

P1074**Susceptibilidade genética e malformações cardíacas: análise de HAND2 na embriopatia da talidomida**

Bruna Duarte Rengel, Thayne Woycinck Kowalski, Julia do Amaral Gomes, Lavínia Schüler-Faccini, Lucas Rosa Fraga, Fernanda Sales Luiz Vianna - HCPA

Introdução: A talidomida, sintetizada na década de 50, leva a uma condição conhecida como Embriopatia da Talidomida (TE), que consiste no conjunto de malformações, especialmente nos membros, coração, olhos e orelhas. A focomelia é a anomalia mais observada nos membros e no coração as mais comuns são persistência do ducto arterial, defeito do septo ventricular, defeito do septo atrial e estenose pulmonar. HAND2 está envolvido na formação de diversos órgãos, com coração e membros, e é codificado pelo gene HAND2, o qual tem dois éxons. Um estudo recente identificou que HAND2 interage com TBX5 e que essa interação é inibida na presença de talidomida. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar o papel de HAND2 na susceptibilidade genética à TE. **Métodos:** O DNA foi extraído de amostras de saliva de 35 indivíduos com TE. Foi feito PCR para amplificação e sequenciamento Sanger dos éxons de HAND2. As sequências foram lidas com o programa CodonCode® Aligner v.3.0.1. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado por teste qui-quadrado. As análises in silico foram feitas com os programas PredictSNP2 e MutationTaster para predições de efeito das variantes na proteína; Human Splicing Finder para sítios de splicing; miRBase para sítios de miRNA; MethPrimer para alteração em ilhas CpG; Enhancer Atlas 2.0 para sítios de reforçadores; e pacote do R motifbreakR para alterações em sítios de fatores de transcrição. O software SPSS v.18 foi usado para as análises estatísticas. **Resultados:** Dos indivíduos avaliados, 12% (3/25) tem anomalias cardíacas congênitas e 52% (10/19) desenvolveram efeitos cardíacos ao longo da vida. Na análise de HAND2, observou-se uma variante polimórfica sinônima p.P51 (rs59621536) no éxon 1 de 3 indivíduos. Não foi observada nenhuma variante no éxon 2. As frequências genótípicas e alélicas de p.P51 foram diferentes entre o grupo TE e amostra de referência (banco de dados GnomAD) ($p=0,005$; $p=0,003$, respectivamente). Nas análises in silico, a variante foi classificada como neutra, sem alterações em sítios miRNA e sítios de splicing. Observou-se a alteração de duas ilhas CpG adjacentes à variante e modificação de sítios de ligação dos fatores de transcrição MECP2 e PLAG1. **Conclusões:** A variante p.P51 parece afetar a regulação de HAND2 por meio de alterações à nível epigenético já que não altera a estrutura proteica mas leva modificação de duas ilhas CpG e do sítio de ligação de MECP2, que realiza a regulação de sequências metiladas. **Unitermos:** Talidomida; HAND2; Cardiopatia congênita.

P1115**Investigação in silico de miRNAs e elementos regulatórios associados à 3'UTR do gene BTD**

Gerda Cristal Villalba Silva, Fernanda Ludwig-Sperb, Ida Vanessa Doederlein Schwartz - UFRGS

