.

Já a MDCF, que também pertence ao grupo das miopatias congênitas, também pode ser caracterizada clinicamente por fraqueza e hipotonia de início precoce na infância apresentando fraqueza muscular proximal nos membros, podendo cursar com comprometimento da musculatura facial, oftalmoplegia, escoliose e contraturas articulares. À biópsia muscular verifica-se como padrão a hipotrofia de fibras tipo I (o diâmetro das fibras tipo I deve ser pelo menos 12% inferior aos das fibras tipo II)^{8,17,18}.

Uma relevante característica das selenopatias está associada à heterogeneidade genética que envolve suas formas, pois, com exceção da DMER, todas as outras também estão associadas a mutações em outros genes. Acredita-se que provavelmente a DMER também possa estar associada à heterogeneidade

genética, porém até o presente momento não há relatos de mutações em outros genes associados a essa forma de miopatia^{1,8}.

Desta forma ressalta-se que as formas de miopatias previamente descritas compartilham algumas características fenotípicas semelhantes, porém são consideradas condições distintas. Do ponto de vista genético podem estar associadas a mutações no gene *SEPN1* ou a outros genes, configurando uma heterogeneidade genética. Assim cita-se que a Mm foi também associada a mutações nos genes *RYR1*, *TNN*, *SCAD*, *SECISBP2* e *MEGF10*. A MDCF também apresenta mutações em outros genes como *ACTA1*, *TPM3*, *CFTD2* e mais recentemente ao gene *RYR1*^{7,8, 10-14,19,20,42}.

Destaca-se ainda, que conforme o gene envolvido, as características fenotípicas podem apresentar algumas particularidades. Como exemplo descrevem-se as diferenças observadas nas Mm causada por mutações nos genes *SEPN1* e *RYR1*. Os pacientes portadores de Mm associada a mutações no gene *SEPN1* apresentam escoliose grave, insuficiência ventilatória, rigidez cervical e apresentam múltiplos minicores na biópsia muscular. Enquanto nos pacientes portadores de Mm devido a mutações no gene *RYR1* pode-se verificar a ocorrência de um comprometimento ventilatório mais leve, porém podendo ocorrer o envolvimento da musculatura extraocular e susceptibilidade à hipertermia maligna. Nestes casos a biópsia muscular evidencia cores grandes e múltiplos associados ao predomínio de fibras tipo I. Outro exemplo pode ser dado citando o acometimento do músculo cardíaco quando a Mm é causada por mutações no gene *TTN* ou no gene *SCAD*^{7,10,11-13}.

Devido a todas suas características e principalmente à heterogeneidade genética e fenotípica que envolve estas formas de selenopatias, o estudo molecular se torna essencial para elucidação destes casos, porém, o estudo tradicional envolvendo a verificação gene a gene através do sequenciamento de Sanger pode se tornar um estudo exaustivo e de difícil condução devido ao fato de não proporcionar uma verificação simultânea de genes.

Assim, o advento do sequenciamento de nova geração no qual a principal estratégia se dá na possibilidade da realização do estudo concomitante de vários genes que possam estar relacionados a algum tipo de doença proporcionou uma grande revolução no estudo destas doenças genéticas⁶⁻⁸.

A exemplo, podemos citar o trabalho recente de Savarese e colaboradores

no qual foi possível a detecção de diversas mutações patogênicas em 52 pacientes dentre 177 casos de miopatias através do uso da metodologia do NGS em um painel contendo os 93 principais genes relacionados às principais miopatias genéticas, inclusive ao gene *SEPN1*²¹.

O objetivo deste trabalho consiste na realização de um estudo genético em pacientes brasileiros com miopatias relacionadas à selenoproteína N1, utilizando o sequenciamento de nova geração através de painel customizado contendo 61 genes relacionados a doenças neuromusculares e correlacionar os achados moleculares com os achados clínicos e histopatológicos.

5.2 Pacientes e métodos

Foi realizado um estudo transversal no qual foram incluídos 19 pacientes brasileiros, com diagnóstico clínico primário de miopatias relacionadas à *SEPN1* (*SEPN1*-MR) acompanhados no ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital das Clínicas da UFMG, no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo, na AACD de Recife e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Riberão Preto-USP, entre o período de fevereiro de 2012 e março de 2016.

5.2.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos pacientes com miopatias relacionadas à selenoproteína N1 que apresentavam mutações provavelmente patogênicas no gene *SEPN1*.

Além destes, foram incluídos novos pacientes com manifestações clínicas e achados histopatológicos e histoquímicos musculares compatíveis com miopatias relacionadas à selenoproteína N1, sendo elas:

- Distrofia muscular congênita tipo espinha rígida: pacientes com história de fraqueza e hipotonia nos primeiros anos de vida, hipotrofia generalizada associada à limitação da movimentação da coluna cervical e/ou torácica. Biópsia muscular apresentado padrão miopático sem anormalidades estruturais, exceto pela presença de minicores ou moth eaten ou padrão distrófico.

- Miopatia multiminicore: pacientes com história de fraqueza e hipotonia nos primeiros anos de vida e biópsia muscular evidenciando minicores (áreas com reatividade diminuída nas reações histoquímicas oxidativas), associados ao predomínio de fibras do tipo I.
- Miopatia com desproporção congênita de fibras: pacientes com história de fraqueza e hipotonia nos primeiros anos de vida e biópsia muscular evidenciando hipotrofia de fibras tipo I, cujo diâmetro das fibras tipo I deve ser pelo menos 12% inferior ao das fibras tipo II.

5.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos desta fase do estudo pacientes que não apresentavam fenótipo clínico e histopatológico compatível com miopatias associadas ao gene *SEPN1* e os pacientes que se recusaram a participar.

5.2.3 Procedimentos

Foram realizados estudos genéticos moleculares por sequenciamento de Sanger e sequenciamento de nova geração a partir de amostras de DNA extraídas de sangue total.

Os pacientes foram reavaliados clinicamente pelo médico neurologista responsável pelo encaminhamento e ao final do estudo todos os pacientes receberam um relatório e o aconselhamento genético familiar.

5.2.3.1 Avaliação clínica

Os novos pacientes incluídos nesta pesquisa foram submetidos a uma reavaliação clínica realizada pelo mesmo neurologista responsável pelo encaminhamento do paciente, tendo sido preenchido um protocolo elaborado com base em aspectos clínicos e neurológicos relevantes (APÊNDICE 4).

Além disso, os pais de alguns dos pacientes incluídos na pesquisa também foram avaliados clinicamente, na tentativa de se detectarem manifestações menores da doença.

5.2.3.2 Estudo genético molecular

O estudo molecular foi realizado através das técnicas de sequenciamento de Sanger e Sequenciamento de Nova Geração.

A - Coleta de sangue e extração de DNA

DNA genômico dos pacientes e dos seus pais foram extraídos a partir da coleta de 10 ml de sangue periférico através de metodologia rotineira, utilizando o kit comercial Wizard Genomic DNA Purification do fabricante Promega (CAT#A1125).

B - Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

O sequenciamento de nova geração foi realizado na Plataforma *HiSeq 2500* da *Illumina* através da inclusão de amostras de DNA dos pacientes em um painel contendo um total de 61 principais genes relacionados à doenças neuromusculares, tais genes estão relacionados no quadro abaixo:

GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE
TPM3	PLEC1	FKRP	DYSF	TTN	DNM2	ITGA7	DNM2
TPM2	GDF8	POMGNT1	SGCG	GNE	KLHL9	DNM2	BIN1
ACTA1	CAV3	LARGE	SGCA	MYH7	FLNC	TCAP	MEGF10
KBTBD13	FHL1	DMD	SGCB	MATR3	VCP	LMNA	TRIM32
CFL2	LAMA2	EMD	SGCD	TIA1	FKTN	POMT1	CRYAB
SEPN1	COL6A1	DNAIB6	TCAP	MYOT	DAG1	POMT2	DES
RYR1	COL6A2	HNRPDL	TRIM32	NEB	AN05	FLNC	MYOT
MTM1	COL6A3	CAPN3	LAMP2	LDB3			

Tabela 1 – Genes incluídos no painel de doenças neuromusculares para NGS.

C - Análise bioinformática

A análise bioinformática foi realizada através de programa criado e patentado pelo CEGH-USP, que permite a seleção de filtros de pesquisa incluindo critérios de verificação para cada amostra de acordo com sua herança genética e perfis específicos de análise.

Através deste programa é possível comparar as alterações encontradas com as descritas nos bancos de dados: 1.000 genomas, 6.500 genomas e ExAC, além de fazer buscas em bancos de dados de mutações (OMIM; ClinVar; HGMD). Ressalta-se ainda que foi utilizado um banco de 1.000 exomas de idosos (acima de 60 anos) brasileiros normais.

D - Sequenciamento Sanger

O sequenciamento de Sanger para o estudo do gene *SEPN1* foi realizado tanto para detecção de mutações nos pacientes novos, quanto para a confirmação das mutações detectadas nos demais pacientes por NGS. Além do estudo de segregação familiar destas mutações nos pais dos pacientes que apresentavam mutações novas nos outros genes verificadas através do estudo por NGS.

Para o estudo de mutações no gene *SEPN1* as amostras de DNA dos pacientes foram amplificadas através da técnica de PCR de todos os exons codificantes do gene *SEPN1*, tendo sido desenhados 12 pares de *primers* (*forward* e *reverse*) com o uso programa *primer 3*, que foram sintetizados pela empresa *IDT - Prodimol Ltda*. As especificações e condições de cada um destes primers esta relacionada no quadro abaixo.

<i>Primer</i>	<i>Sequência do primer</i>	<i>Produto de PCR</i>	<i>Temp. Annealing</i>
SEPN1 - 1F	CTTGGCGTTCCGGTGTAG	456 bp	60°C
SEPN1 - 1R	ACTCGTCCATGCCCATGTC		
SEPN1 - 2F	CAGTCTCTCCTCCCAAGCAG	198 bp	60°C
SEPN1 - 2R	TCAGTGAAGACACCGTTGG		
SEPN1 - 4F	GGTGAGCCCTGTAGCATAAG	232 bp	58°C
SEPN1 - 4R	TCGGGATACACACAGATGAC		
SEPN1 - 5F	ACCCACATGGTACAGGAGAC	298 bp	60°C
SEPN1 - 5R	CACCCCAGCTGTCCTCAC		
SEPN1 - 6F	ACCCAGCAAGCCAGTACG	180 bp	60°C
SEPN1 - 6R	CCAGTGTGGCCCACTCAC		
SEPN1 - 7F	AAGGTGGGCAGCTCTGGT	232 bp	60°C
SEPN1 - 7R	AGCAGGACAAGCTGTAGGAG		
SEPN1 - 8F	TGATGATGGTGTCACTCTGC	207 bp	58°C
SEPN1 - 8R	TAGAGACCCTCCAAAATGCT		
SEPN1 - 9F	CCCCTACCACTGACCTCTG	248 bp	60°C
SEPN1 - 9R	CCTGACCCTGGCCTTCAC		
SEPN1 - 10F	CTTCGCTCTGTCTCGGTGT	196 bp	60°C
SEPN1 - 10R	TCTGGTACCCACAAGGTGT		
SEPN1 - 11F	CGCCTCACCTTCTGTCTT	182 bp	60°C
SEPN1 - 11R	ACTGTTCCGGACGCTCCT		
SEPN1 - 12bF	AGTGTGCAACTGTCCCACA	220 bp	58°C
SEPN1 - 12bR	CGAAGCCTGATGAAGTCTGC		
SEPN1 - 13F	CCCATAGAAGAGAGGGCACA	269 bp	60°C
SEPN1 - 13R	TGCATCAGATCCCGTCCAG		

Tabela 2 - Informações sobre os *primers* *SEPN1*.

Não foi realizada a amplificação do exon 3, pois este corresponde a um *splice* alternativo e não participa da codificação da proteína³².

E - Estudo de segregação genética familiar

Realizou-se o estudo de segregação genética familiar para as mutações detectadas tanto no gene *SEPN1*, quanto nos demais genes incluídos no painel de doenças neuromusculares. Assim, foram confeccionados primers e padronizadas reações de PCR para cada uma destas mutações com a finalidade de avaliar a segregação destas mutações entre os pais de todos dos pacientes que apresentaram mutações.

A sequência dos primers referente aos novos genes estudados no painel de doenças neuromusculares, assim como o detalhamento de cada um deles esta relacionada na tabela 3, abaixo:

Gene	Primer	Sequência 5' - 3'	Fragmento	Localização
COL6A	COL6A_2959F	AGTGGAGGTGTGGAGGAAGT	446 pb	Crh:2
	COL6A_2959R	ACAACCCCACTCTGCTTCAG		
LAMA2	LAMA2_2461F	AGCAGTAGTGGAGAGAGAGAAATGA	274 pb	Crh:6
	LAMA2_2461R	TTCTCCAAAGGATGATGCAAAGGAT		
	LAMA2_1259F	GTTTTCTCAATAATTTGCTGCTCTGT	516 pb	Crh:6
	LAMA2_1259R	ACAGATTTGTGATTGACTCTCTCTCT		
RYR1	RYR1_9457F	CCCACTCCCACCATCATCGG	501 pb	Crh:19
	RYR1_9457R	AGCTCGCGTCCTCATTAACCTCATT		
	RYR1_6469F	GTGGTAGTAACTGGGAAAACCTTCTG	512 pb	Crh:19
	RYR1_6469R	AGAGACTGAGATCACCCAGAGGAT		
	RYR1_8341F	GGGCTGGGAGACAGAGAGGAAG	492 pb	Crh:19
	RYR1_8341R	CCCAAGGCCTGGTCACCTTCT		

Tabela 3 - Informações sobre os *primers*, produto de PCR e temperatura de *anealing*.

Para este estudo, foi realizada uma coleta de sangue periférico dos pais dos pacientes para extração do DNA. Posteriormente foi padronizada uma reação de PCR e em seguida foi realizado o sequenciamento de Sanger para tais fragmentos. A seguir estão demonstradas, na tabela 4, as condições estabelecidas para cada um dos novos genes do painel de NGS:

Gene	Primers	Anealing
COL6A	COL6A_2959F	58Cº
	COL6A_2959R	
LAMA2	LAMA2_2461F	58Cº
	LAMA2_2461R	
	LAMA2_1259F	55Cº
	LAMA2_1259R	
RYR1	RYR1_9457F	61Cº
	RYR1_9457R	
	RYR1_6469F	55Cº
	RYR1_6469R	
	RYR1_8341F	62Cº
	RYR1_8341R	

Tabela 4 – Anealing dos primers para estudo de segregação familiar.

Os produtos de PCR foram posteriormente sequenciados em sequenciador ABI 3730 DNA Sequencer (Applied Biosystem).

F - Estudo da predição da patogenicidade das mutações

As alterações identificadas foram analisadas nos bancos de dados de genes LOVD, como propósito de verificar se já haviam sido descritas na literatura.

Todas as mutações que ainda não haviam sido descritas, encontradas tanto por sequenciamento por Sanger quanto por NGS, foram analisadas através dos programas de predisposição e patogenicidade *Polyphen-2* e *Mutation Taster*.

5.3 RESULTADOS

Os resultados obtidos para as metodologias propostas neste trabalho estão detalhados em seguida.

5.3.1 Identificação e classificação fenotípica

Os dados de identificação, assim como a procedência e a naturalidade dos pacientes, estão descritos na tabela abaixo.

Família	Caso	Sexo	Diagnóstico	Rigidez Cervical	Idade Atual	Procedência/ Naturalidade
1	1	M	Multiminicore	S	19a	HC-UFMG (BH-MG)
2	2	M	Espinha Rígida	S	27a	HC-UFMG (BH-MG)
3	3	F	Espinha Rígida	S	19a	Unesp-São Paulo
4	4	F	Espinha Rígida	S	22a	CEGH-USP (Rondonópolis-MT)
5	5	M	Multiminicore	S	19a	HC-UFMG (BH-MG)
6	6	M	Espinha Rígida	S	16a	HC-Ribeirão Preto/SP
	7	F	Espinha Rígida	S	13a	
7	8	F	Espinha Rígida	S	24a	HC-UFMG (BH-MG)
8	9	F	Espinha Rígida	S	31a	CEGH-USP (Belém-PA)
9	10	M	Multiminicore	N	25a	HC-UFMG (BH-MG)
10	11	M	Multiminicore	S	5a	HC-UFMG (Recife-PE)
11	12	F	Espinha Rígida	S	23a	HC-UFMG (BH-MG)
12	13	M	Espinha Rígida	S	24a	HC-UFMG (Ibirité-MG)
	14	F	Espinha Rígida	S	28a	
	15	M	Espinha Rígida	S	31a	
13	16	M	Espinha Rígida	S	40a	HC-UFMG (St.Luzia-MG)
14	17	M	Desproporção cong.de fibras	S	35a	HC-UFMG (BH-MG)
15	18	F	Espinha Rígida	S	15a	AACD-Recife
16	19	M	Multiminicore	N	4a	AACD-Recife

Tabela 5 - Dados dos pacientes incluídos na pesquisa.

a= anos; F= feminino; M= masculino; HC= Hospital das Clínicas; USP= Universidade de São Paulo, S=sim; N= não; NI= não informado.

Foram incluídos no estudo 19 pacientes de 16 famílias não relacionadas, sendo 12 provenientes do Ambulatório de Doenças Neuromusculares do HC-UFMG, dois do Centro de Estudos do Genoma Humano da USP, três do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto-SP e dois da AACD de Recife. As idades variaram

de 5 a 40 anos e, quanto ao gênero, 11 pacientes eram do sexo masculino e 8 do sexo feminino. Quanto ao fenótipo, 14 foram classificados como portadores de distrofia congênita tipo espinha rígida, quatro com miopatia multiminicore e um com miopatia com desproporção congênita de fibras.

