



**Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,  
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**

# **Estudo Descritivo Molecular de Pacientes com RASopatia**

**Thays Cristine dos Santos Vieira**

Rio de Janeiro  
Maio de 2019



**Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,  
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**

# **Estudo Descritivo Molecular de Pacientes com RASopatia**

**Thays Cristine dos Santos Vieira**

*Dissertação apresentada à Pós-  
Graduação em Pesquisa Aplicada à Saúde  
da Criança e da Mulher como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Ciências.*

**Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Sayonara Maria de Carvalho Gonzalez**

**Co-orientador: Dr. Juan Clinton Llerena Jr**

Rio de Janeiro

Maio de 2019

CIP - Catalogação na Publicação

Vieira, Thays Cristine dos Santos.

Estudo Descritivo Molecular de Pacientes com RASopatia / Thays Cristine dos Santos Vieira. - Rio de Janeiro, 2019.  
163 f.; il.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Pesquisa Aplicada à Saúde da Criança e da Mulher) - Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Rio de Janeiro - RJ, 2019.

Orientadora: Sayonara Maria de Carvalho Gonzalez.

Co-orientador: Juan Clinton Llerena Jr.

Bibliografia: f. 120-133

1. Rasopatia. 2. Doenças em Gêmeos. 3. Sequências Reguladoras de Ácido Ribonucleico. 4. Proteoma. 5. Genética Médica. I. Título.

*À menina que correu para contar a novidade quando leu sua primeira frase sozinha: “Olha, mãe, ‘tá’ escrito aqui ‘A Cura da AIDS’”.*

*Bem-vinda a realização de mais um sonho...*

*Aos amores da minha vida, minha família, Conceição, Rogério e Thayane, por muitas vezes acreditarem mais em mim do que eu mesma e por serem meus maiores incentivadores.*

## AGRADECIMENTOS

Aos **Orixás** e **Guias** que iluminam meus caminhos para que eu seja um bom ser humano e possa auxiliar pessoas com o conhecimento que adquiro.

Às pessoas essenciais e mais importantes da minha vida: **meus pais**.

À minha mãe, **Conceição**, por ser minha melhor amiga, por ser meu porto seguro, por cuidar de mim em todas as dificuldades que enfrentei, por todo amor que me dá, por ser a pessoa em quem posso confiar, por ser minha maior inspiração de força. Dizer que te amo ainda é pouco.

Ao meu pai, **Rogério**, por todos os sacrifícios que fez e faz por nossa família, por incentivar todos os meus sonhos, por ter um orgulho imensurável de mim, por ser meu ponto de calma e positividade, por me ensinar a acreditar que tudo vai dar certo, por ser meu maior exemplo de ser humano com toda sua bondade.

À minha irmã, **Thayne**, meu ponto de equilíbrio, meu oposto que me complementa, meu maior orgulho, minha incentivadora incondicional.

À minha **família**, por todas as adversidades que enfrentamos nos últimos anos e ao longo de toda história de nossos pais e avós. Esse título não é só meu, é nosso!

À minha prima-irmã, **Ana Paula**, por sempre estar ao meu lado, desde a minha infância, se alegrar com minhas conquistas e me dar meu maior presente: meu afilhado.

Ao meu cunhado, **João**, por ser um amigo e um irmão. Obrigada pela amizade de todos esses anos.

Ao meu afilhado, **Victor Hugo**, e aos meus sobrinhos, **Bernardo e Théo**, por me ensinarem a demonstrar afeto. Vocês são os meus maiores presentes, as minhas alegrias e os salvadores da minha vida. A Dinda/laiá ama vocês, meus pretinhos.

À minha grande amiga, **Lívia**, por ser meu anjo da guarda e por ter permanecido ao meu lado ao longo de tantas turbulências. Graças ao seu incentivo, eu voltei para a vida acadêmica. Graças ao seu apoio, eu não desisti. Só você sabe da importância desse título para mim. Obrigada por ser luz no meu caminho e incentivo e alegria nos meus dias. Eu nunca conseguirei demonstrar toda gratidão por ter você na minha vida.

Ao meu amigo, **Leonardo**, que entrou na minha vida graças ao mestrado e que é o maior presente que vou levar comigo. Obrigada por todas risadas na volta para casa, por todas as conversas filosóficas na praia, por me apresentar uma nova forma de enxergar a vida, por ser tão parecido e tão diferente de mim. Desde que te conheci, nunca mais me senti sozinha no mundo.

Aos meus **amigos** de toda uma vida, por me apoiarem e se orgulharem de quem estou me tornando. Cada parte de mim tem um pouco de vocês.

Às minhas companheiras de jornada de mestrado, **Lívia** e **Roberta**, por tornarem essa caminhada mais leve e alegre.

À equipe da **Michelin**, meu berço profissional, em especial à **Natália**, por moldar a profissional que sou hoje.

Às meninas do **Laboratório de Medicina Genômica/Biologia Molecular**, por toda amizade e aprendizado.

Às meninas do **Laboratório de Biologia Molecular e Proteômica do Sangue** da UFRJ, em especial à **Vanessa**, **Sheila** e **Nicole**, por me acolherem, me ajudarem e me ensinarem tanto.

À professora Dr<sup>a</sup> **Luciana Pizzatti**, pela bondade de acolher parte desse projeto, abrir as portas de seu laboratório e me co-orientar com tanta paciência. Obrigada é pouco para expressar minha gratidão.

Ao Dr **Juan Llerena Jr**, por me aceitar em sua equipe e confiar no meu trabalho mesmo sem me conhecer. Obrigada por dar o pontapé inicial desse sonho.

À toda **equipe do Instituto Fernandes Figueira**, os **médicos do ambulatório de Genética**, a **equipe da Citogenômica**, a **equipe de coleta** e todos os outros, por serem engrenagens importantes para a realização desse trabalho.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> **Sayonara**, por me ajudar a realizar esse grande sonho, por confiar e acreditar no meu trabalho. E, acima de tudo, por ser tão humana e compreender as questões pessoais que enfrentei nesse período. Obrigada, Nara, eu não tenho palavras para descrever o quão importante para mim é esse momento e você me ajudou a realizá-lo.

Aos **pacientes e seus familiares** que, mesmo enfrentando a dificuldade de problemas de saúde, aceitaram participar desse projeto que pode abrir novas frentes de pesquisa e diagnóstico para outros pacientes. Minha torcida é para que todos fiquem bem.

Ao **Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**, à **Fundação Oswaldo Cruz**, ao **Sistema Único de Saúde** e ao **Ministério da Saúde**, por financiarem a estrutura desse estudo e por cuidarem dos pacientes e suas famílias. Que nossa população tenha direito à dignidade de uma saúde de qualidade e que o SUS não seja sucateado.



À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**, CAPES, por financiar este projeto e a minha mão de obra como cientista em formação.

À todos os **professores** que tive ao longo desta trajetória. Em especial, ao **Diuliano**, que me deu a oportunidade de mudar o curso da minha trajetória acadêmica e profissional. Tudo isso começou graças ao seu incentivo.

Aos governos de **Lula** e **Dilma**, por suas políticas afirmativas e inclusivas, que me permitiram ser quem sou academicamente e profissionalmente. Muitos iguais a mim são gratos pelas oportunidades que tiveram.

Ao **povo brasileiro**, que financiou essa pesquisa e carrega todo esse país nas costas com a força de seu trabalho. Obrigada! Meu maior objetivo de vida é colocar todo meu conhecimento a serviço de vocês para que possam ter uma vida mais digna.

À **comunidade científica brasileira** que, mesmo com todas as dificuldades e a remuneração não condizente com os grandes trabalhos desenvolvidos, não desiste de melhorar o mundo.

***Pra que(m) serve teu conhecimento?***

***(Autor Desconhecido)***

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                |   |
|----------------|---|
| A              | Adenina   |
| C              | Citosina  |
| CAAE           | Certificado de Apresentação para Apreciação Ética                             |
| CAPES          | Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior                   |
| cDNA           | DNA Complementar (do inglês <i>Complementary DNA</i> )                        |
| CEP            | Comitê de Ética em Pesquisa   |
| CFC            | Síndrome Cardiofaciocutânea   |
| CGM            | Centro de Genética Médica José Carlos Cabral de Almeida                       |
| DEPC           | Dietilpirocarbonato   |
| DNA            | Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )           |
| DSAV           | Defeito do Septo Atrioventricular   |
| DTT            | Ditiotreitol  |
| EDTA           | Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético  |
| <i>et al.,</i> | e outros(as) (do latim <i>et alii, et aliae</i> e <i>et alia</i> )            |
| FAPERJ         | Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro |
| Fiocruz        | Fundação Oswaldo Cruz   |
| G              | Guanina   |
| h              | Hora  |
| hm             | Homozigose  |
| ht             | Heterozigose  |

|                   |   |
|-------------------|---|
| IAA               | Iodoacetoamida  |
| ID                | Identificação   |
| IFF               | Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira                                     |
| KCl               | Cloreto de Potássio   |
| Kd                | Kilo Dalton   |
| KHCO <sub>3</sub> | Bicarbonato de Potássio   |
| LABMOPS           | Laboratório de Biologia Molecular e Proteômica do Sangue  |
| LCC               | Laboratório de Citogenética Clínica   |
| LEOPARD           | Síndrome de LEOPARD   |
| LMG               | Laboratório de Medicina Genômica  |
| LNCC              | Laboratório Nacional de Computação Científica   |
| lncRNA            | RNA Longo Não Codificante (do inglês <i>Long Noncoding RNA</i> )  |
| L2                | Segunda Vértebra Lombar   |
| L5                | Quinta Vértebra Lombar  |
| M                 | Molar (Moles/Litro)   |
| MgCl <sub>2</sub> | Cloreto de Magnésio   |
| min               | Minuto  |
| miRNA             | MicroRNA  |
| mL                | Mili Litro  |
| MLPA              | Amplificação da Sonda Dependente de Ligação Múltipla (do inglês <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> ) |
| mm                | Milímetro   |
| mM                | Mili Molar (Mili Moles/Litro)   |

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| mRNA                              | RNA Mensageiro (do inglês <i>Messenger RNA</i> )  |
| MSc                               | Mestre em Ciências (do inglês <i>Master of Science</i> )  |
| ND                                | Não Determinado   |
| NF1                               | Neurofibromatose Tipo 1   |
| ng                                | Nano Grama  |
| NGS                               | Sequenciamento de Nova Geração (do inglês <i>Next-Generation Sequencing</i> )   |
| NH <sub>4</sub> Cl                | Cloreto de Amônio   |
| NH <sub>4</sub> KHCO <sub>3</sub> | Bicarbonato de Amônio   |
| nt                                | Nucleotídeos  |
| N°                                | Número  |
| OMIM                              | Herança Mendeliana no Homem On-line (do inglês <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> )                                       |
| pb                                | Pares de Bases  |
| pH                                | Potencial Hidrogeniônico  |
| RNA                               | Ácido Ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic Acid</i> )   |
| RNAi                              | RNA de Interferência  |
| RNA <sub>sn</sub>                 | Pequeno RNA Nuclear   |
| RNA <sub>sno</sub>                | Pequeno RNA Nucleolar   |
| RNA <sub>t</sub>                  | RNA Transportador   |
| rpm                               | Rotações por Minuto   |
| <i>RT-qPCR</i>                    | Reação Quantitativa em Cadeia da Polimerase em Tempo Real<br>(do inglês <i>Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> ) |
| SC                                | Síndrome de Costello  |

|       |   |
|-------|---|
| seg   | Segundo                                   |
| SL    | Síndrome de Legius                        |
| SN    | Síndrome de Noonan                        |
| SNML  | Síndrome de Noonan com Múltiplos Lentigos |
| SUS   | Sistema Único de Saúde                    |
| T     | Timina                                    |
| TAE   | Tris-Acetato EDTA                         |
| TEP   | Tampão de Extração de Proteínas           |
| TERC  | RNAs Associados a Telômeros               |
| TFA   | Ácido Trifluoracético                     |
| TLH   | Tampão de Lise de Hemácias                |
| V/cm  | Volt/Centímetro                           |
| Xg    | Unidade de Centrifugação                  |
| µg    | Micrograma                                |
| µg/mL | Micrograma/Mili Litro                     |
| µg/µL | Micrograma/Microlitro                     |
| µL    | Microlitro                                |
| °C    | Graus Celsius                             |
| %     | Porcentagem                               |
| <     | Menor que                                 |
| [+]   | Fita Senso                                |
| [-]   | Fita Anti-Senso                           |

## RESUMO

As RASopatias são um grupo de doenças cujos pacientes apresentam alterações constitucionais em genes que participam de uma mesma via de sinalização celular denominada Ras/MAPK, que desempenha um papel importante na proliferação, diferenciação, migração celular e apoptose, além de estar associada a processos carcinogênicos. Apesar dos avanços em métodos diagnósticos, cerca de 20 a 25% dos casos permanecem inconclusivos, o que impulsiona pesquisas que buscam alterações em outros níveis de regulação da via, como RNAs não codificantes e proteínas. O primeiro capítulo deste estudo, avalia um grupo de 6 pacientes diagnosticados clinicamente com RASopatia e com exomas sequenciados. Foram obtidos dados sobre mutações em seus miRNAs. O segundo capítulo relata o caso de um paciente com suspeita clínica de síndrome de Costello, mas sem mutações detectadas. Foram avaliados, *in silico*, dados sobre miRNAs reguladores do gene *HRAS*, bem como os diferentes tecidos nos quais o *HRAS* é expresso. Para o capítulo 3 foi realizado um estudo comparativo entre gêmeas com diagnóstico clínico de síndrome de Noonan, mas com fenótipo discordante. Foi realizado um *array* por *RT-qPCR* para diferentes RNAs reguladores e um estudo comparativo de proteoma com análise de vias biológicas, processos biológicos e genes alvo da regulação de fatores de transcrição putativos. No estudo de miRNAs foram encontradas mutações em heterozigose, que são de difícil avaliação em ensaios de expressão. No estudo de caso do paciente S4 (síndrome de Costello), não foram encontradas mutações nos miR-181d-5p, let-7a-5p, miR-143-3p, miR-181a-5p, miR-139-5p, miR-663a e let-7b-5p, descritos como reguladores do *HRAS*. Também não foram encontrados tecidos viáveis para coleta e análise da expressão do *HRAS*. Na expressão de RNAs reguladores nas gêmeas (S16 e S17) foram encontrados níveis de expressão aumentados em S17 para Lnc-C21orf33-1, ERBS3/SBNO2e, miR-200be, CTBP1-AS e Lnc\_DC. Na análise do proteoma, foram encontradas diferenças de expressão em vias de integrinas, proteoglicanos e trombinas, além de diferenças em processos de transdução de sinal, crescimento e manutenção celular e metabolismo. Os genes com sítio de ligação para os fatores de transcrição como RREB1, ETS1, EGR1 e TBX5 também possuíam expressão diferente entre as gêmeas. Os resultados aqui apresentados apontam novos caminhos para estudos moleculares das RASopatias que possam preencher as lacunas diagnósticas ainda pendentes.

Palavras chave:

Genética Médica; Rasopatia; Síndrome de Costello; Síndrome de Noonan; Neurofibromatose 1; Doenças em Gêmeos; Divergência Fenotípica em Gêmeos; RNAs Reguladores; MicroRNAs; Sequências Reguladoras de Ácido Ribonucleico; Proteoma.

## ABSTRACT

RASopathies are a group of diseases whose patients present constitutional changes in genes that participate in the same cellular signaling pathway called the Ras/MAPK, which plays an important role in proliferation, differentiation, cell migration and apoptosis, in addition to being associated with carcinogenic processes. Despite advances in diagnostic methods, about 20 to 25% of cases remain inconclusive, which drives research that seeks changes in other levels of pathway regulation, such as non-coding RNAs and proteins. The first chapter of this study evaluates a group of 6 patients clinically diagnosed with RASopathy and sequenced exomes. Data were obtained on mutations in their miRNAs. The second chapter reports the case of a patient with clinical suspicion of Costello syndrome, but without mutations detected. Data on the miRNAs regulating the *HRAS* gene, as well as the different tissues in which *HRAS* is expressed, were evaluated *in silico*. For chapter 3 a comparative study was performed between twins with clinical diagnosis of Noonan syndrome, but with a discordant phenotype. An array was performed by RT-qPCR for different regulatory RNAs and a comparative proteome study with analysis of biological pathways, biological processes and genes targeting the regulation of putative transcription factors. In the study of miRNAs, mutations were found in heterozygosis, which are difficult to evaluate in expression assays. In the case study of S4 patient (Costello syndrome), no mutations were found in miR-181d-5p, let-7a-5p, miR-143-3p, miR-181a-5p, miR-139-5p, miR-663a and let-7b -5p, described as *HRAS* regulators. No available tissues were also found for collection and analysis of *HRAS* expression. In expression of regulatory RNAs in the S16 and S17 twins, increased levels of S17 expression were found for Lnc-C21orf33-1, ERBS3 / SBNO2e, miR-200b, CTBP1-AS and Lnc\_DC. In the proteome analysis, expression differences were found in integrins, proteoglycans and thrombin pathways, as well as differences in signal transduction processes, cell growth and maintenance, and metabolism. Genes with binding site for transcription factors such as RREB1, ETS1, EGR1 and TBX5 also had different expression between the twins. The results presented here point out new ways for molecular studies of RASopathies that may close the remaining diagnostic gaps.

### Keywords:

Medical Genetics; Rasopathy; Costello Syndrome; Noonan Syndrome; Neurofibromatosis 1; Diseases in Twins; Phenotypic Divergence in Twins; Regulatory RNAs; MicroRNAs; Ribonucleic Acid Regulatory Sequences; Proteome.



# SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO:.....  | 22 |
| 2. COMENTÁRIOS INICIAIS: .....   | 25 |
| 3. OBJETIVO GERAL:.....  | 28 |
| 3.1.    Objetivos Específicos:.....                                    | 28 |
| CAPÍTULO 1 – Estudo de miRNAs .....                                    | 30 |
| 4. REFERENCIAL TEÓRICO: .....  | 30 |
| 4.1.    Aspectos Gerais das RASopatias: .....                          | 30 |
| 4.2.    Aspectos Clínicos das RASopatias:.....                         | 32 |
| 4.2.1. Síndrome de Noonan (SN, OMIM 163950):.....                      | 33 |
| 4.2.2. Síndrome de Costello (SC, OMIM 218040):.....                    | 34 |
| 4.2.3. Síndrome de LEOPARD (LEOPARD, OMIM 151100): .....               | 35 |
| 4.2.4. Síndrome Cardiofaciocutânea (CFC, OMIM 115150): .....           | 36 |
| 4.2.5. Neurofibromatose Tipo 1 (NF1, OMIM 162200):.....                | 36 |
| 4.2.6. Síndrome de Legius (SL, OMIM 611431):.....                      | 37 |
| 4.3.    Aspectos Moleculares das RASopatias: .....                     | 38 |
| 4.3.1. Via Ras/MAPK: .....   | 38 |
| 4.3.2. MicroRNAs (miRNAs): .....                                       | 39 |
| 4.3.3. Identificação das Mutações – Sequenciamento de DNA: .....       | 41 |
| 4.3.4. Avaliação Funcional – Alvos Validados dos miRNAs:.....          | 43 |
| 5. METODOLOGIA: .....  | 44 |
| 5.1.    Tipo e Local do Estudo: .....                                  | 44 |
| 5.2.    Comitê de Ética em Pesquisa: .....                             | 44 |
| 5.3.    Amostra e Critérios de Inclusão e Exclusão:.....               | 44 |
| 5.4.    Recrutamento dos Pacientes e Obtenção das Amostras:.....       | 44 |
| 5.5.    Seleção dos miRNAs e Predição <i>in silico</i> dos Alvos:..... | 45 |
| 5.6.    Recursos Financeiros: .....                                    | 46 |
| 6. RESULTADOS: .....   | 48 |
| 6.1.    Pacientes Recrutados:.....                                     | 48 |
| 6.1.1. Paciente S1:.....   | 48 |
| 6.1.2. Paciente S2:.....   | 49 |
| 6.1.3. Paciente S3:.....   | 51 |
| 6.1.4. Paciente S4:.....   | 52 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| 6.1.5.    | Paciente S5:.....   | 54 |
| 6.1.6.    | Paciente S6:.....   | 55 |
| 6.2.      | Seleção dos miRNAs Resultantes do Exoma e Predição <i>in silico</i> dos Alvos: 57 |    |
| 7.        | DISCUSSÃO:.....   | 61 |
|           | CAPÍTULO 2 – Estudo de Caso – Paciente S4.....                                    | 65 |
| 8.        | REFERENCIAL TEÓRICO: .....  | 65 |
| 8.1.      | Descrição de Caso Clínico – Paciente S4:.....                                     | 65 |
| 8.2.      | Gene <i>HRAS</i> : .....  | 65 |
| 9.        | METODOLOGIA: .....  | 67 |
| 9.1.      | Local do Estudo: .....  | 67 |
| 9.2.      | Amostra:.....   | 67 |
| 9.3.      | Investigação de Mutações em miRNAs reguladores do Gene <i>HRAS</i> :<br>67        |    |
| 9.4.      | Avaliação <i>in silico</i> da Expressão Tecidual do Gene <i>HRAS</i> :.....       | 68 |
| 10.       | RESULTADOS: .....   | 69 |
| 10.1.     | Investigação de Mutações em miRNAs reguladores do Gene <i>HRAS</i> :<br>69        |    |
| 10.2.     | Avaliação <i>in silico</i> da Expressão Tecidual do Gene <i>HRAS</i> :.....       | 75 |
| 11.       | DISCUSSÃO: .....  | 80 |
|           | CAPÍTULO 3 – Estudo de Caso – Gêmeas com Fenótipos Discordantes .....             | 83 |
| 12.       | REFERENCIAL TEÓRICO: .....  | 83 |
| 12.1.     | Descrição de Caso Clínico – Pacientes S16 e S17: .....                            | 83 |
| 12.2.     | Estudos com Gêmeos:.....  | 85 |
| 12.3.     | RNAs Não codificantes (RNanc): .....  | 89 |
| 12.4.     | Avaliação Funcional – Proteoma: .....   | 91 |
| 13.       | METODOLOGIA:.....   | 93 |
| 13.1.     | Local do Estudo: .....  | 93 |
| 13.2.     | Obtenção das Amostras de Sangue Venoso: .....                                     | 93 |
| 13.2.1.   | Obtenção de Células de Sangue Periférico: .....                                   | 93 |
| 13.2.2.   | Expressão Gênica de RNAs Reguladores – Análise Comparativa: .                     | 94 |
| 13.2.2.1. | Extração de RNA Total de Células de Sangue Periférico:.....                       | 94 |
| 13.2.2.2. | Síntese de DNA Complementar (cDNA):.....  | 95 |
| 13.2.2.3. | Análise de Expressão por PCR em Tempo Real:.....                                  | 97 |
| 13.2.3.   | Proteoma – Análise Comparativa: .....   | 99 |
| 13.2.3.1. | Preparo da Amostra: .....   | 99 |

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| 13.2.3.2. | Digestão Proteica em Solução e Limpeza das Amostras: .....                              | 99  |
| 13.2.3.3. | Espectrometria de Massas de Alta Resolução: .....                                       | 100 |
| 13.2.3.4. | Análise <i>in silico</i> dos Resultados: .....  | 101 |
| 14.       | RESULTADOS: .....   | 103 |
| 14.1.     | Expressão Gênica de RNAs Reguladores – Análise Comparativa: .....                       | 103 |
| 14.2.     | Proteoma – Análise Comparativa: .....   | 106 |
| 15.       | DISCUSSÃO: .....  | 111 |
| 16.       | CONSIDERAÇÕES FINAIS:.....  | 116 |
| 17.       | CONCLUSÕES: .....   | 119 |
| 18.       | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: .....   | 120 |
|           | APÊNDICE I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....                           | 134 |
|           | APÊNDICE II – Termo de Assentimento para Pacientes de 6 a 11 anos.....                  | 139 |
|           | APÊNDICE III – Termo de Assentimento para Pacientes de 12 a 17 anos....                 | 144 |
|           | APÊNDICE IV – Tabela de Cálculo da Expressão Gênica.....                                | 149 |
|           | APÊNDICE V – Lista de Proteínas Exclusivas da Paciente S16.....                         | 151 |
|           | APÊNDICE VI – Lista de Proteínas Exclusivas da Paciente S17.....                        | 154 |
|           | ANEXO I – Folha de Rosto de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa. ....              | 160 |
|           | ANEXO II – Termo de Autorização de Uso de Imagem e de Voz (para Menores de Idade) ..... | 162 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 - Fluxograma de Avaliação dos Pacientes .....                                | 24 |
| Figura 2 - Sobreposição Clínica nas RASopatias e Tumores com Maior Incidência .....   | 31 |
| Figura 3 - Via Ras/MAPK e seus Genes Associados às RASopatias .....                   | 33 |
| Figura 4 - Paciente com Síndrome de Noonan .....                                      | 34 |
| Figura 5 - Características Clínicas da Síndrome de Costello .....                     | 35 |
| Figura 6 - Paciente com Síndrome de LEOPARD .....                                     | 35 |
| Figura 7 - Paciente com Síndrome Cardiofaciocutânea .....                             | 36 |
| Figura 8 - Paciente com Neurofibromatose Tipo 1 .....                                 | 37 |
| Figura 9 - Paciente com Síndrome de Legius .....                                      | 38 |
| Figura 10 - Biogênese e Mecanismos de Regulação dos miRNAs .....                      | 40 |
| Figura 11 - Fluxograma Metodológico do Capítulo 1 .....                               | 47 |
| Figura 12 - Paciente S1 .....   | 49 |
| Figura 13 - Paciente S2 .....   | 50 |
| Figura 14 - Paciente S3 .....   | 52 |
| Figura 15 - Paciente S4 .....   | 54 |
| Figura 16 - Paciente S5 .....   | 55 |
| Figura 17 - Paciente S6 .....   | 56 |
| Figura 18 - Pareamento do miRNA e do mRNA por Reconhecimento do Seed .....            | 62 |
| Figura 19 - Fluxograma Metodológico do Capítulo 2 .....                               | 68 |
| Figura 20 - Resultado da Busca no miRTarBase de miRNAs Reguladores do Gene HRAS ..... | 70 |
| Figura 21 - Estrutura dos pré-miRNAs .....  | 71 |
| Figura 22 - BLAST do hsa-miR-181d-5p .....  | 73 |
| Figura 23 - BLAST do hsa-let-7a-5p .....  | 73 |
| Figura 24 - BLAST do hsa-miR-143-3p .....   | 74 |
| Figura 25 - BLAST do hsa-miR-181a-5p .....  | 74 |
| Figura 26 - BLAST do hsa-miR-139-5p .....   | 74 |
| Figura 27 - BLAST do hsa-miR-663a .....   | 75 |
| Figura 28 - Expressão de HRAS (GTex) .....  | 76 |
| Figura 29 - Expressão de HRAS (Ensembl) .....   | 77 |
| Figura 30 - Expressão de HRAS (The Human Protein Atlas) .....                         | 78 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 31 - Expressão de HRAS (Gene Cards).....  | 79  |
| Figura 32 - Pacientes S16 e S17.....   | 84  |
| Figura 33 - Radiografia de Coluna da Paciente S17 .....  | 85  |
| Figura 34 - Similaridades e Diferenças Entre Gêmeos ao Longo da Embriogênese e Após o Nascimento ..... | 88  |
| Figura 35 - Mecanismos de Ação dos RNAs Não Codificantes.....  | 90  |
| Figura 36 - Iniciadores Utilizados para Array da Expressão de RNAs .....                               | 97  |
| Figura 37 - Fluxograma Metodológico do Capítulo 3.....   | 102 |
| Figura 38 - Análise das Curvas de Dissociação (Melting) de RNAs.....                                   | 104 |
| Figura 39 - Resultados de Expressão Gênica Comparativa (S16 como Controle) .....                       | 105 |
| Figura 40 - Gráficos da Triplicata da Paciente S16 .....   | 106 |
| Figura 41 - Gráficos da Triplicata da Paciente S17 .....   | 107 |
| Figura 42 - Diagrama de Venn para Resultado do Proteoma das Gêmeas ...                                 | 108 |
| Figura 43 - Proteoma Comparativo por Vias Biológicas .....   | 109 |
| Figura 44 - Proteoma Comparativo por Processos Biológicos .....  | 109 |
| Figura 45 - Proteoma Comparativo por Fatores de Transcrição .....                                      | 110 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Descrição dos genes envolvidos nas RASopatias .....    | 42 |
| Tabela 2 - Resultados da Primeira Pesquisa de miRNAs Mutados..... | 58 |
| Tabela 3 - Resultados da Segunda Pesquisa de miRNAs Mutados.....  | 59 |
| Tabela 4 - Resultados da Terceira Pesquisa de miRNAs Mutados..... | 60 |
| Tabela 5 - Posição dos miRNAs no Genoma de Referência.....        | 72 |
| Tabela 6 - Posição dos miRNAs no IGV (Exoma) .....                | 72 |
| Tabela 7 - Diferenças Fenotípicas entre as Gêmeas S16 e S17.....  | 84 |
| Tabela 8 - Reagentes do STEP 1.....                               | 96 |
| Tabela 9 - Reagentes do STEP 3.....                               | 96 |
| Tabela 10 - Reagentes do Mix do RT-qPCR.....                      | 98 |

## 1. INTRODUÇÃO:

As RASopatias são doenças do desenvolvimento cujos pacientes apresentam alterações constitutivas em genes que participam de uma mesma via de sinalização celular denominada via Ras/MAPK (1). A via Ras/MAPK desempenha um papel crucial em todo o ciclo celular, controlando a proliferação, diferenciação e migração celular (2). Além disso, participa do processo de sinalização para a apoptose. Alterações nesta via de sinalização também estão associadas aos processos carcinogênicos (3,4).

