

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular**

Pedro Guimarães de Azevedo

**AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES GERMINATIVAS EM FAMÍLIAS PORTADORAS  
DA SÍNDROME DA APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO (SAOS) ATRAVÉS DE  
EXOMA**

Belo Horizonte  
2022

Pedro Guimarães de Azevedo

**AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES GERMINATIVAS EM FAMÍLIAS PORTADORAS  
DA SÍNDROME DA APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO (SAOS) ATRAVÉS DE  
EXOMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Medicina Molecular.

Orientadora: Luciana Bastos Rodrigues

Coorientador: Luiz Armando Cunha De Marco

Belo Horizonte  
2022

Azevedo, Pedro Guimarães de.  
AZ994a Avaliação de mutações germinativas em famílias portadoras da Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono (SAOS) através de exoma [manuscrito]. / Pedro Guimarães de Azevedo. - - Belo Horizonte: 2022.  
113f.: il.  
Orientador (a): Luciana Bastos Rodrigues.  
Área de concentração: Medicina Molecular.  
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Exoma. 2. Apneia Obstrutiva do Sono. 3. Estudos de Associação Genética. 4. Dissertação Acadêmica. I. Rodrigues, Luciana Bastos. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WF 143



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

### FOLHA DE APROVAÇÃO

**AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES GERMINATIVAS EM FAMÍLIAS PORTADORAS DA SÍNDROME DA APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO (SAOS) ATRAVÉS DE EXOMA**

**PEDRO GUIMARÃES DE AZEVEDO**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia trinta de junho de dois mil vinte e dois, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores doutores:

**Luciana Bastos Rodrigues - Orientadora**  
UFMG

**Luiz Armando Cunha de Marco**  
UFMG

**Carolina Cavaliéri Gomes**  
UFMG

**Juliana Garcia Carneiro**  
Clínica Personal

**Melania Dirce Oliveira Marques**  
USP

Belo Horizonte, 30 de junho de 2022.



Documento assinado eletronicamente por Luiz Armando Cunha de Marco, Coordenador(a) de curso de pós-graduação, em 01/07/2022, às 13:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Carolina Cavaliéri Gomes, Professora do Magistério Superior, em 01/07/2022, às 14:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Luciana Bastos Rodrigues, Professora do Magistério Superior, em 03/07/2022, às 19:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Melânia Dirce Oliveira Marques, Usuário Externo, em 04/07/2022, às 22:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Juliana Garcia Carneiro, Usuário Externo, em 05/07/2022, às 15:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 1556784 e o código CRC 7704BF9F.

*Aos meus familiares e amigos pela  
compreensão e solidariedade ao longo desses  
momentos da minha vida. A todas as pessoas  
envolvidas na pesquisa médica no Brasil.*

## AGRADECIMENTOS

Inúmeras pessoas foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Desta forma, expresso meus sinceros votos de agradecimentos a todos.

Sou extremamente grato aos professores *Luiz De Marco* e *Luciana Rodrigues* pela oportunidade a mim concedida. Poder participar de um grupo de pesquisadores tão responsáveis e dedicados proporcionou-me experiências e novos conhecimentos que vão muito além daqueles de origem técnica e científica. Reforçou ainda mais meu entusiasmo com a ciência, com as novas descobertas. Entendi que nosso dever como médico não está apenas em prestar assistência clínica, mas também em podermos fazer a diferença ajudando a entender mais sobre as doenças e mitigar seus efeitos na vida do outro. Agradeço-lhes pela compreensão nos momentos difíceis durante os estudos e por encorajar-me a superar desafios e a dar voos mais altos quando fosse necessário;

Também sou muito grato à *Maria de Lourdes Rabelo*, minha mãe, uma dentista completa, tanto no aspecto técnico-profissional quanto pelo lado humanístico. Tornou este projeto possível ao selecionar os pacientes envolvidos, ao fornecer todas as informações clínicas sobre eles, ao me dar total apoio sempre que necessário e à confiança a mim depositada;

Dra. *Patrícia Souza Bastos*, Dra. *Ana Cotta*, Dr. *Elmano Carvalho*, do Hospital Sarah Kubitschek, e Dra. *Patrícia Couto*, do instituto Hermes Pardini, muito obrigado a todos por manterem a alta qualidade das discussões clínicas e pelas considerações científicas;

Agradeço a todos os colegas do laboratório de Medicina Molecular pelo apoio inexprimível como equipe. Em especial, às queridas *Anna Luiza*, *Rayane* e *Bianca* pela dedicação, abdicação de seus preciosos tempos e pelo empenho com a qualidade dos experimentos neste trabalho;

Agradeço ao professor *Eitan Friedman*, com sua grande expertise científica, pela inestimável colaboração e orientação para um melhor caminho na pesquisa;

Meus sinceros agradecimentos à minha família, em especial à minha esposa *Flávia* e meu filho *Antônio*, que respeitaram minhas incontáveis horas dedicadas ao laboratório e, portanto, minha ausência e ansiedade tantas vezes;

A toda minha família pela união e por me proporcionarem momentos de descontração. Em especial agradeço ao meu pai *Marcelo*, minha irmã *Júlia* e minha tia *Beth* pelo apoio e pelo carinho nos momentos difíceis. Agradeço também a família da minha esposa, que há muitos anos passou a ser minha família também, pela força e admiração;

Ao apoio financeiro do CNPq que concedeu a bolsa de doutorado durante este trabalho, bem como à CAPES e à FAPEMIG pelo incentivo a pesquisa;

Gratidão aos pacientes, sujeitos e propósito desta pesquisa, pelo profundo interesse e colaboração que, além de doarem material biológico, doaram também seu tempo, suas experiências e uma parte de suas vidas, para contribuírem de forma excepcional com a execução deste trabalho.

“Se dormir e sonhar não desempenham funções biológicas vitais, então devem representar o erro mais estúpido da natureza e a mais colossal perda de tempo” (Anthony Stevens, *Private Myths: Dreams and Dreaming*, 1997).



## RESUMO

A síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS) é caracterizada pela obstrução completa ou parcial das vias aéreas superiores, resultando em períodos de apneia associada ao sono. A SAOS aumenta o risco de morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares e cerebrovasculares. Embora a herdabilidade da SAOS seja estimada em ~40%, os genes subjacentes precisos permanecem indefinidos. O objetivo do presente estudo é definir a base genética da SAOS aparentemente monogênica em duas famílias brasileiras. Essas famílias seguem um padrão sugestivo de herança autossômica dominante. O sequenciamento completo do exoma do DNA da linhagem germinativa e os dados gerados foram analisados usando o *software Mendel,MD*. As variantes selecionadas foram analisadas usando *Varstation*<sup>®</sup>, com análises subsequentes que incluíram validação por sequenciamento de Sanger, avaliação de pontuação patogênica pelos critérios *ACMG*, análises de co-segregação (quando possível), frequência alélica, padrões de expressão tecidual, análises de vias, efeito na modelagem de dobramento de proteínas usando *Swiss-Modelo* e *RaptorX*. Duas famílias (seis casos de SAOS afetados e três controles não afetados) foram analisadas. Uma análise abrangente de várias etapas apontou variantes em *COX20* (*rs946982087*) (família A), *PTPDC1* (*rs61743388*) e *TMOD4* (*rs141507115*) (família B) que parecem ser genes fortes candidatos a serem associados à OSAS nessas famílias. Em conclusão, as variantes encontradas em *COX20*, *PTPDC1* e *TMOD4* aparentemente estão correlacionadas ao fenótipo da SAOS nessas famílias. Mais estudos em famílias etnicamente diversas e casos de SAOS não familiares são necessários para melhor definir o papel dessas variantes como contribuintes para o fenótipo da SAOS.

Palavras-chave: Exoma. Apneia Obstrutiva do Sono. SAOS. Genes candidatos.

## ABSTRACT

Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is characterized by complete or partial obstruction of the upper airways, resulting in periods of sleep associated apnea. OSAS increases morbidity and mortality risk from cardiovascular and cerebrovascular diseases. While heritability of OSAS is estimated at ~40%, the precise underlying genes remain elusive. The aim of present study is define the genetic basis of seemingly monogenic OSAS in two Brazilian families. Brazilian families with OSAS that follows as seemingly autosomal dominant inheritance pattern were recruited. Whole exome sequencing of germline DNA and the generated data were analyzed using *Mendel,MD* software. Variants selected were analyzed using *Varstation*® with subsequent analyses that included validation by Sanger sequencing, pathogenic score assessment by *ACMG* criteria, co-segregation analyses (when possible) allele frequency, tissue expression patterns, pathway analyses, effect on protein folding modeling using *Swiss-Model* and *RaptorX*. Two families (six affected OSAS cases and three unaffected controls) were analyzed. A comprehensive multistep analyses yielded variants in *COX20* (*rs946982087*) (family A), *PTPDC1* (*rs61743388*) and *TMOD4* (*rs141507115*) (family B) that seemed to be strong candidate genes for being OSAS associated genes in these families. In conclusion, sequence variants in *COX20*, *PTPDC1* and *TMOD4* seemingly are associated with OSAS phenotype in these families. Further studies in more, ethnically diverse families and non-familial OSAS cases are needed to better define the role of these variants as contributors to OSAS phenotype.

Keywords: Obstructive Sleep Apnea. OSAS. Whole-exome sequencing. Candidate genes.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Epidemiologia da SAOS. ....	23
<b>Figura 2</b> – Algoritmo para diagnóstico de SAOS.....	26
<b>Figura 3</b> – Anatomia da orofaringe. ....	28
<b>Figura 4</b> – Estrutura craniofacial .....	30
<b>Figura 5</b> – Imagem de ressonância magnética sagital média. ....	30
<b>Figura 6</b> – Mudanças fisiológicas potencialmente benéficas <i>versus</i> desestabilizadoras associadas a excitações induzidas por respiração na apneia obstrutiva do sono .....	32
<b>Figura 7</b> – Etapas de um sequenciamento de exoma .....	39
<b>Figura 8</b> – Genealogia da família A portadora de SAOS .....	50
<b>Figura 9</b> – Genealogia da família B portadora de SAOS .....	52
<b>Figura 10</b> – Fluxograma do método de análise <i>in silico</i> realizado para o <i>WES</i> .....	54
<b>Figura 11</b> – Eletroferograma representativo do gene <i>COX20</i> validado para indivíduos afetados na família A .....	62
<b>Figura 12</b> – Eletroferograma representativo dos genes validados na família B .....	63
<b>Figura 13</b> – Efeitos do resíduo alterado na proteína COX20 .....	65
<b>Figura 14</b> – Efeitos do resíduo alterado na proteína PTPDC1 .....	67
<b>Figura 15</b> – Efeitos do resíduo alterado na proteína TMOD4 .....	69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Opções terapêuticas para SAOS .....	35
<b>Tabela 2</b> – Fenótipos intermediários e genes candidatos para SAOS .....	37
<b>Tabela 3</b> – Pares de <i>primers</i> desenhados para sequenciamento de Sanger e validação de resultados gerados através de exoma .....	46
<b>Tabela 4</b> – Etapas de filtragem na análise do exoma através do programa <i>Mendel, MD</i> .....	47
<b>Tabela 5</b> – Dados clínico-laboratoriais dos indivíduos estudados na família A .....	51
<b>Tabela 6</b> – Dados clínico-laboratoriais dos indivíduos estudados na família B .....	53
<b>Tabela 7</b> – Métricas associadas às amostras dos pacientes e controles da família A submetidos ao sequenciamento por exoma .....	55
<b>Tabela 8</b> – Métricas associadas às amostras dos pacientes e controles da família B submetidos ao sequenciamento por exoma .....	56
<b>Tabela 9</b> – Variantes observadas em todos os indivíduos portadores de SAOS e ausentes nos controles da família A .....	58
<b>Tabela 10</b> – Descrição da classificação das variantes encontradas na família A com potencial de apresentarem patogenicidade .....	59
<b>Tabela 11</b> – Variantes observadas em todos os indivíduos portadores de SAOS e ausentes nos controles da família B .....	60
<b>Tabela 12</b> – Descrição da classificação das variantes encontradas na família B com potencial de apresentarem patogenicidade .....	61
<b>Tabela 13</b> – Sumário dos resultados da validação dos sequenciamentos dos genes selecionados na família A .....	62
<b>Tabela 14</b> – Sumário dos resultados da validação dos sequenciamentos dos genes selecionados na família B .....	64
<b>Tabela 15</b> – Identificação dos transcritos utilizados para elaboração de <i>primers</i> específicos para as regiões das variantes estudadas em seus respectivos genes .....	84

## LISTA DE ABREVIACOES

ABraOM	Arquivo Brasileiro Online de Mutaoes
ACMG	Do inglês <i>American College of Medical Genetics</i>
AIO	Aparelho Intra Oral
Ala	Do inglês <i>Alanine</i>
AMM	Avanço Maxilo-Mandibular
Anl.	Análise
AOS	Apneia Obstrutiva do Sono
Arg	Do ingls <i>Arginine</i>
ARMCX3	Do ingls <i>Armadillo Repeat Containing X-Linked 3</i>
Asn	Do ingls <i>Asparagine</i>
Asp	Do ingls <i>Aspartic acid</i>
AT	Adenotonsilectomia
ATP2B4	Do ingls <i>ATPase Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup> Transporting 4</i>
BDNF	Do ingls <i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>
bp	Do ingls <i>base pairs</i>
BP1	Do ingls <i>Benign Supportive (P) 1 – inherent</i>
BP4	Do ingls <i>Benign Supportive (P) 4 – in silico</i>
BS1	Do ingls <i>Benign Strong (S) 1 – frequency</i>
C16orf90	Do ingls <i>Chromosome 16 Open Reading Frame 90</i>
CADD	Do ingls <i>Combined Annotation Dependent Depletion</i>
CAPES	Coordenao de Aperfeioamento de Pessoal de Nvel Superior
c.DNA	Do ingls <i>complementary DNA</i>
CD3EAP	Do ingls <i>CD3E antigen, epsilon polypeptide associated protein</i>
ClinVar	Do inglês <i>Clinically relevant variation</i>
cm	Centímetro
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COX2	Do inglês <i>Cytochrome C Oxidase Assembly Factor COX2</i>
COX20	Do inglês <i>Cytochrome C Oxidase Assembly Factor COX20</i>
CPAP	Do inglês <i>Continuous Positive Airway Pressure</i>
CPK	Creatinofosfoquinase
CVF	Capacidade Vital Forçada
Cys	Do inglês Cysteine
dbSNP	Do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphism Database</i>
Desp./h	Índice de despertar por hora
Dessat.	Dessaturação
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
<i>DNAH10</i>	Do inglês <i>Dynein Axonemal Heavy Chain 10</i>
EDTA	Do inglês <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EEG	Eletroencefalograma
EMG	Eletromiograma
ENH	Estimulação do nervo hipoglosso
<i>ERCC1</i>	Do inglês <i>Excision Repair 1, Endonuclease Non-Catalytic Subunit</i>
E.S.	Estudo de segregação
ev./h	Eventos por hora
<i>F</i>	Do inglês <i>forward</i>
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
g	grama
Glu	Do inglês <i>Glutamic acid</i>
Gln	Do inglês <i>Glutamine</i>
Gly	Do inglês <i>Glycine</i>
<i>GDNF</i>	Do inglês <i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
gnomAD	Do inglês <i>The Genome Aggregation Database</i>

<i>GPR98</i>	Do inglês <i>G protein-coupled receptor 98</i>
°C	Graus Celsius
GRCh37	Do inglês <i>Genome Reference Consortium Human Build 37</i>
GWAS	Do inglês <i>Genome Wide Association Studies</i>
hg19	Do inglês <i>Human Genome version 19</i>
His	Do inglês Histidine
HSAT	Do inglês <i>Home Sleep Apnea Testing</i>
Hz	Hertz
IAH	Índice de Apneia-Hipopneia
IDR	Índice de Distúrbio Respiratório
IER	Índice de Eventos Respiratórios
<i>IL18RAP</i>	Do inglês <i>Interleukin 18 Receptor Accessory Protein</i>
Ile	Do inglês <i>Isoleucine</i>
IMC	Índice de massa corporal
INDEL	Do inglês <i>insertion/deletion</i>
<i>JMJD7</i>	Do inglês <i>Jumonji Domain Containing 7</i>
Kg	Quilograma
Krox-20	Do inglês <i>zinc finger transcription factor Krox-20</i>
L	Litro
<i>LARS1</i>	Do inglês <i>Leucyl-TRNA Synthetase 1</i>
Leu	Do inglês <i>Leucine</i>
Lys	Do inglês <i>Lysine</i>
m <sup>2</sup>	Metro quadrado
MAF	Do inglês <i>Minor Allele Frequency</i>
mcg	Micrograma
Met	Do inglês <i>Methionine</i>
mg	Miligrama

Mioglo.	Mioglobina sérica
ml	Mililitro
µl	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrômetros
mM	Milimolar
<i>MRGPRX4</i>	Do inglês <i>MAS Related GPR Family Member X4</i>
<i>MRPS33</i>	Do inglês <i>Mitochondrial Ribosomal Protein S33</i>
<i>MUC6</i>	Do inglês <i>Mucin 6</i>
N.D	Não Disponível
ng	Nanogramas
<i>NLRP6</i>	Do inglês <i>NLR Family Pyrin Domain Containing 6</i>
<i>NRG1</i>	Do inglês <i>Neuregulin 1</i>
<i>NUP214</i>	Do inglês <i>Nucleoporin 214</i>
<i>OMIM</i>	Do inglês <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PaCO <sub>2</sub>	Pressão parcial de gás carbônico
PCR	Do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>PEMT1</i>	Do inglês <i>Phosphatidylethanolamine N-Methyltransferase 1</i>
pH	Potencial de Hidrogênio
Phe	Do inglês <i>Phenylalanine</i>
<i>PIF1</i>	Do inglês <i>PIF1 5'-To-3' DNA Helicase</i>
<i>PKD1L2</i>	Do inglês <i>Polycystin 1 Like 2</i>
PM1	Do inglês <i>Pathogenic moderate (M) 1 – inherent</i>
PM2	Do inglês <i>Pathogenic moderate (M) 2 – frequency</i>
PO <sub>2</sub>	Pressão Parcial de Oxigênio
PolyPhen	Do inglês <i>Polymorphism Phenotyping</i>
<i>POTEC</i>	Do inglês <i>POTE Ankyrin Domain Family Member C</i>



PP2	Do inglês <i>Pathogenic Supportive (P) 2 – inherent</i>
PP3	Do inglês <i>Pathogenic Supportive (P) 3 – in silico</i>
Pro	Do inglês <i>Proline</i>
PSG	Polissonografia
PTP	Do inglês <i>Protein Tyrosine Phosphatase</i>
<i>PTPDC1</i>	Do inglês <i>Protein Tyrosine Phosphatase Domain Containing 1</i>
q.s.p	Quantidade Suficiente Para
R	Do inglês <i>reverse</i>
<i>RAII</i>	Do inglês <i>Retinoic Acid Induced 1</i>
<i>RASD1</i>	Do inglês <i>Ras Related Dexamethasone Induced 1</i>
REM	Do inglês <i>Rapid Eye Movement</i>
Resp. Nasal	Respiração nasal satisfatória
RET	Do inglês <i>Ret Proto-Oncogene</i>
RERA	Do inglês <i>Respiratory effort-related arousal</i>
rs	Referência de <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SAOS	Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono
Sat. Méd.	Saturação média
Sat. Mín.	Saturação mínima
Satisf.	Satisfatória
Ser	Do inglês <i>Serine</i>
Sd.	Síndrome
<i>SHB</i>	Do inglês <i>SH2 Domain Containing Adaptor Protein B</i>
SIFT	Do inglês <i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>
<i>SLC22A18</i>	Do inglês <i>Solute Carrier Family 22 Member 18</i>
<i>SLC45A2</i>	Do inglês <i>Solute Carrier Family 45 Member 2</i>
SNP	Do inglês <i>common Single Nucleotide Polymorphism</i>
SNV	Do inglês <i>Single Nucleotide Variant</i>

SpO <sub>2</sub>	Saturação periférica de oxigênio
<i>SREBF1</i>	Do inglês <i>Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1</i>
Suj.	Sujeitos do estudo
<i>TEX9</i>	Do inglês <i>Testis Expressed 9</i>
Thr	Do inglês <i>Threonine</i>
<i>TLE1</i>	Do inglês <i>TLE Family Member 1, Transcriptional Corepressor</i>
Tm	Temperatura de anelamento
<i>TMOD1</i>	Do inglês <i>Tropomodulin 1</i>
<i>TMOD4</i>	Do inglês <i>Tropomodulin 4</i>
Trp	Do inglês <i>Tryptophan</i>
Tyr	Do inglês <i>Tyrosine</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UniProt	Do inglês <i>Universal Protein</i>
UPFP	Uvalopalatofaringoplastia
UPFP+TE	Uvalopalatofaringoplastia + tonsilectomia
Val	Do inglês <i>Valine</i>
VAF	Do inglês <i>Variant Allele Frequencies</i>
VCF	Do inglês <i>Variant Call Format</i>
<i>VPS13C</i>	Do inglês <i>Vacuolar Protein Sorting 13 Homolog C</i>
VR	Valor de referência
VUS	Do inglês <i>Variant of Uncertain Significance</i>
WES	Do inglês <i>Whole-Exome Sequencing</i>
<i>WFDC1</i>	Do inglês <i>WAP Four-Disulfide Core Domain 1</i>
WT	Do inglês <i>Wild-Type</i>
<i>ZBTB24</i>	Do inglês <i>Zinc Finger And BTB Domain Containing 24</i>
<i>ZFPM2</i>	Do inglês <i>Zinc Finger Protein, FOG Family Member 2</i>
<i>ZNF433</i>	Do inglês <i>Zinc Finger Protein 433</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
1.1	Conceito de síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS)	22
1.2	Epidemiologia da SAOS	22
1.3	Diagnóstico de SAOS	24
1.4	Fisiopatologia da SAOS	27
1.5	Tratamento de SAOS	33
1.6	Fatores genéticos associados ao desenvolvimento de SAOS familiar	35
1.7	Exoma ( <i>WES</i> ), Estudos de Associação Ampla do Genoma ( <i>GWAS</i> ) e SAOS	38
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>42</b>
3.1	Seleção de pacientes	42
3.2	Análises moleculares	42
3.2.1	<i>Extração de DNA genômico</i>	42
3.2.2	<i>Sequenciamento por exoma – WES</i>	43
3.2.3	<i>Validação dos dados encontrados no WES</i>	44
3.3	Análises <i>in silico</i>	46
3.3.1	<i>Seleção de genes e variantes através do programa Mendel, MD</i>	46
3.3.2	<i>Filtragem de variantes através do programa Varstation® (Varstation)</i>	47
3.3.3	<i>Estudo e classificação das variantes</i>	48
3.3.4	<i>Modelos proteicos e impactos estruturais nas proteínas</i>	48
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>49</b>
4.1	População de Estudo	49
4.1.1	<i>Família A</i>	49
4.1.2	<i>Família B</i>	52
4.2	Análises do sequenciamento por <i>WES</i>	55
4.2.1	<i>Família A - WES</i>	55
4.2.2	<i>Família B - WES</i>	56
4.3	Estudo e classificação das variantes	57
4.3.1	<i>Família A – ACMG / VarSome</i>	57
4.3.2	<i>Família B – ACMG / VarSome</i>	60
4.4.1	<i>Família A – Validação por Sanger</i>	62
4.4.2	<i>Família B – Validação por Sanger</i>	63

4.5 Predição de patogenicidade de proteínas, análise de vias e análise <i>in silico</i> .....	64
4.5.1 Proteína COX20 – Família A .....	64
4.5.2 Proteína PTPDC1 – Família B .....	66
4.5.3 Proteína TMOD4 – Família B .....	68
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>84</b>
APÊNDICE A – Tabela com identificação dos transcritos utilizados. ....	84
APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido .....	85
APÊNDICE C – Artigo Científico .....	87

## 1 INTRODUÇÃO

Sono é um estado comportamental fisiológico, recorrente e reversível de desacoplamento e baixa responsividade da percepção em relação a estímulos ambientais (Fernandes, 2006). Tal estado não ocorre por exaustão de redes neurais responsáveis pela vigília, ao contrário, necessita de ativação de estruturas do sistema nervoso central (SNC) que o induzam. Estas estruturas, por outro lado, são ativadas por genes que ajustam o indivíduo às variações geofísicas de luz, temperatura corporal, hormônios e metabolismo (Schwartz *et al.*, 2008; Anafi *et al.*, 2013).

A síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS) é um distúrbio que envolve a interrupção ou diminuição significativa do fluxo aéreo na presença de esforço respiratório durante o sono (Lévy *et al.*, 2015). É hereditária e multifatorial, devido a contribuições variáveis de distúrbios no controle ventilatório, anatomia craniofacial e adiposidade (Patel *et al.*, 2008; Peppard e Hagen, 2018). Em todo o mundo, estima-se que 936 milhões de adultos tenham SAOS leve a grave (Benjafield *et al.*, 2019), associada ao aumento da sonolência, mortalidade e morbidade por uma ampla gama de doenças cardiometabólicas e outras (Lévy *et al.*, 2015; Peppard e Hagen, 2018).

A gravidade da SAOS é caracterizada pelo índice de apneia-hipopneia (IAH), definido como o número de eventos de apneia e hipopneia por hora de sono (American Academy of Sleep Medicine, 2014). Níveis elevados de IAH são hereditários em europeus americanos e afro-americanos, com quase 40% da variância atribuída a fatores genéticos (Redline *et al.*, 1995; Patel *et al.*, 2008).

Em face de uma compreensão ainda incipiente de sua base molecular, os tratamentos habituais da SAOS abordam apenas as manifestações de colapso das vias aéreas e essas terapias são frequentemente mal toleradas pelos pacientes. Assim, há uma demanda considerável para identificar vias moleculares que possam proporcionar objetivos terapêuticos mais específicos (Cade *et al.*, 2021).

Nos últimos anos, estudos genéticos identificaram variantes genéticas associadas ao IAH aumentado, embora esses achados tenham sido baseados em grupos étnicos únicos (Larkin *et al.*, 2010) ou apenas em populações (Wang *et al.*, 2019; Cade *et al.*, 2021). Até o momento, não há estudos moleculares robustos avaliando as bases genéticas da SAOS em famílias.

## 1.1 Conceito de síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS)

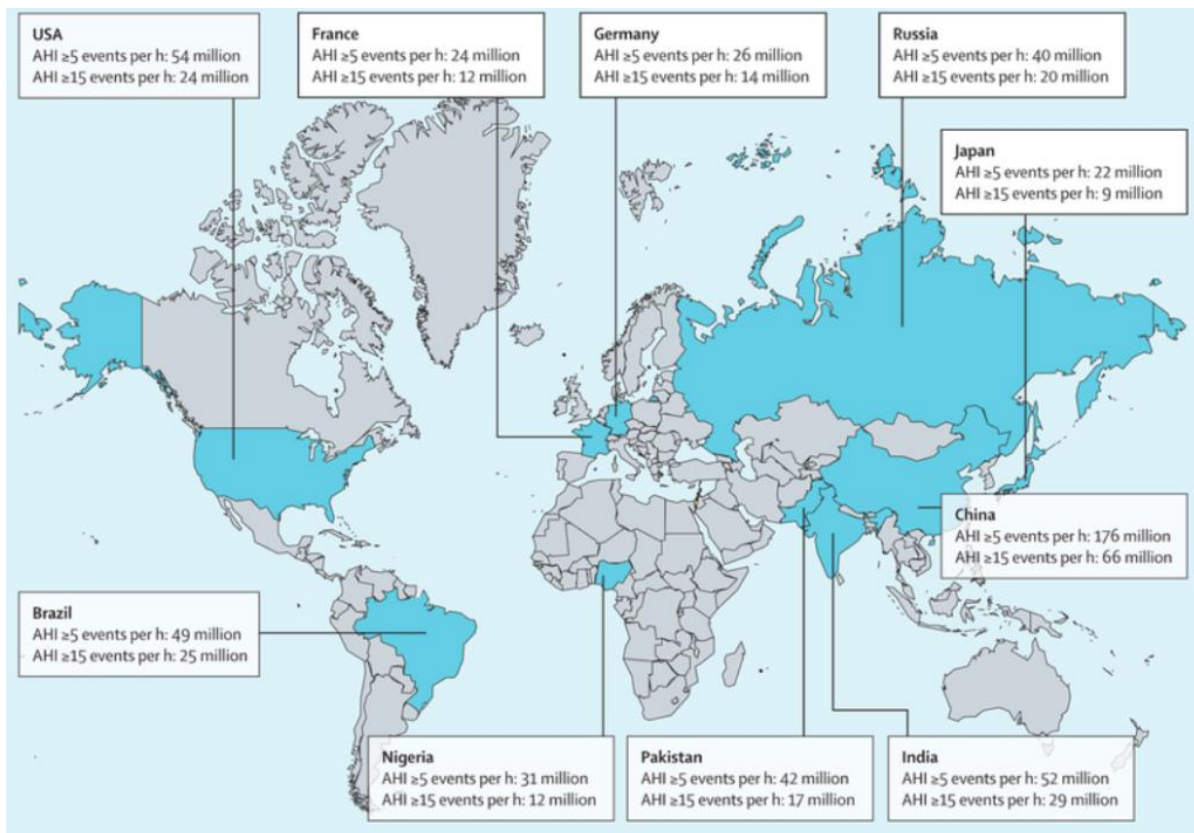
A apneia obstrutiva do sono (AOS), também conhecida como apneia-hipopneia obstrutiva do sono ou síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS) não é uma doença isolada, mas uma síndrome de disfunção das vias aéreas superiores durante o sono. Pode ser definida como um distúrbio do sono que envolve a interrupção ou uma diminuição significativa do fluxo de ar na presença de esforço respiratório (American Academy of Sleep Medicine, 2014; Jordan *et al.*, 2014). Pessoas afetadas muitas vezes sofrem de sonolência diurna excessiva com suas morbidades concomitantes (Stöwhas *et al.*, 2019), e podem estar em maior risco de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares (hipertensão, infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral) (Leppänen *et al.*, 2019).

