

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA

FABRÍCIO MACIEL SOARES

**DOENÇA DE NIEMANN-PICK TIPO C: NOVA VARIANTE PATOGÊNICA
ASSOCIADA A FORMA CLÍNICA INFANTIL**

SÃO LUÍS

2018

FABRÍCIO MACIEL SOARES

**DOENÇA DE NIEMANN-PICK TIPO C: NOVA VARIANTE PATOGÊNICA
ASSOCIADA A FORMA CLÍNICA INFANTIL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Medicina da
Universidade Federal do Maranhão -
UFMA como requisito básico para
obtenção do grau de Médico.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Silma Regina
Ferreira Pereira

SÃO LUÍS

2018

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a)
autor(a). Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Soares, Fabrício Maciel.

Doença de Niemann-Pick tipo C: nova variante
patogênica associada a forma clínica infantil / Fabrício
Maciel Soares. - 2018.

45 f.

Orientador(a): Silma Regina Ferreira Pereira.

Curso de Medicina, Universidade Federal do
Maranhão, São Luís, 2018.

1. Doença de Niemann-Pick tipo C. 2. Gene NPC1. 3.
Transporte de colesterol. I. Pereira, Silma Regina
Ferreira. II. Título.

**DOENÇA DE NIEMANN-PICK TIPO C: NOVA VARIANTE PATOGÊNICA
ASSOCIADA A FORMA CLÍNICA INFANTIL**

FABRÍCIO MACIEL SOARES

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Silma Regina Ferreira Pereira

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Vanda Maria Ferreira Simões (Examinadora)

Departamento de Saúde Pública
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Fernando Lamy Filho (Examinador)

Departamento de Saúde Pública
Universidade Federal do Maranhão

MSc. Maria Juliana Rodovalho Doriqui (Examinadora)

Hospital Infantil Dr^o Juvêncio Mattos

AGRADECIMENTOS

“*E não nos cansemos de fazer o bem, pois no tempo próprio colheremos, se não desanimarmos.*” Em sua primeira epístola, o apóstolo Paulo nos convida a perseverar e ter paciência: a perseverança é uma constante ao longo dos vários versículos inspirados por Deus, e não desistir facilmente dos sonhos, ter fé e insistir na vitória devem ser exercícios de gratidão à vida. Ao final desses anos de formação, ao retomar o passado, percebo que a perseverança foi uma constante em minha vida. Cedo minha inquietude me impeliu para o longe e para a miragem, onde redemoinhei aos ventos em busca de verdades. A verdade é que poucas vezes as encontrei, mas pelo caminho fui coletando mais dúvidas, mais questionamentos e alimentando minha curiosidade. Em algum momento descobri que eu poderia usar o tempo indefinido que ainda hei de compartilhar com todos para gerar mais dúvidas, e dentro de mim um dos meus muitos eus decidiu perseverar e seguir esse caminho. Sou hoje um reflexo dessa escolha, e esse trabalho é a materialização do meu amor pelo difícil. Nunca amei o fácil.

Chega então ao fim uma importante fase da vida, terra estranha entre a infância e a vida adulta. Renovo minha alegria de poder trilhar um novo caminho, com novos desafios e sonhos. Sigo adiante na esperança de ter ao meu lado meus familiares e amigos, que sempre me apoiaram e que foram fundamentais no meu perseverar, assim como tenho a esperança de usar meu ofício para fazer o bem, permanecendo nas coisas que aprendi dos meus mestres e das quais tenho convicção.

Agradeço à minha família amada. Nossa relação poderia facilmente ser objeto de estudo freudiano. Especialmente aos meus pais: vocês reúnem coragem, inteligência e a sabedoria que eu almejo. Tudo o que fiz foi tentativa de lhes retribuir tanta confiança e amor depositados em mim.

Agradeço minha amiga e professora Silma por ter sido chave na minha perseverança no curso de Medicina e com a qual aprendi muito mais sobre a vida, honestidade e ética profissional do que sobre conhecimentos meramente biomédicos. Meu coração se alegra e se orgulha de ter sido seu aluno e, ao lado da incrível Vanessa Moreira, que compartilhou muitos risos comigo, aprendi que a ciência é divertida e que o que nos move é a curiosidade. Agradeço a Juliana Doriqui por ser inspiração e por ajudar os pacientes que muitos médicos já esqueceram.

A vida reúne naturalmente os semelhantes, e sou feliz de ter tido a companhia dos meus eternos amigos: Bianca Portela, que me aconselha há 8 anos e somos testemunhas oculares do que nos tornamos. É o meu fiel da balança, ao qual sempre retorno quando preciso lembrar quem eu era e quem eu sou. Dimítrius Garbis, que meu corpo não entende mais como outra pessoa, mas como extensão do meu coração e do meu pensamento; Elis Vanessa, ter você como companheira de profissão é reforçador da minha escolha de ajudar o próximo com o que eu tenho de melhor; Laerde Ribeiro, o de muitas inteligências. Somente uma alma inquieta pode ter seguido tantos caminhos quanto você; Karina Barros que me ensinou a não desistir das pessoas que eu amo; Larissa Costa, cujo sorriso ecoará pra sempre nos meus ouvidos e que foi um exemplo de religiosidade e de bondade. Que esteja ao lado de Deus olhando por mim e pelos saudosos amigos que deixou; Juliana Barros, Ricardo Conde, Tatiana Messala, Kayanne Moura, Débora Maia, Lara Pezzatto e Luiza Pezzatto que já permanecem há 8 anos como os melhores amigos que eu poderia ter encontrado em São Luís.

Agradeço ainda aos familiares e pacientes deste estudo, cujas vidas não foram em vão, e a Rede NPC Brasil, por ser fundamental na assistência e diagnóstico desses pacientes.

*“Não, não vou por aí! Só vou por onde
Me levam meus próprios passos...
Se ao que busco saber nenhum de vós responde
Por que me repetis: "vem por aqui!"?”*

José Régio

RESUMO

Introdução: A doença de Niemann-Pick tipo C (NP-C) é uma rara desordem de depósito lisossômico causada por mutações autossômicas recessivas nos genes *NPC1* (18q11.2) em 95% das famílias ou *NPC2* (14q24.3) em 4% dos casos. Caracteriza-se por acometimento multissistêmico, variando desde sinais precoces como ascite fetal, esplenomegalia, doença hepática neonatal incluindo colestase prolongada, até progressivo e irreversível comprometimento do sistema nervoso central que pode se iniciar na infância, adolescência ou vida adulta. Possui manifestações neurológicas características, incluindo a paralisia supranuclear do olhar vertical, sinais de envolvimento cerebelar (ataxia, distonia, disartria e disfagia), cataplexia gelástica, convulsões, demência e distúrbios psiquiátricos. Por se tratar de doença rara, os estudos de correlação genótipo *versus* fenótipo são fundamentais para o entendimento das bases moleculares da patologia e, conseqüentemente, abre caminhos para futuros estudos em busca de métodos diagnósticos e de tratamento. **Métodos:** Relata-se os achados clínicos e laboratoriais de quatro pacientes de diferentes famílias diagnosticados com NP-C, bem como as alterações moleculares detectadas nos éxons do gene *NPC1* por meio de sequenciamento direto. **Resultados:** Quatro pacientes com NP-C, dois do sexo masculino e duas do sexo feminino, tiveram as primeiras manifestações clínicas ainda na infância, um permanecendo ainda sem acometimento neurológico importante, sendo diagnosticado por apresentar ascite fetal. Dois dos casos eram primos; os outros desconheciam parentesco entre si. O início dos sintomas detectados variou desde período intraútero a 18 meses, e se constituíram de ascite fetal, esplenomegalia, colestase, regressão motora, espasticidade, disfagia, prejuízo cognitivo e convulsões. Paralisia supranuclear vertical foi observada nos três pacientes com envolvimento neurológico, e a cataplexia gelástica ausente em somente um dos pacientes. Os níveis de quitotriosidase sérica esteve aumentado para todos os pacientes, e a atividade da esfingomielinase ácida foi normal ou pouco diminuída em relação aos valores de referência. O sequenciamento do gene *NPC1* revelou quatro variantes, dentre as quais p.A1035V, p.Q710Rfs, p.P1007A foram previamente descritas e sua patogenicidade atestada, enquanto p.E1166K, descrita pela primeira vez neste trabalho, foi encontrada em heterozigose composta e sua patogenicidade foi avaliada *in silico*, com a indicação de que essa alteração pode acarretar mudanças danosas a proteína codificada pelo gene. **Conclusão:** O conhecimento da variabilidade genética e fenotípica dos casos estudados permite maior entendimento da história natural das doenças raras, fornecendo ferramentas para a conscientização entre médicos não-geneticistas e aumentando a suspeição dessas patologias. Além disso, descreve-se uma nova variante molecular e os sinais clínicos a ela associados.

Palavras-chave: Doença de Niemann-Pick tipo C. gene *NPC1*. Transporte de colesterol.