São seis as síndromes principais inclusas no grupo das RASopatias: síndrome de Noonan (SN, OMIM 163950) (5), síndrome de Costello (SC, OMIM 218040) (5), síndrome de LEOPARD (LEOPARD, OMIM 151100) (5), também denominada como síndrome de Noonan com Múltiplos Lentigos (SNML), síndrome Cardiofaciocutânea (CFC, OMIM 115150) (5), Neurofibromatose tipo 1 (NF1, OMIM 162200) (5) e síndrome de Legius (SL, OMIM 611431) (5). A sobreposição dos fenótipos tem sido um grande obstáculo para o diagnóstico clínico preciso dos pacientes. A expressão fenotípica variável também dificulta o diagnóstico e pode ser atribuída aos diferentes genes envolvidos, às interações entre eles, à variação epigenética e às alterações na regulação da expressão gênica em diversos níveis (6).

Dentre os mais recentes mecanismos descritos para regulação da expressão gênica estão os miRNAs (microRNAs), que são pequenos RNAs (Ácido Ribonucleico, do inglês *Ribonucleic Acid*) não codificantes que apresentam um importante papel no processo biológico por meio da regulação

da expressão gênica através de interações com mRNA (RNA Mensageiro, do inglês *messenger RNA*) celular (7,8). Estão envolvidos na regulação de uma variedade de processos fisiológicos e celulares, dentre eles a carcinogênese (9–11).

Há ainda outras classes de RNAs reguladores como os lncRNA (RNA Longo Não Codificante, do inglês *long noncoding RNAs*) com tamanho superior a 200nt (nucleotídeos) capazes de regular a expressão gênica por diversos mecanismos, dentre eles: interação com proteínas, cromatina e mRNA e disputa por sítio de ligação com miRNAs. Tais processos podem inibir ou superexpressar genes alvo (12).

Todas essas interações pós transcricionais dos genes terão reflexo direto nos níveis de proteínas expressos no sangue do paciente, sendo esse também um parâmetro biológico de avaliação do quadro do mesmo por meio de técnicas de proteômica (13).

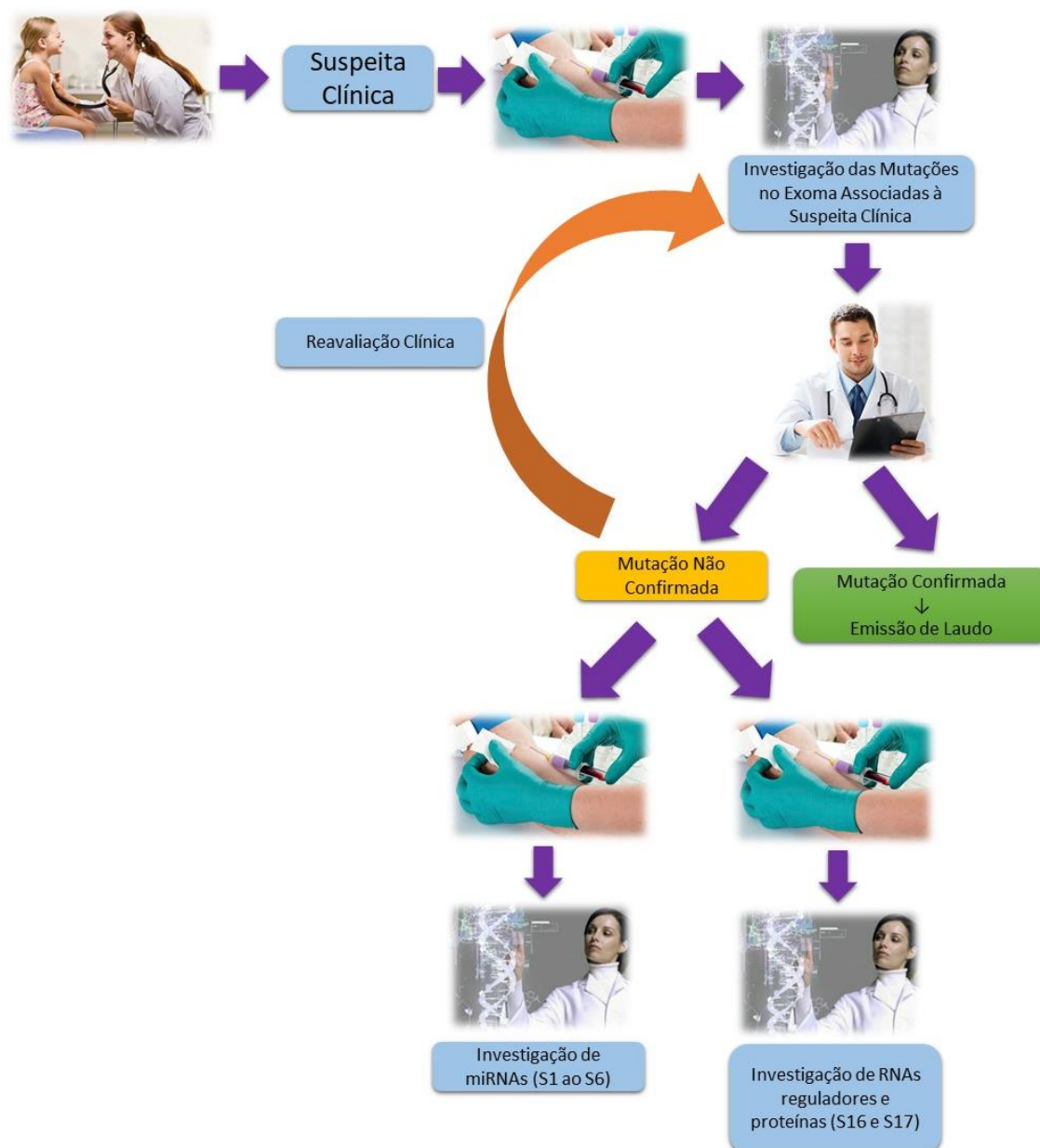
Sendo assim, a hipótese deste trabalho é que pacientes com RASopatia possam apresentar mutações nos genes que codificam miRNAs, alterando, conseqüentemente, a expressão dos genes alvo regulados por eles (14,15). Ou ainda, que apresentem alterações nos níveis de expressão de RNAs reguladores e/ou proteínas que justifiquem a grande variabilidade fenotípica entre os casos.

Tem sido descrito na literatura que cerca de 20-25% dos pacientes com características fenotípicas sugestivas de RASopatia (diagnóstico clínico) não apresentam mutações em nenhum dos genes causadores conhecidos (16), o que pode indicar que outras vias possam estar relacionadas, dada a complexidade da sinalização da via Ras/MAPK. Tais dados reforçam a



importância da análise molecular de indivíduos com suspeita clínica de RASopatia, para viabilizar o diagnóstico, o prognóstico e o entendimento de mecanismos moduladores de fenótipos para fins de aconselhamento genético e acompanhamento do paciente.

Figura 1 - Fluxograma de Avaliação dos Pacientes



Fluxograma de avaliação diagnóstica dos pacientes, apresentando desde a consulta médica, passando pela coleta de material biológico e a investigação laboratorial, até o retorno do médico ao paciente com o laudo diagnóstico.

## 2. COMENTÁRIOS INICIAIS:

O Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF/Fiocruz), unidade materno-infantil da Fiocruz, é centro de referência para as doenças genéticas do desenvolvimento, defeitos congênitos e síndromes genéticas. Com o auxílio do Centro de Genética Médica José Carlos Cabral de Almeida (CGM - Diretório de Pesquisa do CNPq [dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/5465462022316329](http://dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/5465462022316329)) (17), o IFF/Fiocruz habilitou-se recentemente como Centro de Referência para Atendimento Integral a Indivíduos com uma Doença Rara (Portaria nº 09/003.725/2014) constituindo-se em um centro de referência regional para diagnóstico etiológico e tratamento das doenças genéticas envolvendo déficit intelectual, doenças metabólicas e defeitos congênitos.

Os defeitos congênitos são a segunda causa de mortalidade infantil no Brasil, mais especificamente as malformações congênitas; e, quando não levam ao óbito, constituem-se em patologias altamente debilitantes com consequências e sequelas físicas e psicológicas que trazem impacto desfavorável para a vida do indivíduo afetado e sua família, além de serem um problema de saúde pública (18).

Neste contexto, o CGM juntamente com o Laboratório de Citogenética Clínica e o Laboratório de Medicina Genômica (LMG) têm a missão, junto ao Sistema Único de Saúde (SUS), de estabelecer protocolos de investigação assessorando a orientação clínica e o diagnóstico laboratorial dos indivíduos e

seus familiares com uma doença geneticamente determinada (18) que procuram atendimento no IFF/Fiocruz.

As doenças de base genética são altamente complexas e heterogêneas em suas características. Neste sentido, aprofundar o estudo sobre alterações em genes que codificam miRNAs, expressão de seus genes alvo, expressão de RNAs reguladores e níveis de proteínas, pode auxiliar tanto no diagnóstico quanto no prognóstico de pacientes com RASopatia, uma vez que cada síndrome apresenta um grupo de comorbidades associadas. Moléculas que bloqueiam a via de sinalização Ras/MAPK e os mecanismos de ação desta via já estão sendo estudados em modelos animais como forma de tratamento para os sinais clínicos associados a essa classe de doenças (19).

A investigação dos mecanismos de regulação da sinalização da via Ras/MAPK é de suma importância para a caracterização molecular das alterações de cada paciente, podendo proporcionar tratamento e acompanhamento individualizados e direcionados.

Do ponto de vista molecular, as RASopatias não possuem um perfil de miRNAs, RNAs reguladores e proteínas caracterizado na população brasileira, reforçando a importância deste estudo que, juntamente com outros projetos desenvolvidos no LMG, leva a uma melhor orientação ao clínico e à equipe multidisciplinar no acompanhamento desses pacientes.

Esta dissertação é um desdobramento do projeto de doutorado da aluna MSc Natana Chaves Rabelo que visa estudar mutações no exoma de pacientes diagnosticados com RASopatia, montando um painel de perfil desses pacientes atendidos pelo SUS.

O estudo da amplificação das sondas do exoma exibiu sequências de miRNAs com mutações, o que nos levou a indagar se essas variações não poderiam ser responsáveis pela grande variabilidade fenotípica do grupo de pacientes em estudo.

O desenho inicial deste projeto visava confirmar as mutações encontradas no exoma e quantificar a expressão desses miRNAs por expressão gênica, buscando estabelecer uma relação entre as mutações, os níveis de expressão e as variantes de fenótipos dos pacientes.

### 3. OBJETIVO GERAL:

Descrever as alterações em genes que codificam miRNAs, bem como a expressão diferencial de RNAs reguladores e o perfil proteico de pacientes com RASopatia.

#### 3.1. Objetivos Específicos:

- Avaliar as mutações em genes que codificam miRNAs encontradas previamente pelo sequenciamento do exoma, selecionando as variantes de acordo com os dados de funcionalidade do *miRTarBase*;
- Delinear estratégias para estudos *in silico* da expressão gênica do *HRAS* em caso suspeito de síndrome de Costello;
- Realizar estudo comparativo da expressão de RNAs reguladores em caso de gêmeas com suspeita clínica de síndrome de Noonan e fenótipos discordantes;
- Realizar análise de proteoma comparativo em gêmeas com fenótipos discordantes e suspeita clínica de síndrome de Noonan.

# **CAPÍTULO 1**

## **Estudo de miRNAs**

## **CAPÍTULO 1 – Estudo de miRNAs**

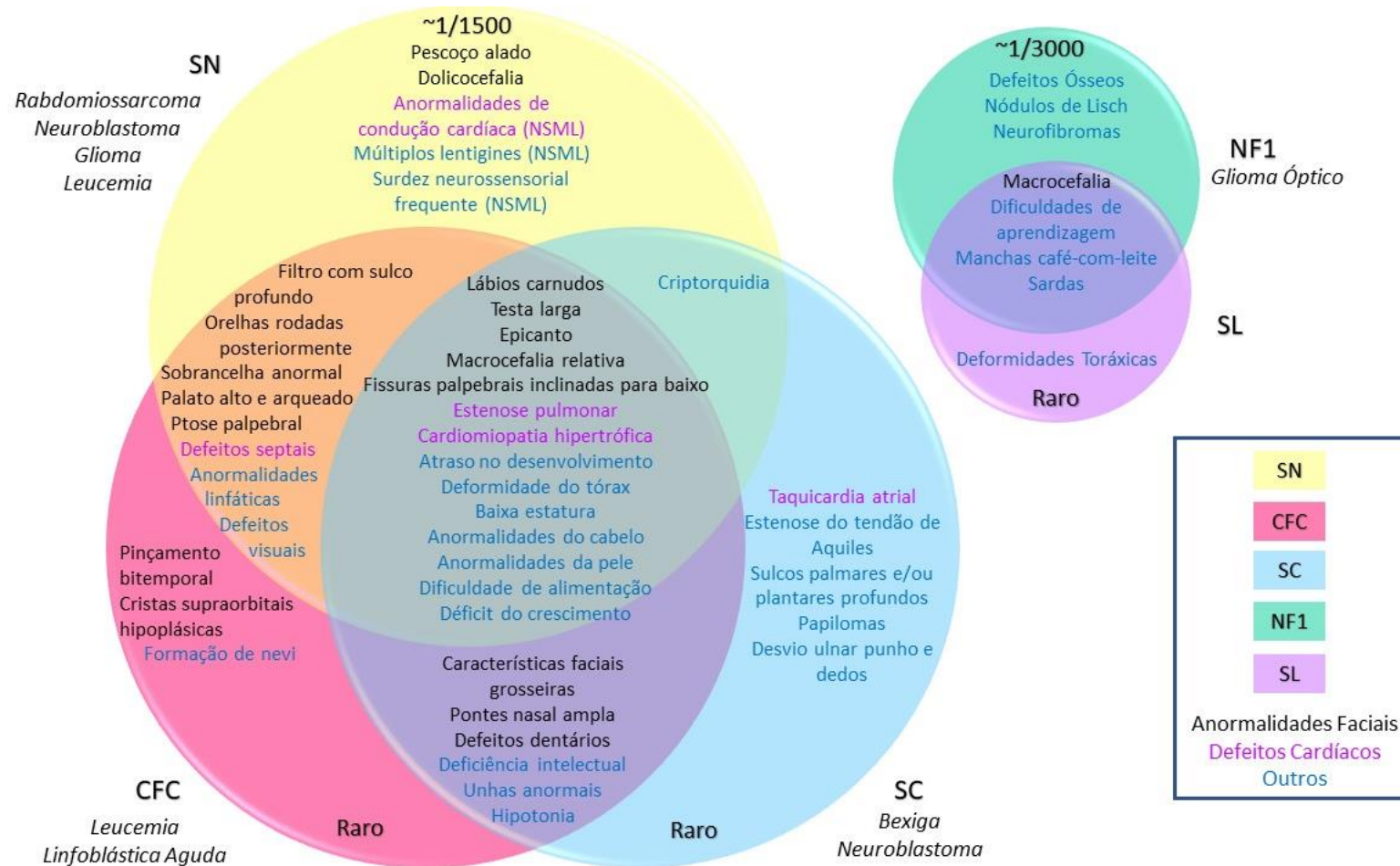
### **4. REFERENCIAL TEÓRICO:**

#### **4.1.Aspectos Gerais das RASopatias:**

As RASopatias são uma classe de distúrbios do desenvolvimento causados por mutações germinativas em genes que codificam componentes ou reguladores da via Ras/MAPK e afetam, aproximadamente, 1 em cada 1000-2000 indivíduos (como exemplo da SN) (1).

Todas as RASopatias originam-se de alterações na regulação de uma via em comum, o que faz com que os diferentes fenótipos apresentem características sobrepostas (Figura 2), dentre elas dismorfia craniofacial, malformações cardíacas, anormalidades cutâneas, músculo-esqueléticas e oculares, comprometimento neurocognitivo, hipotonia e risco aumentado para desenvolvimento de câncer (1).

Figura 2 - Sobreposição Clínica nas RASopatias e Tumores com Maior Incidência



Esquema ilustrativo com as sobreposições das características clínicas das RASopatias. Em amarelo temos a Síndrome de Noonan; em rosa temos a Síndrome Cardiofaciocutânea; em azul claro temos a Síndrome de Costello; em verde água temos a Neurofibromatose do Tipo 1; em lilás temos a Síndrome de Legius. Os círculos correspondentes às características de cada síndrome apresentam as frequências populacionais destas. Abaixo do nome de cada síndrome temos os tipos de tumores mais frequentes em cada uma delas. Traduzido e adaptado de Jindal *et al.*, 2015 (19).

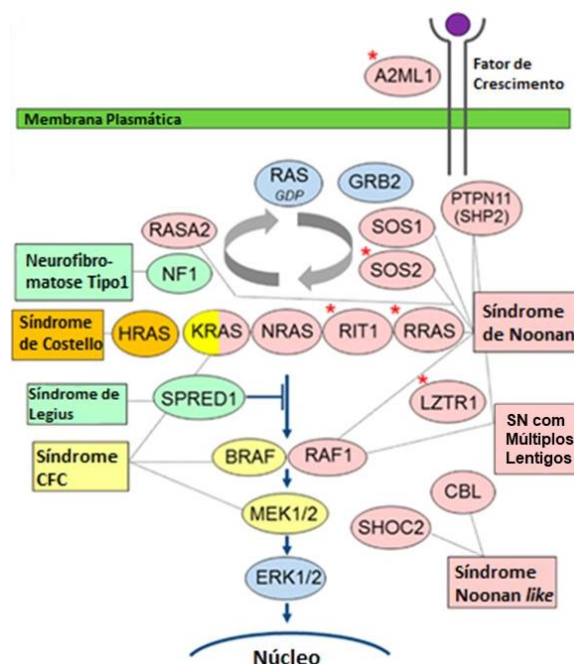


Atualmente, o diagnóstico baseia-se na avaliação clínica dos pacientes. A partir da suspeita clínica é realizada a avaliação molecular, onde mutações no DNA do paciente são investigadas por técnicas de sequenciamento. A confirmação de mutação que corresponda à clínica conclui o diagnóstico do paciente. Caso não sejam encontradas mutações em um dado grupo de genes, o paciente é reavaliado clinicamente e um novo grupo de genes é investigado. Sendo encontradas mutações que diverjam da suspeita clínica, prevalece o diagnóstico molecular, com subsequente reclassificação diagnóstica. Ainda assim, cerca de 20-25% dos casos permanece sem descrição de mutações associadas devido à alta complexidade da via de sinalização envolvida (16).

#### **4.2.Aspectos Clínicos das RASopatias:**

São seis as principais síndromes que compõem esse grupo. As características clínicas variam de acordo com os genes mutados/associados a cada uma delas e as funções que exercem dentro da via Ras/MAPK (1,16). A Figura 3 apresenta a cascata de sinalização proteica da via Ras/MAPK e a associação de cada proteína com a síndrome desenvolvida (20). Um mesmo gene pode ser associado a diferentes síndromes através de mutações em regiões distintas de sua sequência (4).

Figura 3 - Via Ras/MAPK e seus Genes Associados às RASopatias



Representação das associações entre genes e síndromes. Em rosa temos os genes associados à Síndrome de Noonan; em amarelo temos os genes associados à Síndrome Cardiofaciocutânea; em laranja temos os genes associados à Síndrome de Costello; em verde temos os genes associados à Neurofibromatose Tipo 1 e Síndrome de Legius; em azul estão os genes iniciadores ou efetores da via Ras/MAPK mas que ainda não foram descritos como associados à nenhuma das síndromes. \* genes recentemente descobertos. Traduzido e adaptado de Aoki *et al.*, 2016 (20).

#### 4.2.1. Síndrome de Noonan (SN, OMIM 163950):

Distúrbio autossômico dominante com incidência estimada em cerca de 1 a cada 1000-2500 nascidos vivos (5), tendo por características mais comuns baixa estatura, dismorfismo facial e defeitos cardíacos congênitos, presente em cerca de 90% dos pacientes (1,16).

Com mutações descritas em *PTPN11*, *SOS1*, *SOS2*, *RAF1*, *KRAS*, *NRAS*, *SHOC2*, *CBL* e, mais recentemente, *A2ML1* (20), as características craniofaciais mais descritas nos pacientes com SN são testa larga, hipertelorismo, fissuras palpebrais descendentes, palato alto e arqueado e orelhas baixas e rotacionadas posteriormente. Dentre os demais defeitos pode-

se citar estenose pulmonar, cardiomiopatia hipertrófica, defeitos esqueléticos (deformidades torácicas e espinhais), pescoço alado, retardo mental, criptorquidia e diátese hemorrágica (5).

Figura 4 - Paciente com Síndrome de Noonan



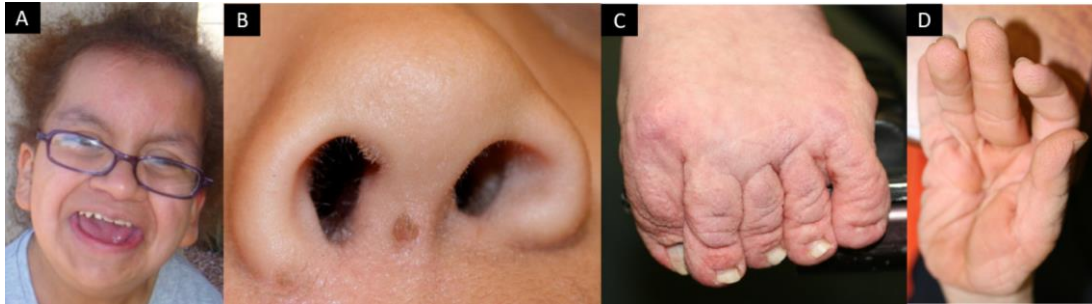
Menina com SN com mutação identificada em *PTPN11* (1).

#### **4.2.2. Síndrome de Costello (SC, OMIM 218040):**

Síndrome congênita rara associada a mutações no gene *HRAS* (20), com sobreposições fenotípicas com CFC e SN (1,16).

Os pacientes apresentam face grosseira, baixa estatura, mãos características, dificuldade alimentar severa, déficit de crescimento e anomalias cardíacas. Uma característica comum durante a infância são as verrugas faciais, particularmente as nasolabiais (5).

Figura 5 - Características Clínicas da Síndrome de Costello



Representação das características físicas da SC: (A) cabelos esparsos (21); (B) papilomas (22); redundância (excesso) de pele em (C) pés e (D) mãos (22).

#### 4.2.3. Síndrome de LEOPARD (LEOPARD, OMIM 151100):

Caracterizada por mutações em *PTPN11*, *BRAF* e *RAF1* (20), o próprio nome da síndrome é um acrônimo para suas manifestações clínicas: lentigos múltiplos (do inglês *multiple Lentigines*), anormalidades da condução eletrocardiográfica (do inglês *Electrocardiographic conduction abnormalities*), hipertelorismo ocular (do inglês *Ocular hypertelorism*), estenose pulmonar (do inglês *Pulmonic stenosis*), genitália anormal (do inglês *Abnormal genitalia*), retardo do crescimento (do inglês *Retardation of growth*) e surdez neurossensorial (do inglês *sensorineural Deafness*) (5).

Figura 6 - Paciente com Síndrome de LEOPARD



Paciente com múltiplos lentigos (23).

#### 4.2.4. Síndrome Cardiofaciocutânea (CFC, OMIM 115150):

Seus pacientes possuem sobreposições fenotípicas com SN e SC, apresentando face característica, defeitos cardíacos (como estenose pulmonar, comunicação interatrial e cardiomiopatia hipertrófica) e retardo mental. Anormalidades ectodérmicas, como cabelos esparsos e friáveis e lesões cutâneas hiperkeratóticas também estão presentes, bem como testa alta com constrição bitemporal, cristas supraorbitais hipoplásicas, fissuras palpebrais descendentes, ponte nasal deprimida e orelhas posteriormente anguladas com hélices proeminentes (1,5,16). As mutações associadas a esse quadro clínico foram descritas nos genes *BRAF*, *MEK1*, *MEK2* e *KRAS* (20).

Figura 7 - Paciente com Síndrome Cardiofaciocutânea



Paciente com CFC e mutação identificada em *MEK2* (1).

#### 4.2.5. Neurofibromatose Tipo 1 (NF1, OMIM 162200):

Associada, até o momento, exclusivamente a alterações no gene *NF1* (20), a NF1 tem incidência de 1 em cada 2500-3000 nascidos vivos e os pacientes afetados apresentam manchas café com leite, nódulos de Lisch nos

olhos e tumores fibromatosos na pele (1,16). O diagnóstico diferencial se faz importante pois esses indivíduos possuem maior susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores benignos e malignos (5).

Figura 8 - Paciente com Neurofibromatose Tipo 1



Paciente com manchas café-com-leite e *pectus excavatum* (24).

#### 4.2.6. Síndrome de Legius (SL, OMIM 611431):

Este distúrbio autossômico dominante é caracterizado por mutações no gene *SPRED1* (20). Fenotipicamente, seus pacientes apresentam semelhanças com a NF1, tais como as múltiplas manchas café-com-leite mas sem a predisposição a formação de tumores. Outras características desta síndrome são: hipertelorismo ou macrocefalia, lipomas e dificuldades leves de aprendizado ou problemas de atenção (1,5,16).

Figura 9 - Paciente com Síndrome de Legius



Característica de sobreposição entre a SL e a NF1: manchas café-com-leite (25).

### 4.3.Aspectos Moleculares das RASopatias:

#### 4.3.1.Via Ras/MAPK:

A via Ras/MAPK é uma das vias de transdução de sinal mais bem estudada e é crítica na regulação do ciclo celular, crescimento celular, diferenciação e senescência, processos essenciais para o desenvolvimento normal de mamíferos (1). Esta via é composta por diversas proteínas que sofrem fosforilações quando acionadas por fatores de crescimento extracelulares (1).