## 1.2 Epidemiologia da SAOS

A prevalência estimada de SAOS na América do Norte é de aproximadamente 20 a 30% em homens e de 10 a 15% nas mulheres quando a síndrome é definida como um índice de apneia-hipopneia (IAH) maior que cinco eventos por hora. Quando se utilizam definições mais rigorosas, combinando um IAH  $\geq 5$  eventos por hora com relato de pelo menos um sintoma de sono perturbado ou utilizando um IAH  $\geq 15$  eventos por hora, a prevalência estimada é de aproximadamente 15% em homens e 5% nas mulheres (Young *et al.*, 2009; Peppard *et al.*, 2013).

Estimativas globais usando cinco ou mais eventos por hora sugerem 936 milhões de pessoas afetadas por SAOS em todo o mundo, dos quais 425 milhões apresentam as formas moderada a grave entre 30 e 69 anos de idade. O número de indivíduos afetados é maior na China, seguido pelos Estados Unidos, Brasil e Índia (Figura 1). No Brasil, a população estimada entre 30 a 69 anos é de 98.118.248. De acordo com o critério de IAH a prevalência de SAOS estimada para IAH  $\geq 5$  eventos/h é de 48.729.844 (49,7%) e para IAH  $\geq 15$  eventos/h, 25.481.720 (26,0%) (Benjafield *et al.*, 2019). Um estudo realizado em 2010 na grande São Paulo com 1.042 pessoas mostrou uma prevalência média de 32% na população em geral e 30,1% em trabalhadores (Tufik *et al.*, 2010).

**Figura 1** – Epidemiologia da SAOS.



Dez países com o maior número de indivíduos com SAOS com base nos critérios da Academia Americana de Medicina do Sono. (Fonte: Benjafield *et al.*, 2019).

Os estudos de prevalência de SAOS variam de acordo com a etnia. A SAOS é mais prevalente em afro-americanos com menos de 35 anos em comparação com os brancos da mesma faixa etária, independentemente do peso corporal (Ancoli-Israel *et al.*, 1995; Redline *et al.*, 1997). Entretanto, as desigualdades na saúde do sono relacionadas à etnia são atribuídas a diferenças nos determinantes de saúde, como fatores sociodemográficos, comportamentos de saúde e biologia. Afro-americanos e hispano-americanos são populações mistas cuja herança genética combina duas ou mais populações ancestrais originárias de continentes diferentes. Portanto, é preciso entender a SAOS como uma síndrome de etiologia complexa que não se restringe apenas à disfunção muscular das vias aéreas, mas que surge como consequência de uma série de patologias e fatores de risco inter-relacionados. A inclusão de abordagens genéticas em estudos de populações mistas permite uma maior compreensão da base biológica potencial na saúde do sono relacionadas à etnia (Prasad *et al.*, 2018).

### 1.3 Diagnóstico de SAOS

A Avaliação diagnóstica de SAOS depende de sinais e sintomas comuns nesse distúrbio, como o ronco, a sonolência excessiva e pausas respiratórias durante o sono. Prejuízos das funções cognitivas, tais como concentração, atenção, memória, e da função executiva são frequentemente observados. Alterações de humor, como irritabilidade, depressão e ansiedade, também podem ser encontradas (American Academy of Sleep Medicine, 2014; Jordan *et al.*, 2014). O diagnóstico da SAOS não é apenas clínico, são também necessários testes objetivos para sua confirmação. Assim sendo, diante de determinados critérios clínicos, são selecionados pacientes para que sejam testados objetivamente através da polissonografia (PSG) em laboratório do sono e a confirmação diagnóstica seja realizada (Myers *et al.*, 2013).

São candidatos a serem testados laboratorialmente pacientes com sonolência diurna excessiva na maioria dos dias e que apresentem pelo menos duas das seguintes características clínicas da SAOS: ronco alto e habitual, apneia testemunhada ou respiração ofegante ou engasgo durante o sono, e diagnóstico de hipertensão arterial sistêmica (Kapur *et al.*, 2017).

A polissonografia é o teste diagnóstico padrão-ouro para os distúrbios respiratórios do sono (ASDA, 1997; Kushida *et al.*, 2005; Fleetham *et al.*, 2011). Um registro completo de PSG deve monitorar os seguintes sinais fisiológicos: eletroencefalograma, eletro-oculograma, eletromiograma do queixo, fluxo aéreo com sensor de pressão e termistor oronasal, esforço respiratório, saturação da oxihemoglobina e eletrocardiograma ou frequência cardíaca. Parâmetros adicionais, como sensor de posição corporal e eletromiograma tibial anterior, podem auxiliar (Epstein *et al.*, 2009).

Uma opção de ferramenta diagnóstica que pode ser utilizada em substituição à polissonografia em laboratório são os registros polissonográficos com os dispositivos de monitorização ambulatoriais/domiciliares (HSAT – *Home Sleep Apnea Test*) (Figura 2). Com a evolução tecnológica, o emprego de diferentes métodos para a obtenção dos registros domiciliares do sono foram sendo criados e têm apresentado acurácia semelhante à PSG para o diagnóstico de SAOS (Haddad e Bittencourt, 2013).

Em caso de PSG, o diagnóstico de SAOS é confirmado se um dos dois critérios numerados abaixo estiver presente (American Academy of Sleep Medicine, 2014):

1. Existem cinco ou mais eventos respiratórios predominantemente obstrutivos (apneias obstrutivas e mistas, hipopneias ou esforço respiratório relacionado a despertar (RERA)) por hora de sono com um ou mais dos seguintes:



- Sintomas de sonolência, sono não restaurador, fadiga ou insônia.
- Acordar prendendo a respiração, sufocado ou engasgado.
- Ronco habitual, interrupções respiratórias observadas.
- Hipertensão, transtorno do humor, disfunção cognitiva, doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca congestiva, fibrilação atrial ou Diabetes Mellitus tipo 2.

2. Existem 15 ou mais eventos respiratórios predominantemente obstrutivos por hora de sono, independentemente da presença de sintomas associados.

Os dados de PSG podem gerar dois índices como medidas quantitativas de eventos obstrutivos relacionados ao sono por hora de sono:

- O índice de apneia-hipopneia (IAH = [apneias + hipopneias] / tempo total de sono em horas).
- O índice de distúrbio respiratório (IDR = [apneias + hipopneias + RERA]) / tempo total de sono em horas (Epstein *et al.*, 2009).

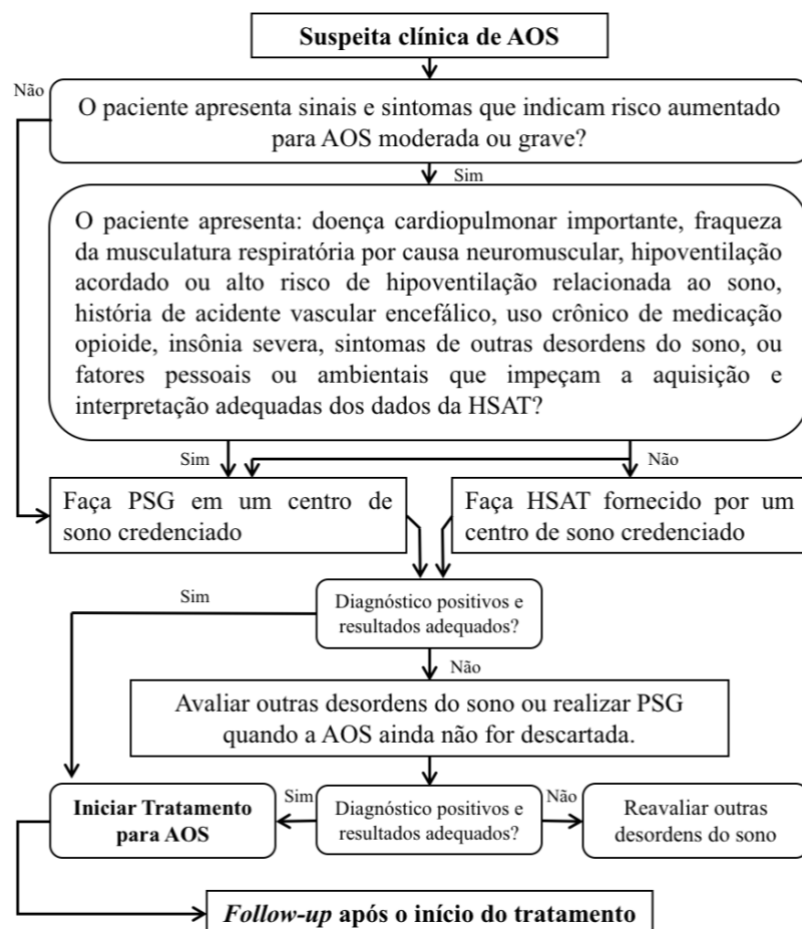
A maioria dos dispositivos HSAT não inclui monitoramento de eletroencefalograma (EEG) e, portanto, RERAs e hipopneias caracterizadas por despertares não podem ser identificados com segurança. Assim, o número de eventos respiratórios por hora de tempo de registro, em vez do tempo total de sono, é usado para gerar o índice de eventos respiratórios (IER). Em dispositivos HSAT validados, o IER se correlaciona bem com IAH e IDR, mas é normalmente menor, pois o denominador (ou seja, o tempo total de registro) é maior do que o tempo total de sono usado para calcular o IAH e IDR. Além disso, os resultados em pacientes de alto risco devidamente selecionados e testados pelo HSAT são semelhantes aos dos pacientes submetidos a estudos em laboratório. As evidências mostram que a duração do tempo de gravação usados para gerar o IER com HSAT deve ser de pelo menos quatro horas (Wittine *et al.*, 2014).

Os pacientes que atendem aos critérios para o diagnóstico de SAOS são tradicionalmente classificados como portadores de doença leve, moderada ou grave com base no IAH e nos sintomas (Epstein *et al.*, 2009):

- **Leve** – IAH entre 5 e 14 eventos respiratórios por hora de sono. Esses pacientes podem ser relativamente assintomáticos ou relatar sonolência diurna em situações monótonas, tornando-se perceptível quando o paciente não está estimulado. A sonolência diurna muitas vezes não prejudica a vida diária, embora possa ser reconhecida por familiares.

- **Moderado** – IAH entre 15 e 30 eventos respiratórios por hora de sono. Esses pacientes geralmente estão cientes da sonolência diurna e tomam medidas para evitar adormecer em horários inadequados. Eles são capazes de continuar suas atividades diárias, mas em níveis reduzidos, e podem ter um aumento na incidência de infrações ou acidentes com veículos automotores. A hipertensão sistêmica pode coexistir. A fragmentação do sono é observada na SAOS moderada, mas a arquitetura do sono é mais bem preservada do que na manifestação grave.
- **Grave** – IAH superior a 30 eventos respiratórios por hora de sono. Presença de sonolência diurna que interfere nas atividades diárias normais. Eles tendem a adormecer frequentemente durante o dia (na postura sentada) e correm o risco de lesões acidentais devido à sonolência. Pacientes com SAOS grave apresentam risco aumentado de mortalidade por todas as causas e de uma variedade de morbidades cardiovasculares, incluindo hipertensão, doença arterial coronariana e arritmias.

**Figura 2** – Algoritmo para diagnóstico de SAOS.



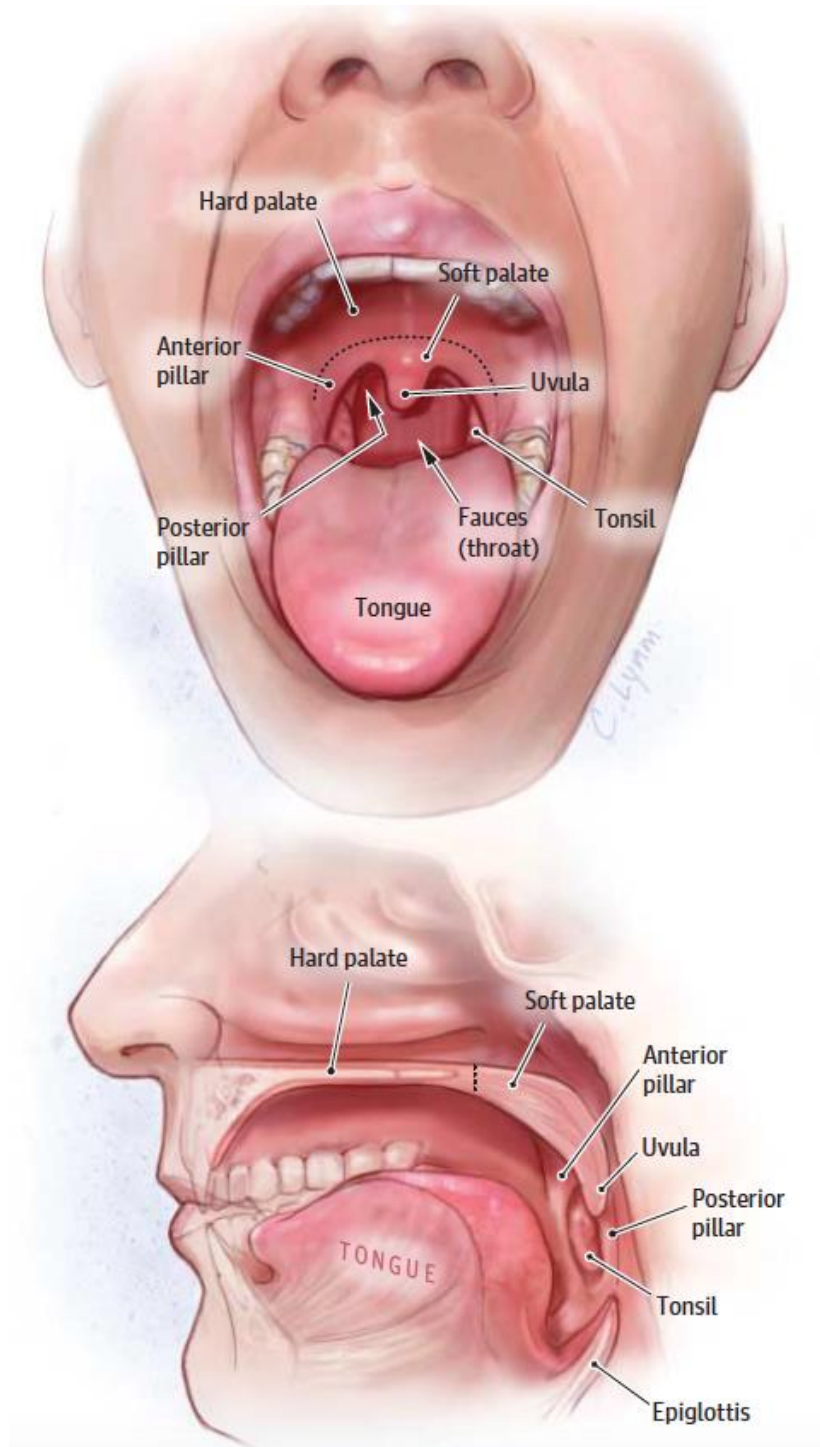
(Fonte: adaptado de Kapur *et al.*, 2017).

#### **1.4 Fisiopatologia da SAOS**

Os pacientes com apneia obstrutiva do sono, em geral, não apresentam problemas com a respiração ou com a permeabilidade das vias aéreas enquanto acordados, ou seja, possuem sistemas de controle ventilatório capazes de regular com precisão a ventilação alveolar e a gasometria arterial com pequenas variações ao longo das horas de vigília. Entretanto, esse controle ventilatório é perdido no início do sono. Em uma faringe colapsável e anatomicamente comprometida, as vias aéreas superiores se estreitam durante o sono. No entanto, a tendência de resultar em apneias cíclicas repetidas é o produto de vários processos compensatórios que variam acentuadamente entre os indivíduos e dentro deles (Dempsey *et al.*, 2010).

A fisiopatologia da SAOS envolve determinantes estruturais e funcionais da predisposição anatômica para o fechamento das vias aéreas. Dentre eles estão o sono e os efeitos do estado de sono nos mecanismos subjacentes à apneia obstrutiva e central, a instabilidade ventilatória, mecanismos subjacentes ao controle neuroquímico central da estabilidade respiratória e ao controle neuromuscular compensatório do calibre das vias aéreas. Todos estes fatores explicam a natureza cíclica e repetitiva da SAOS (Dempsey *et al.*, 2010), sendo seu determinante chave a anatomia prejudicada das vias aéreas superiores, especialmente orofaringe (Figura 3).

**Figura 3** – Anatomia da orofaringe.



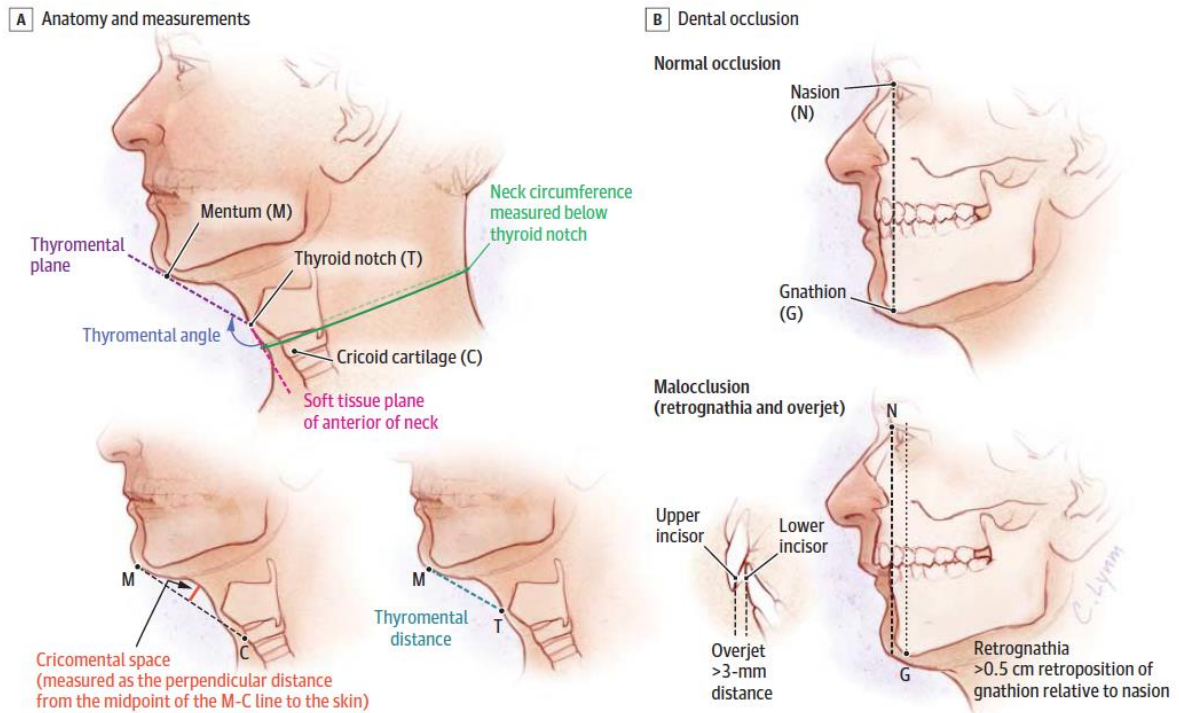
O volume do tecido mole nessa região pode determinar o calibre das vias aéreas. Tonsilas, língua e úvula aumentadas podem associar-se com SAOS. A classificação de *Mallampatti* é estabelecida a partir da relação dessas estruturas entre si e pontuais mais altas na classificação se associam a SAOS. (Fonte: Meyers *et al.*, 2013).

A faringe humana não possui suporte rígido, exceto em suas extremidades superior e inferior, portanto, a área da secção transversal da faringe varia com a pressão do lúmen e depende criticamente das ações e interações coordenadas de mais de 20 músculos esqueléticos que dilatam e abrem a orofaringe. O aumento das estruturas dos tecidos moles dentro e ao redor das vias aéreas contribui significativamente para o estreitamento das vias aéreas faríngeas na maioria dos casos de SAOS. Um palato mole e língua aumentados invadem o diâmetro das vias aéreas no plano anterior-posterior, enquanto as paredes da faringe espessadas invadem o plano lateral (Dempsey *et al.*, 2010).

A região retropalatal da orofaringe é o local mais comum de colapso, mas o estreitamento das vias aéreas é um processo dinâmico e frequentemente inclui as áreas retroglossal e hipofaríngea (Dempsey *et al.*, 2010). O fechamento das vias aéreas em indivíduos obesos com SAOS ocorre principalmente na velofaringe, enquanto em pacientes não obesos com SAOS com mandíbula rebaixada, o fechamento ocorre tanto na velofaringe quanto na orofaringe (Watanabe *et al.*, 2002).

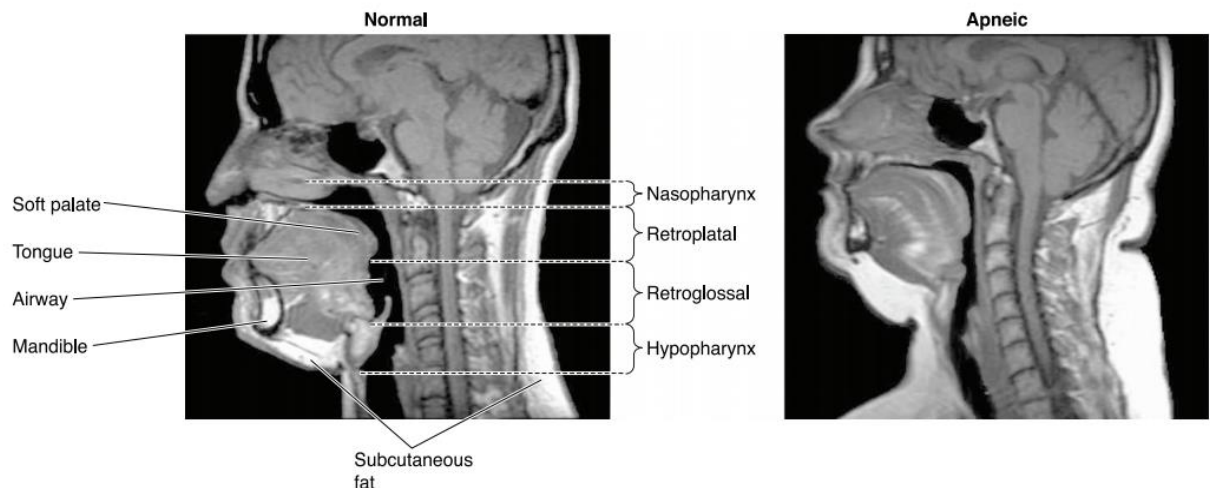
Além dos tecidos moles da orofaringe, a estrutura craniofacial também deve ser observada, pois determinadas alterações apresentam correlação com a SAOS (Figura 4) (Meyers *et al.*, 2013). O tamanho reduzido das estruturas ósseas cranianas no paciente com SAOS inclui um comprimento do corpo mandibular reduzido, osso hioide posicionado inferiormente, retrusão maxilar e comprimento das vias aéreas aumentado (Figura 5) (Schwab *et al.*, 1995). Essas dimensões craniofaciais são primariamente herdadas, uma vez que familiares de pacientes com SAOS demonstraram os mesmos perfis craniofaciais.

**Figura 4** – Estrutura craniofacial.



Algumas medidas e proporções craniofaciais devem ser avaliadas em pacientes com suspeita de SAOS por se correlacionarem com a colapsibilidade das vias aéreas superiores. Dentre elas estão o encurtamento do espaço cricomental e do ângulo e distância tireomentoniana, um ângulo tireomentoniano mais obtuso, mal oclusões associadas à retornaria e *overjet*, definido por uma distância anteroposterior superior a 3mm entre os incisivos superiores e inferiores. (Fonte: Meyers *et al.*, 2013).

**Figura 5** – Imagem de ressonância magnética sagital média.



Sujeito hígido (esquerda) e em um paciente com SAOS grave (direita). Destacam-se as quatro regiões das vias aéreas superiores (nasofaringe, região retropalatal, região retroglossal, hipofaringe) e tecidos moles das vias aéreas superiores (palato mole, língua, gordura) e estruturas craniofaciais (mandíbula). No paciente com apneia as vias aéreas superiores são menores, tanto na região retropalatal quanto na retroglossal, o palato mole é mais longo, o tamanho da língua é maior e a quantidade de gordura subcutânea é maior. (Fonte: Schwab *et al.*, 1995).

Estudos têm destacado que fatores neuromusculares também são determinantes significativos na colapsibilidade das vias aéreas durante o sono. A atividade eletromiográfica tônica e fásica dos músculos dilatadores das vias aéreas da faringe (genioglosso e tensor palatino) são progressivamente reduzidos da vigília para o sono REM (*Rapid Eye Movement*) e não-REM (Mezzanotte *et al.*, 1992; Dempsey *et al.*, 2010).

Não-REM e REM são estágios do sono que são definidos comportamentalmente e podem ser separados pela pontuação EEG / EMG (eletroencefalograma / eletromiograma). Durante o sono não-REM, o EEG mostra grandes quantidades de oscilação eletroencefalográficas nas faixas de frequência delta (0–4 Hz) e o EMG apresenta a preservação do tônus muscular. Após o sono não-REM, o EEG começa a mostrar atividade *teta* abundante que surge do hipocampo dorsal (Patel *et al.*, 2012), que é o início do sono REM. A atividade cortical durante o sono REM se assemelha à atividade de vigília, desafiando a noção de sono como um estado de atividade uniformemente baixa (Loomis *et al.*, 1937; Aserinsky, 1996). Durante o REM, o tônus muscular e os movimentos corporais estão ausentes, porque os neurônios motores somáticos são bloqueados por vias inibitórias descendentes originárias do tronco encefálico (Clément *et al.*, 2011). Além disso, o sono REM é caracterizado pela presença movimentos oculares rápidos e flutuações na frequência cardíaca e na respiração. Os indivíduos frequentemente experimentam sonhos emocionais e semelhantes a histórias durante o sono REM (Hobson, 2009).