Não foi observada consanguinidade entre os pais dos pacientes avaliados. Havia outros membros familiares acometidos em duas famílias estudadas. Os casos 13, 14 e 15 eram irmãos em uma mesma prole, assim como os casos 06 e 07.

5.3.2 Estudo em tecido muscular

O padrão dos achados do estudo histopatológico muscular estão descritos na tabela abaixo:

Caso	Músculo	Padrão
1	Bíceps	Miopático
2	Quadríceps	Miopático
3	N.A	N.A
4	Bíceps	Distrófico
5	Bíceps	Miopático
6	N.A	N.A
7	N.A	N.A
8	N.A	N.A
9	Bíceps	Miopático
10	Bíceps	Miopático
11	Bíceps	Miopático
12	Bíceps	Distrófico
13	Bíceps	Miopático
14	N.A	N.A
15	N.R	N.R
16	Bíceps	Distrófico
17	Bíceps	Miopático
18	N.A	N.A
19	N.A	N.A

Tabela 6 - Dados histológicos musculares dos pacientes.
NA= não analisado; NR=não realizado.

5.3.3 Estudo genético molecular

Os achados moleculares obtidos tanto através do sequenciamento de Sanger, quanto pelo Sequenciamento de Nova Geração estão discriminados na tabela a seguir.

Família	Caso	NGS e Sanger - SEPN1	NGS - Outros genes
1	1	c.1384T>G/p.U426G Patogênica; descrita: ClinVar /LOVD	Nenhuma alteração
		c.1010G>T/p.R337M Patogênica: polyphen-2 ; não descrita	Nenhuma alteração
2	2	Exon 5: c.713-714insA Patogênica; descrita Clinvar/Leiden	Nenhuma alteração
		Exon 11: c.1397G>A/p.R466Q Patogênica: descrita ClinVar.	Nenhuma alteração
3	3	Exon 5: c.713-714insA Patogênica: descrita ClinVar.	Nenhuma alteração
		Exon 11: c.1406G>A/p.R469Q Patogênica: descrita ClinVar /LOVD	Nenhuma alteração
4	4	Exon 5: c.713-714insA Patogênica; descrita: ClinVar /LOVD	Nenhuma alteração
		3' UTR: c.53 G>T Patogênica: polyphen-2; não descrita	
5	5	c.583G>A/p.195 A>T Patogênica: polyphen-2; não descrita	Nenhuma alteração
6	6	Nenhuma alteração	Nenhuma alteração
	7	Nenhuma alteração	Nenhuma alteração
7	8	Nenhuma alteração	Nenhuma alteração
8	9	Nenhuma alteração	Nenhuma alteração
9	10	Nenhuma alteração	Nenhuma alteração
10	11	Nenhuma alteração	Gene: COL6 A3:c.6859delG Patogênica; descrita: ClinVar /LOVD
			Gene: COL6 A3:c.6064_5G>A Patogênica; descrita: ClinVar /LOVD
11	12	Nenhuma alteração	Gene COL6: A1:c.850G>A/p.G284R Patogênica; descrita: ClinVar /LOVD
			Gene COL6: A3:c.2959G>A/p.V987M Patogênica: polyphen-2; não descrita
12	13	Exon 4: insGAG Descrita: ClinVar /LOVD polimorfismo	Gene LAMA2: c.1259delA/p.P418fs Patogênica: Mut.Taster; não descrita
	14		Gene LAMA2: c.2461A>C/p.T821P Patogênica; descrita: ClinVar /LOVD
	15		Gene LAMA2: c.2461A>C/p.T821P Patogênica; descrita: ClinVar /LOVD
13	16	Nenhuma alteração	Gene: LMNA: c.1580G>T/p.R527P Patogênica; descrita: ClinVar /LOVD
14	17	c.136-137ins12 Provavelmente não patog. Não descrita	Gene RYR1: c.6469G>A/p.E2157K Patogênica
		c.729G>A/p.P243P Mutação sinônima	
		c.425G>A/p.C243Y Descrita: ClinVar /LOVD polimorfismo	
		c.748-40G>A Não Patog. Descrita: LOVD	
15	18	Exon 5: c.713-714insA Homozigose Patogênica; descrita: ClinVar /LOVD	Não realizado
16	19	Exon 11: c.1396C>T/p.R466W Patog.: polyphen-2 ; não descrita	Não realizado
		Exon 11: c.1406G>A/p.R469Q Patogênica; descrita: ClinVar /LOVD	

Tabela 7 – Resultados obtidos por sequenciamento de nova geração e/ou Sanger.

Dentre as alterações detectadas no gene *SEPN1* foram encontradas mutações em heterozigose composta nos casos 01, 02, 03, 04 e 19 e em

homozigose no caso 18.

Entre tais mutações encontradas no gene *SEPN1*, as mutações, c.1384T>G (caso 01), c.1397G>A (caso 02) a inserção c.713-714insA (caso 02, 03, 04 e 18) e a mutação c.1406 G>A (caso 03 e 19) já haviam sido previamente descritas na literatura como patogênicas. Enquanto as mutações c.583G>A (caso 05), c.1010G>T (caso 01), 3' UTR: c.53 G>T (caso 04) e c.1396 C>T (caso 19) tratavam-se de mutações novas.

Foram detectadas mais 10 alterações nos genes *COL6A3*, *COL6A1*, *LAMA2*, *LMNA* e *RYR1*, inseridos no painel de doenças neuromusculares, dentre estas, oito mutações já haviam sido previamente descritas na literatura como patogênicas, enquanto duas tratavam-se de mutações novas.

5.3.3.1 Análise das mutações encontradas no gene *SEPN1*

Caso 01: Paciente com fenótipo de miopatia multiminicore, forma clássica.



Figura 1 – Imagens do exame clínico demonstrando acentuação da escoliose e agravamento do comprometimento ventilatório (A e B).

O estudo molecular revelou a presença de duas mutações em heterozigose composta. Uma das mutações consiste na troca de uma timina por uma guanina no nucleotídeo 1384 do cDNA no exon 10, levando à troca do códon da selenocisteína por uma glicina na região 426 da proteína (c.1384 T>G/p.U426G). Tal mutação foi

descrita na literatura e é considerada patogênica⁷.

A segunda mutação consiste na troca de uma guanina por uma timina no nucleotídeo 1010 do cDNA no exon 7, gerando a troca de uma arginina por uma metionina no aminoácido 337 da proteína (c.1010G>T/p.R337M). Essa mutação não foi descrita na literatura até o presente momento.

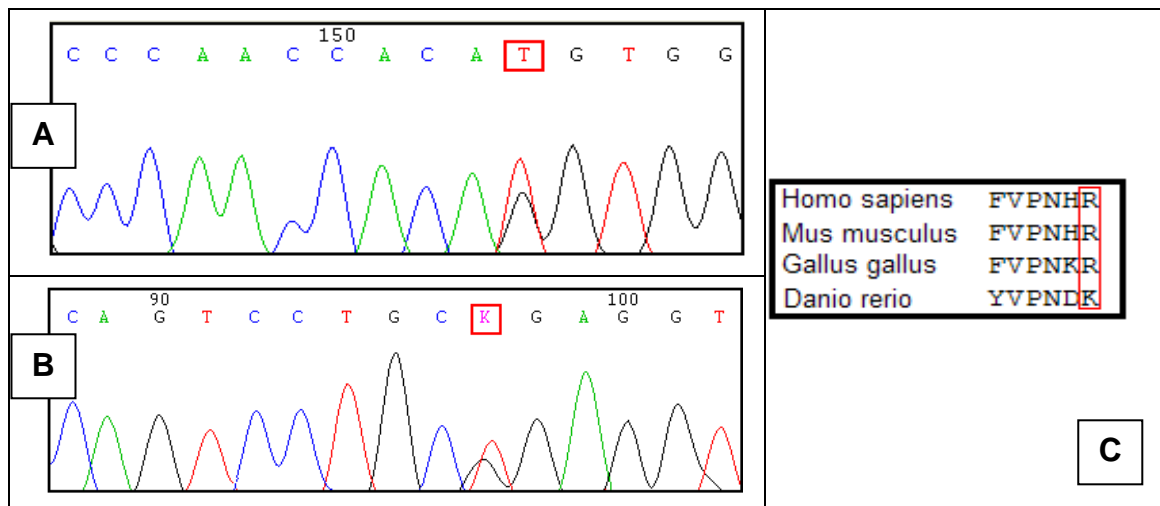


Figura 2 – Cromatograma apresentando mutações em heterozigose composta nos exons 7 e 10, respectivamente (A e B), e o estado de conservação do aminoácido p.R337M (C).

Analisando o estado de conservação deste aminoácido entre as espécies, observa-se que ele é altamente conservado. Além disso, estudo realizado demonstrou a ausência desta mutação na análise de 100 controles normais estudados.

Devido ao fato de se tratar de uma mutação nova, foi realizado o estudo de segregação familiar para as mutações encontradas neste paciente, tendo sido detectada a mutação c.1010G>T em heterozigose no pai e a mutação c.1384T>G em heterozigose na mãe.

Esta mutação também foi verificada quanto à sua predição da patogenicidade através do programa *Polyphen-2*, que apresentou uma probabilidade de 99% desta mutação ser patogênica, conforme demonstrado a seguir:

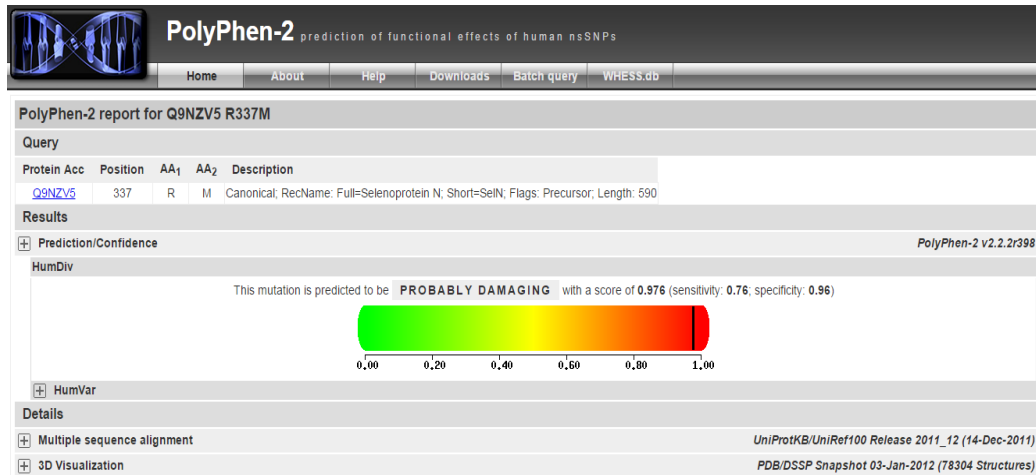
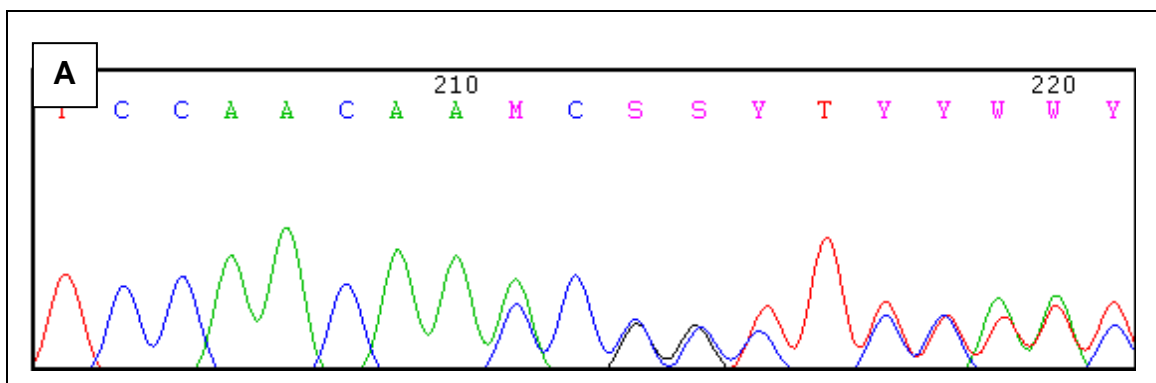


Figura 3 – Predição da patogenicidade da mutação c.1010G>T/p.R337M

Caso 02: Paciente com fenótipo de distrofia muscular congênita tipo espinha rígida.

O estudo molecular revelou a inserção de uma base (adenina) fora de fase entre os nucleotídeos 713 e 714 do cDNA no exon 5 do gene *SEPN1* (c.713-714isnA), em heterozigose composta com a mutação c.1397G>A/p.R466Q que consiste na troca de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo 1397 do cDNA no exon 11, região de grande importância do gene *SEPN1*, pois é a região na qual ocorre o elemento de redefinição da selenocisteína (ERS). Ambas mutações já possuem descrição na literatura como sendo mutações patogênicas.



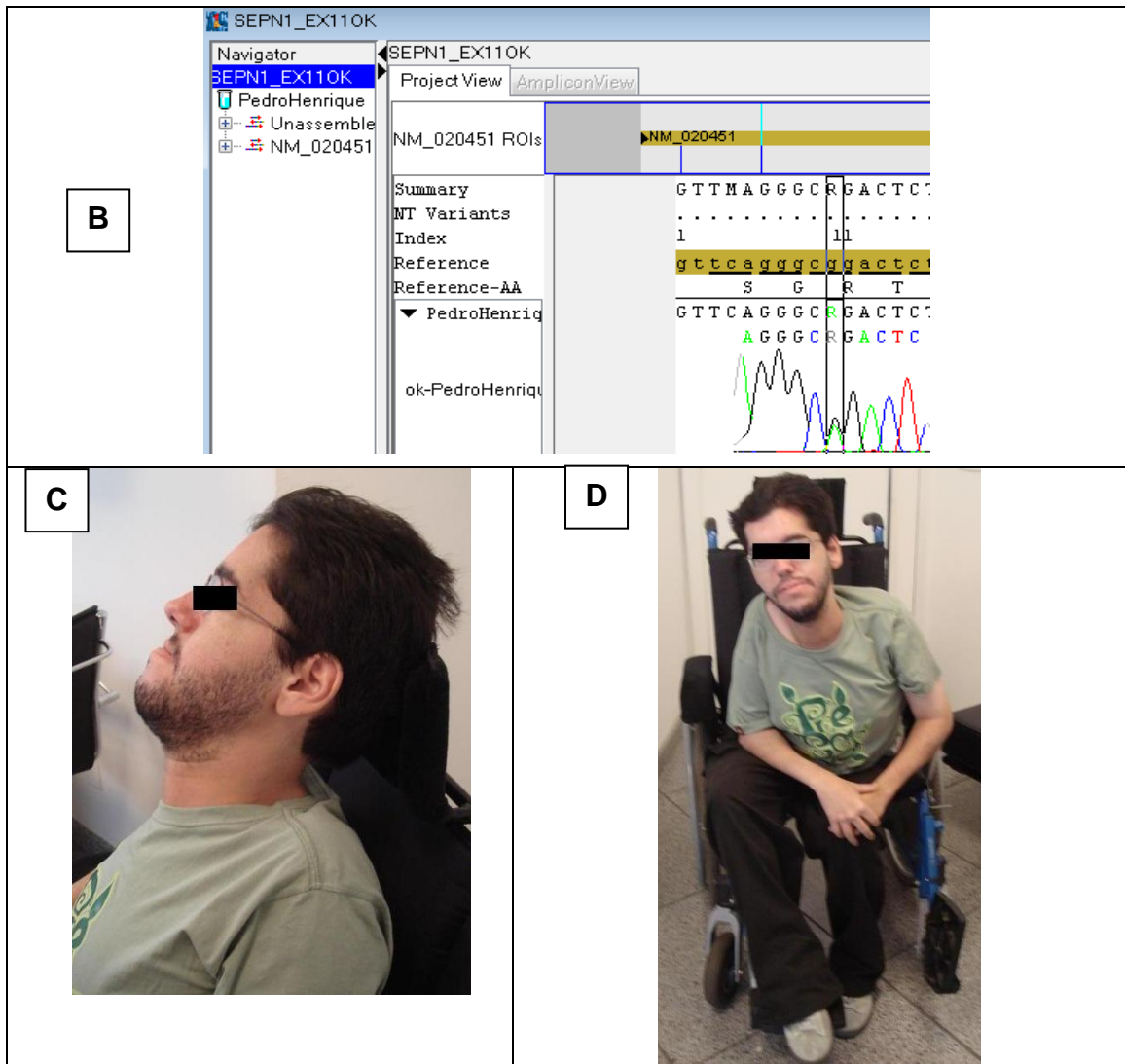


Figura 4 - Cromatogramas demonstrando as mutações c.713-714ins.A/p.N238K e c.1397G>A/p.R466Q (A e B). Imagens do paciente 02 demonstrando rigidez cervical e escoliose (C e D).

Caso 03: Paciente com fenótipo de distrofia muscular congênita tipo espinha rígida.

O estudo molecular revelou a inserção de uma base (adenina) fora de fase entre os nucleotídeos 713 e 714 do cDNA no exon 5 do gene *SEPNI* (c.713-714insA), em heterozigose composta com a mutação c.1406G>A/p.R469Q (exon 11). Ambas alterações são consideradas patogênicas e possuem descrição na literatura médica.