ABSTRACT

Background: Niemann-Pick type C disease (NP-C) is a rare inherited lysosomal storage disorder caused by mutations in either *NPC1* (18q11.2) and *NPC2* (14q24.3) genes. It is responsible for multiple systems impairment, including signs of fetal ascites, splenomegaly, neonatal liver failure, prolonged cholestasis and progressive and irreversible neurological impairment. Classical neurological manifestations include vertical supranuclear gaze palsy, cerebellar signs (ataxia, dystonia, dysarthria and dysphagia), gelastic cataplexy, seizures, dementia and other psychiatric disorders. Genotype/phenotype studies are fundamental for a better understanding of the molecular and pathological basis of rare diseases, being necessary for future diagnostic and therapeutic researches. **Methods:** Herein, we describe the correlation between the clinical and molecular data of four patients with NP-C. All exons of *NPC1* gene were analyzed by direct sequencing. **Results:** All four patients enrolled, two males and two females, had their first visceral symptoms during infancy, one of them without sign of neurological impairment until the evaluation, being diagnosed during investigation due to fetal ascites. Cases two and three were cousins. The onset clinical symptoms varied from intra-uterus to eighteen months and included fetal ascites, motor regression, espasticity, dysphagia, cognitive delay and seizures. Vertical supranuclear gaze palsy was a clinical find in all the three patients with neurological involvement. Cataplexy was absent in only one patient. Serum chitotriosidase was elevated in all patients, while activity of acid sphingomyelinase was normal or slightly lower than normal values. *NPC1* sequencing identified four mutations, among which p.A1035V, p.Q710Rfs and p.P1007A were previously described as pathogenic, while p.E1166K was identified as a novel variant presented in heterozygosity. Its pathogenicity was evaluated *in silico*, which signs suggest that new aminoacid affects protein function. **Conclusion:** The assessment of genetic and phenotypic variability of four cases of NP-C provides greater knowledge on the natural history of this rare disease, besides raise awareness among non-geneticists. We also describe a new pathogenic variant and its clinical features. **Keywords:** Niemann-Pick type C disease; *NPC1* gene; Cholesterol transportation.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 Score das manifestações, associação de sintomas e história familiar do paciente, para o cálculo do Score de Predição de Risco para NP-C (RPS)..... | 9 |
| TABELA 2 Informações clínicas dos pacientes com NP-C diagnosticados no Maranhão, Nordeste do Brasil..... | 20 |
| TABELA 3 Perfil mutacional do gene <i>NPCI</i> neste estudo.. | 21 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO | 2 |
| 1.1 Bases Genéticas e Fisiopatológicas | 3 |
| 1.2 Descrição Clínica | 4 |
| 1.2.1 Formas infantis..... | 5 |
| 1.2.2 Forma juvenil | 6 |
| 1.2.3 Forma adulta | 7 |
| 1.2.4 Prognóstico e Seguimento..... | 7 |
| 1.3 Diagnóstico | 8 |
| 1.3.1 Clínico..... | 8 |
| 1.3.2 Laboratorial..... | 9 |
| 1.4 Tratamento | 11 |
| 3. OBJETIVOS | 13 |
| 2.1. Objetivo Geral | 13 |
| 2.2. Objetivos Específicos | 13 |
| 4. MÉTODOS | 14 |
| 4.1 Pacientes | 14 |
| 4.2 Exames Complementares | 14 |
| 5. RESULTADO | 15 |
| DOENÇA DE NIEMANN-PICK TIPO C: NOVA VARIANTE PATOGÊNICA ASSOCIADA A FORMA CLÍNICA INFANTIL. | 15 |
| REFERÊNCIAS | 26 |
| 6. APÊNDICES | 30 |
| 6.1 Apêndice I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE | 30 |
| 7. ANEXOS | 33 |
| 7.1 Anexo I – Normas de Submissão do Artigo Original | 33 |

1. INTRODUÇÃO

A doença de Niemann-Pick tipo C (NP-C) é uma rara patologia neurovisceral herdada, caracterizada por sintomas neurológicos progressivo e debilitantes, levando à morte prematura na maioria dos pacientes. Estima-se que ocorra um caso para cada 90.000 nascimentos (Wassif et al., 2016). É herdada de maneira autossômica recessiva por mutações em dois genes: *NPCI* e *NPC2*. Mutações em ambos os genes resultam em fenótipos bioquímicos semelhantes, com prejuízo no transporte e utilização do colesterol no metabolismo celular (Kwon et al., 2009).

Os sinais e sintomas clínicos de NP-C podem se manifestar a qualquer idade, variando da vida adulta até a sétima década de vida, com significativa heterogeneidade (Vanier & Millat, 2003). Sinais neurológicos como a paralisia supranuclear vertical, cataplexia gelástica, ataxia cerebelar, distonia e disfagia são os sintomas mais comuns de NP-C, e suas manifestações se associam ao prognóstico geral da doença (Mengel, 2013).

As últimas recomendações internacionais mostram importância para biomarcadores e análise molecular como testes de primeira linha para o diagnóstico de NP-C, diminuindo a importância dos testes mais invasivos que eram classicamente realizados, como o teste de Filipin (Patterson et al., 2013).

Neste estudo descrevemos uma nova variante patogênica para NP-C, assim como analisamos as manifestações clínicas, laboratoriais e achados moleculares de quatro pacientes afetados, a fim de contribuir com a melhor caracterização da variabilidade genética e fenotípica dos casos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

A doença de Niemann-Pick foi primariamente descrita por Albert Niemann e Ludwig Pick nos anos 20, representando um grupo heterogêneo de doenças de acometimento neurológico e visceral progressivos. A divisão de seus tipos hoje conhecidos se deu em 1958, por Crocker e Farber que as classificaram em quatro grupos de espectros clínicos distintos, representados por letras de A a D (Crocker, 1961). Brady e colaboradores demonstraram posteriormente que os tipos A e B representavam uma única entidade nosológica, caracterizada por deficiência severa de atividade da esfingomielinase, em contraposição ao defeito de transporte de lipídeos, característico do tipo C (Alobaidy, 2015).

A doença de Niemann-Pick do tipo C (NP-C) é entendida como uma desordem no transporte intracelular de colesterol, com o acúmulo de colesterol não-esterificado em endossomos maduros (Pentchev et al., 1994). Possui substrato etiológico em mutações de herança autossômica recessiva nos genes *NPC1* em 95% das famílias, *NPC2* em uma minoria (Vanier et al., 1996) e possivelmente em outros genes (Carstea et al., 1993). Apesar de não ter suas funções completamente elucidadas, as proteínas codificadas por esses genes estão envolvidas na coordenação e transporte lisossomal de colesterol e outras moléculas (Patterson et al., 2001; Sleat et al., 2004; Kwon et al., 2009). O tipo D refere-se originalmente a um isolado genético da região da Nova Escócia, que posteriormente demonstrou-se ser uma variante do tipo C, e portanto, não é mais entendido como entidade nosológica (Alobaidy et al., 2015).

A análise de quatro bases de dados de sequenciamento genômico aponta para uma incidência de 1/92104 para mutações em *NPC1* e 1/2858998 para *NPC2*, de acordo com as estimativas de incidências de estudos mais recentes (Wassif et al., 2016). Incidência menor foi encontrada por Vanier e colaboradores na França, com 63 casos entre 2000 e 2009, estimada em 1/120000. Se considerada apenas sua forma de expressão tardia, na qual os sintomas

neuropsiquiátricos são a principal forma de manifestação, a NP-C pode ser ainda mais frequente, com incidência estimada em 1/19000-1/36000 (Patterson et al., 2017).

1.1 Bases Genéticas e Fisiopatológicas

As funções exatas dos produtos codificados pelos genes envolvidos na gênese da NP-C ainda permanecem pouco claras dentro do funcionamento celular, entretanto são bem definidas suas localizações e funções individualmente. *NPCI*, o gene mais frequentemente relacionado à doença, é responsável por codificar uma grande glicoproteína de membrana localizada principalmente nos endossomos (Higgins et al., 1999). O gene *NPC2* codifica uma proteína lisossomal solúvel, que se liga ao colesterol com alta afinidade (Naureckiene et al., 2000).

Estudos em células de tecidos oriundos de pacientes com mutações em *NPCI* e *NPC2* não conseguiram determinar marcadores específicos para nenhum dos dois tipos, sugerindo que ambas as proteínas podem funcionar sequencialmente (Vanier et al., 1996). Essa teoria foi reforçada pela comparação de ratos com mutação nos dois genes e ratos com mutação em um único gene, que demonstrou uma cooperação não redundante das duas proteínas em uma mesma via de transporte intracelular de lipídeos (Kwon et al., 2009).

Sob o ponto de vista patológico, as lesões celulares são semelhantes, independente do gene mutado. Ocorre prejuízo no processamento e utilização do colesterol absorvido pelas células, que explica o acúmulo de colesterol e, de maneira secundária, alterações no metabolismo da esfingomielina em tecidos extraneurais. Nos neurônios, o acúmulo é principalmente de gangliosídeos GM2 e GM3, com uma limitada disfunção do metabolismo do colesterol. Alterações na morfologia neuronal são achados comuns com o progresso da doença, principalmente o aparecimento de meganeuritos, crescimento de dentritos ectópicos e formação de emaranhados fibrilares (Walkley & Suzuki, 2004).

As alterações na membrana celular desempenham papel importante na patogênese da doença, ao desencadear a ativação das vias de apoptose celular. Esse fato é refletido clinicamente com a progressão da doença, que cursa com aumento da taxa de morte dos neurônios, principalmente cerebelares, explicando os sintomas atáxicos característicos do final da doença (Mukherjee & Maxfield, 2004).

1.2 Descrição Clínica

O espectro clínico de NP-C é composto de manifestações viscerais, neurológicas e psiquiátricas profundamente heterogêneas, com a idade de aparecimento dos sintomas variando do período pré-natal até a sétima década de vida (Vanier & Millat, 2003). Não existem sintomas específicos ou patognomônicos para NP-C, porém a associação de sinais e sintomas podem ser altamente sugestivas do diagnóstico (Mengel et al., 2013).

Os sintomas viscerais são os primeiros a aparecerem, sendo em geral bem tolerados, exceto pelo período neonatal que se caracteriza por hidropisia, ascite, doença hepática precoce e em alguns casos pode levar à falência hepática e morte em menos de 6 meses (Vanier et al., 1988; Spiegel et al., 2009). Visceromegalias, em particular a esplenomegalia, são as principais manifestações viscerais e se associam a colestase de diferentes intensidades (Wraith et al., 2009). Tais sintomas não se correlacionam com a progressão da doença e surgem em períodos diferentes daqueles neurológicos, costumando precedê-los ou mesmo ausentes em até 15% dos casos (Vanier, 2010).

Os sintomas neurológicos estarão presentes de forma invariável no curso da doença, como evolução progressiva e fatal, caracterizados por ataxia cerebelar, disartria, disfagia e demência. O sinal mais comum manifestado por pacientes acometidos com NP-C é a paralisia supranuclear do olhar vertical (Solomon et al., 2005). O aparecimento dos sintomas neurológicos é indicativo do curso geral da doença e se correlaciona negativamente com a sobrevida e prognóstico (Mengel, 2013).

Os sintomas psiquiátricos são mais importantes nas formas clínicas tardias, e se iniciam com o declínio cognitivo, que afeta todos os pacientes com NP-C e é um forte indicador da doença quando associados a paralisia supranuclear do olhar vertical (Wijburg et al., 2012). Em adultos, déficits na execução de tarefas, prejuízo na memória e lentidão cognitiva são as primeiras manifestações observáveis. Em crianças, as alterações cognitivas se dão principalmente no desenvolvimento do aprendizado levando a deficiência intelectual, seguindo o padrão de parada do desenvolvimento normal e início da regressão cognitiva. Tais alterações encontram substrato patológico na deterioração hipocampal e das vias fronto-subcorticais (Bonelli & Cummings, 2008).