As proteínas Ras são pequenas GTPases, codificadas por uma classe de genes que atuam como sinalizadores centrais (Ras/MAPK) para múltiplas vias de sinalização intracelulares (26). Estudos funcionais com mutações ativadoras, que levam a desregulação desta via, mostraram que este é um dos mecanismos patogênicos comum às RASopatias (1).

A ativação de Ras inicia-se com a ligação de fatores de crescimento aos receptores do tipo tirosina cinase (RTK) ou aos receptores acoplados à proteína G, que ligados as GTP irão ativar as MAPKs até os efetores terminais da via, ERK1 e/ou ERK2. Esses, por sua vez, regulam um grande número de moléculas,

dentre elas fatores de transcrição, proteínas da membrana e proteínas cinases que controlam as funções celulares essenciais (27).

Dada a alta complexidade da via, as alterações podem ocorrer não somente ao nível de mutação nos genes diretamente envolvidos nela, mas também ao nível de regulação da expressão destes genes. Dentre esses mecanismos podemos citar a metilação, o processamento alternativo do mRNA (*splicing* alternativo) e a regulação por RNAs não codificantes (dentre eles os miRNAs) (6).

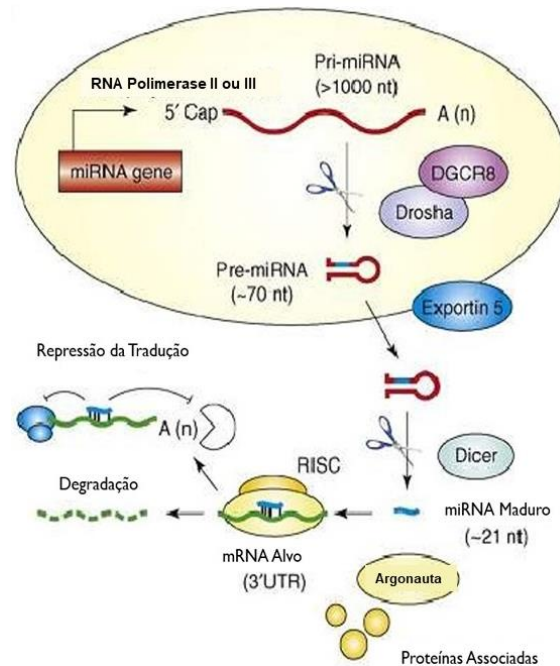
#### **4.3.2. MicroRNAs (miRNAs):**

Os miRNAs são pequenas moléculas endógenas de ácido ribonucleico (RNA), não codificantes, com cerca de 22 nucleotídeos (nt), que apresentam um importante papel no processo biológico por meio da regulação da expressão gênica através de interações com mRNA celular. Exercem sua função principal através de regulação da expressão gênica tanto transcricional como pós-transcricional (28).

Estão envolvidos na regulação de uma variedade de processos fisiológicos e celulares por meio de dois mecanismos distintos: degradação do mRNA e interrupção do processo de tradução (29–31) (Figura 10). Segundo o banco de dados *miRBase* (32,33), já foram descritos 2588 miRNAs que são transcritos pelo genoma humano. Estes podem interferir na regulação de diversos mRNAs (9,30).



Figura 10 - Biogênese e Mecanismos de Regulação dos miRNAs



Os miRNAs são transcritos no núcleo das células, onde são clivados e formam uma estrutura de grampo (pré-miRNA). A Exportina leva essas moléculas para o citoplasma onde a DICER irá clivá-las em sua forma de miRNA maduro. Esta estrutura ativa irá se ligar ao RNAm de seu gene alvo, recrutando uma maquinaria proteica que poderá degradá-lo ou reprimir sua tradução. Traduzido e adaptado de Hébert *et al.*, 2009 (34).

Os miRNAs já foram descritos como biomarcadores do desenvolvimento celular em diferentes tecidos e fluidos corporais (30,35–38). No tecido cardíaco normal, por exemplo, diferentes miRNAs têm sido relacionados à proliferação de cardiomiócitos, diferenciação de progenitores de células cardíacas, reprogramação desses tipos de células, entre outras funções (39). Em processos fisiopatológicos, como nas síndromes de Epidermólise Bolhosa (OMIM 226600) (5), Beckwith-Wiedeman (OMIM 130650) (5,40) e em alguns tipos de câncer, tais como leucemia mieloide, leucemia linfoblástica aguda e linfomas em geral (41,42), carcinoma hepatocelular (43), câncer coloretal (44,45), câncer de próstata (46), e mieloma múltiplo (47), foram descritas mutações ou alterações na expressão de miRNAs (48).

Nas RASopatias, mutações em miRNAs, já foram descritas em síndromes tais como SC e NF1 (14,15,49). Os pacientes com a SC possuem mutações no gene *HRAS*, que produz as proteínas P19 e P21, reguladores do ciclo celular. Garcia-Cruz *et al.* (14) reportaram alterações na expressão dos miRNAs miR-341, miR-206, miR330, mir138 e miR-99b em células contendo mutações no referido gene. Já na NF1, doença de característica proliferativa, alterações da expressão de uma série de miRNAs associados aos genes da via Ras/MAPK, aos processos carcinogênicos (transição epitélio-mesenquimal e proliferação celular) e ao gene supressor tumoral *PTEN*, foram reportadas em neurofibromas dérmicos, plexiformes e malignos (49). Entretanto, alterações de miRNAs em outras RASopatias ainda não foram descritas.

#### **4.3.3. Identificação das Mutações – Sequenciamento de DNA:**

São diversos os genes envolvidos nas RASopatias (1,16), com tamanhos variados, o que torna dispendiosa a investigação molecular (Tabela 1). O método padrão-ouro para este diagnóstico é o sequenciamento por *Sanger* (50). Porém, esse método possui uma restrição quanto ao tamanho dos fragmentos a serem amplificados e sequenciados, que não pode ultrapassar 1000 pares de bases (pb), o que representa uma limitação para doenças multigênicas.

Desta forma, as técnicas de *NGS* (Sequenciamento de Nova Geração, do inglês *Next-Generation Sequencing*) surgiram para otimizar a identificação de alterações no DNA de pacientes com doenças complexas, uma vez que possibilitam até mesmo o sequenciamento do genoma inteiro de um paciente (51,52).

O sequenciamento do exoma consiste na obtenção da sequência de nucleotídeos das regiões codificantes do DNA (éxons).

Tabela 1 - Descrição dos genes envolvidos nas RASopatias

| Síndrome       | Genes               | Prevalência (%) | Posição Cromossômica | Tamanho do Gene (pb) | Nº de Éxons |
|----------------|---------------------|-----------------|----------------------|----------------------|-------------|
| <b>SN</b>      | <i>PTPN11</i>       | 50%             | 12q24                | 98.182               | 16          |
|                | <i>SOS1</i>         | 10-13%          | 2p22                 | 145.915              | 23          |
|                | <i>KRAS</i>         | <5%             | 12p12                | 52.675               | 06          |
|                | <i>RIT1</i>         | 4-9%            | 1q21                 | 20.595               | 06          |
|                | <i>CRAF/RAF1</i>    | 3-17%           | 3p25                 | 87.571               | 17          |
|                | <i>BRAF</i>         | <2%             | 7q34                 | 212.438              | 18          |
|                | <i>NRAS</i>         | <1%             | 1p13                 | 19.438               | 07          |
|                | <i>SHOC2</i>        | <1%             | 10q25.2              | 101.125              | 09          |
|                | <i>CBL</i>          | <1%             | 11q23.3              | 108.870              | 16          |
|                | <i>LZTR1*</i>       | <1%             | 22q11.21             | 23.769               | 21          |
|                | <i>RASA2*</i>       | <1%             | 3q22-q23             | 135.317              | 25          |
|                | <i>MAP2K1/MEK1*</i> | <1%             | 5q22.1-q22.33        | 111.672              | 11          |
|                | <i>A2ML1*</i>       | <1%             | 12p13.31             | 61.312               | 36          |
|                | <i>RRAS*</i>        | <1%             | 19q13.33             | 11.852               | 6           |
| <i>SOS2*</i>   | <1%                 | 14q21           | 114.751              | 26                   |             |
| <b>SC</b>      | <i>HRAS</i>         | 90%             | 11p15.5              | 10.309               | 7           |
| <b>LEOPARD</b> | <i>PTPN11</i>       | 90%             | 12q24                | 98.182               | 16          |
|                | <i>CRAF/RAF1</i>    | 5%              | 3p25                 | 87.571               | 17          |
| <b>CFC</b>     | <i>BRAF</i>         | 5%              | 7q34                 | 212.438              | 18          |
|                | <i>BRAF</i>         | 75%             | 7q34                 | 212.438              | 18          |
|                | <i>MAP2K1/MEK1</i>  | 12%             | 5q22.1-q22.33        | 111.672              | 11          |
|                | <i>MAP2K2/MEK2</i>  | 12%             | 19p13.3              | 40.808               | 11          |
|                | <i>KRAS</i>         | <1%             | 12p12                | 52.675               | 06          |
| <b>NF1</b>     | <i>NF1</i>          | 100%            | 17q11.2              | 289.701              | 58          |
| <b>SL</b>      | <i>SPRED1</i>       | 100%            | 15q13.2              | 107.324              | 7           |

\* Indica que tais genes foram recentemente descritos e ainda estão em fase de validação para que sejam incluídos na lista de genes associados à doença. (Fonte: <http://www.omim.org> (5)).

#### 4.3.4. Avaliação Funcional – Alvos Validados dos miRNAs:

Os miRNAs atuam reduzindo a expressão de seus alvos pela interação molecular com o mRNA (28–30,38,48). Estudos funcionais em nível celular e de predição molecular por bioinformática, realizados desde a descoberta dos miRNAs, foram capazes de gerar dados para a formação de bancos com predição de alvos.

O banco de dados selecionado para este estudo (*miRTarBase* (53–56)) sobressai-se, quando comparado aos demais, por compilar resultados de bancos de predição *in silico*, bancos de associação com patologias e artigos indexados. A partir dos resultados apresentados por essa convergência de dados, são determinados os possíveis alvos regulados por cada miRNA e a força dessa predição, de acordo com a técnica usada para sugerí-la.

A partir da identificação dos miRNAs mutados, são pesquisados os seus alvos e avaliados quais podem estar relacionados com a via de interesse. A expressão dos alvos pode ser quantificada através de *RT-qPCR* (57–60).

## **5. METODOLOGIA:**

### **5.1. Tipo e Local do Estudo:**

O estudo seguiu o modelo observacional, transversal e descritivo. O presente capítulo foi realizado no LMG do IFF/Fiocruz e no LNCC (Laboratório Nacional de Computação Científica – Petrópolis/RJ).

Os pacientes foram recrutados e acompanhados no ambulatório do CGM - IFF/Fiocruz, supervisionado pelo Dr Juan Clinton Llerena Jr.

### **5.2. Comitê de Ética em Pesquisa:**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa CEP/IFF (CAAE: 46884615.3.0000.5269; Parecer Consolidado nº 2.071.943) (Anexo I).

### **5.3. Amostra e Critérios de Inclusão e Exclusão:**

A amostra se constituiu de pacientes diagnosticados clinicamente com RASopatia acompanhados pelo CMG - IFF/Fiocruz com idade entre 0 e 19 anos e resultados do exoma com mutações em miRNAs.

### **5.4. Recrutamento dos Pacientes e Obtenção das Amostras:**

Durante a consulta no Ambulatório de Genética Médica do IFF/Fiocruz, os médicos avaliaram os pacientes. Quando confirmado o diagnóstico clínico, os pacientes foram convidados a participar do projeto através da aplicação dos termos de consentimento (Apêndice I), assentimento respectivo para sua idade

(Apêndices II e III) e autorização de uso de imagem (Anexo II). Durante a consulta foram fornecidas todas as explicações necessárias para que o paciente e sua família entendessem a pesquisa, seus objetivos e vantagens.

Tendo o paciente concordado em participar, e após a assinatura dos termos em três vias (uma do paciente, uma da equipe de pesquisa e outra anexada ao prontuário médico), o mesmo foi encaminhado para o setor de coleta do IFF/Fiocruz onde foi colhido cerca de 5mL de sangue venoso periférico para obtenção das amostras de DNA e RNA.

### **5.5. Seleção dos miRNAs e Predição *in silico* dos Alvos:**

Este projeto avaliou parte dos resultados obtidos no piloto do sequenciamento do exoma de 06 pacientes com diagnóstico clínico de RASopatia, projeto desenvolvido pela aluna de doutorado MSc Natana Chaves Rabelo em colaboração com a equipe de bioinformática do LNCC, que forneceu dados sobre a sequência de uma lista de miRNAs.

Neste projeto piloto, amostras de DNA isoladas do sangue periférico destes 06 pacientes tiveram seus éxons (parte codificante do DNA) sequenciados em uma plataforma de NGS e os dados obtidos foram avaliados em plataformas de bioinformática para estudo de mutações.

As mutações nos genes que codificam miRNAs foram identificadas pelo grupo do LNCC (resultados obtidos a partir do projeto principal), a partir da análise do exoma. Os bancos de dados dbSNP (build 151) (61) e dbNSFP versão 3.5 (62) foram utilizados para a predição do impacto funcional dessas mutações. Os resultados também foram filtrados a partir das associações conhecidas a

doenças presentes em pacientes com RASopatia, como problemas cardio-cerebrovasculares e câncer, enfocando apenas em miRNAs com variantes na sequência madura, ou seja, a sequência que reconhece o gene alvo. Esta seleção foi realizada com base em um banco de dados públicos (*miRTarBase* – <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/> (53–56)) e de dados já reportados na literatura.

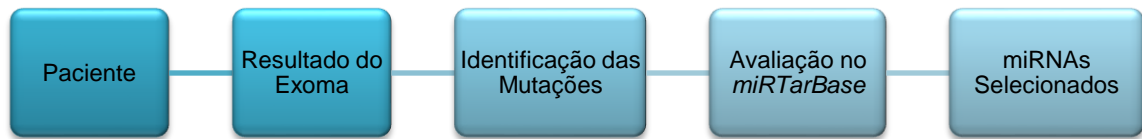
A plataforma *miRTarBase* (53–56) reúne os dados de bancos de predição *in silico* e artigos publicados em revistas indexadas que realizaram validação funcional experimental da relação miRNA *versus* alvos. Os miRNAs selecionados foram analisados quanto a relação de seus alvos com a via Ras/MAPK, alterada nas RASopatias.

### **5.6. Recursos Financeiros:**

Este trabalho é parte integrante do Projeto “Estudo Molecular das Doenças Genéticas Crônicas: Defeitos Congênitos, Doença do Desenvolvimento e Câncer Infantil, a partir da Via das RASopatias”, aprovado no Edital 15/2015 - “Apoio às Instituições de Ensino Sediadas no Rio de Janeiro” através da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), sob a matrícula 2000.08477.4.

Esta dissertação foi realizada com investimentos da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Figura 11 - Fluxograma Metodológico do Capítulo 1



Seguimento das análises dos pacientes para composição dos resultados do capítulo 1, desde a sua entrada (pelo projeto de doutorado da MSc Natana Chaves Rabelo) até todas as avaliações *in silico* realizadas.



## 6. RESULTADOS:

### 6.1. Pacientes Recrutados:

#### 6.1.1. Paciente S1:

Paciente do sexo masculino, que se apresentou ao ambulatório de genética aos 3 meses de idade com laringomalácia, retardo de crescimento intra-uterino, nevos e redundância de pele nas palmas das mãos e solas dos pés. Seu fenótipo era consistente com a SN; entretanto, o mosaicismo da trissomia 8 também foi considerado devido a sulcos palmares e plantares profundos com pele frouxa, lábios carnudos e dismorfia facial grosseira. Foi observado cariótipo normal 46, XY em cultura de fibroblastos (dados não mostrados). O paciente apresentava atraso motor e adquiriu marcha independente apenas aos 3,8 anos. Com atraso na fala, vocabulário e capacidade de formação de frases muito reduzidos, refletindo claramente suas dificuldades de aprendizagem. O ecocardiograma revelou estenose pulmonar leve, não sendo necessária medicação ou cirurgia. Desenvolveu epilepsia quando tinha 12 anos de idade, com uma crise generalizada, o que foi inicialmente controlado com hidantoína. O paciente apresentava hipertrofia gengival devido ao uso de anticonvulsivantes. Em uma avaliação clínica recente, aos 18 anos de idade, ele apresentou-se como um jovem muito tímido, com deficiência intelectual, baixa estatura (abaixo do segundo percentil), cabelos esparsos e crespos, dismorfia facial caracterizada por face grosseira, fissuras palpebrais com inclinação “anti-Down”, ptose palpebral bilateral, orelhas com implantação baixa, lábios carnudos, cúbito valgo, sulcos profundos das mãos e pés e hiperlaxidez dos ligamentos. Nenhum

papiloma ou quaisquer sinais clínicos sugestivos de SC estavam presentes, e nenhuma surdez foi identificada. A suspeita clínica inicial foi de SN.

O paciente foi reclassificado como CFC pois em seu exoma foi detectada uma variante descrita como patogênica no gene *BRAF*.

Figura 12 - Paciente S1



Paciente S1 e suas características clínicas: à esquerda, cúbito valgo; à direita (de cima para baixo) face grosseira, implantação baixa das orelhas e sulcos profundos nas mãos.

### 6.1.2. Paciente S2:

Paciente do sexo masculino que se apresentou ao ambulatório de genética aos 1,5 anos de idade com tórax anormal, hipertelorismo ocular e atraso motor. Nascido a termo (38 semanas de gestação). Foram diagnosticadas estenose pulmonar e comunicação interventricular. O paciente conseguia andar com auxílio e tinha medidas antropométricas normais para sua idade. Estavam presentes ptose palpebral direita com fendas palpebrais oblíquas e epicanto

bilateral, bem como pescoço curto, *pectus excavatum* importante, proeminentes coxins digitais, criptorquidia bilateral e múltiplos lentigos pelo corpo. Uma reavaliação clínica do paciente aos 12,7 anos de idade revelou medidas antropométricas normais, múltiplos lentigos de pele, cúbito valgo, pterígio *coli* e proeminentes coxins digitais; adicionalmente, *pectus excavatum* com mamilos espaçados entre si e hiper mobilidade articular. A ultrassonografia abdominal revelou um rim em ferradura. Também foi observado atraso intelectual. A suspeita clínica inicial foi de SN.

Na análise do exoma encontrou-se a alteração no gene *PTPN11*, já descrita para a síndrome de LEOPARD, justificando sua reclassificação.

Figura 13 - Paciente S2



Paciente S2 e suas características clínicas: à esquerda, cúbito valgo e *pectus excavatum*; à direita, os múltiplos lentigos pelo corpo.

### 6.1.3. Paciente S3:

Paciente do sexo feminino que apresentou uma translucência nugal de 13,5 mm durante o pré-natal. Foi detectado um cariótipo normal 46, XX em cultura de células do âmnio (dados não mostrados). A paciente nasceu com 36 semanas de gestação com um índice de *Apgar* de 3/7. Com 1 mês de idade foi detectado um defeito cardíaco complexo e caracterizado como uma válvula aórtica estenótica muito espessa, válvula mitral anormal com regurgitação e uma válvula pulmonar incompetente, estenótica e insuficiente. Através de ressonância magnética cerebral foi observado um corpo caloso fino com *vermis* cerebelar hipoplásico e uma anomalia de *Dandy-Walker*. O exame clínico aos 6 meses de idade revelou uma face grosseira, choro rouco, hipertelorismo ocular, orelhas baixas, palato muito estreito e alto, importante redundância da pele nugal, pterígio *coli* e mamilos espaçados entre si. Também foram observados coxins digitais proeminentes com sulcos profundos e pele frouxa nas regiões palmar e plantar. Aos 10 meses de idade, a paciente era muito pequena (abaixo do percentil 3) e apresentava hipotonia, atraso motor e de desenvolvimento, choro rouco e pregas epicânticas proeminentes. Uma ultrassonografia abdominal revelou um rim direito vicariante e pélvico, enquanto um ecocardiograma não mostrou melhora dos defeitos cardíacos previamente detectados. A paciente também apresentava a doença de *von Willebrand*, transmitida por sua mãe e avó. A suspeita clínica inicial foi de SC.

Foi detectada uma variante descrita como patogênica para a SN no gene *PTPN11*. Coincidentemente, a paciente também apresentava uma variante no

gene *A2ML1* herdada do pai (não afetado). A paciente foi reclassificada como SN.

Figura 14 - Paciente S3



Paciente S3 e suas características clínicas: à esquerda, a face grosseira; à direita (acima), a redundância de pele nugal; à esquerda (abaixo) os sulcos palmares e plantares profundos.

#### 6.1.4. Paciente S4:

Paciente do sexo masculino que se apresentou durante o pré-natal devido a uma translucência nugal anormal (2,9 mm) e rins assimétricos. Um cariótipo normal 46, XY foi observado em cultura de células do âmnio (dados não mostrados). O paciente nasceu com 38 semanas de gestação, com edema das mãos e pés e foi diagnosticada hidronefrose esquerda. Seu primeiro exame clínico aos 4 meses de idade mostrou características faciais grosseiras, com macrocefalia (P50 P75) em comparação com seus pais (<P50) e uma estatura normal. A redundância de pele estava presente na área da nuca, com proptose

ocular bilateral e esclera azul. Seu tórax era largo e a diástase dos músculos retos abdominais era evidente. O paciente apresenta uma grande mancha café-com-leite na região abdominal direita, incluindo um ponto hiperpigmentado menor. Uma forma de unha muito peculiar semelhante a “garras de falcão” foi observada, particularmente nos pés. Era evidente uma região plantar hiperqueratótica, assim como sulcos profundos nas mãos. A área sacrococcígea apresentava uma forma pronunciada em V, com um seio cego. Uma criptorquidia direita também estava presente. Em reavaliação clínica aos 15 meses de idade foi revelada uma disfunção motora importante, em que o paciente só conseguia ficar em pé com apoio e não apresentava coordenação motora fina. A ressonância magnética sacral revelou um lipoma do *filum terminale* em L2 - L5; e nenhuma anormalidade no ecocardiograma foi detectada. Aos 2 anos de idade, o paciente conseguia andar sem ajuda, porém, não falava. Sua aparência era a de um menino macrossômico, com queixo pontudo, mãos e pés grandes, hiperqueratose plantar e unhas de formato anormal. Apresentava grave atraso no desenvolvimento. A suspeita clínica inicial foi de SC.

O exoma não apresentou nenhuma mutação para os genes da via Ras/MAPK. Está mantida a suspeita inicial de SC até que novos resultados moleculares possam ser analisados.

*Figura 15 - Paciente S4*

Paciente S4 e suas características clínicas: acima, a mancha café-com-leite; abaixo, as unhas com formato anormal.

#### **6.1.5. Paciente S5:**

Paciente do sexo masculino, atendido em consulta genética aos 07 meses de idade devido a presença de manchas “café-com-leite” generalizadas. Associado a este quadro, também apresentou lesão tipo “plexiforme em sola” no pé direito. Perímetro cefálico dentro do P50 e estatura em P25, apresentando as mesmas medidas aos 2,3 anos. Nesta idade, foi observado déficit global do desenvolvimento: balbuciava palavras; apresentava dificuldade no andar, caindo com frequência e, por vezes, andava nas pontas dos pés. Associado a este quadro, também verificou-se um comportamento errático, sem interação e não atendimento aos chamados orais. A tomografia cerebral, ultrassom abdominal generalizado e raio-x do esqueleto se apresentaram normais. A suspeita clínica inicial foi de NF1.

Não foram encontradas mutações em genes da via Ras/MAPK na análise do exoma. Não foram encontradas mutações pontuais no gene *NF1*, como era de se esperar para um caso de NF1. A suspeita inicial está mantida e a amostra de DNA deste paciente foi enviada para avaliação de deleção/duplicação através da técnica de MLPA (do inglês *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), que ainda está processamento.

Figura 16 - Paciente S5



Paciente S5 e suas características clínicas: ao centro, as manchas café-com-leite; à direita, a lesão plexiforme no pé direito.

#### 6.1.6. Paciente S6:

Paciente do sexo masculino atendido inicialmente pela pneumologia aos 2 anos de idade devido a pneumonias de repetição e laringomalácea (estridor e dispneia), diagnosticado por videolaringoscopia. Após dois meses, realizou tomografia computadorizada da região cervical, sendo detectada massa hipodensa (semelhante às partes moles), infiltrante, pouco impregnada pelo contraste, desde a região infra-glótica à direita levando a compressão da epiglote e da laringe) que se estendia até o tórax, onde envolvia a traquéia, que estava



severamente comprimida. A massa comprimiu a carótida e a veia jugular à direita. Ao ser encaminhado a um geneticista clínico, foram relatadas a presença de manchas café-com-leite disseminadas pelo corpo em diferentes tamanhos, fendas palpebrais de obliquidade inferior, pescoço curto, orelhas rodadas posteriormente e hélices muito dobradas. O ecocardiograma se apresentou normal. A suspeita clínica inicial foi de NF1 com neurofibroma plexiforme.

Os resultados do exoma apresentaram uma mutação no éxons 18 do gene *A2ML1* herdada da mãe. Este também é um caso de NF1 sem mutação no gene de mesmo nome. O DNA do paciente foi enviado para análise de deleção/duplicação pela técnica de MLPA que está em processamento. O paciente veio a óbito antes do fim das análises e sua classificação clínica foi mantida.

Figura 17 - Paciente S6



Paciente S6 e suas características clínicas: à esquerda, as manchas café-com-leite; à direita, as imagens do neurofibroma plexiforme.

## **6.2. Seleção dos miRNAs Resultantes do Exoma e Predição *in silico* dos Alvos:**

As sequências de miRNAs detectadas pelo exoma foram analisadas utilizando como base o genoma de referência para a detecção de mutações. Foi realizada uma primeira filtragem levando em consideração os miRNAs que regulavam genes da via Ras/MAPK. Na Tabela 2 temos o resultado dessa primeira filtragem.

Dos miRNAs selecionados na primeira filtragem, apenas 1 estava predito como regulador de um gene da via Ras/MAPK, os demais não possuíam dados experimentais que comprovassem sua influência direta na via. Desta forma, optou-se por uma nova filtragem dos resultados do exoma, mostrada na Tabela 3.