A biotinidase (EC 3.5.1.12) é a enzima responsável por liberar a biotina da biocitina, e atua como cofator para diversas carboxilases. A deficiência de biotinidase (DB), doença de herança autossômica recessiva, pode resultar em problemas neurológicos e dermatológicos quando não tratada precocemente. O gene que codifica a biotinidase, BTD, é composto por 4 éxons e sua região 3'UTR possui 329 pb. Regiões 3'UTR são sítio de ação de reguladores pós-transcricionais que influenciam na expressão gênica, entre eles os microRNAs (miRNAs). A investigação de miRNAs com alvos em BTD poderia contribuir na compreensão da relação entre o genótipo e o fenótipo bioquímico de pacientes, que nem sempre é clara. **Objetivos:** identificar miRNAs e outros elementos regulatórios que possam estar influenciando nos níveis da enzima biotinidase dos pacientes. **Metodologia:** Para predição dos miRNAs foram utilizados os softwares miRBase e miRTarBase, baseados em similaridade de sequência; StarBase e TarBase, que utilizam alinhamento múltiplo entre espécies; TargetScanHuman, que combina status de ligações termodinâmicas e conservação evolutiva; e o banco miRDB. Para a análise dos demais elementos regulatórios, utilizou-se o RegRNA2.0. **Resultados e discussão:** Foram encontrados 42 miRNAs pelo software miRBase; 11 pelo miRTarBase; 2 pelo StarBase, 22 pelo TarBase e 1 pelo TargetScanHuman. Estes miRNAs estão relacionados com sinalização celular; vias de glicosilação; metabolismo de arginina, biotina, tirosina e tiamina. Na rota metabólica da Biotina, foram identificados miRNAs em genes alvos que interagem com o BTD: SPCS1 e SPCS3, subunidades do complexo sinal da peptidase e HLCS, um importante regulador de carboxilases dependentes de biotina. Os principais miRNAs encontrados foram hsa-miR-7-5p, supressor de proliferação celular e indutor de apoptose, hsa-miR-34a-5p, relacionado com proliferação celular e hsa-miR-145, identificado em recém-nascidos e expresso no fígado. Além disso, foram encontrados 6 elementos ricos em AU associados à 3'UTR, cuja função foi elucidada em diversos estudos, sendo elas decaimento e regulação da instabilidade do mRNA, e resposta ao stress celular. A região 3'UTR do gene BTD não havia sido caracterizada anteriormente, e até o presente estudo não há interações fortemente validadas entre os miRNAs e o gene BTD, o que deixa sua validação experimental como uma perspectiva futura. **Número do Projeto:** 160480. **Apoio Financeiro:** FIPE-HCPA. **Unitermos:** Biotinidase; MiRNAs; Elementos ricos em AU.

P1147**Análise de regiões alvo no genoma humano para inserção de sequências usando sistema CRISPR/CAS9**

Paola Barcelos Carneiro, Marina Hentschke Lopes, Martiela Vaz de Freitas, Ursula da Silveira Matte - HCPA

Introdução: CRISPR (do inglês: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) é um mecanismo imune de procaríotos contra infecções virais aplicado à edição gênica em outros organismos. O funcionamento se baseia em uma endonuclease capaz de clivar em uma região específica mediada por uma sequência de RNA com 20 nucleotídeos complementar ao sítio-alvo. Esse sistema pode ser utilizado para inserção de sequências de DNA em regiões específicas. **Objetivo:** Neste contexto, o objetivo deste trabalho é avaliar duas regiões gênicas associadas aos loci THUMP3-AS1 e AAVS1 como potenciais sítios-alvo para inserção gênica. **Métodos:** Para isso utilizaram-se métodos de identificação de potenciais off-targets e de eficiência a partir de análises computacionais. Para a predição de off-targets as sequências foram submetidas à ferramenta CHOPCHOP utilizando como base o genoma humano. Além disso, três aspectos foram avaliados para escolha das sequências: o número de mismatches, o conteúdo GC e a eficiência da endonuclease. **Resultados:** Foram obtidas cinco sequências-alvo sem mismatch para THUMP3-AS1 e duas para AAVS1. O conteúdo GC ficou entre 50 e 70%, visto que esta é a porcentagem ideal para eficiência do sistema no que se refere à estabilidade da molécula híbrida de DNA e RNA e à concentração de domínios CG. Além desses critérios, também foi levada em consideração a eficiência de corte associado à região PAM adjacente a sequência do sítio-alvo. Para confirmar a predição realizada pela ferramenta CHOPCHOP, as sequências foram submetidas a um alinhamento local com a utilização da ferramenta BLASTn. A avaliação foi estipulada levando em consideração as regiões seed (localizadas a 10-12 nucleotídeos a montante do códon PAM) e PAM, que são determinantes na complementaridade do mRNA e atividade da Cas9, respectivamente. A averiguação confirmou