Uma descrição clínica classificada por idade de acometimento neurológico foi proposta e é amplamente utilizada, ajudando na predição e avaliação do curso da doença, assim como resposta à terapia. Essa divisão inclui quatro formas clínicas: infantil precoce (2 meses – 2 anos), infantil tardia (2-6 anos), juvenil (6-12 anos) e adulta (>12 anos) (Wraith et al., 2009). A forma perinatal (até 2 meses) é caracterizada por sintomas sistêmicos.

1.2.1 Formas infantis

A manifestação de NP-C entre o período pré-natal e os dois primeiros anos é inicialmente sistêmica, apresentando-se com visceromegalia isolada. Esplenomegalia, com ou sem hepatomegalia, é observada na maioria dos pacientes e é o sintoma sistêmico mais indicativo da doença (Wijburg et al., 2012). Quando se apresenta em conjunto com sintomas neurológicos ou psiquiátricos, as visceromegalias tornam-se ainda mais sugestivas de NP-C (Wraith, Sedel & Pineda, 2014). Pode não ser isolada, manifestando-se em conjunto com icterícia prolongada ou inexplicada, do tipo colestática, que pode causar falência hepática e morte no primeiro ano de vida.

Os sintomas neurológicos manifestam-se como atrasos nos marcos de desenvolvimento motor. A hipotonia axial pode ser persistente tornando-se mais evidente entre a idade de 1 a 2

anos. A regressão das habilidades motoras já adquiridas, envolvimento do trato piramidal e espasticidade são os estágios subsequentes dos sintomas neurológicos, com regressão intelectual menos pronunciada. Convulsões são sintomas menos frequentes, e nessa fase, a paralisia supranuclear do olhar vertical já pode ser identificada, embora seja um sintoma pouco diagnosticado. Exames de imagem mostram sinais de leucodistrofia e atrofia cerebral. A sobrevivência costuma ser de 5 anos, com evolução progressiva dos sintomas.

A cataplexia gelástica, conceituada como atonia muscular súbita e transitória após algum estímulo (como o riso) costuma aparecer mais tardiamente, na forma infantil tardia. Nessa fase, é perceptível a piora dos sintomas motores, com o aparecimento de ataxia e quedas frequentes, além de atraso na aquisição da linguagem (Vanier, 2010). As convulsões costumam ser mais comuns nesse período, podendo ser parciais ou generalizadas e são responsivas ao tratamento padrão. Casos refratários evoluem para quadros de mal epilético e suas complicações, geralmente conduzidos à morte. Os pacientes raramente ultrapassam o início da adolescência (Vanier, 2010).

1.2.2 Forma juvenil

Esse grupo é representado pelos pacientes que são portadores da forma clássica da NP-C. O sintoma sistêmico mais frequente continua sendo a esplenomegalia isolada, porém em até 10% dos casos pode estar ausente no momento do início dos sintomas neurológicos. A forma neurológica desta faixa etária constitui a forma mais comum da doença na maioria dos países. Se inicia com alterações comportamentais, dificuldade em escrever e prejuízo na atenção, que são sintomas pouco específicos e que podem levar a um diagnóstico equivocado.

A paralisia supranuclear do olhar vertical estará presente invariavelmente, porém nem sempre perceptível ou erroneamente testada. A cataplexia com ou sem narcolepsia é um outro sintoma comum, sendo induzida principalmente pelo riso. Esses dois sintomas, em associação com sintomas psiquiátricos ou visceromegalias, sugerem fortemente NP-C e essa hipótese deve

entrar como diagnóstico diferencial na investigação etiológica. O sintoma mais associado com a morbimortalidade dos pacientes é a disfagia, que aumenta as chances de pneumonias por broncoaspiração. A expectativa de vida desses pacientes é de 30 anos (Wraith et al., 2009).

1.2.3 Forma adulta

Sintomas sistêmicos são relativamente infrequentes quando comparados com as manifestações neuropsiquiátricas nessa faixa etária. Visceromegalias podem ser encontradas por diagnóstico ultrassonográfico, mas ainda assim de pouca expressividade ou importância clínica. Epilepsia e convulsões são raras. As alterações neurológicas descritas anteriormente estão presentes secundariamente, com manifestação na terceira ou quarta década de vida com pouca expressividade clínica, levando à hipótese de que o diagnóstico de NP-C na fase adulta possa ser subestimado (Trendelenburg et al., 2006; Klarner et al., 2007). Os sintomas psiquiátricos parecem ser os de maior importância neste grupo. Em um terço dos casos, a manifestação inicial da doença é psicótica, com ilusões paranoides, alucinações visuais e auditivas. Podem ainda ser comportamentais, do tipo depressivo, agressivo ou de isolamento social (Sevin et al., 2007).

1.2.4 Prognóstico e Seguimento

NP-C é uma doença progressiva, irreversível e debilitante que leva à morte prematura, usualmente entre 10 a 25 anos em sua forma clássica (Wraith et al., 2009). A forma adulta tem mostrado novas perspectivas sobre o prognóstico da doença, agora que mais pacientes têm sido diagnosticados com idades avançadas. A disfagia foi identificada como um fator de risco para mortalidade em pacientes com NPC (Walterfang et al., 2012). O prejuízo da deglutição aumenta o risco de broncoaspiração e pneumonia, que é a causa mais comum de morte em doenças neurodegenerativas, incluindo NP-C (Marik & Kaplan, 2003). O acompanhamento clínico da doença e a resposta do paciente ao tratamento podem ser avaliadas através de escala específica de prejuízo funcional, devendo ser aplicada semestralmente para avaliar os pacientes

em quatro eixos principais: deambulação, manipulação, linguagem e deglutição (Mengel et al., 2013).

1.3 Diagnóstico

1.3.1 Clínico

Como descrito anteriormente, NP-C apresenta uma grande e heterogênea gama de apresentações clínicas, o que dificulta de forma considerável o diagnóstico e a suspeição. Um Índice de Suspeição de NP-C (ISNP-C) foi então desenvolvido para ajudar clínicos a identificar possíveis casos da doença, para aqueles que outras doenças comuns já foram descartadas (Wijburg et al., 2012). A ferramenta mostrou apresentar boa especificidade e sensibilidade para o diagnóstico da doença, e por se basear em dados da história clínica e do exame físico se torna de fácil aplicação e reprodutibilidade (Mengel et al, 2013).

Após essa etapa, toda a informação clínica, incluindo achados do exame físico, sintomas e histórico familiar deve ser classificada entre os três grandes grupos de sintomas citados anteriormente - visceral, neurológico e psiquiátrico - e individualmente são atribuídos pontos aos sintomas. A soma de todos os pontos é o score de predição de risco para NP-C (*Risk Prediction Score* - RPS), que denota alta suspeição para um ponto de corte 70 pontos. Uma pontuação entre 40 e 69 é indicativa de suspeição moderada e recomenda-se observação clínica em regime de *follow-up*, além de discussão do caso com especialistas na doença (Lyseng-Williamson, 2014).

Devido aos sintomas complexos e inespecíficos, a aplicação do ISNP-C e o diagnóstico são relativamente difíceis em alguns casos que não apresentam os sintomas típicos. Foi demonstrado que prosseguir a investigação através da associação de sintomas tem relativa sensibilidade nesses casos, devendo haver o referenciamento para mais testes quando coexistem, por exemplo, esplenomegalia e paralisia do olhar vertical; esplenomegalia e tontura;

esplenomegalia e sintomas psiquiátricos; sintomas psiquiátricos e prejuízo cognitivo; ataxia com distonia, disartria/disfagia e prejuízo cognitivo (Wraith, Sedel & Pineda, 2014).

TABELA 1 Score das manifestações, associação de sintomas e história familiar do paciente, para o cálculo do Score de Predição de Risco para NPC (RPS)

| Muito Forte (40) | Forte (20) | Moderado (10) | Fracos (5) | Auxiliar (1) |
|---------------------------------|---|-----------------------------|--|---|
| Paralisia do Olhar Vertical [N] | Esplenomegalia Isolada com ou sem Hepatomegalia [V] | Ataxia ou Quedas Freq. [N] | Espasticidade Adquirida ou Progressiva [N] | Hidrópsia fetal [V] Irmão com Ascite [V] |
| Cataplexia Gelástica [N] | Icterícia Colestática Prolongada [V] | Disartria e/ou Disfagia [N] | Sint. psiquiátricos resist. a tratamento [P] | Atraso de Desenvolvimento [N] |
| Associação V+N | Declínio Cognit. [P] | Distonia [N] | Outras desordens psiquiátricas [P] | Convulsões [N] |
| Associação V+P | Associação P+N | Sintomas Psicóticos [P] | | Comportamento Agressivo [P] |
| Hist. Familiar em 1ª grau | | Hist. Familiar em 2ª grau | | Hipotonia [N] Mioclonia [N] |

N = sintomas neurológicos; V= sintomas viscerais; P = sintomas psiquiátricos;

1.3.2 Laboratorial

Exames inespecíficos como hemograma, enzimas hepáticas, bilirrubina total e frações e provas de coagulação estarão alterados em pacientes com icterícia colestática, hepatomegalia e outras desordens comuns à fase sistêmica da doença. As lipoproteínas séricas mostrarão mais comumente um padrão de redução das lipoproteínas de alta densidade. Demonstrou-se que essa redução se correlaciona quantitativamente com a severidade das anormalidades no tráfego intracelular de colesterol (Garver, Jelinek & Meaney, 2010). O aspirado de medula óssea mostra células ricas em colesterol, com o citoplasma repleto de endossomos, em um padrão *foam-cell like*. Esse exame mostra utilidade para casos sob suspeição, antecedendo outros testes bioquímicos mais específicos, quando estes são de difícil acesso (Alobaidy, 2014).

Os testes bioquímicos e moleculares mais específicos são pouco disponíveis em centros não especializados, mas são decisivos na maioria dos casos. As últimas recomendações internacionais de manejo de NP-C (Patterson et al., 2013) incluem novos biomarcadores e tecnologias de análise genética como testes de primeira linha para o diagnóstico. Dessa

maneira, a maioria dos diagnósticos são confirmados com a combinação de testes moleculares e dosagem sérica de biomarcadores (Patterson et al., 2017).

Com valor histórico, o Teste de Filipin era o principal teste diagnóstico de NP-C. É realizado com cultura de fibroblastos obtidos por biópsia de pele, que são cultivados em meio rico em lipídeos de baixa densidade (LDL), e posteriormente fixados e corados com o corante de Filipin (Vanier, 1991). Analisadas em microscopia de fluorescência, as lâminas mostram fibroblastos com o citoplasma repleto de vesículas perinucleares de colesterol em 80-85% dos casos. Uma porcentagem menor de pacientes exibe um fenótipo bioquímico variável, com menor acúmulo de vesículas, que se correlaciona com a variante genotípica e presente mesmo em alguns heterozigotos (Vanier & Suzuki, 1998).

