

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Revisão da patologia molecular e estratégia para a investigação de pacientes com suspeita clínica de esclerose tuberosa e diagnóstico molecular convencional inconclusivo

Arthur Bandeira De Mello Garcia

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Genética e Biologia Molecular**.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Ashton-Prolla

Coorientadora: Dra. Clévia Rosset

Porto Alegre, 28 de Fevereiro de 2023.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Medicina Genômica (LMG), do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), localizado no Centro de Pesquisa Experimental (CPE) do HCPA e em uma área compartilhada do centro de pesquisa, na Unidade de Pesquisa Laboratorial (UPL). O aluno recebeu bolsa de estudos concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) vinculada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGBM/UFRGS).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha orientadora Patrícia pela oportunidade e pelo apoio durante essa etapa. É uma honra participar do grupo de pesquisa e te ter como orientadora.

A todos os meus amigos que me apoiaram durante esse ciclo, todos os amigos de fora da UFRGS/HCPA e de dentro da UFRGS/HCPA. Especialmente pro Bruno e Rodrigo que estão sempre ao meu lado e me dando apoio nas decisões, mas também nas horas de dar uma desligada e aproveitar uma resenha. A todos os colegas do Laboratório de Medicina Genômica (LMG) que me aguentam todos os dias e sempre fizeram eu me sentir em casa dentro do LMG. Obrigado por todas as conversas, conselhos, incentivos, bolinhos, faixas, palhaçadas, cafés, e RUs que tiveram nesse tempo.

A todos da minha família - Neila, Dema, Júlia, Joana e Júlio - que sempre acreditaram e incentivaram todos os meus sonhos, sem vocês eu não teria conseguido chegar até aqui. Obrigado por toda nossa história. Vocês são tudo pra mim.

A minha namorada, Rafa, que tem um papel enorme na minha trajetória e na minha vida. Só tenho a agradecer por ser a minha parceira e minha força em cada momento. Tu me inspira e me motiva demais.

E por fim, a Clévia. Tu é uma inspiração como profissional e como pessoa. Não tenho como deixar de agradecer especialmente pra ti. Obrigado por tudo nesses últimos dois anos. Das piadas e palhaçadas até os puxões de orelha. Tu é Clévershow!

SUMÁRIO

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS	2
AGRADECIMENTOS	3
SUMÁRIO.....	4
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT	9
CAPÍTULO I	
INTRODUÇÃO.....	12
1. Genodermatoses.....	12
2. Esclerose Tuberosa.....	13
2.1 Aspectos clínicos da ET.....	13
2.2 Hamartina e Tuberina.....	15
2.3 Variantes em <i>TSC1</i> e <i>TSC2</i>	17
2.4 Correlações Genótipo-Fenótipo: ET.....	17
2.5 Diagnóstico molecular de ET.....	17
3. Desafios na reclassificação de VUS.....	19
4. Variantes intrônicas como causadoras de doença.....	19
CAPÍTULO II	
JUSTIFICATIVA.....	22
OBJETIVOS.....	23
CAPÍTULO III	
MANUSCRITO EM ELABORAÇÃO	72
<i>“Protocolo para avaliação de variantes de splicing em pacientes com suspeita clínica de Esclerose tuberosa e diagnóstico molecular inconclusivo”</i>	
CAPÍTULO IV	
CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
REFERÊNCIAS	86
ANEXOS.....	92

Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes pediátricos

Anexo 3. Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes assintomáticos

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

4E-BP1: Proteína 1 de ligação ao fator de iniciação da tradução eucariótica 4E

ACMG: American College of Medical Genetics (Escola Americana de Genética e Genômica Médica)

CNV: Copy number variants (Variação do número de cópias)

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ET: Esclerose tuberosa
FBS: Soro bovino fetal
GAP: GTPase activating protein (Proteínas ativadoras de GTPase)
HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre
LMG: Laboratório de Medicina Genômica
MLPA: Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (amplificação multiplex de sondas mRNA: RNA mensageiro)
NGS: Next generation sequencing (Sequenciamento de Nova Geração)
NMD: Nonsense mediated-decay (Decaimento mediado por nonsense)
PBMC: Peripheral blood mononuclear cells (Célula mononucleares de sangue periférico)
PBS: Tampão fosfato-salino
PCR: Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
PHA-M: Fitohemaglutinina-M
Rheb: *Ras homolog enriched in brain* (Homólogo de Ras enriquecido no cérebro)
S6K1: Proteína ribossomal S6 quinase beta-1
SEGA: subependymal giant cell astrocytoma (astrocitomas subependimários de células gigantes)
TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TSC: Tuberous sclerosis complex (Complexo da Esclerose tuberosa)
ULK1: *Unc-51-like kinase 1*
UPL: Unidade de Pesquisa Laboratorial
VUS: Variants unknown significance (Variante de significado incerto)

]

RESUMO

A Esclerose Tuberosa (ET) é uma doença autossômica dominante com diversas manifestações clínicas afetando múltiplos tecidos. Embora o diagnóstico clínico desses distúrbios geralmente possa ser feito pelo fenótipo no nascimento ou durante o início da infância, o diagnóstico molecular é importante para aconselhamento genético. Também é particularmente importante

nos casos de apresentação atípica, em que as características clínicas são insuficientes para o diagnóstico. Mais recentemente, com o advento da medicina personalizada, o diagnóstico molecular pode se tornar ainda mais importante para definir os candidatos a receberem tais intervenções. O diagnóstico molecular é geralmente realizado por sequenciamento de nova geração (do inglês *next generation sequencing*, NGS) e análise de variação do número de cópias (do inglês *copy number variation*, CNV), seguido da classificação das variantes detectadas usando diretrizes como as do *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) e/ou Sherloc. Esses critérios categorizam as variantes como: patogênicas, provavelmente patogênicas, provavelmente benignas, benignas e variantes de significado incerto (do inglês *variant of uncertain significance*, VUS). Uma proporção de pacientes com ET submetidos a diagnóstico molecular não tem variante patogênica identificada. Em cerca de 8% dos casos com suspeita ou diagnóstico clínico são identificadas VUS e em 10-40% destes pacientes não há variante patogênica identificada usando análise direta de DNA germinativo. Por outro lado, vários autores relatam que a frequência de variantes que afetam o processamento de RNA mensageiro pode chegar a 11-16%, mas a frequência de tais alterações em pacientes brasileiros permanece desconhecida. Por esse motivo, o presente estudo tem como objetivo: Realizar uma análise detalhada das variantes identificadas em *TSC1* e *TSC2* constantes em uma base de dados moleculares pública e estabelecer uma metodologia para identificar variantes patogênicas causadoras de alteração ao nível do RNA em pacientes com diagnóstico clínico de esclerose tuberosa e resultado de diagnóstico molecular negativo ou inconclusivo. A revisão mostrou que as VUS são as variantes em *TSC1/2* mais descritas no banco de dados ClinVar, com pouca informação sobre elas. Muitas dessas variantes apresentam conflitos na interpretação de significância clínica, ressaltando a importância de estudos funcionais; entretanto, foram identificados poucos estudos sobre essa temática na literatura (n=12). A maioria dessas variantes apresentam similaridade com variantes benignas. No entanto, variantes que apresentam mudança na matriz de leitura, sentido trocado e que estão em regiões canônicas de splicing tem um potencial de reclassificação como patogênicas. A falta de informação sobre elas dificulta a reclassificação no ClinVar e tem impacto direto para aconselhamento genético de pacientes acometidos com tais variantes, reforçando a necessidade de submeter o máximo de informações sobre variantes detectadas em banco de dados públicos. Com os dados disponíveis na base ClinVar, não foi possível identificar um *hotspot* de variantes patogênicas em ambos os genes. Para analisar o papel de VUS e identificar possíveis variantes intrônicas, foram recrutados quatro pacientes com suspeita clínica de esclerose tuberosa e com teste genético convencional negativo para análise de cDNA. Para isto, foram desenhados blocos de

primers que abrangem a totalidade dos transcritos dos genes *TSC1/2*. Reações de amplificação por PCR de todos os primers *TSC1/2* foram padronizados, todas as amplificações por PCR dos quatro pacientes com suspeita de TSC foram realizadas e, até o momento, nenhuma alteração de processamento (avaliada por diferenças de tamanho dos amplicons) foi identificada. O estabelecimento de um protocolo de triagem para variantes que resultam em processamento de RNA aberrante é de utilidade clínica significativa no cuidado de pacientes com suspeita de ET e seus familiares. Em última análise, nosso objetivo é contribuir para a implementação dessa metodologia como parte do diagnóstico molecular em casos negativos/VUS. Por fim, um melhor entendimento das variantes em *TSC1/2* depositadas em um banco de dados público, assim como a padronização de uma metodologia para analisar papel de VUS e/ou identificação de possíveis variantes intrônicas em casos negativos de teste genético convencional podem resultar em maior compreensão da patogênese molecular da esclerose tuberosa e otimização do manejo clínico, em especial, aconselhamento genético de pacientes com a doença.

ABSTRACT

Tuberous Sclerosis (TE) is an autosomal dominant disease with diverse clinical manifestations affecting multiple tissues. Although the clinical diagnosis of these disorders can usually be made by the phenotype at birth or during early childhood, molecular diagnosis is important for genetic counseling. It is also particularly important in cases of atypical presentation, where clinical features are insufficient for diagnosis. More recently, with the advent of personalized medicine, molecular diagnosis may become even more important for defining candidates to receive such interventions. Molecular diagnosis is usually performed by next generation sequencing (NGS) and copy number variation (CNV) analysis, followed by classification of the variants detected using guidelines such as those of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and/or Sherloc. These criteria categorize variants as: pathogenic, probably pathogenic, probably benign, benign and variants of uncertain significance (VUS). A proportion of patients with ET who undergo molecular diagnosis have no pathogenic variant identified. In about 8% of suspected or clinically diagnosed cases, VUS are identified, and in 10-40% of these patients there is no pathogenic variant identified using direct germline DNA analysis. On the other hand, several authors report that the frequency of variants affecting messenger RNA processing may be as high as 11-16%, but the frequency of such alterations in Brazilian patients remains unknown. For this reason, the present study aims to: Perform a detailed analysis of the variants identified in *TSC1* and *TSC2* in a public molecular database and establish a methodology to identify pathogenic variants causing alterations at the RNA level in patients with a clinical diagnosis of tuberous sclerosis and a negative or inconclusive molecular diagnosis result. The review showed that VUS are the most described variants in *TSC1/2* in the ClinVar database, with little information about them. Many of these variants present conflicts in the interpretation of clinical significance, highlighting the importance of functional studies; however, few studies on this topic were identified in the literature (n=12). Most of these variants show similarity with benign variants. However, variants that show change in the reading array, swapped sense, and are in canonical regions of splicing have a potential for reclassification as pathogenic. The lack of information about them hinders the reclassification in ClinVar and has direct impact for genetic counseling of patients affected with such variants, reinforcing the need to submit as much information about variants detected in public databases as possible. With the data available in the ClinVar database, it was not possible to identify a hotspot of pathogenic variants in both genes. To analyze the role of VUS and identify possible intronic variants, four patients with clinically suspected tuberous sclerosis and

with negative conventional genetic test for cDNA analysis were recruited. For this, primer blocks spanning the entire transcripts of the *TSC1/2* genes were designed. PCR amplification reactions of all *TSC1/2* primers were standardized, all PCR amplifications of the four patients with suspected TSC were performed, and to date, no processing alterations (assessed by amplicon size differences) have been identified. Establishing a screening protocol for variants that result in aberrant RNA processing is of significant clinical utility in the care of patients with suspected SCD and their families. Ultimately, our goal is to contribute to the implementation of this methodology as part of molecular diagnosis in negative/VUS cases. Finally, a better understanding of variants in *TSC1/2* deposited in a public database, as well as standardization of a methodology to analyze role of VUS and/or identification of possible intronic variants in conventional genetic test negative cases may result in further understanding of the molecular pathogenesis of tuberous sclerosis and optimization of clinical management, in particular genetic counseling of patients with the disease.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

1. *Genodermatoses*

As genodermatoses são um grupo de doenças, que podem ser multissistêmicas, apresentam sintomas em um amplo e heterogêneo espectro, desde mais brandos até mais graves que impactam a qualidade de vida do paciente acometido, uma característica das doenças genéticas de expressividade variável (Aşkın *et al.*, 2020; Spitz, 1996). São doenças hereditárias, sendo mais comuns a herança autossômica dominante e recessiva; entretanto, algumas apresentam herança ligada ao X (Lemke *et al.*, 2014).