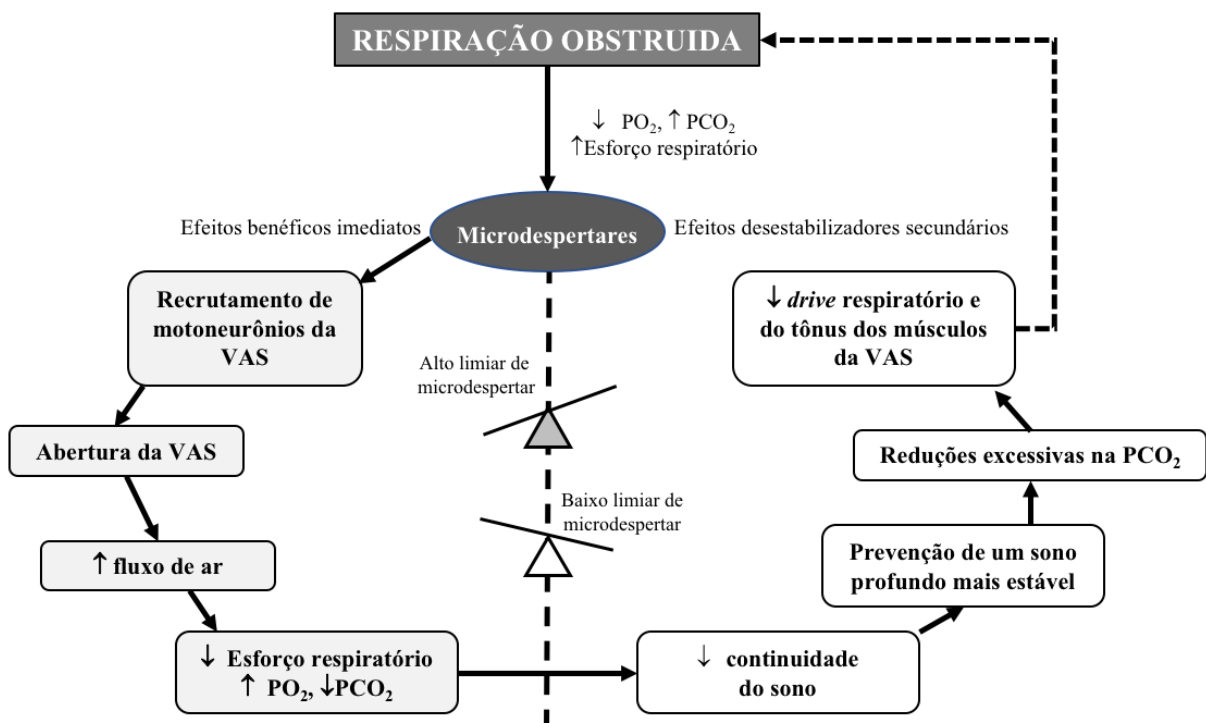
Durante o sono, o único sistema de controle respiratório que está atuando é o autônomo. Dessa forma, a respiração depende exclusivamente de fatores metabólicos e da ativação de quimiorreceptores centrais e periféricos. O aumento da PaCO<sub>2</sub> estimula o centro respiratório e aumenta a ventilação. A hipercapnia ativa os músculos dilatadores das vias aéreas e diminui sua colapsibilidade por aumentar a tensão das paredes. O sono também reduz a sensibilidade dos quimiorreceptores, desativa neurônios bulbares e diminui a atividade motora geral, ou seja, ocorre um relaxamento dos músculos incluindo os das vias aéreas. Esses fenômenos são bem tolerados por pessoas saudáveis, mas em alguns indivíduos podem predispor a distúrbios respiratórios (Martins *et al.*, 2007).

As alterações que ocorrem na ventilação são específicas de cada fase do sono. No estágio N3 a ventilação é extremamente regular, sem alteração do volume corrente e da frequência respiratória. No sono REM, a ventilação torna-se irregular, com volume corrente e frequência variáveis, há perda do tônus da musculatura em relação ao sono não-REM e em certos momentos o limiar para despertar pode estar elevado. Dessa forma, o sono REM é o

momento de maior risco para os pacientes com apneia do sono, com eventos graves e longos. As apneias e hipopneias ocorrem com frequência máxima durante o sono REM e nos estágios 1 e 2 do sono não-REM. Ocasionalmente a apneia pode ser mais frequente no sono não REM do que no sono REM, mas ainda assim as que ocorrem no REM são as mais graves e duradouras (Martins *et al.*, 2007).

Os despertares corticais do sono ocorrem com frequência nos distúrbios respiratórios do sono (Younes, 2004). As mudanças fisiológicas imediatas que ocorrem com a excitação cortical são benéficas no alívio rápido de eventos respiratórios graves e suas consequências. Por outro lado, as mudanças fisiológicas secundárias que ocorrem após a excitação são susceptíveis de serem deletérias e perpetuar uma maior instabilidade respiratória (Figura 6). O equilíbrio relativo entre essas influências e seu papel na patogênese da SAOS provavelmente varia entre os pacientes de acordo com as diferenças na fisiopatologia individual da SAOS (Eckert e Younes, 2014).

**Figura 6** – Mudanças fisiológicas potencialmente benéficas *versus* desestabilizadoras associadas a excitações induzidas por respiração na apneia obstrutiva do sono.



VAS – Via Aérea Superior. (Fonte: adaptado de Eckert e Younes, 2014).



Sendo assim, além do grau de comprometimento anatômico, como uma via aérea superior estreita ou altamente colapsável, técnicas de endotipagem respiratória têm sido usadas para identificar três contribuintes não anatômicos para SAOS. Estes incluem controle respiratório instável, capacidade de resposta inadequada dos músculos dilatadores das vias aéreas superiores ao estreitamento da faringe durante o sono, e uma alta propensão para despertar a níveis relativamente menores de estímulos respiratórios (baixo limiar de despertar respiratório) (Eckert, 2018). Aproximadamente 70% dos portadores de SAOS apresentam comprometimento de um ou mais fatores não anatômicos que contribuem para a síndrome (Eckert *et al.*, 2013).

### **1.5 Tratamento de SAOS**

Os objetivos da terapia para SAOS são resolver os sinais e sintomas da síndrome, melhorar a qualidade do sono, normalizar o índice de apneia-hipopneia e os níveis de saturação da oxihemoglobina. A SAOS deve ser abordada como uma doença crônica que requer tratamento multidisciplinar de longo prazo. Os benefícios potenciais do tratamento bem-sucedido da SAOS incluem melhora clínica, redução da utilização e dos custos com cuidados de saúde e, possivelmente, diminuição da morbidade e mortalidade cardiovascular (Epstein *et al.*, 2009).

Medidas comportamentais, como evitar ingestão de bebidas alcoólicas e sedativos, cessar tabagismo e evitar privação de sono, são sugeridas como terapias complementares no tratamento da SAOS. A perda de peso é recomendada para pacientes com sobrepeso e obesidade e o exercício físico deve fazer parte das recomendações no tratamento da SAOS devido a sua indiscutível capacidade de melhorar diversos parâmetros fundamentais de saúde. Não há, porém, evidências suficientes indicando que apenas o exercício físico seja uma terapia efetiva no tratamento da SAOS. A terapia posicional é uma opção de tratamento promissora para pacientes com SAOS limitada à posição supina, embora o método ideal e sua eficácia ainda não tenham sido adequadamente estudados (Haddad e Bittencourt, 2013).

Algumas terapias são propostas para SAOS (Tabela 1), porém, a terapia com pressão positiva contínua nas vias aéreas (CPAP) é a terapia base para adultos com SAOS. Seu mecanismo envolve a manutenção de uma pressão transmural faríngea positiva de modo que a pressão intraluminal exceda a pressão circundante. O CPAP também estabiliza as vias aéreas superiores por meio do aumento do volume pulmonar expiratório final. Como resultado, os

eventos respiratórios devido ao colapso das vias aéreas superiores são evitados (Jordan *et al.*, 2014).

Diversos ensaios clínicos randomizados e metanálises têm demonstrado a eficácia da terapia com pressão positiva nas vias aéreas na redução da frequência de eventos respiratórios durante o sono, da sonolência diurna, melhora da pressão arterial sistêmica, redução no risco de acidentes, melhora a disfunção erétil e melhora na qualidade de vida (Patel *et al.*, 2003; Giles *et al.*, 2006; McDaid *et al.*, 2009; Martínez-García *et al.*, 2015; Salord *et al.*, 2016; Martínez-Cerón *et al.*, 2016; McEvoy *et al.*, 2016; Kuhn *et al.*, 2017; Jonas *et al.*, 2017; Walia *et al.*, 2019; Navarro-Soriano *et al.*, 2021). No entanto, nenhum impacto efetivo sobre a mortalidade foi demonstrado. Além disso, apesar dos importantes efeitos comprovados da terapia através de CPAP, estima-se que 20 a 40% dos pacientes não usam seu dispositivo e muitos outros não o usam a noite toda, todas as noites (Hoffstein *et al.*, 1992), dificultando assim o tratamento.

Para pacientes com SAOS leve ou moderada que recusam ou não aderem à terapia de pressão positiva nas vias aéreas, um aparelho oral é uma alternativa ao CPAP. Isso se baseia no reconhecimento de que, embora a pressão positiva nas vias aéreas seja geralmente mais eficaz do que um aparelho oral na normalização de eventos respiratórios e episódios de dessaturação de oxihemoglobina durante o sono, a maioria dos pacientes prefere usar um aparelho oral. Há um número crescente de aparelhos orais que projetam a mandíbula para frente ou mantêm a língua em uma posição mais anterior. Dessa forma, os tecidos moles da orofaringe são mantidos longe da parede posterior da faringe, favorecendo assim a permeabilidade das vias aéreas superiores (Scherr *et al.*, 2014). Os aparelhos orais diminuem a frequência de eventos respiratórios, despertares e episódios de dessaturação da oxihemoglobina, em comparação com nenhum tratamento ou uma intervenção simulada. Eles também podem melhorar a sonolência diurna, a qualidade de vida e a função neurocognitiva (Ramar *et al.*, 2015).

O tratamento cirúrgico de SAOS não é a primeira opção terapêutica e parece ser mais eficaz em pacientes em que a SAOS ocorre devido a uma lesão obstrutiva grave, corrigível cirurgicamente, das vias aéreas superiores, incluindo hipertrofia tonsilar, hipertrofia adenoide ou anormalidades craniofaciais (Epstein *et al.*, 2009; Randerath *et al.*, 2011; Senchak *et al.*, 2015).

A estimulação do nervo hipoglossal através de um dispositivo neuroestimulador implantável é uma estratégia de tratamento que pode ter seu papel em pacientes selecionados com AOS moderada a grave, cujo tratamento com CPAP não foi eficiente (Eastwood *et al.*, 2011; Goding *et al.*, 2012).

**Tabela 1** – Opções terapêuticas para SAOS.

Métodos	Métodos Não-Invasivos				Métodos Invasivos			
	CPAP	AIO	Perda de peso	AMM	UPFP	UPFP+TE	AT	ENH
<b>Limitações</b>								
<b>Severidade da AOS</b>	Leve-grave	Leve-grave	Leve-grave	Grave	Moderada-grave	Moderada-grave	Moderada-grave	Grave
<b>Número de amostras</b>	463	425	132	29	212	31	578	584
<b>Pré (média)</b>	48,6 ± 31,8	27,5 ± 16,3	27,6 ± 24,6	36,7 ± 14 (S)	39,9 ± 18,3	33,7 ± 14,6	18,2 ± 21,4	33,8 ± 15,5
<b>Pós (média)</b>	5,7 ± 8,4	12 ± 12,5	9,9 ± 11,2	4,7 ± 3,2 (S)	21,5 ± 15,6	15,4 ± 14,1	4,1 ± 6,4	11 ± 13,6
<b>IAH &lt;5 ou redução do IAH &gt;50%</b>	59,3%	68%	27%	27,6%	44,35%	64,5%		77,1%
<b>IAH &lt;1</b>							27,2%	
<b>Follow-up</b>	7 anos	4 anos	1 ano	12,5±3,5 anos	≥34 meses	3 meses	Imediatamente	1 ano
<b>Eficiência</b>	+++++	+++	+	+++++	+++	++++	++	+++++
<b>Limitações</b>	Pobre aderência	Estrutura rígida dos dentes, <i>overjet</i> e <i>overbite</i> de longo prazo	Difícil de conseguir perder peso e manter	Procedimento altamente invasivo e complicado, os efeitos colaterais incluem má oclusão, hemorragia, dor facial, etc.	Insuficiência velofaríngea, disfagia, dificuldade de deglutição	Insuficiência velofaríngea, disfagia, dificuldade de deglutição	Sangramento pós-operatório, infecção da ferida	Alto custo, abrasão da língua, mau funcionamento do dispositivo, sensações anormais, etc.

CPAP (pressão positiva das vias aéreas), AIO (aparelho intraoral), AMM (avanço maxilo-mandibular), UPFP (uvalopalatofaringoplastia), UPFP+TE (uvalopalatofaringoplastia + tonsilectomia), AT (adenotonsilectomia), ENH (estimulação do nervo hipoglosso). (Fonte: adaptado de Xia e Sawan, 2021).

Por fim, uma variedade de agentes farmacológicos têm sido estudados como agentes terapêuticos primários para o manejo de SAOS, incluindo medicamentos que podem atuar para estimular o impulso respiratório diretamente (teofilina) ou indiretamente (acetazolamida), medicamentos que reduzem a colapsibilidade das vias aéreas superiores (desipramina), antimuscarínicos (oxibutinina) ou agentes noradrenérgicos (atomoxetina) (Taranto-Montemurro *et al.*, 2016; Eskandari *et al.*, 2018; Taranto-Montemurro *et al.*, 2019). No entanto, nenhum agente farmacológico provou ser suficientemente eficaz para garantir a substituição das terapias supracitadas (Randerath *et al.*, 2011).

## 1.6 Fatores genéticos associados ao desenvolvimento de SAOS familiar

Na molécula de DNA encontram-se os genes que codificam todas as características do organismo. Todas as informações estão armazenadas em uma sequência de bases nitrogenadas e é a partir dela que se dá a construção de uma proteína específica. Se, por algum motivo, houver uma alteração na sequência de bases nitrogenadas do DNA, também haverá alteração na sequência de aminoácidos que forma a proteína, e provavelmente nas propriedades dessa

proteína. Tal alteração, chamada de variante, pode ser suficiente para provocar o surgimento de uma característica nova no organismo (Milholland *et al.*, 2017).

Variantes somáticas, ou adquiridas, são alterações nas sequências de bases nitrogenadas que ocorrem nas células somáticas de um organismo, que são todas as células de um indivíduo com exceção das que dão origem aos óvulos e espermatozoides. Esse tipo de variante é menos importante evolutivamente, pois não será transmitida aos descendentes, mas pode representar danos significativos a sobrevivência de um indivíduo a depender da linhagem celular afetada e de sua consequência para a proliferação celular e manutenção de sua homeostase. Por sua vez, variantes da linhagem germinativa são transmitidas diretamente de um progenitor ao seu conceito e a medida que o embrião se desenvolve, a variante patogênica é copiada para todas as células do corpo (Milholland *et al.*, 2017).

Estudos indicam que existe uma predisposição hereditária para o desenvolvimento de SAOS (Pillar e Lavie, 1995; Carmelli *et al.*, 1997; Redline e Tishler, 2000, Casale *et al.*, 2009). A primeira descrição de uma família que sofria de sintomas de sonolência diurna excessiva e agitação noturna, dos quais três irmãos tinham apneias recorrentes durante o sono ocorreu em 1978 (Strohl *et al.*, 1978). A agregação familiar possivelmente ocorre porque a maioria dos fatores de risco envolvidos na fisiopatologia é geneticamente determinada (Redline e Tishler, 2000; Mukherjee *et al.*, 2018).

No entanto, à medida que se entendeu mais sobre a fisiopatologia da doença, percebeu-se que além dos fatores de risco, a anatomia craniofacial desproporcional é fator comum em grupos familiares com SAOS (Guilleminault *et al.*, 1995). Um estudo realizado na população brasileira avaliando dados antropométricos, clínicos e de PSG evidenciou herdabilidade de 25% da SAOS em uma população rural, cuja influência de covariáveis como idade, sexo e obesidade foi descartada (De Paula *et al.*, 2016).

A herdabilidade da anatomia das vias aéreas e da postura da cabeça têm mostrado relevância no aumento do risco de SAOS. Comparando-se características do esqueleto e do tecido mole de gêmeos monozigóticos e dizigóticos, o ângulo goníaco, a lordose cervical, a posição hioídea e das dimensões velofaríngea e hipofaríngea apresentam alto grau de herdabilidade. Sendo que o grau de lordose cervical ainda demonstra correlações significativas com massa corporal, tamanho e posição da mandíbula, e as dimensões das vias aéreas, especialmente com as dimensões nasofaríngeas (Kang *et al.*, 2018).

O conhecimento a respeito da herdabilidade de fatores associados a SAOS tem mudado a forma de se analisar e tratar a síndrome, permitindo uma abordagem mais personalizada

(Owens *et al.*, 2015). A ênfase atual está em identificar qual dos vários mecanismos fisiopatológicos possíveis são responsáveis pelo desenvolvimento da síndrome em indivíduos específicos com o objetivo terapêutico de direcionar o tratamento e otimizá-lo, deixando de tratar todos os pacientes de forma homogênea, como se a doença em si fosse causada por um único fator (Chang *et al.*, 2019).

Nesse sentido, fenótipos específicos que são fatores de risco (obesidade, distribuição de gordura corporal, morfologia craniofacial, controle neural dos músculos das vias aéreas) e que têm uma base genética conhecida ou suspeita, têm sido avaliados em busca da identificação dos fatores de herdabilidade que se associam à síndrome e que possam conferir o aspecto de personalização da medicina de precisão (Tabela 2) (Redline e Tishler, 2000; Mukherjee *et al.*, 2018).

**Tabela 2** – Fenótipos intermediários e genes candidatos para SAOS.

<b>Fenótipos intermediários</b>	<b>Genes Candidatos</b>
<b>Obesidade</b>	Receptor de leptina/leptina Pro-opiomelanocortina Fator de crescimento da insulina Glucocinase Adenosina desaminase Receptor de melanocortina-3 Fator de necrose tumoral Proteína reguladora da glicose Proteína Agouti e peptídeo relacionado com a proteína B-3 Receptor adrenérgico Orexina
<b>Controle ventilatório</b>	RET-proto-oncogene, receptor tirosina-quinase Fatores de crescimento neurotróficos (BDNF, GDNF) Endotelina-1 Endotelina-3 Krox-20 Receptor de ácido retinóico Receptores de leptina/leptina Orexina (?)
<b>Dismorfismos craniofaciais</b>	Genes homeobox Receptores de hormônio do crescimento Receptores do fator de crescimento Receptor de ácido retinóico Endotelina-1 Colágeno tipo I e II Fator de necrose tumoral
<b>Regulação do sono</b>	Orexina Leptina

(Fonte: adaptado de Redline e Tishler, 2000).

### 1.7 Exoma (WES), Estudos de Associação Ampla do Genoma (GWAS) e SAOS

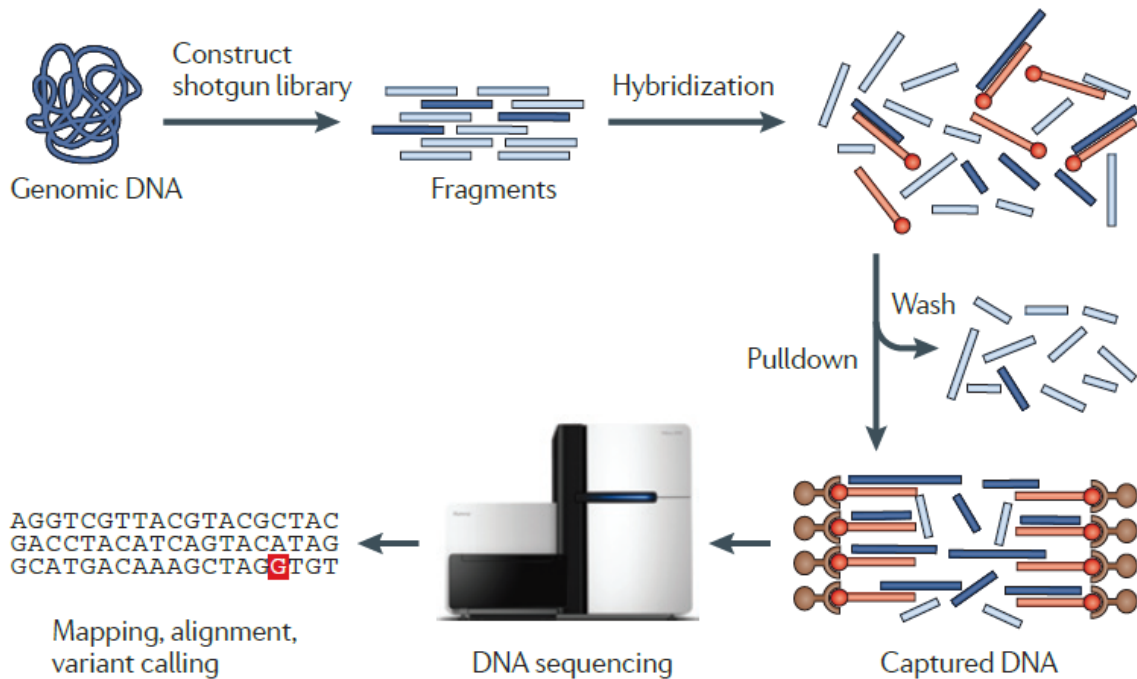
O sequenciamento do exoma total (*Whole Exome Sequencing – WES*) para a identificação de variantes que levam às doenças mendelianas tem sido extensamente utilizado. No entanto, apenas recentemente essa tecnologia começou a ser aplicada à SAOS (Xia *et al.*, 2014).

WES é uma técnica de sequenciamento que implementa um enriquecimento baseado em captura de regiões codificadoras de proteínas do DNA genômico (éxons), usando um conjunto de sondas de hibridização de oligonucleotídeos que visam sequências de éxons conhecidas. A aplicação mais comum do WES é a detecção de variantes de um único nucleotídeo (*Single-Nucleotide Variants - SNVs*) ou pequenas inserções e deleções (*Indels*). Existem algumas limitações deste método, que vão além dos tecnicismos, pois o conhecimento científico da função e os correlatos clínicos de todos os éxons verdadeiramente codificadores de proteínas no genoma ainda estão incompletos (Bamshad *et al.*, 2011).

O WES gera centenas de milhões de leituras de sequências curtas com comprimento médio de 50bp a 125bp. O sequenciamento de fragmentos tem taxas de erro de sequenciamento mais altas do que o sequenciamento de Sanger; assim, uma validação adicional usando o sequenciamento de Sanger é essencial. Em média, o sequenciamento do exoma identifica cerca de 24.000 variantes de nucleotídeo único em amostras afro-americanas e quase 20.000 em amostras europeias, mas mais de 95% dessas variantes são polimorfismos conhecidos na população humana (Bamshad *et al.*, 2011).

A técnica consiste em uma série de etapas: fragmentação do DNA genômico, hibridização de áreas genômicas de interesse por sondas específicas, captura de sondas hibridizadas, amplificação de fragmentos de DNA, sequenciamento por síntese de cada fragmento por uma plataforma (Figura 7).

**Figura 7** – Etapas de um sequenciamento de exoma.



(Fonte: Bamshad *et al.*, 2011).

Em 2017 esta técnica foi utilizada para identificar variantes em 1.475 indivíduos de ascendência europeia com sintomas de apneia do sono. Foram identificadas 17 variantes genéticas raras com evidências sugestivas de significância. A replicação em um conjunto de dados independente confirmou a associação do polimorfismo “rs” (Referência *common Single Nucleotide Polymorphism*) *rs2229918*, com sintomas de apneia do sono. A *rs2229918* se sobrepõe às regiões 3' não traduzidas dos genes *ERCC1* e *CD3EAP* no braço longo do cromossomo 19. Ambos os genes são expressos em tecidos da região do pescoço, como língua, músculos, cartilagem e traqueia (Van der Spek *et al.*, 2017).

Um estudo do tipo *GWAS*, caracterizado por métodos matemáticos que identificam associações entre regiões genômicas e traços fenotípicos, conduzido em 2018 identificou que em homens de diferentes etnias o IAH durante o sono não-REM está associado à *rs1293687*, localizada no cromossomo 17. Neste local encontra-se o gene *RAI1* abrangendo os genes *PEMT1*, *SREBF1* e *RASD1*, previamente correlacionados com doença arterial coronariana, metabolismo lipídico, a *Potocki-Lupski* e *Smith-Magenis*, síndromes associadas aos distúrbios do sono. Este trabalho sugere que os mecanismos fisiopatológicos do desenvolvimento da SAOS podem ser diferentes entre homens e mulheres e que tal condição complexa deve estar associada às bases genotípicas da doença, que deve ser mais bem esclarecida em estudos subsequentes (Chen *et al.*, 2018).

Em 2021, um novo estudo *GWAS* identificou a associação de variantes em *ARMCX3* e a dessaturação durante o sono. *MRPS33* e *C16orf90* foram associados a dessaturação durante o sono, mantendo tempo considerável de  $SpO_2 < 90\%$ . *IL18RAP*, *NRG1*, *SLC45A2*, *ATP2B4* também foram associadas a alterações na  $SpO_2$  (Cade *et al.*, 2021).

Até o presente momento não existem trabalhos utilizando a análise de exoma total que identificaram mutações específicas relacionadas à síndrome em grupos familiares. Sabe-se que a SAOS é uma síndrome prevalente, com uma carga importante de hereditariedade e que se relaciona a um evento extremamente complexo que é o sono. Sendo assim mais estudos que possam auxiliar na determinação genética dessa doença fazem-se necessários.



## 2 OBJETIVOS

### Objetivo geral:

Identificar em duas famílias brasileiras, através da análise de exoma, alterações genéticas germinativas que possam estar associadas a predisposição ou desenvolvimento de apneia obstrutiva do sono.

### Objetivos específicos

- 2.1 Realizar o sequenciamento do exoma dos integrantes de cada uma das duas famílias de pacientes diagnosticados com síndrome da apneia obstrutiva do sono;
- 2.2 Analisar nos programas *Mendel*, *MD* e *Varstation*<sup>®</sup> (*Varstation*) os dados obtidos nos sequenciamentos dos exomas para identificar e classificar as alterações genéticas candidatas particulares de cada família;
- 2.3 Analisar a patogenicidade e a prevalência das alterações genéticas candidatas a partir de *guideline* da *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)* (Richards *et al.*, 2015);
- 2.4 Realizar o sequenciamento de Sanger para validar as variantes candidatas identificadas nos pacientes;
- 2.5 Avaliar, em outros membros não afetados das famílias, a presença das alterações genéticas validadas para investigar a segregação das variantes;
- 2.6 Avaliar *in silico* o impacto da presença da variante selecionada para a estrutura e função proteica.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Seleção de pacientes**

A população do estudo compreendeu nove pacientes com histórico familiar sugestivo de SAOS de duas famílias avaliadas. Esses pacientes foram encaminhados ao Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para realização das análises moleculares após diagnóstico confirmado por polissonografia. Todos os casos foram atendidos em consultórios particulares em Belo Horizonte, Brasil. Foram selecionados cinco indivíduos na família A (três pacientes e dois indivíduos controles) e quatro família B (três pacientes e um indivíduo controle). Os indivíduos controles apresentavam IAH < 5.

O material da pesquisa consistiu em amostras de sangue periférico, informações clínicas, laboratoriais e polissonográficas obtidas de prontuários médicos e odontológicos. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Todos os pacientes e seus familiares que aceitaram participar deste estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Registro de Ética – COEP UFMG 2.980.453) – seção Apêndices.

#### **3.2 Análises moleculares**

##### ***3.2.1 Extração de DNA genômico***

O DNA genômico foi extraído a partir de leucócitos do plasma dos participantes da pesquisa pelo método de concentração salina de Lahiri e Nurnberger (1991) modificado. As amostras de sangue foram transferidas para tubos de 50mL, ao qual a solução TKM1 (Tris-HCl 10mM; KCl 10mM; MgCl<sub>2</sub> 10mM; EDTA 4mM) foi adicionada. Em seguida, 500µL de Triton X-100 foram acrescentados à solução, com a finalidade de promover a hemólise. Após agitação vigorosa da mistura foi centrifugada a 1.255rpm por 15 minutos, a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante, repleto de restos de hemácias, foi removido; e o precipitado, contendo leucócitos, foi lavado com a solução TKM1. Neste passo, foi realizada uma centrifugação a 475 rpm por 10 minutos, a 4°C. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, contendo leucócitos, mantido no tubo. Nesta etapa, 1.600µL de TKM2 (Tris-HCl 10mM; KCl 10mM; MgCl<sub>2</sub> 10mM; EDTA 33mM; NaCl 400mM) foram adicionados ao precipitado, juntamente

com 100µL SDS 10% – tendo sido este utilizado para promover a lise de leucócitos. Em seguida, o tubo foi mantido a 55°C, em banho-maria, por 20 minutos. Após o período de incubação, 900µL de NaCl (6 M) foram adicionados, com a função de promover a precipitação de proteínas. Foi realizada uma última centrifugação de 15 minutos, a 2.800rpm, a 4°C. Desta vez, o sobrenadante, contendo DNA, foi transferido para um novo tubo, com 5mL de álcool a 100%. Neste momento, houve a visualização do DNA, e este foi lavado em álcool 70%, secado e transferido para tubo contendo o tampão de eluição TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM, pH 7.0-8.0). A quantificação foi realizada utilizando-se espectrofotômetro e as diluições realizadas para a obtenção de uma concentração final em torno de 60ng/µL. As amostras permaneceram armazenadas a -20°C durante todo o período da pesquisa.