A dosagem de biomarcadores séricos ganharam importância com o melhor entendimento da fisiopatologia da doença e avanços nas técnicas laboratoriais. Dentre os biomarcadores conhecidos e disponíveis, a dosagem dos produtos de oxidação do colesterol (oxisteróis) está bem estabelecida e possui grande evidência científica como instrumento diagnóstico, acompanhamento clínico e resposta ao tratamento (Boenzi et al., 2014; Reunert, Kannenberg & Fobkeretal, 2013). Com baixa sensibilidade e especificidade, a atividade da quitotriosidase, importante na investigação da Doença de Gaucher, pode ser útil no diagnóstico de NP-C quando aumentada (Guo, He & Boeretal, 1995).

Os testes moleculares são indispensáveis para o diagnóstico final da doença em paciente com suspeita clínica elevada ou com perfil de biomarcadores consistente com NP-C (Vanier et al., 2016). As duas variantes mais frequentes em pacientes com NP-C são p.I1061T (c.3182T<C no éxon 21) e p.P1007A, respondendo por 20% dos alelos em europeus ocidentais e descendentes (Runz et al., 2008).

Em mais de 90% dos casos, testes de sequenciamento genético, como sequenciamento de Sanger para DNA genômico ou complementar e Sequenciamento de Nova Geração, são

capazes de identificar as duas variantes patogênicas presentes no probando e são tradicionalmente recomendados para o diagnóstico de NP-C (Stampfer et al., 2013). Vários painéis já incluem os genes *NPC1* e *NPC2* para triagem de NP-C entre pacientes com sintomas sugestivos da doença, possuindo melhor sensibilidade em pacientes com ataxia de início precoce (rendimento de 1-2% para NP-C) que epilepsia, distonia, colestase infantil ou quadro sugestivo de erros inatos do metabolismo (rendimento <1%) (Synofzik et al., 2015). Por possuir 25 éxons, a identificação de variantes no gene *NPC1* é mais laboriosa e suscetível a falha diagnóstica. O gene *NPC2*, apesar de ser responsável por somente 4% dos pacientes, é de mais fácil testagem, possuindo somente cinco pequenos éxons (Millat et al., 1999).

Nos casos de heterozigose factícia (10%), quando somente uma variante será identificada ou quando nenhuma mutação é identificada, deve-se considerar a existência de variantes intrônicas ou grandes deleções (Rodriguez-Pascau et al., 2009). Essa investigação pode ser prosseguida com a utilização de técnicas quantitativas para avaliar variantes no número de cópias de segmentos maiores de DNA, como a hibridização genômica comparativa com arranjos (*array-CGH*) que possibilita essa avaliação e pode identificar duplicações ou deleções parciais que possam ser responsáveis por esta parcela dos pacientes (Bauer et al., 2002).

1.4 Tratamento

Ainda não há tratamento curativo para NP-C. Todo o manejo clínico direciona-se ao suporte e alívio sintomático, na tentativa de melhorar a qualidade de vida em seu componente relacionado à saúde. Nos últimos anos, novos alvos para intervenção farmacológica têm sido estudados, e o Miglustat (*Zavesca*®; Actelion Pharmaceuticals.) é a única droga doença-específica aprovada para o tratamento da NP-C, ainda com efeitos restritos à estabilização e diminuição da regressão neurológica da doença. Sua ação ocorre com a inibição na síntese de glicoesfingolípídeos. Seu uso mostrou efeitos sobre os defeitos de transporte intracelular de

lipídeos, reduzindo o acúmulo de gangliosídeos GM2 e GM3 e sua ação neurotóxica no cérebro, além de reduzir a velocidade de progressão dos sintomas neurológicos. A droga não apresentou nenhum efeito sobre as manifestações sistêmicas da doença (Patterson et al., 2010).

Desde então, o Miglustat é formalmente indicado no tratamento da NP-C, devendo ser iniciado imediatamente aos primeiros sinais de manifestação neurológica do agravo (Vanier & Cailland, 2012). Seus principais efeitos colaterais estão relacionados ao trato gastrointestinal, como diarreia, vômito, flatulência e perda de peso, tendendo a diminuir com o uso. Agentes hipocolesterolêmicos e uma dieta baixa em colesterol podem reduzir parcialmente o acúmulo de colesterol no tecido hepático, mas não possuem efeito sobre as manifestações neurológicas (Madra & Sturley, 2010).

3. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Descrever as características genéticas e fenotípicas de quatro pacientes diagnosticados com Doença de Niemann-Pick do tipo C.

2.2. Objetivos Específicos

- Relatar nova variante patogênica associada a Doença de Niemann-Pick do tipo C.
- Correlacionar as variantes genotípicas identificadas e os fenótipos clínicos e bioquímicos determinados.

4. MÉTODOS

4.1 Pacientes

As informações clínicas relatadas neste estudo foram obtidas sob a aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal do Maranhão (nº 2.934.811) e Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1) foram coletados de todos os responsáveis legais. O trabalho inclui todos os quatro pacientes diagnosticados com NP-C no estado do Maranhão até a data de publicação, atendidos em serviço de Genética Médica do Estado. As informações clínicas, diagnósticas e terapêuticas aqui resumidas foram coletadas de maneira retrospectiva no Hospital Juvêncio Mattos e na Maternidade de Alta Complexidade do Maranhão, em São Luís, onde os pacientes foram atendidos entre 2012 e 2016, no ambulatório de Genética Médica. Foram utilizadas como ferramentas de avaliação clínica o Índice de Suspeição de NP-C (Wijburg et al., 2012) em todos os pacientes antes dos testes bioquímicos e genéticos, além de exame físico detalhado.

4.2 Exames Complementares

Os exames laboratoriais realizados incluíram a dosagem de metabólitos em urina, bioquímica básica no sangue, marcadores de função orgânica, marcadores para doenças genéticas (ácido lático, amônia sérica, ácidos orgânicos e aminoácidos na urina) e atividade da esfingomielinase ácida. A dosagem da quitotriosidade foi realizada em três dos quatro pacientes.

O teste de Filipin foi realizado em dois pacientes, a partir de biópsia de pele e cultura de fibroblastos em meio rico em LDL. O acúmulo intracelular de lipídeos foi analisado após a coloração com o corante Filipin de acordo com o método padrão (Vanier et al., 1991; Mengel et al., 2013). Os outros dois pacientes tiveram acesso facilitado à análise molecular, e foram poupados de procedimento invasivo (biópsia de pele) para o Teste de Filipin. Todos os éxons de *NPC1* e *NPC2* foram analisados por sequenciamento direto (Behjati & Tarpey, 2013).

5. RESULTADO

DOENÇA DE NIEMANN-PICK TIPO C: NOVA VARIANTE PATOGÊNICA ASSOCIADA A FORMA CLÍNICA INFANTIL.

NIEMANN-PICK TYPE C DISEASE: A NOVEL PATHOGENIC VARIANT ASSOCIATED TO THE INFANTILE CLINICAL FORM.

Fabício Maciel Soares¹

Silma Regina Ferreira Pereira²

Nota do Autor:

Artigo a ser submetido à *American Journal of Medical Genetics*.

¹Acadêmico de Medicina da Universidade Federal do Maranhão - UFMA. fabriciomaciel@outlook.com

²Professora Doutora Titular do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Maranhão - UFMA Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Av. dos Portugueses, 1966, Cidade Universitária Dom Delgado, Campus Bacanga, CEP: 65085-580, São Luís, Maranhão, Brasil. silmaregina@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A doença de Niemann-Pick tipo C (NP-C) faz parte de um grupo de doenças descritas nos anos 20 por Albert Niemann e Ludwig Pick que cursam com acometimento visceral e neurológico progressivos e importante impacto na qualidade de vida e saúde global das famílias acometidas. Com o advento das técnicas moleculares, Pentchev e colaboradores (1994) demonstraram se tratar, em nível celular, de uma desordem no transporte intracelular de colesterol, em oposição ao protótipo das doenças de depósito lisossômico por deficiência enzimática e acúmulo de substrato. Possui uma incidência estimada de 1/90.000 nascidos vivos e respeita um padrão pan-étnico de acometimento (Wassif et al., 2016).

A doença apresenta herança autossômica recessiva, sendo causada por mutações nos genes *NPC1* (18q11.2) em 95% das famílias e *NPC2* (14q24.3) em 4% (Vanier et al., 1996). Mutações em ambos os genes resultam em fenótipos bioquímicos semelhantes, com prejuízo no transporte e utilização do colesterol no metabolismo celular, conseqüente acúmulo intracelular de lipídeos e ativação de vias de apoptose celular. Clinicamente, a progressão da doença está relacionada com o aumento da taxa de morte dos neurônios, principalmente cerebelares, explicando os sintomas atáxicos característicos do final da doença (Mukherjee & Maxfield, 2004).

A apresentação clínica de NP-C é extremamente heterogênea, podendo se manifestar em qualquer faixa etária e com diferentes velocidades de progressão. Sinais e sintomas sistêmicos fazem parte da história natural na maioria dos pacientes, mas o acometimento neurológico é que mais se correlaciona com o prognóstico e progressão da doença (Vanier & Millat, 2003). O espectro clínico é composto de manifestações viscerais, neurológicas e psiquiátricas, não existindo sintomas específicos ou patognomônicos. A associação de sinais ou sintomas de sistemas distintos aumenta a especificidade do diagnóstico clínico (Mengel et al., 2013).

Um Índice de Suspeição de NP-C (ISNP-C) foi desenvolvido para ajudar clínicos a identificar possíveis casos da doença, para aqueles que outras doenças comuns já foram descartadas. Neste sistema, pontos são atribuídos aos sinais e sintomas previamente identificados durante exame clínico. A soma de todos os pontos é o score de predição de risco para NP-C (RPS), que denota alta suspeição para um ponto de corte de 70 pontos. Uma pontuação entre 40 e 69 é indicativa de suspeição moderada e recomenda-se observação clínica em regime de *follow-up*. Abaixo de 40 pontos, a hipótese de NP-C passa a ser considerada menos plausível (Wijburg et al., 2012; Lyseng-Williamson, 2014).