As genodermatoses são representadas por 560 doenças (Feramisco *et al.*, 2009). As mais frequentes e suas principais características fenotípicas estão resumidas na Tabela 1. Dentro das genodermatoses há um subgrupo que são síndromes de predisposição ao câncer, sendo as mais frequentes a neurofibromatose e a esclerose tuberosa, que também apresentam uma das maiores incidências (Evans *et al.*, 2016; Northrup *et al.*, 2021).

Tabela 1: Manifestações clínicas das principais genodermatoses e sua patogênese.

Doença	Manifestações clínicas	Patogênese	Referência
Ictiose	Queratinização da pele separada por fissuras profundas (Ictiose arlequim); membrana de colódio, alopecia e hiperqueratose palmoplantar (IL) ¹ ; eritrodermia, escamas finas e brancas semi-aderentes e ceratodermia palmoplantar (EIC) ²	Desenvolvimento das bicamadas lipídicas da pele prejudicado e distúrbio na função da barreira cutânea	(Richard, 2017)
Xeroderma pigmentoso	Formação de bolhas na pele, queratoses actínicas, fotossensibilidade, neurodegeneração progressiva	Incapacidade em reparar alterações do DNA causadas por UV em células epiteliais	(Leung <i>et al.</i> , 2022; Babu <i>et al.</i> , 2015)
Queratose folicular	Hiperqueratose de pápulas, anormalidades nas unhas, anormalidades neuropsiquiátricas	Acantólise	(Suryawanshi <i>et al.</i> , 2017; Schmieder & Rosario-Collazo, 2022)
Epidermólise bolhosa	Alopecia, estenose do esôfago, desenvolvimento de inflamação crônica, cicatrizes e feridas não curadas, carcinoma de células escamosas (CCE), distrofia muscular	Diversos subgrupos: EBS ³ e EBJ ⁴ Herlitz = deficiência da laminina-5; EBJ = deficiência da queratina-5; EBD ⁵ = deficiência do colágeno VII	(Boeira <i>et al.</i> , 2013)
Síndrome de Cowden	Gangliocitoma displásico do cerebelo, carcinoma da tireoide, macrocefalia, câncer de mama, lipomas, fibromas, retardo mental, hamartomas gastrointestinais	Atividade constitutiva da via PI3K/AKT	(Garofola <i>et al.</i> , 2022)
Neurofibromatose tipo 1	Manchas "café au lait", sardas, neurofibromas, neurofibromas plexiformes, escoliose distrófica, anormalidades neuropsiquiátricas	Atividade constitutiva da via Ras (Friedman, 2022)	
Esclerose tuberosa	Angiofibromas, hamartomas, angiomiolipoma renal, astrocitoma subependimário de células gigantes (ASCG), manchas hipomelanóticas, anormalidades neuropsiquiátricas	Atividade constitutiva da via mTOR	(Northrup <i>et al.</i> , 2021)

¹IL, ictiose lamelar; ²EIC, eritrodermia ictiosiforme congênita; ³EBS, epidermólise bolhosa simples; ⁴EBJ,

As manifestações cutâneas estão presentes em todas as genodermatoses, sendo este o fenótipo mais característico do grupo. A avaliação precoce de lesões cutâneas é importante para analisar relações com características mais graves (Silva *et al.*, 2013), tal como para ter o diagnóstico clínico correto, possibilitando o tratamento específico para a condição, quando disponível. Um diagnóstico precoce pode auxiliar também no estabelecimento do prognóstico. Como as genodermatoses são doenças multissistêmicas, frequentemente de expressividade variável, havendo alguma sobreposição fenotípica entre algumas doenças, o diagnóstico molecular pode ter utilidade, em especial para fins de aconselhamento genético e eventualmente também para decisões reprodutivas, como por exemplo para realizar diagnóstico pré-natal ou pré-implantação.

2. *Esclerose Tuberosa*

A esclerose tuberosa (ET) é uma desordem autossômica dominante e multissistêmica, caracterizada pela formação de tumores benignos – chamados de hamartomas – em vários órgãos, tais como cérebro, pele e rim (Dimario *et al.*, 2015). Também é representada pela presença de distúrbios neurológicos como epilepsia, atraso no desenvolvimento e transtornos pervasivos do desenvolvimento, incluindo autismo em alguns pacientes (Crino *et al.*, 2006; Au *et al.*, 2007). A ET tem expressividade variável e a sua prevalência foi estimada em 1:6.000 - 1:10.000 nascidos vivos, sem grandes diferenças entre gêneros e grupos étnicos (Sahin *et al.*, 2016; Northrup *et al.*, 2021).

2.1 *Aspectos clínicos da ET*

Em alguns casos, logo no início da vida intrauterina, o primeiro sintoma observado é o rabdomioma intracardíaco, que é um tumor benigno que pode ser visto em exame pré-natal como a ultrassonografia, a partir de 22 semanas de gestação (Di Mario *et al.*, 1996). Nos primeiros meses de vida até aproximadamente quatro anos, os sintomas mais frequentes são máculas hipomelanóticas na pele, angiofibromas e epilepsia (Au *et al.*, 2007). As máculas hipopigmentadas são manifestações cutâneas planas, um dos sintomas mais comuns da doença em conjunto com a epilepsia, ocorrendo em cerca de 90% dos pacientes com ET (Curatolo *et al.*, 2008; Northrup *et al.*, 2013; Uysal and Şahin, 2020). Os angiofibromas também são

frequentes (75% dos casos), ocorrendo entre dois a cinco anos de idade (Portocarrero *et al.*, 2018; Uysal and Şahin, 2020).

Os achados clínicos subsequentes podem acometer diferentes órgãos com gravidade variável. As três principais lesões intracranianas associadas à ET são os tubérculos corticais, nódulos subependimários e astrocitomas subependimários de células gigantes (do inglês *subependymal giant cell astrocytomas*, SEGAs) (Northrup *et al.*, 2021). A presença de nódulos subependimários está relacionada com a ocorrência de epilepsia (Raymond *et al.*, 1994), assim como SEGAs e alterações renais são os principais responsáveis pela mortalidade atribuída a ET (Shepherd *et al.*, 1991; Nabbout *et al.*, 1999; Amin *et al.*, 2017). A lesão renal mais comum é o angiomiolipoma, um tumor benigno encontrado frequentemente em indivíduos com ET. Critérios de diagnóstico clínico foram estabelecidos para avaliação da doença (Northrup *et al.*, 2021), e as principais manifestações clínicas estão resumidas na Tabela 2.

Tabela 2: Principais manifestações clínicas da Esclerose Tuberosa.

Cutâneas	Manchas hipomelanóticas
----------	-------------------------

	Lesão cutânea em "confete"
	Nevo de tecido conjuntivo (<i>Shagreen patch</i>)
Cardiovasculares	Rabdomioma cardíaco
Neoplásicas	Linfangioleiomiomatose
	Astrocitoma subependimário de células gigantes (ASCG)
	Fibromas ungueais
	Hamartomas nodulares retinianos e renais
	Angiofibromas (≥3) ou placa cefálica fibrosa
	Angiomiolipoma renal
Outras	Múltiplos cistos renais
	Lesões ósseas escleróticas
	Anormalidades neuropsiquiátricas
Modificado de:	(Northrup <i>et al.</i> , 2021)

2.2 *Hamartina e Tuberina*

A esclerose tuberosa é causada por variantes patogênicas germinativas nos genes *TSC1* e *TSC2*, que codificam as proteínas supressoras de tumor hamartina e tuberina, respectivamente. O gene *TSC1* abrange cerca de 53kb de DNA genômico, está localizado no cromossomo 9q34 e possui 23 éxons (NM_000368.5). A hamartina é uma proteína hidrofílica de 1.164 aminoácidos e 130kDa (*National Center for Biotechnology Information, NCBI, 2022*). O gene *TSC2* está localizado no cromossomo 16p13.3, distribuído em 40kb do genoma, e apresenta 42 éxons (NM_000548.5). A tuberina constitui-se de 1.807 aminoácidos e 200kDa, e tem um domínio de interação com *TSC1* N-terminal e uma região de homologia com o domínio catalítico de proteínas da família GTPases rap1GAP na porção carboxi-terminal (Wienecke *et al.*, 1995).

A tuberina e a hamartina ligam-se e formam um complexo que regula negativamente a via de sinalização mTOR (Huang *et al.*, 2008). O complexo tuberina/hamartina inibe a mTOR efetuando a hidrólise de uma molécula de GTP associada a proteína Rheb (do inglês, *Ras homolog enriched in brain*), a principal ativadora da via mTOR. Por outro lado, a ativação da via mTOR resulta na fosforilação de diferentes proteínas, principalmente causando a ativação da proteína ribossomal S6 quinase beta-1 (S6K1) e inibição da proteína 1 de ligação ao fator de

iniciação da tradução eucariótica 4E (4E-BP1), ambas relacionadas com aumento de síntese proteica (Ma and Blenis, 2009). Além disso, a ativação da via mTOR inibe a autofagia pela fosforilação/inativação da ULK1 (do inglês, *Unc-51-like kinase 1*) (Kim *et al.*, 2011). A perda de função do complexo tuberina/hamartina leva a desregulação de diferentes processos celulares, como a proliferação, crescimento celular e a autofagia. Os desfechos e a regulação da via mTOR estão mostrados na Figura 1.