### 3.2.2 Sequenciamento de exoma – WES

Amostras de DNA de cinco indivíduos portadores de síndrome da apneia obstrutiva do sono foram coletadas para o sequenciamento por exoma (II.4, III.2 – da família A; I.1, II.1, II.3 – da família B) (Figuras 8 e 9 – seções 4.1.1 e 4.1.2). Um total de três indivíduos não portadores de SAOS também foram utilizados na investigação como controles familiares saudáveis em relação aos indivíduos portadores da doença (II.5, III.1 – da família A; II.2 – da família B) (Figuras 8 e 9). As amostras de DNA obtidas foram preparadas e submetidas a sequenciamento completo do exoma. O processo empregado consistiu nas seguintes etapas (Bamshad *et al.*, 2011):

- 1º) Fragmentação do DNA genômico (fragmentos de 100pb a 200pb) e ligação de adaptadores nas extremidades dos fragmentos;
- 2º) Desnaturação e amplificação dos fragmentos de DNA, formando várias cópias de fita simples de cada fragmento;
- 3º) Hibridização dos fragmentos de interesse através de sondas específicas;
- 4º) Captura das sondas hibridizadas com as regiões de interesse;
- 5º) Amplificação dos fragmentos de DNA de interesse, formando várias cópias de fita simples de cada fragmento;
- 6º) Sequenciamento por síntese (*sequencing by synthesis*) de cada fragmento no por meio da plataforma *Illumina*<sup>®</sup> HiSeq2000 (Hayward, CA).

Os arquivos VCF das sequências de exomas geradas no aparelho HiSeq2000 (*Illumina*<sup>®</sup>) para os indivíduos II.4, II.5, III.1, III.2 – da família A; I.1, II.1, II.2, II.3 – da família B (Figuras

8 e 9) foram analisados a partir dos programas *Mendel, MD* (<http://mendel.medicina.ufmg.br>) (Cardenas *et al.*, 2017)) e *Varstation*<sup>®</sup> (*Varstation*). Nesses programas foram realizados o alinhamento das sequências capturadas com o genoma humano de referência GRCh37 (hg19) e para as análises foi empregado o método de filtragem de variantes em sequência.

Nas análises em ambos os programas foram incluídas apenas as variantes identificadas com profundidade de leitura maior que 20.0, que estivessem em posições de boa qualidade de sequenciamento (*call quality*  $\geq 50$ ), e que apresentassem frequência alélica inferior a 1,0% nos seguintes bancos de dados: *1.000 genomes* ([www.1000genomes.org](http://www.1000genomes.org)), *Complete Genomics* (<http://www.completegenomics.com/public-data/>), e exomas do *NHLBI ESP* (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>). Além disso, por meio destas ferramentas de bioinformática, foi utilizado um filtro para selecionar apenas as variantes que estivessem presentes no DNA dos pacientes e ausentes nos exomas dos indivíduos controles. Os genes selecionados apresentaram variantes de sequências homozigóticas ou heterozigotas que ocorreram nos casos analisados, mas não ocorreram nos controles.

Cabe ressaltar que o indivíduo II.2 da família A fez parte apenas do estudo de segregação de variantes e sua amostra não foi submetida ao sequenciamento completo por exoma.

### **3.2.3 Validação dos dados encontrados no WES**

Após realizar o sequenciamento dos exomas e selecionar as variantes para validação conforme descrito acima, as alterações encontradas foram validadas usando o sequenciamento de Sanger em uma amostra de DNA independente do mesmo indivíduo. Essas variantes de genes específicos, seus *primers* flanqueadores de éxons específicos e a temperatura de anelamento desses iniciadores estão descritos na Tabela 3. A identificação dos transcritos utilizados para elaboração dos referidos *primers* encontra-se na –seção Apêndices – deste documento (Tabela 15).

As amostras de DNA extraídas do sangue periférico, dos familiares que consentiram em participar deste estudo, foram testados para as variantes das sequências selecionadas que eram aparentemente patogênicas e causadoras da doença. Após o isolamento do DNA todos os genes relevantes foram amplificados por PCR (reações de cadeia da polimerase) com *primers* específicos para cada região (Tabela 3). As PCR foram realizadas utilizando 50ng/ml de DNA, 2.5ml de Tampão IIB 10x (NaCl 40mM; Tris HCl 10mM, pH 8.4; Triton X-100 0.1%; MgCl<sub>2</sub> 1.5mM), 2.5ml de dNTPs (0.2mM), 0.5ml de cada par de *primers* (10pmol/ml) e 0.25ml de Taq

polimerase (0.625U). Os produtos foram amplificados em termociclador *Bio-Rad Mycycler Thermal Cycler*, utilizando as seguintes etapas: desnaturação a 94°C por 3 minutos, e, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos. Anelamento a 55-62°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Ao término dos ciclos, as reações passaram por uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos de PCR foram purificados usando o *PCRLink™ Quick PCR Purification Kit* (*Life Technologies*, Carlsbad, Califórnia) seguindo o protocolo do fabricante e visualizados em um gel de poliacrilamida 6,5% corado com prata. O protocolo de coloração envolveu uma etapa de fixação em ácido acético glacial 10%, lavagem em água destilada por 3 minutos; etapa de impregnação em solução de nitrato de prata (10.5g AgNO<sub>3</sub>, q.s.p 100ml H<sub>2</sub>O, formaldeído 37%, q.s.p 50ml de água destilada) lavagem em água destilada por 15 segundos e a etapa de revelação em uma solução contendo 50ml de carbonato de sódio (3g de NaCO<sub>3</sub>, q.s.p 100ml H<sub>2</sub>O 75ml de formaldeído 100% e 20ml de tiosulfato de sódio 10mg/ml).

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando *BigDye Terminator v.3.1* cycle sequencing kit, seguindo as instruções do fabricante (*Applied Biosystems*). As sequências foram obtidas no *ABI 3130 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA). Os dados de sequência bidirecional foram analisados usando o *software Sequencer 4.9*.

**Tabela 3** – Pares de *primers* desenhados para sequenciamento de Sanger e validação de resultados gerados através de exoma.

Gene	Exon	Sequência (5' - 3')	Tm °C	Tamanho (pb)
COX20	1	F, GGTGGAGTCGCGGAGTAG	61,0	126
		R, GCGGAGAACGTCCTTACCCA	61,0	
NUP214	22	F, GCACGGACGTCCTGTAAAGAT	60,0	263
		R, ACCACCATATTGGTGTGACAGTA	60,0	
GPR98	39	F, TCAGGATGATGTACCAGAGCTAGA	60,0	204
		R, AGCTAAGATTAACAAAACAGCACAA	60,0	
TLE1	16	F, ATCAGCCCCGATTCCAAGGTC	62,0	190
		R, AGAGGCTCTTATTGTGTGGGCTG	62,0	
PKD1L2	5	F, AATGTGCAATTTTGCTTCACAAGT	60,0	211
		R, TTCTCTTACCTCGGCGGGTT	60,0	
TEX9	1	F, ACCGGGATGTGGAAACTCTCG	61,0	159
		R, AGGAAGTTAGGCGTCCTAGTCG	61,0	
PTPDC1	5	F, CTCAGTGTAGATCTGTGTACTTTTC	58,0	217
		R, AGCCCTGCATGACAATGGAT	58,0	
TMOD4	9	F, GTGTCCCTCTATTGTCCGCT	60,0	182
		R, GGCTGTTAGTCATTAGGTCTGCT	60,0	

F, sequência *forward*; R, sequência *reverse*; Tm: Temperatura de anelamento; pb: pares de base.

### 3.3 Análises *in silico*

#### 3.3.1 Seleção de genes e variantes através do programa Mendel, MD

Usando o programa *Mendel, MD* foram realizadas duas análises (Tabela 4):

- Análise 1: para avaliação do exoma dos pacientes da família A: avaliação de variantes existentes nos mesmos genes em todos os indivíduos afetados (II.4, III.2), excluindo-se as variantes presentes no indivíduo não afetado (II.5, III.1).

- Análise 2: para avaliação do exoma dos pacientes da família B: avaliação de variantes existentes nos mesmos genes em todos os indivíduos afetados (I.1, II.1, II.3), excluindo-se as variantes presentes nos indivíduos não afetados (II.2).

Os filtros utilizados no programa *Mendel, MD* permitiram a detecção de variantes que seguissem os seguintes critérios: estivessem presentes em exons, estivessem associadas a ganho ou perda de função, fossem homozigotas ou heterozigotas, correspondessem a mutações do tipo sem sentido, de sentido trocado, *frameshift* ou *indels*, e fossem identificadas como possivelmente ou provavelmente patogênicas.

**Tabela 4** – Etapas de filtragem na análise do exoma através do programa *Mendel, MD*.

Programa	<i>Mendel, MD</i>	
	Análise 1 Família A	Análise 2 Família B
1º Filtro	Seleção de variantes com <i>read depth</i> $\geq 20$ e <i>call quality</i> $\geq 50$ ;	
2º Filtro	Seleção de variantes que são observadas com frequência alélica menor que 1% no <i>1000 Genome Project</i> , e no <i>dbSNP (Single Nucleotide Polymorphism Database)</i> ; e apresentem escore entre 0 a 0,05 no <i>SIFT</i> , 0,95 a 1,0 no <i>Polyphen</i> , 15 a 40 no <i>CADD</i> ;	
3º Filtro	Seleção das variantes em <i>frameshift</i> , <i>indel</i> , sem sentido ou sentido trocado;	
4º Filtro	Seleção das variantes em homozigose ou heterozigose;	
5º Filtro	Seleção das variantes que geram impacto grande ou moderado.	

### 3.3.2 Filtragem de variantes através do programa *Varstation*<sup>®</sup> (*Varstation*)

Após a análise realizada no programa *Mendel, MD*, os arquivos na extensão “.vcf” foram adicionados à plataforma de dados do programa *Varstation*<sup>®</sup> (*Varstation*, <https://varstation.com/>) com o intuito de confirmar os mesmos achados do programa supracitado também nesta plataforma. As informações a respeito da frequência da variante em bancos de dados, critério em *ClinVar* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), características descritas no *OMIM* (<https://www.omim.org/>), seus efeitos descritos em publicações disponíveis no *PUBMED* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) e resultados em programas preditores de patogenicidade da variante na estrutura da proteína, disponibilizados nos filtros do *Varstation*<sup>®</sup>, foram utilizadas para classificar as variantes.

### ***3.3.3 Estudo e classificação das variantes***

As variantes selecionadas em cada uma das famílias A e B a partir das análises dos programas *Mendel*, *MD* e *Varstation*® (*Varstation*) foram estudadas conforme os critérios e diretrizes da *American College of Medical Genetics and Genomics – ACMG*, os quais encontram-se descritos no trabalho de Richards *et al.* (2015) e utilizando a interface do *VarSome* (<https://varsome.com>). Esse método é uma sequência de etapas com informações que devem ser levantadas para cada tipo de variante após extensa revisão da literatura e bancos de dados. Como exemplo tem-se o efeito na proteína, a frequência e tipos de variantes nos genes, a posição no transcrito e a presença e segregação na família. Esses critérios são avaliados em conjunto e a probabilidade de a variante em questão ser patogênica é determinada pela combinação de tais algoritmos.

Ao final, é gerada uma classificação de variantes sendo uma das cinco categorias a seguir: “patogênica”, “provavelmente patogênica”, “significado incerto”, “provavelmente benigno” ou “benigno” com mais de 90% de certeza de uma variante ser causadora de doença ou benigna. A lista de variantes em genes que não puderam ser excluídas por nenhuma das etapas acima e foram classificadas como “patogênicas”, “provavelmente patogênicas” ou “significado incerto” pelo critério da *ACMG* foram então selecionadas para posterior validação pelo sequenciamento de Sanger (Tabelas 9 e 11, seções 4.3.1 e 4.3.2).

### ***3.3.4 Modelos proteicos e impactos estruturais nas proteínas***

Com a finalidade de avaliar o impacto estrutural das variantes selecionadas pelo estudo, foram obtidos modelos das proteínas não modificadas através das sequências proteicas disponíveis no banco de dados *UniProt* (<https://www.uniprot.org/blast/>). Utilizando-se os programas *Swiss-Model* (<https://swissmodel.expasy.org>) e *RaptorX* (<http://raptorx.uchicago.edu>) foram construídas imagens bidimensionais das proteínas não modificadas e modificadas para cada uma das variantes selecionadas. A base de dados do *Mutation Taster* (<https://www.mutationtaster.org>) foi utilizada para prever os impactos das variantes na estrutura das proteínas.



## 4 RESULTADOS

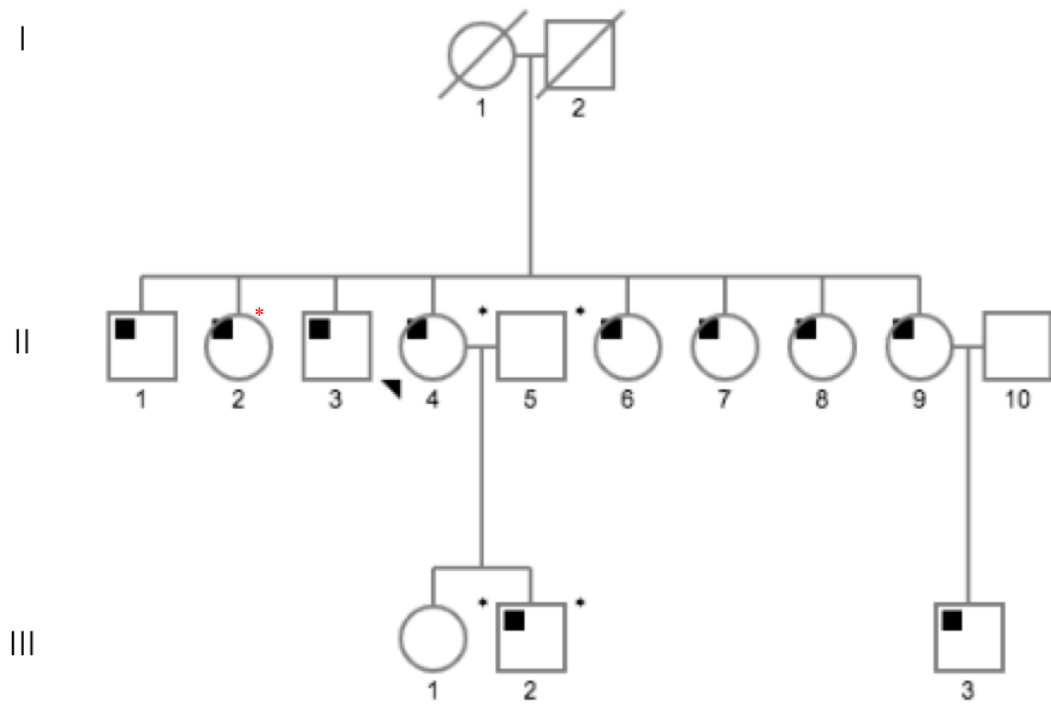
### 4.1 População de Estudo

#### 4.1.1 Família A

O probando, indivíduo II.4 da família A (Figura 8), foi diagnosticado com síndrome de apneia obstrutiva do sono aos 55 anos de idade. A história familiar desse paciente para SAOS inclui relato de ronco alto no pai, já falecido, com paradas respiratórias testemunhadas e presença de SAOS diagnosticada por polissonografia em sete irmãos. Todos os participantes dessa família foram avaliados para presença de SAOS por meio de polissonografia em laboratório do sono, sendo que aqueles que apresentaram um índice de apneia/hipopneia (IAH) >5 eventos/hora de sono foram diagnosticados como portadores da SAOS. O filho do probando, o caso III.2 (Figura 8), que hoje está com 39 anos de idade, apresenta SAOS diagnosticada e encontra-se em tratamento. Assim, com relação a família A, no presente estudo foram analisados os exames dos indivíduos afetados II.4 e III.2 e dos indivíduos controles II.5 e III.1 (Figura 8).

Na tabela 5 são apresentados os dados clínicos dos indivíduos II.2, II.4, II.5, III.1 e III.2 da família A. Na família A, os sintomas de ronco e sonolência estavam presentes tanto nos casos quanto nos controles. Os indivíduos selecionados não apresentaram nenhum problema de saúde geral que pudesse ser associado a SAOS, como obesidade, hipertensão, diabetes, refluxo, alterações tireoidianas, diminuição da libido, problema pulmonar ou cardíaco. Ao exame clínico, todos apresentam língua aumentada, palato ogival e classificação de Mallampati IV, mas variavam a classificação de má oclusão de Angle.

**Figura 8** – Genealogia da família A portadora de SAOS.



Quadrados negros representam indivíduos afetados; autoformas em branco indicam indivíduos não afetados; \* indivíduos submetidos à análise de exoma; \* indivíduo que participou apenas do estudo de segregação; seta indica o probando.

**Tabela 5** – Dados clínico-laboratoriais dos indivíduos estudados na família A.

Paciente	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Idade (anos)	IAH (ev./h)	Sat. Mín. (%)	Sat. Méd. (%)	Tempo abaixo de 90%	Índice Dessat. (%)	Índice Desp. /h	CPK	Miogl.	Ronco	Resp. Nasal	Palato	Mallampati	Má Oclusão (Classe)
II.2	22,6	73	19,8	79,0	85,0	6,8	13,1	18,6	46,0	13,5	Presente	Satisf.	Ogival	IV	I
II.4	25,1	71	13,2	82,0	88,0	6,5	16,9	22,9	78,0	18,0	Presente	Satisf.	Ogival	IV	II
II.5	22,2	70	4,6	92,0	96,0	0,0	4,3	3,2	N.D	N.D	Presente	Satisf.	Ogival	IV	I
III.1	20,7	41	0,4	91,0	96,0	0,0	0,4	0,8	33,0	2,8	Presente	Satisf.	Ogival	IV	III
III.2	25,5	39	22,9	80,0	86,0	7,0	18,2	0,0	N.D	N.D	Presente	Satisf.	Ogival	IV	I

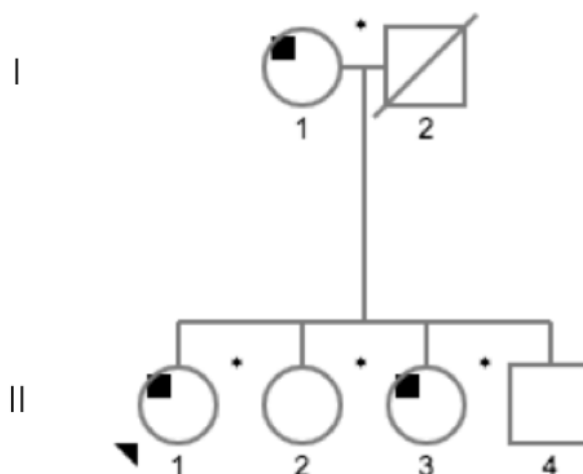
IMC = Índice de Massa Corporal; IAH = Índice de Apneia - Hipopneia (eventos/hora); Sat. Mín. = Saturação Mínima %; Sat. Méd. = Saturação Média %; Índice Dessat. = índice de Dessaturação %; Índice Desp./h = Índice de Despertar / hora; CPK = creatinofosfoquinase sérica (VR: Mulher: 26-140U/L; Homem: 38-174U/L); Miogl. = mioglobina sérica (VR: <90mcg/L); Resp.Nasal = Respiração Nasal Satisfatória; N.D = não disponível; linhas sombreadas indicam indivíduos afetados.

#### 4.1.2 Família B

O probando, indivíduo II.1 da família B (Figura 9), foi diagnosticado com SAOS aos 59 anos de idade. Sua irmã (caso II.3) e sua mãe (caso I.1) também foram diagnosticadas com SAOS e encaminhadas para tratamento. Com relação a família B, no presente estudo foram analisados os casos I.1, II.1 e II.3 e o controle II.2 (Figura 9).

Os dados clínico-laboratoriais de tais indivíduos estão apresentados na Tabela 6. Na família B, ronco estava presente em todos os casos, mas não no controle. Sonolência e fadiga eram queixas importantes nos casos I.1, II.1 e II.3, mas não no controle II.2. Em relação a morbididades relacionadas à SAOS, como hipertensão, diabetes, refluxo, alteração na tireoide, diminuição da libido, problema pulmonar ou cardíaco, somente o caso II.3 apresentava hipotireoidismo. Dificuldade de respirar bem pelo nariz estava ausente em todos da família B. O IMC estava aumentado em três membros da família B, o probando II.1 e a mãe I.1 estavam com sobrepeso e o caso II.3 estava com grau I de obesidade. De forma interessante, o controle que tinha um IMC classificado como obesidade grau II não apresentava SAOS. Ao exame clínico, todos tinham língua aumentada, palato ogival e Mallampati IV, mas variavam a classificação de má oclusão de Angle.

**Figura 9** – Genealogia da família B portadora de SAOS.



Quadrados negros representam indivíduos afetados; autoformas em branco indicam indivíduos não afetados; \* indivíduos submetidos à análise de exoma; seta indica o probando.

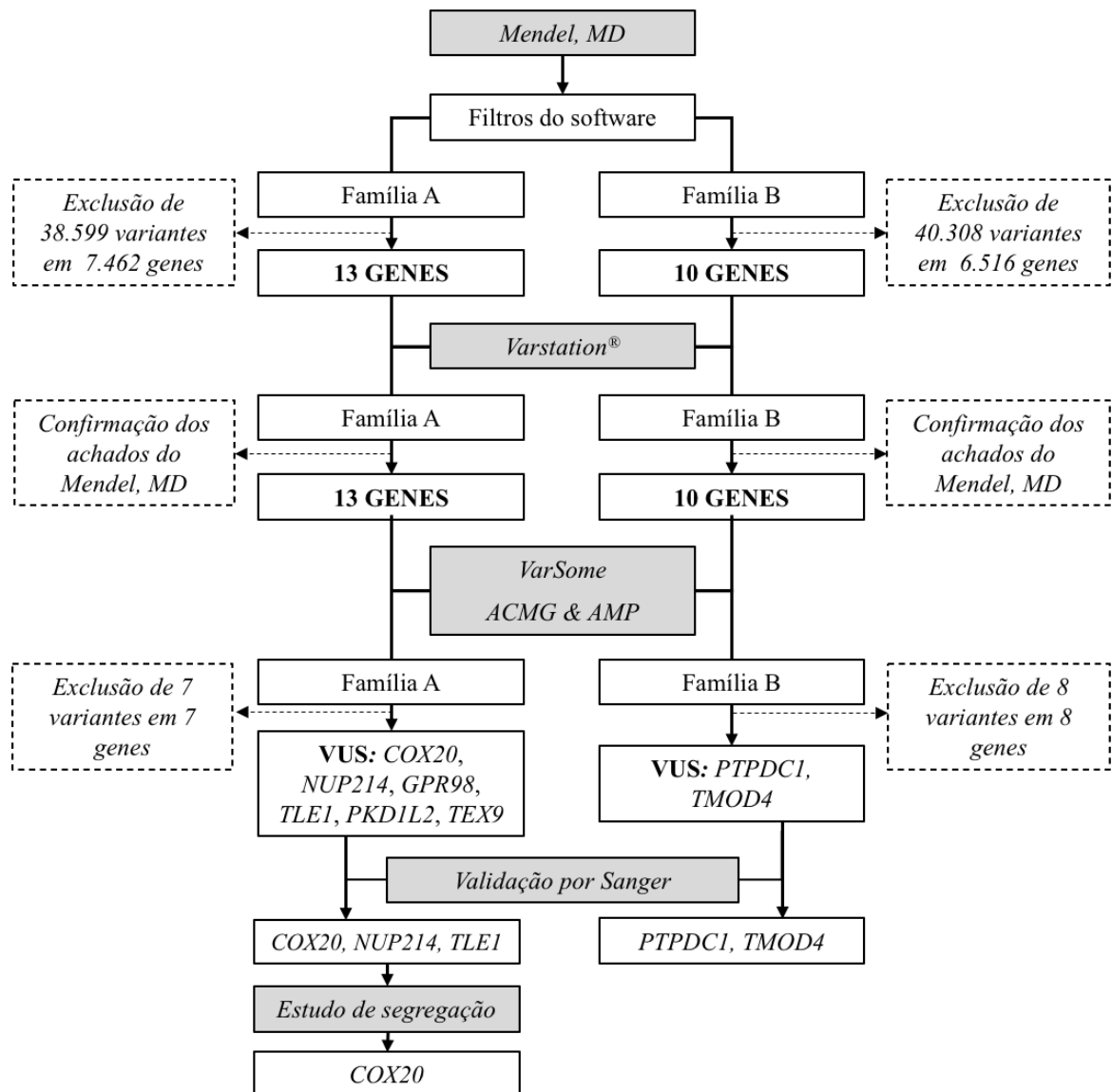
**Tabela 6** – Dados clínico-laboratoriais dos indivíduos estudados na família B.

Paciente	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Idade (anos)	IAH (ev./h)	Sat. Mín. (%)	Sat. Méd. (%)	Tempo abaixo de 90%	Índice Dessat. (%)	Índice Desp. /h	CPK	Miogl.	Ronco	Resp. Nasal	Palato	Mallampati	Má Oclusão (Classe)
I.1	29,6	86	17,1	88	92	5,8	11,7	24,2	61,3	8,0	Presente	Satisf.	Ogival	IV	I
II.1	24,5	59	9,9	87	92	4,1	9,0	14,2	57,2	12,5	Presente	Satisf.	Ogival	IV	II
II.2	35,0	57	4,8	90	95	0,1	3,1	1,8	31,5	5,0	Ausente	Satisf.	Ogival	IV	I
II.3	33,8	50	23,3	85	89	6,3	13,5	19,6	N.D	N.D	Presente	Satisf.	Ogival	IV	III
II.4	32,3	48	3,6	91	96	0,8	2,4	1,0	N.D	N.D	Ausente	Satisf.	Ogival	IV	I

IMC = Índice de Massa Corporal; IAH = Índice de Apneia - Hipopneia (eventos/hora); Sat.Mín. = Saturação Mínima %; Sat. Méd. = Saturação Média %; Índice Dessat. = índice de Dessaturação %; Índice Desp./h = Índice de Despertar / hora; CPK = creatinofosfoquinase sérica (VR: Mulher: 26-140U/L; Homem: 38-174U/L); Miogl. = mioglobina sérica (VR: <90mcg/L); Resp.Nasal = Respiração Nasal Satisfatória; N.D = não disponível; linhas sombreadas indicam indivíduos afetados.

A Figura 10 apresenta um fluxograma que sintetiza os resultados em cada uma das etapas de análise e filtragem de variantes das famílias estudadas, bem como a seleção dos genes e sua subsequente validação. Os resultados detalhados de cada etapa serão apresentados nos itens a seguir.

**Figura 10** – Fluxograma do método de análise *in silico* realizado para o *WES*.



**Família A:** Após análise *ACMG & AMP*, seis variantes *missense* classificadas como “significado incerto” foram consideradas candidatas para validação por sequenciamento de Sanger (*COX20*, *NUP214*, *GPR98*, *TLE1*, *PKD1L2*, *TEX9*). Variantes *missense* dos genes *GPR98*, *TEX9* e *PKD1L2* presentes na análise do exoma não foram validadas ou confirmadas nos dois indivíduos afetados. As variantes *missense* dos genes *NUP214* e *TLE1* foram validadas nas amostras submetidas à análise do exoma, mas não foram encontradas no indivíduo II.2 no estudo de segregação. **Família B:** Utilizando filtros de *Mendel, MD* e *Varstation®*, foram identificadas 10 variantes, todas em heterozigossidade, presentes em 10 genes. Após a análise *ACMG & AMP*, duas variantes *missense* foram validadas pelo sequenciamento de Sanger e consideradas neste estudo.

## 4.2 Análises do sequenciamento por WES

### 4.2.1 Família A - WES

A análise do WES dos quatro indivíduos genotipados da família A resultou em uma média de 81.228 variantes, presentes em 13.228 genes. A qualidade média do sequenciamento (*call quality*) foi de 728 e a profundidade média de leitura (*read depth*) foi 37. Uma média de 11.232 variantes de nucleotídeos únicos de sentido trocado (*missense*) foi encontrada nos quatro pacientes sequenciados, e o número médio de variantes sem sentido (*nonsense*) foi de 81 (Tabela 7).

**Tabela 7** – Métricas associadas às amostras dos pacientes e controles da família A submetidos ao sequenciamento por exoma.

Família	Amostra	Total de SNV	Nonsense	Missense	Média <i>call quality</i>	Média <i>read depth</i>
Família A	II.4	80967	80	11403	658	34
	II.5	80371	79	10994	703	36
	III.1	81184	80	11195	719	37
	III.2	82390	88	11336	833	44
<i>Média</i>		81228	81	11232	728	37

SNV: *Single Nucleotide Variant*.