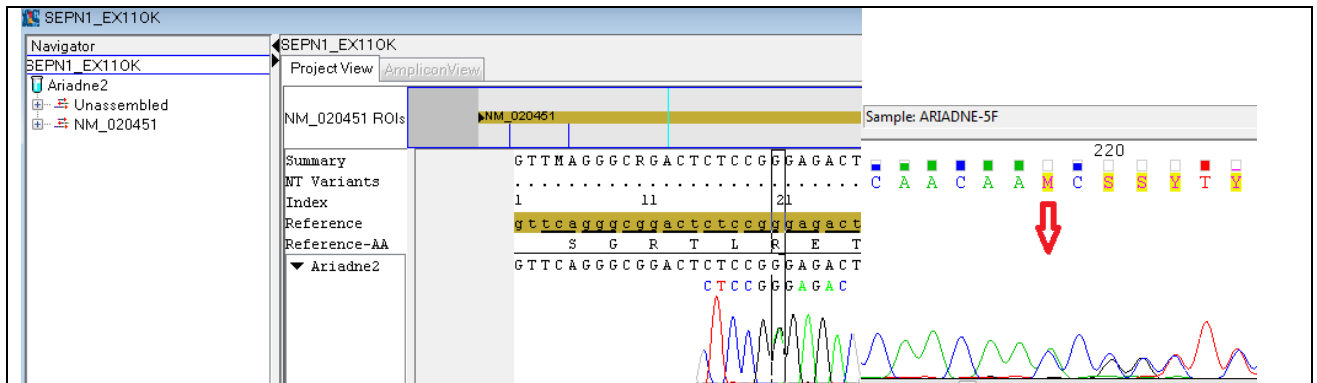


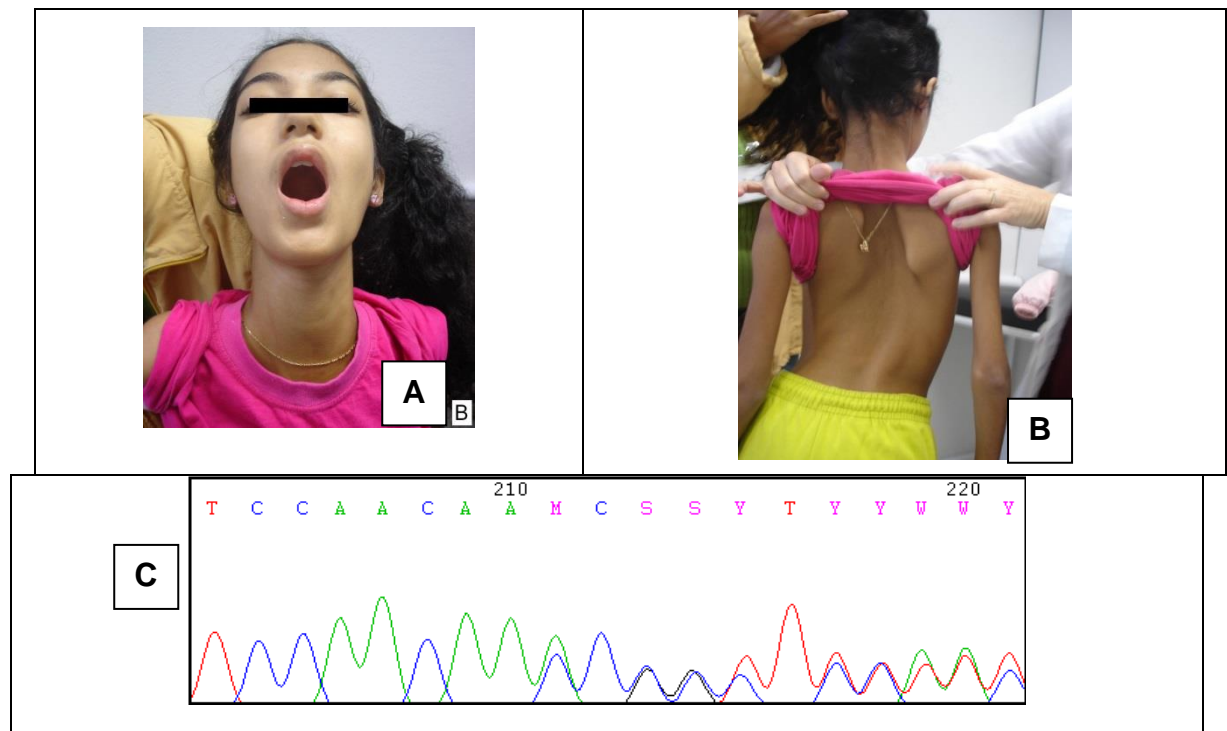
Figura 5 - Cromatogramas demonstrando a mutação c.1406G>A/p.R469Q

Caso 04: Paciente com fenótipo de distrofia muscular congênita tipo espinha rígida.

O estudo molecular revelou a inserção de uma base (adenina) fora de fase entre os nucleotídeos 713 e 714 do cDNA no exon 5 do gene *SEPNI* (c.713-714insA), em heterozigose composta com a mutação c.53G>T em heterozigose na posição 3' UTR (anterior ao ATG).

A segunda mutação consiste na troca de uma guanina por uma timina em uma região 3'UTR.

Esta mutação não foi descrita na literatura até o presente momento.



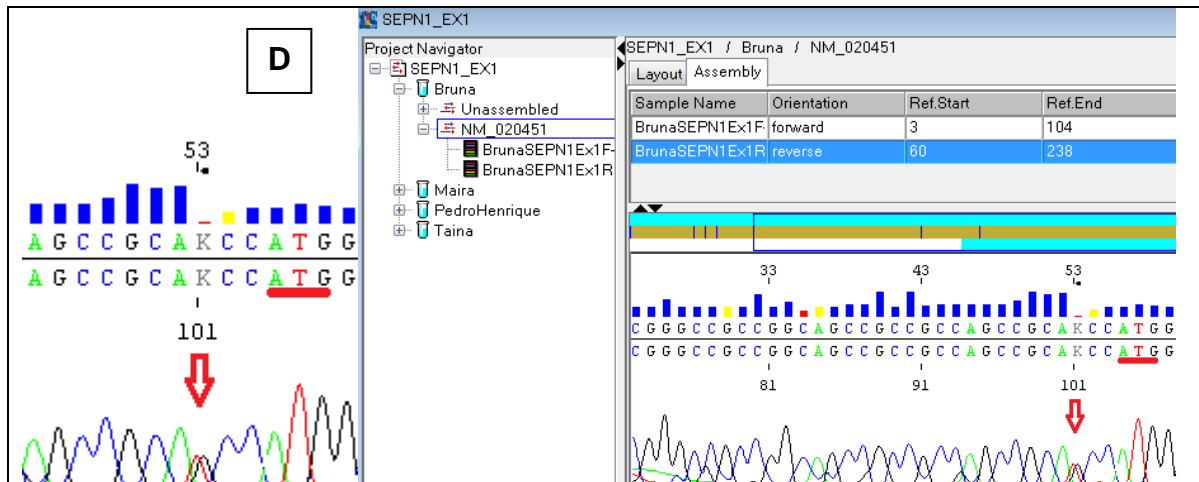


Figura 6 – Imagens da paciente 04, demonstrando características fenotípicas (A e B). Cromatogramas apresentando as mutações em heterozigose composta nos exons 5 e 1, respectivamente (C e D).

A região desta nova alteração detectada, compreende 55 bases transcritas mas não traduzidas, sendo considerada uma região importante de regulação do gene.

Esta mutação também foi verificada quanto à sua predição da patogenicidade através do programa *Mutation Taster* que apresentou uma probabilidade de 99% desta mutação ser patogênica, conforme demonstrado abaixo:

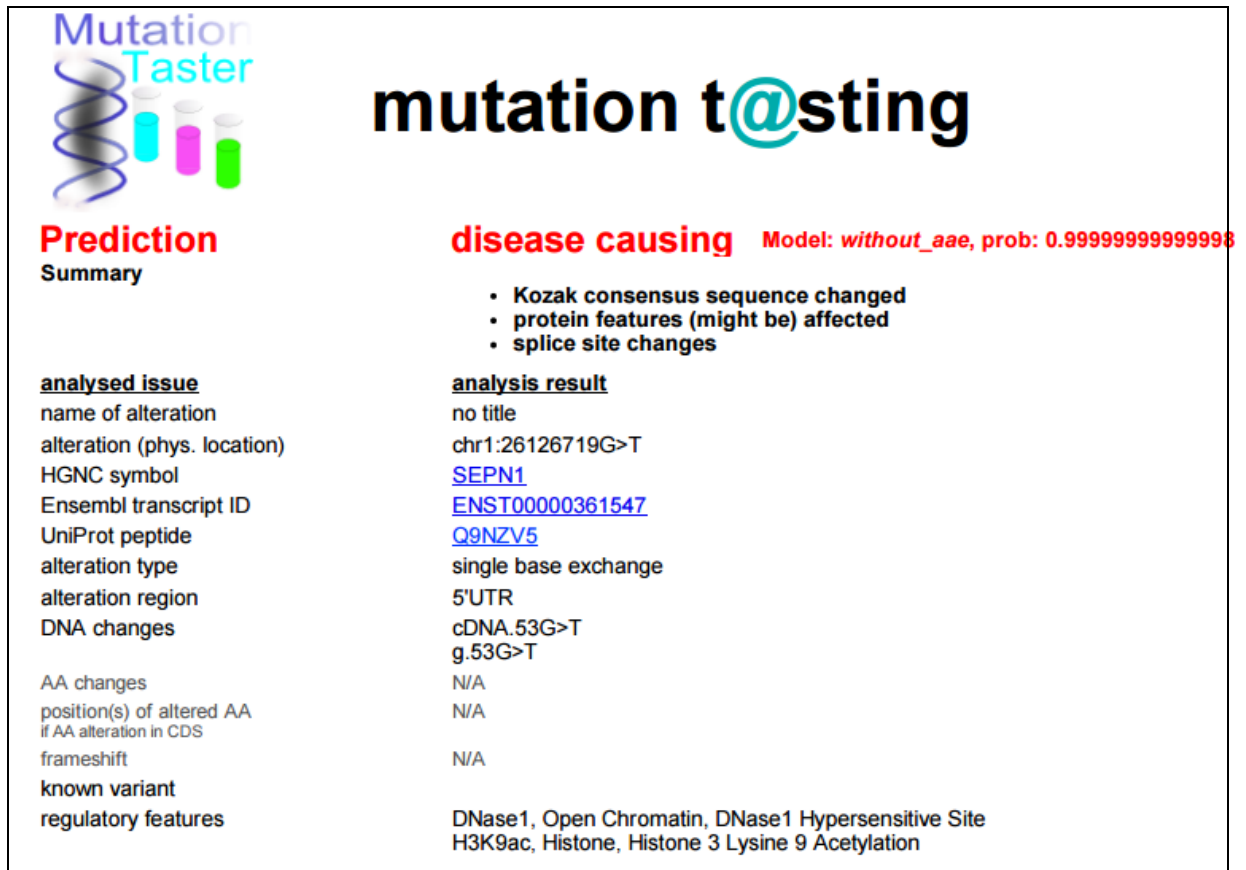


Figura 7 - Predição da patogenicidade da mutação c.53G>T.

Caso 05: Paciente com fenótipo de miopatia multimínico-re forma pré-natal com artrogripose múltipla.

O estudo molecular identificou uma mutação *missense* em heterozigose no exon 5, na qual houve a troca de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo 583 do cDNA, levando à troca de uma alanina por uma treonina no aminoácido 195 da proteína. Além disso, estudo realizado anteriormente demonstrou a ausência desta mutação na análise de 100 controles normais estudados. O estudo de segregação familiar foi realizado nos pais deste paciente e identificou-se a mesma mutação em heterozigose no pai, o qual é assintomático e não foi encontrada nenhuma alteração no DNA da mãe deste paciente. Não foi encontrada outra mutação no segundo alelo do paciente.

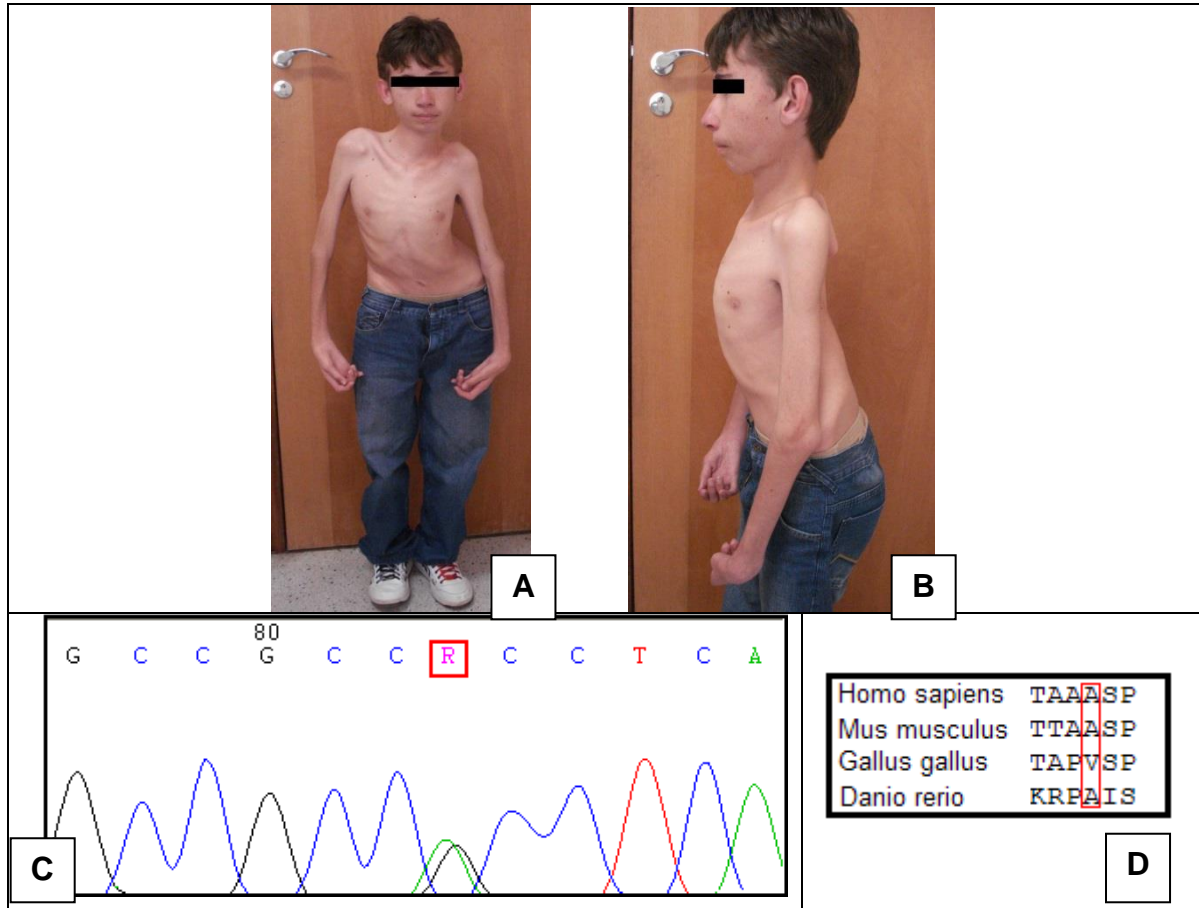


Figura 8 - Paciente aos 12 anos de idade portador de miopatia multiminicore forma pré-natal com artogripose. Ao exame clínico acentuação da escoliose e agravamento do comprometimento ventilatório (A e B). Cromatograma demonstrando a mutação c.583G>A/p.A195T em heterozigose no exon 5 (C). Demonstrado estado de conservação do aminoácido (D).

Foi possível a detecção de apenas uma mutação (heterozigose) no gene *SEPN1*, não sendo encontrada a mutação para o segundo alelo. Tal mutação ainda não possui descrição na literatura científica, sendo assim, considerada como uma mutação nova. O estudo de predição da patogenicidade desta mutação foi realizado e esta demonstrado a seguir:

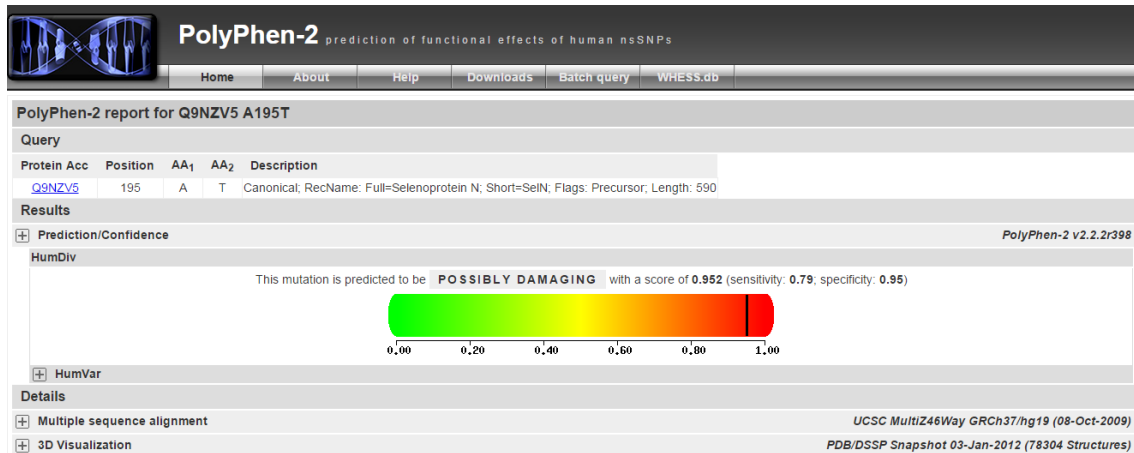


Figura 9 – Predição da patogenicidade da mutação c.583G>A/p.A195T.

Caso 18: Paciente com fenótipo de distrofia muscular congênita tipo espinha rígida.

O estudo molecular revelou a inserção de uma base (adenina) fora de fase entre os nucleotídeos 713 e 714 do cDNA no exon 5 do gene *SEPN1* (c.713-714isnA), em homozigose. Esta mutação já possui descrição na literatura como sendo patogênica.