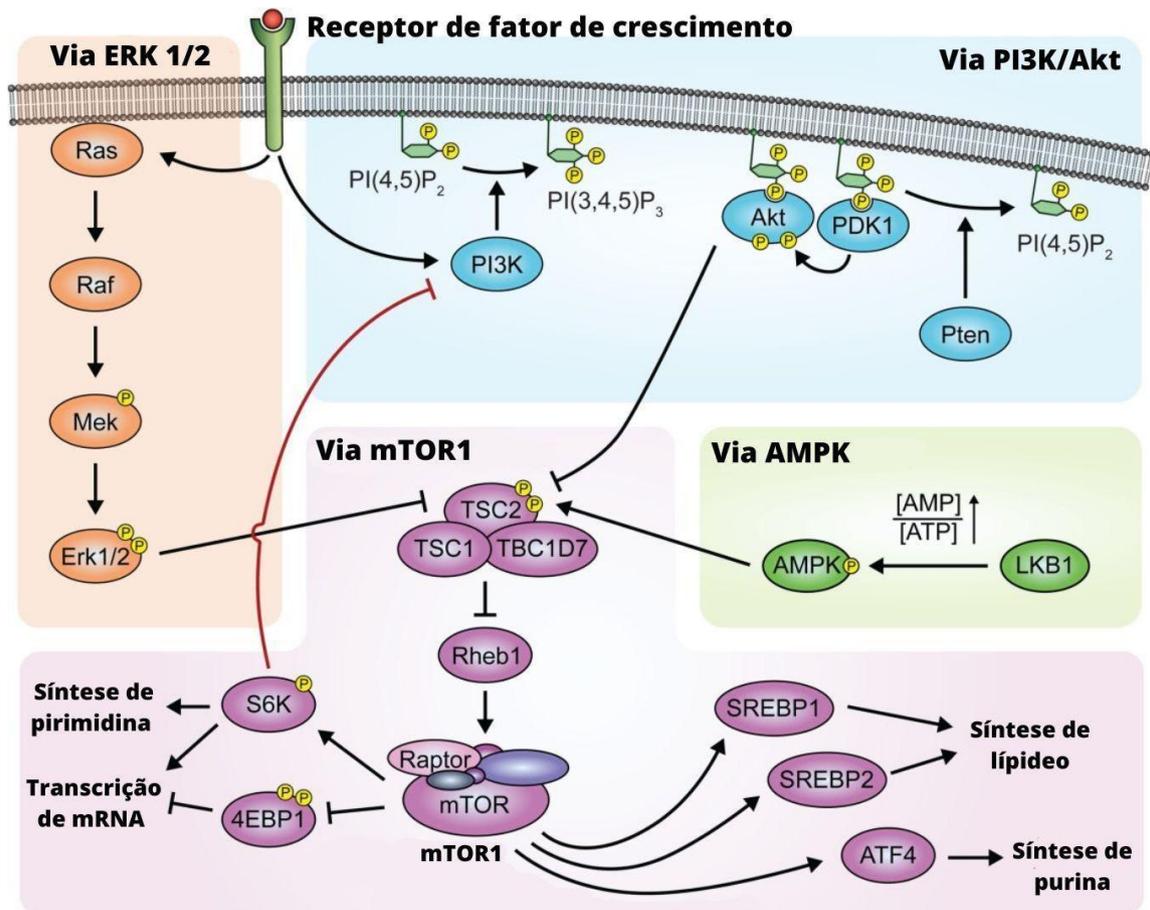


Figura 1: Regulação e desfechos da via mTOR. Adaptado de Figlia *et al.*, 2017.

2.3 Variantes genéticas em TSC1 e TSC2

Até a conclusão deste estudo havia sido descritas 369 variantes em *TSC1* em um banco de dados público *Human Gene Mutation Database* (HGMD), sendo mais frequentes pequenas deleções (n=119), grandes inserções (n=52), variantes de sentido trocado e sem sentido (n=127), e variantes nos sítios de processamento (n=40). Em *TSC2* foram identificadas 1.183 variantes, sendo as mais frequentes: pequenas (n=254) ou grandes deleções (n=159), variantes de sentido trocado e sem sentido (n=430), e variantes nos sítios de processamento (n=153)

(*Human Gene Mutation Database*, , 2022). Esses dados mostram maior frequência de variantes detectadas no gene *TSC2* em comparação ao *TSC1*, o que pode ser observado em diferentes populações (Jones *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2019; Rosengren *et al.*, 2020; Alsowat *et al.*, 2021).

2.4 **Correlações Genótipo-Fenótipo: ET**

Descrições robustas de correlação genótipo-fenótipo na ET são escassas na literatura. A correlação mais robusta é a de uma grande deleção que engloba uma região distal de *TSC2* e proximal de *PKDI*, que resulta em doença policística renal (Oyazato *et al.*, 2011; Boronat *et al.*, 2014). Por outro lado, existem correlações menos robustas, como a da variante c.2714G>A com fenótipo brando e da variante c.3106T>C com convulsões (O'connor *et al.*, 2003; Jansen *et al.*, 2006).

Epilepsia precoce e déficit intelectual relacionado à ET e quadros fenotípicos mais graves são mais prevalentes em indivíduos portadores de variantes patogênicas em *TSC2* (Dabora *et al.*, 2001; Sancak *et al.*, 2005; Au *et al.*, 2007; Farach *et al.*, 2019; Alsowat *et al.*, 2021). Pacientes com alterações em *TSC1* podem ter, mais frequentemente, sintomas relacionados com transtorno de ansiedade e autismo.

2.5 **Diagnóstico Molecular de ET**

O principal método utilizado para investigar variantes genéticas em ET é o Sequenciamento de Nova Geração (*Next Generation Sequencing – NGS*) associado a uma metodologia para análise de rearranjos gênicos como a amplificação multiplex de sondas dependentes de ligação (do inglês *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*, MLPA) (Rosset *et al.*, 2017; Bąbol-Pokora *et al.*, 2021; Lin *et al.*, 2021). Mais recentemente, metodologias de NGS identificam ao mesmo tempo alterações de sequência e de número de cópias (Singh *et al.*, 2021). Após o sequenciamento é feita a análise comparativa da sequência obtida com uma sequência referência seguida da classificação clínica das variantes pelas diretrizes do *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) (Richards *et al.*, 2015) ou da *Sherloc*, que é uma classificação otimizada do ACMG (Nykamp *et al.*, 2017). Ambos consistem na categorização das variantes em uma de cinco categorias: patogênica, provavelmente patogênica, benigna, provavelmente benigna e de significado incerto.

No entanto, essa estratégia de investigação tem algumas lacunas, pois, por mais que produza uma grande quantidade de informações, grande parte das variantes encontradas ainda

tem um significado incerto (do inglês *Variant of Uncertain Significance*, VUS) por ter dados/evidências limitados sobre a repercussão dessas variantes. Diversos estudos moleculares com pacientes com ET indicam que a taxa de VUS atualmente é de cerca de 8% dos pacientes com variantes detectadas (Sancak *et al.*, 2005; Au *et al.*, 2007; Tyburczy *et al.*, 2015; Reyna-Fabián *et al.*, 2020; Rosengren *et al.*, 2020; Alsowat *et al.*, 2021), dependendo do número de pacientes analisados.

Outra lacuna importante são as bibliotecas utilizadas para o NGS em muitos estudos publicados, pois estas não abrangem a totalidade da sequência dos genes relacionados a ET. Os painéis de NGS geralmente são desenhados para captar éxons e regiões intrônicas canônicas de processamento de RNA próximas aos éxons (máximo de 20 bases nas extremidades intrônicas), pois a probabilidade de encontrar variantes nessas regiões é maior. A maioria das análises convencionais não avalia regiões intrônicas profundas e outras regiões regulatórias nas extremidades não codificadoras dos genes. (Balla *et al.*, 2014; Pasmant *et al.*, 2015). Entretanto, variantes nessas regiões podem eventualmente ter significado clínico (Montalban *et al.*, 2019; Fitzgerald *et al.*, 2020). Um estudo molecular com pacientes com ET relatou 40% das variantes detectadas como intrônicas (Tyburczy *et al.*, 2015). A estratégia de análise em duas etapas para o diagnóstico molecular, incluindo NGS e MLPA, tem taxa de detecção de variantes nos genes *TSC1* ou *TSC2* em torno de 75–90% (Jones *et al.*, 1999; Dabora *et al.*, 2001; Au *et al.*, 2007; Northrup *et al.*, 2013; Rosset *et al.*, 2017; Rosengren *et al.*, 2020), dependendo da população estudada.

Pacientes com variantes patogênicas geralmente são encaminhados para acompanhamento específico e seus familiares recebem aconselhamento genético com a informação de que o resultado da análise molecular confirma a suspeita clínica (Murray *et al.*, 2011). Por outro lado, pacientes que possuem diagnóstico molecular negativo, ou seja, em que há ausência de variantes patogênicas identificáveis, assim como pacientes em que o diagnóstico apresenta apenas VUS, ficam sem diagnóstico definitivo, o que pode ser um complicador para o acompanhamento adequado, bem como para fins de aconselhamento genético. Por isso, é importante estabelecer uma estratégia de reavaliação periódica das VUS, revisão das metodologias diagnósticas empregadas e sempre que possível, avaliação funcional no caso de VUS.

3. *Desafios na reclassificação de VUS*

A reclassificação de VUS de acordo com os critérios de ACMG/Sherloc é feita a partir de dados disponíveis do histórico familiar e dados clínicos do paciente que realizou o exame, como análises de segregação, e dados novos sobre a variante, oriundos de estudos que utilizam preditores de bioinformática e estudos funcionais (Richards *et al.*, 2015). Frequentemente, o que falta para reclassificar variantes são estudos funcionais e análises de segregação, que são extremamente relevantes para a compreensão da importância clínica da variante detectada. Para a análise de segregação é necessária coleta de amostras biológicas de familiares do paciente portador da variante rara, sendo frequente a dificuldade do contato e comparecimento de familiares (Grasel *et al.*, 2020). Alguns estudos mostram que pode haver um período de meses até anos para a reclassificação de algumas VUS (Slavin *et al.*, 2019). Murray e colaboradores (2011) relataram reclassificação de variantes nos genes *BRCA1* e *BRCA2* após nove anos do exame realizado, e esse período longo pode estar relacionado à falta de estudos funcionais. As VUS podem ser intrônicas (em regiões canônicas de processamento de RNA que são sequenciadas por painéis de NGS) ou em éxons, e podem afetar o processamento de RNA em ambas as situações (Fang *et al.*, 2001; Vaz-Drago *et al.*, 2017; Anna and Monika, 2018; Moles-Fernández *et al.*, 2021). Por isso, são necessários estudos funcionais que tem como finalidade analisar possíveis alterações no processamento de RNA.

4. *Variantes intrônicas como causadoras de doença*

Variantes intrônicas profundas em diversos genes já foram relatadas como patogênicas, incluindo doenças como câncer de mama (Montalban *et al.*, 2019), miopatia miotubular (Fitzgerald *et al.*, 2020) e retinose pigmentar (Qian *et al.*, 2021). Essas variantes podem ser consideradas patogênicas por diferentes mecanismos, incluindo, por exemplo: ativação ou inserção de pseudoexons (Montalban *et al.*, 2019; Fitzgerald *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2021); interrupção de motivos regulatórios de transcrição (Antonellis *et al.*, 2010); e inativação de RNA não codificante (Edery *et al.*, 2011). As variantes podem também ser causadoras de outras enfermidades e por outras modificações na transcrição e processamento do RNA mensageiro (RNAm) (Vaz-Drago *et al.*, 2017). Modificações em sítios de processamento de RNA podem gerar proteínas truncadas e ocasionar o fenômeno de *exon skipping*, que é um modo de processamento de RNA, na qual há "salto" ou exclusão de um éxon, formando uma proteína

truncada ou com uma deleção intersticial, muitas vezes resultando em função alterada (Ars *et al.*, 2003; Krawczak *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2020).

Variantes intrônicas profundas já foram descritas em pacientes com esclerose tuberosa (Tyburczy *et al.*, 2015; Reyna-Fabián *et al.*, 2020); entretanto, mais estudos são necessários para detecção de possíveis variantes intrônicas em pacientes de diferentes populações com diagnóstico clínico de ET que apresentaram diagnóstico molecular prévio negativo ou inconclusivo.