Foram encontradas 38.612 variantes em comum entre os indivíduos afetados da família A (II.4 e III.2), localizadas em 7.462 genes. Após as etapas de filtragem especificadas nos itens 3.3.1 e 3.3.2, analisando-se apenas as variantes presentes em ambos os *softwares* (*Mendel*, *MD* e *Varstation*<sup>®</sup>), e excluindo-se aquelas comuns aos casos e controles (II.5 e III.1), um total de 13 variantes foram selecionadas, sendo todas em heterozigose, pertencentes a 13 genes (*COX20*, *NUP214*, *DNAH10*, *GPR98*, *WFDC1*, *TLE1*, *PKD1L2*, *VPS13C*, *TEX9*, *JMJD7*, *SHB*, *MRGPRX4*, *MUC6*).

#### 4.2.2 Família B - WES

Em relação à família B, a análise do *WES* dos quatro indivíduos genotipados apresentou uma média de 78.481 variantes, presentes em 9.736 genes. A qualidade média do sequenciamento (*call quality*) foi de 700 e a profundidade média de leitura (*read depth*) foi 35. Uma média de 10.797 variantes de nucleotídeos únicos de sentido trocado (*missense*) foram localizadas nos quatro pacientes sequenciados, e o número médio de variantes sem sentido (*nonsense*) foi de 69 (Tabela 8).

**Tabela 8** – Métricas associadas às amostras dos pacientes e controles da família B submetidos ao sequenciamento por exoma.

Família	Amostra	Total de SNV	<i>Nonsense</i>	<i>Missense</i>	Média <i>call quality</i>	Média <i>read depth</i>
<b>Família B</b>	I.1	77278	73	10478	716	35
	II.1	79196	68	10949	751	38
	II.2	79200	67	10945	683	34
	II.3	78250	68	10817	653	33
	<i>Média</i>	78481	69	10797	700	35

SNV: *Single Nucleotide Variant*.

Um total de 40.318 variantes em comum entre os indivíduos afetados da família B (I.1, II.1 e II.3), foram localizados em 6.526 genes. Após o uso sistemático dos filtros dos programas *Mendel*, *MD* e *Varstation*<sup>®</sup> (itens 3.3.1 e 3.3.2), e excluídas as variantes comuns aos casos e controle (II.2), foram identificadas 10 variantes, todas em heterozigose, pertencentes a 10 genes (*NLRP6*, *SLC22A18*, *ZNF433*, *POTEC*, *PIF1*, *PTPDC1*, *ZFPM2*, *ZBTB24*, *LARS1*, *TMOD4*).



### 4.3 Estudo e classificação das variantes

A avaliação das amostras das famílias portadoras de SAOS através de exoma realizada no presente trabalho apresentou 23 genes – 13 deles referentes à família A e 10 referentes à família B – com potencial de estarem envolvidos na fisiopatologia da síndrome. No entanto, vale ressaltar que nenhum dos genes selecionados é compartilhado entre as famílias avaliadas.

Após a identificação das variantes nos genes supracitados, foi realizado o estudo e classificação das variantes, conforme os critérios e diretrizes da *American College of Medical Genetics and Genomics ACMG*, utilizando a interface do *VarSome* (item 3.3.3).

#### 4.3.1 Família A – ACMG / VarSome

Em relação a família A, após análise, foram encontradas cinco variantes “provavelmente benignas” e duas “benignas”. Seis variantes *missense* classificadas como sendo de “significado incerto” foram selecionadas como candidatas à validação por sequenciamento de Sanger (Tabela 9). A descrição detalhada das informações, obtidas através da análise no *VarSome* (<https://varsome.com>), revisão bibliográfica na literatura no *PUBMED* (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), no *ClinVar* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) e no *OMIM* (<https://www.omim.org>), encontra-se na Tabela 10.

**Tabela 9** – Variantes observadas em todos os indivíduos portadores de SAOS e ausentes nos controles da família A.

Chr	Gene	Posição	rs	c.DNA	Proteína	Classificação ACMG (VarSome)
1	<i>COX20</i>	244999041	<i>rs946982087</i>	c.25G>A	p.Glu9Lys	Significado incerto
9	<i>NUP214</i>	134049657	<i>rs902499481</i>	c.3112A>G	p.Lys1037Glu	Significado incerto
12	<i>DNAH10</i>	124333367	<i>rs75173589</i>	c.5686G>A	p.Val1896Met	Provavelmente benigna
5	<i>GPR98</i>	90004717	<i>rs202211640</i>	c.8815C>A	p.Pro2939Thr	Significado incerto
16	<i>WFDC1</i>	84353166	<i>rs145072849</i>	c.551G>A	p.Arg184His	Provavelmente benigna
9	<i>TLE1</i>	84205726	<i>rs1333105043</i>	c.1823T>C	p.Leu608Pro	Significado incerto
16	<i>PKD1L2</i>	81241175	<i>rs79139155</i>	c.826C>T	p.Leu276Phe	Significado incerto
15	<i>VPS13C</i>	62160874	<i>rs77673743</i>	c.10847G>A	p.Gly3616Asp	Benigna
15	<i>TEX9</i>	56657655	<i>rs746610687</i>	c.7G>C	p.Gly3Arg	Significado incerto
15	<i>JMJD7</i>	42127226	<i>rs747062485</i>	c.277G>T	p.Ala93Ser	Benigna
9	<i>SHB</i>	38068162	<i>rs199974314</i>	c.481C>G	p.Leu161Val	Provavelmente benigna
11	<i>MRGPRX4</i>	18195609	<i>rs146132319</i>	c.806C>T	p.Pro269Leu	Provavelmente benigna
11	<i>MUC6</i>	1031202	<i>rs139011641</i>	c.541G>A	p.Gly181Arg	Provavelmente benigna

As linhas sombreadas representam variantes com potencial deletério de acordo com a análise *in silico*.

**Tabela 10** – Descrição da classificação das variantes encontradas na família A com potencial de apresentarem patogenicidade.

Gene (rs)	OMIM	ClinVar	Publicações	CLASSIFICAÇÃO ACMG (VarSome)		
				Geral	Regra	Significado
<b>COX20</b> (rs946982087)	Deficiência do complexo mitocondrial IV	--	Neuropatia (Otero <i>et al.</i> , 2018)	Significado incerto	PM2	Não presente em: <i>Exome Sequencing Project</i> , <i>1000 Genomes Project</i> , ou <i>Exome Aggregation Consortium</i>
					PP2	Troca de sentido onde poucas alterações desse tipo são benignas, sendo um mecanismo comum de doença
<b>NUP214</b> (rs902499481)	Leucemia	--	Leucemia (Zheng <i>et al.</i> , 2021)	Significado incerto	PM1	Variante em região de domínio crítico proteico
					PM2	Não presente em GnomAD
					BP1	75% das variantes de sentido trocado são benignas
<b>GPR98</b> (rs202211640)	Sd. de Usher Convulsões	Benigno	Sd. de Usher (Castiglione e Möller, 2022)	Significado incerto	PM2	Não presente em GnomAD
<b>TLE1</b> (rs1333105043)	--	--	Sarcoma (Yang <i>et al.</i> , 2020)	Significado incerto	PM2	Não presente em GnomAD
					PP3	Predição em programas: <b>Benigna</b> (MVP, MutationAssessor) / <b>Patogênica</b> (BayesDel_addAF, DANN, DEOGEN2, EIGEN, FATHMM-MKL, LIST-S2, M-CAP, MutationTaster, PrimateAI, REVEL e SIFT)
<b>PKD1L2</b> (rs79139155)	--	--	Doença Renal Policística (Kim <i>et al.</i> , 2020)	Significado incerto	PP3	Predição em programas: <b>Benigna</b> (BayesDel_addAF, LIST-S2, MVP e PrimateAI) / <b>Patogênica</b> (DANN, EIGEN, FATHMM-MKL, MutationTaster e REVEL)
					BS1	Frequente no GnomAD
<b>TEX9</b> (rs746610687)	--	--	Ciliopatia (Gheiratmand <i>et al.</i> , 2019)	Significado incerto	PM2	Não presente em GnomAD
					BP4	Predição em programas: <b>Benigna</b> (DEOGEN2, EIGEN, FATHMM-MKL, LIST-S2, M-CAP, MVP, PrimateAI e REVEL) / <b>Patogênica</b> (BayesDel_addAF, DANN, MutationAssessor, MutationTaster e SIFT)

-- indicam informações não encontradas nesta etapa do estudo.

### 4.3.2 Família B – ACMG / VarSome

O estudo da família B encontrou seis variantes “provavelmente benignas” e duas “benignas” que foram descartadas quanto ao seguimento do estudo. Duas variantes *missense* de “significado incerto” (*VUS*) foram tidas como candidatas à validação por sequenciamento de Sanger (Tabela 11). As informações quanto à classificação dessas variantes, obtidas por meio do *VarSome* (<https://varsome.com>), revisão bibliográfica na literatura, *ClinVar* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) e *OMIM* (<https://www.omim.org>), encontram-se na Tabela 12.

**Tabela 11** – Variantes observadas em todos os indivíduos portadores de SAOS e ausentes nos controles da família B.

Chr	Gene	Posição	rs	c.DNA	Proteína	Classificação ACMG ( <i>VarSome</i> )
11	<i>NLRP6</i>	281073	<i>rs946982087</i>	c.1339C>T	p.Arg447Cys	Provavelmente benigna
11	<i>SLC22A18</i>	2929502	<i>rs143044180</i>	c.184G>T	p.Gly62Cys	Provavelmente benigna
19	<i>ZNF433</i>	12126348	<i>rs202067147</i>	c.1229C>T	p.Thr410Met	Provavelmente benigna
18	<i>POTEC</i>	14542931	<i>rs45554841</i>	c.215G>A	p.Cys72Tyr	Provavelmente benigna
15	<i>PIF1</i>	65108865	<i>rs150356082</i>	c.1774C>T	p.Arg592Cys	Provavelmente benigna
9	<i>PTPDC1</i>	96857621	<i>rs61743388</i>	c.477G>T	p.Trp159Cys	Significado incerto
8	<i>ZFPM2</i>	106801092	<i>rs202204708</i>	c.679A>G	p.Ile227Val	Benigna
6	<i>ZBTB24</i>	109803084	<i>rs147441359</i>	c.146G>A	p.Arg49Gln	Benigna
5	<i>LARS1</i>	145503564	<i>rs34823161</i>	c.3077A>G	p.Tyr1026Cys	Provavelmente benigna
1	<i>TMOD4</i>	151143043	<i>rs141507115</i>	c.967G>A	p.Gly323Arg	Significado incerto

As linhas sombreadas representam variantes com potencial deletério de acordo com a análise *in silico*.

**Tabela 12** – Descrição da classificação das variantes encontradas na família B com potencial de apresentarem patogenicidade.

Gene (rs)	OMIM	ClinVar	Publicações	CLASSIFICAÇÃO ACMG ( <i>VarSome</i> )		
				Geral	Regra	Significado
<b><i>PTPDC1</i></b> (rs61743388)	--	--	Anemia de Fanconi (Wickramasekara e Stessman, 2019)	Significado incerto	PM2	A posição é fortemente conservada (phyloP100way = 9,29 é maior que 7,2). A contagem de alelos homozigotos dos exomas GnomAD = 1 é inferior a 3 para o gene <i>PTPDC1</i> (não é possível verificar a cobertura dos exomas gnomAD). A contagem de alelos homozigotos dos genomas GnomAD = 1 é menor que 3 para o gene <i>PTPDC1</i> (com boa cobertura de genomas gnomAD = 31,9).
					PP3	Predição em programas: <b>Benigna</b> (BayesDel_addAF, DEOGEN2 e MVP) / <b>Patogênica</b> (DANN, EIGEN, FATHMM-MKL, LIST-S2, M-CAP, MutationAssessor, MutationTaster, PrimateAI, REVEL e SIFT)
<b><i>TMOD4</i></b> (rs141507115)	--	--	Miopatia (Berger <i>et al.</i> , 2014)	Significado incerto	PM2	A posição é fortemente conservada (phyloP100way = 7,71 é maior que 7,2). A contagem de alelos homozigotos dos exomas GnomAD = 0 é inferior a 3 para o gene <i>TMOD4</i> (com boa cobertura de genomas gnomAD = 83,1). A contagem de alelos homozigotos dos genomas GnomAD = 0 é menor que 3 para o gene <i>TMOD4</i> (com boa cobertura de genomas gnomAD = 32,5).
					PP3	Predição em programas: <b>Benigna</b> (BayesDel_addAF, DEOGEN2 e MVP) / <b>Patogênica</b> (DANN, EIGEN, FATHMM-MKL, LIST-S2, M-CAP, MutationAssessor, MutationTaster, PrimateAI, REVEL e SIFT)

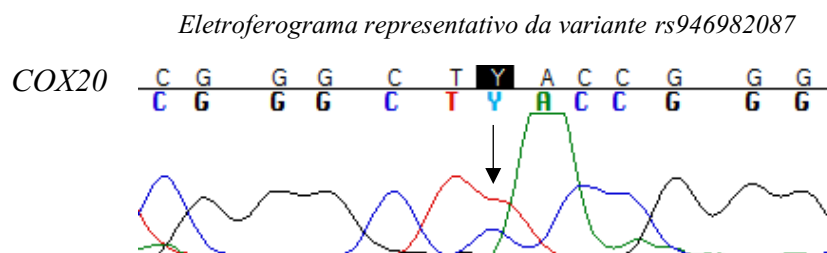
-- indicam informações não encontradas nesta etapa do estudo.

#### 4.4 Validação do WES por sequenciamento de Sanger.

##### 4.4.1 Família A – Validação por Sanger

As variantes *missense* dos genes *GPR98*, *TEX9* e *PKD1L2* presentes nas análises de exoma, não foram validadas ou confirmadas nos dois indivíduos afetados (II.4 e III.2) – apesar de suas elevadas frequências alélicas (VAF ~40%) no WES. Já as variantes *missense* dos genes *NUP214* e *TLE1* foram validadas nas amostras submetidas à análise de exoma, mas não foram encontradas no indivíduo II.2 no estudo de segregação. A variante *missense* do *COX20* foi a única validada nas amostras de exoma e subsequentemente também no indivíduo II.2 (Figura 11, Tabela 13).

**Figura 11** – Eletroferograma representativo do gene *COX20* validado para indivíduos afetados na família A.



**Tabela 13** – Sumário dos resultados da validação dos sequenciamentos dos genes selecionados na família A.

Anál.	Suj.	Genes					
		<i>NUP214</i> p.Lys1037Glu Aaa/Gaa	<i>GPR98</i> p.Pro2939Thr Ccc/Acc	<i>TLE1</i> p.Leu608Pro cTa/cCa	<i>TEX9</i> p.Gly3Arg Ggg/Cgg	<i>PKD1L2</i> p.Leu276Phe Ctc/Ttc	<i>COX20</i> p.Glu9Lys Gag/Aag
Exoma	II.4	A/G	C/A	T/C	G/G	C/T	G/A
	II.5	A/A	C/C	T/T	G/G	C/C	G/G
	III.1	A/A	C/C	T/T	G/G	C/C	G/G
	III.2	A/G	C/C	T/C	G/C	C/C	G/A
E.S	II.2	A/A	--	T/T	--	--	G/A

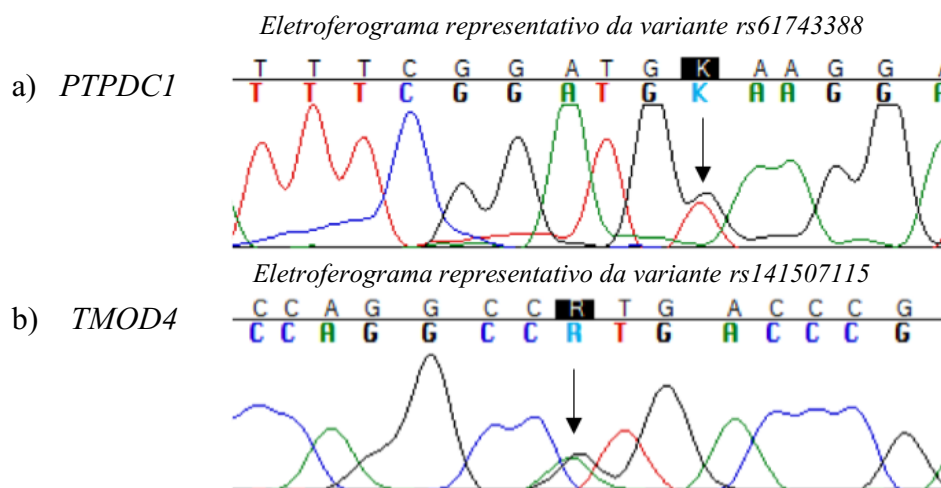
Anál.: análise; E.S: estudo de segregação; Suj.: sujeitos do estudo; -- não procedeu-se à validação; quadrados sombreados indicam indivíduos afetados.

A frequência da variante do *COX20* (*rs946982087*) não é relatada na população brasileira, de acordo com o banco de dados AbraOM (<https://abraom.ib.usp.br/>), nem na população mundial, segundo o GnomAD (GnomAD; <https://gnomad.broadinstitute.org/>), o que demonstra que essa variante não é frequente em diferentes populações.

#### 4.4.2 Família B – Validação por Sanger

Ambas as variantes *missense*, em heterozigose, encontradas nas análises de exoma da família B foram validadas nos indivíduos afetados e ausentes no controle (Figura 12, Tabela 14). As frequências das variantes de *PTPDC1* e *TMOD4* analisadas no ABraOM (<https://abraom.ib.usp.br/>) são 0.0017 e 0.00042, respectivamente. No banco de dados GnomAD as frequências relatadas são 0.00046 para *PTPDC1* e 0.00097 para *TMOD4* (<https://gnomad.broadinstitute.org/>).

**Figura 12** – Eletroferograma representativo dos genes validados na família B.



(a) Resultados do sequenciamento de *PTPDC1* (5' → 3'); (b) Resultados do sequenciamento de *TMOD4* (3' → 5'); Setas apontam as mutações.

**Tabela 14** – Sumário dos resultados da validação dos sequenciamentos dos genes selecionados na família B.

Análise	Sujeitos	Genes	
		<i>PTPDC1</i> p.Trp159Cys tgG/tgT	<i>TMOD4</i> p.Gly323Arg Ggg/Agg
Exoma	I.1	G/T	G/A
	II.1	G/T	G/A
	II.2	G/G	G/G
	II.3	G/T	G/A

Quadrados sombreados indicam indivíduos afetados.

## 4.5 Predição de patogenicidade de proteínas, análise de vias e análise *in silico*

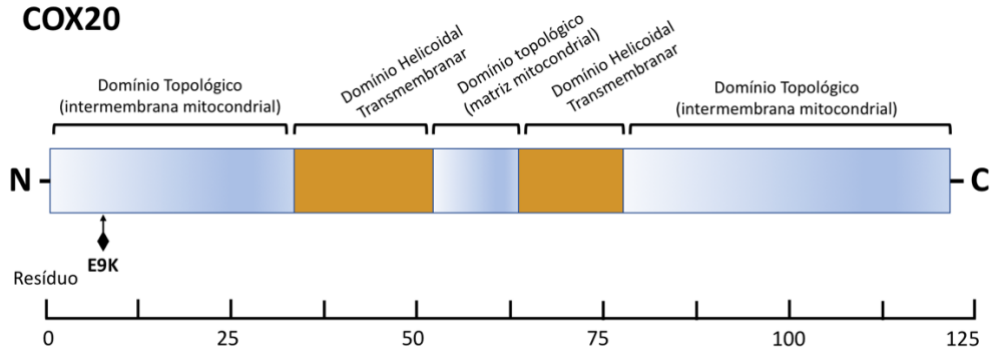
### 4.5.1 Proteína COX20 – Família A

A proteína COX20 é composta por três *random coils* e dois domínios transmembrana alfa-hélice (The UniProt Consortium, 2021). A mutação c.25G>A (p.Glu9Lys) localiza-se no primeiro domínio topológico N-terminal (Figura 13a), em um aminoácido altamente conservado entre as espécies (Figura 13b). Embora seja difícil construir modelos de alta confiança do domínio N-terminal da COX20, dada a falta de modelos semelhantes para esta parte da proteína, o modelo COX20 tipo selvagem *AlphaFold* (Jumper *et al.*, 2021) demonstra que o ácido glutâmico 9 da proteína forma uma ponte de hidrogênio com o ácido glutâmico 11, gerando uma dobra (Figura 13c). No entanto, essa interação não é observada com a Lisina substituída nessa posição na COX20 que apresenta a variante selecionada no presente estudo. Tal alteração, como previsto pelo *Swiss-Model* (Waterhouse *et al.*, 2018) afeta a estrutura da proteína e potencialmente a desestabiliza, conforme demonstrado nos modelos criados com o *software RaptorX* (Sheng *et al.*, 2016) (Figura 13c).



**Figura 13** – Efeitos do resíduo alterado na proteína COX20.

a)



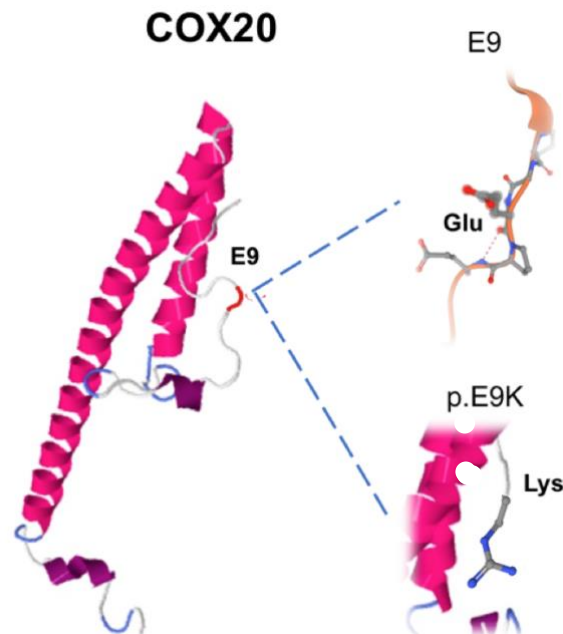
b)

**COX20**

<i>H. sapiens</i>	9	MAAPPEPG	E	PEERK
<b>p.E9K</b>	9	MAAPPEPG	K	PEERK
<i>P. troglodytes</i>	9	MAAPEPG	E	PEERK
<i>M. mulatta</i>	9	MAAPEPG	E	PKERK
<i>M. musculus</i>	9	MAAPEPH	E	TE-KK
<i>D. rerio</i>	4	-----	E	DGKTQ
<i>D. melanogaster</i>	4	-----	E	PEEPAK

↑  
**p.E9K**

c)

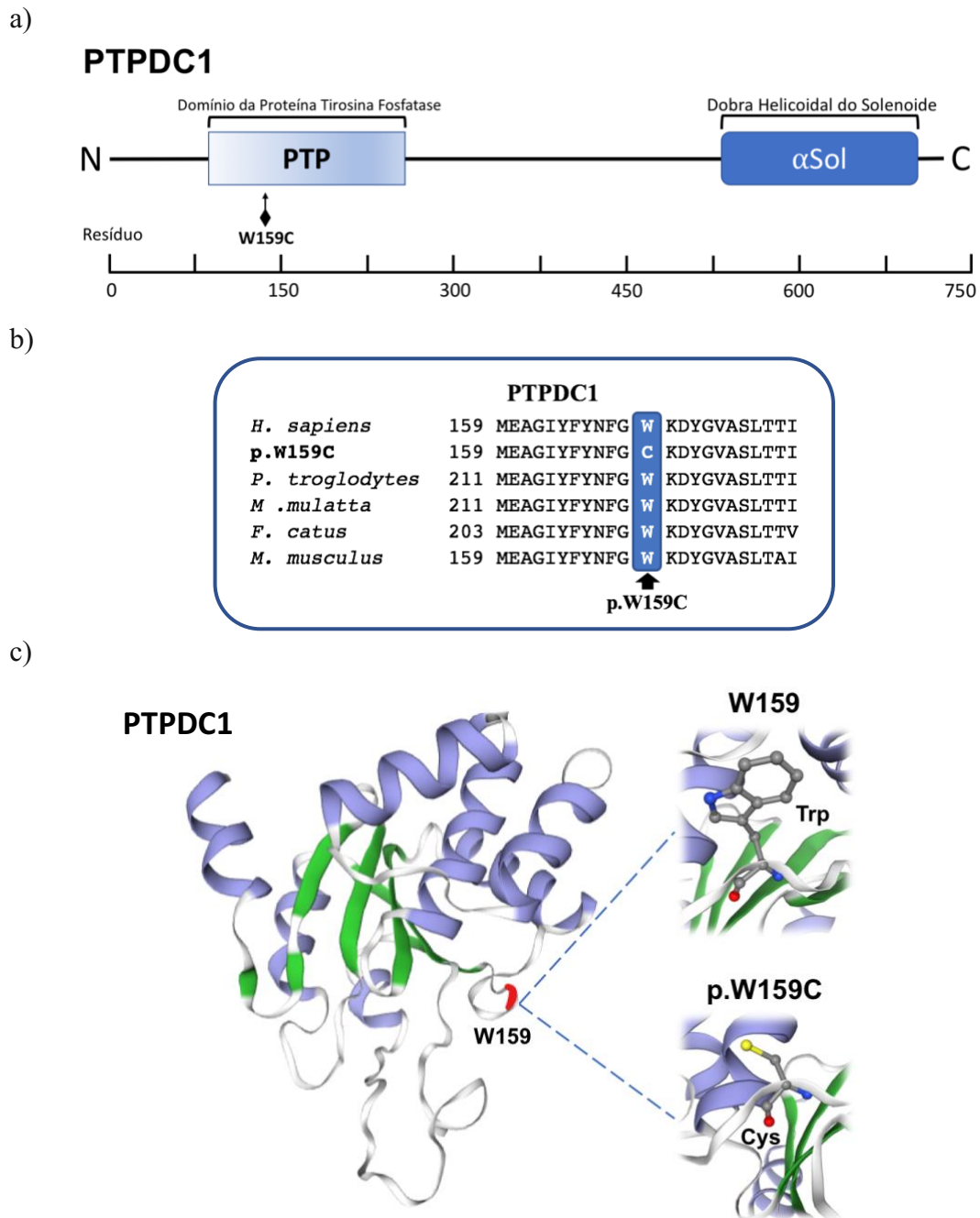


(a) – Esquema dos domínios de COX20 com a localização do resíduo variante. A posição da variante E9K detectada no GAG é representada por um diamante. (b) – Alinhamentos de sequências mostrando homologia entre o domínio topológico da proteína COX20 de diferentes espécies (*H. sapiens*, *P. troglodytes*, *M. mulatta*, *M. musculus*, *D. rerio*, *D. melanogaster*), destacando a conservação do resíduo variante E9K (em azul). (c) – Modelo da estrutura do sítio ativo de COX20 mostrando, no tipo selvagem, os resíduos carregados. Destacado, o local da substituição em Glu9 para Lis9 (p.E9K) (ID da base de dados de proteínas: Q5RI15).

#### **4.5.2 Proteína PTPDC1 – Família B**

Para estimar a patogenicidade e prever a estrutura da proteína PTPDC1, foi utilizado o transcrito ENST00000375360.7, que codifica a proteína A2A3K4-1, classificada como sequência canônica pelo UniProt (The UniProt Consortium, 2021). A variante identificada nesse gene foi descrita como patogênica por diferentes *softwares*, conforme demonstrado na Tabela 12. A substituição p.Trp159Cyst ocorre no domínio tirosina-proteína fosfatase (entre os aminoácidos 82-253) (Figuras 14a,c), em um aminoácido altamente conservado entre as espécies (Figura 14b), o que poderia explicar o efeito deletério da mutação.