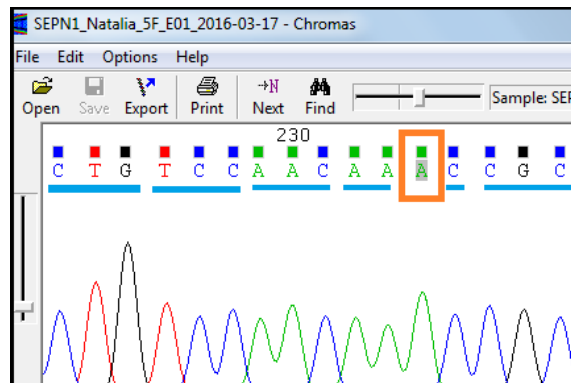


Figura 10 - Cromatograma demonstrando a mutação c.713-714isnA em homozigose no exon 5.

Caso 19: Paciente com fenótipo de Miopatia Multiminicore.

No caso 19, foram detectadas através do estudo molecular a presença de duas mutações em heterozigose composta, ambas localizadas no elemento de redefinição da selenocisteína (ERS) no exon 11.

Uma das mutações consiste na troca de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo 1406 do cDNA no exon 11, levando à troca do códon da arginina por

uma glutamina na região 469 da proteína (c.1406G>A/p.R469Q). Tal mutação foi descrita na literatura e é considerada patogênica⁷.

A segunda mutação consiste na troca de uma citosina por uma timina no nucleotídeo 1396 do cDNA também no exon 11, gerando a troca de uma arginina por um triptofano no aminoácido 466 da proteína (c.1396C>T/p.R466W). Essa mutação não foi descrita na literatura até o presente momento.

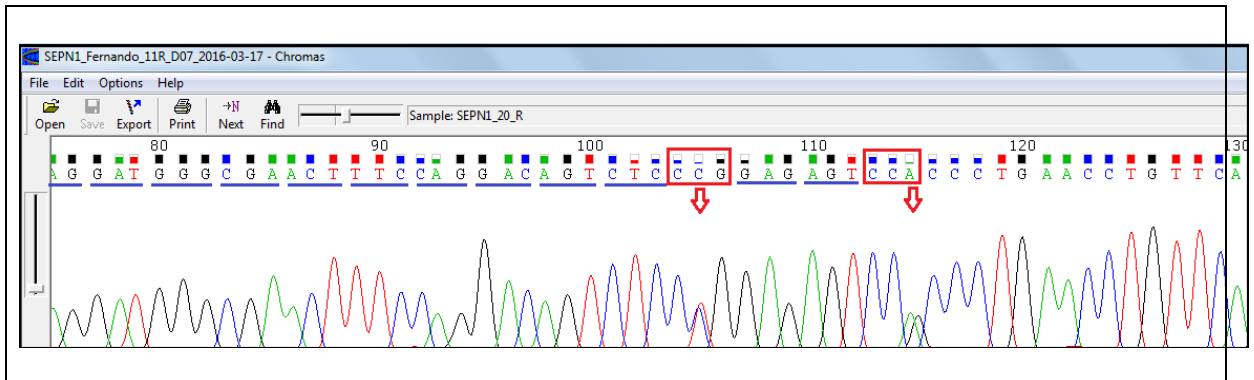


Figura 11 - Cromatograma demonstrando as mutações c.1406G>A/c.1396C>T em heterozigose no exon 11.

Analisando o estado de conservação desse aminoácido entre as espécies, observa-se que ele é altamente conservado.

Esta mutação também foi verificada quanto à sua predição da patogenicidade através do programa *Polyphen-2*, que apresentou uma probabilidade de 100% desta mutação ser patogênica, conforme demonstrado abaixo:

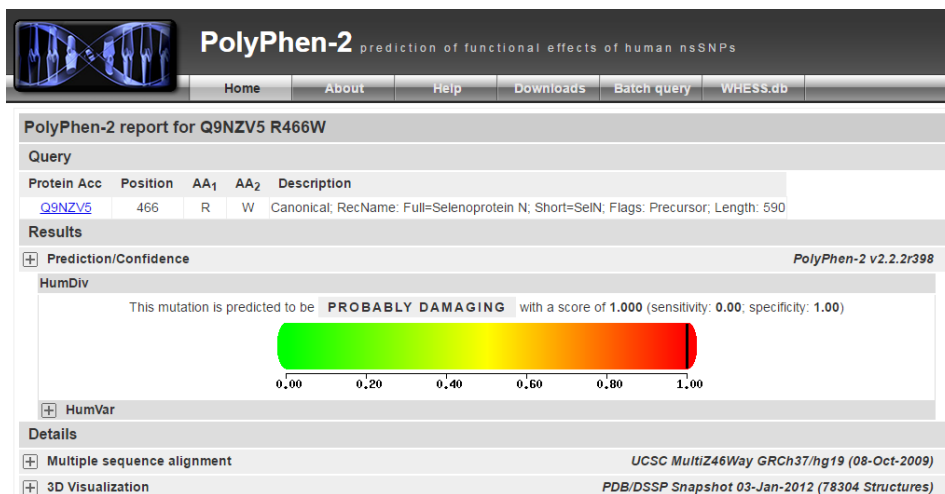


Figura 12 – Predição da patogenicidade da mutação c.1396C>T/p.R466W.

5.3.3.2 Análise das mutações detectadas por NGS nos demais genes

Em relação às mutações detectadas em outros genes do painel de NGS, estas estão detalhadas em seguida, contendo o estudo da predição da patogenicidade para as mutações que ainda não possuem descrição na literatura científica.

A - Gene *LAMA2*:

Casos 13, 14 e 15: Três irmãos com Distrofia Muscular de Cinturas com deficiência de merosina (Família 12).

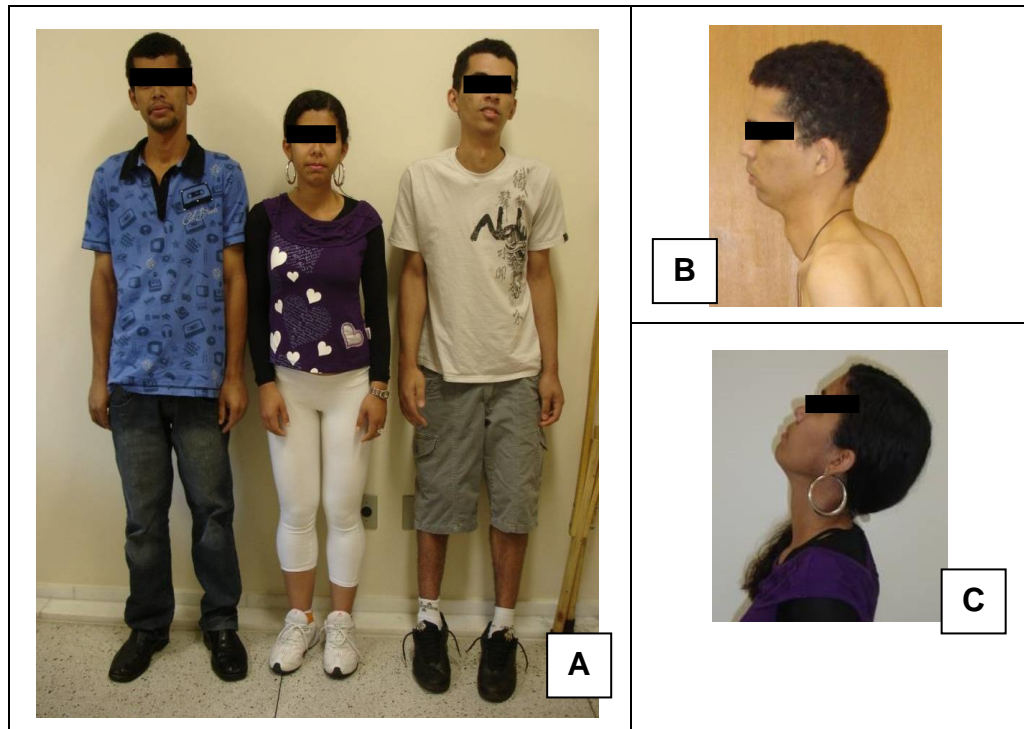


Figura 13 - Três irmãos afetados apresentando fraqueza muscular proximal, rigidez cervical e comprometimento ventilatório leve (A). Demonstração da rigidez cervical (B e C).

Realizou-se estudo molecular de três irmãos integrantes de uma mesma família (nº12) no qual os casos 13, 14 e 15, foram incluídos inicialmente neste estudo como prováveis portadores de DMER, devido à suas características clínicas (fraqueza muscular proximal e rigidez cervical). O estudo de mutações no gene

SEPN1 revelou a inserção de uma trinca GAG no exon 4 (c.438-439insGAG), em heterozigose, a qual ainda não havia descrição na literatura.


Foi realizado o estudo de segregação familiar desta alteração nos pais destes pacientes, e este revelou a presença desta mesma inserção em homozigose no pai e ausência na mãe. O pai foi avaliado clinicamente e não foram encontradas anormalidades no seu exame físico e neurológico, exceto pela presença de uma discreta escoliose torácica. Além disso, esta inserção foi estudada em 100 controles normais e foi detectada a sua presença em dois indivíduos, em heterozigose. Assim esta alteração foi considerada como um polimorfismo.

Devido a tais achados, foi realizado o estudo genético destes pacientes através do sequenciamento de nova geração, o qual identificou a presença de duas mutações em heterozigose composta no gene *LAMA2*.

Uma das mutações consiste na troca de uma adenina por uma citosina no nucleotídeo 2461 do cDNA, levando à troca do codon da treonina por uma prolina na região 821 da proteína (c.2461A>C/p.T821P). Tal mutação esta descrita na literatura como uma mutação patogênica descrita em abril de 2015 (rs186538779) e esta relacionada à distrofia muscular de cinturas com deficiência de merosina.

A segunda mutação consiste na deleção de uma adenina no nucleotídeo 1253 do cDNA, levando à ocorrência de um frameship na região 418 da proteína, região que era composta pelo aminoácido da prolina (c.1253delA/p.P418fs). Essa mutação não foi descrita na literatura até o presente momento.

Analisando o estado de conservação desse aminoácido entre as espécies, observa-se que ele é altamente conservado. E devido ao fato de se tratar de uma mutação nova, esta foi verificada quanto à sua predição da patogenicidade através do programa *Mutation Taster*, que a classificou como causadora da doença, classificando assim como uma mutação patogênica, conforme demonstrado a seguir:



**Mutation
Taster**

mutation t@sting

Prediction disease causing

Model: *complex_aae*, prob: 1 (classification due to NMD, [real probability](#) is shown anyway)

Summary

- NMD
- amino acid sequence changed
- frameshift
- protein features (might be) affected

analysed issue	analysis result
name of alteration	no title
alteration (phys. location)	chr6:129486767_129486767delC
HGNC symbol	LAMA2
Ensembl transcript ID	ENST00000421865
Genbank transcript ID	NM_000426
UniProt peptide	P24043
alteration type	deletion
alteration region	CDS
DNA changes	c.1253_1253delC cDNA.1302_1302delC g.282426_282426delC
AA changes	P418Qfs*5
position(s) of altered AA	418 (frameshift or PTC - further changes downstream)
if AA alteration in CDS	
frameshift	yes
known variant	Variant was neither found in ExAC nor 1000G. Search ExAC.
regulatory features	H3K36me3, Histone, Histone 3 Lysine 36 Tri-Methylation

Figura 14 – Predição da patogenicidade da mutação c.1253delA/p.P418fs.

A partir destes resultados os membros desta família foram reconvocados e o irmão mais velho (caso 15) foi submetido a uma ressonância magnética de encéfalo que demonstrou a presença de leucoencefalopatia, achado descrito em pacientes com mutações no gene *LAMA2*³⁴.

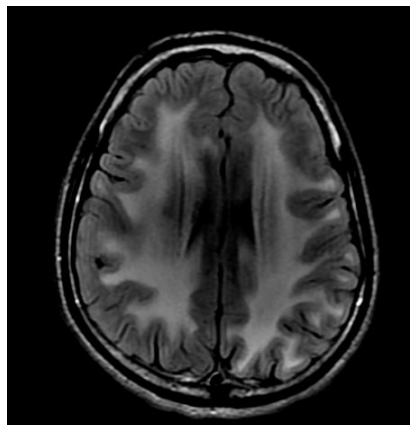


Figura 15: Ressonância magnética do encéfalo revela alteração difusa de substância branca na sequência Flair.

A – 1. Estudo de segregação familiar:

Também foi realizado o estudo de segregação familiar desta mutação nova nos pais destes pacientes, o que revelou a presença da mutação c.2461A>C em heterozigose no pai e ausência da mesma na mãe. Já a mutação c.1253delA estava presente em heterozigose na mãe e ausente no pai, conforme demonstrado abaixo:

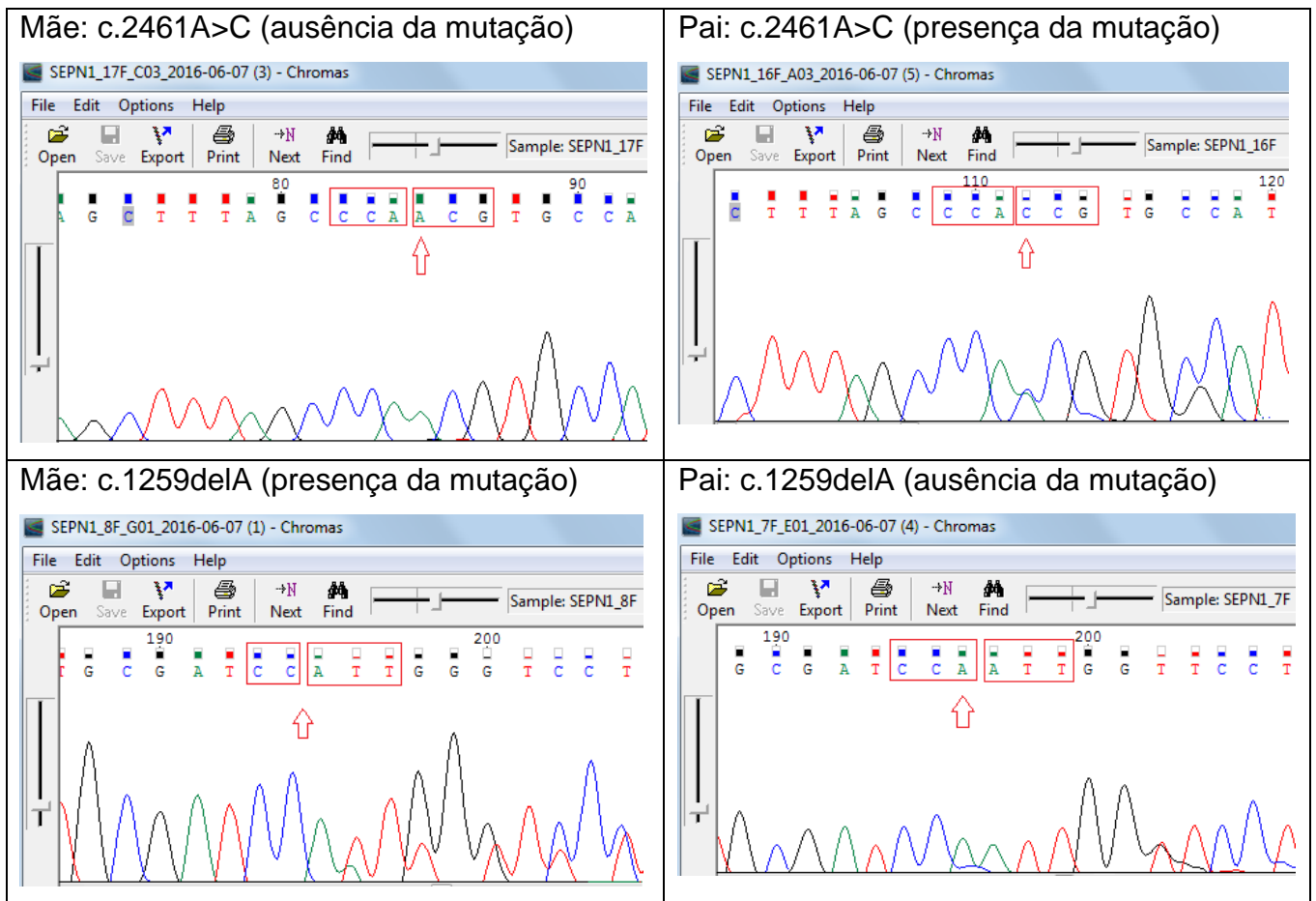


Figura 16 - Cromatogramas demonstrando as mutações detectadas no estudo de segregação familiar dos pais da família 12.

B - Gene COL6:

Caso 11: Paciente com mutação no gene do colágeno 6.

No caso 11 foram detectadas duas mutações em heterozigose composta no gene do colágeno 6 alfa 3 (COL6A3). Sendo as mutações: c.6859delC e c.6064_5G>A.

Ambas as mutações detectadas neste paciente já haviam sido descritas na literatura científica em maio de 2014 como patogênicas e relacionadas á miopatia de Bethlem³⁵.

Caso 12: Paciente com mutação no gene do colágeno 6.

No caso 12, também foram detectadas mutações no gene do colágeno tipo 6, sendo uma na variante COL6A1:c.850G>A p.G284R, a qual já possui descrição na literatura como sendo uma mutação patogênica relacionada com a distrofia muscular congênita de Ullrich e a segunda mutação, na variante COL6A3:c.2959G>A/p.V987M²².

A segunda mutação consiste na troca de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo 2959 do cDNA, gerando a troca de uma valina por uma metionina no aminoácido 987 da proteína (c.2959G>A/p.V987M). Essa mutação não foi descrita na literatura até o presente momento.

Analisando o estado de conservação desse aminoácido entre as espécies, observa-se que ele é altamente conservado.