Capítulo II

Justificativa e Objetivos

JUSTIFICATIVA

Considerando o número significativo de VUS identificadas em pacientes com ET e as limitações metodológicas do diagnóstico molecular convencional, estratégias complementares podem ser empregadas para garantir um diagnóstico e acompanhamento clínico adequado destes pacientes. Considerando também que VUS e variantes intrônicas profundas podem afetar o processamento adequado do RNA mensageiro, uma estratégia complementar promissora é avaliar o processamento de RNA por metodologias que utilizam como material biológico RNA convertido para cDNA em pacientes que apresentaram VUS, bem como em pacientes sem variantes detectadas nos genes *TSC1* e *TSC2* em teste molecular prévio (NGS em conjunto com MLPA). A validação desta metodologia complementar poderia auxiliar no diagnóstico de uma parcela significativa de pacientes atendidos no ambulatório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), nos quais resultados negativos ou inconclusivos foram observados em 18,5% dos casos com diagnóstico clínico em um estudo prévio do grupo de pesquisa (Rosset *et al.*, 2017). Adicionalmente, é bem conhecida a dificuldade inerente ao processo de classificação de variantes de sequência, e esta dificuldade se acentua no caso de variantes raras ou únicas ainda não descritas, o que é comum em doenças raras e em países onde ainda não há grandes números de pacientes com diagnóstico molecular. Em razão disso, é importante analisar bancos de dados públicos de variantes já descritas, como o ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), pois há uma gama de informações que podem ser agrupadas e interpretadas para melhor compreensão de regiões dos genes que podem ser mais tolerantes ou mais vulneráveis a alterações, chamadas de *hotspots*, e das variantes em si. Por fim, entender a heterogeneidade de variantes descritas no banco de dados pode instrumentar o desenvolvimento de protocolos de diagnóstico molecular e trazer subsídios para o manejo clínico do paciente e aconselhamento genético familiar.

OBJETIVOS

Objetivo Principal:

Realizar uma análise detalhada das variantes identificadas em *TSC1* e *TSC2* constantes em uma base de dados moleculares pública e estabelecer uma metodologia para identificar variantes patogênicas causadoras de alteração ao nível do RNA em pacientes com diagnóstico clínico de esclerose tuberosa e resultado de diagnóstico molecular negativo ou inconclusivo.

Objetivos Específicos:

- a) Revisar variantes detectadas em *TSC1* e *TSC2* descritas no banco de dados ClinVar com objetivo de descrever a patogenicidade e distribuição de cada variante por toda a extensão de ambos os genes;
- b) Estabelecer uma metodologia para identificar o papel de VUS que podem afetar os sítios de processamento de RNA dos genes *TSC1* e *TSC2* anteriormente detectadas por NGS em pacientes com suspeita clínica de esclerose tuberosa;
- c) Estabelecer uma metodologia para identificar possíveis variantes intrônicas profundas nos genes *TSC1* e *TSC2* em pacientes com suspeita clínica de esclerose tuberosa sem variantes detectadas por teste molecular prévio (NGS + MLPA).

CAPÍTULO III

RESULTADOS PRELIMINARES E MANUSCRITO EM ELABORAÇÃO: *“Protocolo para avaliação de variantes de splicing em pacientes com suspeita clínica de Esclerose tuberosa e diagnóstico molecular inconclusivo.”*

1. INTRODUÇÃO

Genodermatoses são um grupo de doenças hereditárias multissistêmicas caracterizadas por manifestações cutâneas (Aşkin *et al.*, 2020). Síndromes de predisposição ao câncer são um exemplo de genodermatoses que apresentam formação de tumores em diferentes partes do corpo, sendo uma das mais frequentes a esclerose tuberosa (ET) (Northrup *et al.*, 2021).

A esclerose tuberosa apresenta amplo espectro de manifestações clínicas ocasionando em um diagnóstico clínico complexo. Por conta da complexidade do diagnóstico clínico, o teste molecular para a confirmação de casos em que as características clínicas são insuficientes para o diagnóstico é necessário. Além disso, estimula o aconselhamento genético familiar adequado e o manejo do paciente acometido. Por esta razão, em 2013 foi implementado o teste genético como um critério diagnóstico para ET (Northrup *et al.*, 2013). Mesmo se o paciente não apresentar manifestação clínica da doença, a detecção de uma variante patogênica nos genes *TSC1* ou *TSC2* tem diagnóstico direto de esclerose tuberosa (Northrup *et al.*, 2021).

A principal estratégia para análise molecular de pacientes com suspeita clínica de ET é a realização por sequenciamento de nova geração (NGS) em conjunto da análise de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (sigla do inglês, MLPA). As variantes detectadas são classificadas baseadas principalmente nas diretrizes da ACMG (Richards *et al.*, 2015) e do *Sherloc*, uma classificação otimizada da ACMG (Nykamp *et al.*, 2017). Ambos os critérios classificam as variantes como: patogênicas, provavelmente patogênicas, provavelmente benignas, benignas e variantes de significado incerto (*variant of uncertain significance*, VUS).

O número elevado de VUS detectadas em testes moleculares em ambos os genes é um obstáculo para um diagnóstico molecular. De todas as variantes detectadas, 8% representam VUS em *TSC1/2* (Sancak *et al.*, 2005; Au *et al.*, 2007; Tyburczy *et al.*, 2015; Reyna-Fabián *et al.*, 2020; Rosengren *et al.*, 2020; Alsowat *et al.*, 2021). Isso ocorre pela falta de informações sobre variantes, resultante da falta de estudos funcionais e de estudos de segregação e preditores *in silico*.

Além disso, 15-25% (Jones *et al.*, 1999; Dabora *et al.*, 2001; Rosengren *et al.*, 2020) dos pacientes com suspeita clínica de ET que realizam os testes moleculares não apresentam nenhuma variante detectada em *TSC1/2*. Isso ocorre pela estratégia do teste molecular não incluir a totalidade da sequência de ambos os genes, tendo alvos em regiões com maior probabilidade de detecção, como regiões exônicas e intrônicas próximas aos éxons - locais canônicos de *splicing*. Entretanto, já foram descritas variantes intrônicas que causam defeitos

no processamento de RNA, como *splicing* aberrante, nos transcritos dos genes *TSC1* (Qiu *et al.*, 2020) e *TSC2* (Liu *et al.*, 2022).

Estudos com análise de processamento de RNA vêm sendo utilizados como estudos funcionais. Esses estudos permitem que a classificação das variantes já descritas como benignas ou como patogênicas sejam mais robustas. Além disso, podem permitir a reclassificação de VUS. Por isso, este estudo tem como objetivo analisar possíveis erros de processamento de RNA em pacientes com suspeita clínica de esclerose tuberosa que apresentaram VUS ou que não tiveram variante identificada em análise molecular.

2. METODOLOGIA

2.1 Recrutamentos dos Pacientes

Um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa (Rosset *et al.*, 2017) implementou uma metodologia de NGS em conjunto com análise de grandes deleções/duplicações por MLPA para diagnóstico molecular de ET em pacientes com diagnóstico clínico e atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Nesse estudo foram incluídos 53 pacientes. Não houve variantes identificadas em 11% desses pacientes. Além disso, 7,5% tiveram detecção de VUS (Rosset *et al.*, 2017).

No presente trabalho foram incluídos cinco pacientes do estudo prévio, sendo três pacientes com VUS e dois pacientes externos ao HCPA, um com VUS e outro sem variante identificada. O presente projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (2013-0260). Os indivíduos incluídos aceitaram voluntariamente participar no estudo e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexos I, II e III). Informações de cada paciente sobre manifestações clínicas, idade, sexo e a variante, caso tenha detecção prévia de VUS, são apresentadas na Tabela 1. A paciente 2 apresentou uma VUS no teste genético (estudo prévio), mas durante o nosso estudo (após a coleta) essa mesma variante foi reclassificada como benigna (c.3986G>A). Por este motivo, a paciente foi considerada um caso negativo, pois não apresentou nenhuma variante com patogenicidade confirmada. Na figura 1 é apresentado o fluxograma da metodologia do trabalho.

Tabela 1: Dados relativos aos pacientes recrutados pelo estudo.

Paciente	Variante (gene)	Sexo	Idade	Características clínicas
----------	-----------------	------	-------	--------------------------

1	c.975+8 G>A (<i>TSC2</i>)	Feminino	56	Angiofibromas faciais, mancha hipomelanótica, angiomiolipoma renal, angiomiolipoma hepático, fibromas ungueais
2	Negativo	Feminino	23	Máculas hipocrômicas, Angiofibromas faciais, <i>Shagreen patches</i> em região lombar, Túberes corticais, Astrocitoma de retina
3	c.664-10T>C (<i>TSC1</i>)	Masculino	16	Máculas hipomelanóticas; nódulos subependimários, displasia cortical
4	c.976-14G>C e c.976-3C>G (<i>TSC2</i>)	Feminino	-*	-

* Paciente de convênio, informação não disponível.

2.2 Coleta de amostras e cultura de células

Para cada paciente incluído neste estudo, foram coletados dois tubos de sangue total (4mL) em tubo Vacutainer® contendo EDTA. Um tubo foi utilizado para cultura de células de curto prazo e outro para a extração de RNA de sangue total imediato.

Para a cultura de células, os leucócitos foram isolados a partir do sangue total por separação por gradiente de densidade pelo uso de Ficoll-paque. O Ficoll-paque é constituído por um polissacarídeo que contém uma densidade específica capaz de separar eritrócitos e granulócitos de células mononucleares sanguíneas, utilizado para extração de DNA/RNA ou para cultura celular de células mononucleares de sangue periférico (PBMC). Foram separados dois tubos Falcons de 15 ml, em um tubo adicionamos 4 ml de Ficoll-paque e no outro tubo Falcon preparamos 4 ml de sangue com 2 ml de tampão fosfato-salino (PBS). O sangue diluído com PBS foi adicionado cuidadosamente sobre o Ficoll-paque, evitando a mistura das duas soluções. Após isso, o tubo foi centrifugado em 500xg por 30 minutos com o freio da centrífuga desligado, para não prejudicar o gradiente de células formado. Após a centrifugação, há um gradiente de células, na base do tubo Falcon ficam os eritrócitos e os granulócitos, acima posiciona-se o Ficoll-paque, seguido da camada de PBMC e, por último, o plasma. A camada de PBMC foi retirada com o uso de uma pipeta Pasteur para um novo tubo Falcon. Após a coleta de PBMC, foi realizada a lavagem das células, que foi feita pela adição de 5 ml de PBS e centrifugação de 370g por cinco minutos, repetindo esse processo duas vezes. A ressuspensão das células foi feita em 5 ml de RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) contendo 10% de Soro Bovino Fetal (FBS), 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich) e 1,5% de Fitohemaglutinina-M (do inglês *Phytohemagglutinin*, PHA-M), um composto extraído de semente de feijão com

propriedades de estimulação do metabolismo e da divisão celular de células mononucleares (Dixit *et al.*, 2003).

As células foram mantidas em 37°C e 5% de CO₂ por quatro dias. Após o estabelecimento da cultura, os leucócitos foram tratados com 200µg/ml de puromicina (Sigma-Aldrich-P7255) para inativar o mecanismo de degradação mediada por mutação sem sentido (do inglês *Nonsense-mediated mRNA decay* - NMD) (Messiaen & Wimmer, 2012). O uso de culturas de células de linfócitos de curto prazo tratadas com puromicina pode diminuir expressivamente o tempo necessário para detectar variantes deletérias. Essa técnica é utilizada para obter RNA de melhor qualidade para análise e para contornar o NMD, visto que esse mecanismo degrada RNAs mensageiros com códons de parada prematuros formados por variantes na sequência do gene (Messiaen *et al.*, 2000).