**Figura 14** – Efeitos do resíduo alterado na proteína PTPDC1.

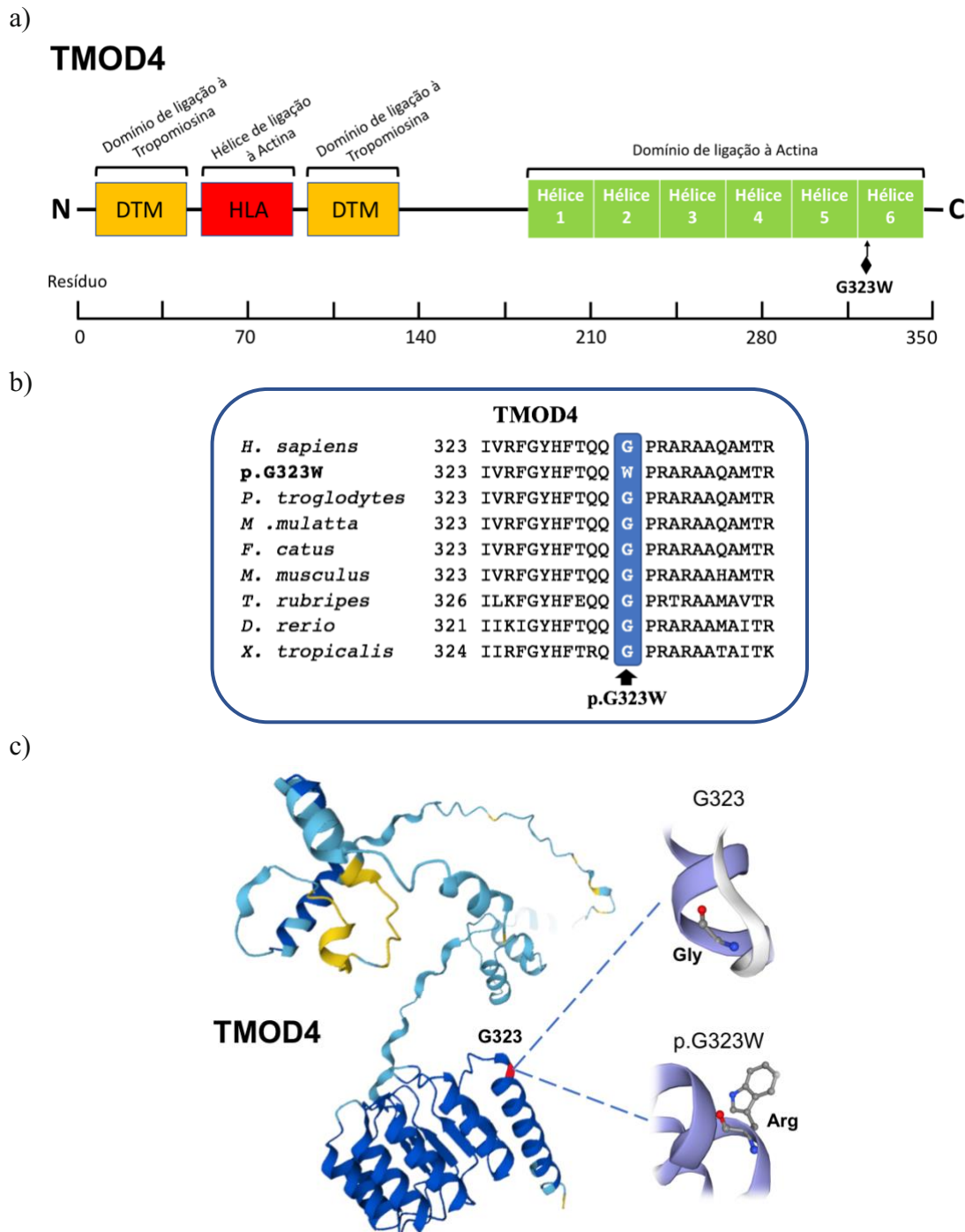


(a) – Esquema dos domínios de PTPDC1 com a localização do resíduo variante: PTP, proteína tirosina fosfatase; αSol, representa uma dobra helicoidal do solenoide. A posição da variante W159C detectada no TGG é representada por um diamante. (b) – Alinhamentos de seqüências mostrando homologia entre o domínio PTP da proteína PTPDC1 de diferentes espécies (*H. sapiens*, *P. troglodytes*, *M. mulatta*, *F. catus*, *M. musculus*), destacando a forte conservação do resíduo variante W159C (em azul). (c) – Modelo da estrutura do sítio ativo de PTPDC1 mostrando, no tipo selvagem, os resíduos carregados. Destacado, o local da substituição em Trp290 para Cis290 (p.W159C) (ID da base de dados de proteínas: A2A3K4).

#### **4.5.3 Proteína TMOD4 – Família B**

TMOD4 é altamente conservada entre os aminoácidos 1-151 e 172-344, incluindo o resíduo da variante p.Gly323Arg, que se localiza no último domínio de ligação à actina, sendo capaz de alterar a capacidade de ligação entre actina e tropomodulina in vivo. A substituição ocorre em um *coil* logo no início de uma alfa-hélice, como pode ser visto pela projeção realizada através do *Swiss-Model* (Waterhouse *et al.*, 2018) (Figura 15). No modelo construído com *RaptorX* (Sheng *et al.*, 2016), a substituição de um resíduo de glicina por arginina resultou no alongamento da última alfa-hélice do último domínio de ligação à actina, o que pode ser deletério para sua função.

**Figura 15** – Efeitos do resíduo alterado na proteína TMOD4.



(a) – Esquema dos domínios de TMOD4 com a localização do resíduo variante. A posição da variante G323W detectada no GGG é representada por um diamante. (b) – Alinhamentos de sequências mostrando homologia entre o domínio de ligação à actina da proteína TMOD4 de diferentes espécies (*H. sapiens*, *P. troglodytes*, *M. mulatta*, *F. catus*, *M. musculus*, *T. rubripes*, *D. rerio*, *X. tropicalis*), destacando a forte conservação do resíduo variante G323W (em azul). (c) – Modelo da estrutura TMOD4 mostrando no tipo selvagem os resíduos carregados. Destacado, o local da substituição em Gly323 para Arg323 (p. G323W) (ID da base de dados de proteínas: Q9NZQ9).

## 5 DISCUSSÃO

A fisiopatologia da Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono é um processo complexo e a identificação de genes críticos para a caracterização da doença é uma tarefa árdua devido às infinitas possibilidades. Assim, os casos familiares são um ponto de partida interessante para buscar novas mutações que podem ocorrer em todo o contexto familiar e elucidar a fisiopatogênese da síndrome.

O presente trabalho descreve seis indivíduos afetados e três controles em duas famílias portadoras da SAOS. Todos os indivíduos afetados manifestam fenótipos típicos da doença e foram responsivos aos tratamentos propostos respectivamente. Os controles tratam-se de indivíduos sem queixas clínicas de SAOS e os quais foram avaliados objetivamente por meio de polissonografia para exclusão da doença.

Nestas duas famílias brasileiras com fenótipos de SAOS, três novas variantes heterozigóticas aparentemente patogênicas foram identificadas nos genes *COX20* – família A – *PTPDC1* e *TMOD4* – família B. Nenhum destes genes encontrados e selecionados para seguimento dos experimentos têm relação direta descrita na literatura com a síndrome. A probabilidade pré-teste para a detecção de mutações associadas a SAOS é baixa, uma vez que estudos com este escopo ainda são escassos. Sendo assim, é esperado que as variantes observadas no presente estudo sejam de fato novas.

### EXPLICAR AUSÊNCIA DE GPR98, TEX9 E PKD1L2 EM SANGER

*COX20* é uma proteína nuclear essencial para a montagem do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial (CIV)/citocromo C oxidase (Szklarczyk *et al.*, 2012). O complexo IV é composto por 14 domínios, dos quais três são codificados na mitocôndria e inseridos na membrana mitocondrial de forma cotraducional com a ajuda de fatores de montagem e chaperonas como a *COX20*. Níveis limítrofes de *COX20* têm sido associados a proteínas *COX2* instáveis, que são degradadas devido à falha de sua inserção na membrana mitocondrial e à maturação de seu sítio de cobre (Bourens *et al.*, 2014), resultando em acúmulo de complexo IV danificado, possivelmente envolvido em capacidade respiratória reduzida (Otero *et al.*, 2018).

Mutações em homozigose nesse gene têm sido descritas em pacientes com deficiência do complexo IV mitocondrial (*OMIM*: #220110), que apresentam achados neuromusculares como hipotonia, distonia e ataxia (Szklarczyk *et al.*, 2013; Doss *et al.*, 2014). Em doenças mitocondriais primárias como esta, o envolvimento neuromuscular e do sistema nervoso central pode afetar as vias aéreas e a respiração. Os sintomas podem incluir respiração ruidosa,

rouquidão, estridor, congestão, tosse, respiração anormal, ronco, distúrbios do sono, hipersonolência diurna e intolerância ao exercício (Parikh *et al.*, 2017). A polissonografia pode mostrar achados de apneia central, apneia obstrutiva do sono e diminuição do drive ventilatório em resposta à hipóxia e/ou hipercapnia (Ramezani e Stacpoole, 2014).

Embora não localizada nos domínios transmembrana da COX20, a região onde se localiza a mutação p.Glu9Lys também é de importância considerável para a estabilidade e funcionalidade do COX20. Um estudo de uma família com dois pacientes com mutações heterozigóticas compostas em COX20 (p.Lys14Arg + Trp74Lys), mostrou que, associadas, essas variantes causaram uma neuropatia axonal autossômica recessiva e encefalopatia estática (Xu *et al.*, 2019). A primeira mutação (p.Lys14Arg), afeta exatamente a mesma região da proteína que a mutação p.Glu9Lys observada neste estudo, o que corrobora a hipótese de importância da variante aqui encontrada para a fisiopatologia da SAOS.

Na família B um tema notável relacionado ao *TMOD4* (*rs141507115*) é seu envolvimento no controle muscular. Durante o sono, a manutenção da desobstrução das vias aéreas superiores é um objetivo fisiológico primário, cuja falha pode levar à apneia obstrutiva do sono (AOS) e suas sequelas (Strohl *et al.*, 2012). Trabalhos anteriores sugerem que a patogênese da apneia do sono envolve uma interação complexa da anatomia das vias aéreas superiores (Schwab, 1998), controle motor do dilatador faríngeo (Malhotra *et al.*, 2002), instabilidade do controle ventilatório (*loop gain*) (Khoo, 2000; Wellman *et al.*, 2011), sozinhos e/ou em combinação. A contribuição de cada um desses fatores para a AOS em um determinado indivíduo é bastante variável, enfatizando a importância de definir o mecanismo subjacente da AOS em pacientes acometidos para atingir o objetivo de terapia individualizada e direcionada (Saboisky *et al.*, 2009).

Os músculos das vias aéreas superiores agem para aumentar o calibre das mesmas. São controlados ao nível do tronco cerebral por meio de mecanismos complexos. Existem 23 pares de músculos sendo controlados principalmente através do hipoglosso (nervo craniano XII) e através da saída motora do trigêmeo (V3) (Kubin *et al.*, 1993; Kubin *et al.*, 1994; Remmers e Lahiri, 1998). Esses músculos são classificados de várias maneiras diferentes, por exemplo, fásico *versus* tônico (ou seja, aqueles que são ativados em cada ato inspiratório *versus* aqueles com atividade constante ao longo do ciclo respiratório), protratores *versus* retratores, dilatadores *versus* constritores, ou aqueles com ou sem estado dependência (isto é, grau de mudança na atividade no início do sono) (Saboisky *et al.*, 2009; Saboisky *et al.*, 2010).

Um estudo avaliou as alterações patológicas dos músculos palatofaríngeos em pacientes com AOS e encontrou correlação entre o grau de AOS com as alterações patológicas dos músculos palatofaríngeos. Além disso, verificaram que a incidência de miopatia é uma parte importante da AOS secundária à hipóxia intermitente crônica na AOS e outras lesões patológicas, mas também uma razão importante para o aumento do colapso faríngeo (Li *et al.*, 2011).

TMOD4 é um dos quatro membros da família Tropomodulin, um grupo de proteínas que se ligam às extremidades dos filamentos de actina e os estabilizam, inibindo seu alongamento, despolimerização e renovação (Fischer e Fowler, 2003). Compartilha uma sequência muito semelhante e todas as propriedades funcionais conhecidas de TMOD1. Ambos são altamente expressos no músculo esquelético e cardíaco, diferindo apenas quanto a expressão predominante de TMOD4 em fibras musculares esqueléticas rápidas e TMOD1 em fibras musculares esqueléticas lentas (Fowler 1996; Almenar-Queralt *et al.*, 1999; Gokhin *et al.*, 2010; Zhao, 2013).

A regulação precisa da dinâmica dos filamentos de actina é essencial para a miofibrilogênese. Modelos animais de *zebrafish* com perda de função de TMOD4 apresentam alongamento de filamentos finos, sarcômeros desorganizados, diminuição da força isométrica e fraqueza muscular (Berger *et al.*, 2014), o que corrobora com a observação de que diminuir a expressão de TMOD4 resulta no alongamento do filamento fino (Gregorio *et al.*, 1995).

As doenças associadas com *TMOD4* incluem Esclerose Lateral Amiotrófica Tipo 5 (Cox *et al.*, 2001) e a Miopatia Estrutural Congênita (Nanda *et al.*, 2018). Entre suas vias relacionadas estão a contração do músculo estriado e a condução cardíaca (Gokhin *et al.*, 2010).

Os membros da família B têm alteração em seu peso corporal, no entanto, a via aérea superior avaliada clinicamente e por meio de cefalometria não se mostra estreita. Tais características nos faz inferir que desordens na musculatura faríngea possam ser um importante fator fisiopatológico desses pacientes. Corrobora com essa hipótese o fato de que a terapia miofuncional orofacial ter repercutido favoravelmente no tratamento de ronco e apneia dos membros dessa família.

Dentre os fenótipos associados ao gene *PTPDC1* estão relação cintura quadril (Pulit *et al.*, 2019), relação cintura quadril ajustada pelo IMC (Lotta *et al.*, 2018), circunferência da cintura ajustada pelo IMC (Zhu *et al.*, 2020; Christakoudi *et al.*, 2021).

Embora a função da proteína tirosina fosfatase 1 (PTPDC1) ainda não esteja totalmente elucidada, sua regulação negativa tem sido associada a alguns fenótipos, como alterações



faciais e hipotonia (UniProt, 2021) e sua regulação positiva com alguns tipos de câncer (Dufrense *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2021). Entende-se que ela participe da montagem e degradação do cílio, importante para direcionar o movimento do fluido (cílios móveis), detectar o ambiente extracelular e controlar várias vias de transdução de sinal (cílios primários). Nesse sentido, a depleção de PTPDC1 em células knockout leva a um aumento no comprimento dos cílios, bem como a um prejuízo funcional dos mesmos (Milenkovic *et al.*, 2009; Lai *et al.*, 2011).

É difícil estabelecer uma relação entre SAOS e *PTPDC1*, por falta de informação, mas possivelmente o movimento dos cílios pode ser a chave para integrá-los. Apneia obstrutiva do sono tem sido um importante achado relacionado a doenças ciliares primárias (Bush *et al.*, 1998; Erdem *et al.*, 2011; Pifferi *et al.*, 2011). Um *clearance* de muco deficiente pode levar a uma maior resistência ao fluxo de ar nas vias aéreas superiores, a distúrbios nas trocas gasosas ao nível pulmonar e, conseqüentemente, a anormalidades na arquitetura do sono (Oktem *et al.*, 2013).

Entre suas vias relacionadas está a via-PAK. A proteína codificada por este gene compõe um grupo característico, as proteínas tirosina fosfatases (PTPs). As PTPs regulam as atividades das fosfoproteínas por meio da desfosforilação. São moléculas sinalizadoras envolvidas na regulação de uma ampla variedade de processos biológicos. A função específica desta proteína ainda não foi claramente determinada (Li *et al.*, 2016).

Dentre as diversas doenças associadas ao gene *PTPDC1* algumas se manifestam com hipotonia e alterações craniofaciais, são elas: Síndrome de Kleefstra, Síndrome de Coffin-Siris, Síndrome de Wolf-Hirschhorn, Síndrome de Sotos (McLean *et al.*, 2011; Ronchetti *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2019; Wickramasekara *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2021).

Os aminoácidos do tipo selvagem em *COX20*, *PTPDC1* e *TMOD4* são consideravelmente conservados entre as espécies, fato que demonstra sua relevância evolutiva. Além disso, é interessante notar que as variantes observadas nestes genes são raras na população geral, demonstrando que podem estar relacionadas a sujeitos menos adaptados no âmbito biológico.

Cabe ressaltar que nenhum dos genes citados foi identificado em estudos prévios de SAOS envolvendo *GWAS*. Uma pesquisa no *GWAS-catalog* (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/genes>) por variantes dentro de 150 kilobases das variantes aqui citadas não levou a resultados associados à apneia do sono. Uma possível razão para este fato é que *SNPs* de efeitos modestos são perdidos nas análises, pois não atingem um limiar de significância estatística (Eichler *et al.*, 2010).

O presente estudo possui algumas limitações. A amostra, embora bem documentada, foi de tamanho reduzido e não foi possível realizar o estudo de segregação na família B. Nenhum dos genes selecionados foi encontrado em comum nas famílias, sugerindo uma contribuição molecular diversa para diferentes fenótipos de SAOS. Assim, uma importante restrição do presente estudo diz respeito à não realização de uma fenotipagem fisiopatológica dos sujeitos, como sugere o complexo protocolo proposto por Eckert *et al.* (2013). Determinar esses fatores é claramente um objetivo importante para pesquisas futuras.

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo sugere que os genes *COX20*, *PTPDC1* e *TMOD4* anteriormente não relacionados à apneia obstrutiva do sono podem estar associados à síndrome. O mecanismo pelo qual esses genes estão envolvidos com o desenvolvimento da SAOS permanece pouco claro e requer mais investigações, mas o potencial deletério da localização das respectivas mutações para estrutura proteica e a inferência da relação dessas proteínas com fenótipos associados a SAOS os torna potenciais candidatos.

## REFERÊNCIAS

- Almenar-Queralt, A. *et al.* Tropomodulin assembles early in myofibrillogenesis in chick skeletal muscle: evidence that thin filaments rearrange to form striated myofibrils. **Journal of Cell Science**. 112:1111-1123. 1999.
- American Academy of Sleep Medicine. International Classification of Sleep Disorders, 3rd ed, **American Academy of Sleep Medicine**. 2014.
- Anafi, R. C. *et al.* Sleep is not just for the brain: transcriptional responses to sleep in peripheral tissues. **BMC Genomics**. 14:362. 2013.
- Ancoli-Israel, S. *et al.* Sleep-disordered breathing in African-American elderly. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 152:1946-1949. 1995.
- ASDA (American Sleep Disorders Association) Standards of Practice Committee. Practice parameters for the indications for polysomnography and related procedures. **Sleep**. 20(6):406-42222. 1997.
- Aserinsky, E.; Kleitman, N. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. **Science** 118, 273–274. 1953.
- Bamshad, M. J. *et al.* Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. **Nature Reviews Genetics**. 12, 745–755. 2011.
- Benjafield, A. V. *et al.* Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis. **The Lancet Respiratory Medicine**. (8): 687-698. 2019.
- Berger, J. *et al.* Loss of Tropomodulin4 in the zebrafish mutant *träge* causes cytoplasmic rod formation and muscle weakness reminiscent of nemaline myopathy. **Diseases Models & Mechanisms**. 7(12):1407-1415. 2014.
- Bourens, M. *et al.* Human COX20 cooperates with SCO1 and SCO2 to mature COX2 and promote the assembly of cytochrome c oxidase. **Human Molecular Genetics**. 23(11):2901-2913. 2014.
- Bush, A. *et al.* Primary ciliary dyskinesia: diagnosis and standards of care. **European Respiratory Journal**. 12:982–988. 1998.
- Cade, B. E. *et al.* Whole-genome association analyses of sleep-disordered breathing phenotypes in the NHLBI TOPMed program. **Genome Medicine**. 13, 136. 2021.
- Cardenas, R. *et al.* Mendel,MD: A user-friendly open-source web tool for analyzing WES and WGS in the diagnosis of patients with Mendelian disorders. **PLOS Computational Biology**. 13(6). 2017.
- Carmelli, D. *et al.* Prevalence and concordance rates for sleep disordered breathing (SDB) in adult male twins: The National Heart, Lung, and Blood Institute Twin Study. **Sleep Research Society**. 26:340. 1997.
- Casale, M. *et al.* Obstructive sleep apnea syndrome: from phenotype to genetic basis. **Current Genomics**. 10(2):119-126. 2009.
- Castiglione, A.; Möller, C. Usher Syndrome. **Audiology Research**. 12(1):42-65. 2022.
- Chang, H. P. *et al.* Obstructive sleep apnea treatment in adults. Kaohsiung. **Journal of Medical Science**. 36:7–12. 2019.

- Chen, H. *et al.* Multiethnic Meta-Analysis Identifies *RAII* as a Possible Obstructive Sleep Apnea-related Quantitative Trait Locus in Men. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. 58(3):391-401. 2018.
- Christakoudi, S. *et al.* GWAS of allometric body-shape indices in UK Biobank identifies loci suggesting associations with morphogenesis, organogenesis, adrenal cell renewal and cancer. **Scientific Reports**. 11(1):10688. 2021.
- Clément, O. *et al.* Evidence that neurons of the sublateralodorsal tegmental nucleus triggering paradoxical (REM) sleep are glutamatergic. **Sleep**. 34, 419–423. 2011.
- Cox, P. R. *et al.* Genomic organization of Tropomodulins 2 and 4 and unusual intergenic and intraexonic splicing of YL-1 and Tropomodulin 4. **BMC Genomics**. 2:7. 2001.
- De Paula, L. K. *et al.* Heritability of OSA in a Rural Population. **Chest**. 149(1):92-7. 2016.
- Dempsey, J. A. *et al.* Pathophysiology of sleep apnea. **Physiology Reviews**. 90:47. 2010.
- Doss, S. *et al.* Recessive dystonia-ataxia syndrome in a Turkish family caused by a *COX20* (*FAM36A*) mutation. **Journal of Neurology**. 261(1):207-212. 2014.
- Dufresne, J. *et al.* The plasma peptides of breast versus ovarian cancer. **Clinical Proteomics**. 16:43. 2019.
- Eastwood, P. R. *et al.* Treating obstructive sleep apnea with hypoglossal nerve stimulation. **Sleep**. 34(11):1479-1486. 2011.
- Eckert, D. J. *et al.* Defining phenotypic causes of obstructive sleep apnea. Identification of novel therapeutic targets. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 188(8):996-1004. 2013.
- Eckert, D. J.; Younes, M. K. Arousal from sleep: implications for obstructive sleep apnea pathogenesis and treatment. **Journal of Applied Physiology**. 116:302–313. 2014.
- Eckert, D. J. Phenotypic approaches to obstructive sleep apnoea - New pathways for targeted therapy. **Sleep Medicine Reviews**. 37:45-59. 2018.
- Epstein, L. J. *et al.* Clinical guideline for the evaluation, management and long-term care of obstructive sleep apnea in adults. **Journal of Clinical Sleep Medicine**. 5(3):263-276. 2009.
- Erdem, E. *et al.* Effect of night symptoms and disease severity on subjective sleep quality in children with non-cysticfibrosis bronchiectasis. **Pediatric Pulmonology**. 46:919–926. 2011.
- Eskandari, D. *et al.* Acetazolamide Reduces Blood Pressure and Sleep-Disordered Breathing in Patients With Hypertension and Obstructive Sleep Apnea: A Randomized Controlled Trial. **Journal of Clinical Sleep Medicine**. 14(3):309-317. 2018.
- Fernandes, R. M. F. O sono normal. **Distúrbios Respiratórios do Sono. Ribeirão Preto: Medicina**. 39(2):157-168. 2006.
- Fischer, R. S.; Fowler VM. Tropomodulins: life at the slow end. **Trends in Cell Biology**. 13(11):593-601. 2003.
- Fleetham, J. *et al.* Canadian Thoracic Society 2011 guideline update: diagnosis and treatment of sleep disordered breathing. **Canadian Respiratory Journal**. 18(1):25-47. 2011.
- Fowler, V. M.; Vale, R. Cytoskeleton. **Current Opinion in Cell Biology**. 8(1):1-3. 1996.
- Gheiratmand, L. *et al.* Spatial and proteomic profiling reveals centrosome-independent features of centriolar satellites. **EMBO Journal**. 38(14):e101109. 2019.

- Giles, T. L. *et al.* Continuous positive airways pressure for obstructive sleep apnoea in adults. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. 25;(1). 2006.
- Goding, G. S Jr. *et al.* Hypoglossal nerve stimulation and airway changes under fluoroscopy. **Otolaryngology–Head and Neck Surgery**. 146(6):1017-1022. 2012.
- Gokhin, D. S. *et al.* Tropomodulin isoforms regulate thin filament pointed-end capping and skeletal muscle physiology. **Journal of Cell Biology**. 189(1):95-109. 2010.
- Gregorio, C. C. *et al.* Requirement of pointed-end capping by tropomodulin to maintain actin filament length in embryonic chick cardiac myocytes. **Nature**. 377(6544):83-86. 1995
- Guilleminault, C. *et al.* Familial Aggregates in Obstructive Sleep Apnea Syndrome. **Chest**. 107:1545-1551. 1995.
- Haddad, F.; Bittencourt, L. **Recomendações para o diagnóstico e tratamento da síndrome da apneia obstrutiva do sono no adulto**. São Paulo: Estação Brasil. 2013.
- Heinzer, R. C. *et al.* Effect of increased lung volume on sleep disordered breathing in patients with sleep apnoea **Thorax**. 61:435-439. 2006.
- Hobson, J. A. REM sleep and dreaming: towards a theory of protoconsciousness. **Nature Reviews Neuroscience**. 10, 803–814. 2009.
- Hoffstein, V. *et al.* Treatment of obstructive sleep apnea with nasal continuous positive airway pressure. Patient compliance, perception of benefits, and side effects. **American Review of Respiratory Disease**. 145(4 Pt 1):841-845. 1992.
- Jonas, D. E. *et al.* Screening for Obstructive Sleep Apnea in Adults: Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. **JAMA**. 317(4):415-433. 2017.
- Jordan, A. S. *et al.* Adult obstructive sleep apnoea. **Lancet**. 383(9918):736-747. 2014.
- Jumper, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**. 596, 583–589. 2021.
- Kang, J. H. *et al.* Heritability of the airway structure and head posture using twin study. **Journal of Oral Rehabilitation**. 45(5):378-385. 2018.
- Kapur, V. K. *et al.* Clinical Practice Guideline for Diagnostic Testing for Adult Obstructive Sleep Apnea: An American Academy of Sleep Medicine Clinical Practice Guideline. **Journal of Clinical Sleep Medicine**. 13(3):479-504. 2017.
- Khoo, M. Determinants of ventilatory instability and variability. **Respiration Physiology**. 122:167–182. 2002.
- Kim, Y. W. *et al.* Exploring the Novel Susceptibility Gene Variants for Primary Open-Angle Glaucoma in East Asian Cohorts: The GLAU-GENDISK Study. **Scientific Reports**. 10(1):221. 2020.
- Kubin, L. *et al.* Suppression of hypoglossal motoneurons during the carbachol-induced atonia of REM sleep is not caused by fast synaptic inhibition. **Brain Research**. 611:300–312. 1993.
- Kubin, L. *et al.* Changes in serotonin level in the hypoglossal nucleus region during carbachol-induced atonia. **Brain Research**. 645:291–302. 1993.
- Kuhn, E. *et al.* Effects of CPAP and Mandibular Advancement Devices on Health-Related Quality of Life in OSA: A Systematic Review and Meta-analysis. **Chest**. 151(4):786-794. 2017.

- Kushida, C. A. *et al.* Practice parameters for the indications for polysomnography and related procedures: an update for 2005. **Sleep**. 28(4):499-521. 2005.
- Lahiri, D. K. Nurnberger JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**. 19(19). 1991.
- Lai, C. K. *et al.* Functional characterization of putative cilia genes by high-content analysis. **Molecular Biology of the Cell**. 22(7):1104-1119. 2011.
- Larkin, E. K. *et al.* A candidate gene study of obstructive sleep apnea in European Americans and African Americans. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 182:947–953. 2010.
- Leppänen, T. *et al.* Increase in Body Mass Index Decreases Duration of Apneas and Hypopneas in Obstructive Sleep Apnea. **Respiratory Care**. 64(1):77-84. 2019.
- Lévy, P. *et al.* Obstructive sleep apnea syndrome. **Nature Reviews Disease Primers**. 1(1):15. 2015
- Li, X. *et al.* Defining the Protein-Protein Interaction Network of the Human Protein Tyrosine Phosphatase Family. **Molecular & Cellular Proteomics**. 15(9):3030-3044. 2016.
- Li, Z. *et al.* Circ-PTPDC1 promotes the Progression of Gastric Cancer through Sponging Mir-139-3p by Regulating ELK1 and Functions as a Prognostic Biomarker. **International Journal of Biological Sciences**. 17(15):4285-4304. 2021.
- Loomis, A. L. *et al.* Cerebral states during sleep, as studied by human brain potentials. **Journal of Experimental Psychology**. 21, 127–144. 1937.
- Lotta, L. A. *et al.* Association of Genetic Variants Related to Gluteofemoral vs Abdominal Fat Distribution With Type 2 Diabetes, Coronary Disease, and Cardiovascular Risk Factors. **JAMA**. 320(24):2553-2563. 2018.
- Malhotra, A. *et al.* Pharyngeal pressure and flow effects on genioglossus activation in normal subjects. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 65:71–77. 2002.
- Martínez-Cerón, E. *et al.* Effect of Continuous Positive Airway Pressure on Glycemic Control in Patients with Obstructive Sleep Apnea and Type 2 Diabetes. A Randomized Clinical Trial. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 194(4):476-485. 2016.
- Martínez-García, M. A. *et al.* Obstructive sleep apnoea in the elderly: role of continuous positive airway pressure treatment. **European Respiratory Journal**. 46(1):142-151. 2015.
- Martins, A. B. *et al.* Síndrome da apnéia-hipopnéia obstrutiva do sono. Fisiopatologia. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. 33(1):93-100. 2007.
- McDaid, C. *et al.* A systematic review of continuous positive airway pressure for obstructive sleep apnoea-hypopnoea syndrome. **Sleep Medicine Reviews**. 13(6):427-436. 2009.
- McEvoy, R. D. *et al.* CPAP for Prevention of Cardiovascular Events in Obstructive Sleep Apnea. **New England Journal of Medicine**. 375(10):919-931. 2016.
- McLean, J. R. *et al.* State of the APC/C: organization, function, and structure. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. 46(2):118-136. 2011.
- Mezzanotte, W. S. *et al.* Waking genioglossal electromyogram in sleep apnea patients versus normal controls (a neuromuscular compensatory mechanism). **Journal of Clinical Investigation**. 89:1571– 1579. 1992.