Esta mutação também foi verificada quanto à sua predição da patogenicidade através do programa *Polyphen-2*, que apresentou uma probabilidade de 100% desta mutação ser patogênica, conforme demonstrado abaixo:

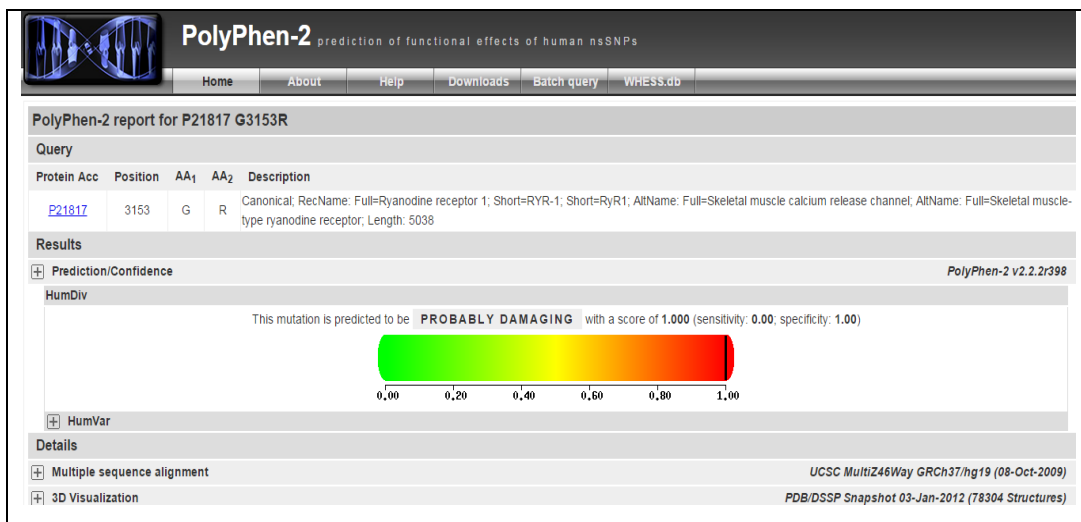


Figura 17 – Predição da patogenicidade da mutação c.2959G>A/p.V987M.

C - Gene *LMNA*:

Caso 16: Paciente com Distrofia Muscular Escapulomeral com miocardiopatia.

O estudo molecular deste paciente detectou a mutação c.1580G>C/p.R527P em homozigose no gene *LMNA*. Esta mutação já possui descrição na literatura, nos bancos de dados ClinVar e LOVD (NM_005572.3), como sendo uma mutação patogênica causadora da Distrofia Muscular Escapulomeral com miocardiopatia.

D – Gene *RYR1*

Caso 17: Paciente portador de MDCF

Trata-se de um paciente do sexo masculino, com diagnóstico clínico e histopatológico compatível com MDCF, no qual o estudo molecular inicial do gene *SEPN1* revelou a inserção de 12 bases na região c.136-137 no exon 1. Devido as características desta alteração, esta foi considerada como um polimorfismo.

Identificou-se, através dos estudos por NGS, duas mutações em heterozigose composta no gene *RYR1*, sendo elas, a mutação c.6469G>A/p.E2157K no exon 39 e a mutação c.9457G>A/p.G3153R presente no exon 63. Ambas já mutações já haviam sido descritas na literatura médica, como sendo mutações patogênicas associadas ao fenótipo clássico de MDCF.

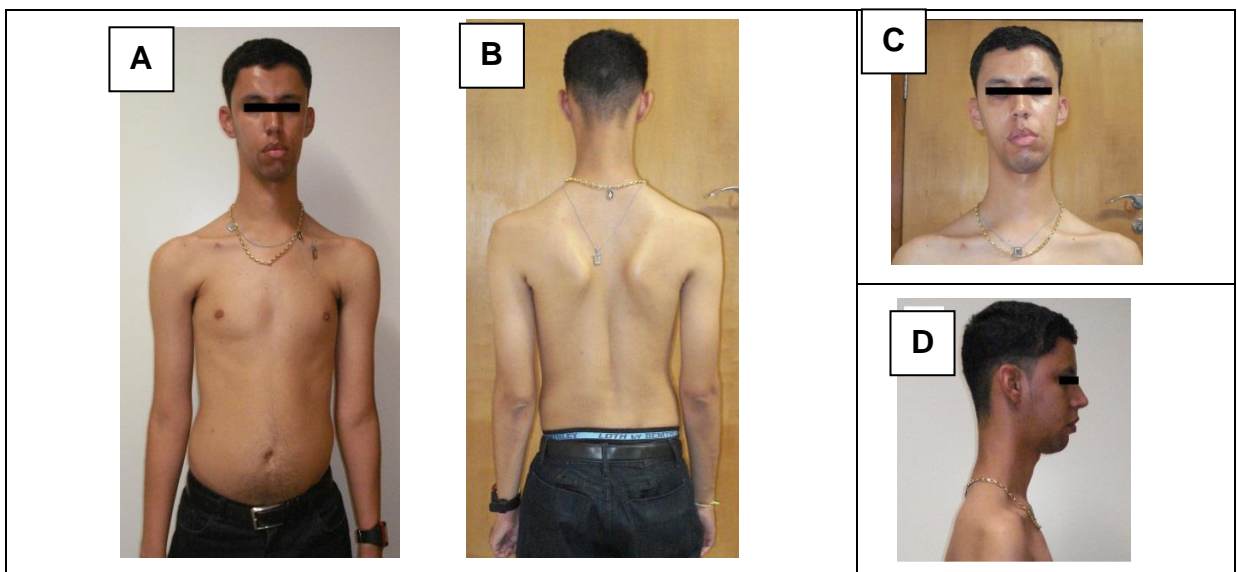


Figura 18 - Paciente portador de MDCF, apresentando escoliose, rigidez cervical, comprometimento ventilatório e face alongada (A, B, C e D).

D – 1. Estudo de segregação familiar

Foi realizado o estudo de segregação familiar destas mutações, na mãe deste paciente, na qual não se detectou tais mutações no DNA. Não foi possível realizar o estudo no pai do paciente uma vez que este já havia falecido.

Assim podemos levantar a hipótese de que este paciente possa ter recebido uma mutação proveniente do pai e a outra seria uma mutação de novo.

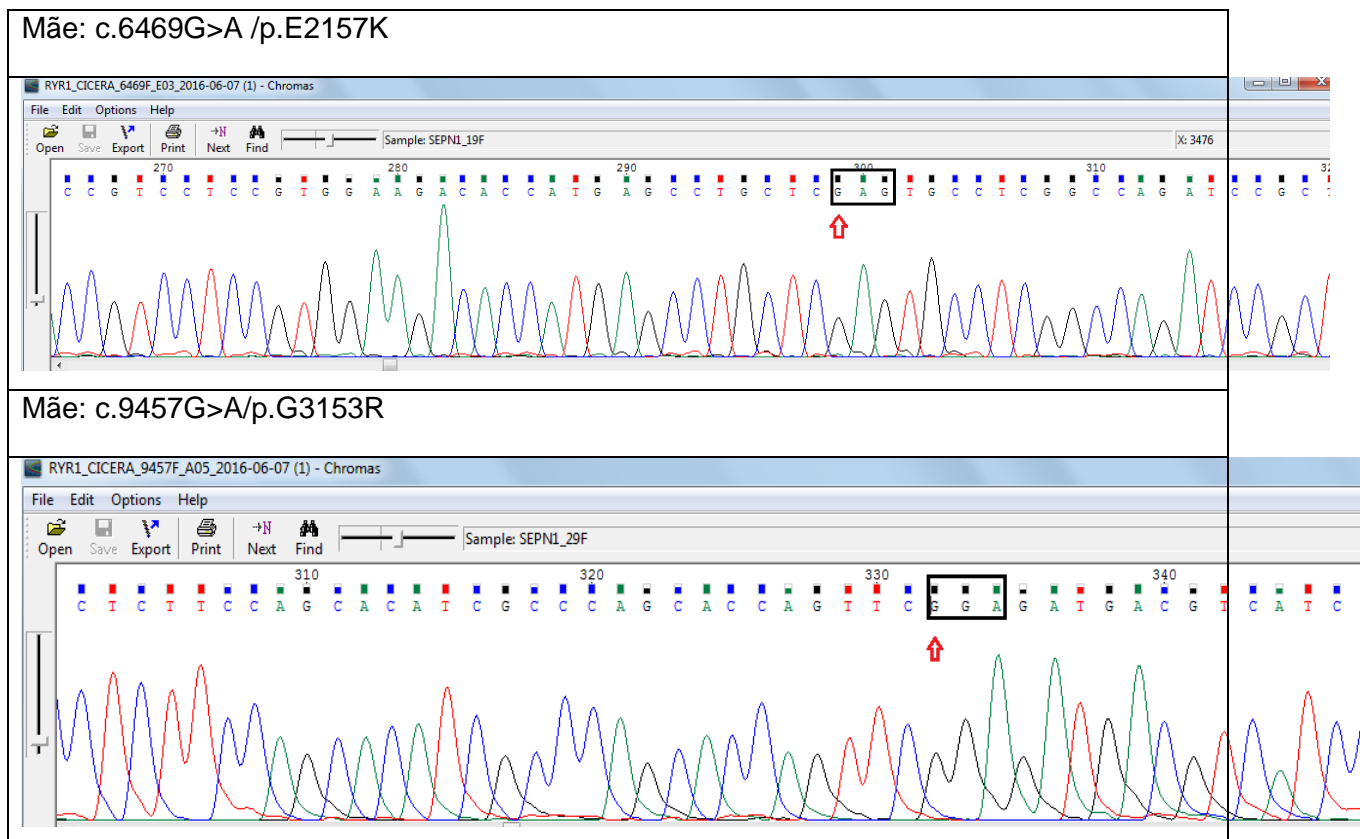


Figura 19 - Cromatogramas demonstrando as mutações verificadas no estudo de segregação familiar no caso 17.

5.4 DISCUSSÃO

As análises realizadas neste projeto abrangem o estudo de 19 pacientes com quadros clínicos e histopatológicos inicialmente compatíveis com o de miopatias relacionadas ao gene *SEPN1*, no qual foram detectadas e caracterizadas 7 diferentes mutações patogênicas no gene *SEPN1* em 12 pacientes da população brasileira.

Além das mutações detectadas no gene *SEPN1*, também foram detectadas mais 10 mutações diferentes em outros 5 genes relacionados a doenças musculares a partir do uso do NGS, através de painel contendo os 61 principais genes relacionados à doenças neuromusculares, sendo eles os genes *COL6A1*, *COL6A3*, *LAMA2*, *LMNA* e *RYR1*.

Todos os pacientes incluídos neste projeto são acompanhados em centros de referência em doenças neuromusculares do Brasil, sendo eles provenientes de diferentes regiões do país, configurando um trabalho multicêntrico com uma amostragem heterogênea da população brasileira.

Dentre os pacientes nos quais foram detectadas mutações no gene *SEPN1*, quatro apresentaram fenótipo de DMER e três de Mm. Todas estas formas de miopatias são consideradas raras e até o momento não há registros literários relacionando a frequência de cada uma delas.

Os resultados obtidos, são compatíveis com achados da literatura que descrevem mutações no gene *SEPN1* associadas a todas as diferentes formas de selenopatias^{1,8}. Porém, vale destacar a marcante prevalência da forma de DMER verificada neste estudo. Contudo, a rigidez cervical, que constitui um achado clínico marcante na DMER, pode ser verificado nas diferentes formas de selenopatias, bem como em outras miopatias e por isso é considerado um achado inespecífico³⁰.

Outra característica presente na nossa amostragem, que também pode ser corroborada pelos registros literários das selenopatias, é ocorrência de pais assintomáticos para todos os pacientes incluídos neste estudo, dados que também são compatíveis com a herança associada a estas miopatias, a herança autossômica recessiva.

O estudo molecular, tanto do gene *SEPN1*, quanto dos demais genes envolvidos neste projeto foi realizado na grande maioria inicialmente através de sequenciamento de Sanger e posteriormente através do sequenciamento de nova

geração. Sendo o sequenciamento de Sanger utilizado também para a confirmação de mutações encontradas em outros genes inicialmente por NGS, assim como para o estudo de segregação familiar para mutações detectadas nos pacientes analisados.

Dentre as mutações detectadas no gene *SEPN1*, identificou-se a mutação c.713-714insA, a qual foi verificada em quatro pacientes não aparentados incluídos neste projeto e a mutação c.1406G>A, a qual foi verificada em dois pacientes, também não aparentados. Talvez tais mutações do gene *SEPN1* possam ser mais frequentes em pacientes brasileiros, porém um estudo com um maior número de pacientes seria necessário para confirmar tal dado.

A mutação c.713-714ins.A, leva à inserção de uma adenina no exon 5 do gene, esta alteração molecular foi detectada e descrita na literatura como patogênica inicialmente em 2002, ocasião na qual esta foi detectada em dois pacientes franceses com o fenótipo de Mm também não aparentados⁷. Posteriormente a suas primeiras descrições, esta mutação foi verificada em mais quatro registros literários e em seguida em mais alguns registros. Tais registros apontam a ocorrência desta mutação na literatura científica associando-a tanto com a forma de Mm, quanto com a forma de DMER, além disso, vale ressaltar a sua ocorrência tanto em heterozigose composta como em homozigose^{7,16,25}.

Da mesma forma como ocorrido nos demais trabalhos científicos, esta inserção foi detectada neste trabalho tanto em heterozigose composta, em três pacientes, quanto em homozigose, em um paciente. Porém, na nossa amostragem esta inserção foi detectada somente em pacientes acometidos com a forma de DMER. Dentre os três pacientes que apresentaram a mutação em heterozigose foi possível detectar a mutação complementar em todos eles e dentre as mutações complementares detectadas, somente uma delas já havia sido descrita na literatura. As outras duas mutações não foram descritas na literatura até o momento, sendo consideradas mutações novas patogênicas a partir de análise em programas de predição da patogenicidade.

No caso 02, em complementaridade a esta inserção, identificou-se a mutação c.1397G>A/p.R466Q localizada no exon 11 do gene *SEPN1*. Esta é uma mutação comprovadamente patogênica tendo sido descrita em 2001 em heterozigose composta em um paciente francês com a forma de DMER¹. Em 2014 esta mutação também foi detectada em uma paciente russa de 27 anos também

portadora da forma DMER¹⁶.

Maiti e colaboradores demonstraram em 2009 que mutações na região do exon 11, região na qual está localizado o elemento de redefinição da selenocisteína, estão associadas ao enfraquecimento da estrutura secundária do elemento de redefinição da selenocisteína (ERS), reduzindo a eficiência da inserção da selenocisteína e conseqüentemente dos níveis do RNA da selenocisteína. Os pacientes que apresentavam mutações nesta região do gene demonstraram níveis insignificantes de proteínas SEPN1 no músculo. Estes dados enfatizam a importância do elemento ERS durante a expressão da SEPN1 e ilustra o mecanismo molecular pelo qual as mutações pontuais podem levar à miopatias relacionadas à SEPN1²⁹.

Portanto, devido a tais registros associados ao fenótipo clínico e registros histopatológicos, o paciente 02 pôde ser caracterizado como portador de DMER causada pelas mutações c.713-714insA/c.1397G>A, em heterozigose composta, no gene *SEPN1*.

Já a paciente 03, apresentou como mutação complementar à inserção, a mutação c.1406G>A/p.R469Q, também no exon 11. Esta mutação foi descrita como patogênica na literatura por Maiti e colaboradores após ter sido verificada em um paciente francês apresentado a forma de DMER em 2009²⁹. Portanto, pôde-se caracterizar o paciente 03 como portador de DMER causada pelas mutações c.713-714insA/c.1406G>A, em heterozigose composta, no gene *SEPN1*.

Em relação ao caso 04, que assim como nos dois últimos casos citados, também apresentou a inserção c.713-714insA no exon 5, a segunda mutação foi detectada na região 3'UTR do gene *SEPN1*, esta região antecede 55 bases ao códon de iniciação do gene e por estar localizada em uma região de grande importância para regulação do gene, esta é classificada como provavelmente patogênica pelo programa de predição de patogenicidade Mutation Taster. Não há registros desta alteração na literatura científica, porém, registros literários relatam mutações nesta mesma região de regulação gênica como sendo causa de miopatias relacionadas à SEPN1, devido a modificação na estrutura do RNAm da selenoproteína N1²⁶. Sendo assim, pode-se caracterizar o paciente 04 como portador de DMER causada pelas mutações c.713-714insA/3'UTR:c.53G>T, em heterozigose composta, no gene *SEPN1*.

Já o caso 18 apresentou esta mesma mutação c.713-714insA em

homozigose. Sendo esta paciente caracterizada como portadora de DMER causada pela mutação c.713-714isnA, em homozigose no gene *SEPN1*.

Conforme já mencionado, a mutação c.1406G>A, detectada em dois pacientes incluídos neste estudo (casos 03 e 19), refere-se a uma mutação já descrita na literatura como patogênica. No caso 19, foi verificada em heterozigose composta com a mutação complementar c.1396C>T também localizada na região do elemento de redefinição da selenocisteína no exon 11. Não foram encontrados registros literários desta mutação complementar, sendo ela considerada uma mutação nova devido a suas características conservacionais em adição à sua classificação por programas de predição de patogenicidade.

Assim, analisando o caso 19, podemos concluir que a troca desses aminoácidos pode trazer alteração na estrutura da proteína e conseqüentemente, em sua função e devido a tais razões esta mutação é classificada como patogênica por programas de predição de patogenicidade polyphen-2, SHIFT e Mutation Taster. Desta forma, pode-se caracterizar o paciente 19 como portador de Mm causada pelas mutações c.1396C>T/c.1406G>A, em heterozigose composta, no gene *SEPN1*.