Tabela 2 - Resultados da Primeira Pesquisa de miRNAs Mutados

| ID | Classificação | Resultado do Exoma                     | Reclassificação                       | miRNA                          | SNP ID                 | Alvo   |
|----|---------------|--|---------------------------------------|--------------------------------|------------------------|--|
| S1 | SN            | <i>BRAF</i>                            | CFC                                   | -                              | -                      | -  |
| S2 | SN            | <i>PTPN11</i>                          | LEOPARD                               | hsa-miR-1304-3p<br>hsa-miR-608 | rs2155248<br>rs4919510 | <i>A2ML1</i><br><i>CD44</i><br><i>CDC42</i><br><i>FBXO32</i> |
| S3 | SC            | <i>PTPN11</i><br><i>A2ML1</i>          | SN                                    | hsa-miR-1304-3p                | rs2155248              | <i>A2ML1</i>   |
| S4 | SC            | sem mutação em<br><i>HRAS</i>          | SC                                    | hsa-miR-1304-3p<br>hsa-miR-646 | rs2155248<br>rs6513497 | <i>A2ML1</i><br><i>NOB1 oncogene</i>                         |
| S5 | NF1           | sem mutação <i>NF1</i>                 | NF1                                   | hsa-miR-646<br>hsa-miR-1304-3p | rs6513497<br>rs2155248 | <i>NOB1 oncogene</i><br><i>A2ML1</i>                         |
| S6 | NF1           | sem mutação <i>NF1</i><br><i>A2ML1</i> | NF1 com<br>Neurofibroma<br>Plexiforme | hsa-miR-1304-3p                | rs2155248              | <i>A2ML1</i>   |

Tabela 3 - Resultados da Segunda Pesquisa de miRNAs Mutados

| ID | Classificação | Resultado do Exoma                     | Reclassificação                       | miRNA                                      | SNP ID                  | Alvo   |
|----|---------------|--|---------------------------------------|--|-------------------------|--|
| S1 | SN            | <i>BRAF</i>                            | CFC                                   | hsa-miR-412-3p (ht)                        | rs61992671              | <i>ACVR1C</i><br><i>CD44</i>                 |
| S2 | SN            | <i>PTPN11</i>                          | LEOPARD                               | hsa-miR-608 (hm)                           | rs4919510               | <i>CDC42</i><br><i>FBXO32</i><br><i>TP53</i> |
| S3 | SC            | <i>PTPN11</i><br><i>A2ML1</i>          | SN                                    | hsa-miR-412-3p (ht)<br>hsa-miR-627-5p (ht) | rs61992671<br>rs2620381 | <i>ACVR1C</i><br><i>KDM3A</i>                |
| S4 | SC            | sem mutação em<br><i>HRAS</i>          | SC                                    | hsa-miR-646 (ht)                           | rs6513497               | <i>NOB1 oncogene</i>                         |
| S5 | NF1           | sem mutação <i>NF1</i>                 | NF1                                   | hsa-miR-646 (ht)<br>hsa-miR-412-3p (hm)    | rs6513497<br>rs61992671 | <i>NOB1 oncogene</i><br><i>ACVR1C</i>        |
| S6 | NF1           | sem mutação <i>NF1</i><br><i>A2ML1</i> | NF1 com<br>Neurofibroma<br>Plexiforme | hsa-miR-412-3p (ht)                        | rs61992671              | <i>ACVR1C</i>                                |

(ht) – heterozigose; (hm) – homozigose.

Nesta segunda análise, a maioria das mutações em miRNAs foi encontrada em heterozigose, ou seja, um alelo estava mutado e o outro não. Como, no ensaio de expressão gênica, não se poderia precisar qual alelo estaria sendo expresso naquele momento (o mutado ou o selvagem), optou-se por uma nova filtragem.

Decidiu-se realizar uma terceira filtragem dos dados, avaliando tanto os alvos regulados quanto os alelos mutados (Tabela 4). Novamente foram encontradas mutações em heterozigose. Encerrou-se a busca por miRNAs nesses pacientes.

*Tabela 4 - Resultados da Terceira Pesquisa de miRNAs Mutados*

| <b>miRNA</b>    | <b>SNP ID</b> | <b>Troca de Bases</b> | <b>Paciente com a Mutação Detectada</b> |
|-----------------|---------------|-----------------------|---|
| hsa-miR-1231    | rs116338160   | G>A                   | S1 (ht)                                 |
| hsa-miR-1231    | rs112032363   | C>A                   | S1 (ht)                                 |
| hsa-miR-590-3p  | rs6971711     | C>T                   | S1 (ht)                                 |
| hsa-miR-6875-3p | rs112975788   | C>G                   | S2 (ht)                                 |
| hsa-miR-6778-3p | rs377036954   | G>C                   | S2 (ht)                                 |
| hsa-miR-4743-5p | rs141766192   | C>T                   | S3 (ht)                                 |

A – adenina; T – timina; G – guanina; C – citosina; > - troca da base à esquerda do sinal pela base à direita do sinal; (ht) – heterozigose; ND – Não determinado.

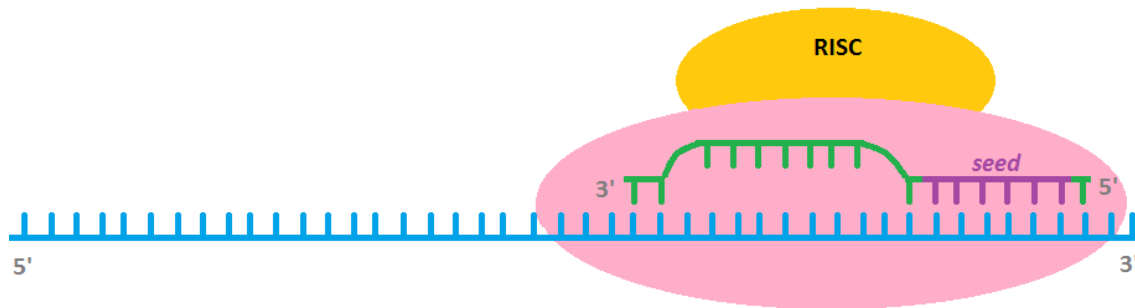
## 7. DISCUSSÃO:

As sondas usadas para o sequenciamento do exoma estendem-se para além dos éxons e, em alguns, casos incluem regiões de miRNAs em suas sequências. Tais amplificações podem ter número de leituras (*reads*) menor que os éxons, porém isso não impossibilita a análise de seus resultados.

O *miRTarBase* (53–56,63) compila dados de diversos bancos de dados de miRNA, bem como dados de artigos publicados em revistas indexadas, e é a melhor base de dados para tais moléculas até o presente momento. A pesquisa nessa base de dados nos permite filtrar as predições dos alvos pela força da associação, sendo consideradas mais fortes as análises *in vitro* e menos fortes as *in silico*. Tal ferramenta nos permite visualizar se o miRNA em pesquisa tem forte predição para regular os genes de interesse, no caso os genes da via Ras/MAPK. Se os genes visados possuem predição fraca, pode-se excluir o miRNA da análise até que se encontrem provas experimentais desta relação.

A localização das mutações no miRNA pode ter interferência direta em sua função. Mutações na região de grampo (*hairpin*) do pré-miRNA podem afetar a estabilidade da molécula e, por consequência sua expressão. Já as mutações na região de reconhecimento do mRNA alvo (*seed*) podem aumentar ou diminuir a afinidade do miRNA por seu alvo, afetando diretamente a expressão desses genes (Figura 18).

Figura 18 - Pareamento do miRNA e do mRNA por Reconhecimento do Seed



Esquema de reconhecimento por complementariedade de bases, onde a região do *seed* do miRNA reconhece uma região do seu mRNA alvo e exerce sua função pelo estabelecimento de interações químicas. Em azul, a sequência do RNA do gene alvo; em verde, a sequência do miRNA, com destaque em roxo na porção *seed* de reconhecimento do alvo; em rosa, o complexo proteico de recrutamento; em laranja, o complexo proteico RISC.

A identificação da mutação no miRNA no exoma, com posterior confirmação pelo método de *Sanger* (50), não nos garante que esta molécula reguladora esteja alterando a expressão de seus alvos. Para tal, necessita-se investigar se a expressão dos alvos está alterada na amostra. Porém essa análise encontra um impeditivo quando a mutação do miRNA encontra-se em heterozigose. Durante os processos celulares, com a técnica de RT-q-PCR, não se pode precisar qual dos dois alelos está sendo expresso, a menos que fossem usadas sondas do tipo *TaqMan* (64). Tais sondas são capazes de permitir a distinção entre mutações diferentes, no mesmo poço, durante uma reação de *RT-qPCR* ao marcarem cada uma das mutações com um fluoróforo diferente.

Tais reagentes são extremamente precisos, porém são caros, o que inviabilizou o uso dos mesmos neste estudo. Dessa forma, não poderíamos confirmar se a mutação estava modulando a expressão do alvo pois não teríamos como afirmar que o miRNA expresso era o mutado ou o selvagem. Daí a justificativa de exclusão das mutações em heterozigose.

Diante destas barreiras metodológicas, o prosseguimento das análises do miRNAs não nos traria segurança e poderia ser extremamente dispendiosa e cara. Optou-se por ampliar a investigação dos resultados do exoma dos pacientes a fim de definir o diagnóstico dos mesmos. Para seguimento deste trabalho, optou-se pela a análise de relatos de casos, descritos nos próximos capítulos.



## **CAPÍTULO 2**

# **Estudo de Caso – Paciente S4**

## **CAPÍTULO 2 – Estudo de Caso – Paciente S4**

### **8. REFERENCIAL TEÓRICO:**

#### **8.1. Descrição de Caso Clínico – Paciente S4:**

O caso clínico do paciente foi descrito no tópico 6.1.4. O mesmo foi inicialmente classificado como SC. As análises moleculares ainda não apresentaram resultados conclusivos para o diagnóstico, mas as avaliações seguem considerando a classificação clínica inicial.

De acordo com os resultados prévios do doutorado (em andamento), da aluna MSc Natana Chaves Rabelo, não foram encontradas mutações nos genes da via Ras/MAPK avaliados no exoma e também foi descartada a possibilidade de mosaïcismo somático através da análise por *Sanger* (50) de mutações em *HRAS* em diferentes tecidos (sangue e mucosa oral).

#### **8.2. Gene *HRAS*:**

Ras é uma família multigênica codificadora de pequenas GTPases, sendo as mais estudadas: o HRAS, o NRAS e o KRAS. Esta via de sinalização faz a transdução de estímulos extracelulares que resultam em uma rede intracelular complexa, altamente controlada e vital para a homeostase celular. A via Ras é utilizada por todas as células, o que justifica as consequências no desenvolvimento quando essa sinalização é perturbada (65).

O *HRAS* é um gene altamente conservado localizado em 11p15.5 (65), formado por seis éxons dos quais os éxons de 2 a 6 codificam uma proteína de 189 aminoácidos com um peso molecular de 21 kd (p21). O processamento alternativo do mRNA, excluindo os resíduos 152 a 165, dá origem a uma proteína de 170 aminoácidos (21). Mutações recorrentes neste gene para SC encontram-se nas bases que codificam as glicinas nas posições 12 e 13 (21,65,66), sendo responsáveis por cerca de 95% dos diagnósticos desta síndrome (66). Mutações que dão sentido trocado aos aminoácidos nessas posições levam ao aumento da atividade do produto gênico (21). As alterações mais comuns (G12S, G12A) resultam no fenótipo típico, enquanto casos mais leves podem ser devido a mutações que resultam em um comprometimento menos funcional do produto proteico anormal (66,67).

A preocupação médica em indivíduos com SC é o aumento do risco de câncer (68). A identificação de mutações germinativas heterozigotas de ativação em *HRAS* em indivíduos com SC justifica o aumento do risco de malignidade. *HRAS* é um proto-oncogene bem conhecido e sua ativação aberrante é frequentemente encontrada em tumores somáticos esporádicos (21,69). Dentre as RASopatias, a SC apresenta o maior risco de malignidade, especialmente para o rabdomiossarcoma embrionário, levando ao estabelecimento de um protocolo de rastreamento de tumores (68–71). Apesar da existência de estudos que mostram que a malignidade do tumor está associada à posição da mutação no gene, ainda sugere-se que o rastreamento tumoral seja feito em todos os pacientes, independentemente da mutação identificada (68).

## 9. METODOLOGIA:

### 9.1. Local do Estudo:

Este capítulo foi realizado no LMG do IFF/Fiocruz.

### 9.2. Amostra:

Paciente sem mutações em genes da via Ras/MAPK pela análise do exoma e com diagnóstico inconclusivo. Decidiu-se investigar por outras abordagens possíveis alterações nesta via, com a finalidade de determinar o diagnóstico do paciente.

### 9.3. Investigação de Mutações em miRNAs reguladores do Gene

#### ***HRAS:***

Tendo em vista que a literatura, até o momento, apresenta apenas um gene relacionado à SC, decidiu-se investigar se os miRNAs reguladores do gene *HRAS* apresentavam alguma mutação no paciente S4.

Foi realizada uma busca no banco de dados *miRTarBase* (53–56) para miRNAs reguladores do gene *HRAS*. Foi utilizado como filtro predição forte de relação entre miRNAs e gene.

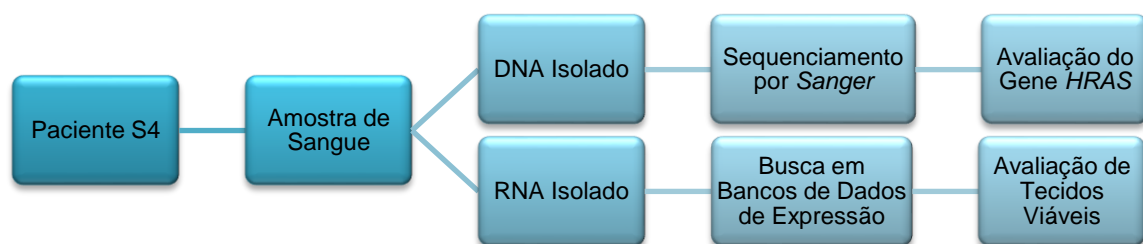
Os miRNAs relacionados tiveram suas sequências genômicas obtidas a partir dos dados do exoma do paciente. Foi realizado um estudo comparativo de similaridade com um genoma de referência (GRCh38) através da plataforma *BLAST – Basic Local Alignment Search Tool* (72–77).

### 9.4. Avaliação *in silico* da Expressão Tecidual do Gene *HRAS*:

Foram utilizadas diversas plataformas de análise da expressão gênica tecidual *in silico* para buscas de tecidos viáveis para coleta e estudo da expressão do gene *HRAS*. Foram elas:

- *GTex*: <https://gtexportal.org/home/> (78);
- *Ensembl*: <https://www.ensembl.org/index.html> (79,80);
- *The Human Protein Atlas*: <https://www.proteinatlas.org/> (81);
- *GeneCards*: <https://www.genecards.org/> (82–85).

Figura 19 - Fluxograma Metodológico do Capítulo 2



Seguimento das análises do paciente S4 para composição dos resultados do capítulo 2, desde a sua entrada (pelo projeto de doutorado da MSc Natana Chaves Rabelo) até todas as avaliações *in silico* realizadas.

## 10.RESULTADOS:

### 10.1.Investigação de Mutações em miRNAs reguladores do Gene

#### ***HRAS:***

Após a análise, sem conclusão diagnóstica, dos resultados do exoma, a suspeita clínica de SC foi mantida. Até o momento, o único gene descrito para esta síndrome é o *HRAS*. Sendo assim, foi criada a hipótese de que a síndrome neste paciente pudesse ser causada por mecanismos reguladores da expressão do *HRAS*, mesmo que este não estivesse mutado.

Decidiu-se realizar a busca inversa, no *miRTarBase* (53–56,63), ou seja, procurar pelo próprio *HRAS*, a fim de relacionar os miRNAs que poderiam estar regulando este gene. Os resultados foram filtrados de acordo com a força do ensaio preditivo. Desta forma, foram encontrados 07 miRNAs que regulam, com predição forte o *HRAS* (Figura 20).


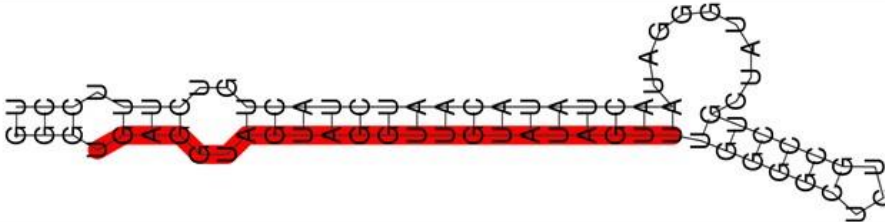
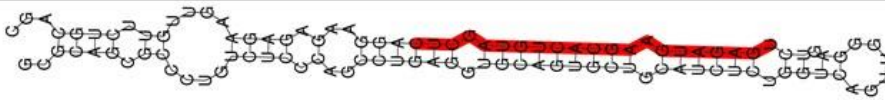

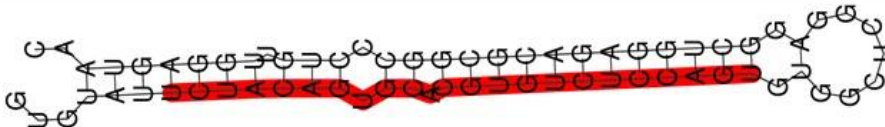
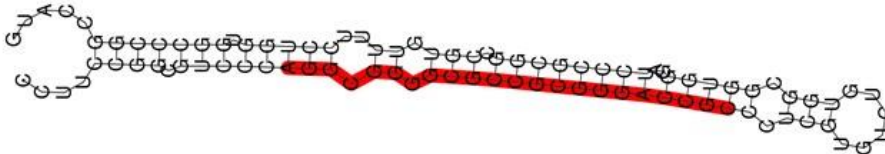
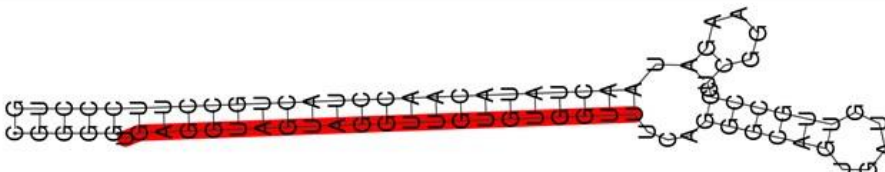
Figura 20 - Resultado da Busca no miRTarBase de miRNAs Reguladores do Gene HRAS

| ID         | Species (miRNA) | Species (Target) | miRNA           | Target | Validation methods |              |      |                      |     |        |       | Sum | # of papers |
|------------|-----------------|------------------|-----------------|--------|--------------------|--------------|------|----------------------|-----|--------|-------|-----|-------------|
|            |                 |                  |                 |        | Strong evidence    |              |      | Less strong evidence |     |        |       |     |             |
|            |                 |                  |                 |        | Reporter assay     | Western blot | qPCR | Microarray           | NGS | psILAC | Other |     |             |
| MIRT006548 | Homo sapiens    | Homo sapiens     | hsa-miR-181d-5p | HRAS   | ✓                  | ✓            | ✓    |                      |     |        |       | 3   | 1           |
| MIRT004471 | Homo sapiens    | Homo sapiens     | hsa-let-7a-5p   | HRAS   | ✓                  | ✓            | ✓    |                      |     |        | ✓     | 4   | 4           |
| MIRT005644 | Homo sapiens    | Homo sapiens     | hsa-miR-143-3p  | HRAS   | ✓                  | ✓            | ✓    |                      |     |        | ✓     | 4   | 3           |
| MIRT005880 | Homo sapiens    | Homo sapiens     | hsa-miR-181a-5p | HRAS   | ✓                  | ✓            | ✓    |                      |     |        |       | 3   | 1           |
| MIRT438494 | Homo sapiens    | Homo sapiens     | hsa-miR-139-5p  | HRAS   | ✓                  |              |      |                      |     |        |       | 1   | 1           |
| MIRT438681 | Homo sapiens    | Homo sapiens     | hsa-miR-663a    | HRAS   | ✓                  | ✓            | ✓    |                      |     |        |       | 3   | 1           |
| MIRT006057 | Homo sapiens    | Homo sapiens     | hsa-let-7b-5p   | HRAS   |                    | ✓            | ✓    |                      |     |        |       | 2   | 1           |

Em vermelho, as análises com forte predição de interação do miRNA com *HRAS*; em verde, as análises com predição mais fraca.

Foi obtida a sequência de bases nitrogenadas dos miRNAs no próprio *miRTarBase* (53–56,63) (Figura 21).

Figura 21 - Estrutura dos pré-miRNAs

| miRNA           | Estrutura do pré-miRNA   |
|-----------------|--|
| hsa-miR-181d-5p |    |
| hsa-let-7a-5p   |    |
| hsa-miR-143-3p  |   |
| hsa-miR-181a-5p |  |
| hsa-miR-139-5p  |  |
| hsa-miR-663a    |  |
| hsa-let-7b-5p   |  |

Estrutura dos pré-miRNAs. Em vermelho, temos destacada a sequência de nucleotídeos do miRNA maduro pós-clivagem (Adaptado do *miRTarBase* (53–56,63)).

A sequência dos miRNAs foi revertida para a sequência do DNA que a codificou. Foi feita a busca desta sequência nos resultados do exoma do



paciente S4 (IGV) e também no genoma de referência (GRCh38) a fim de localizar a posição cromossômica das sequências de interesse (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 - Posição dos miRNAs no Genoma de Referência

| miRNA           | Sequência Madura        | Posição Genômica          |
|-----------------|-------------------------|---------------------------|
| hsa-miR-181d-5p | AACAUUCAUUGUUGUCGGUGGGU | 19:13874875-13875011 [+]  |
| hsa-let-7a-5p   | UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU  | 9:94175957-94176036 [+]   |
| hsa-miR-143-3p  | UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC   | 5:149428918-149429023 [+] |
| hsa-miR-181a-5p | AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU | 1:198859044-198859153 [-] |
| hsa-miR-139-5p  | UCUACAGUGCACGUGUCUCCAGU | 11:72615063-72615130 [-]  |
| hsa-miR-663a    | AGGCGGGGCGCCGCGGGACCGC  | 20:26208186-26208278 [-]  |
| hsa-let-7b-5p   | UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU  | 22:46113686-46113768 [+]  |

[+] fita senso; [-] fita anti-senso.

Tabela 6 - Posição dos miRNAs no IGV (Exoma)

| Cobertura Exoma | miRNA           | Posição Sequência IGV |
|-----------------|-----------------|-----------------------|
| 19              | hsa-miR-181d-5p | 19:13874625-13875261  |
| 27              | hsa-let-7a-5p   | 9:94175707-94176286   |
| 15              | hsa-miR-143-3p  | 5:149428668-149429273 |
| 28              | hsa-miR-181a-5p | 1:198858794-198859403 |
| 7               | hsa-miR-139-5p  | 11:72614813-72615380  |
| 10              | hsa-miR-663a    | 20:26207936-26208528  |
| 6               | hsa-let-7b-5p   | 22:16113436-46114018  |

Em verde estão os números de *reads* acima do corte considerado bom para análise do exoma; em vermelho, os que se encontravam abaixo.

Em posse dessas informações, foram obtidas as sequências codificantes dos miRNAs no paciente, que foram alinhadas com o genoma de referência pela ferramenta *BLAST – Basic Local Alignment Search Tool* (72–77), apenas a sequência do hsa-let-7b-5p não pode ser obtida através dos dados dos exoma.

Todas as demais sequências do paciente encontraram 100% de correspondência com o GRCh38 (Figuras de 22 a 27), indicando que o paciente não possui mutações nos miRNAs reguladores do *HRAS*.

Figura 22 - BLAST do *hsa-miR-181d-5p*

Download ▾ GenBank Graphics

Homo sapiens microRNA 181d (MIR181D), microRNA  
 Sequence ID: [NR\\_030179.1](#) Length: 137 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 137 GenBank Graphics ▾ Next Match ▲ Pr

| Score         | Expect   | Identities    | Gaps      | Strand    |
|---------------|--|---------------|-----------|-----------|
| 254 bits(137) | 1e-64  | 137/137(100%) | 0/137(0%) | Plus/Plus |
| Query 225     | GTCCCCTCCCCTAGGCCACAGCCGAGGTCACAATCAACATTCATTGTTGTCGGTGGGTTG | 284           |           |           |
| Sbjct 1       | GTCCCCTCCCCTAGGCCACAGCCGAGGTCACAATCAACATTCATTGTTGTCGGTGGGTTG | 60            |           |           |
| Query 285     | TGAGGACTGAGGCCAGACCCACCGGGGGATGAATGTCACTGTGGCTGGGCCAGACACGGC | 344           |           |           |
| Sbjct 61      | TGAGGACTGAGGCCAGACCCACCGGGGGATGAATGTCACTGTGGCTGGGCCAGACACGGC | 120           |           |           |
| Query 345     | TTAAGGGGAATGGGGAC  | 361           |           |           |
| Sbjct 121     | TTAAGGGGAATGGGGAC  | 137           |           |           |

Figura 23 - BLAST do *hsa-let-7a-5p*

Download ▾ GenBank Graphics

Homo sapiens microRNA let-7a-1 (MIRLET7A1), microRNA  
 Sequence ID: [NR\\_029476.1](#) Length: 80 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 80 GenBank Graphics ▾ Next Match ▲ |

| Score        | Expect   | Identities  | Gaps     | Strand    |
|--------------|--|-------------|----------|-----------|
| 148 bits(80) | 6e-33  | 80/80(100%) | 0/80(0%) | Plus/Plus |
| Query 208    | TGGGATGAGGTAGTAGGTTGTATAGTTTTAGGGTCACACCCACCACTGGGAGATAACTAT | 267         |          |           |
| Sbjct 1      | TGGGATGAGGTAGTAGGTTGTATAGTTTTAGGGTCACACCCACCACTGGGAGATAACTAT | 60          |          |           |
| Query 268    | ACAATCTACTGTCTTTCCTA   | 287         |          |           |
| Sbjct 61     | ACAATCTACTGTCTTTCCTA   | 80          |          |           |

Figura 24 - BLAST do hsa-miR-143-3p

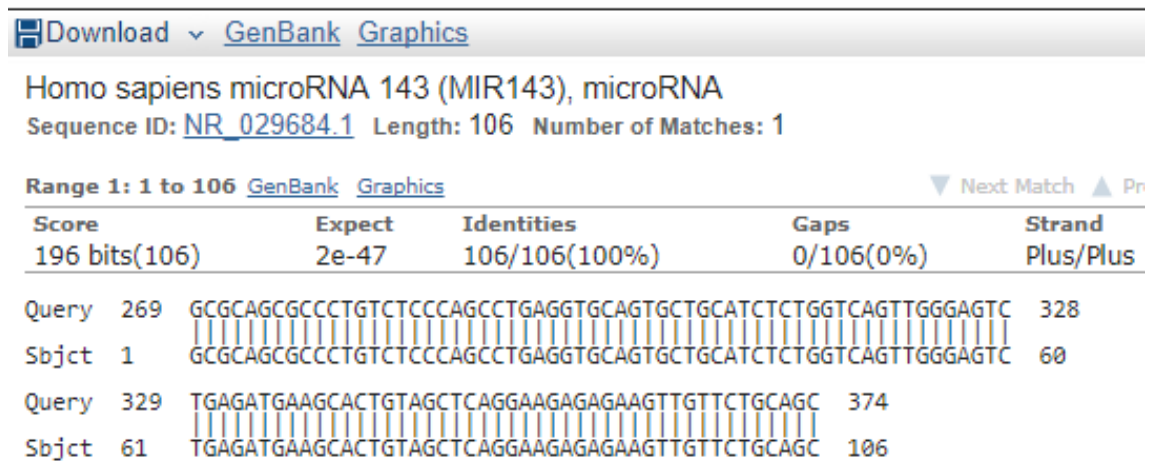


Figura 25 - BLAST do hsa-miR-181a-5p

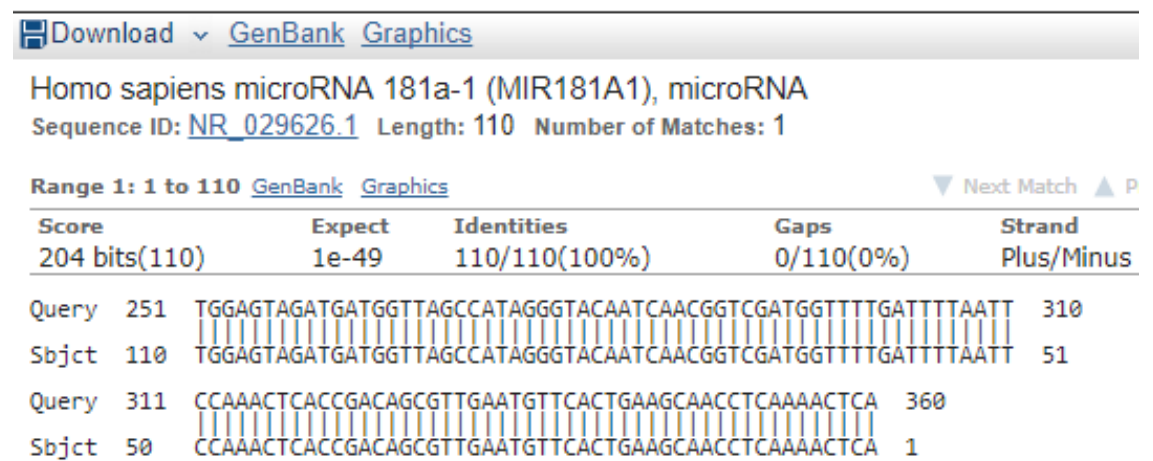


Figura 26 - BLAST do hsa-miR-139-5p

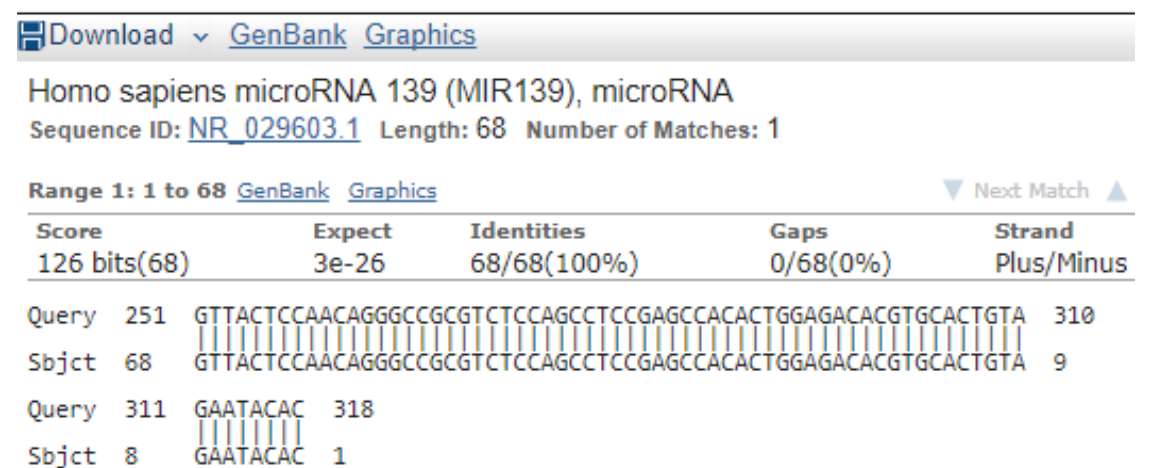


Figura 27 - BLAST do hsa-miR-663a

| Download ▾ GenBank Graphics  |   |             |          |                |
|--|---|-------------|----------|----------------|
| Homo sapiens microRNA 663a (MIR663A), microRNA                           |   |             |          |                |
| Sequence ID: <a href="#">NR_030386.1</a> Length: 93 Number of Matches: 1 |   |             |          |                |
| Range 1: 1 to 93 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a>        |   |             |          | ▼ Next Match ▲ |
| Score  | Expect  | Identities  | Gaps     | Strand         |
| 172 bits(93)   | 4e-40   | 93/93(100%) | 0/93(0%) | Plus/Minus     |
| Query 251  | CATGGCCGGGCCACCCAGGAAAACACGGCCGCGGGATCCCACCGCCACAGACACGAGGGCG |             |          | 310            |
| Sbjct 93   | CATGGCCGGGCCACCCAGGAAAACACGGCCGCGGGATCCCACCGCCACAGACACGAGGGCG |             |          | 34             |
| Query 311  | GTCCCGCGGGCGCCCCGCCTGGGACGCCGGAAGG                            |             |          | 343            |
| Sbjct 33   | GTCCCGCGGGCGCCCCGCCTGGGACGCCGGAAGG                            |             |          | 1              |

## 10.2. Avaliação *in silico* da Expressão Tecidual do Gene *HRAS*:

Visando outra alternativa para avaliação de alterações que justifiquem o fenótipo do paciente, foi traçada a hipótese metodológica para análise da expressão do gene *HRAS*. Para tal, foram realizadas buscas em diversos bancos de expressão gênica com o objetivo de encontrar um tecido acessível que expressasse o gene de interesse (Figuras de 28 a 31).