- Milenkovic, L. *et al.* Lateral transport of Smoothed from the plasma membrane to the membrane of the cilium. **Journal of Cell Biology**. 187(3):365-374. 2009.
- Milholland, B. *et al.* Differences between germline and somatic mutation rates in humans and mice. **Nature Communications**. 8:15183. 2017.
- Mukherjee, S. *et al.* The genetics of obstructive sleep apnoea. **Respirology**. 23(1):18-27. 2018.
- Myers, K. A. *et al.* Does this patient have obstructive sleep apnea? The Rational Clinical Examination systematic review. **JAMA**. 310 (7):731-741. 2013.
- Navarro-Soriano, C. *et al.* The HIPARCO-2 study: long-term effect of continuous positive airway pressure on blood pressure in patients with resistant hypertension: a multicenter prospective study. **Journal of Hypertension**. 39(2):302-330. 2021.
- Nanda, V. *et al.* Functional regulatory mechanism of smooth muscle cell-restricted *LMOD1* coronary artery disease locus. **PLoS Genetics**. 14(11):e1007755. 2018.
- Otero, M. G. *et al.* Novel pathogenic *COX20* variants causing dysarthria, ataxia, and sensory neuropathy. **Annals of Clinical and Translational Neurology**. 6(1):154-160. 2018.
- Oktem, S. *et al.* Sleep disordered breathing in patients with primary ciliary dyskinesia. **Pediatric Pulmonology**. 48(9):897-903. 2013.
- Owens, R. L. *et al.* An integrative model of physiological traits can be used to predict obstructive sleep apnea and response to non-positive airway pressure therapy. **Sleep**. 38(6):961–970. 2015.
- Parikh, S. *et al.* Patient care standards for primary mitochondrial disease: a consensus statement from the Mitochondrial Medicine Society. **Genetics in Medicine**. 19(12). 2017.
- Patel, S. R. *et al.* Continuous positive airway pressure therapy for treating sleepiness in a diverse population with obstructive sleep apnea: results of a meta-analysis. **Archives of Internal Medicine**. 163(5):565-71. 2003.
- Patel, S. R. *et al.* Shared genetic basis for obstructive sleep apnea and adiposity measures. **International Journal of Obesity**. 32(5):795–800. 2008
- Peppard, P. E. *et al.* Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults. **American Journal of Epidemiology**. 177:1006. 2013.
- Peppard, P. E.; Hagen, E. W. The last 25 years of obstructive sleep apnea epidemiology—and the next 25? **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 197(3):310. 2018.
- Pifferi, M. *et al.* Nasal nitric oxide and nitric oxide synthase expression in primary ciliary dyskinesia. **European Respiratory Journal**. 37:572–577. 2011.
- Pillar, G.; Lavie, P. Assessment of the role of inheritance in sleep apnea syndrome. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 151:688. 1995.
- Prasad, B. *et al.* Genetic Ancestry for Sleep Research: Leveraging Health Inequalities to Identify Causal Genetic Variants. **Chest**. 153(6):1478-1496.2018.
- Pulit, S. L. *et al.* Meta-analysis of genome-wide association studies for body fat distribution in 694 649 individuals of European ancestry. **Human Molecular Genetics**. 28(1):166-174. 2019.



- Ramar, K. *et al.* Clinical Practice Guideline for the Treatment of Obstructive Sleep Apnea and Snoring with Oral Appliance Therapy: An Update for 2015. **Journal of Clinical Sleep Medicine**. 11:773. 2015.
- Ramezani, R. J.; Stacpoole, P. W. Sleep disorders associated with primary mitochondrial diseases **Journal of Clinical Sleep Medicine**.10:1233–1239. 2014.
- Ramos, F. *et al.* Role of protein phosphatases PP1, PP2A, PP4 and Cdc14 in the DNA damage response. **Cell Stress**. Feb 21;3(3):70-85. 2019.
- Randerath, W. J. *et al.* European Respiratory Society task force on non-CPAP therapies in sleep apnoea. Non-CPAP therapies in obstructive sleep apnoea. **European Respiratory Journal**. 37(5):1000-28. 2011.
- Redline, S.; Tishler, P. V. The genetics of sleep apnea. **Sleep Medicine Reviews**. 4(6):583-602. 2000.
- Redline, S. *et al.* The familial aggregation of obstructive sleep apnea. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 151:682–687. 1995.
- Redline, S. *et al.* Racial differences in sleep-disordered breathing in African-Americans and Caucasians. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 155(5):1820. 1997.
- Remmers, J. E.; Lahiri, S. Regulating the ventilatory pump: A splendid control system prone to fail during sleep. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**.157:S95–S100. 1998.
- Richards, S. *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in Medicine**. 17, 405–423. 2015.
- Ronchetti, D. *et al.* Distinct lncRNA transcriptional fingerprints characterize progressive stages of multiple myeloma. **Oncotarget**. 7(12):14814-14830. 2016.
- Saboisky, J. P. *et al.* Potential therapeutic targets in obstructive sleep apnoea. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**. 13:795–809. 2009.
- Salord, N. *et al.* A Randomized Controlled Trial of Continuous Positive Airway Pressure on Glucose Tolerance in Obese Patients with Obstructive Sleep Apnea. **Sleep**. 39(1):35-41. 2016.
- Scherr, S. C. *et al.* Definition of an effective oral appliance for the treatment of obstructive sleep apnea and snoring: a report of the American Academy of Dental Sleep Medicine. **Journal of Dental Sleep Medicine**. 1(1):39–50. 2014.
- Schwab, R. J. *et al.* Upper airway and soft tissue anatomy in normal subjects and patients with sleep-disordered breathing. Significance of the lateral pharyngeal walls. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 152:1673–1689. 1995.
- Schwab, R. J. Upper airway imaging. **Clinics in Chest Medicine**.19:33–54. 1998
- Senchak, A. J. *et al.* The effect of tonsillectomy alone in adult obstructive sleep apnea. **Otolaryngology–Head and Neck Surgery**. 152(5):969-973. 2015.
- Sheng, W. *et al.* RaptorX-Property: a web server for protein structure property prediction. **Nucleic Acids Research**. 2016.
- Stöwhas, A. C. *et al.* **Obstructive Sleep Apnea Syndrome**. Praxis (Bern 1994). 108(2):111-117. 2019.

- Strohl, K. P. *et al.* Mechanical properties of the upper airway. **Comprehensive Physiology**. 2(3):1853-1872. 2012.
- Strohl, K. P. *et al.* Obstructive sleep apnea in family members. **New England Journal of Medicine**. 299(18):969-973. 1978.
- Schwartz, J. R.; Roth, T. Neurophysiology of sleep and wakefulness: basic science and clinical implications. **Current Neuropharmacology**. 6(4):367-378. 2008
- Szklarczyk R, *et al.* A mutation in the *FAM36A* gene, the human ortholog of *COX20*, impairs cytochrome c oxidase assembly and is associated with ataxia and muscle hypotonia. **Human Molecular Genetics**. 22: 656-667, 2013.
- Taranto-Montemurro, L. *et al.* The Combination of Atomoxetine and Oxybutynin Greatly Reduces Obstructive Sleep Apnea Severity. A Randomized, Placebo-controlled, Double-Blind Crossover Trial. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 199(10):1267-1276. 2019.
- Taranto-Montemurro, L. *et al.* Desipramine improves upper airway collapsibility and reduces OSA severity in patients with minimal muscle compensation. **European Respiratory Journal**. 48(5):1340-1350. 2016.
- The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. **Nucleic Acids Research**. 49:D1. 2021.
- Tufik, S. *et al.* Obstructive sleep apnea syndrome in the Sao Paulo Epidemiologic Sleep Study. **Sleep Medicine**. 11:441. 2010.
- Van der Spek, A. *et al.* Exome-Wide Meta-Analysis Identifies Rare 3'-UTR Variant in *ERCC1/CD3EAP* Associated with Symptoms of Sleep Apnea. **Frontiers in Genetics**. 8:151. 2017.
- Varstation<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil. Software. Disponível em: <https://varstation.com/>. Acesso em: 19 de abril de 2022.
- Walia, H. K. *et al.* Effect of Positive Airway Pressure Therapy on Drowsy Driving in a Large Clinic-Based Obstructive Sleep Apnea Cohort. **Journal of Clinical Sleep Medicine**. 15(11):1613-1620. 2019.
- Wang, H. *et al.* Admixture mapping identifies novel loci for obstructive sleep apnea in Hispanic/Latino Americans. **Human Molecular Genetics**. 28(4):675–687. 2019.
- Watanabe, T. *et al.* Contribution of body habitus and craniofacial characteristics to segmental closing pressures of the passive pharynx in patients with sleep-disordered breathing. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 165: 260–265. 2002.
- Waterhouse, A. *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**. 46, W296-W303. 2018.
- Wellman, A. *et al.* A method for measuring and modeling the physiological traits causing obstructive sleep apnea. **Journal of Applied Physiology**. 110:1627–1637. 2011.
- Wickramasekara, R. N.; Stessman, H. A. F. Histone 4 Lysine 20 Methylation: A Case for Neurodevelopmental Disease. **Biology (Basel)**. 8(1):11. 2019.
- Wittine, L. M. *et al.* Effect of recording duration on the diagnostic accuracy of out-of-center sleep testing for obstructive sleep apnea. **Sleep**. 37(5):969-975. 2014.

- Xia, F. *et al.* De novo truncating mutations in *AHDC1* in individuals with syndromic expressive language delay, hypotonia, and sleep apnea. **American Journal of Human Genetics**. 94(5):784-789. 2014.
- Xia, F. Sawan, M. Clinical and Research Solutions to Manage Obstructive Sleep Apnea: A Review. **Sensors**. 21:1784. 2021.
- Xu, H. *et al.* Observation of novel *COX20* mutations related to autosomal recessive axonal neuropathy and static encephalopathy. **Human Genetics**. 138(7):749-756. 2019.
- Yang, H. *et al.* Primary synovial sarcoma of the duodenal bulb: a case report and review of the literature. **Translational Cancer Research**. (9):5663-5673. 2020.
- Younes, M. Role of arousals in the pathogenesis of obstructive sleep apnea. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 169:623–33. 2004.
- Young, T. *et al.* Burden of sleep apnea: rationale, design, and major findings of the Wisconsin Sleep Cohort study. **Wisconsin Medical Journal**. 108:246. 2009.
- Zheng, Y. Z. *et al.* SET-*NUP214*-positive pediatric acute myeloid leukemia: a report of two cases. **Chinese Journal of Hematology**. 42(9):769. 2021.
- Zhu, Z. *et al.* Shared genetic and experimental links between obesity-related traits and asthma subtypes in UK Biobank. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 145(2):537-549. 2020.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A – Tabela com identificação dos transcritos utilizados.

**Tabela 15** – Identificação dos transcritos utilizados para elaboração de *primers* específicos para as regiões das variantes estudadas em seus respectivos genes.

<b>Gene</b>	<b>rs</b>	<b>Transcrito</b>
<i>COX20</i>	<i>rs946982087</i>	ENST00000411948.7
<i>NUP214</i>	<i>rs902499481</i>	ENST00000359428.10
<i>GPR98</i>	<i>rs202211640</i>	ENST00000405460.9
<i>TLE1</i>	<i>rs1333105043</i>	ENST00000376499.8
<i>PKD1L2</i>	<i>rs79139155</i>	ENST00000337114.8
<i>TEX9</i>	<i>rs746610687</i>	ENST00000352903.6
<i>PTPDC1</i>	<i>rs61743388</i>	ENST00000620992.5
<i>TMOD4</i>	<i>rs141507115</i>	ENST00000295314.9

**APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Nº Registro COEP: 2.980.453

**Título do Projeto:** “AVALIAÇÃO DO PERFIL GENÉTICO E SUA CORRELAÇÃO COM FENÓTIPO DO PACIENTE COM APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO VISANDO O DIAGNÓSTICO PRECOCE E INTERVENÇÃO TERAPÊUTICA DIRECIONADA”

O senhor (a) está sendo convidado (a) a participar, como voluntário, na pesquisa intitulada: "AVALIAÇÃO DO PERFIL GENÉTICO E SUA CORRELAÇÃO COM FENÓTIPO DO PACIENTE COM APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO VISANDO O DIAGNÓSTICO PRECOCE E INTERVENÇÃO TERAPÊUTICA DIRECIONADA". O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que está sendo realizada. Sua colaboração neste estudo é muito importante, mas a decisão de participar deve ser sua. Para tanto, leia atentamente as informações abaixo. Se você não concordar em participar ou quiser desistir em qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você. Se você concordar em participar basta preencher os seus dados e assinar a declaração concordando com a pesquisa. Caso tenha alguma dúvida pode esclarecê-la com o responsável pela pesquisa, Dra. Maria de Lourdes Rabelo Guimarães. Obrigada.

**Objetivo do estudo**

A identificação dos genes e sua relação com os fenótipos da síndrome da apneia obstrutiva do sono fornecerá indicadores importantes para seu diagnóstico precoce, prevenção e intervenção terapêutica direcionada. O objetivo desse estudo é compreender os mecanismos genéticos envolvidos no surgimento e nas manifestações clínicas da síndrome da apneia obstrutiva do sono.

**Procedimentos**

Serão incluídos nesta pesquisa tanto indivíduos portadores da síndrome da apneia obstrutiva do sono, quanto alguns outros indivíduos não acometidos pela doença, desde que concordem e assinem o termo de consentimento livre e esclarecido. Não serão administrados aos pacientes quaisquer medicamentos. A única realização prática aos quais os pacientes serão submetidos será a coleta de sangue total (4 ml). O desconforto associado à coleta de sangue é o habitual de um exame de sangue de rotina. A coleta será realizada com material estéril, descartável e por pessoas devidamente treinadas. O material colhido será devidamente etiquetado e utilizado

somente para os propósitos dessa pesquisa, não havendo quaisquer custos para o paciente. Serão acessadas as informações de prontuários clínicos e dos exames de polissonografias já realizadas pelos participantes na empresa Águia Branca. As informações obtidas serão objeto de estrita confidencialidade e não envolvem custos ou pagamento de qualquer espécie.

### **Pesquisadores**

A equipe de pesquisadores é composta pelos seguintes pesquisadores: Dra. Luciana Bastos Rodrigues (coordenadora da pesquisa), professora do Departamento de Nutrição da UFMG e Dra. Maria de Lourdes Rabelo Guimarães, aluna de mestrado em Medicina Molecular da UFMG.

### **Confidencialidade**

Todos os dados dessa pesquisa serão mantidos em sigilo e apenas a equipe de pesquisadores terá acesso a eles. Os dados obtidos serão tratados de forma a resguardar o participante, e somente serão divulgados de forma agregada, sem possibilidade de identificação. Porém os resultados da pesquisa serão utilizados em trabalhos científicos publicados ou apresentados oralmente em congressos e palestras sem revelar sua identidade. Os dados obtidos durante a pesquisa são confidenciais e não serão usados para outros fins.

<b>RUBRICAS</b>	
Voluntário/Participante	Pesquisador Responsável
_____ <b>Assinatura</b>	_____ <b>Assinatura</b>
<b>Nome:</b> _____ <b>CPF:</b> _____. _____. _____. - ____	<b>Nome:</b> _____ <b>CPF:</b> _____. _____. _____. - ____

**APÊNDICE C – Artigo Científico**

**Programa de Pós-graduação:  
Farmacologia Bioquímica e Molecular/Medicina Molecular  
Faculdade de Medicina  
Universidade Federal de Minas Gerais**

17<sup>h</sup> June 2022

To  
Dr Alon Avidan, MD, MPH  
Associate Editor  
*Sleep*

Dear Dr Avidan

Please find enclosed our manuscript entitled “Whole-exome identifies germline variants in families with Obstructive Sleep Apnea Syndrome (OSAS)”, which I and my co-authors have seen and approved. To our knowledge, this is the first report of exome analysis in families with OSAS.

This manuscript is original, has not been published nor is being considered for publication elsewhere and was conducted after being approved by the University Ethics Committee.

We hope you will find this manuscript suitable for publication in *Sleep*.

We would be glad to provide any further information needed.

Yours faithfully

Luciana Bastos-Rodrigues, PhD

Department of Nutrition  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Av. Alfredo Balena 190 - room 114  
Belo Horizonte – 30130-100  
Brazil  
e-mail: lu.bastosr@gmail.com  
Phone/Fax: +55 31 3409-9134

Manuscripts submitted to Sleep

**OXFORD** | **SLEEP**  
UNIVERSITY PRESS

**Whole-exome identifies germline variants in families with  
Obstructive Sleep Apnea Syndrome (OSAS)**

Journal:	<i>Sleep</i>
Manuscript ID	SLEEP-2022-0470
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	17-Jun-2022
Complete List of Authors:	Azevedo, Pedro; Universidade Federal de Minas Gerais, Centro de Tecnologia em Medicina Molecular Guimarães, Maria de Lourdes; Universidade Federal de Minas Gerais, Centro de Tecnologia em Medicina Molecular Albuquerque, Anna Luiza ; Universidade Federal de Minas Gerais, Centro de Tecnologia em Medicina Molecular Alves, Rayane ; Universidade Federal de Minas Gerais, Centro de Tecnologia em Medicina Molecular Gomes-Fernandes, Bianca; Universidade Federal de Minas Gerais, Centro de Tecnologia em Medicina Molecular Melo, Flavia; Universidade Federal de Minas Gerais, Centro de Tecnologia em Medicina Molecular Friedman, Eitan; Tel Aviv University, The Preventive Personalized Medicine Center De Marco, Luiz; Universidade Federal de Minas Gerais, Department of Surgery; Universidade Federal de Minas Gerais, Department of Surgery bastos-rodrigues, luciana; Universidade Federal de Minas Gerais, Department of Nutrition; Universidade Federal de Minas Gerais, Department of Nutrition
Keywords:	
Please select below if your paper belongs to the Call for Papers. <p>SUBMISSION CRITERIA for the Call for Papers can be found <a href="https://academic.oup.com/sleep/pages/big_data_cfp" target="_new">here</a></p>	
Section:	
Keywords Pick List:	

<https://mc.manuscriptcentral.com/jsleep>



1  
2  
3 **Whole-exome identifies germline variants in families with Obstructive Sleep**  
4 **Apnea Syndrome (OSAS)**  
5  
6  
7  
8  
9

10 Pedro Guimarães de Azevedo<sup>1</sup>, Maria de Lourdes Rabelo Guimarães<sup>1</sup>, Anna Luiza Braga  
11 Albuquerque<sup>1</sup>, Rayane Benfica Alves<sup>1</sup>, Bianca Gomes Fernandes<sup>1</sup>, Flavia Marques de  
12 Melo<sup>1</sup>, Eitan Friedman<sup>2</sup>, Luiz De Marco<sup>1,3</sup>; Luciana Bastos-Rodrigues<sup>1,4\*</sup>  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20

21 <sup>1</sup>Centro de Tecnologia em Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade  
22 Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 30130-100, Brazil;  
23  
24

25 <sup>2</sup>The Preventive Personalized Medicine Center, Assuta Medical Center and the Sackler  
26 School of Medicine, Tel-Aviv University, Tel-Aviv, Israel.  
27  
28

29 <sup>3</sup>Department of Surgery, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.  
30  
31

32 <sup>4</sup>Department of Nutrition, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

40 \*To whom correspondence should be addressed:  
41

42 Luciana Bastos-Rodrigues  
43

44 Department of Nutrition, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.  
45

46 Centro de Tecnologia em Medicina Molecular, Faculdade de Medicina  
47

48 Av. Alfredo Balena, 190, room 114; Belo Horizonte 30130-100; Brazil.  
49

50 Phone: +55 31 3409-9134  
51

52 E-mail: lu.bastosr@gmail.com  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Abstract

**Study Objectives** – Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is characterized by complete or partial obstruction of the upper airways, resulting in periods of sleep associated apnea. OSAS increases morbidity and mortality risk from cardiovascular and cerebrovascular diseases. While heritability of OSAS is estimated at ~40%, the precise underlying genes remain elusive. Therefore, we aim to define the genetic basis of seemingly monogenic OSAS in two Brazilian families.

**Methods** – Brazilian families with OSAS that follows as seemingly autosomal dominant inheritance pattern were recruited. Whole exome sequencing of germline DNA and the generated data were analyzed using Mendel,MD software. Variants selected were analyzed using Varstation® with subsequent analyses that included validation by Sanger sequencing, pathogenic score assessment by ACMG criteria, co-segregation analyses (when possible) allele frequency, tissue expression patterns, pathway analyses, effect on protein folding modeling using Swiss-Model and RaptorX.

**Results** – Two families (six affected OSAS cases and three unaffected controls) were analyzed. A comprehensive multistep analysis yielded variants in *COX20* (*rs946982087*) (family A), *PTPDC1* (*rs61743388*) and *TMOD4* (*rs141507115*) (family B) that seemed to be strong candidate genes for being OSAS associated genes in these families.

**Conclusions** – Sequence variants in *COX20*, *PTPDC1* and *TMOD4* seemingly are associated with OSAS phenotype in these families. Further studies in more, ethnically diverse families and non-familial OSAS cases are needed to better define the role of these variants as contributors to OSAS phenotype.

**Keywords:** Obstructive Sleep Apnea, OSAS, whole-exome sequencing, Candidate genes.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Introduction

Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) (OMIM #107650) affects 936 million adults worldwide [1] and is hallmarked by the interruption of or a significant decrease in airflow in the presence of respiratory effort during sleep, leading to increased sleepiness and significantly increases cardiovascular morbidity and mortality risks [2]. While the precise etiological factors for OSAS are not clear, disturbances in ventilatory control, craniofacial anatomy, and being overweight, as well as genetic factors are major contributors to OSAS [3].

Familial clusters of OSAS have been reported and in fact heritability and genetic factors have been estimated to contribute ~40% to OSAS phenotype [4, 5]. Over the past few years, sequence variants in candidate genes seemingly associated with OSAS (as objectively quantified by AHI [(apnea–hypopnea index (AHI), defined as the number of apnea and hypopnea events per hour of sleep (American Academy of Sleep Medicine, 2014) [6] have been reported [7], as well as variants identified in the course of admixture mapping [8] and genome wide association studies (GWAS) [9]. However, few genes have been reported and validated as “OSAS genes” using these approaches. The aim of the current study was to identify pathogenic germline sequence variants that could be associated with predisposition and/or development of OSAS using whole-exome DNA sequencing of individuals from two Brazilian OSAS families.

## Materials and methods

### *Clinical Case identification and recruitment*

The study encompassed individuals from two Brazilian families displaying OSAS in at least two generations (Figure 1). These families were referred to the School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais. They underwent the OSAS evaluation

1  
2  
3 protocol as previously described [10]. All OSAS diagnoses were based on the established  
4  
5 criteria as specified by the American Academy of Sleep Medicine (2014)[6]. The  
6  
7 experimental protocols were approved by the Institutional Review Board at the  
8  
9 Universidade Federal de Minas Gerais (CEP UFMG 2.980.453). All participants signed  
10  
11 an informed consent.  
12  
13  
14  
15

#### 16 *DNA Extraction from Peripheral Blood Leukocytes*

17  
18 Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples of participants using  
19  
20 standard protocols [11]. The quality and quantity of each DNA sample were tested by  
21  
22 NanoDrop ND -2000 UV-Vis Spectrophotometer (ThermoFisher, Waltham, MA).  
23  
24  
25  
26  
27

#### 28 *Whole-Exome Sequencing*

29  
30 DNA was subjected to whole exome capturing and sequencing using the Roche  
31  
32 NimbleGen V2 chip (Madison, WI) or Nextera (San Diego, CA) with the Illumina  
33  
34 HiSeq2000 sequencing platform (San Diego, CA) [12]. Sanger sequencing was used to  
35  
36 validate all pathogenic variants identified via WES.  
37  
38  
39  
40  
41

#### 42 *Variant Calling and Annotation*

43  
44 For each studied sample, raw sequence files were prepared using the Genome  
45  
46 Analysis Tool Kit (GATK). Each fastq file was aligned against the human hg19/GRCh37  
47  
48 reference genome and a variant call format (VCF) file generated for each sample. PCR  
49  
50 duplicates were removed using Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard/>), reads  
51  
52 around known and detected indels were realigned, and base quality was recalibrated using  
53  
54 GATK.  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 VCF files were analyzed using two different tools: *Mendel, MD*, available at  
4 <https://mendelmd.org/> [13] and Varstation® (available at <https://varstation.com/>). Only  
5 variants selected by both software and excluding those common to cases and controls  
6 were further analyzed according to the ACMG Standards and guidelines [14], using  
7 published data and the VarSome platform (<https://varsome.com>). Following these  
8 filtering steps, data were manually reviewed to generate a final candidate gene list (Figure  
9 2).

#### 20 21 *WES sequence data validation*

22 Validation of the candidate pathogenic variants was carried out using Sanger  
23 sequencing. In addition, allele frequencies of all candidate variants were queried with  
24 data derived from The Genome Aggregation Database (gnomAD;  
25 <https://gnomad.broadinstitute.org/>; accessed 22<sup>nd</sup> May 2022) as well as the AbraOM:  
26 Online Archive of Brazilian Mutations database (<https://abraom.ib.usp.br/>; accessed 12<sup>th</sup>  
27 May 2022).