2.3 Extração de RNA e conversão em cDNA

A extração de RNA total foi realizada a partir dos leucócitos em cultura tratados com puromicina e a partir do tubo EDTA adicional com sangue total, utilizando o *kit PureLink RNA mini kit* (Thermo Fisher Scientific, USA).

Após a extração de RNA total, foi realizada a etapa de conversão do RNA para cDNA por transcrição reversa, utilizando o *kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA). As concentrações e as razões 260/280 e 260/230 das extrações de RNA total de todos os pacientes que realizaram a coleta é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Concentração e razões de pureza de cada amostra com RNA extraído.

Paciente	[] RNA -		
	ng/µl	260/230	260/280
P1*	22,3	0,84	1,72
P1C**	314,9	2,16	2,04
P2	167,6	1,55	2,06
P2C	232,8	1,98	2,03
P3	127,2	1,41	2,07
P3C	1219,6	1,85	2,1
P4	44,8	2	2,09
P4C	300,1	2,09	2,28

*P1 representa a amostra biológica do paciente gerada do sangue total sem a realização da cultura de células;

**PIC representa a amostra biológica que foi realizada cultura de células e inibição da via NMD (conforme mostrado no tópico 2.2).

2.4 Análise de Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para verificar se as VUS encontradas nos pacientes selecionados podem estar afetando os sítios de processamento dos RNAs mensageiros respectivos e se existe presença de alterações em pacientes sem variantes detectadas por teste molecular prévio, foram desenhados *primers* específicos para cada gene contemplando todos os éxons codificantes. As sequências de referência utilizadas para o desenho dos *primers* foram os cDNAs correspondentes a NM_000368.5 para *TSC1* e NM_000548.5 para *TSC2*. Os *primers* foram desenhados nas junções éxon-éxon para evitar amplificação de DNA que possivelmente pode estar na amostra, formando blocos de *primers*. Foram desenhados sete *primers* para *TSC1* e 12 *primers* para *TSC2* (Tabela 2). Como controle das reações de PCR foi utilizado um *primer* para o gene constitutivo *GAPDH*, que por sempre ser expresso em nível basal, deve ser amplificado em todas as reações de PCR com cDNA (Suzuki *et al.*, 2000). Foram posteriormente visualizados por eletroforese em gel de agarose. O tamanho de cada amplicon gerado para *GAPDH* e para cada *primer* de interesse foi analisado pelo seu tamanho de peso molecular. Se algum bloco amplificado por PCR estivesse ausente ou com tamanho diferente do esperado, poderíamos inferir que a alteração afeta a constituição da proteína.

Tabela 2: Blocos de primers desenhados nas junções éxon-éxon contemplando toda a região de cada gene *TSC1* e *TSC2*.

Gene			Amplicon (bp)	TA* (°C)
<i>TSC1</i> (éxons)	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')		
TSC1_1 (1-3)	GGGGAGGTGCTGTACG	CCACGGTCAGAATTGAGG	341	60
TSC1_2 (4-6)	GCTGGACTCCCCCATGCT	CGTGGCCTGGTTTCTTCAGG	476	60
TSC1_3 (7-10)	GAAGAAACCAGGCCACG	GCTCCAAAGAGTAGCTTGTG	547	60
TSC1_4 (11-14)	TGAACCACCACAAGCTACTC	CTAGATATTGCAGCTTCTTCTTT AT	435	54
TSC1_5 (15-	AAAGATAAAGAAGAAGCTGCA	AGCCTCCAAAGTGGGTC	622	55.5

16)	AT			
TSC1_6 (17-19)	CTTTGGAGGCTCTCCTCCTTC	CAGCTGCCTGTTCAAG ACTC	523	54
TSC1_7 (20-22)	GTTTCCCAAAGCTCTCAAAC	CCGTCATTACAACAGTCAAGC	506	60
TSC2 (éxons)				
TSC2_1 (1-3)	GGGGGTGCGCCTTTCT	CCACTGCGTGCTCTTCAAAT	320	59
TSC2_2 (4-5)	AGAACCTCAATTCTGACCGT	GTCCATCTTGAGACATTTTAGT	278	60
TSC2_3 (6-10)	AGAGCTGGCTGACTTTGTCCT	CATGGCCTGGTAAAATGATGGC	508	60
TSC2_4 (11-15)	GTCCGAACGAGGTGGTGTC	GGGCCATCACCTTCTCGATG	624	55
TSC2_5 (16-19)	CTGCCACACACACCACTTCAA	TTCCAGTCAGACTCCTGCTTCA A	558	61
TSC2_6 (20-22)	TGCCCTACTCCCTGCTCTT	GCCAGAGTGGACAGGAACTC	502	60
TSC2_7 (23-27)	TGGAGTTCCTGTCCACTC	CAGGAGACCTCTTCGGG	607	58
TSC2_8 (28-30)	GGAGCTCACGGAAACCTGTC	GCTGGTGTTCCTGTGGG	562	60
TSC2_9 (31-33)	GAGGCCACAGGGAAC	CTGGAGACTGAGGACGAC	423	59
TSC2_10 (34)	GGTCGTCCTCAGTCTCC	GCAGGAACACGAAACTGG	504	59
TSC2_11 (35-39)	AACCCAGTTTCGTGTTT	CTCCATGTCTTTCCTGCAC	591	60
TSC2_12 (40-41)	CAGGAAAGACATGGAGGG	GGCTTCCTCGCAGATCC	214	60

* = temperatura de anelamento de cada reação de PCR padronizada (*TSC1/2*).

2.5 Sequenciamento de Sanger

Em amostras com resultados de PCR diferentes do esperado, como por exemplo bandas ausentes ou de tamanhos diferentes do tamanho esperado para o bloco de éxons, posteriormente foram sequenciadas pela metodologia de Sanger para confirmação da alteração. Foi realizado pelo sequenciador ABI 3500 (*Applied Biosystems*, California, USA) e as sequências dos genes dos pacientes foram comparadas com cDNA de referência do banco de dados NCBI (NM_000368.5 para *TSC1* e NM_000548.5 para *TSC2*), através do alinhamento pelo programa CodonCode Aligner implementado no MEGA 5.04.

As análises laboratoriais deste projeto foram realizadas no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no Laboratório de Medicina Genômica (LMG), e em uma área compartilhada do centro de pesquisa, na Unidade de Pesquisa Laboratorial (UPL).

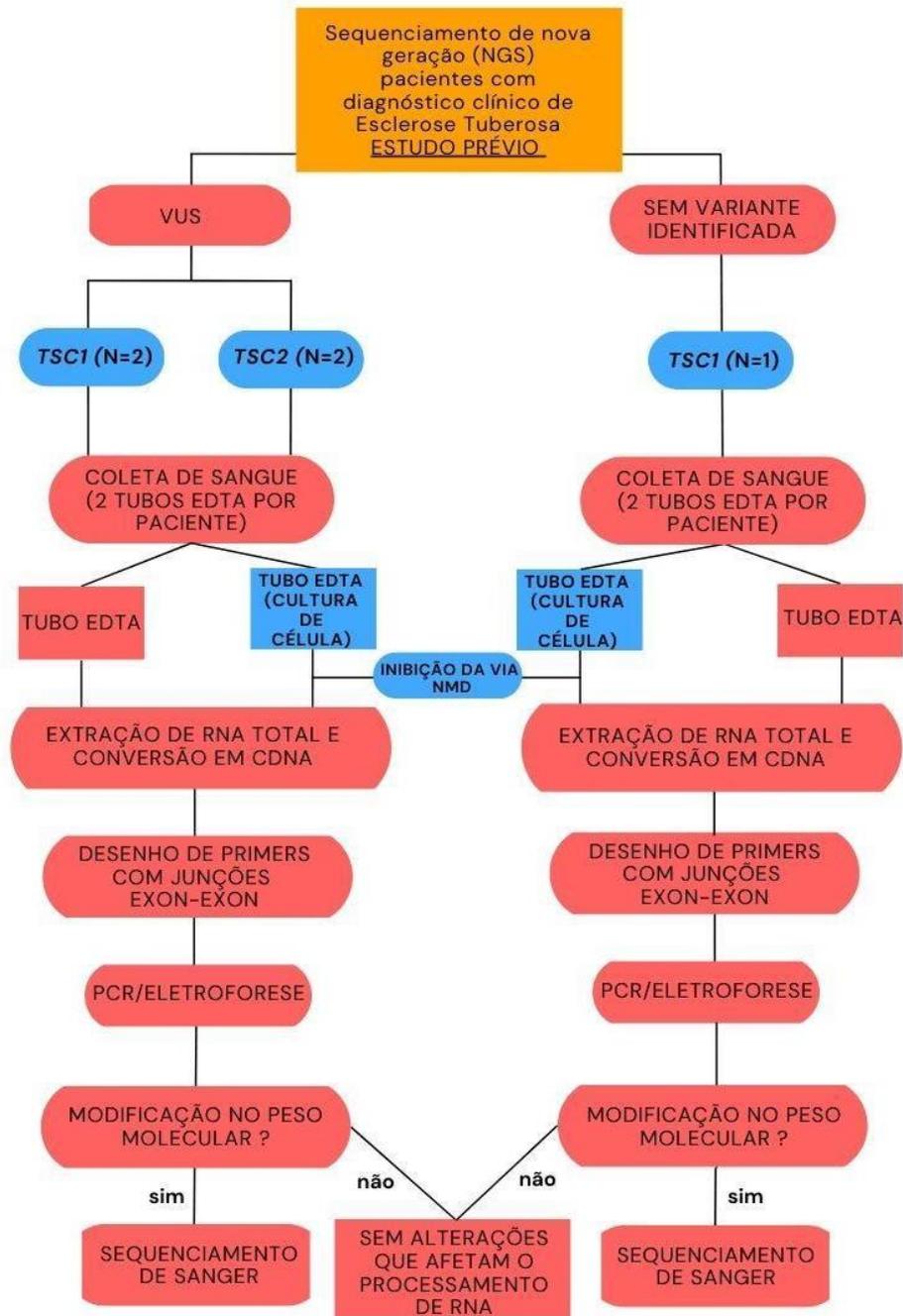


Figura 1: Fluxograma da metodologia proposta pelo estudo.

3. RESULTADOS PRELIMINARES

Foram coletados até o momento quatro pacientes com suspeita de esclerose tuberosa (três com VUS e um paciente sem variante identificada). A amplificação de todos os primers de *TSC1* e *TSC2* foi padronizada (Tabela 2). A metodologia foi aplicada com amostra de quatro pacientes com diagnóstico clínico de ET que realizaram coleta e até o momento não foi

identificada nenhuma alteração. Entretanto, serão recrutados mais pacientes. A padronização do primer *TSCI_5* (éxon 15-16) está apresentado na Figura 2. Mesmo que não tenha sido detectada uma alteração, a metodologia foi padronizada, visto que os amplicons de cada reação tiveram o tamanho esperado.