O paciente 01, possui uma mutação patogênica nova (c.1010G>T) em heterozigose com uma mutação patogênica c.1384T>G/p.U426G já descrita na literatura. A mutação c.1384T>G/p.U426G, descrita como patogênica, transforma o códon da selenocisteína em uma glicina, na região 462 da proteína. Esta região tem importante função na proteína, pois carrega o códon da selenocisteína (TGA), que é o sítio catalítico da selenoproteína. Ela foi detectada previamente em dois pacientes de uma família portuguesa com miopatia multimínico, em homozigose⁷. A segunda mutação encontrada c.1010G>T, não foi registrada anteriormente na literatura. Esta mutação foi estudada quanto às suas características e somada ao fato desta não ter sido identificada em 100 controles normais, foi concluída como uma mutação patogênica. Ressalta-se ainda, que foi realizado o estudo de segregação destas mutações nos pais deste paciente e verificou-se a herança de uma delas da mãe e a segunda do pai. Assim, concluiu-se que o paciente 01 é portador de Mm causada pelas mutações no gene *SEPN1* (c.1010G>T/c.1384 T>G) , em heterozigose composta.

Quanto ao paciente 05, identificou-se uma mutação nova em heterozigose no gene *SEPN1*, classificada por programas de predição de patogenicidade, como

patogênica. No entanto, não foi possível detectar a segunda mutação neste paciente. Tal ocorrência é descrito na literatura e poderia estar relacionada com dificuldade de identificação de mutações no exon 1, devido ao fato deste exon ser rico em repetições de CG o que dificulta seu estudo tanto por Sanger quanto por NGS.

Assim, foi possível através do sequenciamento de Sanger estabelecer o diagnóstico molecular de 7 pacientes contendo mutações patogênicas no gene *SEPN1*, validando estes achados com os achados clínicos e histopatológicos levantados neste trabalho.

Em relação aos demais genes estudados neste projeto, foi possível realizar a detecção de mais 10 mutações, dentre elas duas mutações novas, em 5 outros diferentes genes relacionados a doenças musculares. Tal achado foi possível devido ao uso do NGS.

Nos pacientes 13, 14 e 15, irmãos de uma mesma família, sendo uma paciente do sexo feminino e dois do sexo masculino, foi possível detectar duas alterações em heterozigose composta no gene *LAMA2*. Mutações neste gene estão relacionadas à distrofia muscular congênita com deficiência total de merosina ou a uma forma de distrofia muscular de cinturas com deficiência parcial de merosina. A mutação c.2461A>C já é descrita na literatura médica como patogênica^{6,23}, já a mutação complementar c.1259delA ainda não possui descrição na literatura, porém, esta foi classificada como uma mutação patogênica por programas de predição de patogenicidade.

O estudo de segregação familiar destas mutações através da análise dos pais destes pacientes, mostrou que a mãe era portadora de um alelo mutado (c.1259delA) em heterozigose, já com o segundo alelo herdado do pai (c.2461A>C).

Assim, de acordo com a análise das alterações encontradas, foi possível caracterizar estes pacientes como portadores de distrofia muscular de cinturas com deficiência de merosina causada pelas mutações c.1259delA; p.P418fs/c.2461A>C; p.T821P; em heterozigose composta no gene *LAMA2*. Corroborando este achado realizamos estudo de ressonância magnética de encéfalo no caso 15 que revelou alteração difusa de substância branca, achado característico desta forma de distrofia muscular.

De forma semelhante em 2015, foi descrito uma família com fenótipo de

espinha rígida cujo diagnóstico de distrofia tipo cinturas relacionado ao gene *LAMA2* foi possível a partir de estudo molecular por NGS³³.

O caso 17, teve diagnóstico inicial de MDCF devido à biópsia muscular que mostrou um padrão miopático, predomínio e atrofia de fibras tipo I, o que é classicamente descrito nessa forma de miopatia⁸. Este paciente foi inicialmente incluído neste estudo devido ao fato de que mutações no gene da *SEPN1* foram descritas como causa genética conhecida da miopatia por desproporção congênita de fibras^{11,21}. O estudo molecular do gene *SEPN1* revelou a inserção de 12 bases na região c.136-137 no exon 1, em heterozigose. Tal inserção encontrava-se em fase sem incluir um códon de parada de leitura, e não foi possível detectar anormalidades no outro alelo do paciente ao longo dos exons estudados. Considerando que a MDCF apresenta uma grande heterogeneidade genética, já tendo sido associada a mutações nos genes *TPM3*, *SEPN1*, *ACTA1*, *CFTD2*, e mais recentemente associadas ao gene *RYR1*, este caso foi incluído para a realização do estudo molecular por sequenciamento de nova geração (NGS)^{8,14,21}.

Assim, identificou-se no paciente 17 mutações em heterozigose no gene *RYR1*, através de NGS em painel de doenças neuromusculares, sendo elas, a mutação c.6469G>A/p.E2157K, presente no exon 39 e a mutação c.9457G>A/p.G3153R no exon 63. Ambas mutações detectadas neste caso c.6469G>A/c.9457G>A já haviam sido descritas na literatura, também em heterozigose composta, como sendo mutações patogênicas verificadas em pacientes com fenótipo de MDCF²¹.

É importante reforçar que o gene *RYR1* é um gene extremamente grande, fato que limita muito seu estudo através de sequenciamento de Sanger e o uso do sequenciamento de nova geração tem facilitado o estudo de mutações neste gene.

Para tal caso também foi realizado o estudo de segregação, porém, como havia disponível apenas amostra da mãe do paciente, pois o pai era falecido, não foi possível ilustrar o mecanismo de segregação familiar visto que a mãe não apresentou nenhuma das mutações verificadas no filho.

Ainda neste estudo detectamos duas mutações em heterozigose composta nos genes *COL6A1* e *COL6A3* em 2 paciente incluídos (casos 11 e 12).

O caso 11 apresentou duas mutações em heterozigose composta no gene *COL6A3*, sendo elas, a mutação c.6859delG/p.R2287Gfs e a mutação c.6064_5G>A. Ambas mutações foram descritas recentemente como patogênicas

(2014), relacionadas com a miopatia de Bethlem 1 (BTHLM1)^{21,22,35}.

Ressalta-se que este paciente foi incluído inicialmente neste estudo por suspeita de Mm causada por mutações no gene *SEPN1*. O estudo por NGS identificou de forma inesperada as mutações no gene do colágeno 6, confirmando a heterogeneidade genética relacionada com a miopatia multiminicore.

Já em relação ao caso 12, detectou-se a mutação COL6A1:c.850G>A/p.G284R em heterozigose composta com a mutação COL6A3:c.2959G>A/p.V987M, sendo a primeira já descrita na literatura como patogênica relacionada com a distrofia muscular congênita Ullrich^{21,22}.

Este paciente apresentava quadro clínico compatível com DMER, sem indícios de hiper-elasticidade distal conforme observado na Síndrome de Ullrich.

Assim, foi possível estabelecer o diagnóstico molecular destes dois pacientes inicialmente incluídos neste estudo por suspeitas de mutações no gene *SEPN1*, como pacientes com mutações patogênicas relacionadas ao gene *do colágeno 6*.

Destaca-se também o caso 16, no qual foi detectada uma mutação no gene *LNMA* (c.1580G>T) através de estudo molecular por NGS no painel customizado para doenças neuromusculares. Esta mutação é descrita na literatura como sendo patogênica e associada a forma de distrofia muscular tipo espinha rígida - Emery Dreifus. Assim, devido a este achado molecular, somado à suas características clínicas do paciente também foi possível concluir o diagnóstico deste paciente.

Analisando os achados moleculares obtidos neste presente estudo, pode-se inferir a dificuldade que envolve o diagnóstico clínico diferencial das selenopatias devido à grande heterogeneidade fenotípica e genética que as envolvem²⁴.

Nota-se também que uma mesma mutação pode ser referida na literatura tanto em pacientes com Mm como em pacientes com DMER, havendo inclusive registro de casos nos quais houve sobreposição dos dois fenótipos.

5.5 CONCLUSÃO

As miopatias relacionadas à selenoproteína N1, consistem em um grupo heterogêneo de miopatias e distrofias congênitas. O fenótipo clínico é variável assim como os achados histopatológicos. A rigidez cervical apresenta-se como uma característica inespecífica, visto que é visualizado na maioria dos pacientes, com ou sem mutações no gene da *SEPN1*.

O presente estudo identificou mutações patogênicas no gene *SEPN1* em sete pacientes, sendo que dentre elas três são mutações novas. Além das mutações detectadas no gene *SEPN1*, também foram detectadas quatro mutações no gene *COL6A* (em dois pacientes), duas mutações no gene *LAMA2* em três irmãos, uma mutação no *LMNA* (em um paciente) e duas mutações no gene *RYR1* (em um paciente).

Em conclusão, observa-se que o estudo molecular em pacientes com as diferentes formas de miopatias relacionadas à selenoproteína N1 é essencial para a identificação do defeito genético e consequente aconselhamento genético. Desta forma, destaca-se que com o constante avanço nas tecnologias moleculares, o estudo por sequenciamento de nova geração tem se mostrado um excelente método para o estudo de doenças que apresentam grande heterogeneidade clínica e genotípica, pois proporciona o estudo de diversos genes concomitantemente. Além disso, seu custo tem caído progressivamente tornando-o mais efetivo e menos oneroso que o sequenciamento tradicional por Sanger, no qual a estratégia é sequenciar gene a gene.

REFERÊNCIAS

1. Moghadazadeh B, Petit N, Jaillard C, Brockington M, Roy SQ, Merlini L, *et al.* Mutations in *SEPN1* cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome. *Nat Genet* 2001; 29:17-18.
2. Moghadaszadeh B, Beggs AH. Selenoproteins and their impact on human health through diverse physiological pathways. *Physiology (Bethesda)* 2006 Oct; 21:307-15.
3. Arbogast S, Beuvin M, Fraysse B, Zhou H, Muntoni F, Ferreiro A. Oxidative stress in *SEPN1*-related myopathy: from pathophysiology to treatment. *Ann Neurol* 2009 Jun; 65(6):677-86.
4. Arbogast S, Ferreiro A. Selenoprotein and protection against oxidative stress: selenoprotein N as a novel player at the crossroads of redox signaling and calcium homeostasis. *Antioxid Redox Signal* 2010; 12(7):893-904.
5. Moghadaszadeh B, Desguerre I, Topaloglu H, Muntoni F, Pavsek S, Sewry C, *et al.* Identification of a new *locus* for a peculiar form of congenital muscular dystrophy with early rigidity of the spine, on chromosome 1p35-36. *Am J Hum Genet* 1998 Jun; 62(6):1439-45.
6. Ferreiro A, Ceuterick de Groote C, Marks JJ, Goemans N, Schreiber G, Hanefeld F, *et al.* Desmin-related myopathy with Mallory body-like inclusions is caused by mutations of the selenoprotein N gene. *Ann Neurol* 2004; 55 (5):676-86.
7. Ferreiro A, Quijano Roy S, Pichereau C, Moghadazadeh B, Goemans N, Bonnemann C, *et al.* Mutations of the selenoprotein N gene, which is implicated in rigid spine muscular dystrophy, cause the classical phenotype of multimincore disease: reassessing the nosology of early-onset myopathies. *Am J Hum Genet* 2002, 71: 739-749.
8. Clarke NF, Kidson W, Quijano-Roy S, Estounet B, Ferreiro A, Guicheney P, *et al.* *SEPN1*: associated with congenital fiber-type disproportion and insulin resistance. *Ann Neurol* 2006 Mar; 59 (3):546-52.
9. Dubowitz V. Rigid spine syndrome: a muscle syndrome in search of a name. *Proc R Soc Med* 1973; 66(3):219-20.
10. Sewry CA, Jimenez-Mallebrera C, Muntoni F. Congenital myopathies. *Current Opinion in Neurology* 2008; 21(5):569-575.
11. Carmignac V, Salih MA, Quijano-Roy S, Marchand S, Al Rayess MM, Mukhtar MM, *et al.* C-terminal titin deletions cause a novel early-onset myopathy with fatal cardiomyopathy. *Ann Neurol* 2007 Apr; 61(4):340-51.
12. Tein I, Elpeleg O, Ben-Zeev B, Korman SH, Lossos A, Lev D, *et al.* Short-chain acyl-CoA dehydrogenase gene mutation (c.319C>T) presents with clinical

heterogeneity and is candidate founder mutation in individuals of Ashkenazi Jewish origin. *Mol Genet Metab* 2008 Feb; 93(2):179-89.

13. Tein I, Haslam RH, Rhead WJ, Bennett MJ, Becker LE, Vockley J. Short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: a cause of ophthalmoplegia and multicore myopathy. *Neurology* 1999 Jan 15; 52(2):366-72.

14. PubMed. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: abril de 2016.

15. Engel AG, Gomez MR, Groover RV. Multicore disease. A recently recognized congenital myopathy associated with multifocal degeneration of muscle fibers. *Mayo Clin Proc* 1971 Oct; 46(10):666-81.

16. Rudenskaia GE, Kadnikova VA, Poliakov AV. Rigid spine congenital muscular dystrophy produced by SEP1 mutations (RSMD1)]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova* 2014;114(5):70-4. Russian.

17. Cavanagh NP, Lake BD, McMeniman P. Congenital fibre type disproportion myopathy. A histological diagnosis with an uncertain clinical outlook. *Arch Dis Child*.1979 Oct; 54(10):735-43.

18. Clarke NF, North KN. Congenital fiber type disproportion--30 years on. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003 Oct; 62(10):977-89.

19. Laing NG, Clarke NF, Dye DE, Liyanage K, Walker KR, Kobayashi Y, *et al*. Actin mutations are one cause of congenital fibre type disproportion. *Ann Neurol* 2004 Nov; 56(5):689-94.

20. Clarke NF, Kolski H, Dye DE, Lim E, Smith RL, Patel R, *et al*. Mutations in TPM3 are a common cause of congenital fiber type disproportion. *Ann Neurol* 2008, 63(3):329-37.

21. Savarese *et al*. MotorPlex provides accurate variant detection across large muscle genes both in single myopathic patients and in pools of DNA samples. *Acta Neuropathologic Communications Neuroscience of Disease* 2014; 2:100.

22. Noguchi S. *et al*. Allele-specific Gene Silencing of Mutant mRNA Restores Cellular Function in Ullrich Congenital Muscular Dystrophy Fibroblasts. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014 Jun 24;3:e171.

23 - Quijano-Roy S, Sparks S, Rutkowski A. *LAMA2-Related Muscular Dystrophy*. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2016.

24. Tajsharghi H, Darin N, Tulinius M, Oldfors A. Early onset myopathy with a novel mutation in the Selenoprotein N gene (*SEP1*). *Neuromuscul Disord* 2005 Apr; 15(4):299-302.

25. Schara U, Kress W, Bönnemann CG, Breitbart-Faller N, Korenke CG, Schreiber G, *et al*. The phenotype and long-term follow-up in 11 patients with

- juvenile selenoprotein N1-related myopathy. *Eur J Paediatr Neurol* 2008 May; 12(3):224-30.
26. Allamand V, Richard P, Lescure A, Ledeuil C, Desjardin D, Petit N, *et al.* A single homozygous point mutation in a 3'untranslated region motif of selenoprotein N mRNA causes SEPN1-related myopathy. *EMBO Reports* 2006; 7(4):450-4.
27. Okamoto Y, Takashima H, Higuchi I, Matsuyama W, Suehara M, Nishihira Y, *et al.* Molecular mechanism of rigid spine with muscular dystrophy type 1 caused by novel mutations of selenoprotein N gene. *Neurogenetics* 2006 Jul; 7(3):175-83.
28. Cagliani R, Fruguglietti ME, Berardinelli A, D'Angelo MG, Prella A, Riva S, *et al.* New molecular findings in congenital myopathies due to selenoprotein N gene mutations. *J Neurol Sci* 2011 Jan 15; 300(1-2):107-13.
29. Maiti B, Arbogast S, Allamand V, Moyle MW, Anderson CB, Richard P, *et al.* A mutation in the SEPN1 selenocysteine redefinition element (SRE) reduces selenocysteine incorporation and leads to SEPN1-related myopathy. *Hum Mutat* 2009 Mar; 30(3):411-6.
30. Merlini L, Granata C, Ballestrazzi A, Marini ML, 1989 *apud* Moghadaszadeh B, Desguerre I, Topaloglu H, Muntoni F, Pavsek S, Sewry C, *et al.* Identification of a new *locus* for a peculiar form of congenital muscular dystrophy with early rigidity of the spine, on chromosome 1p35-36. *Am J Hum Genet* 1998 Jun; 62(6).
31. Jungbluth H. Multi-minicore disease. *Orphanet J Rare Dis* 2007 Jul; 13(2):31.
32. Lescure A, Rederstorff M, Krol A, Guicheney P, Allamand V. Selenoprotein function and muscle disease. *Biochim Biophys Acta* 2009 Nov; 1790(11):1569-74.
33. Nelson I, Stojkovic T, Allamand V. Laminin $\alpha 2$ Deficiency-Related Muscular Dystrophy Mimicking Emery-Dreifuss and Collagen VI related Diseases. *Journal of Neuromuscular Diseases*, 2015; VOL.2 N^o 3, 229-240.
34. Ribeiro V, *et al.* Distrofia muscular congênita merosina positiva, anormalidades da substância branca e displasia cortical occipital posterior bilateral. *Acta Médica Portuguesa*, 2003; 16: 189-192
35. Allamand *et al.* ColVI myopathies: where do we stand, where do we go?. *Skeletal Muscle* 2011; 1: 30.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese de doutorado foi realizada através da soma e consolidação de dados obtidos inicialmente em sua fase de mestrado, ocasião em que foram realizados estudos clínicos, histopatológicos e genéticos moleculares de pacientes brasileiros com miopatias e distrofias musculares congênitas causadas por mutações no gene *SEPN1*.