Os tecidos passíveis de coleta (sangue e mucosa oral) possuem baixa expressão em todos os bancos pesquisados. Coletas de biópsias de pele foram descartadas por serem mais invasivas e devido à dificuldade em coletar material de controles saudáveis pareados.

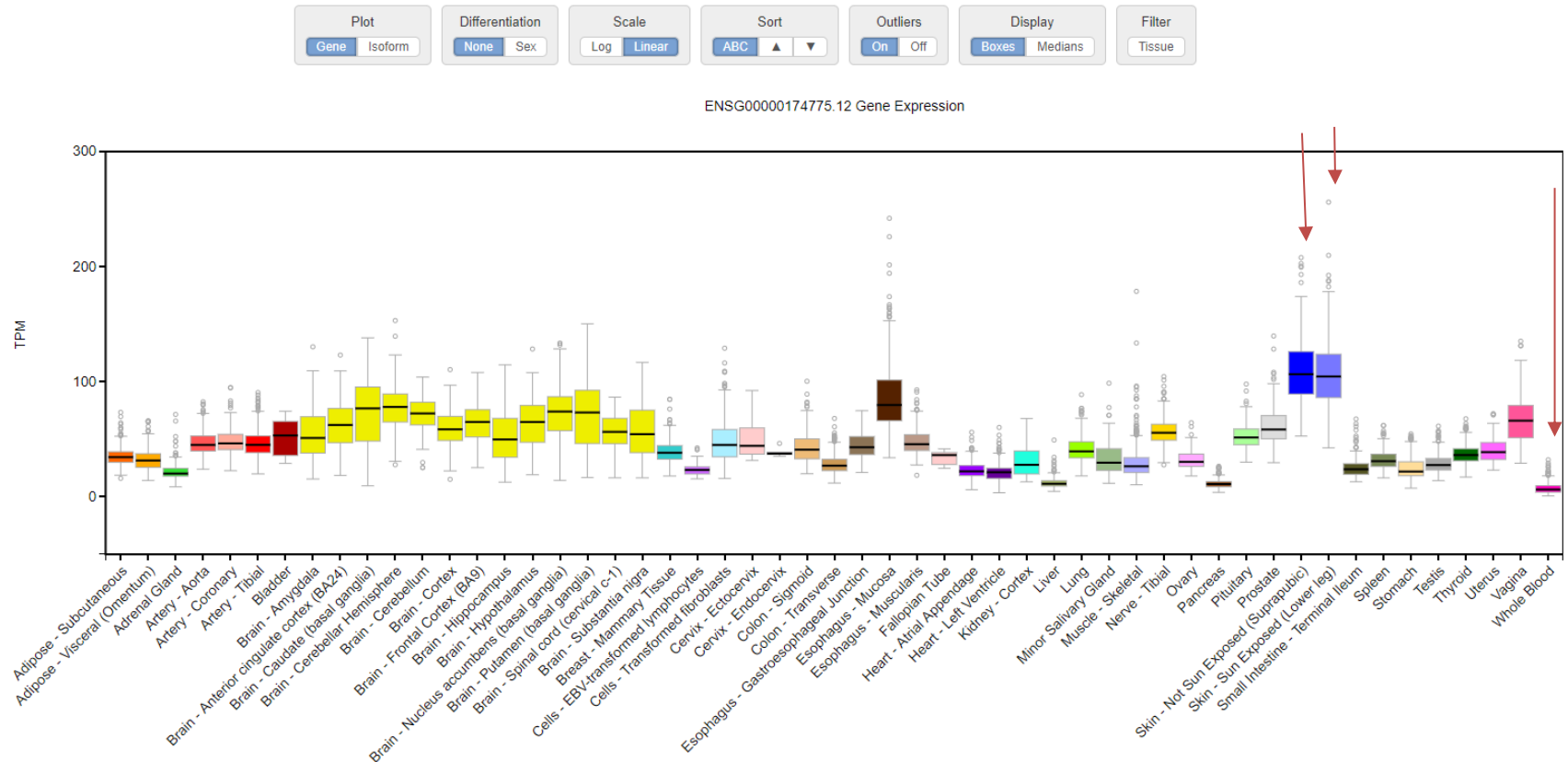
Figura 28 - Expressão de HRAS (GTEx)

Gene expression for HRAS (ENSG00000174775.12)

Data Source: GTEx Analysis Release V7 (dbGaP Accession phs000424.v7.p2)

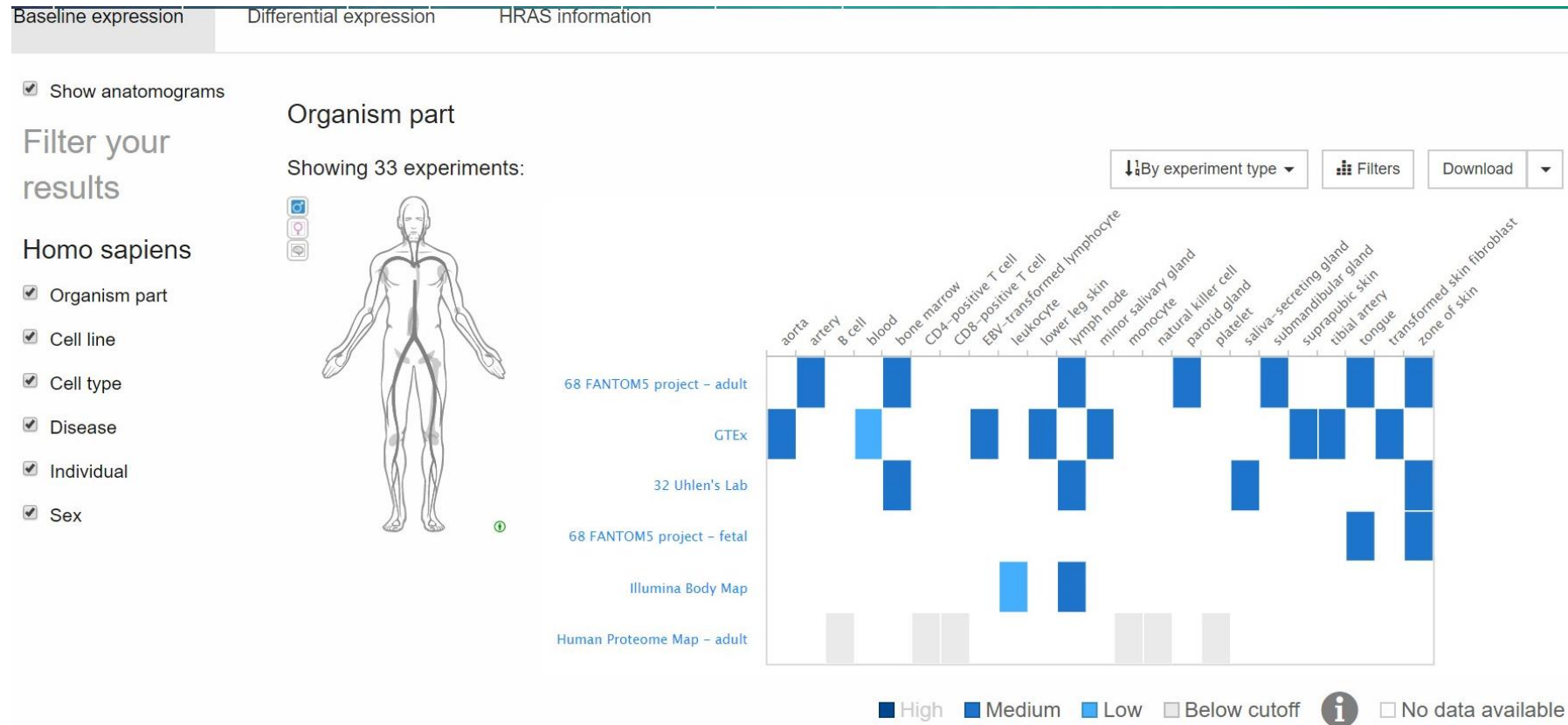
Data processing and normalization

Download



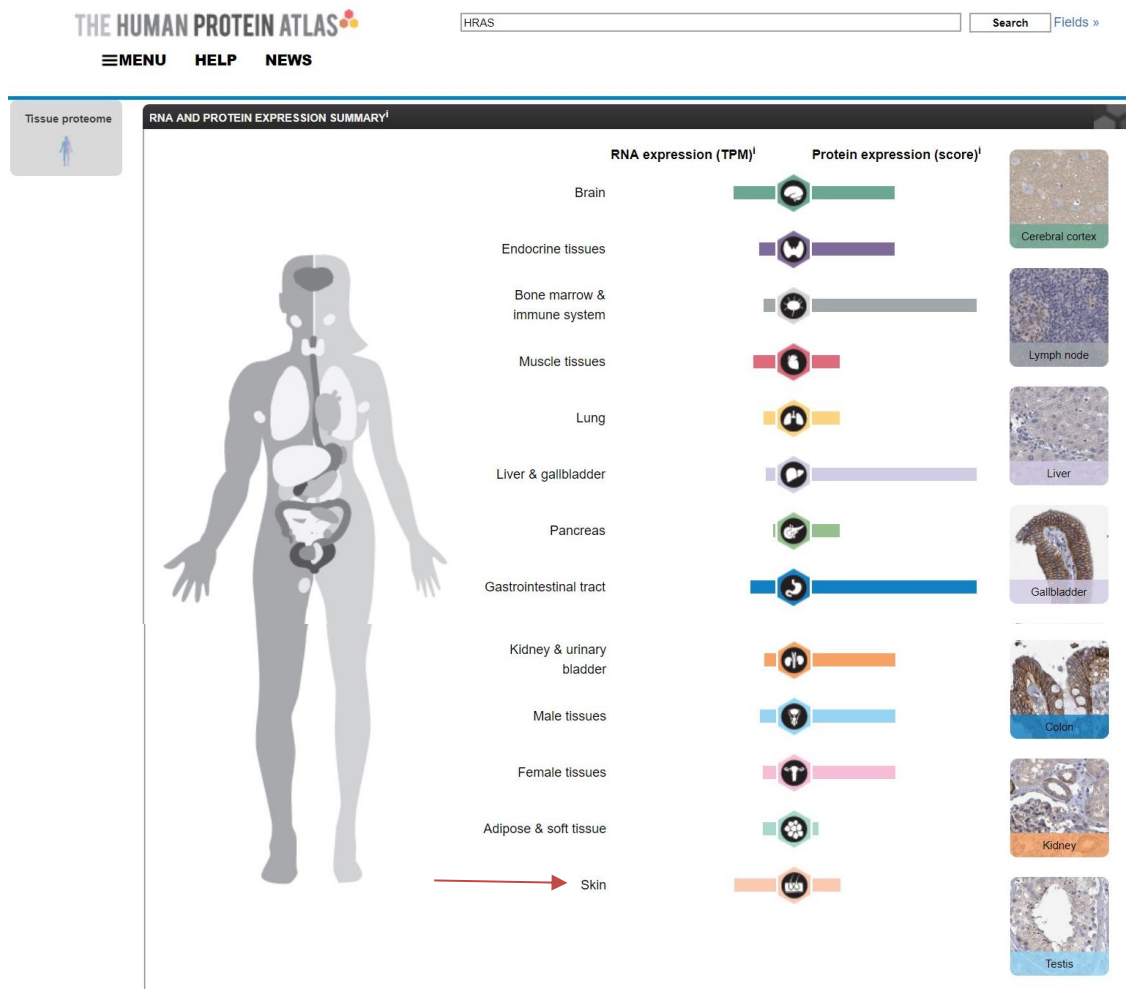
Expressão tecidual do gene *HRAS* em diferentes tecidos de acordo com os experimentos do banco *GTEx*. As setas em vermelho indicam os tecidos viáveis para a coleta no paciente S4.

Figura 29 - Expressão de HRAS (Ensembl)



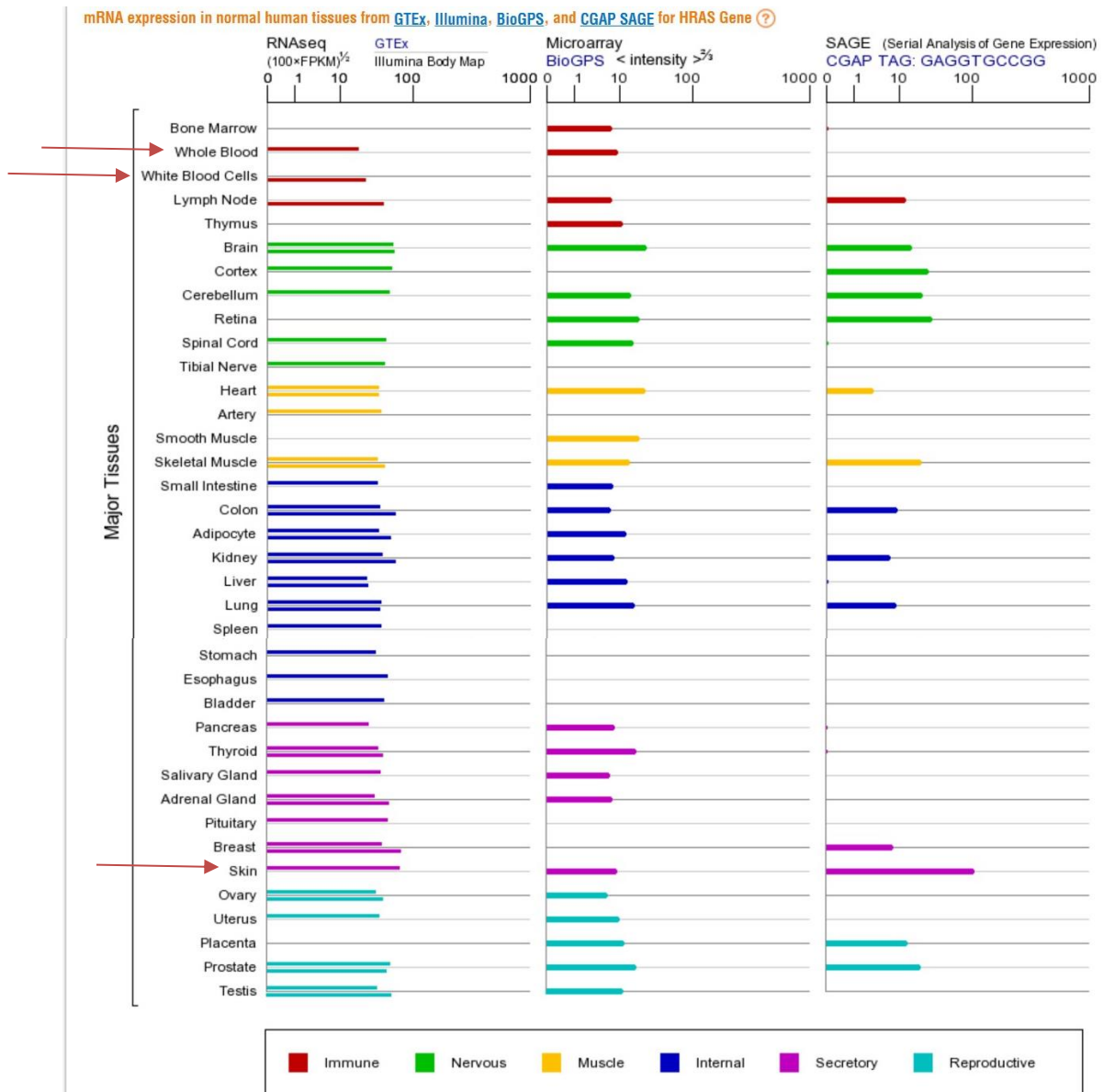
Expressão tecidual do *HRAS* em diferentes tecidos de segundo os experimentos do banco *Ensembl*. Foram utilizados filtros para exibição dos tecidos viáveis de serem coletados no paciente S4. As gradações dos tons de azul indicam, do mais fraco para o mais forte, o aumento dos níveis de expressão do gene de interesse.

Figura 30 - Expressão de HRAS (The Human Protein Atlas)



Expressão tecidual do *HRAS* segundo os dados do banco *The Human Protein Atlas*. A coluna da esquerda apresenta a expressão de RNA do gene em diferentes tecidos, enquanto a coluna da direita apresenta os níveis da proteína *HRAS* em diferentes tecidos. O tamanho da barra é indicativo da expressão comparativa entre os tecidos. A seta vermelha indica o tecido viável de ser coletado no paciente S4.

Figura 31 - Expressão de HRAS (Gene Cards)



Expressão tecidual do *HRAS* segundo os dados do banco *Gene Cards*. As colunas indicam a expressão do gene detectada nos tecidos por três diferentes técnicas. Os tamanhos das barras são indicativos da expressão comparativa entre os tecidos. As setas vermelhas indicam os tecidos viáveis de serem coletados no paciente S4.



## 11.DISSCUSSÃO:

Em se tratando de doenças genéticas, é comum associá-las a alterações na sequência de DNA de um gene. Porém, um conceito mais amplo engloba alterações em quaisquer níveis de regulação da expressão desse gene que irão afetar a conformação estrutural/funcional ou a quantidade do produto deste processo, ou seja, proteínas e enzimas.

Sendo assim, pode-se pensar que uma doença até o momento associada a somente um gene, como é o caso da SC com o *HRAS*, pode ser identificada não só pelo sequenciamento deste gene como também por técnicas que avaliem mutações em moléculas reguladoras da expressão do alvo ou técnicas que mensurem a quantidade e a funcionalidade da molécula final do processo de tradução.

Seguindo a linha de trabalho com miRNAs, optou-se por avaliar especificamente esta classe de reguladores através da base de dados *miRTarBase*. A busca realizada através do gene *HRAS* resultou em 07 miRNAs com forte predição de regulação. Porém estes não estavam mutados no DNA do paciente, indicando que não seria justificável realizar o estudo da expressão dos mesmos.

Devido à baixa expressão do *HRAS* na mucosa e no sangue, optou-se por suspender esta etapa analítica e aprofundar a genotipagem do paciente através do sequenciamento do genoma (análise em andamento). O mais importante é fornecer um retorno à família e o correto acompanhamento do paciente, pois, se

confirmado o diagnóstico de SC, o mesmo deverá ter um melhor rastreio para câncer devido a maior incidência nesta síndrome (68).

## **CAPÍTULO 3**

# **Estudo de Caso – Gêmeas com Fenótipos Discordantes**

## **CAPÍTULO 3 – Estudo de Caso – Gêmeas com Fenótipos Discordantes**

### **12.REFERENCIAL TEÓRICO:**

#### **12.1.Descrição de Caso Clínico – Pacientes S16 e S17:**

Pacientes gêmeas, univitelinas, com fenótipos discordantes. Avaliação comparativa, visando descrever as possíveis alterações na expressão gênica que poderiam modular o fenótipo da doença.

Nascidas em setembro de 2002, de gestação normal e não consanguínea. Apresentam certo atraso cognitivo. Aos 5 anos de idade foi descartada a suspeita de síndrome de Turner pela análise dos cariótipos que se apresentaram normais para ambas (46, XX). Possuem face característica de SN com pescoço alado e orelhas com baixa implantação. Em 2018 foram encaminhadas para o Hemorio para investigação de coagulopatias, comuns em SN (86), onde foi confirmada doença de *von Willebrand* em ambas.

Em relatório escolar, foram descritas como alunas com dificuldades em acompanhar os conteúdos, precisando de mais tempo para entender a matéria. Frequentam atividades pedagógicas no contraturno. Possuem dificuldades com conceitos mais abstratos, na compreensão de narrativas, na produção de textos coesos, na interpretação de enunciados, com limitação no desenvolvimento de raciocínio lógico e dificuldade de autonomia nas avaliações. Ficam frequentemente de recuperação.

São diferenciadas entre si por características em três aspectos principais descritos a seguir:

Tabela 7 - Diferenças Fenotípicas entre as Gêmeas S16 e S17

|          | S16   | S17  |
|----------|---|--|
| Coração  | sem alterações cardiológicas  | submetida a uma cirurgia cardíaca aos 5 anos de idade para correção de defeito do septo atrioventricular (DASV)              |
| Coluna   | sem alterações osteoarticulares na coluna                                       | escoliose e lordose lombar acentuadas (Figura 33) que conferem a ela uma estatura menor em relação a outra gêmea (Figura 32) |
| Cognição | mais falante e participativa em aula, porém com maior dificuldade nos conteúdos | mais centrada e, no geral, apresenta melhor desempenho nas avaliações  |

Ambas tiveram seu material genético analisado no exoma. Não foram encontradas mutações nos genes da via Ras/MAPK e a análise dos resultados está sendo expandida para outros genes.

Figura 32 - Pacientes S16 e S17



Pacientes S16 e S17 e suas características clínicas: à esquerda, a diferença de estatura entre elas; à direita, ambas com o pescoço alado.

Figura 33 - Radiografia de Coluna da Paciente S17



Exame de imagem da paciente S17, evidenciando a escoliose da paciente.

## 12.2. Estudos com Gêmeos:

Há duas classes de gêmeos. Os dizigóticos são originários de dois zigotos, ou seja, dois óvulos fertilizados por dois espermatozoides. Já os monozigóticos são originados da fertilização de um único óvulo por um único espermatozoide e são considerados geneticamente idênticos (87), embora diferenças físicas ocorram devido a influências ambientais (88). A prevalência de gêmeos monozigóticos em humanos é de 0,3 a 0,4%, não sofrendo variações entre os grupos étnicos (89).

Diversos autores relataram casos de gêmeos discordantes fenotipicamente mesmo antes da definição de testes genéticos para RASopatias (90–93). O primeiro estudo clínico de gêmeos discordantes com SN realizou a definição de gemelaridade através de características e similaridades físicas, mesma placenta, mesmo sexo, mesmo tipo sanguíneo (94). Estes estudos de

relatos de caso reforçaram a evidência de influência genética nas RASopatias (90).

Na literatura, a maioria dos estudos em RASopatia com resultados moleculares para gêmeos discordantes são nos casos de NF1 (89,95–99) devido a sua grande variabilidade fenotípica e ao interesse em encontrar marcadores para malignidade e fenótipos mais graves (99). Há também estudos com LEOPARD (100) e SN (101,102).

Um importante estudo de 1993 mostrou que variações nas mutações em *NF1* não são as únicas justificativas para expressão fenotípica variável, já que existem diferenças consideráveis entre membros da mesma família que variaram em maior grau com o aumento da distância de um probando. Tal estudo sugeriu a atuação de genes modificadores em tal variabilidade (103). Já um estudo em uma família com SN associou dados moleculares de humanos com resultados de pesquisa em modelos animais para gerar a teoria que uma possível hiperfunção de *PTPN11* em humanos pode resultar em ovulação múltipla e um risco aumentado de gemelaridade dizigótica, uma vez que há três gêmeos dizigóticos nos filhos de duas mulheres afetadas nessa família (104).