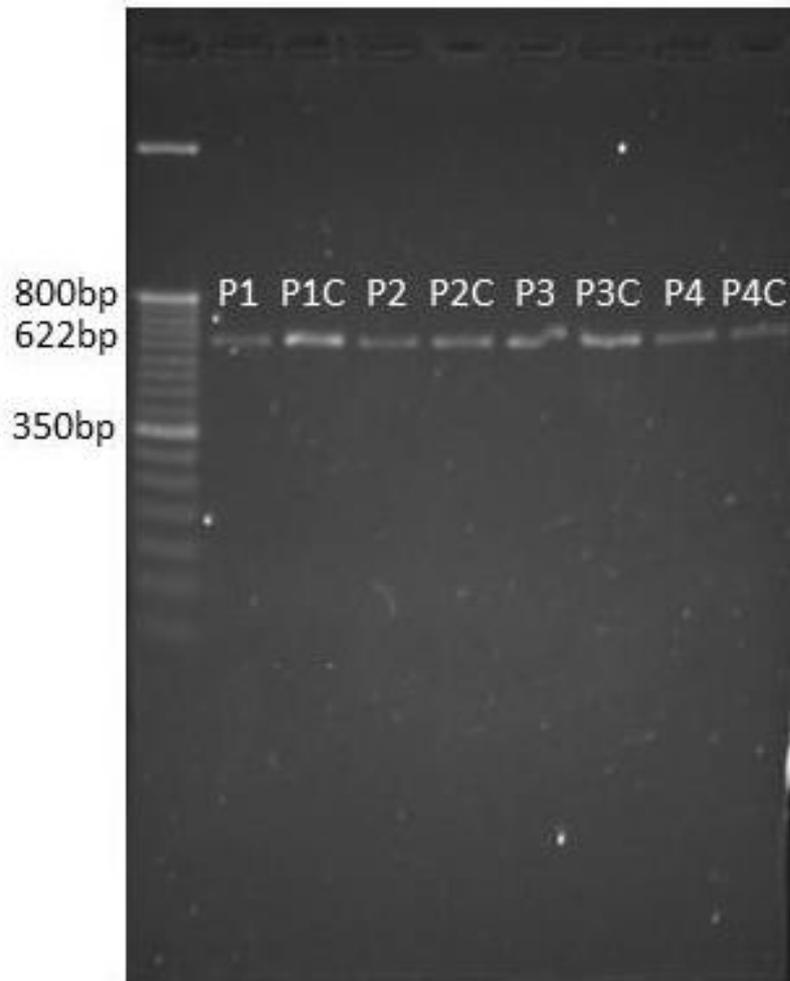


Figura 2: Eletroforese dos amplicons do primer *TSCI_5* (éxons 15-16) das amostras dos quatro pacientes recrutados. P1 = RNA do paciente 1 obtido sem a execução da cultura de células mononucleares; P1C = RNA do paciente 1 obtido após a cultura de células mononucleares.

CAPÍTULO IV

Considerações finais, referências e anexos

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta dissertação de mestrado teve como objetivo principal realizar uma análise detalhada das variantes identificadas nos genes *TSC1* e *TSC2* constantes em uma base de dados moleculares pública. Além disso, estabelecer uma metodologia para identificar variantes patogênicas causadoras de alteração ao nível do RNA em pacientes com diagnóstico clínico de esclerose tuberosa e resultado de diagnóstico molecular (análise de sequência codificadora e de número de cópias de *TSC1* e *TSC2*) negativo ou inconclusivo. Nesse sentido, essa metodologia seria principalmente empregada para analisar o papel de variantes com significado incerto (VUS) sobre patogenicidade e para analisar possíveis variantes intrônicas.

Em relação ao primeiro objetivo específico, de revisar variantes detectadas em *TSC1/2* descritas no banco de dados ClinVar, os principais achados foram: VUS é a maioria das variantes em *TSC1/2* submetidas no banco de dados (*TSC1*=1.763 e *TSC2*=3.840), como já relatado em outros genes (Federici & Soddu, 2020). Além disso, apresentam consequência molecular mais semelhantes às variantes benignas; entretanto, é necessário dar destaque para algumas VUS com mudança na matriz de leitura, de sentido trocado e em regiões canônicas de *splicing*, que podem ser reclassificadas como patogênicas, dependendo da sua localização no gene. Como já relatado na literatura, em *TSC2* há éxons com maior número de variantes patogênicas, como o éxon 15 (Reyna-Fabián *et al.*, 2020); e outros com menor número de variantes patogênicas, como o éxon 25 e 31 (Ekong *et al.*, 2016). No entanto, na revisão não conseguimos identificar regiões claras com maior número de variantes patogênicas com a análise de distribuição das variantes ao longo de ambos os genes. Para reclassificar VUS como patogênica ou benigna, são necessários estudos funcionais ou estudos de segregação. Em nossa revisão, identificamos um número baixo de estudos funcionais com variantes em *TSC1/2* publicados na literatura (n=12).

Adicionalmente, identificamos que as VUS são pouco revisadas de acordo com o nível de revisão do ClinVar, muitas somente com uma submissão e poucas informações no banco de dados (*TSC1*=1.123 e *TSC2*=2.195). Entretanto, um número significativo dessas variantes apresenta múltiplas submissões, mas com conflito na interpretação da significância clínica (*TSC1*=230 e *TSC2*=664). Essas variantes conflitantes parecem ser primeiramente

submetidas como VUS e após submetidas como benignas (B/LB vs VUS). E a segunda submissão como benigna leva menos de dois anos em 20,4% dessas variantes e mais de dois anos em 19.7% dessas variantes. Esse achado corrobora dados de um estudo da literatura, o qual relatou que reclassificações de VUS para benignas ou provavelmente benignas demoram em média 1,17 anos e para patogênicas e provavelmente patogênicas levam em média 1,86 anos (Mersch *et al.*, 2018).

A falta de submissões de variantes detectadas em estudos moleculares no ClinVar, os poucos estudos funcionais relatados com variantes em *TSC1/2* em toda a literatura (n=12) e a falta de informações sobre VUS acarreta a dificuldade de reclassificação e acúmulo destas variantes no banco de dados. O entendimento sobre as variantes em *TSC1/2* pode nos dar novas direções do manejo clínico, bem como ter possíveis marcadores de severidade da doença, sendo necessário mais estudos moleculares e de correlações genótipo-fenótipo de variantes detectadas em pacientes com esclerose tuberosa.

Em relação aos demais objetivos específicos, relacionados ao desenvolvimento de um protocolo para identificar alterações de processamento, as metodologias laboratoriais foram realizadas com duas abordagens de obtenção do material biológico para a análise de cDNA: a) coleta de sangue periférico com extração de RNA imediata e b) cultura de PBMC para inibição da via de degradação de mRNA defeituosos. Até o momento não identificamos nenhuma alteração no tamanho dos amplicons, mas a amostragem de pacientes recrutados ainda é pequena. Como perspectiva, temos expectativa de ampliar os recrutamentos e esperamos identificar alguns casos em que alterações de processamento são determinantes do fenótipo e esclerose tuberosa, como relatado previamente para transcritos dos genes *TSC1* (Qiu *et al.*, 2020) e *TSC2* (Liu *et al.*, 2022) A análise de uma amostra maior de pacientes permitirá verificar também a frequência da ocorrência destas variantes em nossa população. Um ponto a ser ressaltado acerca da estratégia proposta é que a cultura de células parece mostrar maior eficiência em fornecer amostras com concentrações mais elevadas de RNA e amostras biológicas mais puras em comparação com a extração de RNA direto sem a realização da cultura de células primárias. Por esta razão, análises adicionais serão realizadas para confirmar essa impressão adicional. Por fim, um melhor entendimento das variantes em *TSC1/2* depositadas no ClinVar, assim como a padronização de uma metodologia para analisar papel de VUS e/ou identificação de possíveis variantes intrônicas em casos negativos de teste genético convencional podem resultar em maior compreensão da

patogênese molecular da esclerose tuberosa e otimização do manejo clínico, em especial, aconselhamento genético de pacientes com a doença.

REFERÊNCIAS

ALSOWAT, D. *et al.* The Phenotypic Spectrum of Tuberous Sclerosis Complex: A Canadian Cohort. **Child Neurol Open**, v. 8, p. 2329048X211012817, Maio 2021.

AMIN, S. *et al.* Causes of mortality in individuals with tuberous sclerosis complex. **Dev Med Child Neurol**, v. 59, n. 6, p.612-617, Junho 2017.

ANNA, A.; MONIKA, G. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. **J Appl Genet**, v. 59, n. 3, p. 253-268, Agosto 2018.

ANTONELLIS, A. *et al.* A rare myelin protein zero (MPZ) variant alters enhancer activity in vitro and in vivo. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e14346, Dezembro 2010.

ARS, E. *et al.* Recurrent mutations in the NF1 gene are common among neurofibromatosis type 1 patients. **J Med Genet**, v. 40, n. 6, p. e82, Junho 2003.

AU, K. S. *et al.* Genotype/phenotype correlation in 325 individuals referred for a diagnosis of tuberous sclerosis complex in the United States. **Genet Med**, v. 9, n. 2, p. 88-100, Fevereiro 2007.

AŞKIN, Ö. *et al.* A multistep approach to the diagnosis of rare genodermatoses. **Clin Dermatol**, v. 38, n. 4, p. 399-407, Julho/Agosto 2020.

BALLA, B. *et al.* Fast and robust next-generation sequencing technique using ion torrent personal genome machine for the screening of neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. **J Mol Neurosci**, v. 53, n. 2, p. 204-10, Junho 2014.

BORONAT, S. *et al.* Arachnoid cysts in tuberous sclerosis complex. **Brain Dev**, v. 36, n. 9, p. 801-6, Outubro 2014.

BAŁOL-POKORA, K. *et al.* A multistep approach to the genotype-phenotype analysis of Polish patients with tuberous sclerosis complex. **Eur J Med Genet**, v. 64, n. 10, p. 104309, Outubro 2021.

CRINO, P. B.; NATHANSON, K. L.; HENSKE, E. P. The tuberous sclerosis complex. **N Engl J Med**, v. 355, n. 13, p. 1345-56, Setembro 2006.

CURATOLO, P.; BOMBARDIERI, R.; JOZWIAK, S. Tuberous sclerosis. **Lancet**, v. 372, n. 9639, p. 657-68, Agosto 2008.

DABORA, S. L. *et al.* Mutational analysis in a cohort of 224 tuberous sclerosis patients indicates increased severity of TSC2, compared with TSC1, disease in multiple organs. **Am J Hum Genet**, v. 68, n. 1, p. 64-80, Janeiro 2001.

DIMARIO, F. J.; SAHIN, M.; EBRAHIMI-FAKHARI, D. Tuberous sclerosis complex. **Pediatr Clin North Am**, v. 62, n. 3, p. 633-48, Junho 2015.

DIXIT, V. D. *et al.* Leptin induces growth hormone secretion from peripheral blood mononuclear cells via a protein kinase C- and nitric oxide-dependent mechanism. **Endocrinology**, v. 144, n. 12, p. 5595-603, Dezembro 2003.

EDERY, P. *et al.* Association of TALS developmental disorder with defect in minor splicing component U4atac snRNA. **Science**, v. 332, n. 6026, p. 240-3, Abril 2011.

EKONG R, *et al.* Variants Within TSC2 Exons 25 and 31 Are Very Unlikely to Cause Clinically Diagnosable Tuberous Sclerosis. **Hum Mutat**, v. 37, n. 4, p. 364-70, Abril 2016.

EVANS, D. G. *et al.* Comprehensive RNA Analysis of the NF1 Gene in Classically Affected NF1 Affected Individuals Meeting NIH Criteria has High Sensitivity and Mutation Negative Testing is Reassuring in Isolated Cases With Pigmentary Features Only. **EBioMedicine**, v. 7, p. 212-20, Maio 2016.

FANG, L. J. *et al.* A novel mutation in the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene promotes skipping of two exons by preventing exon definition. **J Mol Biol**, v. 307, n. 5, p. 1261-70, Abril 2001.