que, a partir do banco de dados de sequência nucleotídicas do NCBI, não há potenciais off-targets das sequências estabelecidas em outro local no genoma humano. Por conseguinte, três sequências de 23 pares de bases foram escolhidas com base nos critérios mencionados. Conclusão: A seguir, essas sequências serão submetidas a ensaios experimentais por intermédio de cultivo celular para a confirmação in vitro da predição de off-targets. Unitermos: CRISPR-CAS9; Off-target; Terapia gênica.

P1151

Investigação clínica e análise por hibridização in situ fluorescente (FISH) em pacientes com suspeita de síndromes de microdeleções cromossômicas

Bruna Lixinski Diniz, Maiara Anschau Floriani, Andressa Schneiders Santos, Andressa Barreto Glaeser, Luiza Emy Dorfman, Rafael Fabiano Machado Rosa, Paulo Ricardo Gazzola Zen - UFCSPA

As síndromes de microdeleções cromossômicas (SM) são causadas por deleções submicroscópicas de genes contíguos, em regiões específicas do cromossomo, sendo relacionadas a malformações congênitas. O diagnóstico clínico pode ser difícil e o cariótipo não permite a sua identificação. Assim, se faz necessário a realização de análises complementares como, por exemplo, Hibridização in situ fluorescente (FISH). As síndromes de Willms (SW), Prader-Willi (SPW), Angelman (SA) e DiGeorge (SDG) são as mais prevalentes, porém com dificuldades para a sua confirmação, devido a necessidade de testes genéticos que não são oferecidos pelo SUS. Assim, é importante que se faça um diagnóstico clínico eficiente e a partir de uma estratégia de investigação, otimizar a realização dos testes genéticos, possibilitando assim um melhor acompanhamento e tratamento dos pacientes. O objetivo deste trabalho é realizar a investigação clínica e análise por FISH em pacientes com suspeita de SM, atendidos pelo Serviço de Genética Clínica da UFCSPA/HCSA. É um estudo prospectivo e de conveniência, onde foram coletados 5ml de sangue periférico para posterior cultivo de células e análise por FISH de indivíduos que apresentaram suspeita clínica de SW, de SA, de SPW e de SDG. Todos os indivíduos tinham cariótipo normal. Dos 12 indivíduos que apresentaram suspeita clínica, 1 indivíduo apresentou microdeleção no cromossomo 7 (del7q11.23), 1 indivíduo apresentou microdeleção no cromossomo 15 (del15q11-13), 8 indivíduos não apresentaram alterações cromossômicas e 1 indivíduo não teve seu diagnóstico confirmado devido a amostra estar contaminada. Através dos prontuários clínicos e da análise por FISH, foi possível diagnosticar 1 indivíduo com SW e 1 indivíduo com SA, onde seus achados clínicos foram compatíveis com a literatura. Devido à variedade de achados clínicos já descritos para a SDG, há dificuldade de se estabelecer critérios mais específicos para o encaminhamento para análise molecular. Sendo assim, concluímos que a análise molecular por FISH consegue superar a limitação do cariótipo, possuindo uma maior resolução e promovendo a análise de uma região específica. Porém, tem as desvantagens de não analisar o genoma completo e ser limitada ao tamanho da sonda. Para os casos onde a suspeita clínica foi descartada pela FISH, recomenda-se a investigação por meio de outras técnicas, como MLPA ou array-CGH. Unitermos: Microdeleções; FISH; Malformação congênita.