#### 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 *Structural effect prediction*

41 Wild-type protein models were established according to protein sequence  
42 available at UniProt (<https://www.uniprot.org/blast/>). To obtain model of proteins  
43 predicted to be derived from the specific gene variants, Swiss-Model  
44 (<https://swissmodel.expasy.org>) and RaptorX (<http://raptosx.uchicago.edu>) were used.  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52

## 53 **Results**

### 54 55 56 *Clinical data*

57  
58  
59  
60

1  
2  
3 The study included nine individuals from two Brazilian families displaying a  
4 seemingly autosomal dominant inheritance pattern of OSAS (Figure 1). Table 1  
5 summarizes all relevant clinical and laboratory data.  
6  
7  
8  
9

#### 10 11 12 *WES and subsequent analyses*

##### 13 14 *Family A*

15 A total of 38,612 common variants in 7,462 genes were detected in two affected  
16 individuals of family A (II.4 and III.2). After the initial filtering steps (see Methods) a  
17 total of 13 heterozygous sequence variants in 13 genes were selected for further analyses.  
18 After ACMG pathogenicity classification, Sanger sequence validation, and co-  
19 segregation analyses, only one variant remained as a possible OSAS-related genetic  
20 variant (*COX20*, *rs946982087*) (Figure 2 and Table 2). This variant is not reported in the  
21 Brazilian population according to the AbraOM database (<https://abraom.ib.usp.br/>) or in  
22 the GnomAD database (gnomAD; <https://gnomad.broadinstitute.org/>).  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34

35 The predicted effect of this sequence variant on protein structure by the Swiss  
36 Model/MolProbity (<https://swissmodel.expasy.org/>) is to eliminate the Glu9-Glu11  
37 hydrogen bond [15] thereby destabilizing the protein (Figure 3).  
38  
39  
40  
41

##### 42 *Family B*

43 A total of 40,318 sequence variants shared by the three affected individuals of  
44 family B (I.1, II.1 and II.3) were present in 6,526 genes. After the initial filtering steps  
45 (Figure 2 and Table 3), two missense variants in two genes (*PTPDC1* and *TMOD4*) were  
46 selected as candidate genes for validation (Table 3). The reported frequency of these  
47 variants in the Brazilian population (<https://abraom.ib.usp.br/>) was 0.0017 for *PTPDC1*  
48 and 0.00042 for *TMOD4*, respectively. In the GnomAD database the reported frequencies  
49 are 0.00046 for *PTPDC1* and 0.00097 for *TMOD4* (<https://gnomad.broadinstitute.org/>),  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 respectively. No segregation analysis was performed in this family due the lack of  
4  
5 available samples.  
6

7  
8 The pathogenicity of *PTPDC1* variant (*rs61743388*) was investigated. The  
9  
10 substitution p.Trp159Cys occurs in the tyrosine-protein phosphatase domain, known to  
11  
12 be involved in the control of processes such as cellular division and differentiation and  
13  
14 was predicted to be pathogenic according to software that estimates the impact on the  
15  
16 biological function of a protein, such as PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>),  
17  
18 MutationTaster (<https://www.mutationtaster.org/>) and SIFT ([https://sift.bii.a-](https://sift.bii.a-star.edu.sg/)  
19  
20 [star.edu.sg/](https://sift.bii.a-star.edu.sg/)) (Figure 4).  
21  
22

23  
24 TMOD4 protein is highly evolutionarily conserved between the amino acids 1-  
25  
26 151 and 172-344, encompassing the mutated residue p.Gly323Arg. This missense variant  
27  
28 localizes at the beginning of an alpha helix and hence may be deleterious for its function,  
29  
30 according to Mutation Taster analysis (Figure 5).  
31

### 32 33 34 35 Discussion

36  
37 In this study, three heterozygous sequence variants that seemingly exert a  
38  
39 deleterious effect on protein function in three genes (*COX20*, *PTPDC1*, and *TMOD4*)  
40  
41 were identified in two Brazilian OSAS families. The involvement of these three genes in  
42  
43 the pathogenesis of OSAS is based on indirect lines of evidence. *COX20* is a nucleus-  
44  
45 encoded protein, essential for the assembly of the mitochondrial respiratory chain  
46  
47 complex IV (CIV)/ cytochrome C oxidase [16]. *COX20* assists in the stabilization and  
48  
49 translocation of newly synthesized *COX2* C-terminal into the intermembrane space  
50  
51 during CIV assembly and promotes the association between *COX2* and  
52  
53 metallochaperones *SCO1/2*, essential for the biogenesis of the cooper core in Complex  
54  
55 IV [17]. Consequently, limiting *COX20* levels was associated with unstable, degradable  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 COX2 proteins [18], resulting in impaired complex IV biogenesis and reduced respiratory  
4 capacity [19]. Homozygous *COX2* gene pathogenic variants lead to mitochondrial  
5 complex IV deficiency (OMIM# 220110), a disorder clinically hallmarked by  
6 neuromuscular findings such as hypotonia, dystonia, and ataxia [16, 20].  
7  
8 Polysomnography showed that individuals with central apnea and obstructive sleep  
9 apnea, display a decreased ventilatory drive in response to hypoxia and/or hypercapnia  
10 [21].  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18

19 Although not located in the transmembrane domains of COX20, p.Glu9Lys is at  
20 a position of considerable importance for the stability and functionality of COX20. This  
21 variant is predicted (but shown conclusively) to disrupt protein structure causing the loss  
22 of an important hydrogen bond.  
23  
24  
25  
26  
27

28 In family B, sequence variants in two genes seemingly underlie OSAS  
29 pathogenesis. While the precise function of the Protein tyrosine phosphatase domain-  
30 containing 1 (PTPDC1) protein is yet to be elucidated, its down regulation has been  
31 associated with phenotypes such as obesity [22] and dementia [23]. Functionally,  
32 PTPDC1 protein is involved in cilium assembly and degradation, directing fluid  
33 movement (motile cilia), sensing extracellular environment, and controlling signal  
34 transduction pathways (primary cilia). Thus, PTPDC1 depletion leads to an increase in  
35 cilia length, suggesting that it negatively regulates cilia length via increased anterograde  
36 transport [24].  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48

49 The other variant present in family B is *TMOD4*, one of the four members of the  
50 Tropomodulin family, a group of proteins that bind to the pointed ends of actin filaments  
51 thereby stabilizing them and inhibiting filament elongation [25]. *TMOD4* gene is highly  
52 expressed in skeletal muscle and heart [26]. The Inactivating biallelic pathogenic  
53 sequence variants in the *TMOD4* have been associated with myopathy, (e.g., nemaline  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 myopathy OMIM #609284) also reported in zebrafish-mutated model [27], suggesting  
4  
5 that *TMOD4* mutations may lead to OSAS relevant myopathy, in the intercostal muscles  
6  
7 and/or diaphragm.  
8  
9

10 An OSAS -like phenotype has previously been reported in cases with nemaline  
11  
12 myopathy [28, 29]. Sasaki *et al.* (1997), reported the results of polysomnography in two  
13  
14 nemaline myopathy (NM) cases who had apnea or irregular chest movements with  
15  
16 hypercapnia that occurred only during REM sleep. Cook and Berkowitz (2005) [29] also  
17  
18 described a milder form of NM in a child who presented at polysomnography, severe  
19  
20 obstructive sleep apnea with an oxygen saturation nadir of 55% during REM sleep. Thus,  
21  
22 these single reports are in line with the notion that loss of function in *TMD04* may play  
23  
24 a role in muscle strength and may contribute to OSAS pathogenesis.  
25  
26

27  
28 The wild-type amino acids in *COX20*, *PTPDC1* and *TMOD4* are highly conserved  
29  
30 between species, which demonstrates its evolutionary relevance. Additionally, it is  
31  
32 interesting to notice that the variants observed are rare in general population,  
33  
34 demonstrating that it could be related to less adaptive subjects.  
35  
36

37  
38 Noteworthy, none of the above cited variants or other variants in the three genes  
39  
40 reported herein have been identified in previous OSAS-GWAS studies. A search in  
41  
42 GWAS catalog (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/genes>) for variants within 150Kb of the  
43  
44 variants reported in the current study led to no results associated with sleep apnea. A  
45  
46 possible reason is that SNPs of modest effect are missed as they do not reach a  
47  
48 significance threshold [30].  
49  
50

51  
52 The limitations of our study should be acknowledged. The number of analyzed  
53  
54 individuals from two families is limited and no segregation analysis could be performed  
55  
56 in one of the two families. The results reported herein may only pertain to OSAS cases  
57  
58 from Brazil.  
59  
60

1  
2  
3 In conclusion, the present study suggests that sequence variants in the *COX20*,  
4 *PTPDC1*, and *TMD04* genes could be associated with OSAS phenotype in Brazilian  
5 families. The putative involvement of these genes in OSAS phenotype needs to be  
6 validated and expanded using more families of diverse ethnicity.  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14

#### 15 **Acknowledgments**

16 This work was partially funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
17 Tecnológico (CNPq# 405053/2013-4), CAPES and Fundação de Amparo à Pesquisa de  
18 Minas Gerais (FAPEMIG# CDS-RED-00019-16).  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

#### 26 **Financial Disclosure Statement**

27 None  
28  
29  
30  
31  
32

#### 33 **Non-financial Disclosure Statement**

34 The authors report no conflicts of interest.  
35  
36  
37  
38  
39

#### 40 **Data Availability Statement**

41 Bam files are available upon request  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## References

1. Benjafield AV, Ayas NT, Eastwood PR, et al. Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis. *Lancet Respir Med*. 2019;7(8):687-698.
2. Lévy P, Kohler M, McNicholas WT et al. Obstructive sleep apnea syndrome. *Nat Rev Dis Primer*. 2015;1(1):15015
3. Peppard PE, Hagen EW. The last 25 years of obstructive sleep apnea epidemiology—and the next 25? *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;197(3):310–2.
4. Redline S, Tishler PV, Tosteson TD et al. The familial aggregation of obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 151:682–687.
5. Patel SR, Larkin EK, Redline S. Shared genetic basis for obstructive sleep apnea and adiposity measures. *Int J Obes*. 2008;32(5):795–800.
6. American Academy of Sleep Medicine. *International Classification of Sleep Disorders*, 3rd ed, American Academy of Sleep Medicine. 2014.
7. Larkin EK, Patel SR, Goodloe RJ et al. A candidate gene study of obstructive sleep apnea in European Americans and African Americans. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 182:947–953.
8. Wang H, Cade BE, Sofer T et al. Admixture mapping identifies novel loci for obstructive sleep apnea in Hispanic/Latino Americans. *Hum Mol Genet*. 2019;28(4):675–87.
9. Cade BE, Lee J, Sofer T *et al*. Whole-genome association analyses of sleep-disordered breathing phenotypes in the NHLBI TOPMed program. *Genome Med*. 13,136. 2021.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

10. Kapur VK, Auckley DH, Chowdhuri S. Clinical practice guideline for diagnostic testing for adult obstructive sleep apnea: An American Academy of Sleep Medicine Clinical Practice Guideline. *J Clin Sleep Med*. 2017;13(3):479-504.
11. Lahiri DK, Nummerger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991; 19:5444.
12. Horn S. Target enrichment via DNA hybridization capture. *Methods Mol Biol*. 2012; 840:177–188.
13. Cardenas R, D Linhares N, Ferreira R, Pena SDJ. MendelMD: A user-friendly open-source web tool for analyzing WES and WGS in the diagnosis of patients with Mendelian disorders. *PLOS Computational Biology*. 2017;13(6):e1005520.
14. Richards S, Aziz N, Bale S. *et al*. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015; 17:405–423.
15. Jumper J, Evans R, Pritze, A. *et al*. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021;596(7873):583-589.
16. Szklarczyk R, Wanschers BF, Nijtmans LG et al. A mutation in the FAM36A gene, the human ortholog of COX20, impairs cytochrome c oxidase assembly and is associated with ataxia and muscle hypotonia. *Hum Mol Genet*. 2013;22(4):656-667.
17. Lorenzi I, Oeljeklaus S, Aich A et al. The mitochondrial TMEM177 associates with COX20 during COX2 biogenesis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2018;1865(2):323-333.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

18. Bourens M, Boulet A, Leary SC, Barrientos A. Human COX20 cooperates with SCO1 and SCO2 to mature COX2 and promote the assembly of cytochrome c oxidase. *Hum Mol Genet.* 2014;23(11):2901-13.
19. Otero MG, Tiongson E, Diaz F. Novel pathogenic COX20 variants causing dysarthria, ataxia, and sensory neuropathy. *Ann Clin Transl Neurol.* 2018;6(1):154-160.
20. Doss S, Lohmann K, Seibler P et al. Recessive dystonia-ataxia syndrome in a Turkish family caused by a COX20 (FAM36A) mutation. *J Neurol.* 2014;261(1):207-12.
21. Brunetti V, Della Marca G, Servidei S, Primiano G. Sleep disorders in mitochondrial diseases. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2021;21(7):30.
22. Zhu Z, Guo Y, Shi H et al. Shared genetic and experimental links between obesity-related traits and asthma subtypes in UK Biobank. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;145(2):537-549. Erratum in: *J Allergy Clin Immunol.* 2022;149(4):1486-1489.
23. Wang H, Yang J, Schneider JA, De Jager PL, Bennett DA, Zhang HY. Genome-wide interaction analysis of pathological hallmarks in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2020; 93:61-68.
24. Lai CK, Gupta N, Wen X et al. Functional characterization of putative cilia genes by high-content analysis. *Mol Biol Cell.* 2011;22(7):1104-19.
25. Fischer RS, Fowler VM. Tropomodulins: life at the slow end. *Trends Cell Biol.* 2003;13(11):593-601.
26. Cox PR, Zoghbi HY. Sequencing, expression analysis, and mapping of three unique human tropomodulin genes and their mouse orthologs. *Genomics.* 2000;63(1):97-107.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

27. Berger J, Tarakci H, Berger S et al. Loss of Tropomodulin4 in the zebrafish mutant *träge* causes cytoplasmic rod formation and muscle weakness reminiscent of nemaline myopathy. *Dis Model Mech*. 2014;7(12):1407-15.
28. Sasaki M, Takeda M, Kobayashi K, Nonaka I. Respiratory failure in nemaline myopathy. *Pediatr Neurol*. 1997;16(4):344-6.
29. Cook BJ, Berkowitz RG. Tracheostomy in children with nemaline core myopathy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2005;69(2):263-6.
30. Eichler EE, Flint J, Gibson G et al. Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nat Rev Genet*. 2010; 11:446–450.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

#### Figure Legends

Figure 1 Pedigree status from families A and B, with respect to OSA and the genotypes for each identified heterozygous mutation. Circles and squares represent female and male members, respectively. The proband is indicated by a black arrow. Deceased members are shown by diagonal lines. Black squares represent affected individuals; blank eigenforms indicate unaffected individuals; \*DNA from individuals submitted to exome analysis; \*individual who participated only in the segregation study. (a) pedigree from family A; (b) pedigree from family B.

Figure 2 Flowchart of variant analyses method. Family A: After ACMG & AMP analysis, six missense variants classified as "uncertain significance" were considered candidates for validation by Sanger sequencing (*COX20*, *NUP214*, *GPR98*, *TLE1*, *PKD1L2*, *TEX9*). Missense variants of the *GPR98*, *TEX9* and *PKD1L2* genes present in the exome analysis were not validated or confirmed in the two affected individuals. The missense variants of the *NUP214* and *TLE1* genes were validated in the samples submitted to exome analysis, but they were not found in individual II.2 in the segregation study. Family B: Using filters by Mendel, MD and Varstation\*, 10 variants were identified, all in heterozygosity, present in 10 genes. After ACMG & AMP analysis two variants (*PTPDC1* and *TMOD4*) were validated by Sanger sequencing and considered in this study.

Figure 3 Effects of the altered residue on COX20 protein. (A), Schematic model of the domains of COX with the localization of the variant residue. The position of the variant E9K detected in the GAG is represented by a diamond. (B),

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Sequence alignments showing homology between the topological domain of the COX20 protein from different species (*H. sapiens*, *P. troglodytes*, *M. mulatta*, *M. musculus*, *D. rerio*, *D. melanogaster*), highlighting the conservation of the variable residue E9K (in blue) (Mutation Taster score: 56). (C), Modeling of COX20 active site structure showing in the wild type of the charged residues. Highlighted, the site of the misfolding substitution at Glu9 to Lys9 (p.E9K) (Protein Data Base ID: Q5RI15).

Figure 4 Effects of the altered residue on PTPDC1 protein. (A), Schematic model of PTPDC1 domains with the localization of the variant residues: PTP, protein tyrosine phosphatase;  $\alpha$ Sol, depicts a helical solenoid fold. The position of the variant W159C detected in the TGG is represented by a diamond. (B), Sequence alignments showing homology between the PTP domain of the PTPDC1 protein from different species (*H. sapiens*, *P. troglodytes*, *M. mulatta*, *F. catus*, *M. musculus*), highlighting the strong conservation of the variable residue W159C (in blue) (phyloP100way = 9,91 is greater than 7,2). (C), Modeling of PTPDC1 active site structure showing in the wild type the charged residues. Highlighted, the site of the misfolding substitution at Trp290 to Cys290 (p.W159C) (Protein Data Base ID: A2A3K4).

Figure 5 Effects of the altered residue on TMOD4 protein. (A), Schematic model of TMOD4 domains with the localization of the variant residue. The position of the variant G323W detected in the GGG is represented by a diamond. (B), Sequence alignments showing homology between the actin binding domain of the TMOD4 protein from different species (*H. sapiens*, *P. troglodytes*, *M. mulatta*, *F. catus*, *M. musculus*, *T. rubripes*, *D. rerio*, *X. tropicalis*),



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

highlighting the strong conservation of the variable residue G323W (in blue) (phyloP100way = 7,71 is greater than 7,2). (C), Modeling of TMOD4 structure showing in the wild type the charged residues. Highlighted, the site of the misfolding substitution at Gly323 to Arg323 (p.G323W) (Protein Data Base ID: Q9NZQ9).

For Review Only

Table 1. Clinical and laboratory data of the individuals studied

Patient	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Age (Years)	AHI (ev./h)	Min Sat. (%)	Mean Sat. (%)	Time below 90%	Desat Index (%)	Arousal	CPK	Myogl (mcg/L)	Snore	Nose Brea	Palate	Mallampati	Malocclusion (Class)
Family A															
II.2	22,6	73	19,8	79,0	85,0	6,8	13,1	18,6	46,0	13,5	Present	Satisf	Ogival	IV	I
II.4	25,1	71	13,2	82,0	88,0	6,5	16,9	22,9	78,0	18,0	Present	Satisf	Ogival	IV	II
II.5	22,2	70	4,6	92,0	96,0	0,0	4,3	3,2	na	na	Present	Satisf	Ogival	IV	I
III.1	20,7	41	0,4	91,0	96,0	0,0	0,4	0,8	33,0	2,8	Present	Satisf	Ogival	IV	III
III.2	25,5	39	22,9	80,0	86,0	7,0	18,2	0,0	na	na	Present	Satisf	Ogival	IV	I
Family B															
I.1	29,6	86	17,1	88	92	5,8	11,7	24,2	61,3	8,0	Present	Satisf	Ogival	IV	I
II.1	24,5	59	9,9	87	92	4,1	9,0	14,2	57,2	12,5	Present	Satisf	Ogival	IV	II
II.2	35,0	57	4,8	90	95	0,1	3,1	1,8	31,5	5,0	Absent	Satisf	Ogival	IV	I
II.3	33,8	50	23,3	85	89	6,3	13,5	19,6	na	Na	Present	Satisf	Ogival	IV	III
II.4	32,3	48	3,6	91	96	0,8	2,4	1,0	na	na	Absent	Satisf	Ogival	III	I

BMI = Body Mass Index; AHI = Apnea – Hypopnea Index (events/hour); Min Sat. = Minimum Saturation %; Mean Sat. = Mean Saturation%; Desat Index = desaturation index %; CPK = serum creatine phosphokinase (Reference Value: Women: 26-140U/L, Man: 38-174U/L); Miogl = serum myoglobin (Reference Value: <90mcg/L); Nose Brea = nose breathing; Satisf = Satisfactory; na = not available.

Table 2. Summary of validation of family A sequencing

		Genes					
		<i>NUP214</i>	<i>GPR98</i>	<i>TLE1</i>	<i>TEX9</i>	<i>PKD1L2</i>	<i>COX20</i>
Su							p.Glu9L
	bj	p.Lys1037G	p.Pro2939T	p.Leu608P	p.Gly3A	p.Leu276P	ys
		lu	hr	ro	rg	he	Gag/Aa
		Aaa/Gaa	Ccc/Acc	cTa/cCa	Ggg/Cgg	Ctc/Ttc	g
WES	II.4	A/G	C/A	T/C	G/G	C/T	G/A
	II.5	A/A	C/C	T/T	G/G	C/C	G/G
	III.						
	1	A/A	C/C	T/T	G/G	C/C	G/G
	III.						
S	2	A/G	C/C	T/C	G/C	C/C	G/A
	II.2	A/A	--	T/T	--	--	G/A

S, segregation study; Subj, subjects; WES, whole exome sequencing; shaded squares

indicate affected individuals.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Table 3. Summary of validation of family B sequencing**

		Genes	
		<i>PTPDC1</i>	<i>TMOD4</i>
Subj.		p.Trp159Cys	p.Gly323Arg
		tgG/tgT	Ggg/Agg
WES	I.1	G/T	G/A
	II.1	G/T	G/A
	II.2	G/G	G/G
	II.3	G/T	G/A

Subj, subjects; WES, whole exome sequencing;

shaded squares indicate affected individuals.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

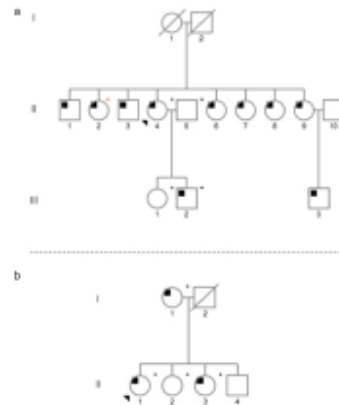


Figure 1 Pedigree status from families A and B, with respect to OSA and the genotypes for each identified heterozygous mutation. Circles and squares represent female and male members, respectively. The proband is indicated by a black arrow. Deceased members are shown by diagonal lines. Black squares represent affected individuals; blank eigenforms indicate unaffected individuals; \*DNA from individuals submitted to exome analysis; \*individual who participated only in the segregation study. (a) pedigree from family A; (b) pedigree from family B.

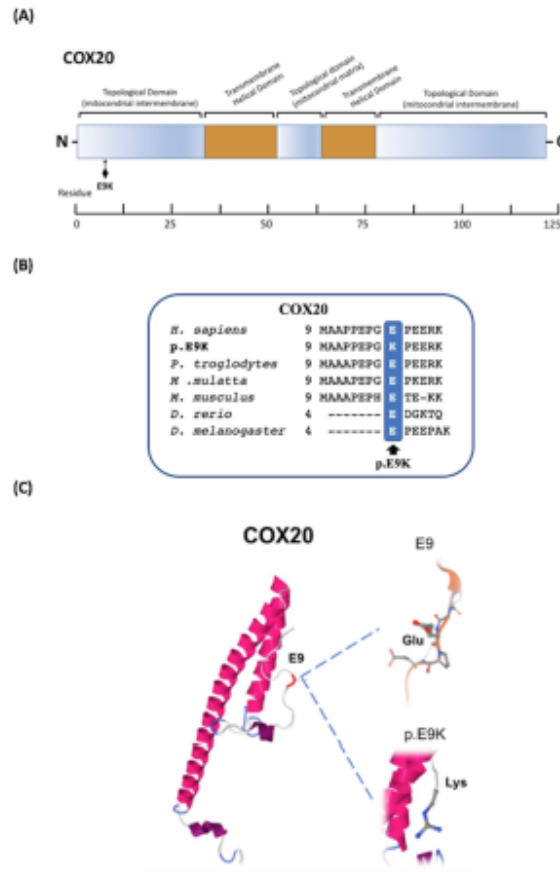
108x60mm (300 x 300 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



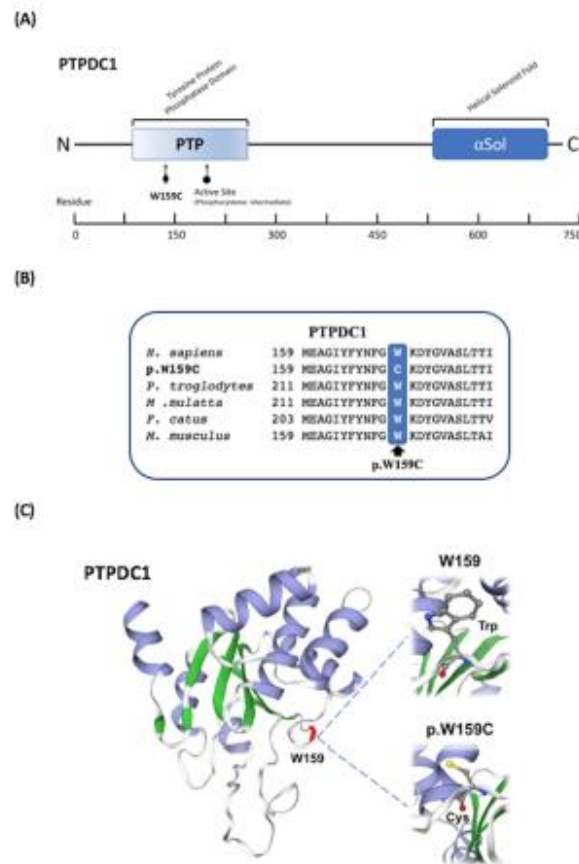
Figure 2 Flowchart of variant analyses method. Family A: After ACMG & AMP analysis, six missense variants classified as "uncertain significance" were considered candidates for validation by Sanger sequencing (COX20, NUP214, GPR98, TLE1, PKD1L2, TEX9). Missense variants of the GPR98, TEX9 and PKD1L2 genes present in the exome analysis were not validated or confirmed in the two affected individuals. The missense variants of the NUP214 and TLE1 genes were validated in the samples submitted to exome analysis, but they were not found in individual II.2 in the segregation study. Family B: Using filters by Mendel, MD and VarStation®, 10 variants were identified, all in heterozygosity, present in 10 genes. After ACMG & AMP analysis two variants (PTPDC1 and TMOD4) were validated by Sanger sequencing and considered in this study.

108x60mm (300 x 300 DPI)



45 Figure 3 Effects of the altered residue on COX20 protein. (A), Schematic model of the domains of COX with  
46 the localization of the variant residue. The position of the variant E9K detected in the GAG is represented by  
47 a diamond. (B), Sequence alignments showing homology between the topological domain of the COX20  
48 protein from different species (*H. sapiens*, *P. troglodytes*, *M. mulatta*, *M. musculus*, *D. rerio*, *D.*  
49 *melanogaster*), highlighting the conservation of the variable residue E9K (in blue) (Mutation Taster score:  
50 56). (C), Modeling of COX20 active site structure showing in the wild type of the charged residues.  
51 Highlighted, the site of the misfolding substitution at Glu9 to Lys9 (p.E9K) (Protein Data Base ID: Q5RI15).

52 197x302mm (300 x 300 DPI)

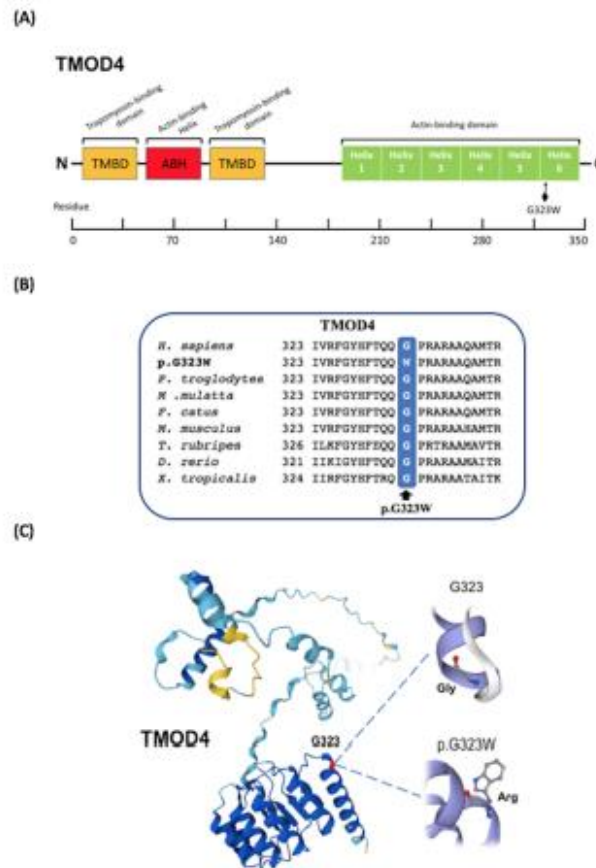


45 Figure 4 Effects of the altered residue on PTPDC1 protein. (A), Schematic model of PTPDC1 domains with the  
46 localization of the variant residues: PTP, protein tyrosine phosphatase;  $\alpha$ Sol, depicts a helical solenoid fold.

47 The position of the variant W159C detected in the TGG is represented by a diamond. (B), Sequence  
48 alignments showing homology between the PTP domain of the PTPDC1 protein from different species (*H.*  
49 *sapiens*, *P. troglodytes*, *M. mulatta*, *F. catus*, *M. musculus*), highlighting the strong conservation of the  
50 variable residue W159C (in blue) (phyloP100way = 9.91 is greater than 7.2). (C), Modeling of PTPDC1  
51 active site structure showing in the wild type the charged residues. Highlighted, the site of the misfolding  
52 substitution at Trp290 to Cys290 (p.W159C) (Protein Data Base ID: A2A3K4).

53 195x287mm (300 x 300 DPI)





45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Figure 5 Effects of the altered residue on TMOD4 protein. (A), Schematic model of TMOD4 domains with the localization of the variant residue. The position of the variant G323W detected in the GGG is represented by a diamond. (B), Sequence alignments showing homology between the actin binding domain of the TMOD4 protein from different species (*H. sapiens*, *P. troglodytes*, *M. mulatta*, *F. catus*, *M. musculus*, *T. rubripes*, *D. rerio*, *X. tropicalis*), highlighting the strong conservation of the variable residue G323W (in blue) (phyloP100way = 7,71 is greater than 7,2). (C), Modeling of TMOD4 structure showing in the wild type the charged residues. Highlighted, the site of the misfolding substitution at Gly323 to Arg323 (p.G323W) (Protein Data Base ID: Q9NZQ9).

196x283mm (300 x 300 DPI)