FEDERICI, G. & SODDU, S. Variants of uncertain significance in the era of high-throughput genome sequencing: a lesson from breast and ovary cancers. **Journal of experimental & clinical cancer research**, v. 39, n.1 p. 46, Março 2020.

FARACH, L. S. *et al.* Tuberous Sclerosis Complex Genotypes and Developmental Phenotype. **Pediatr Neurol**, v. 96, p. 58-63, Julho 2019.

FERAMISCO, J. D. *et al.* Phenotypic and genotypic analyses of genetic skin disease through the Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) database. **J Invest Dermatol**, v. 129, n. 11, p. 2628-36, Novembro 2009.

FITZGERALD, J. *et al.* A Deep Intronic Variant Activates a Pseudoexon in the. **Mol Syndromol**, v. 11, n. 5-6, p. 264-270, Dezembro 2020.

GRASEL, R. S. *et al.* Using Co-segregation and Loss of Heterozygosity Analysis to Define the Pathogenicity of Unclassified Variants in Hereditary Breast Cancer Patients. **Front Oncol**, v. 10, p. 571330, Outubro 2020.

(HGMD) **Human Gene Mutation Database**. Disponível em: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php> Acesso em: 20 de dezembro 2022.

JANSEN, A. C. *et al.* Unusually mild tuberous sclerosis phenotype is associated with TSC2 R905Q mutation. **Ann Neurol**, v. 60, n. 5, p. 528-539, Nov 2006.

JONES, A. C. *et al.* Comprehensive mutation analysis of TSC1 and TSC2-and phenotypic correlations in 150 families with tuberous sclerosis. **Am J Hum Genet**, v. 64, n. 5, p. 1305-15, Maio 1999.

- KANG, E. *et al.* Phenotype categorization of neurofibromatosis type I and correlation to NF1 mutation types. **J Hum Genet**, v. 65, n. 2, p. 79-89, Janeiro 2020.
- KIM, J. *et al.* AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. **Nat Cell Biol**, v. 13, n. 2, p. 132-41, Fevereiro 2011.
- KRAWCZAK, M. *et al.* Single base-pair substitutions in exon-intron junctions of human genes: nature, distribution, and consequences for mRNA splicing. **Hum Mutat**, v. 28, n. 2, p. 150-8, Fevereiro 2007.
- LEMKE, J. R. *et al.* Monogenic human skin disorders. **Dermatology**, v. 229, n. 2, p. 55-64, Julho 2014.
- LIN, R. *et al.* [Genetic screening and prenatal diagnosis in high-risk families with tuberous sclerosis complex syndrome]. **Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi**, v. 38, n. 5, p. 435-438, Maio 2021.
- LIN, S. *et al.* Tuberous Sclerosis Complex in Chinese patients: Phenotypic analysis and mutational screening of TSC1/TSC2 genes. **Seizure**, v. 71, p. 322-327, Outubro 2019.
- LIU, L.; YU, C.; YAN, G. Identification of a novel heterozygous TSC2 splicing variant in a patient with Tuberous sclerosis complex: A case report. **Medicine (Baltimore)**, v. 101, n. 3, p. e28666, Janeiro 2022.
- LU, X. *et al.* Novel Intronic Mutations Introduce Pseudoexons in DMD That Cause Muscular Dystrophy in Patients. **Front Genet**, v. 12, p. 657040, Abril 2021.
- MA, X. M.; BLENIS, J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 5, p. 307-18, Maio 2009.
- MESSIAEN, L. M. *et al.* Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. **Hum Mutat**, v. 15, n. 6, p. 541-55, Maio 2000.
- MERSCH, J. *et al.* Prevalence of Variant Reclassification Following Hereditary Cancer Genetic Testing. **JAMA**, v.320, n. 12, 1266-1274, Setembro 2018.
- MESSIAEN, L. WIMMER., K. Mutation analysis of the NF1 gene by cDNA-based sequencing of the coding region. v. 6, p. 17, Janeiro 2012.
- MOLES-FERNÁNDEZ, A. *et al.* Role of Splicing Regulatory Elements and In Silico Tools Usage in the Identification of Deep Intronic Splicing Variants in Hereditary Breast/Ovarian Cancer Genes. **Cancers (Basel)**, v. 13, n. 13, Julho 2021.
- MONTALBAN, G. *et al.* Screening of BRCA1/2 deep intronic regions by targeted gene sequencing identifies the first germline BRCA1 variant causing pseudoexon activation in a patient with breast/ovarian cancer. **J Med Genet**, v. 56, n. 2, p. 63-74, Fevereiro 2019.

MURRAY, A. *et al.* Common genetic variants are significant risk factors for early menopause: results from the Breakthrough Generations Study. **Hum Mol Genet**, v. 20, n. 1, p. 186-92, Janeiro 2011.

NABBOUT, R. *et al.* Early diagnosis of subependymal giant cell astrocytoma in children with tuberous sclerosis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 66, n. 3, p. 370-5, Março 1999.

(NCBI) **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7248>. Acesso em: 20 de dezembro 2022.

NORTHRUP, H. *et al.* Updated International Tuberous Sclerosis Complex Diagnostic Criteria and Surveillance and Management Recommendations. **Pediatr Neurol**, v. 123, p. 50-66, Outubro 2021.

NORTHRUP, H.; KRUEGER, D. A.; GROUP, I. T. S. C. C. Tuberous sclerosis complex diagnostic criteria update: recommendations of the 2012 International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference. **Pediatr Neurol**, v. 49, n. 4, p. 243-54, Outubro 2013.

NYKAMP, K. *et al.* Sherlock: a comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria. **Genet Med**, v. 19, n. 10, p. 1105-1117, Outubro 2017.

O'CONNOR, S. E. *et al.* A family with seizures and minor features of tuberous sclerosis and a novel TSC2 mutation. **Neurology**, v. 61, n. 3, p. 409-12, Agosto 2003.

OYAZATO, Y. *et al.* Molecular analysis of TSC2/PKD1 contiguous gene deletion syndrome. **Kobe J Med Sci**, v. 57, n. 1, p. E1-10, Junho 2011.

PASMANT, E. *et al.* Neurofibromatosis type 1 molecular diagnosis: what can NGS do for you when you have a large gene with loss of function mutations? **Eur J Hum Genet**, v. 23, n. 5, p. 596-601, Maio 2015.

PORTOCARRERO, L. K. L. *et al.* Tuberous sclerosis complex: review based on new diagnostic criteria. **An Bras Dermatol**, v. 93, n. 3, p. 323-331, Junho 2018.

QIAN, X. *et al.* Identification of Deep-Intronic Splice Mutations in a Large Cohort of Patients With Inherited Retinal Diseases. **Front Genet**, v. 12, p. 647400, Março 2021.

QIU, C. *et al.* A novel TSC1 frameshift mutation c.1550_1551del causes tuberous sclerosis complex by aberrant splicing and nonsense-mediated mRNA degradation (NMD) simultaneously in a Chinese family. **Mol Genet Genomic Med**, v. 8, n. 10, p. e1410, Outubro 2020.

RAYMOND, A. A. *et al.* Subependymal heterotopia: a distinct neuronal migration disorder associated with epilepsy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 57, n. 10, p. 1195-202, Outubro 1994.

REYNA-FABIÁN, M. E. *et al.* First comprehensive TSC1/TSC2 mutational analysis in Mexican patients with Tuberous Sclerosis Complex reveals numerous novel pathogenic variants. **Sci Rep**, v. 10, n. 1, p. 6589, Abril 2020.

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. **Genet Med**, v. 17, n. 5, p. 405-24, Maio 2015.

ROSENGREN, T. *et al.* Mutational analysis of TSC1 and TSC2 in Danish patients with tuberous sclerosis complex. **Sci Rep**, v. 10, n. 1, p. 9909, Junho 2020.

ROSSET, C. *et al.* Molecular analysis of TSC1 and TSC2 genes and phenotypic correlations in Brazilian families with tuberous sclerosis. **PLoS One**, v. 12, n. 10, p. e0185713, Outubro 2017.

SAHIN, M. *et al.* Advances and Future Directions for Tuberous Sclerosis Complex Research: Recommendations From the 2015 Strategic Planning Conference. **Pediatr Neurol**, v. 60, p. 1-12, Julho 2016.

SANCAK, O. *et al.* Mutational analysis of the TSC1 and TSC2 genes in a diagnostic setting: genotype--phenotype correlations and comparison of diagnostic DNA techniques in Tuberous Sclerosis Complex. **Eur J Hum Genet**, v. 13, n. 6, p. 731-41, Junho 2005.

SHEPHERD, C. W. *et al.* Causes of death in patients with tuberous sclerosis. **Mayo Clin Proc**, v. 66, n. 8, p. 792-6, Agosto 1991.

SILVA, J. A. *et al.* Paraneoplastic cutaneous manifestations: concepts and updates. **An Bras Dermatol**, v. 88, n. 1, p. 9-22, Fevereiro 2013.

Singh, A.K., Olsen, M.F., Lavik, L.A.S. *et al.* Detecting copy number variation in next generation sequencing data from diagnostic gene panels. **BMC Med Genomics**, v. 14, n. 1, p. 214-226, Agosto 2021.

SLAVIN, T. P. *et al.* The effects of genomic germline variant reclassification on clinical cancer care. **Oncotarget**, v. 10, n. 4, p. 417-423, Janeiro 2019.

SPITZ, J. **Genodermatoses: A Full-Color Clinical Guide to Genetic Skin Disorders.** Williams & Wilkins, New York: 1996.

Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation. **Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 332-337, Agosto 2000.

TYBURCZY, M. E. *et al.* Mosaic and Intronic Mutations in TSC1/TSC2 Explain the Majority of TSC Patients with No Mutation Identified by Conventional Testing. **PLoS Genet**, v. 11, n. 11, p. e1005637, Novembro 2015.

UYSAL, S. P.; ŞAHİN, M. Tuberous sclerosis: a review of the past, present, and future. **Turk J Med Sci**, v. 50, n. SI-2, p. 1665–1676, Novembro 2020.

VAZ-DRAGO, R.; CUSTÓDIO, N.; CARMO-FONSECA, M. Deep intronic mutations and human disease. **Hum Genet**, v. 136, n. 9, p. 1093–1111, Setembro 2017.

WIENECKE, R.; KÖNIG, A.; DECLUE, J. E. Identification of tuberin, the tuberous sclerosis-2 product. Tuberin possesses specific Rap1GAP activity. **J Biol Chem**. v. 270, n. 27, 16409-14, Julho 1995.

ANEXOS

Anexo 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

Projeto de Pesquisa: “CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DE PACIENTES COM GENODERMATOSES EM UM HOSPITAL PÚBLICO E TERCIÁRIO NO SUL DO BRASIL”

Você está sendo convidado (a) a participar de um estudo para avaliar os aspectos clínicos e a presença de mutações em pacientes com diagnóstico clínico de neurofibromatose tipo 1, neurofibromatose tipo 2 e esclerose tuberosa. A sua participação neste estudo envolve o preenchimento de uma ficha com seus dados pessoais e de uma ficha com seus dados demográficos e clínicos. Nessa ficha você precisará preencher seus dados de local de nascimento e residência atual, idade ao diagnóstico da doença, história familiar e complicações apresentadas. Você vai utilizar no máximo 15 minutos para preencher esta ficha. Também será realizada uma coleta de sangue (2 tubos Vacutainer® de 4mL cada), com a finalidade de obter o material para análise genética.