Acredita-se que a grande vantagem de estudos com gêmeos seja poder avaliar indivíduos pareados quanto a fatores genéticos e ambientais (105). Porém, a influência ambiental inicia-se ainda no útero, como por exemplo, na anastomose placentária. Neste mecanismo de transfusão de gêmeo para gêmeo, o sangue desoxigenado da artéria de um bebê entra na placenta e chega na veia do outro bebê, fazendo com que o segundo não tenha os nutrientes

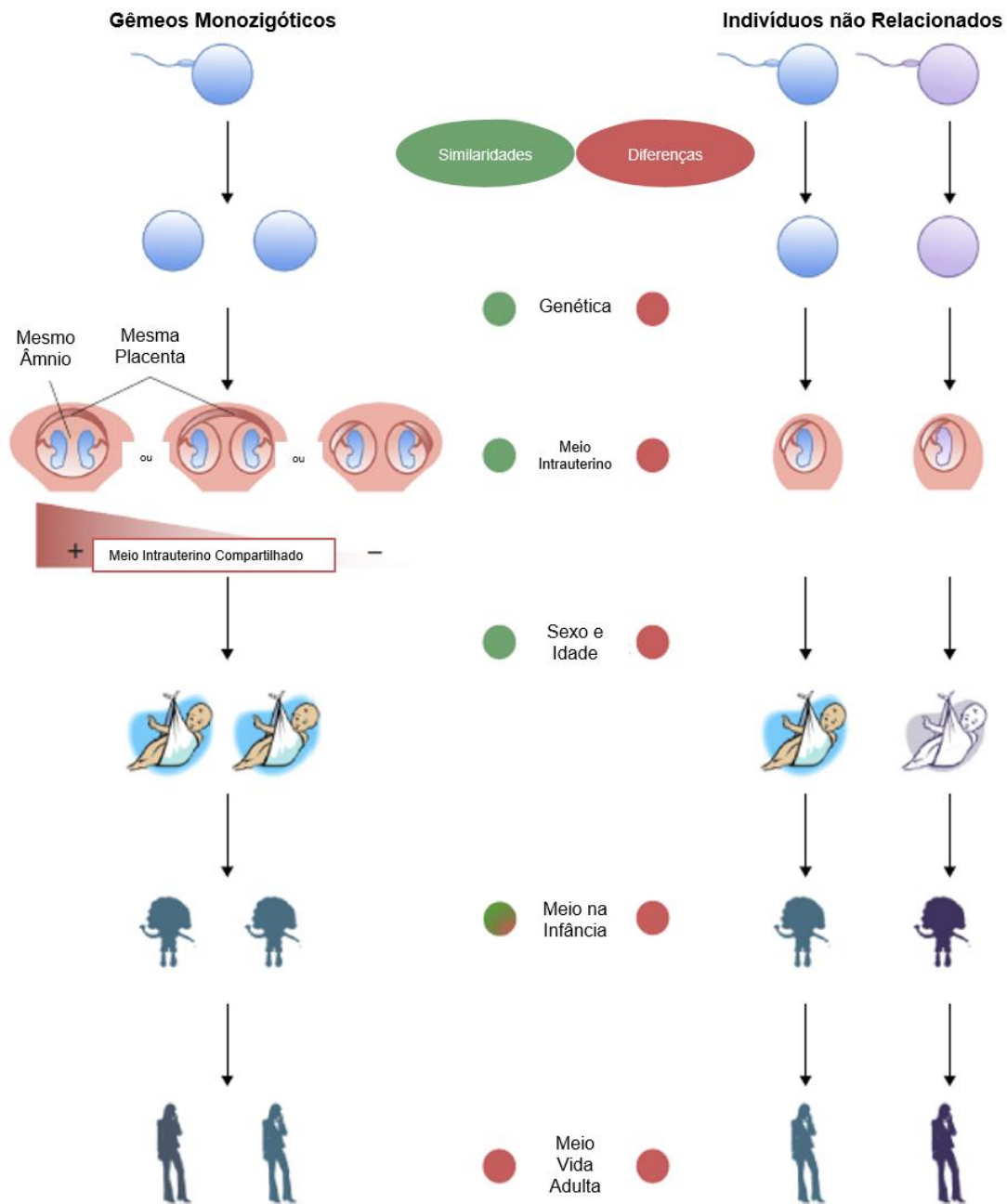
necessários para seu desenvolvimento e que o excesso de sangue para o primeiro também possa acarretar problemas (88) (Figura 34).

A nível molecular há ainda a ocorrência de eventos pós-zigóticos que levam a formação de indivíduos mosaicos, com mutações diferentes nos diversos tecidos e, conseqüentemente, expressão variável (89,98). Além disso, estudos moleculares recentes mostram que há variações em genomas de gêmeos, sugerindo que eles não são 100% idênticos devido a retrotransposons e variações no número de cópias (106). Há ainda a evidência de que outros mecanismos devam ser estudados para entendimento de tais variações, dentre eles temos: padrões de metilação, genes reguladores, RNAs não traduzidos, DNA mitocondrial, variantes do número de cópias etc. (95,97).

A era Genômica nos trouxe técnicas que permitem avaliar a influência destes mecanismos regulatórios no desenvolvimento de doenças, mudando a definição de “genótipo” (107). Desta forma, estudos com gêmeos ainda serão importantes para avaliar o impacto de tais regulações no desenvolvimento, diferenciação, malignidade e prognóstico de diversas patologias (87,108).



Figura 34 - Similaridades e Diferenças Entre Gêmeos ao Longo da Embriogênese e Após o Nascimento



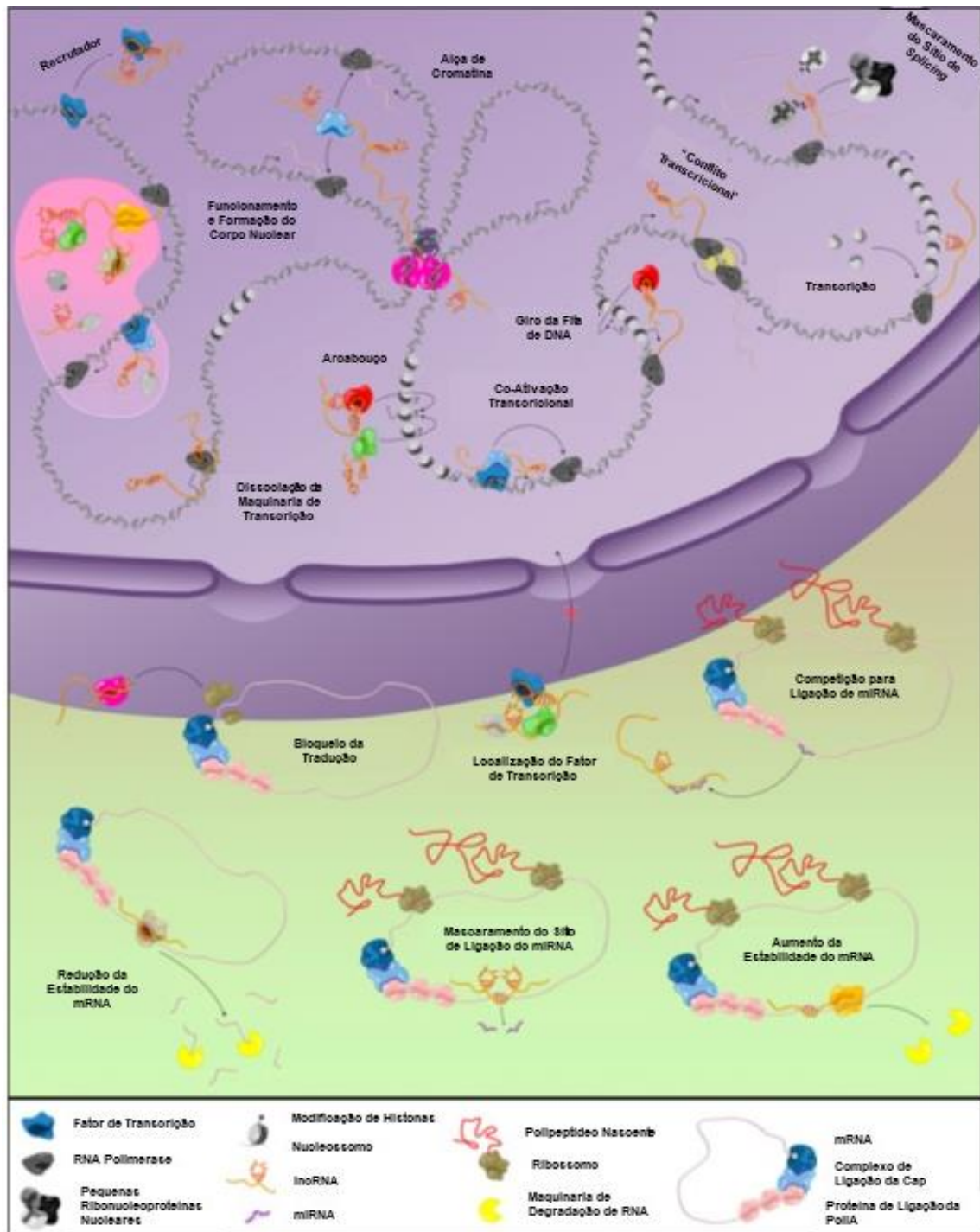
O esquema apresenta a fecundação de indivíduos gêmeos e não relacionados (podendo esses serem gêmeos di- ou multi-zigóticos), além das possíveis relações de partilha (ou não) de placenta e âmnio em gêmeos monozigóticos. Ao longo da imagem são apresentados os graus de similaridades e diferenças entre os indivíduos sob diversos aspectos. Traduzido e adaptado de Castillo-Fernandez *et al.*, 2014 (108).

### 12.3. RNAs Não codificantes (RNAnc):

RNAs não codificantes são a classe de moléculas transcritas a partir do DNA mas que não exercerão sua função como codificadoras para a tradução proteica (109,110). Existem diversas classes de moléculas englobadas neste grupo. Dentre elas, destacam-se os RNAs longos não codificantes (lncRNA – do inglês *long noncoding RNA*), os RNAs ribossomais, os RNAs transportadores (RNAt), os pequenos RNAs nucleares (RNAsn), os pequenos RNAs nucleolares (RNAsno), os RNAs associados a telômeros (TERC), os micro RNAs (miRNA) e os RNAs de interferência (RNAi) (12). Tais moléculas reguladoras atuam de diversas formas em fenômenos biológicos, podendo participar de *imprinting* genômicos, auxiliando a conformação de cromossomos e regulando a atividade enzimática (110), como podemos ver na Figura 35.

Um grande número de RNAs não codificantes segue sendo descrito, uma vez que as técnicas de sequenciamento massivo em paralelo tornam-se cada vez mais eficientes (12). Mesmo com muitas de suas funções ainda desconhecidas, sabe-se da importância destes RNAs para a coordenação da manutenção celular, bem como sua diferenciação. Desta forma, cresce o número de estudos que procuram investigar a causalidade existente entre mutações e diferentes níveis de expressão desse RNAs com o desenvolvimento de doenças (110).

Figura 35 - Mecanismos de Ação dos RNAs Não Codificantes



Os RNAs Reguladores desempenham suas funções recrutando diversos tipos de proteínas. Traduzido e Adaptado de Kung *et al.*, 2013 (12)

#### **12.4.Avaliação Funcional – Proteoma:**

Os avanços nos estudos de biologia molecular apresentaram novas dúvidas a comunidade científica (111). Saber quais alterações um genoma carrega já não é suficiente para responder mecanismos que levam à doenças. Para melhor entender esses processos, iniciou-se o estudo dos produtos dos genes, RNAs codificantes (ou não) e proteínas. Ao grupo de proteínas expressas em uma célula, tecido ou organismo, em um dado momento, dá-se o nome de proteoma (112). Essa é uma abordagem mais sensível pois permite estudar modificações provenientes de estímulos internos e externos (113).

A proteômica, técnicas para o estudo de proteínas, envolve mais dificuldades que o estudo de ácidos nucléicos uma vez que a estrutura das primeiras é mais diversa e complexa (111). Pelo conjunto de técnicas que a proteômica engloba pode-se ter resultados que a genômica não pode proporcionar, tais como processos pós-traducionais e processamento alternativo de RNA (*splicing* alternativo) (113). Tecendo um comparativo com estudos de expressão gênica, não necessariamente os níveis de mRNA refletem os níveis de proteína (molécula funcional), por conta da ação de RNAs reguladores, o que torna a proteômica mais precisa funcionalmente (111–113).

As técnicas de proteômica baseiam-se na separação dos produtos proteicos para sua identificação. As primeiras técnicas realizavam essa separação em um gel bidimensional baseada no pH e na massa molecular (111). As técnicas mais modernas realizam a clivagem enzimática de tais proteínas, com separação ultrasensível por cromatografia líquida, ionização dos peptídeos em espectrômetro de massas e análise dos dados obtidos através de

bioinformática. O grande volume de dados gerados é comparado com bancos de dados para identificação e até mesmo quantificação das proteínas da amostra em questão. As técnicas mais modernas permitem identificar proteínas de baixo peso molecular e em baixas concentrações, sendo mais sensível que a eletroforese bidimensional (114).

O proteoma tem se tornado uma grande ferramenta de estudo para doenças humanas. Capaz de refletir variações do metabolismo, tem sido útil na busca de biomarcadores para prognóstico, diagnóstico, monitoramento e direcionamento de tratamentos (112). O desenvolvimento de técnicas de proteômica auxilia no acompanhamento da evolução da doença, da resposta ao tratamento e na escolha do melhor tratamento (115), principalmente em tecidos corporais mais acessíveis, fazendo da espectrometria de massas uma ferramenta para a prática clínica de rotina (13,116).

Grande parte dos estudos de proteoma avalia casos de câncer, doenças cardíacas e doenças neurológicas. Ainda não há publicações que abordem a proteômica em casos de RASopatia, tampouco em estudos de gêmeos com tais síndromes.

## **13.METODOLOGIA:**

### **13.1.Local do Estudo:**

Esta parte do estudo foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular e Proteômica do Sangue (LABMOPS/UFRJ) e no LMG do IFF/Fiocruz.

As pacientes foram recrutadas e acompanhadas no ambulatório do CGM - IFF/Fiocruz, supervisionado pelo Dr Juan Clinton Llerena Jr. E as amostras de sangue foram obtidas pelo setor de coleta do IFF/Fiocruz.

### **13.2.Obtenção das Amostras de Sangue Venoso:**

Foram colhidos 4mL de sangue venoso de cada uma das gêmeas, em tubos revestidos com EDTA. As amostras foram imediatamente entregues ao LMG e divididas, em tubos de 15mL, em duas alíquotas de 2mL cada, sendo uma destinada para extração de RNAs e outra para a extração de proteínas.

#### **13.2.1.Obtenção de Células de Sangue Periférico:**

Os leucócitos foram obtidos através da técnica de lise de hemácias. As alíquotas foram centrifugadas a 300xg por 10 min para a separação do plasma, que foi transferido para tubos de 2,0mL e congelado a -80°C.

À solução com as células, foi acrescentado 7,0mL (3,5mL para cada 1,0mL de sangue venoso) de Tampão de Lise de Hemácias (TLH – 155mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; pH 7,4; 10mM de  $\text{KHCO}_3$ ; 1mM de EDTA). As amostras foram vortexadas, incubadas em gelo por 30 min e centrifugadas por 15 min a 1500xg.

O sobrenadante foi descartado e foi novamente adicionado TLH (na proporção de 1:1 mL inicial de sangue), a amostra foi novamente vortexada e centrifugada, agora por 10 min a 1500xg. Uma nova lavagem do precipitado foi realizada, com TLH na mesma proporção da última, seguida de uma centrifugação por 5 min a 1500xg. Todo o sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma pipeta.

A primeira alíquota de cada amostra foi destinada à extração de RNA, sendo adicionada à mesma 1,0mL do reagente *Trizol*® (Invitrogen), com posterior congelamento a -80°C até o momento do processamento das amostras.

A segunda alíquota recebeu reagentes para a extração de proteínas: 200µL de Tampão de Extração de Proteínas (TEP – KCl; MgCl<sub>2</sub>; DTT; EDTA; Glicerol; Hepes) e 12µL de Tampão *cOmplete*™ (Roche – 1 pastilha dissolvida em 2mL de água *MiliQ*). E também foi congelada a -80°C até a extração de proteínas totais da amostra.

### **13.2.2.Expressão Gênica de RNAs Reguladores – Análise**

#### **Comparativa:**

#### **13.2.2.1.Extração de RNA Total de Células de Sangue**

##### **Periférico:**

No LABMOPS, a alíquota para extração de RNAs totais em *Trizol*® (Invitrogen), foi incubada por 5 min a temperatura ambiente para completa dissociação das proteínas e em seguida foram adicionados 267µL de Clorofórmio (Tedia). A solução foi homogeneizada vigorosamente por inversão

e após uma incubação por 2 min à temperatura ambiente, foi centrifugada a 12.000xg por 15 min a 4°C.

Ao término da centrifugação, foi obtida uma mistura contendo 3 fases: uma inferior de coloração rosa (fenol-clorofórmio), uma interfase (proteínas) e uma superior, aquosa e incolor, a qual contém o RNA.

A fase superior foi transferida para um novo tubo livre de RNase, onde foram adicionados 667µL de Isopropanol (Tedia). A solução foi homogeneizada e incubada por 10 min à temperatura ambiente e em seguida, submetida a centrifugação a 12.000xg por 10 min a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado por inversão. O precipitado foi lavado com 1,0mL de Etanol 75% (Merck – RNase *free*) gelado e centrifugado a 7500xg por 5 min. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado com uma pipeta e o precipitado ressuspensão em água destilada contendo 0,01% do inibidor de RNase Dietilpirocarbonato (DEPC).

Após a extração, o RNA foi quantificado pelos métodos espectrofométricos *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific) e *Qubit* (Thermo Scientific) e a qualidade do RNA foi analisada em gel de Agarose 0,8% dissolvida em TAE 1X (0,04M Tris-Acetato, 0,001M EDTA, água contendo 0,01% de DEPC, acrescido de 0,5µg/ml de Brometo de Etídeo (Invitrogen). A corrida eletroforética foi realizada a 5V/cm.

#### **13.2.2.2.Síntese de DNA Complementar (cDNA):**

Foi utilizado o kit de reagentes da placa de *array* para RNA *Regulatory RNA qPCR Profiler* (System Biosciences). Seguindo o protocolo do fabricante,



os seguintes reagentes foram adicionados em tubo de 0,2mL (usando um tubo para cada gêmea):

Tabela 8 - Reagentes do STEP 1

| REAGENTE                | VOLUME ( $\mu$ L) |
|-------------------------|-------------------|
| RNA                     | $\pm$ 500ng       |
| 5X <i>PolyA Buffer</i>  | 2,0               |
| 25mM MgCl <sub>2</sub>  | 1,0               |
| 5mM ATPtp               | 1,5               |
| <i>PolyA Polymerase</i> | 0,5               |
| Volume Total            | $\pm$ 10          |

Reagentes para adição da cauda PoliA às moléculas de RNA (manual do fabricante do kit da placa).

Os tubos foram incubados a 37°C por 30 min, com posterior adição de 0,5 $\mu$ L de *Oligo dT Adaptor*. Nesse *STEP 2*, as amostras foram incubadas a 60°C por 5 min e depois ficaram por 2 min a temperatura ambiente.

A síntese do cDNA ocorreu no *STEP 3*, com adição dos reagentes descritos abaixo:

Tabela 9 - Reagentes do STEP 3

| REAGENTE                     | VOLUME ( $\mu$ L) |
|------------------------------|-------------------|
| 5X <i>RT Buffer</i>          | 4,0               |
| dNTP mix                     | 2,0               |
| 0,1M DTT                     | 1,5               |
| <i>Random Primer Mix</i>     | 1,5               |
| <i>Reverse Transcriptase</i> | 1,0               |
| Volume Total                 | $\pm$ 20,5        |

Reagentes adicionados para síntese do cDNA (manual do fabricante do kit da placa).

Os tubos foram incubados a 42°C por 60 min e, posteriormente, a 95°C por 10 min. As ciclagens de temperatura foram realizadas no equipamento

*Proflex System* (Applied Biosystems). As reações foram utilizadas na etapa descrita a seguir.

### 13.2.2.3. Análise de Expressão por PCR em Tempo Real:

A técnica de PCR em tempo real foi realizada no equipamento *QuantStudio 12K Flex* (Applied Biosystems) visando quantificar a expressão de diferentes RNAs reguladores. Para tal, foram pipetados 2,0µL de cada par de iniciadores (*primers*) contidos no kit da placa *Regulatory RNA qPCR Profiler* (System Biosciences). Cada *iniciador* foi pipetado em 1 dos 96 poços da placa, como mostra o esquema a seguir:

Figura 36 - Iniciadores Utilizados para Array da Expressão de RNAs

|   | 1            | 2              | 3                     | 4         | 5          | 6           | 7            | 8           | 9             | 10           | 11            | 12            |
|---|--------------|----------------|-----------------------|-----------|------------|-------------|--------------|-------------|---------------|--------------|---------------|---------------|
| A | 4q32e        | ACSL1e         | AZIN1e                | CA12e     | Lnc-PERP-1 | Lnc-KLF14-1 | Linc-LAMA4-3 | Lnc-LYZL2-1 | Linc-LAMA4-2  | Lnc-LCP2 1:1 | Lnc-FABP5-2:1 | Lnc-TMTC3-6:2 |
| B | Lnc-IER3-5.2 | Lnc-C21orf33-1 | ERBS3/SBNO2e          | Epha4e    | FKBP5e     | FOXC1e      | GREB1e       | IL1be       | IL6e          | IRS2e        | KLF6e         | KLK3e         |
| C | MARCKSe      | miR-200be      | Nanoge                | NKX31e    | NRIP1e     | P2RY2e      | P53BER2      | P53BER4     | PCBP1e        | PGRe         | PLZFe         | Pou5f1e       |
| D | Ppap2be      | SIAH2e1        | SLC30A4e              | SMAD7e    | SOCS3e     | SOX2e       | TFF1e        | TNFSF8e     | Wnt-8be       | XBP1e        | CBR3-AS1      | CCAT1-L       |
| E | CD48-AS-     | CTBP1-AS       | DBE-T                 | ERIC      | FIRRE      | GAP1inc     | HAS2-AS1     | HOTTIP      | iL7-mf-IncRNA | Lnc_DC       | IncRNA-508851 | IncRNA-ATB    |
| F | LOC100132354 | MRUL           | ncRNA-a1-same as FAI1 | ncRNA-a2  | ncRNA-a3   | ncRNA-a4    | ncRNA-a5     | ncRNA-a6    | ncRNA-a7      | ncRuPAR      | NONCO2 077    | NONCO2 61     |
| G | NONCO2 807   | NONCO2 823     | NONCO2 913            | NONCO5 26 | OIP5-mf    | Paupar      | PCAT-1       | PCGEM1      | PCNA-AS1      | PINT         | PRNCR1        | RPLP0P2       |
| H | SENCR        | SPRY4-IT1      | LncR1                 | Thril     | AS1        | BRD4        | FOXO3        | Actin       | GAPDH         | U6           | 18S rRNA      | control       |

RNAs reguladores avaliados neste experimento. Em azul, temos os eRNAs; em verde, temos os lncRNAs; em preto, temos os iniciadores dos normalizadores do cálculo de expressão relativa.

O mix com reagentes e amostras foi preparado segundo a tabela a seguir:

Tabela 10 - Reagentes do Mix do RT-qPCR

| REAGENTE                              | VOLUME (µL) |
|---------------------------------------|-------------|
| 2X SYBR Green qPCR Master Mix Buffer* | 1810,0      |
| cDNA (recém-sintetizado)              | 20,0        |
| Água RNase free                       | 1670,0      |
| Volume Total                          | 3500,0      |

Powerup™ SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems).

Foram pipetados 28µL do mix em cada poço da placa. A placa foi selada com um adesivo plástico especial para análises de PCR em Tempo Real e submetida a um *spin down* em centrífuga. A termociclagem seguiu as indicações do fabricante: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, e 40 ciclos de duas etapas, sendo uma de 15 seg a 95°C e uma de 1 min a 60°C, com posterior Curva de Dissociação (*Melting*).

Os experimentos foram realizados em duplicata para cada gêmea. Foram considerados apenas os RNAs expressos em pelo menos uma das corridas, tendo picos bem definidos, sem duplicações ou ruídos analíticos. E resultados de experimentos com boa amplificação de ao menos 2 *iniciadores* de normalizadores e sem amplificação do controle negativo.

As curvas de dissociação dos produtos finais foram analisadas para avaliar a especificidade das amplificações. A quantificação das variações dos níveis de mRNA foram baseadas em *Livak* e *Schmittgenb* (117), sendo calculadas por  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Testes estatísticos não foram realizados devido a quantidade reduzida de amostras.

### **13.2.3. Proteoma – Análise Comparativa:**

#### **13.2.3.1. Preparo da Amostra:**

As amostras conservadas em tampões de inibição de proteases foram transportadas em gelo seco até o LABMOPS, onde foram descongeladas à temperatura ambiente para prosseguimento do protocolo de extração de proteínas. As amostras foram vortexadas por 1 min e centrifugadas por 30 min a 14000xg e 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e quantificado no *Qubit* (Thermo Scientific) e o precipitado foi descartado.

A amostra foi purificada usando a coluna *Amicon® Ultra-2 mL Centrifugal Filters for DNA and Protein Purification and Concentration* (Merck Millipore) que foi lavada 2 vezes com água Mili-Q, preenchida com 2,0mL de tampão  $\text{NH}_4\text{KHCO}_3$  50mM (pH 8,0) e centrifugada por 10 min a 4000xg e 16°C. A solução filtrada pela coluna foi descartada para adição da amostra e do mesmo tampão até o volume final de 2,0mL. A coluna foi novamente centrifugada (45 min; 4000xg; 16°C) e o filtrado foi colocado em um tubo novo de 2,0mL e congelado a -80°C. A coluna foi invertida e centrifugada por 2 min a 4000xg e 16°C e o concentrado de proteínas obtido foi transferido para um tubo novo de 1,5mL e quantificado no *Qubit* (Thermo Scientific).

#### **13.2.3.2. Digestão Proteica em Solução e Limpeza das Amostras:**

Foram utilizados 50µg de proteínas de cada paciente para a digestão. Foram adicionados 25µL de *RapiGest SF Surfactant* (Waters), com posterior

incubação de 15 min a 80°C. O tubo foi centrifugado no modo *spin* e a ele foi adicionado DTT – Ditioneitol 100mM (Promega) a fim de atingir a concentração final 10mM. O tubo foi novamente incubado, agora a 60°C por 30 min. Um novo *spin* foi dado e adicionado ao tubo IAA – Iodoacetoamida 400mM (Biorad) para uma concentração final 40mM. A amostra foi incubada por 30 min, ao abrigo de luz, em temperatura ambiente. Após, foram adicionados 25µL de Tripsina – *Sequencing Grade Modified Trypsin* (Promega) (proporção de 0,5µg:50µg de proteína), com incubação da amostra por 20h, a 37°C a 1000rpm. A fim de parar a reação de tripsinização, foi adicionado TFA – Ácido Trifluoracético em água Tedia 10%, para uma concentração final 1%.

Para limpeza das amostras, foram montadas colunas C18 com resinas R2 em *ponteiras* de 200µL. A amostra foi filtrada pelo sistema com o auxílio de uma seringa e a coluna passou por sucessivas lavagens com soluções com concentrações variadas de TFA e ACN (acetonitrila). Ao fim, o filtrado foi totalmente seco no *Savant®DNA Speed Vac®Model 120* (Thermo Scientific), ressuspendido em ácido fórmico 0,1% e armazenado a -30°C até sua injeção no espectrômetro de massas.

### **13.2.3.3. Espectrometria de Massas de Alta Resolução:**

As amostras foram ressuspendidas com Ácido Fórmico 0,1% de maneira que a concentração final fosse de 1µg/µL, ou seja, adicionando o volume de Ácido Fórmico 0,1% (50µL) igual à quantidade de proteínas digeridas (50µg). Neste passo, cada amostra foi bem vortexada (*LP Vortex Mixer* – Thermo

Scientific). Por fim, o volume de amostra para injeção foi transferido para um novo *vial*, que foi vedado com parafillme para evitar a evaporação.

As amostras foram analisadas em triplicata em um sistema de cromatografia líquida (*Easy II-NanoLC 1000* – Thermo Scientific) acoplada à espectrometria de massas de alto desempenho e resolução (*Q-Exactive Plus* – Thermo Scientific) com analisador *Q Exactive hybrid quadrupole-Orbitrap* (Thermo Scientific).