Já em sua fase de doutorado, este estudo realizou a investigação de alguns dos pacientes incluídos no projeto de mestrado e novos pacientes incluídos posteriormente, utilizando tecnologias que pudessem otimizar o estudo do gene *SEPN1* assim como o de genes relacionados às principais doenças musculares que devem ser consideradas no diagnóstico diferencial das selenopatias.

Esta tese de doutorado constitui um dos projetos desenvolvido pelo Grupo Multidisciplinar de Doenças Neuromusculares do HC-UFMG, que realiza estudos moleculares das doenças neuromusculares, em colaboração com o Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (Prof^a. Dr^a. Mariz Vainzof) com a USP de Riberão Preto (Dr. Charles Marques) e com a Equipe da Dra. Vanessa Van Der Linden da AACD de Recife.

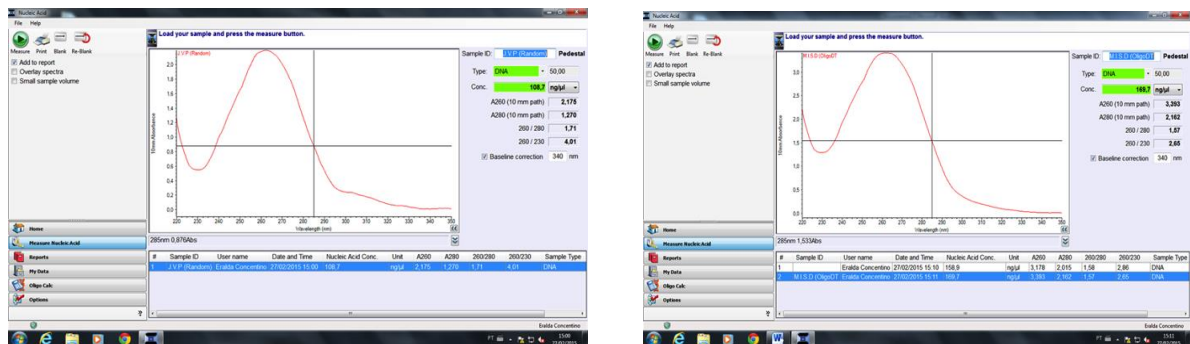
Este projeto permitiu o aprimoramento de novas técnicas moleculares, além de abrir possibilidades para novas pesquisas nesta área. Além disso, o presente estudo trouxe benefício também para os pacientes e seus familiares, uma vez que foi feito um laudo com os dados do estudo molecular para cada participante, assim como o aconselhamento genético familiar.

APÊNDICES E ANEXOS

APÊNDICE 1 – Estudos de cDNA

Para a extração de RNA e amplificação do cDNA, a qualidade e concentração de ácidos nucleicos foram reveladas por espectrofotometria (NanoDrop® 2000- 2000c), onde foram considerados os limiares de pureza e qualidade emitidos para as razões A260/280 e A260/230.

Para todas as amostras foram obtidos altos valores de concentração de ácidos nucleicos e boas correlações indicando eficácia no isolamento de RNA. Conforme imagens abaixo:



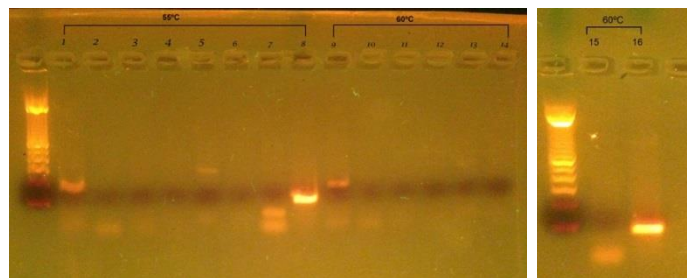
Inicialmente, foram testados os primers desenhados para as regiões do cDNA do SEPN1 utilizando diretamente amostras dos pacientes incluídos nesta pesquisa.

Foram realizadas inúmeras reações utilizando diversos protocolos na tentativa da padronização das amplificações para cada um destes primers foram realizadas, incluindo amostras controles para cada reação mantendo em cada rotina reações primers para cDNA dos genes constitutivos B-actina e MTB, porém, nenhuma das amostras testes apresentaram amplificação, nem mesmo as amostras contendo os primers constitutivos, (cedidos por colaboradores do Laboratório de Medicina Molecular da FM-UFMG), que permaneceram sem apresentar amplificação.

Assim, foi realizada uma nova tentativa de amplificação utilizando uma amostra referência de cDNA reconhecidamente funcionante, também cedida por colaboração do Laboratório de Medicina Molecular da FM-UFMG e nesta tentativa, foi possível verificar para esta amostra referência a formação de um produto de amplificação na região/tamanho esperado para tais produtos de PCR, para os exons 1 e 5 em um anealing de 55°C (conforme imagem de gel de agarose

anexado/ amostras 7 e 8 e 15 e 16 reference aos genes constitutivos *B-actina* e *MTB* respectivamente).

Devido a tais experimentos, uma reanálise em relação aos primers desenhados e em relação às amostras testadas foi realizada e concluiu-se que os primers desenhados foram baseados na sequência referente à isoforma 1 do gene *SEPN1* (mais prevalente), portanto, a suspeita é que os dois pacientes inicialmente testados possam apresentar a isoforma 2, na qual o exon 3 esta ausente, e nestes devido a tal razão a ligação dos primers 2, 3 e 4 estaria comprometida, conforme demonstra a ilustração posterior à imagem do gel abaixo.



<p>EXON 1 (cDNA 190PB) CTGAAGACCCTGGGGACAGATGGCCTTTTCTCTTTTCTCCTTGGACACT GACGGGGATATGTACATCAGCCCTGAGGAGTTCAAACCATTGCTGAGAAG CTAACAGGGTCTTGTCTGTCCAGACTGGAGTGCAGTGGTGCAGTCCAC AGCTCACTGCAGCCTCAACTTCCCTGGCTCAATTGAT</p> <p>EXON 2 (cDNA 370PB) CTCAGCCTCCTGAGGTCAACTCCCAGCCAGCTGCGAGGAGGAGGAGTTG CCCCGTGACCCTAGCGAGGAGACGCTCACCATAGAAAGCCCGATTCCAGCCT CTGTCCCGGAGACCATGACCAAGAGCAAAAGATGGCTTCTAGGGGTCTCC CGCCTCGCCCTGTCCGGCCTCCGAAACTGGACAGCCGCGCCCTCACCAAGT GCAGTGTGTGCCACCCGCCACTTCCAGCCCTTCCCTCCCGCCAGGCCAG GAGCTGGGTGAGCCCTGGTGGATCATCCCCAGTGAGCTGAGCATGTTCACT GGCTACCTGTCCAACAACCGCTTCTATCCACCGCCGCCAAGGGCAAGGAG STCATCATCCACC</p> <p>EXON 3 (cDNA 348PB) AGCATGTTCACTGGGTCACTTCCAACAACCGCTTCTATCCACCGCCGCC AAGGGCAAGGAGGTTCATATCCACCGGCTCCTGAGCATGTTCCACCCCTCGG CCCTTTGTGAAGACCCGCTTTGCCCTCAGGGAGCTGTGGCCTGCCTGACT GCCATCAGCGACTTCTACTACACTGTGATGTTCCGGATCCATGCCGAGTTC CAGCTCAGTGAGCCGCGCACTTCCCTTTTGGTTCTCCCTGCTCAGTTC ACCGGCCACATCATCTTCCAAGACGCCACCCAGTCCGGACTTCCGG CTCTTCGTGCCAACACAGTCTCTGAAATGTGGACATGGAG</p> <p>EXON 4 (cDNA 342PB) CCACATCATCTCTCCAAGAGGCCACCCAGTCCCGACTTCCGGCTCTT CGTGCCCAACCACAGGTCTCTGAAATGTGGACATGGAGTGGCTTTACGGGGC CAGTGAAGCAGCAACATGGAGGTGGACATCGGCTACATACCCAGATGGA GCTGGAGGCCACGGCCCTCTGTGCCCTCCGTGATCCTGGATGAGGATGG CAGCATGATCGACAGCCACCTGCCCTCAGGGGAGCCCTGCAGTTTGTGTT TGAGGAGATCAAGTGGCAGCAGGAGCTGAGCTGGGAGGAGGCTGCCCGCC CCTGGAGGTGGCCATGTACCCTTCAAGAAGGTCT</p> <p>EXON 5 (cDNA 327PB) TGTGTTTGAGGAGATCAAGTGGCAGCAGGAGCTGAGCTGGGAGGAGGCTGC CCGGCGCCTGGAGGTGGCCATGTACCCTTCAAGAAGGTCTCCTACTTGCC GTTCACTGAGGCTTTCGACCCAGCAAGGCTGAGAACAAGCTGGTGCACCT AATCTGCTGTGGGGGCCCTGGATGACCAAGTCTCTGGAGTTTCAAGGCG GACTTCCGGGAGACTGTCCGAAAGTTCGCCCATCTCACCTTGTCTCAA CGAGAGCTTCACTGACCACTGGTCCCTGGTGAAGAGCTGGAGGAATGCA GAACAACCAGGAGAACTCGT</p> <p>EXON 6 (cDNA 248PB) CAACGAGAGCTTCATCAGCACCTGGTCCCTG GTGAAGAGCTGGAGGAAGTGCAGAAACACAGGAGAACTCGTCCCAAG AAGCTGGCTGGCCTGCACCTGGAGAAGTACAGCTTCCCGTGGAGATGATG ATCTGCCTGCCAATGGACCGTGGTCCATCATCAATGCCAATCTCTTC TTGGACATCACTCCGTGAAGCCCGAGGAAATCGAGAGCAATCTCTTCAGC TTCATCCACC</p>	<p>ISOFORMA 2 >CCDS41283.1</p> <p>ATGGGCCGGGCCCCGGCCGCGGCAACCGGGGCGCCAGCCCCGGCCCCG CGCGCAGCCTCCCAGCCACCGCGCCGCGCCGCGCCGTTCCCTGGCGCTGC TCGGAGCCTGCTGGCCGCCGCTGCGCGCCGCTCCGGGTCTGCAGCC CGCCACGCCGAGGCCCAGGGGCGCGCGGAGGAACCTGGGCTGAAGAC 1F CTGTTGGGACAGATGGCCTTTTCTCTTTTCTCCTTGGACACTGACGGGG ATATGTACATCAGCCCTGAGGAGTTCAAACCATTGCTGAGAAGCTAACA GGTCAACTCCCAGCCAGCTGCGAGGAGGAGGAGTTCGCCCTGACCC TAGCGAGGAGACGCTCACCATAGAAAGCCGATTCCAGCCTCTGCTCCCGG AGACCATGACCAAGAGCAAAGATGGCTTCTAGGGGTCTCCCGCTCGCC CTGTCCGGCCTCCGAAACTGGACAGCCCGCCCTACCAAGTGCAGTGT TGCCACCCGCCACTTCCAGCCCTTCCCTCCCGCCAGGCCAGGAGCTGG GTGAGCCCTGGTGGATCATCCCCAGTGCAGTGCAGTGTTCAGTGGCTAC 3F CTGTCCAACAACCGCTTCTATCCACCGCCGCCAAGGGCAAGGAGGTCAT CATCCACCGGCTCCTGAGCATGTTCCACCCCTCGGCCCTTTGTGAAGACC GCTTTGCCCTCAGGGAGCTGTGGCCTGCCTGACTGCATCAGGACTTC TACTACACTGTGATGTTCCGGATCCATGCCGAGTTCAGCTCAGTGCAGC GCCGCACTTCCCTTTTGGTTCTCCCTGCTCAGTTTACCGGCCACATCA 4F TCCCTCTCAAAGAGGCCACCCAGTCCCGCACTTCCGGCTTCTCGTGC AACCACAGGTCTCTGAAATGTGGACATGGAGTGGCTTTACGGGGCCAGTGA AAGCAGCAACATGGAGGTGGACATCGGCTACATACCCAGATGGAGCTGG AGCCACGGGCCCCCTGTGCCCCCTCCGTGATCTCTGGATGAGGATGGCAGC ATGATCGACAGCCACTGCCTCAGGGGAGCCCTGCAGTTTGTGTTGA 5F GGAGATCAAGTGGCAGCAGGAGCTGAGCTGGGAGGAGGCTGCCCGGCC TGGAGTGGCCATGTACCCCTTCAAGAAGTCTCCTACTTGCCTTCACT GAGGCTTCGACCCAGCCAGGCTGAGAACAAGCTGGTGCACCTCAATCCT GCTGTGGGGGGCCCTGGATGACCACTCTGCTGAGGTTTCAAGGGGCACTC TCCGGGAGACTGTCTGAAAGTTCGCCCATCTCACCCCTGCTCAACGAG 6F AGCTTCATCAGCACCTGGTCCCTGGTGAAGGAGCTGGAGAACTGCAGAA CAACCAGGAGAACTCGTCCCACCAAGGCTGGCTGGCCTGCACCTGGAGA AGTACAGCTTCCCGTGGAGATGATGATCTGCCTGCCAATGGCACCGTGG GTCCATACATCAATGCCAATCTCTTGGACATCACTCCGTTGAAGCC CGAGGAAATCGAGAGCAATCTTTCAGTCTCTCATCCACCTTTGAAGACC CGTCCACGGCCACTACATGCAGTCTTGAAGGAGGACTCCGGCCTGGC CTGCCCTCTCCAGCCCTAG</p>
---	--

Sendo assim, seria necessário o desenho de novos primers considerando a possibilidade de que estes pacientes apresentem a isoforma 2 deste gene.

APÊNDICE 2 - Termos de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO (pais de adolescentes)

**Projeto de Pesquisa: “ESTUDO GENÉTICO DE PACIENTES BRASILEIROS
COM MIOPATIAS RELACIONADAS À SELENOPROTEÍNA N1”.**

***Investigadores responsáveis: Por^ª. Dr^ª. Juliana Gurgel Giannetti
Eralda Luiza Concentino Slomp***

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que meu(minha) filho(a) foi convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa envolvendo pacientes e famílias de indivíduos com diagnóstico confirmado de miopatias e distrofias musculares congênitas. O objetivo geral da pesquisa é realizar detalhado estudo clínico, histopatológico e molecular de pacientes brasileiros com tais diagnósticos. Esses estudos poderão trazer mais conhecimentos sobre tais doenças. A pesquisa será mantida em segredo em todos os estudos colaborativos a partir da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar deste estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos antecedentes médicos e familiares de meu(minha) filho(a). Meu(minha) filho(a) será submetido(a) a exame físico neurológico para confirmar o seu estado clínico e à documentação por meio de imagens (foto e vídeo). Uma amostra de sangue venoso será colhida (10 a 20 mL). Os pais também deverão ser submetidos à coleta de sangue. Entendo também que os fragmentos musculares de meu(minha) filho(a), retirados e estocados na ocasião do seu diagnóstico, serão utilizados na pesquisa.

RISCO E DESCONFORTO:

Exame de sangue: coleta de 10 a 20 mL de sangue venoso será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço, que será realizada por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

VANTAGENS:

Eu entendo que, com a minha participação neste estudo, meu diagnóstico será mais preciso, apesar disto, meu tratamento provavelmente não será modificado. Os resultados dos testes moleculares obtidos serão entregues em consulta no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, tel. (31) 3248-9540.

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados dos testes genéticos decorrentes deste projeto de pesquisa, farão parte do meu prontuário médico.

Se os resultados, informações ou as imagens obtidos forem utilizados para fins de publicação científica, minha identidade será mantida em sigilo, sendo utilizadas apenas as iniciais do meu nome.

Entendo também que em todas as imagens (foto e vídeo) serão utilizadas tarjas sobre os olhos. Tais informações serão divulgadas em Congressos e reuniões científicas, bem como em revistas científicas sobre o assunto.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar do estudo a qualquer momento sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no HC-UFMG. Eu reconheço também que Eralda Luiza Concentino Slomp ou a Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti podem interromper a minha participação neste estudo a qualquer momento que julgarem apropriado.

Eu confirmo que Eralda Luiza Concentino Slomp / Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti explicaram-me o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei

submetido(a) e as possíveis vantagens advindas deste projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi, este formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar deste estudo.

Nome do responsável

Assinatura do responsável

Data: _____ / _____ / _____

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____
o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia deste formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado

Data: _____ / _____ / _____

Comitê de Ética em Pesquisa-UFMG:

Prof^a. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Unidade Administrativa II-2 andar-sala 2.005
Av. Antônio Carlos,6.627-Pampulha
Fone:31-3499-4592

Pesquisadores Responsáveis:

Eralda Luiza Concentino Slomp
Prof^a. Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti
Departamento de Pediatria-FM/UFMG
Av. Alfredo Balena,190- 4º andar
Fone:31-3248 3773

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO
(para criança até 6 anos)

**Projeto de Pesquisa: “ESTUDO GENÉTICO DE PACIENTES BRASILEIROS
COM MIOPATIAS RELACIONADAS À SELENOPROTEÍNA N1”.**

Investigadores responsáveis: Por^ª. Dr^ª. Juliana Gurgel Giannetti
Eralda Luiza Concentino Slomp

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que meu(minha) filho(a) foi convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa envolvendo pacientes e famílias de indivíduos com diagnóstico confirmado de miopatias e distrofias musculares congênitas. O objetivo geral do projeto é realizar detalhado estudo clínico, histopatológico e molecular de pacientes brasileiros com tais diagnósticos. Esses estudos poderão trazer mais conhecimentos sobre tais doenças. A pesquisa será mantida em segredo em todos os estudos colaborativos a partir da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar deste estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas ao(a) meu(minha) filho(a) a respeito dos seus antecedentes médicos e familiares. Meu(minha) filho(a) será submetido(a) a exame físico neurológico para confirmar o estado clínico e à documentação por meio de imagens (foto e vídeo). Amostra de sangue venoso será colhida (10 a 20 mL). Os pais também deverão ser submetidos à coleta de sangue.