As complicações clínicas associadas às genodermatoses podem causar grande impacto nos pacientes. Com o advento de novas opções terapêuticas, incluindo drogas que atuam nas vias de sinalização afetadas por estas doenças, o conhecimento das mutações que originam a doença em pacientes individuais pode ser relevante para definir qual a melhor opção terapêutica. A caracterização clínica e molecular dos grupos de pacientes afetados no Sul do Brasil contribuirá para o melhor entendimento destas doenças na nossa população e os dados produzidos poderão servir de subsídio para o delineamento de novas estratégias de tratamento específicas.

O único risco potencial aos participantes deste estudo é o desconforto na coleta de sangue. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações da coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por pessoas especialmente treinadas para este fim, o que

diminui as chances de complicações.

Você pode escolher livremente se quer ou não participar do estudo. Se você decidir por não participar, isso não afetará de maneira alguma o seu atendimento e tratamento no HCPA. Caso você aceite participar, será marcado um momento adequado para que todas as informações necessárias sejam obtidas. Permanecemos à disposição para esclarecer quaisquer dúvidas que venham a surgir durante a sua participação no estudo. A pesquisadora responsável pelo estudo é a Dra. Patricia Ashton Prolla. Ela pode ser encontrada pelos telefones (51) 33598304 ou (51)33597661. As informações dessa pesquisa serão utilizadas somente pela equipe de saúde. Em caso de publicações posteriores, os dados desse estudo serão utilizados de forma inteiramente anônima, ou seja, não haverá possibilidade de identificar os dados individuais dos participantes.

1. Declaro ter sido esclarecido sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta sobre procedimentos, riscos, benefícios ligados à pesquisa e que serei informado quanto ao desenvolvimento de novos exames relacionados.

SIM

NÃO

2. Declaro estar ciente de meu direito de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade de meu tratamento.

SIM

NÃO

3. Declaro ter sido esclarecido que não receberei nenhuma remuneração financeira.

SIM

NÃO

4. Declaro ter sido esclarecido sobre a segurança de que minha identidade será preservada e que todas as informações por mim fornecidas serão confidenciais.

SIM

NÃO

5. Autorizo o armazenamento da amostra de meu DNA, obtido nesse projeto de pesquisa. Caso seja necessária a utilização futura dessa amostra, o paciente será chamado para reconsentimento específico para o novo estudo.

SIM

NÃO

6. Declaro estar ciente de que não há prazo exato ou estipulado para receber resposta do resultado desta pesquisa, mas que este será informado assim que disponível.

SIM

NÃO

7. Estou ciente de que posso optar por não saber o resultado do teste quando este estiver disponível.

SIM

NÃO

8. Em caso de impossibilidade de receber o resultado pessoalmente, autorizo meu/minha familiar, Sr./Sra. _____ a recebê-lo.

9. Eu expliquei a _____ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, na minha melhor capacidade.

Assinatura do entrevistador

Nome por extenso

Local e Data

Eu li e recebi uma cópia deste formulário de consentimento e concordo em participar da pesquisa. Eu entendo a informação fornecida por este documento e tive a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer minhas dúvidas sobre a pesquisa.

Nome e assinatura do participante

Local e Data

Data de nascimento

Anexo 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes pediátricos

Projeto de Pesquisa: “CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DE PACIENTES COM GENODERMATOSES EM UM HOSPITAL PÚBLICO E TERCIÁRIO NO SUL DO BRASIL”

Você está sendo convidado (a) a permitir a participação do paciente menor de idade, pelo qual você é responsável legal, em um estudo para avaliar os aspectos clínicos e a presença de mutações em pacientes com diagnóstico clínico de neurofibromatose tipo 1, neurofibromatose tipo 2 e esclerose tuberosa. A participação neste estudo envolve o preenchimento de uma ficha com os dados pessoais do paciente e de uma ficha com dados demográficos e clínicos. Nessa ficha você precisará preencher os dados de local de nascimento e residência atual do paciente, idade ao diagnóstico da doença, história familiar e complicações apresentadas. Você vai utilizar no máximo 15 minutos para preencher esta ficha. Também será realizada uma coleta de sangue do menor de idade pelo qual você é responsável (2 tubos Vacutainer® de 4mL cada), com a finalidade de obter o material para análise genética.

As complicações clínicas associadas às genodermatoses podem causar grande impacto nos pacientes. Com o advento de novas opções terapêuticas, incluindo drogas que atuam nas vias de sinalização afetadas por estas doenças, o conhecimento das mutações que originam a doença em pacientes individuais pode ser relevante para definir qual a melhor opção terapêutica. A caracterização clínica e molecular dos grupos de pacientes afetados no Sul do Brasil contribuirá para o melhor entendimento destas doenças na nossa população e os dados produzidos poderão servir de subsídio para o delineamento de novas estratégias de tratamento específicas.

O único risco potencial aos participantes deste estudo é o desconforto na coleta de sangue. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações da coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por pessoas especialmente treinadas para este fim, o que

diminui as chances de complicações.

Você pode escolher livremente se o paciente menor de idade pode ou não participar do estudo. Se você decidir por não participar, isso não afetará de maneira alguma o atendimento e tratamento no HCPA. Caso você concorde com a participação, será marcado um momento adequado para que todas as informações necessárias sejam obtidas. Permanecemos à disposição para esclarecer quaisquer dúvidas que venham a surgir. A pesquisadora responsável pelo estudo é a Dra. Patricia Ashton Prolla. Ela pode ser encontrada pelos telefones (51) 33598304 ou (51) 33597661. As informações dessa pesquisa serão utilizadas somente pela equipe de saúde. Em caso de publicações posteriores, os dados desse estudo serão utilizados de forma inteiramente anônima, ou seja, não haverá possibilidade de identificar os dados individuais dos participantes.

1. Declaro ter sido esclarecido sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta sobre procedimentos, riscos, benefícios ligados à pesquisa e que serei informado quanto ao desenvolvimento de novos exames relacionados.

SIM

NÃO

2. Declaro estar ciente de meu direito de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade de meu tratamento.

SIM

NÃO

3. Declaro ter sido esclarecido que não receberei nenhuma remuneração financeira.

SIM

NÃO

4. Declaro ter sido esclarecido sobre a segurança de que minha identidade será preservada e que todas as informações por mim fornecidas serão confidenciais.

SIM

NÃO

5. Autorizo o armazenamento da amostra de meu DNA, obtido nesse projeto de pesquisa. Caso seja necessária a utilização futura dessa amostra, o paciente será chamado para reconsentimento específico para o novo estudo.

SIM

NÃO

6. Declaro estar ciente de que não há prazo exato ou estipulado para receber resposta do resultado desta pesquisa, mas que este será informado assim que disponível.

SIM

NÃO

7. Estou ciente de que posso optar por não saber o resultado do teste quando este estiver disponível.

SIM

NÃO

8. Em caso de impossibilidade de receber o resultado pessoalmente, autorizo meu/minha familiar, Sr./Sra. _____ a recebê-lo.

9. Eu expliquei a _____ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, na minha melhor capacidade.

Assinatura do entrevistador

Nome por extenso

Local e Data

Eu li e recebi uma cópia deste formulário de consentimento e concordo em participar da pesquisa. Eu entendo a informação fornecida por este documento e tive a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer minhas dúvidas sobre a pesquisa.

Nome do participante

Data de nascimento

Assinatura do responsável legal

Local e Data

Anexo 3 - Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes assintomáticos

Projeto de Pesquisa: “CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DE PACIENTES COM GENODERMATOSES EM UM HOSPITAL PÚBLICO E TERCIÁRIO NO SUL DO BRASIL”

Você está sendo convidado (a) a participar de um estudo para avaliar os aspectos clínicos e a presença de mutações em pacientes com diagnóstico clínico de neurofibromatose tipo 1, neurofibromatose tipo 2 e esclerose tuberosa, e sua participação é importante para ajudar a esclarecer como a doença ocorre em seus familiares afetados e qual o risco que você e outros familiares sem a doença tem de desenvolvê-la. A sua participação neste estudo envolve o preenchimento de uma ficha com seus dados pessoais e de uma ficha com seus dados demográficos e clínicos. Nessa ficha você precisará preencher seus dados de local de nascimento e residência atual, história familiar de doenças e possíveis sintomas associados às doenças estudadas. Você vai utilizar no máximo 15 minutos para preencher esta ficha. Também será realizada uma coleta de sangue (2 tubos Vacutainer® de 4mL cada), com a finalidade de obter o material para análise genética.

As complicações clínicas associadas às genodermatoses podem causar grande impacto nos pacientes. Com o advento de novas opções terapêuticas, incluindo drogas que atuam nas vias de sinalização afetadas por estas doenças, o conhecimento das mutações que originam a doença em pacientes individuais pode ser relevante para definir qual a melhor opção terapêutica. A caracterização clínica e molecular dos grupos de pacientes afetados no Sul do Brasil contribuirá para o melhor entendimento destas doenças na nossa população e os dados produzidos poderão servir de subsídio para o delineamento de novas estratégias de tratamento específicas.

O único risco potencial aos participantes deste estudo é o desconforto na coleta de sangue. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações da coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por pessoas especialmente treinadas para este fim, o que diminui as chances de complicações.

Você pode escolher livremente se quer ou não participar do estudo. Caso você aceite

participar, será marcado um momento adequado para que todas as informações necessárias sejam obtidas. Permanecemos à disposição para esclarecer quaisquer dúvidas que venham a surgir durante a sua participação no estudo. A pesquisadora responsável pelo estudo é a Dra. Patricia Ashton Prolla. Ela pode ser encontrada pelos telefones (51) 33598304 ou (51) 33597661. As informações dessa pesquisa serão utilizadas somente pela equipe de saúde. Em caso de publicações posteriores, os dados desse estudo serão utilizados de forma inteiramente anônima, ou seja, não haverá possibilidade de identificar os dados individuais dos participantes.

1. Declaro ter sido esclarecido sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta sobre procedimentos, riscos, benefícios ligados à pesquisa e que serei informado quanto ao desenvolvimento de novos exames relacionados.

SIM

NÃO

2. Declaro estar ciente de meu direito de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade de meu tratamento.

SIM

NÃO

3. Declaro ter sido esclarecido que não receberei nenhuma remuneração financeira.

SIM

NÃO

4. Declaro ter sido esclarecido sobre a segurança de que minha identidade será preservada e que todas as informações por mim fornecidas serão confidenciais.

SIM

NÃO

5. Autorizo o armazenamento da amostra de meu DNA, obtido nesse projeto de pesquisa. Caso seja necessária a utilização futura dessa amostra, o paciente será chamado para reconsentimento específico para o novo estudo.

SIM

NÃO

6. Declaro estar ciente de que não há prazo exato ou estipulado para receber resposta do resultado desta pesquisa, mas que este será informado assim que disponível.

SIM

NÃO

7. Estou ciente de que posso optar por não saber o resultado do teste quando este estiver disponível.

SIM

NÃO

8. Em caso de impossibilidade de receber o resultado pessoalmente, autorizo meu/minha familiar, Sr./Sra. _____ a recebê-lo.

9. Eu expliquei a _____ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, na minha melhor capacidade.

Assinatura do entrevistador

Nome por extenso

Local e Data

Eu li e recebi uma cópia deste formulário de consentimento e concordo em participar da pesquisa. Eu entendo a informação fornecida por este documento e tive a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer minhas dúvidas sobre a pesquisa.

Nome e assinatura do participante

Local e Data

Data de nascimento