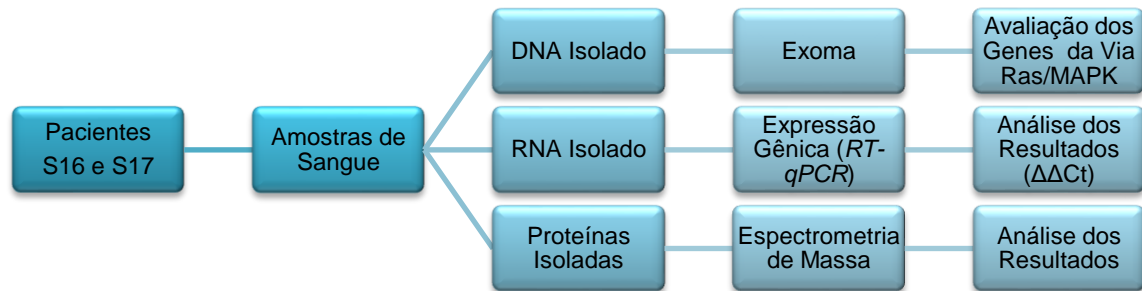
Foi realizado anteriormente um teste com volume de injeção de 2 $\mu$ L, que não obteve qualidade aprovada, decidindo então aumentá-lo. O novo volume de injeção determinado foi de 4 $\mu$ L (totalizando 4 $\mu$ g de amostra por injeção), utilizando duplicatas técnicas. Para isso, o volume inserido no *vial* foi no mínimo 10 $\mu$ L. A separação foi feita utilizando os solventes A (5% Acetonitrila / 0,1% Ácido Fórmico) e B (95% Acetonitrila / 0,1% Ácido Fórmico). O gradiente teve duração total de 180 min, tendo início com 2% de B aumentando gradualmente para 20% durante 133 min. O segundo passo teve duração de 34 min, aumentando o gradiente de 20% a 40% de B. O terceiro passo teve duração de 5 min e aumentou de 40% a 95% de B. Por fim, o gradiente se manteve estável por 8 min, até completar os 180 min do método. Os dados foram analisados no programa *Proteome Discoverer 2.1* (Thermo Scientific).

#### **13.2.3.4. Análise *in silico* dos Resultados:**

As proteínas foram identificadas utilizando o banco de dados *UniProt* (<http://www.uniprot.org>) (118). Os resultados obtidos foram tratados no programa *Excel* (Microsoft), para obtenção da lista de proteínas exclusivas e comuns de

cada paciente, com posterior análise no programa *FunRich* (<http://www.funrich.org/>) (119,120) das vias de sinalização, função, domínios proteicos e redes de interação, das proteínas detectadas.

Figura 37 - Fluxograma Metodológico do Capítulo 3



Seguimento das análises das pacientes S16 e S17 para composição dos resultados do capítulo 3, desde a sua entrada (pelo projeto de doutorado da MSc Natana Chaves Rabelo) até todas as análises comparativas realizadas.

## **14.RESULTADOS:**

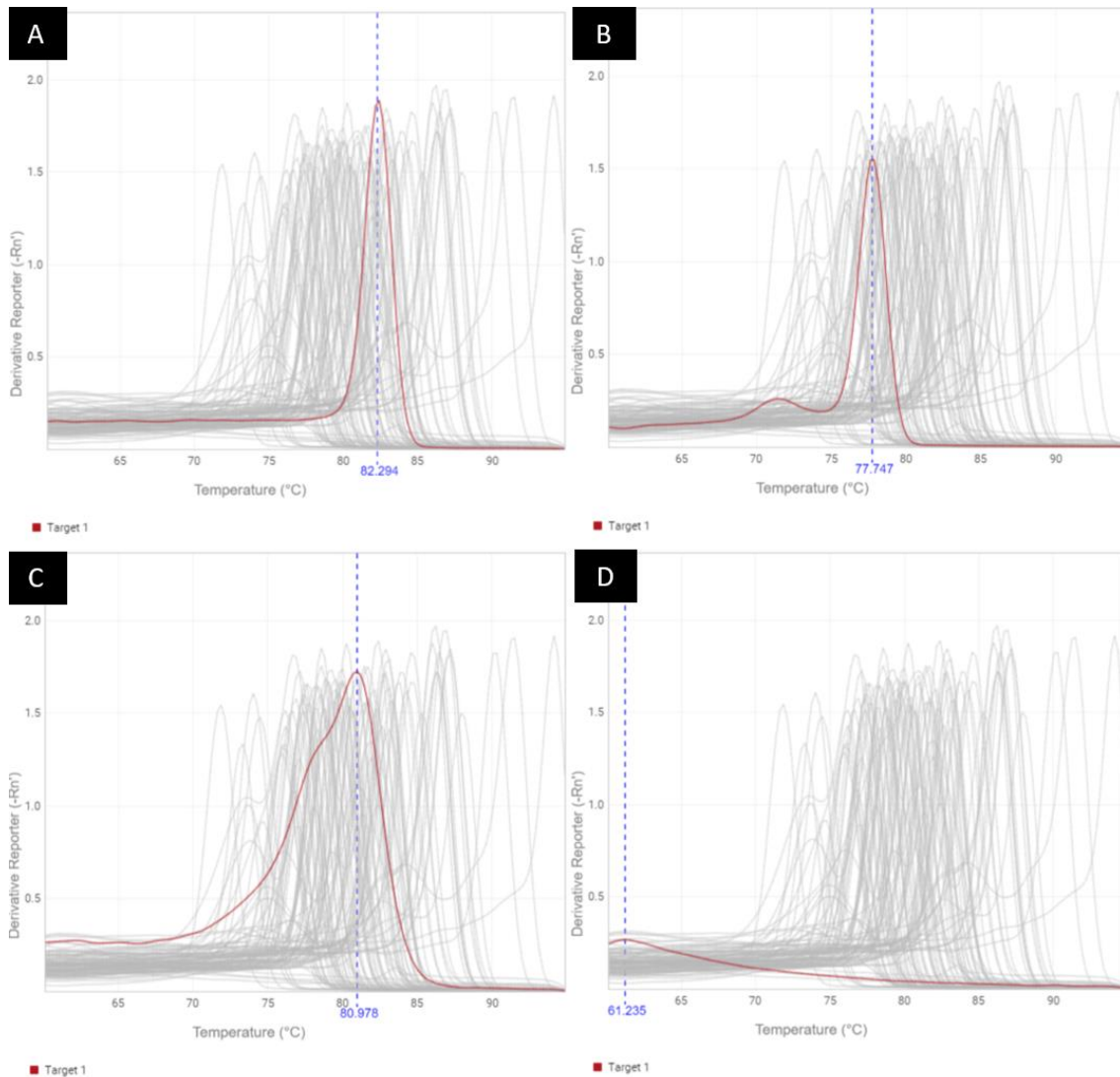
### **14.1.Expressão Gênica de RNAs Reguladores – Análise Comparativa:**

Os gráficos da expressão gênica foram analisados individualmente para cada RNA, em ambas as pacientes e separadamente nas duplicatas das corridas. O objetivo de tal análise minuciosa foi avaliar a qualidade da corrida, a qualidade dos gráficos de resultados gerados, a ausência de ruídos e interferentes. Foram desconsiderados gráficos com mais de um pico, picos alongados, picos ruidosos e sem amplificação (como os exemplos da Figura 38).

Para o cálculo da expressão relativa (117) foram considerados apenas RNAs com ao menos um pico limpo em ambas as gêmeas. Os resultados foram obtidos utilizando S16 como controle, tendo em vista que S17 possui um fenótipo mais grave até o momento. Não foram usados controles saudáveis dada a dificuldade em se fazê-los de forma pareada com as gêmeas e partindo dos achados na literatura que consideram os estudos entre gêmeos os melhores pares possíveis tanto molecularmente, por terem uma genética praticamente idêntica, quanto por influência de fatores externos, por serem submetidos ao mesmo ambiente, alimentação etc. (108).



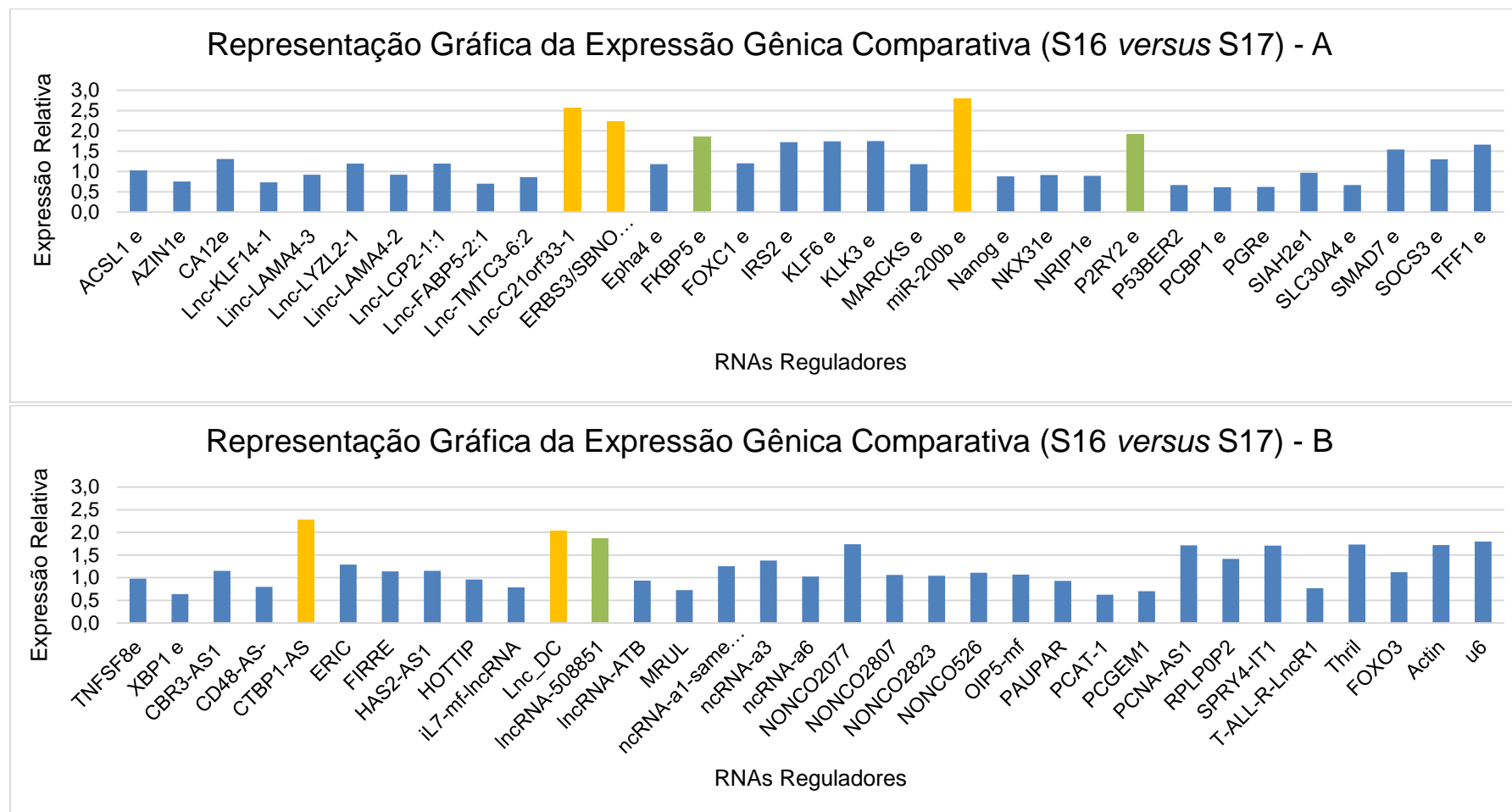
Figura 38 - Análise das Curvas de Dissociação (Melting) de RNAs



Resultados da Gêmea S17 – Exemplos de curvas e suas análises: (A) pico limpo e único, considerado para o cálculo; (B) pico duplo, descartado; (C) pico prolongado, descartado; (D) poço sem amplificação, descartado.

Considerou-se com uma expressão diferencial significativa apenas os RNAs com valor do cálculo igual ou superior a 2 (57) (Apêndice IV). Desta forma, somente os RNAs Lnc-C21orf33-1, ERBS3/SBNO2e, miR-200be, CTBP1-AS e Lnc\_DC apresentavam expressão consideravelmente aumentada na S17 (Figura 39).

Figura 39 - Resultados de Expressão Gênica Comparativa (S16 como Controle)

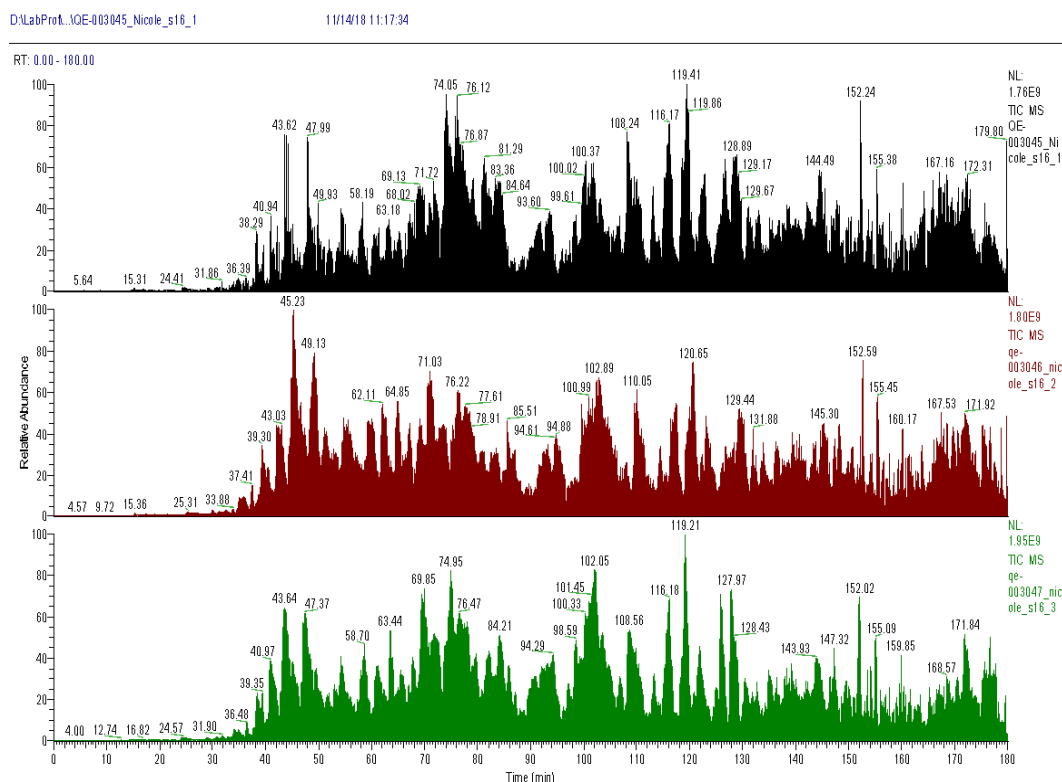


Resultados da Expressão Gênica Comparativa entre as Gêmeas: O cálculo foi realizado utilizando a gêmea S16 como “controle”. Em laranja, temos marcados os RNAs com *fold change* igual ou superior a 2, ou seja, com expressão diferencial significativa; em verde, temos marcados os RNAs com *fold change* superior a 1,8 e inferior a 2,0..

## 14.2. Proteoma – Análise Comparativa:

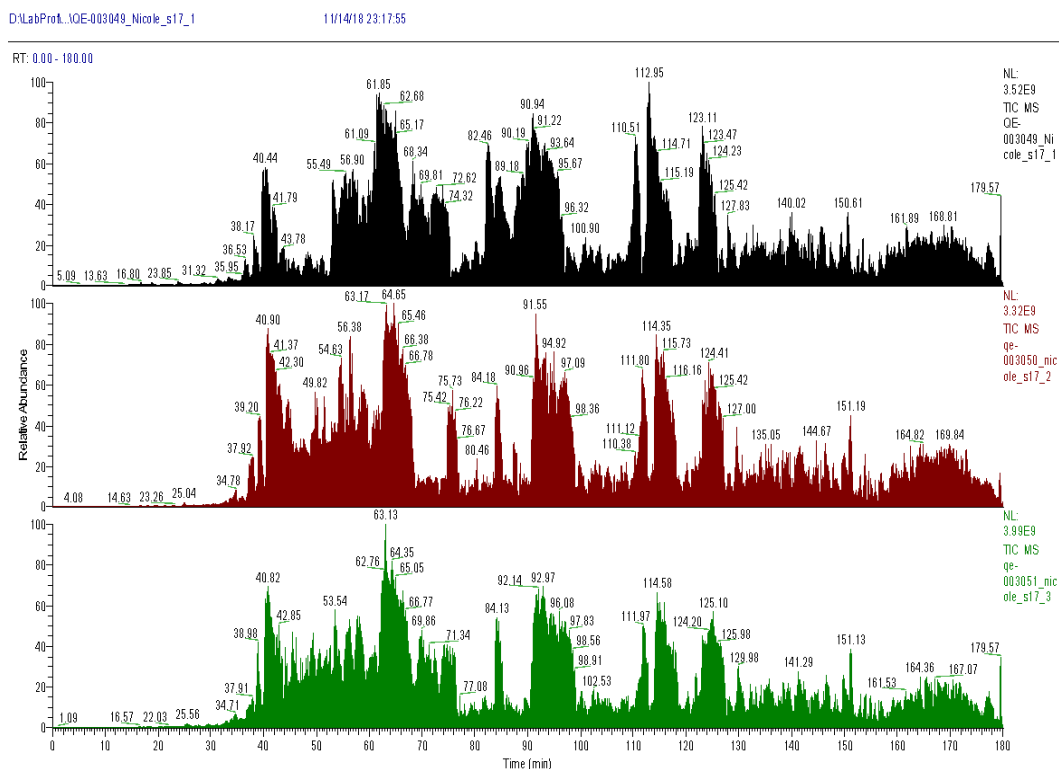
A corrida das amostras foi realizada em triplicata para melhor avaliação da consistência dos resultados. Nas Figuras 40 e 41 pode-se ver que os gráficos apresentam resultado satisfatório para a avaliação.

Figura 40 - Gráficos da Triplicata da Paciente S16



Gráficos dos peptídeos ionizados em cada corrida da paciente S16, mostrando a similaridade de padrões nas diferentes corridas.

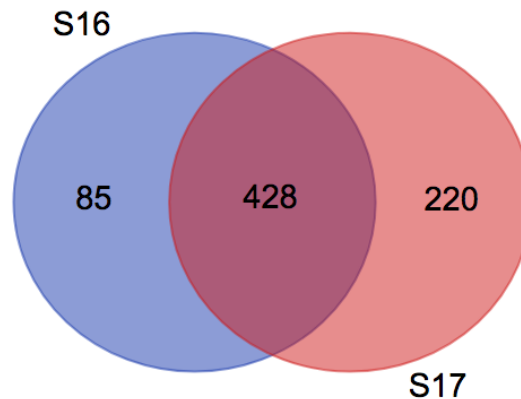
Figura 41 - Gráficos da Triplicata da Paciente S17



Gráficos dos peptídeos ionizados em cada corrida da paciente S17, mostrando a similaridade de padrões nas diferentes corridas.

A avaliação dos dados gerados apresentou a lista de proteínas de cada amostra de leucócitos (S16: 513 proteínas; S17: 648 proteínas), que foram identificadas através do banco de dados *UniProt* (118). Destas, 428 eram comuns a ambas as gêmeas. Visando a caracterização das diferenças entre elas, avaliou-se as proteínas exclusivas de cada uma: 85 para S16 e 220 para S17 (Figura 42).

Figura 42 - Diagrama de Venn para Resultado do Proteoma das Gêmeas

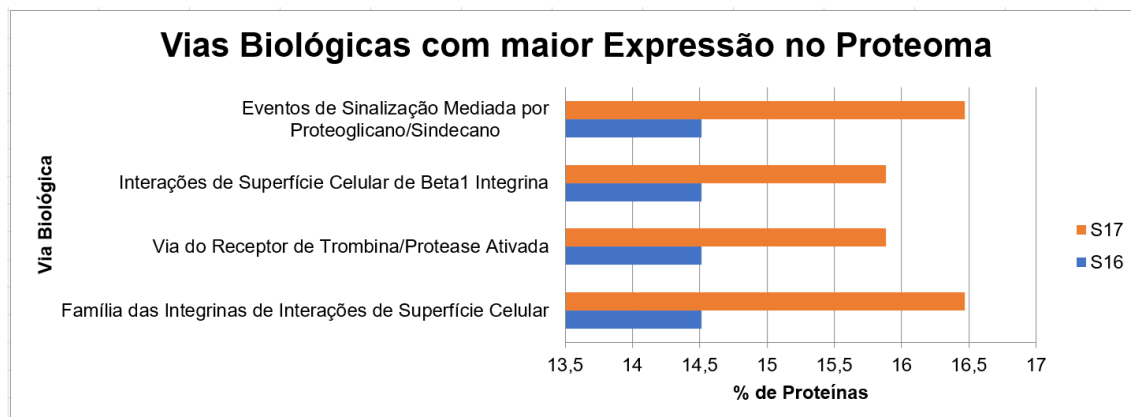


O círculo em azul representa as 85 proteínas expressas somente na amostra da paciente S16. O círculo em rosa representa as 220 proteínas expressas somente na amostra da paciente S17. A interseção dos círculos representa as 428 proteínas expressas nas amostras de ambas as pacientes S16 e S17.

Foram geradas listas com as proteínas exclusivas de cada uma das pacientes (Apêndice V para S16; Apêndice VI para S17) e as mesmas foram analisadas pelo programa *FunRich* (119,120), sendo agrupadas de acordo com: 1) suas vias biológicas, 2) seus processos biológicos e 3) seus fatores de transcrição preditos.

Para as vias biológicas, foi realizado um ponto de corte arbitrário de 30. O gráfico gerou 26 vias com diferença entre as pacientes. Dessas, 4 foram selecionadas por estarem potencialmente relacionadas a processos descritos na SN tais como coagulopatias (86), cardiopatias (121–123) desordens do aprendizado (124,125) e são apresentadas na Figura 43.

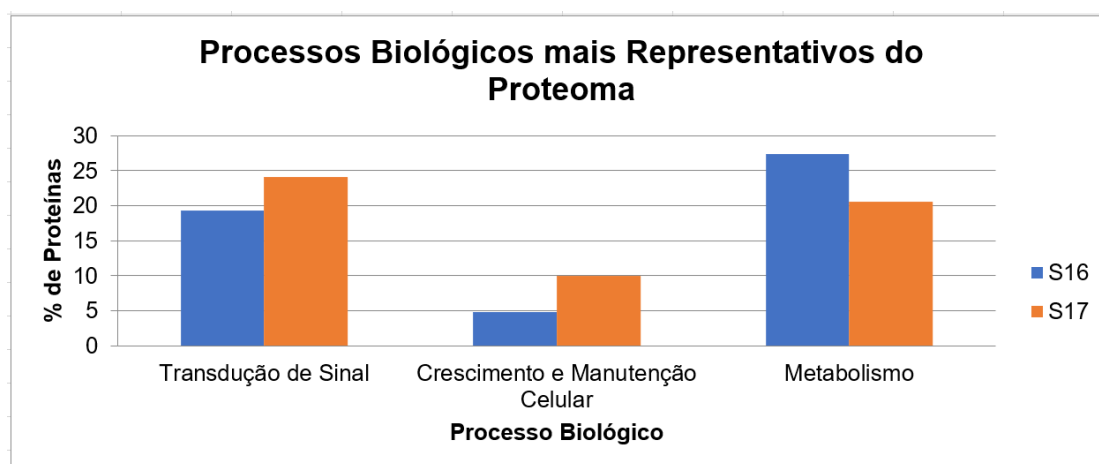
Figura 43 - Proteoma Comparativo por Vias Biológicas



As barras em azul informam o percentual de proteínas da amostra da paciente S16 relacionadas a cada uma das vias biológicas listadas. As barras em laranja informam o percentual de proteínas da amostra da paciente S17 relacionadas a cada uma das vias biológicas listadas.

Para os processos biológicos, foi realizado um ponto de corte arbitrário de 30 que resultou em 20 processos com diferença entre as pacientes. Desses, 3 foram selecionados de acordo com as alterações moleculares que possam estar relacionadas com a via Ras/MAPK (1,2,4,16,19,126) e são apresentadas na Figura 44.

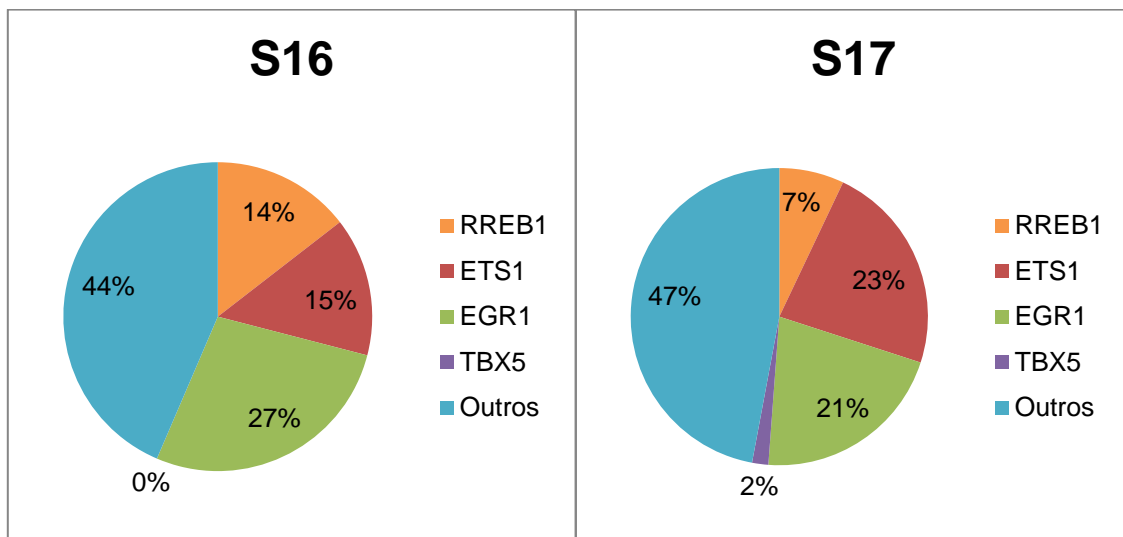
Figura 44 - Proteoma Comparativo por Processos Biológicos



As colunas em azul informam o percentual de proteínas da amostra da paciente S16 relacionadas a cada um dos processos biológicos listados. As colunas em laranja informam o percentual de proteínas da amostra da paciente S17 relacionadas a cada um dos processos biológicos listados.

Foi realizado um ponto de corte aleatório de 30 para os fatores de transcrição preditos como ligantes em sítios dos genes codificadores das proteínas identificadas pelo proteoma. O gráfico também gerou uma lista de 20 fatores de transcrição com diferença entre as pacientes. Foram selecionados 4 fatores de transcrição de acordo com alguns dados já relatados na literatura para fisiopatologias das RASopatias (Figura 45).

Figura 45 - Proteoma Comparativo por Fatores de Transcrição



O gráfico de pizza representa, em cada fatia, o percentual do fator de transcrição atuante nos sítios de transcrição das proteínas encontradas nas amostras das gêmeas. O comparativo entre os gráficos das pacientes S16 e S17 evidencia a diferença entre as amostras.

## 15.DISSCUSSÃO:

Boa parte dos estudos com RNAs reguladores concentra-se em avaliar os níveis de expressão em doenças específicas (como câncer, por exemplo), não se tendo muitas informações sobre os alvos regulados por tais RNAs.