Entendo também que os fragmentos musculares de meu(minha) filho(a), retirados e estocados na ocasião do seu diagnóstico, serão utilizados na pesquisa.

RISCO E DESCONFORTO:

Exame de sangue: coleta de 10 a 20 mL de sangue venoso será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço, que

será realizada por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

VANTAGENS:

Eu entendo que ao aceitar que meu(minha) filho(a) participe desta pesquisa, o seu diagnóstico será mais preciso, apesar disto, o seu tratamento provavelmente não será modificado. Os resultados dos testes moleculares obtidos serão entregues em consulta no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, tel. (31) 3248-9540.

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados dos testes genéticos decorrentes deste projeto de pesquisa, farão parte do meu prontuário médico.

Se os resultados, informações ou as imagens obtidos forem utilizados para fins de publicação científica, minha identidade será mantida em sigilo, sendo utilizadas apenas as iniciais do meu nome.

Entendo também que em todas as imagens (foto e vídeo) serão utilizadas tarjas sobre os olhos. Tais informações serão divulgadas em Congressos e reuniões científicas, bem como em revistas científicas sobre o assunto.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a participação de meu(minha) filho(a) é voluntária e que eu posso recusar sua participação no estudo a qualquer momento sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no HC-UFMG. Eu reconheço também que Eralda Luiza Concentino Slomp ou a Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti podem interromper a minha participação nesse estudo a qualquer momento que julgarem apropriado.

Eu confirmo que Eralda Luiza Concentino Slomp / Dr^a.Juliana Gurgel Giannetti explicaram-me o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido(a) e as possíveis vantagens advindas deste projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi, este formulário de consentimento e estou de pleno acordo com a participação de meu(minha) filho(a) neste estudo.

Nome do responsável

Assinatura do responsável

Data: ____ / ____ / ____

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____
o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia deste formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado

Data: ____ / ____ / ____

Comitê de Ética em Pesquisa-UFMG:
Prof^a. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Unidade Administrativa II-2 andar-sala 2.005
Av. Antônio Carlos,6.627-Pampulha
Fone:31-3499-4592

Pesquisadores Responsáveis:
Eralda Luiza Concentino Slomp
Prof^a. Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti
Departamento de Pediatria-FM/UFMG
Av. Alfredo Balena,190- 4^o andar
Fone:31-3248 3773

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO
(crianças entre 7-12 anos)

**Projeto de Pesquisa: “ESTUDO GENÉTICO DE PACIENTES BRASILEIROS
COM MIOPATIAS RELACIONADAS À SELENOPROTEÍNA N1”.**

Investigadores responsáveis: Prof^a. Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti
Eralda Luiza Concentino Slomp

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que meu(minha) filho(a) foi convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa envolvendo pacientes e famílias de indivíduos portadores de miopatias e distrofias musculares congênitas. O objetivo geral da pesquisa é realizar detalhado estudo clínico, histopatológico e molecular de pacientes brasileiros com tais diagnósticos. Esses estudos poderão trazer mais conhecimentos sobre tais doenças. A pesquisa será mantida em segredo em todos os estudos colaborativos a partir da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar deste estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas ao(a) meu(minha) filho(a) a respeito dos seus antecedentes médicos e familiares. Meu(minha) filho(a) será submetido(a) a exame físico neurológico para confirmar o estado clínico e à documentação por meio de imagens (foto e vídeo). Amostra de sangue venoso será colhida (10 a 20 mL). Os pais também deverão ser submetidos à coleta de sangue.

Entendo também que os fragmentos musculares de meu(minha) filho(a), retirados e estocados na ocasião do seu diagnóstico, serão utilizados na pesquisa.

RISCO E DESCONFORTO:

Exame de sangue: coleta de 10 a 20 mL de sangue venoso será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será

mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço, que será realizada por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

VANTAGENS:

Eu entendo que ao aceitar que meu(minha) filho(a) participe desta pesquisa, o seu diagnóstico será mais preciso, apesar disto, o seu tratamento provavelmente não será modificado. Os resultados dos testes moleculares obtidos serão entregues em consulta no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, tel. (31) 3248-9540.

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados dos testes genéticos decorrentes deste projeto de pesquisa, farão parte do meu prontuário médico.

Se os resultados, informações ou as imagens obtidas forem utilizadas para fins de publicação científica, minha identidade será mantida em sigilo, sendo utilizadas apenas as iniciais do meu nome.

Entendo também que em todas as imagens (foto e vídeo) serão utilizadas tarjas sobre os olhos. Tais informações serão divulgadas em Congressos e reuniões científicas, bem como em revistas científicas sobre o assunto.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a participação de meu(minha) filho(a) é voluntária e que eu posso recusar sua participação no estudo a qualquer momento sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no HC-UFMG. Eu reconheço também que Eralda Luiza Concentino Slomp ou a Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti podem interromper a minha participação neste estudo a qualquer momento que julgarem apropriado.

Eu confirmo que Eralda Luiza Concentino Slomp / Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti explicaram-me o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais meu(minha) filho(a) será submetido(a) e as possíveis vantagens advindas deste projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi, este

formulário de consentimento e estou de pleno acordo com a participação de meu(minha) filho(a) neste estudo.

Nome do responsável

Assinatura do responsável

Nome da criança

Assinatura da criança

Data: ____ / ____ / ____

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____
o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia deste formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado

Data: ____ / ____ / ____

Comitê de Ética em Pesquisa-UFMG:
Prof^a. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Unidade Administrativa II-2 andar-sala 2.005
Av. Antônio Carlos,6.627-Pampulha
Fone:31-3499-4592

Pesquisadores Responsáveis:
Eralda Luiza Concentino Slomp
Prof^a. Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti
Departamento de Pediatria-FM/UFMG
Av. Alfredo Balena,190- 4^o andar
Fone: 31-3248 3773

APÊNDICE 3 - Autorização para foto e vídeo

DECLARAÇÃO

Eu,,
declaro que autorizo a realização de fotos e vídeos durante o meu atendimento no Ambulatório São Vicente do Hospital das Clínicas-UFMG. Fui informado(a) de que minha identidade será mantida em sigilo. Estou ciente e concordo com a utilização do material fotográfico e vídeos em Congressos e Simpósios Médicos, bem como em revistas científicas e especializadas.

Belo Horizonte, de de

Assinatura do responsável

DECLARAÇÃO

Eu,, como responsável pelo(a) paciente....., declaro que autorizo a realização de fotos e vídeos durante o atendimento no Ambulatório São Vicente do Hospital das Clínicas-UFMG. Fui informado(a) de que a identidade de meu(minha) filho(a) será mantida em sigilo. Estou ciente e concordo com a utilização do material fotográfico e vídeos em Congressos e Simpósios Médicos, bem como em revistas científicas e especializadas.

Belo Horizonte, de de

Assinatura do responsável

APÊNDICE 4 - PROTOCOLO AVALIATIVO DE PACIENTES COM DOENÇAS MUSCULARES

Projeto de Pesquisa: “ESTUDO GENÉTICO DE PACIENTES BRASILEIROS COM MIOPATIAS RELACIONADAS À SELENOPROTEÍNA N1”.

Mestrado/Doutorado em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da UFMG
Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Pesquisadores: Eralda Luiza Concentino Slomp

Prof^a. Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti

Nome:	RG:
Data de nascimento/Idade:	Sexo
Data da 1º consulta:	
Nome dos pais:	Idade dos pais:
Endereço:	Estado:
Tels:	Cep:

Diagnóstico provável: _____

Diagnóstico definitivo: _____

Queixa principal: _____

Dados relevantes do quadro clínico:

DNPM: () normal () atrasado

Sustento cefálico: Em pé sem apoio: Sentar com apoio:

Andar com apoio: Sentar sem apoio: Andar sem apoio:

Em pé com apoio: Primeiras palavras:

História gestacional:

História pregressa:

História familiar: consanguinidade: () sim () não

Parentes acometidos:

Heredograma:*** Exame Físico:**

Peso: _____ (**Pc:** _____) **Estatura:** _____ (**Pc:** _____)

- Dismorfismos faciais: _____
- Deformidades da coluna: _____
- Deformidades do tórax: _____

- Deformidades de extremidades:

	Direito	Esquerdo
Mãos		
Dedos		

Pés		
Artelhos		
Outros		

- Alterações cardíacas: _____

Alterações oculares: _____

- Outras alterações: _____

* Exame neurológico: _____ Pc: _____ (Percentil: _____)

- **Psiquismo:** : _____

- **Fácies:** : _____

- **Atitude:** : _____

- **Equilíbrio estático:** _____ **Romberg:** _____

- **Equilíbrio dinâmico** _____

- Marcha

- Marcha na ponta dos pés: () sim () não

- Marcha no calcanhar: () sim () não

* **Força muscular:**

- **Cintura escapular:** levanta MMSS ao nível cotovelo (), ombros (), acima da cabeça () escápula alada: () sim () não

- **Cintura pélvica:** corre () salta ()

sobe escadas: () sem apoio () com apoio

levanta da cadeira: () sem apoio () com apoio

levanta do chão: () sem apoio () com apoio

Músculo	Direito	Esquerdo
Trapézio		
Esternocleidomastoide		
Deltoide		
Bíceps		
Tríceps		
Estiloradial		
Flexor dos dedos		
Glúteo máximo		
Íleopsoas		
Quadríceps		
Bíceps femoral		
Tibial anterior		
Gastrocnêmico		
Extensor dos dedos		

Legenda: 0 – sem esboço de contração; 1 – Fraca contração sem movimento; 2 – movimento no plano horizontal; 3 – movimento contra a gravidade; 4 – movimento vencendo pequena resistência; 5 – normal.

*** Miotonia:**

- Ativa: () sim () não

- De percussão: () sim () não

- Músculos: _____

*** Reflexos profundos**

	Direito	Esquerdo
Bíceps		
Tríceps		
Estiloradial		
Adutor da coxa		
Patelar		
Aquileu		

nl: normal; - : hipo; + : vivos; e: exaltado.

***Reflexo cutâneo plantar:** _____

*** Tônus e trofismo:**

Tônus	Difusa	Proximal	Distal
Hipotonia			
Hipertonia			
Trofismo	Difuso	Proximal	Distal
Hipotonia			
Hipertonia			

+: leve; ++ : moderada; +++ : acentuada

*** Sensibilidade:** _____

*** Nervos cranianos:**

- alterações MOE:

- ptose palpebral:

- paresia facial:

- paresia *orbicular oris*:

- outros:

*** Retrações fibrotendíneas:**

Aquileu	Poplítea	Coxofemoral	Ombros	Cotovelos	Punhos	Dedos

Exames complementares:

Exames:	Valores de Referência:	Data: ___/___/___	Data: ___/___/___	Data: ___/___/___	Data: ___/___/___
CPK					
DHL					
Aldolase					
TGO					
TGP					
Lactato					
pH					
Bic					
BE					
pO ₂					
pCO ₂					
SatO ₂					

DHL = Desidrogenase láctica;

ENMG: (Data: ___/___/___)

T. Crânio : (Data: ___/___/___)

RM de crânio: (Data: ___/___/___)

Avaliação cardiológica: (Data: ___/___/___)

ECG: _____

Rx de tórax: _____

Eco: _____

Avaliação da função pulmonar: (Data: ___/___/___)

Espirometria:

Avaliação oftalmológica: (Data: __/__/__)

Biópsia muscular: (Data: __/__/__)

Estudo histoquímico:

Estudo imuno-histoquímico:

Estudos moleculares - DNA:(Data: __/__/__)

Demais exames:

_____ : (Data: __/__/__)

ANEXO A - AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Parecer nº. ETIC 555/08

**Interessado(a): Profa. Juliana Gurgel Giannetti
Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 04 de fevereiro de 2009, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Estudos de mutações no gene SEPN1 em pacientes portadores de miopatias e distrofias musculares congênitas acompanhados no ambulatório de doenças neuromusculares do Hospital das Clínicas da UFMG"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Maria Teresa Marques Amaral', is written over a faint, illegible stamp.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

ANEXO B - AUTORIZAÇÃO DAS UNIDADES FUNCIONAIS:**Departamento de Patologia e Medicina Laboratorial****UNIDADE FUNCIONAL PATOLOGIA E
MEDICINA LABORATORIAL**
Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal

Belo Horizonte, 14 de outubro de 2008.

Ao Sr. Diretor de Ensino, Pesquisa e Extensão do
Hospital das Clínicas UFMG.

Senhor Diretor,

Pela presente, venho informar que o Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal do Hospital das Clínicas da UFMG está ciente e concordante com a utilização do ambiente físico, para o estudo histopatológico e molecular e dos fragmentos de biópsias musculares armazenados nos seus arquivos, para realização do projeto de pesquisa intitulado **“Estudos de mutações no gene SEPN1 em pacientes com distrofia e miopatias musculares congênitas acompanhados pelo ambulatório de doenças neuromusculares do Hospital das Clínicas da UFMG”**, que será desenvolvido no Laboratório de Investigações em Doenças Neuromusculares do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina, como projeto de mestrado da aluna Eralda Luíza Castro Concentino e orientado pela Profa.Dra.Juliana Gurgel Giannetti.

A handwritten signature in black ink, reading 'Mônica Maria Demas Álvares Cabral'.

Prof. Mônica Maria Demas Álvares Cabral
Chefe do Departamento de Anatomia Patológica
e Medicina Legal do Hospital das
Clínicas da UFMG

Unidade funcional da Pediatria:

*Unidade Funcional Pediatria
Hospital das Clínicas
Universidade Federal de Minas Gerais*

ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA

Título do Projeto:

“Estudo de Mutações no Gene SEPN1 em Pacientes Portadores de Miopatias e Distrofias Musculares Congênitas acompanhados no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital das Clínicas da UFMG.”

Orientador:

Juliana Gurgel Giannetti

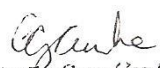
Pesquisador Responsável:

Eralda Luiza Castro Concentino

Recomendações/restrições para o desenvolvimento da pesquisa:

. O objetivo do projeto é detectar mutações no gene SEPN1 em pacientes portadores de distrofia muscular congênita e correlacionar o genótipo com o fenótipo clínico e histopatológico dos pacientes. Esse estudo poderá contribuir com o entendimento destas mutações e melhorar o prognóstico dos pacientes. O projeto é bem fundamentado teoricamente, é relevante e não oferece riscos aos pacientes.

O projeto foi aprovado por unanimidade neste Colegiado.
31 de Outubro de 2008


Cláudia González Cunha
Gerente da U. F. Pediatria HC-UFMG

ANEXO C - AUTORIZAÇÃO DA DIRETORIA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS-UFMG



Universidade Federal de Minas Gerais **UFMG**
Hospital das Clínicas
Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão


DECLARAÇÃO

Declaramos para fins de comprovação no Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos – COEP/UFMG que o projeto de pesquisa intitulado, ” **ESTUDOS DE MUTAÇÕES NO GENE SEPN1 EM PACIENTES COM DISTROFIA E MIOPATIAS MUSCULARES CONGÊNIAS ACOMPANHADOS PELO AMBULATÓRIO DE DOENÇAS NEUROMUSCULARES DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG**”, de responsabilidade, da *Prof. Juliana Gurgel Giannetti* foi recebido na Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão/HC-UFMG para registro e avaliação.

Belo Horizonte, 31 de outubro de 2008.


Elzi do Carmo Cota
Secretária da DEPE/HC-UFMG

ANEXO D – ATA DE DEFESA

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE	
---	--	---

ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA ERALDA LUIZA CONCENTINO SLOMP

Realizou-se, no dia 22 de agosto de 2016, às 08:30 horas, na sala 029, andar térreo da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada “ESTUDO GENÉTICO DE PACIENTES BRASILEIROS COM MIOPATIAS RELACIONADAS À SELENOPROTEÍNA N1.”, apresentada por **ERALDA LUIZA CONCENTINO SLOMP**, número de registro 2012655089, graduada no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Saúde da Criança e do Adolescente, à seguinte Comissão Examinadora, formada pelos Professores Doutores: Juliana Gurgel Giannetti - Orientadora (UFMG), Ana Cristina Simões e Silva (UFMG), Paulo Caramelli (UFMG), Alessandra Lopes Starling (ONCOCENTRO), Elvis Cristian Cueva Mateo (Hermes Pardini).

A Comissão considerou a tese:

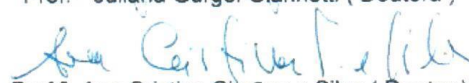
Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.


Belo Horizonte, 22 de agosto de 2016.


Prof.ª Juliana Gurgel Giannetti (Doutora)


Prof.ª Ana Cristina Simões e Silva (Doutor)


Prof. Paulo Caramelli (Doutor)


Prof.ª Alessandra Lopes Starling (Doutora)


Prof. Elvis Cristian Cueva Mateo (Doutor)

Centro de Pós Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG
Av. Prof. Alfredo Balena, 110 - 9º Andar
CEP 30130-100 - Funcionários - BH/MG


CONFERE COM ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG

ANEXO E – FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

ESTUDO GENÉTICO DE PACIENTES BRASILEIROS COM MIOPATIAS
RELACIONADAS À SELENOPROTEÍNA N1.

ERALDA LUIZA CONCENTINO SLOMP

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde, Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração Ciências da Saúde.

Aprovada em 22 de agosto de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Prof.ª Juliana Gurgel Giannetti - Orientadora
UFMG

Prof.ª Ana Cristina Simões e Silva
UFMG

Prof. Paulo Caramelli
UFMG

Prof.ª Alessandra Lopes Starling
ONCOCENTRO

Dr. Elvis Cristian Cueva Mateo
Hermes Pardini

Belo Horizonte, 22 de agosto de 2016.