A classificação dos pacientes segundo a idade de aparecimento dos sintomas neurológicos é comumente utilizada na literatura e é útil para a avaliação da evolução da doença e resposta ao tratamento. Essa classificação divide os pacientes entre quatro formas clínicas: infantil precoce, infantil tardia, juvenil e adulta. Uma quinta forma clínica, perinatal, é constituída por pacientes com uma forma sistêmica grave, com rápida deterioração da função hepática e morte (Wraith et al., 2009).

O tratamento sintomático de NP-C é diverso e pode aliviar muitas das manifestações neurológicas, tendo grande impacto na qualidade de vida. O único tratamento específico aprovado para NP-C é o Miglustat (Zavesca®; Actelion Pharmaceuticals), que teve eficácia comprovada na diminuição da deterioração neurológica dos pacientes e está indicado para aqueles com pouco ou moderado prejuízo das funções motoras.

Neste estudo, descrevemos uma nova variante patogênica para NP-C, assim como analisamos as manifestações clínicas, laboratoriais e achados moleculares de quatro pacientes afetados, a fim de contribuir com a melhor caracterização da variabilidade genética e fenotípica dos casos.

2. MÉTODOS

2.1 Pacientes

As informações clínicas relatadas neste estudo foram obtidas sob a aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal do Maranhão (Nº 2.934.811) e Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1) foram coletados de todos os responsáveis legais. As informações clínicas, diagnósticas e terapêuticas aqui resumidas foram coletadas de maneira retrospectiva no Hospital Juvêncio Mattos e na Maternidade de Alta Complexidade do Maranhão em São Luís, onde os pacientes foram atendidos entre 2012 e 2015, no ambulatório de Genética Médica.

2.2 Exames Complementares

O teste de Filipin foi realizado em dois pacientes, a partir de biópsia da pele e cultura de fibroblastos em meio rico em LDL. O acúmulo intracelular de lipídeos foi analisado após a coloração com o corante Filipin de acordo com o método padrão (Vanier et al., 1991; Mengel et al., 2013). Os outros dois pacientes tiveram acesso facilitado à análise molecular, e foram poupados de procedimento invasivo para o Teste de Filipin. Todos os éxons de *NPC1* e *NPC2* foram analisados por sequenciamento direto (Behjati & Tarpey, 2013).

3. RESULTADOS

Um total de quatro pacientes foram arrolados neste estudo e representam os únicos casos diagnosticados até o momento no estado do Maranhão, no Nordeste do Brasil. Os pacientes receberam o diagnóstico com idade média de 36 meses e um tempo médio de 27 meses para a conclusão do diagnóstico. Sintomas sistêmicos foram universalmente os primeiros referidos, iniciados tão cedo quanto o período pré-natal. A idade média de acometimento neurológico foi inferior aos dois anos para três pacientes (8, 9 e 18 meses). Um dos pacientes, atualmente aos 3 anos e 5 meses, ainda não desenvolveu sintomas neurológicos importantes, e tem a sintomatologia ainda restrita à forma sistêmico-visceral. No que tange o histórico familiar, existiu história positiva para NP-C para o paciente #3, que era prima do

paciente #2. Consanguinidade foi referida por apenas uma família, do paciente #2, cujo os pais eram primos. As outras famílias desconheciam parentesco.

Paciente #1: Primogênita de pais que negavam consanguinidade, procedente do município Alcântara. Encaminhada para o serviço de Genética Médica após extensa investigação para esplenomegalia isolada, sem outros sintomas associados. Aos oito meses este quadro associou-se aos sintomas neurológicos, inicialmente com regressão dos marcos motores e atraso na aquisição de fala, assim como espasticidade e cataplexia gelástica.

Paciente #2: Primogênito de pais consanguíneos (primos em primeiro grau), procedente do município de São Bernardo. Possuía história positiva para icterícia colestática prolongada e hepatoesplenomegalia progressivas, que demandou internação no período neonatal. Disfagia para sólidos foi percebida pela mãe aos nove meses, porém não houve outras manifestações neurológicas no período, atingindo os marcos motores até os dois anos, quando teve regressão neurológica e aparecimento de convulsões.

Paciente #3: Primogênita de pais que negavam consanguinidade, procedente do município de São Bernardo, com história familiar positiva para NP-C em primo, o paciente #2. Responsáveis relatavam aumento discreto do volume abdominal durante o período neonatal. Aos 18 meses, mãe referiu alterações na posição do olhar, porém sem avaliação, documentação ou diagnóstico médico. Aos dois anos apresentou regressão neurológica, com perda da capacidade de deambulação, da fala e aparecimento de convulsões.

Paciente #4: Primogênito de pais não consanguíneos, procedente do município de Paço do Lumiar, teve diagnóstico intraútero de importante ascite fetal, evoluindo com hepatoesplenomegalia e colestase. Alcançou os marcos motores definidos para idade, sem regressão ou sintomatologia neurológica até o momento. O paciente possui importantes alterações dismorfológicas, com macrocrania, dolicocefalia, retrognatia e raiz nasal baixa.

As principais informações clínicas e laboratoriais são resumidas na tabela 2.

TABELA 2 Informações clínicas dos pacientes com NP-C diagnosticados no Maranhão, Nordeste do Brasil.

| Paciente | #1 | #2 | #3 | #4 |
|-----------------------------|-----------|-----------------|--------------|--|
| Sexo | F | M | F | M |
| Naturalidade/Proced. | Alcântara | São Bernardo | São Bernardo | Paço do Lumiar |
| Idade Acom. Neuro. | 8m | 9m | 18m | - |
| Idade Diagnóstico | 2a7m | 3a2m | 3a5m | 2a10m |
| Mutação | | | | |
| Alelo 1 | p.A1035V | p.Q710Rfs | p.Q710Rfs | p.P1007A |
| Alelo 2 | p.A1035V | p.Q710Rfs | p.Q710Rfs | p.E1166K |
| Aval. Diagnósticas | | | | |
| NPC - SI | 166 | 156 | 161 | 41 |
| Teste de Filipin | + | + | NR | NR |
| Quitotriosidase | 1254 | NR | 1366 | 277 |
| Esfingomielinase | 0,7 | NR | NR | 1,1 |
| Manif. Neurológicas | | | | |
| Oftalmoparesia | + | + | + | - |
| Cataplexia | + | - | + | - |
| Convulsão | + | + | + | - |
| Disfagia | + | + | + | - |
| Distonia | + | - | - | - |
| Espasticidade | + | + | - | - |
| Manif. Gastroinst. | | | | |
| Icterícia | - | + | - | + |
| Visceromegalias | + | + | + | + |
| Ascite | - | - | - | + |
| Dismorfologia | | | | |
| Alt. Axial | Cifose | Escoliose | Escoliose | - |
| Alt. Apendicular | - | MMII em tesoura | - | - |
| Crânio e Face | - | - | - | Mcran, Dolicocef., Retrogn., RNB |

F = feminino; M = masculino; NR = não realizado; NPC-SI = Índice de Suspeição de NP-C; Mcran = macrocrania; RNB = Raiz Nasal Baixa; (+) = característica presente; (-) = característica ausente.

O exame neurológico dos pacientes mostrou importantes alterações motoras, com hipertonia apendicular e hipotonia axial presentes nos pacientes #1, #2 e #3, que apresentaram devastadora progressão dos sintomas neurológicos. Distonia e espasticidade foram observadas nos pacientes #1 e #3, afetando principalmente os membros superiores. Nesses dois pacientes também foi observada cataplexia gelástica. A Paralisia Supranuclear do Olhar Vertical foi observada em todos os pacientes avaliados que possuíam envolvimento neurológico, assim como a disfagia para sólidos e pastosos e crises epilépticas parciais complexas ou tônico-clônicas generalizadas, necessitando de tratamento. Os pacientes #2 e #3 possuíam ainda importante hipotrofia muscular e estavam pouco contactantes ao primeiro exame.

O Índice de Suspeição de NP-C (ISNP-C) foi >70 pontos em todos os pacientes com acometimento neurológico (variando de 156-166), no entanto o paciente #4 teve ISNP-C calculado de 41. Diagnósticos diferenciais de Doença de Gaucher e outros Erros Inatos do Metabolismo foram considerados para dois dos quatro pacientes, previamente à avaliação no serviço de Genética Médica.

O diagnóstico molecular foi o método preferencial utilizado em todos os pacientes, porém foram utilizadas outras técnicas laboratoriais, principalmente a dosagem de quitotriosidade plasmática, atividade da esfingomielinase e o teste de Filipin. Nos pacientes #1, #2 e #4, a quitotriosidade esteve acima da faixa da normalidade. A atividade da esfingomielinase foi dosada nos pacientes #1 e #4, mantendo-se dentro da faixa de referência ou pouco diminuída. O teste de Filipin foi realizado para os pacientes #1 e #2, sendo positivo nos dois pacientes, apresentando o fenótipo bioquímico clássico. Quatro alelos mutantes foram identificados, com três pacientes em homozigose e um paciente heterozigoto composto. Dentre as mutações detectadas, três são *missense*: p.A1053V, p.P1007A e p.P1166K, e uma *frameshift* por deleção de adenina na posição c.2129 no éxon 13, p.Q710Rfs, compartilhada pelos pacientes #2 e #3..

A tabela 4 mostra os tipos de mutações descritas por diferentes autores, bem como aquelas detectadas neste trabalho.

TABELA 3 Perfil mutacional do gene *NPC1* neste estudo.

| Mutação | p.A1035V | p.Q710Rfs | p.P1007A | p.E1166K |
|---------------|-------------------------|----------------|--------------|--------------------|
| Fonte | Fernandez-Valero (2005) | Ribeiro (2001) | Greer (1999) | <i>este estudo</i> |
| Éxon | 21 | 12 | 20 | 23 |
| Tipo | Missense | Frameshift | Missense | Missense |
| Alt. cDNA | c.3104C>T | c.2129delA | c.3019C>G | c.G>A |
| Alt. Aminoác. | p.A1035V | p.G710fs | p.P1007A | p.E1166K |

4. DISCUSSÃO

Esta coorte retrospectiva apresenta o espectro clínico e as mutações encontradas nos primeiros quatro pacientes maranhenses diagnosticados com NP-C, todos diagnosticados durante os últimos 4 anos. Anteriormente à essa data, nenhum paciente havia sido diagnosticado, mas a recente disponibilidade de métodos diagnósticos e de triagem possibilitou a identificação de tais pacientes. A suspeição das doenças genéticas ainda é um obstáculo a ser vencido para celeridade do diagnóstico. Os pacientes deste estudo foram diagnosticados com um tempo médio de 27 meses após as manifestações neurológicas iniciais, tempo semelhante ao de outras séries de casos internacionais (Xiong et al., 2012; Chamova et al., 2016).