P1153

Investigação de lipodistrofia sindrômica conduz a diagnóstico de síndrome autoinflamatória relacionada ao proteassoma

Bibiana Mello de Oliveira, Pablo Brea Winckler, Fabiano de Oliveira Poswar, Jonas Alex Morales Saute - HCPA

Apresentação do Caso: Indivíduo do sexo masculino, 29 anos, filho de pais consanguíneos. Desde o período neonatal, apresentou pápulas eritematosas difusas recidivantes. A partir dos 3 anos iniciou restrição de crescimento, atrofia muscular progressiva, infecções de repetição e esplenomegalia. Aos sete anos passou a apresentar febre diária, associada à anemia microcítica, baquetamento digital e lipodistrofia parcial progressiva. Evoluiu com atraso puberal, caquexia e marcadas contraturas articulares. Realizou sorologias, ressonância magnética de crânio e investigação para erros inatos do metabolismo, que não evidenciaram alterações. Devido à suspeita de dermatomiosite, foi realizado tratamento com múltiplos imunossupressores sem resposta. Considerando-se fenótipo complexo de envolvimento muscular e lipodistrofia foi realizado sequenciamento do LMNA, que foi normal descartando a hipótese de laminopatia. Revisão de literatura evidenciou a descrição de um novo espectro de síndromes autoinflamatórias relacionado ao gene PSMB8 que geraria disfunção do proteassoma e que poderia explicar o quadro do paciente, tendo adicionalmente a presença de calcificações cerebrais. Foi solicitada então tomografia de crânio, a qual confirmou a presença de múltiplas calcificações simétricas em gânglios da base. Investigação molecular levou à identificação da variante patogênica c.224C>T (p.T75M) em homozigose, confirmando a hipótese diagnóstica. Discussão: O presente caso evidencia fenótipo complexo que inclui restrição de mobilidade articular, atrofia muscular, restrição de crescimento, lipodistrofia, visceromegalia, alterações hematológicas e cutâneas que, após longo período de investigação, teve seu diagnóstico conclusivo. Este espectro clínico foi associado a três síndromes descritas por diferentes grupos, até que, recentemente, com a descoberta de que o gene PSMB8 estaria relacionado aos 3 fenótipos, estes foram unificados sob o termo doenças relacionadas ao gene PSMB8, uma condição ultrarrara e sem descrição prévia na América Latina. Um promissor ensaio clínico aberto está em andamento no NIH para avaliar o benefício do inibidor JAK Baricitinib nesta condição. Comentários Finais: O presente relato ilustra a história clínica de indivíduo diagnosticado com doença rara recentemente descrita e com agente terapêutico em estudo. O diagnóstico confirmatório encerra um longo período de investigação e permite adequado aconselhamento genético ao paciente e seus familiares. Unitermos: Doenças neuromusculares; Doença autoinflamatória; PSMB8.

P1183

Diagnóstico genético e associação genótipo-fenótipo de 35 indivíduos brasileiros com atividade reduzida de biotinidase

Dévora Randon, Taciane Borsatto, Fernanda Sperb-Ludwig, Karina Carvalho Donis, Erlane Ribeiro, Carolina Fischinger Moura de Souza, Paula Medeiros, Ida Vanessa Doederlein Schwartz - UFRGS

INTRODUÇÃO: A enzima biotinidase (EC 3.5.1.12), codificada pelo gene BTBD9, é responsável pela absorção e reciclagem da biotina, um cofator para diversas carboxilases mitocondriais. Na deficiência de biotinidase (DB, OMIM: 253260), uma doença metabólica autossômica recessiva, a atividade da biotinidase é reduzida, podendo ocasionar manifestações neurológicas e dermatológicas na ausência de tratamento precoce. Indivíduos com atividade reduzida da biotinidase podem apresentar DB total, parcial, ou ser heterozigotos para variantes patogênicas no gene BTBD9. Devido à labilidade dessa enzima, a análise genética pode auxiliar no diagnóstico, sendo fundamental o entendimento da relação entre o fenótipo bioquímico e o genótipo. OBJETIVOS: Caracterizar o perfil genético de indivíduos brasileiros com atividade reduzida de biotinidase e avaliar a associação entre os achados genéticos e