Três dos quatro pacientes desta coorte foram classificados como portadores da forma clínica infantil precoce de NP-C, conceitualmente caracterizada pelo aparecimento de sinais ou sintomas neurológicos entre dois meses e dois anos. Essa divisão proposta por Wraith e colaboradores apresenta boa correlação com o prognóstico clínico e resposta ao tratamento. Dados do Registro Internacional de NP-C indicam que aproximadamente dois terços dos pacientes com a doença se apresentam com as formas infantil ou juvenil, enquanto o terço restante manifesta sinais e sintomas neurológicos na vida adulta ou adolescente (Imrie et al., 2009). Dos três pacientes deste estudo com acometimento neurológico, todos apresentaram a forma da doença com sintomas neurológicos precoces, graves e rapidamente progressivos, com início entre 8 e 18 meses de idade. A presença de envolvimento piramidal e o aparecimento de outros sintomas previamente descritos como pertencentes às formas clínicas mais tardias, como a cataplexia gelástica, também chama a atenção para futuras correlações genótipo-fenotípicas nesses casos.

Vários fatores podem contribuir para a preponderância da forma infantil e para a ausência de pacientes adultos nesta coorte, mas podemos ressaltar que a sintomatologia dessa forma clínica, principalmente os quadros clínicos psiquiátricos, possuem o viés de serem

observados pelas especialidades de Psiquiatria e Clínica Médica. No Brasil, essas áreas ainda enfrentam o obstáculo da falta de suspeição das doenças raras de etiologia genética, além da insuficiência de ambulatórios de Genética Médica para adultos integrado ao Sistema Único de Saúde – SUS. Tal fato incorre no subdiagnóstico de NP-C e outras doenças raras de etiologia genética entre adultos, na contramão do grupo pediátrico, que conta com o apoio de um serviço público de Genética Médica no Maranhão. As diferenças fenotípicas observadas poderiam ser ainda explicadas por diferenças genuínas conferidas pelos genótipos encontrados, mesmo que na literatura algumas relações genótipo-fenotípicas para algumas dessas variantes já tenham sido apontadas (Fernandez-Valero et al., 2005; Ribeiro et al, 2001; Greer et al., 1999).

Várias mutações do gene *NPC1* já foram descritas em pacientes com NP-C (Fernandez-Valero et al., 2005; Fancello et al., 2009). A mutação p.P1007A é frequentemente associada às formas juvenil e adulta em vários países, e ao lado da mutação p.I1061T responde por 20% dos alelos mutantes em europeus e descendentes (Runz et al., 2008). As mutações p.P1007A e p.A1035V já foram previamente encontradas no Brasil, e este estudo reforça a hipótese de estas serem mutações frequentes no país (Godeiro-Júnior et al., 2006).

A mutação p.P1007A parece determinar um fenótipo bioquímico atípico, com poucas alterações no acúmulo de colesterol, independente da natureza do segundo alelo mutante. Em Greer e colaboradores (2001) o paciente em homozigose para mutação p.P1007A pertencia à forma clínica juvenil, manifestando ataxia aos 8 anos de idade. O paciente #4 é portador da mutação em heterozigose composta e dentro desta coorte é único que permanece sem sintomas neurológicos. p.E1166K, a outra mutação encontrada no paciente #4, não tinha sido descrita anteriormente, sendo causada por uma mudança de guanina para adenina no éxon 23, determinando a mudança do aminoácido glutamato para lisina na posição 1166 da proteína. A patogenicidade desta mutação missense foi avaliado *in silico* usando softwares que avaliam o possível impacto da substituição de aminoácidos na estrutura e função do produto de *NPC1*,

através de critérios físicos e comparativos. As análises usando os programas PolyPhen, SIFT, Mutation Tester e Align GVGD indicam que essa alteração pode acarretar mudanças danosas à proteína.

O gene *NPCI* codifica uma proteína de 1278 aminoácidos, que formam 13 domínios transmembrana, três *loops* hidrofílicos luminais, um *loop* citoplasmático, um início luminal e uma cauda citoplasmática. A região entre os aminoácidos 615 e 797 mostra homologia ao domínio sensor de esterol identificado em várias outras proteínas transmembranas que respondem à concentração de colesterol no retículo endoplasmático, exercendo um feedback negativo na produção endógena do lípido, quando aumentado (Davies & Ionannou, 2000). A mutação p.Q710Rfs, encontrada em duas famílias neste estudo, afeta a região homóloga ao domínio sensor de esterol supracitado e foi descrita em heterozigose composta por Ribeiro e colaboradores (2001) para um paciente com a forma juvenil da NP-C, com regressão da fala, convulsões, envolvimento cerebelar precoce e paralisia do olhar vertical. Os pacientes #2 e #3, em estado homoalélico para a mesma mutação, compartilham de quadro clínico semelhante ao relatado por Ribeiro, porém com apresentação precoce da doença e importante componente piramidal associado à rápida regressão neurológica.

No que tange o seguimento dos pacientes, poucas reavaliações foram possíveis para os três pacientes com acometimento neurológico grave. Os pacientes #1 e #2 faleceram antes de conseguirem acesso ao tratamento com Miglustat, que assim como outras medicações para o tratamento de doenças raras ainda não faz parte do rol de medicamentos disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde do Brasil. A judicialização tem sido a única perspectiva de obtenção de tratamento na rede pública. Estima-se que no ano de 2012, 523 pessoas obtiveram o direito à tratamento específico para doenças genéticas raras através de processos judiciais, com um custo individual por ano de R\$ 533.000,00 (BRASIL, AGU, p7-14). Cabe discutir que o Miglustat não mostrou impacto positivo significativo na diminuição da progressão da doença

naqueles pacientes que já apresentavam prejuízo neurológico grave, como nos casos dos pacientes estudados.

O paciente #4 teve o direito ao tratamento público garantido, e continua em seguimento no nosso serviço, ainda sem manifestações neurológicas. Novas reavaliações serão feitas com o início da medicação e familiares foram treinados na suspeição das manifestações neurológicas mais comuns. A paciente #3 mudou-se e perdeu acompanhamento e contato com o serviço de Genética Médica do Maranhão.

Diante do número significativo de casos de NP-C no estado durante o período de 4 anos, das frequentes relações conjugais entre consanguíneos, em especial na zona rural, favorecendo a manifestação de desordens genéticas recessivas, bem como baixa suspeição de condições genéticas pelas equipes de saúde, destacamos a possibilidade de subdiagnóstico de NP-C, principalmente em adultos, e ressaltamos a importância de referenciar casos sem diagnóstico para investigação etiológica a fim de proporcionar melhor assistência, manejo, avaliação prognóstica e nos casos pertinentes, aconselhamento genético.

REFERÊNCIAS

- Alobaidy, H. (2015). Recent Advances in the Diagnosis and Treatment of Niemann-Pick Disease Type C in Children: A Guide to Early Diagnosis for the General Pediatrician. *International Journal of Pediatrics*, 2015, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/816593>
- Bonelli, R. M., & Cummings, J. L. (2008). Frontal-subcortical dementias. *Neurologist*, 14(2), 100–107. <https://doi.org/10.1097/NRL.0b013e31815b0de2>
- Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing?. *Archives of disease in childhood. Education and practice edition*, 98(6), 236–8. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>
- Carstea, E. D., Polymeropoulos, M. H., Parker, C. C., Detera-Wadleigh, S. D., O'Neill, R. R., Patterson, M. C., ... Vanier, M. T. (1993). Linkage of Niemann-Pick disease type C to human chromosome 18. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(5), 2002–2004.
- Chamova, T., Kirov, A., Guergueltcheva, V., Todorov, T., Bojinova, V., Zhelyazkova, S., ... Tournev, I. (2016). Clinical spectrum and genetic variability in bulgarian patients with niemann-pick disease type C. *European Neurology*, 75(3–4), 113–123. <https://doi.org/10.1159/000444480>
- Crocker, A. C. (1961). the Cerebral Defect in Tay-Sachs Disease and Niemann-Pick Disease. *Journal of Neurochemistry*, 7(1), 69–80. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1961.tb13499.x>
- Cuisset, J. M., Sukno, S., Trauffer, A., Latour, P., Dobbelaere, D., Michaud, L., & Vallée, L. (2016). Impact of miglustat on evolution of atypical presentation of late-infantile-onset Niemann-Pick disease type C with early cognitive impairment, behavioral dysfunction, epilepsy, ophthalmoplegia, and cerebellar involvement: A case report. *Journal of Medical Case Reports*, 10(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13256-016-1038-9>
- Davies, J. P., & Ioannou, Y. A. (2000). Topological Analysis of Niemann-Pick C1 Protein Reveals That the Membrane Orientation of the Putative Sterol-sensing Domain Is Identical to Those of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase and Sterol Regulatory Element Binding Protein Cleavage-activating Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 275(32), 24367–24374. <https://doi.org/10.1074/jbc.m002184200>
- Fernandez-Valero, E. M., Ballart, A., Iturriaga, C., Lluch, M., Macias, J., Vanier, M. T., ... Coll, M. J. (2005). Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann-Pick type C patients: Genotype-phenotype correlations. *Clinical Genetics*, 68(3), 245–254. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2005.00490.x>
- Godeiro-Júnior, C., Jun Inaoka, R., Rocha Barbosa, M., Regis Silva, M. R., de Carvalho Aguiar, P., & Barsottini, O. (2006). Mutations in NPC1 in two Brazilian patients with Niemann-Pick disease type C and progressive supranuclear palsy-like presentation. *Movement Disorders*, 21(12), 2270–2272. <https://doi.org/10.1002/mds.21146>

- Greer, W., Dobson, M., Girouard, G., Byers, D., Riddell, D., & Neumann, P. (1999). Mutations in NPC1 Highlight a Conserved NPC1-Specific Cysteine-Rich Domain. *The American Journal of Human Genetics*, 65(5), 1252–1260. <https://doi.org/10.1086/302620>
- Hendriksz, C. J., Pineda, M., Fahey, M., Walterfang, M., Stampfer, M., Runz, H., ... Kolb, S. A. (2015). The Niemann-Pick Disease Type C Suspicion Index: Development of a New Tool to Aid Diagnosis. *Journal of Rare Disorders: Diagnosis & Therapy*, 1(1), 1–9.
- Imrie, J., Galani, C., Gairy, K., Lock, K., & Hunsche, E. (2009). Cost of illness associated with Niemann-Pick disease type C in the UK. *Journal of Medical Economics*, 12(3), 219–229. <https://doi.org/10.3111/13696990903245863>
- Kwon, H. J., Abi-Mosleh, L., Wang, M. L., Deisenhofer, J., Goldstein, J. L., Brown, M. S., & Infante, R. E. (2009). Structure of N-Terminal Domain of NPC1 Reveals Distinct Subdomains for Binding and Transfer of Cholesterol. *Cell*, 137(7), 1213–1224. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.049>
- Lladó, A., Carpentier, A. F., Honnorat, J., Sillevs-Smitt, P., Twijnstra, A., Blanco, Y., ... Graus, F. (2006). Hu-antibody-positive patients with or without cancer have similar clinical profiles [5]. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 77(8), 996–997. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2005.085753>
- Marik, P. E., & Kaplan, D. (2003). Aspiration pneumonia and dysphagia in the elderly. *Chest*, 124(1), 328–336. <https://doi.org/10.1378/chest.124.1.328>
- Mengel, E., Klünemann, H.-H., Lourenço, C. M., Hendriksz, C. J., Sedel, F., Walterfang, M., & Kolb, S. A. (2013). Niemann-Pick disease type C symptomatology: an expert-based clinical description. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8(1), 166. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-166>
- Millat, G., Marçais, C., Rafi, M. A., Yamamoto, T., Morris, J. A., Pentchev, P. G., ... Vanier, M. T. (1999). Niemann-Pick C1 Disease: The I1061T Substitution Is a Frequent Mutant Allele in Patients of Western European Descent and Correlates with a Classic Juvenile Phenotype. *The American Journal of Human Genetics*, 65(5), 1321–1329. <https://doi.org/10.1086/302626>
- Patterson, M. C., Clayton, P., Gissen, P., Anheim, M., Bauer, P., Bonnot, O., ... Marquardt, T. (2017). Recommendations for the detection and diagnosis of Niemann-Pick disease type C. *Neurology: Clinical Practice*, 7(6), 499–511. <https://doi.org/10.1212/CPJ.0000000000000399>
- Patterson, M. C., Hendriksz, C. J., Walterfang, M., Sedel, F., Vanier, M. T., & Wijburg, F. (2012). Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: An update. *Molecular Genetics and Metabolism*, 106(3), 330–344. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.03.012>
- Pentchev, P. G., Brady, R. O., Blanchette-Mackie, E. J., Vanier, M. T., Carstea, E. D., Parker, C. C., ... Roff, C. F. (1994). The Niemann-Pick C lesion and its relationship to the intracellular distribution and utilization of LDL cholesterol. *BBA - Molecular Basis of Disease*, 1225(3), 235–243. [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(94\)90001-9](https://doi.org/10.1016/0925-4439(94)90001-9)

- Ribeiro, I., Marcão, A., Amaral, O., Sá Miranda, M., Vanier, M. T., & Millat, G. (2001). Niemann-Pick type C disease: NPC1 mutations associated with severe and mild cellular cholesterol trafficking alterations. *Human Genetics*, 109(1), 24–32. <https://doi.org/10.1007/s004390100531>
- Rodríguez-Pascau, L., Coll, M. J., Vilageliu, L., & Grinberg, D. (2009). Antisense oligonucleotide treatment for a pseudoexon-generating mutation in the NPC1 gene causing Niemann-Pick type C disease. *Human Mutation*, 30(11), 993–1001. <https://doi.org/10.1002/humu.21119>
- Runz, H., Dolle, D., Schlitter, A. M., & Zschocke, J. (2008). NPC-db, a Niemann-Pick type C disease gene variation database. *Human Mutation*, 29(3), 345–350. <https://doi.org/10.1002/humu.20636>
- Sévin, M., Lesca, G., Baumann, N., Millat, G., Lyon-Caen, O., Vanier, M. T., & Sedel, F. (2007). The adult form of Niemann-Pick disease type C. *Brain*, 130(1), 120–133. <https://doi.org/10.1093/brain/awl260>
- Sleat, D. E., Wiseman, J. A., El-Banna, M., Price, S. M., Verot, L., Shen, M. M., ... Lobel, P. (2004). Genetic evidence for nonredundant functional cooperativity between NPC1 and NPC2 in lipid transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(16), 5886–5891. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308456101>
- Spiegel, R., Raas-Rothschild, A., Reish, O., Regev, M., Meiner, V., Bargal, R., ... Zeigler, M. (2009). The clinical spectrum of fetal Niemann-Pick type C. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 149(3), 446–450. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32642>
- Vanier, M. T. (2010). Niemann-Pick disease type C. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 5(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-16>
- Vanier, M. T., Duthel, S., Rodriguez-Lafrasse, C., Pentchev, P., & Carstea, E. D. (1996). Genetic heterogeneity in Niemann-Pick C disease: a study using somatic cell hybridization and linkage analysis. *American Journal of Human Genetics*, 58(1), 118–125.
- Vanier, M. T., Wenger, D. A., Comly, M. E., Rousson, R., Brady, R. O., & Pentchev, P. G. (1988). Niemann-Pick disease group C: clinical variability and diagnosis based on defective cholesterol esterification: A collaborative study on 70 patients. *Clinical Genetics*, 33(5), 331–348. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1988.tb03460.x>
- Vanier, M., & Millat, G. (2003). Niemann-Pick disease type C. *Clinical Genetics*, 64(4), 269–281. <https://doi.org/10.1034/j.1399-0004.2003.00147.x>
- Walkley, S. U., & Suzuki, K. (2004). Consequences of NPC1 and NPC2 loss of function in mammalian neurons. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1685(1-3), 48–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2004.08.011>
- Walterfang, M., Chien, Y.-H., Imrie, J., Rushton, D., Schubiger, D., & Patterson, M. C. (2012). Dysphagia as a risk factor for mortality in Niemann-Pick disease type C: systematic literature review and evidence from studies with miglustat. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 7(1), 76. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-76>

- Wassif, C. A., Cross, J. L., Iben, J., Sanchez-Pulido, L., Cougnoux, A., Platt, F. M., ... Porter, F. D. (2015). High incidence of unrecognized visceral/neurological late-onset Niemann-Pick disease, type C1, predicted by analysis of massively parallel sequencing data sets. *Genetics in Medicine*, 18(1), 41–48. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.25>
- Wraith, J. E., Baumgartner, M. R., Bembi, B., Covanis, A., Levade, T., Mengel, E., ... Patterson, M. C. (2009). Recommendations on the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C. *Molecular Genetics and Metabolism*, 98(1–2), 152–165. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.06.008>
- Xiong, H., Higaki, K., Wei, C. jie, Bao, X. H., Zhang, Y. H., Fu, N., ... Wu, X. R. (2012). Genotype/phenotype of 6 Chinese cases with Niemann-Pick disease type C. *Gene*, 498(2), 332–335. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.01.026>

6. APÊNDICES

6.1 Apêndice I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
LABORATÓRIO DE GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
INFORMAÇÕES PARA OS PACIENTES, RESPONSÁVEIS E FAMILIARES

Você está sendo convidado a participar voluntariamente da pesquisa **“DOENÇAS GENÉTICAS NO MARANHÃO: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA E LABORATORIAL”**, este formulário de consentimento explica sobre a pesquisa supracitada e sobre sua participação na mesma.

Leia atentamente as informações a seguir antes de dar o seu consentimento. No caso de dúvidas ou de não entender bem, pergunte e peça mais esclarecimento. Este documento está impresso em duas vias (uma para o pesquisador e outra para o participante) e será assinado por você somente após ser lido, completamente entendido e após suas dúvidas serem todas esclarecidas.

Você é um voluntário. Se você participar desta investigação clínica, você pode mudar de idéia mais tarde. Você pode decidir não fazer parte ou você pode sair a qualquer momento.

Se crianças e adultos aceitarem participar desta investigação clínica, a palavra "você", neste formulário de consentimento vai se referir tanto a você como a seu filho (a). A pessoa que está sendo convidada a participar desta investigação clínica pode não ser capaz de dar o seu consentimento para o presente estudo. Nesse caso, você está, portanto, sendo convidado a dar permissão para que essa pessoa participe do estudo, como seu responsável legal.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO ESTUDO

A Universidade Federal do Maranhão em parceria com o Hospital Infantil Dr. Juvêncio Matos e a Maternidade de Alta Complexidade do Maranhão está realizando esta pesquisa científica para conhecer melhor as doenças genéticas do Estado, buscando novas estratégias de diagnóstico, tratamento e seguimento.

Por que estou sendo convidado para essa pesquisa?

Você pode fazer parte desta investigação clínica porque você ou seu filho(a) tem uma síndrome rara ou distúrbio genético para o qual foi encontrada a causa genética, mas por ser rara, são necessários mais dados para ampliar o conhecimento sobre a história natural da doença, portanto, você está sendo convidado a participar pois selecionamos seu caso para publicação de série de casos clínicos relacionados a sua patologia. Nós olhamos para a causa destas doenças raras e/ou distúrbios genéticos estudando os dados clínicos, de exames complementares e em alguns casos é possível analisar também o DNA de um indivíduo afetado e / ou de membros da família. O DNA transporta informações que coordenam o crescimento, o desenvolvimento ou a função do corpo, sob a forma de um código. Nós herdamos esse código do nosso pai e passamos o código para os nossos filhos. O DNA é dividido em genes. Os genes contêm a informação para produzir as proteínas do nosso corpo, que nos permitem crescer, desenvolver e desempenhar funções orgânicas. O conjunto completo de genes de uma pessoa é chamado de genoma. Uma anormalidade no gene, denominada mutação ou variante, pode produzir proteínas defeituosas que não funcionam adequadamente no corpo. Neste caso, as mutações podem resultar em problemas no desenvolvimento, crescimento e função que possa ser reconhecido como um síndrome ou distúrbio de saúde.

Como será feita esta pesquisa?

Você será atendido(a) normalmente pelo médico geneticista, que fará o exame médico seguindo a rotina de pacientes em acompanhamento ou em investigação. Nós vamos coletar informações médicas sua e de seus familiares e vamos utilizar dados da consulta registrados no prontuário, incluindo resultados de exames realizados (cariótipo, sequenciamento, PCR, ecografias, ressonâncias, ou outros que você tenha realizado). Não serão solicitados exames além do necessário para investigação e seguimento habitual. Vamos pedir permissão para obter fotografias de você (autorização está ao fim desse documento) para ilustrarem características típicas da doença que será descrita e que poderão divulgadas/apresentadas em artigo científico, monografia e/ou Congressos. Os achados clínicos e laboratoriais serão descritos e comparados com outros casos encontrados na literatura científica. É garantida a manutenção do sigilo e da privacidade dos participantes da pesquisa durante todas as fases da pesquisa e o paciente é livre para escolher entre participar ou não da mesma. Todos os dados do paciente são absolutamente confidenciais e, portanto, serão comunicados somente ao paciente e ao médico que a acompanha.

Quais os benefícios e malefícios deste estudo?

Não haverá nenhuma vantagem direta, tal como remuneração, com a participação neste estudo, porém, os resultados poderão ajudar no entendimento da epidemiologia e aspectos clínicos das doenças genéticas e poderá contribuir, a longo prazo, para a melhoria do diagnóstico e melhor distribuição de recursos para tratamento dessas desordens. Os riscos, se necessário coleta de material biológico, são os mínimos pois é em geral obtido por meios não invasivos (sangue periférico - total sangue coletado geralmente em torno de 3ml até 2 colheres de sopa ou swab de mucosa oral), bem como não cumprirão propósito de apenas fornecer dados para a pesquisa, mas sim investigar o diagnóstico da causa da doença em questão e para melhor orientar o tratamento. Você terá acompanhamento e assistência médica nas instituições onde já realiza seu acompanhamento médico, mesmo que não participe desta pesquisa ou que a pesquisa seja interrompida. Você não terá despesas decorrentes da pesquisa. Todos os custos tidos com a pesquisa serão de responsabilidade do pesquisador responsável e equipe executora, isto é, o você não arcará com nenhum custo referente aos procedimentos da pesquisa. Os pacientes que não concordarem em participar da pesquisa não terão nenhum prejuízo sobre seu tratamento. É garantido o direito de assistência integral gratuita devido a danos diretos/indiretos e imediatos/tardios decorrentes da pesquisa, pelo tempo que for necessário, ao participante da pesquisa, garantido pelo pesquisador responsável. É garantida também o direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa. O pesquisador responsável, ao perceber qualquer risco ou danos significativos ao participante da pesquisa, previstos, ou não, no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, comunicará o fato, imediatamente, ao Comitê de Ética em Pesquisa, para avaliar, em caráter emergencial, a necessidade de adequar ou suspender o estudo.

O que vai ser feito com os dados coletados de cada paciente?

Os dados coletados serão analisados e seus resultados publicados em forma de artigo científico, monografia e/ou apresentado em Congressos. A eventual inclusão dos resultados da pesquisa em publicação científica será sempre feita de modo a manter o seu anonimato, ou seja, seu nome ou qualquer informação que o identifique nunca serão divulgados. As informações que podem ser apresentadas incluem fotografias, raios-X, ou resultados de outros testes diagnósticos. O paciente poderá escolher entre ser informado ou não dos resultados da pesquisa. Aqueles que se interessarem em saber sobre os resultados obtidos com o presente estudo serão orientados pela coordenadora geral do Projeto, Dra. Silma Regina Ferreira Pereira (professora do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Maranhão), podendo ser contactada no Laboratório de Genética e Biologia Molecular, no endereço: Av. dos Portugueses, 1966, cidade universitária do Campus do Bacanga, São Luís, Maranhão, telefone 32728543,

ou pelo seu médico geneticista assistente durante as consultas, ou pelo email geneticas.raras.ma@gmail.com. O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMA funciona das 8:00h às 12:00h e das 14:00h às 18:00h, e está situado na Avenida dos Portugueses número 1966, Cidade Universitária do Bacanga, Prédio do CEB Velho, PPPG, Bloco C Sala 07. E-mail cepufma@ufma.br, telefone (98)3272-8708. Este comitê tem, como uma de suas atribuições, garantir a manutenção dos aspectos éticos da pesquisa, bem como, a obtenção do consentimento livre e esclarecido dos indivíduos ou grupos para a sua participação.

AUTORIZAÇÃO OBTENÇÃO E DIVULGAÇÃO DE FOTOS

Depois de conhecer e entender os objetivos, procedimentos metodológicos, riscos e benefícios da pesquisa, bem como de estar ciente da necessidade do uso de minha imagem e/ou depoimento, especificados no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), **AUTORIZO**, através do presente termo, os pesquisadores desse estudo a realizar as fotos que se façam necessárias sem quaisquer ônus financeiros a nenhuma das partes e ao mesmo tempo, libero a utilização destas fotos para fins científicos e de estudos (livros, artigos, slides).

Por favor, rubricar todas as linhas que indicam o tipo de fotografias você concorda que podemos mostrar em público ou em apresentação científica ou revista médica.

_____ Sim, você pode mostrar uma foto do meu corpo todo, incluindo o rosto, e sem as minhas roupas.

_____ Sim, você pode mostrar uma foto do meu corpo inteiro sem a minha roupa, mas cobrindo ou cortando a minha face.

_____ Sim, você pode mostrar uma foto do meu corpo todo, incluindo o rosto, com as minhas roupas.

_____ Sim, você pode mostrar uma foto de todo o meu corpo com minhas roupas, mas cobrindo ou cortando certas partes.

_____ Não mostrar as fotos de qualquer parte do meu corpo.

Ao assinar o item abaixo, você declara que foi informado sobre a pesquisa, dessa forma, confirmando que leu e entendeu o conteúdo da Informação e que **VOLUNTARIAMENTE CONCORDA** em participar deste estudo. Você também entendeu que pode esclarecer suas dúvidas junto a seu médico e que a informação que lhe foi fornecida permitiu-lhe tomar uma decisão livre e completamente informada sobre a sua participação nesse estudo. Uma via desse termo de consentimento assinada pelo pesquisador também ficará com você. Ressaltamos que você tem o direito de sair desse estudo em qualquer momento sem qualquer consequência.

Todas as páginas deverão ser rubricadas pelo pesquisador responsável/pessoa por ele delegada e pelo participante/responsável legal.

PACIENTE:

NOME POR EXTENSO: _____

RG: _____

ASSINATURA: _____

PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

NOME POR EXTENSO: _____

RG: _____

ASSINATURA: _____

São Luís, _____ de _____ de 20____

7. ANEXOS

7.1 Anexo I – Normas de Submissão do Artigo Original

Parts of the Manuscript

The manuscript should be submitted in separate files: main text file; figures.

Main Text File

The text file should be presented in the following order:

- i. The title;
- ii. The full names of the authors (do not include academic degrees);
- iii. The author's institutional affiliations where the work was conducted, with a footnote for the author's present address if different from where the work was conducted;
- iv. Grant numbers (as applicable-to ensure proper identification of funders with publication requirements-see note under Author Licensing; below);
- v. Abstract and keywords;
- vi. Main text;
- vii. Acknowledgments;
- viii. References;
- ix. Tables (each table complete with title and footnotes);
- x. Figure legends;
- xi. Appendices (if relevant)

Figures and supporting information should be supplied as separate files. Figures must be clearly labeled.

Authorship

Please refer to the journal's Authorship policy in the Editorial Policies and Ethical Considerations section for details on author listing eligibility.

Acknowledgements

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section. Financial and material support should also be mentioned. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

Conflict of Interest Statement

Authors will be asked to provide a conflict of interest statement during the submission process. For details on what to include in this section, see the Conflict of Interest section in the Editorial Policies and Ethical Considerations section below. Submitting authors should ensure they liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement.

Abstract

Please provide an abstract of 200 words containing the major keywords summarizing the article.

Keywords

Please provide three to five keywords.

Main Text

The journal uses US spelling; however, authors may submit using either option, as spelling of accepted papers is converted during the production process.

References

The accuracy of references is the responsibility of the authors. Only published papers and those in press may be included in the reference list. Unpublished data and submitted manuscripts must be cited parenthetically within the text. Personal communications should also be cited within the text; permission in writing from the communicator is required.

References should be prepared according to the Publication Manual of the American Psychological Association (6th edition). The APA website includes a range of resources for authors learning to write in APA style, including an overview of the manual, free tutorials on APA Style basics, and an APA Style Blog.

According to APA style, in text citations should follow the author-date method whereby the author's last name and the year of publication for the source should appear in the text, for example, (Jones, 1998). The complete reference list should appear alphabetically by name at the end of the paper.

Authors should note that the APA referencing style requires that a Digital Object Identifier (DOI) be provided for all references where available. Also, for journal articles, issue numbers are not included unless each issue in the volume begins with page one.

Footnotes

Footnotes should be placed as a list at the end of the paper only, not at the foot of each page. They should be kept to a minimum. Keep footnotes brief; they should contain only short comments tangential to the main argument of the paper and should not include references. They should be numbered in the list and referred to in the text with consecutive, superscript Arabic numerals.

Tables

Tables should be self-contained and complement, not duplicate, information contained in the text. They should be supplied as editable files, not pasted as images. Legends should be concise but comprehensive – the table, legend, and footnotes must be understandable without reference to the text. All abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for P-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

Figure Legends

Legends should be concise but comprehensive – the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

Figures

Although authors are encouraged to send the highest quality figures possible, for peer-review purposes, a wide variety of formats, sizes, and resolutions are accepted. Click here for the basic figure requirements for figures submitted with manuscripts for initial peer review, as well as the more detailed post-acceptance figure requirements.

Figures submitted in color may be reproduced in color online free of charge. Please note, however, that it is preferable that line figures (e.g. graphs and charts) are supplied in black and white so that they are legible if printed by a reader in black and white. If an author would prefer figures printed in color in hard copies of the journal, a fee will be charged by the Publisher.

Additional FilesAppendices

Appendices will be published after the references. For submission they should be supplied as separate files but referred to in the text.

General Style Points

The following points provide general advice on formatting and style.

- Abbreviations: In general, terms should not be abbreviated unless they are used repeatedly and the abbreviation is helpful to the reader. Initially, use the word in full, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter use the abbreviation only.
- Units of measurement: Measurements should be given in SI or SI-derived units. Visit the Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) website for more information about SI units.
- Numbers: numbers under 10 should be spelt out, except for: measurements with a unit (8 mmol/L); age (6 weeks old), or lists with other numbers (11 dogs, 9 cats, 4 gerbils).
- Trade Names: Chemical substances should be referred to by the generic name only. Trade names should not be used. Drugs should be referred to by their generic names. If proprietary drugs have been used in the study, refer to these by their generic name, mentioning the proprietary name and the name and location of the manufacturer in parentheses.

FONTE: <https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/15524833/homepage/forauthors.html>
(*acesso em 16/10/2018*).