Os RNAs que compõem a placa do kit *Regulatory RNA qPCR Profiler* (System Biosciences), usado nos experimentos deste trabalho, foram selecionados com base em publicações científicas, que demonstraram a relação dos RNAs com algum tipo celular ou patologia específicos.

Dentre os RNAs com aumento de expressão na paciente S17 (fenótipo mais grave) em relação à paciente S16, temos que o Lnc-C21orf33-1 já foi descrito em monócitos primários (127) e o Lnc\_DC desempenha um importante papel na diferenciação de células dendríticas (128), tendo sua transcrição regulada por insulina, podendo regular a expressão de genes ligados ao metabolismo (129). A detecção de tais moléculas neste experimento corrobora com a origem das amostras: o RNA total foi extraído a partir de leucócitos do sangue.

Sabe-se que o ERBS3/SBNO2e age como potencializador dos sítios de ligação de receptores de estrogênio em células MCF7, uma linhagem celular de câncer mama humano (130). O miR-200be já teve sua expressão descrita como aumentada em células de câncer de mama humano (131), enquanto que o CTBP1-AS atua no núcleo, regulando a expressão de inúmeros genes, alguns deles envolvidos na progressão tumoral (132) e já foi associado ao câncer de próstata (133) e à síndrome do ovário policístico (134).



Quatro dos cinco RNAs reguladores apresentados neste trabalho já foram descritos em mecanismos de câncer e, tanto esta patologia quanto as RASopatias, resultam de alterações em vias essenciais para a progressão celular. As descrições apresentadas aqui podem servir de base para estudos posteriores que visem aprofundar as relações entre RASopatias e seus espectros fenotípicos com os RNAs reguladores.

O uso de sangue periférico para as análises comparativas justifica-se pelo difícil acesso aos tecidos afetados de forma diferencial entre as gêmeas (coração, sistema nervoso central e coluna). Estudos para outras patologias, como Mal de Alzheimer (135), também utilizam da mesma estratégia para evitar coletas e procedimentos invasivos.

O sangue, por ser um fluido que circula por todo o corpo, pode fornecer dados sistêmicos do estado geral de um dado organismo. Este ponto é relevante para o estudo de proteomas pois possibilita detectar mínimas alterações de expressão proteica.

O filtro usado para selecionar as vias biológicas relevantes para este estudo foi baseado em dados da literatura para as diferenças fenotípicas entre as gêmeas. Nota-se que, mesmo apresentando grupos de proteínas distintos nessa análise, a paciente S17 possui um percentual mais elevado de proteínas para todas as vias em destaque.

A via de trombina foi destacada neste estudo pois coagulopatias já foram descritas como comuns em pacientes com SN (86). Ambas as pacientes foram diagnosticadas pelo Hemorio com doença de *von Willebrand*, tal patologia se caracteriza pela redução de fatores de coagulação no sangue.

Diversos estudos apontam a relação entre alterações moleculares da via Ras/MAPK com os atrasos cognitivos de pacientes com RASopatias (124,136–139). Há uma relação já determinada entre proteoglicanos e alterações cognitivas, com aumento da expressão dessas moléculas extracelulares em astrócitos de pacientes com SC (124,125).

Já as integrinas, já foram amplamente descritas como participantes da morfogênese do coração (121–123,140). A diferença de expressão de proteínas desta via biológica pode explicar o porquê de umas das gêmeas ter desenvolvido uma cardiopatia. Para elucidação desta teoria, necessita-se da realização de ensaios funcionais para as proteínas desta via.

Os processos biológicos aqui destacados (transdução de sinal; crescimento e manutenção celular; metabolismo) são diretamente relacionados às funções celulares desempenhadas pela via Ras/MAPK. Aprofundar o estudo da expressão de suas proteínas também pode levar a um maior entendimento das variações fenotípicas das RASopatias.

Os resultados dos gráficos de fatores de transcrição não representam a porcentagem desses nas amostras, mas sim a porcentagem de genes que potencialmente sejam regulados por esses fatores e que foram detectados na forma de proteínas. Destacou-se o RREB1 que faz parte da via Ras/MAPK (141); o ETS1 já descrito em defeitos cardíacos (142,143) e atuando na diferenciação de astrócitos (144); o EGR1, associado ao desenvolvimento de neurônios (145); e o TBX5 que já foi associado a defeitos cardíacos (142,146).

Além dessa análise descritiva e qualitativa que apresenta as proteínas exclusivamente presentes em uma gêmea *versus* a outra gêmea, também

poderiam ser feitas análises quantitativas para comparar a expressão das proteínas comuns a ambas. Esta análise necessitaria de curvas padrões e programas mais robustos.

Os resultados aqui apresentados são descritivos e necessitam de validação funcional em bancada para melhor entendimento do papel dessas proteínas e desses RNAs reguladores nas RASopatias e na modulação de seus fenótipos.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## 16. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Doenças genéticas não são determinadas apenas por mutações em genes, mas por desregulações em qualquer ponto de sua via. Sendo assim, a ampliação da investigação de alterações para além dos genes pode fechar lacunas diagnósticas ainda pendentes.

Para estudos com miRNAs, é de suma importância atentar-se para a predição de seus alvos, além da localização de suas mutações e presença em homozigose ou heterozigose nos pacientes. Todos esses pontos devem ser avaliados por conta das limitações técnicas que ainda existem para este modelo de estudo.

As alterações genéticas podem ser avaliadas pelo efeito nos produtos da transcrição e da tradução. Para o primeiro caso, avalia-se os níveis de expressão do mRNA de um determinado gene. Neste caso, vale realizar estudos *in silico* prévios para escolher o tecido ideal para realização da investigação. Tecidos com baixa expressão do gene de interesse e/ou não passíveis de coleta por motivos éticos (para humanos) são empecilhos para o estudo.

Ensaio de varredura geram um grande número de dados que podem ser úteis para indicar novos caminhos para ensaios funcionais. A escolha de uma placa comercial previamente montada para expressão de RNAs reguladores facilita as análises quanto a padronização dos *iniciadores*, porém pode conter RNAs que não são de interesse para a patologia que está sendo pesquisada. De qualquer forma, os resultados aqui apresentados indicam RNAs que podem ter

seus alvos e mecanismos de regulação estudados para tentar compreender melhor a variabilidade fenotípica da doença.

Seguindo a linha de raciocínio descritiva que o presente trabalho propõe, as análises de proteoma também forneceram dados importantes para posteriores validações funcionais e quantitativas que possam justificar as diferenças encontradas entre as gêmeas. A busca por marcadores em sangue periférico é uma boa ferramenta para facilitar o diagnóstico dessa e de outras patologias.

Os dados aqui descritos podem abrir novas vertentes de pesquisa, com estudos mais aprofundados, para diagnóstico das RASopatias.

## **CONCLUSÕES**

## 17.CONCLUSÕES:

Este trabalho apresentou dados descritivos a cerca de RNAs reguladores e proteínas expressas em pacientes com RASopatias.

As variantes em miRNAs detectadas pelo exoma foram avaliadas pelo *miRTarBase*. Não se estabeleceu correlações com as RASopatias devido ao pequeno número da amostra e da presença de mutações em heterozigose.

Foram apresentadas estratégias para avaliar a viabilidade *in silico* de estudos de expressão gênica antes de seu teste em bancada. Mas não foi possível realizar a análise de expressão do gene *HRAS*.

Foram descritos estudos comparativos entre gêmeas com fenótipos discordantes para síndrome de Noonan. Os dados aqui apresentados sobre RNAs reguladores e proteoma não determinam o diagnóstico das pacientes, mas apresentam novas frentes de pesquisa para diagnóstico e entendimento dos moduladores de fenótipo das RASopatias.



## 18.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Rauen KA. The RASopathies. *Annu Rev Genomics Hum Genet* [Internet]. 2013 Aug 31;14(1):355–69. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-genom-091212-153523>
2. Aoki Y, Matsubara Y. Ras/MAPK syndromes and childhood hematological diseases. *Int J Hematol* [Internet]. 2013 Jan 19;97(1):30–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12185-012-1239-y>
3. Aoki Y, Niihori T, Narumi Y, Kure S, Matsubara Y. The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Hum Mutat* [Internet]. 2008 Aug [cited 2017 Jun 8];29(8):992–1006. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/humu.20748>
4. Bezniakow N, Gos M, Obersztyn E. The RASopathies as an example of RAS/MAPK pathway disturbances - clinical presentation and molecular pathogenesis of selected syndromes. *Dev period Med* [Internet]. 2014;18(3):285–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25182392>
5. OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man [Internet]. 2017 [cited 2017 Sep 13]. Available from: <https://www.omim.org/#>
6. Rosser TL, Packer RJ. Neurocognitive dysfunction in children with neurofibromatosis type 1. *Curr Neurol Neurosci Rep* [Internet]. 2003 Mar [cited 2017 Jun 11];3(2):129–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12583841>
7. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of MicroRNA–Target Recognition. James C. Carrington, editor. *PLoS Biol* [Internet]. 2005 Feb 15 [cited 2017 May 19];3(3):e85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15723116>
8. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2009 Mar;11(3):228–34. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncb0309-228>
9. Amaral BA do, Nonaka CFW, Freitas RDA, Souza LB De, Pinto LP. MicroRNAs – Biogênese , funções e seu papel potencial na carcinogênese oral. *Odontol Clin-Cient*. 2010;9(2):105–9.
10. Sassen S, Miska EA, Caldas C. MicroRNA—implications for cancer. *Virchows Arch* [Internet]. 2008 Jan 27;452(1):1–10. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00428-007-0532-2>
11. Zhang W, Dahlberg JE, Tam W. MicroRNAs in Tumorigenesis. *Am J Pathol* [Internet]. 2007 Sep;171(3):728–38. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010620056>

12. Kung JTY, Colognori D, Lee JT. Long Noncoding RNAs: Past, Present, and Future. *Genetics* [Internet]. 2013;193(3):651–69. Available from: <http://www.genetics.org/cgi/doi/10.1534/genetics.112.146704>
13. Barbosa EB, Vidotto A, Polachini GM, Henrique T, Trovó de Marqui AB, Tajara EH. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. *Rev Assoc Med Bras* [Internet]. 2012 May;58(3):366–75. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0104423012705237>
14. García-Cruz R, Camats M, Calin GA, Liu C-G, Volinia S, Taccioli C, et al. The role of p19 and p21 H-Ras proteins and mutants in miRNA expression in cancer and a Costello syndrome cell model. *BMC Med Genet* [Internet]. 2015 Dec 3;16(1):46. Available from: <http://bmcmmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12881-015-0184-z>
15. Sedani A, Cooper DN, Upadhyaya M. An emerging role for microRNAs in NF1 tumorigenesis. *Hum Genomics* [Internet]. 2012;6(1):23. Available from: <http://humgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-7364-6-23>
16. Tidyman WE, Rauen KA. Expansion of the RASopathies. *Curr Genet Med Rep* [Internet]. 2016 Sep 1;4(3):57–64. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s40142-016-0100-7>
17. Diretório dos Grupos de Pesquisa no Brasil [Internet]. 2017 [cited 2017 Sep 13]. Available from: <http://dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/5465462022316329>
18. Horovitz DDG, Cardoso MHC de A, Llerena JC, de Mattos RA. Birth defects in Brazil and health care: proposals for public policies in clinical genetics. *Cad Saude Publica* [Internet]. 2006 Dec [cited 2017 Jun 11];22(12):2599–609. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17096039>
19. Jindal GA, Goyal Y, Burdine RD, Rauen KA, Shvartsman SY. RASopathies: unraveling mechanisms with animal models. *Dis Model Mech* [Internet]. 2015 Aug 1;8(8):769–82. Available from: <http://dmm.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dmm.022442>
20. Aoki Y, Niihori T, Inoue S, Matsubara Y. Recent advances in RASopathies. *J Hum Genet* [Internet]. 2016 Jan 8;61(1):33–9. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/jhg.2015.114>
21. Gripp KW, Lin AE. Costello syndrome: A Ras/mitogen activated protein kinase pathway syndrome (rasopathy) resulting from HRAS germline mutations. *Genet Med* [Internet]. 2011 Sep;14(3):1. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00125817-900000000-99582>
22. Siegel DH, Mann JA, Krol AL, Rauen KA. Dermatological phenotype in Costello syndrome: consequences of Ras dysregulation in development. *Br J Dermatol* [Internet]. 2012 Mar;166(3):601–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15370834>

23. Cançado FH da SQ, Silva LCP da, Taitson PF, Andrade ACDV de, Pithon MM, Oliveira DD. Do you know this syndrome? Leopard syndrome. *An Bras Dermatol* [Internet]. 2017 Feb;92(1):127–9. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0365-05962017000200271&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962017000200271&lng=en&tlng=en)
24. Messiaen L, Yao S, Brems H, Callens T, Sathienkijkanchai A, Denayer E, et al. Clinical and mutational spectrum of neurofibromatosis type 1-like syndrome. *JAMA* [Internet]. 2009 Nov 18;302(19):2111–8. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2009.1663>
25. Sakai N, Maeda T, Kawakami H, Uchiyama M, Harada K, Tsuboi R, et al. Family with Legius syndrome (neurofibromatosis type 1-like syndrome). *J Dermatol* [Internet]. 2015 Jul;42(7):703–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/1346-8138.12862>
26. Rajalingam K, Schreck R, Rapp UR, Albert S. Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2007 Aug [cited 2017 Jun 12];1773(8):1177–95. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488907000286>
27. Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* [Internet]. 2006 Jan 11 [cited 2017 Jun 12];24(1):21–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16393692>
28. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* [Internet]. 2009 Feb 20 [cited 2013 Nov 7];136(4):642–55. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2675692&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
29. Roy S, Khanna S, Hussain S-RA, Biswas S, Azad A, Rink C, et al. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2017 Jun 11];82(1):21–9. Available from: <https://academic.oup.com/cardiovasres/article-lookup/doi/10.1093/cvr/cvp015>
30. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* [Internet]. 2010 Nov 1 [cited 2017 Jun 11];56(11):1733–41. Available from: <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2010.147405>
31. Alevizos I, Alexander S, Turner RJ, Illei GG. MicroRNA expression profiles as biomarkers of minor salivary gland inflammation and dysfunction in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2011 Feb [cited 2017 Jun 8];63(2):535–44. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.30131>
32. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data [Internet]. Vol. 42, *Nucleic Acids Research*. 2014 [cited 2017 Sep 13]. p. D68–73. Available from:

- <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkt1181>
33. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2014 Jan [cited 2017 Jun 11];42(Database issue):D68-73. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkt1181>
  34. Hébert SS, De Strooper B. Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease. *Trends Neurosci* [Internet]. 2009 Apr [cited 2017 Nov 27];32(4):199–206. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19268374>
  35. Stanczyk J, Pedrioli DML, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, et al. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2008 Apr [cited 2013 Nov 9];58(4):1001–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18383392>
  36. Wiklund ED, Gao S, Hulf T, Sibbritt T, Nair S, Costea DE, et al. MicroRNA Alterations and Associated Aberrant DNA Methylation Patterns across Multiple Sample Types in Oral Squamous Cell Carcinoma. Zhang B, editor. *PLoS One* [Internet]. 2011 Nov 22 [cited 2013 Nov 9];6(11):e27840. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3222641&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  37. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic D a, Abemayor E, et al. Salivary microRNA: Discovery, Characterization, and Clinical Utility for Oral Cancer Detection. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2009 Sep 1 [cited 2013 Nov 9];15(17):5473–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2752355&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  38. Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG. The Majority of MicroRNAs Detectable in Serum and Saliva Is Concentrated in Exosomes. Afarinkia K, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Mar 9 [cited 2013 Nov 9];7(3):e30679. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3302865&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  39. Zhu H, Fan G-C. Extracellular/circulating microRNAs and their potential role in cardiovascular disease. *Am J Cardiovasc Dis* [Internet]. 2011 Jul 30 [cited 2013 Nov 10];1(2):138–49. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3207246&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  40. Mishra S, Lin C-L, Huang TH-M, Bouamar H, Sun L-Z. MicroRNA-21 inhibits p57Kip2 expression in prostate cancer. *Mol Cancer* [Internet]. 2014 Sep 12 [cited 2017 Jun 11];13(1):212. Available from: <http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-4598-13-212>
  41. Dzikiewicz-Krawczyk A, Macieja A, Mały E, Januszkiewicz-Lewandowska D, Mosor M, Fichna M, et al. Polymorphisms in microRNA target sites

- modulate risk of lymphoblastic and myeloid leukemias and affect microRNA binding. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2014 Jun 2 [cited 2017 Jun 8];7(1):43. Available from: <http://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-8722-7-43>
42. Dzikiewicz-Krawczyk A. MicroRNA polymorphisms as markers of risk, prognosis and treatment response in hematological malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2015 Jan [cited 2017 Jun 11];93(1):1–17. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1040842814001474>
  43. Liu S, An J, Lin J, Liu Y, Bao L, Zhang W, et al. Single nucleotide polymorphisms of microRNA processing machinery genes and outcome of hepatocellular carcinoma. Zhang Z, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Mar 27 [cited 2017 Jun 11];9(3):e92791. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0092791>
  44. Naccarati A, Rosa F, Vymetalkova V, Barone E, Jiraskova K, Di Gaetano C, et al. Double-strand break repair and colorectal cancer: gene variants within 3' UTRs and microRNAs binding as modulators of cancer risk and clinical outcome. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Apr 26 [cited 2017 Jun 11];7(17):23156–69. Available from: <http://www.oncotarget.com/abstract/6804>
  45. Tang R, Qi Q, Wu R, Zhou X, Wu D, Zhou H, et al. The polymorphic terminal-loop of pre-miR-1307 binding with MBNL1 contributes to colorectal carcinogenesis via interference with Dicer1 recruitment. *Carcinogenesis* [Internet]. 2015 Aug [cited 2017 Jun 11];36(8):867–75. Available from: <https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgv066>
  46. Stegeman S, Amankwah E, Klein K, O'Mara TA, Kim D, Lin H-Y, et al. A Large-Scale Analysis of Genetic Variants within Putative miRNA Binding Sites in Prostate Cancer. *Cancer Discov* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2017 Jun 11];5(4):368–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25691096>
  47. Maccauda A, Calvetti D, Maccari G, Hemminki K, F?rsti A, Goldschmidt H, et al. Identification of miRSNPs associated with the risk of multiple myeloma. *Int J Cancer* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2017 Jun 11];140(3):526–34. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.30465>
  48. Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, et al. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2006 Jun 13 [cited 2017 Jun 11];103(24):9136–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16754881>
  49. Masliah-Planchon J, Pasmant E, Luscan A, Laurendeau I, Ortonne N, Hivelin M, et al. MicroRNAome profiling in benign and malignant neurofibromatosis type 1-associated nerve sheath tumors: evidences of PTEN pathway alterations in early NF1 tumorigenesis. *BMC Genomics* [Internet]. 2013;14(1):473. Available from: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-14->

473

50. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1977 Dec [cited 2017 Jun 11];74(12):5463–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/271968>
51. Lapunzina P, López RO, Rodríguez-Laguna L, García-Miguel P, Martínez AR, Martínez-Glez V. Impact of NGS in the medical sciences: Genetic syndromes with an increased risk of developing cancer as an example of the use of new technologies. *Genet Mol Biol* [Internet]. 2014 Mar [cited 2017 Jun 11];37(1 Suppl):241–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24764758>
52. Varuzza L. Introdução à análise de dados de sequenciadores de nova geração. In: Leonardo Varuzza's Site [Internet]. 2013. p. 1–76. Available from: [http://lvaruzza.com/files/apostila\\_bioinfo\\_2.0.1.pdf](http://lvaruzza.com/files/apostila_bioinfo_2.0.1.pdf)
53. miRTarBase: the experimentally validated microRNA-target interactions database [Internet]. 2017 [cited 2017 Sep 17]. Available from: <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>
54. Hsu S, Lin F, Wu W, Liang C, Huang W, Chan W, et al. miRTarBase : a database curates experimentally validated microRNA – target interactions. 2011;39(November 2010):163–9.
55. Hsu S, Tseng Y, Shrestha S, Lin Y, Khaleel A, Chou C, et al. miRTarBase update 2014 : an information resource for experimentally validated miRNA-target interactions. 2014;42(December 2013):78–85.
56. Chou C, Chang N, Shrestha S, Hsu S, Lin Y, Lee W, et al. miRTarBase 2016 : updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. 2016;44(November 2015):239–47.
57. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem* [Internet]. 2009 Apr 1;55(4):611–22. Available from: <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2008.112797>
58. El Hadi H, Abdellaoui-Maane I, Kottwitz D, El Amrani M, Bouchoutrouch N, Qmichou Z, et al. Development and evaluation of a novel RT-qPCR based test for the quantification of HER2 gene expression in breast cancer. *Gene* [Internet]. 2017 Mar;605:114–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2016.12.027>
59. Hruz T, Wyss M, Docquier M, Pfaffl MW, Masanetz S, Borghi L, et al. RefGenes: identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization. *BMC Genomics* [Internet]. 2011 Dec 21;12(1):156. Available from: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-12-156>
60. Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on

- housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* [Internet]. 2000 Nov;46(1–2):69–81. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165022X00001299>
61. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2001 Jan 1 [cited 2019 May 3];29(1):308–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11125122>
  62. Liu X, Wu C, Li C, Boerwinkle E. dbNSFP v3.0: A One-Stop Database of Functional Predictions and Annotations for Human Nonsynonymous and Splice-Site SNVs. *Hum Mutat* [Internet]. 2016 Mar [cited 2019 May 3];37(3):235–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26555599>
  63. Chou C-H, Shrestha S, Yang C-D, Chang N-W, Lin Y-L, Liao K-W, et al. miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2018 Jan 4 [cited 2018 Nov 6];46(D1):D296–302. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29126174>
  64. Chen C. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2005 Nov 27;33(20):e179–e179. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gni178>
  65. Rauen K. HRAS and the Costello syndrome. *Clin Genet* [Internet]. 2007 Jan 23;71(2):101–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-0004.2007.00743.x>
  66. Sol-Church K, Stabley DL, Demmer LA, Agbulos A, Lin AE, Smoot L, et al. Male-to-male transmission of costello syndrome: G12S HRAS germline mutation inherited from a father with somatic mosaicism. *Am J Med Genet Part A*. 2009;149(3):315–21.
  67. Gripp KW, Stabley DL, Nicholson L, Hoffman JD, Sol-Church K. Somatic mosaicism for an HRAS mutation causes Costello syndrome. *Am J Med Genet A* [Internet]. 2006 Oct 15;140(20):2163–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16969868>
  68. Bertola D, Buscarilli M, Stabley DL, Baker L, Doyle D, Bartholomew DW, et al. Phenotypic spectrum of Costello syndrome individuals harboring the rare HRAS mutation p.Gly13Asp. *Am J Med Genet Part A* [Internet]. 2017 May;173(5):1309–18. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.a.38178>
  69. Gripp KW. Tumor predisposition in Costello syndrome. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* [Internet]. 2005 Aug 15;137C(1):72–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.c.30065>
  70. Kratz CP, Franke L, Peters H, Kohlschmidt N, Kazmierczak B, Finckh U, et al. Cancer spectrum and frequency among children with Noonan, Costello, and cardio-facio-cutaneous syndromes. *Br J Cancer* [Internet]. 2015 Apr 14;112(8):1392–7. Available from:

- <http://www.nature.com/doi/10.1038/bjc.2015.75>
71. Kratz CP, Rapisuwon S, Reed H, Hasle H, Rosenberg PS. Cancer in Noonan, Costello, cardiofaciocutaneous and LEOPARD syndromes. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* [Internet]. 2011 May 15;157(2):83–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.c.30300>
  72. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool [Internet]. [cited 2018 Nov 6]. Available from: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
  73. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* [Internet]. 1990 Oct 5 [cited 2018 Nov 6];215(3):403–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2231712>
  74. McGinnis S, Madden TL. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2004 Jul 1 [cited 2018 Nov 6];32(Web Server):W20–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15215342>
  75. Ye J, McGinnis S, Madden TL. BLAST: improvements for better sequence analysis. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2006 Jul 1 [cited 2018 Nov 6];34(Web Server):W6–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16845079>
  76. Mount DW. Using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). *Cold Spring Harb Protoc* [Internet]. 2007 Jul 1 [cited 2018 Nov 6];2007(7):pdb.top17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21357135>
  77. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2008 May 19 [cited 2018 Nov 6];36(Web Server):W5–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18440982>
  78. Lonsdale J, Thomas J, Salvatore M, Phillips R, Lo E, Shad S, et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet* [Internet]. 2013 Jun 1 [cited 2018 Nov 6];45(6):580–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23715323>
  79. Aken BL, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, Bernsdorff F, Bhai J, et al. Ensembl 2017. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2017 Jan 4 [cited 2018 Nov 6];45(D1):D635–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27899575>
  80. Zerbino DR, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, Barrell D, Bhai J, et al. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2018 Jan 4 [cited 2018 Nov 6];46(D1):D754–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29155950>
  81. Pontén F, Schwenk JM, Asplund A, Edqvist P-HD. The Human Protein Atlas as a proteomic resource for biomarker discovery. *J Intern Med* [Internet]. 2011 Nov [cited 2018 Nov 6];270(5):428–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21752111>
  82. Rebhan M, Chalifa-Caspi V, Prilusky J, Lancet D. GeneCards: integrating



- information about genes, proteins and diseases. *Trends Genet* [Internet]. 1997 Apr [cited 2018 Nov 6];13(4):163. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9097728>
83. Rebhan M, Chalifa-Caspi V, Prilusky J, Lancet D. GeneCards: a novel functional genomics compendium with automated data mining and query reformulation support. *Bioinformatics* [Internet]. 1998 [cited 2018 Nov 6];14(8):656–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9789091>
  84. Safran M, Dalah I, Alexander J, Rosen N, Iny Stein T, Shmoish M, et al. GeneCards Version 3: the human gene integrator. *Database* [Internet]. 2010 Aug 5 [cited 2018 Nov 6];2010(0):baq020–baq020. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20689021>
  85. Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, et al. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. In: *Current Protocols in Bioinformatics* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2016 [cited 2018 Nov 6]. p. 1.30.1-1.30.33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27322403>
  86. Artoni A, Selicorni A, Passamonti SM, Lecchi A, Bucciarelli P, Cerutti M, et al. Hemostatic Abnormalities in Noonan Syndrome. *Pediatrics* [Internet]. 2014 May 1;133(5):e1299–304. Available from: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2013-3251>
  87. Zwijnenburg PJG, Meijers-Heijboer H, Boomsma DI. Identical but not the same: The value of discordant monozygotic twins in genetic research. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* [Internet]. 2010;153(6):n/a-n/a. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.b.31091>
  88. Smith DE, Cibis GW. Discordant Duane's retraction syndrome in monozygotic twins. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 1996;122(5):749–50. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9394\(14\)70506-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9394(14)70506-9)
  89. Kaplan L, Foster R, Shen Y, Parry DM, McMaster ML, O'Leary MC, et al. Monozygotic twins discordant for neurofibromatosis 1. *Am J Med Genet Part A* [Internet]. 2010 Mar [cited 2019 Feb 19];152A(3):601–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20186797>
  90. Lai KN, Lam KC, Lawton JW. Dizygosity of discordant twins with Noonan syndrome. *Clin Genet* [Internet]. 1979 Jun [cited 2019 Feb 19];15(6):509–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/572748>
  91. Kelly TE, Sproul GT, Huerta MG, Rogol AD. Discordant puberty in monozygotic twin sisters with neurofibromatosis type 1 (NF1). *Clin Pediatr (Phila)* [Internet]. 1998 May;37(5):301–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9597296>
  92. Van den Bosch T, Van Schoubroeck D, Fryns JP, Naulaers G, Inion AM, Devriendt K. Prenatal findings in a monozygotic twin pregnancy with Costello syndrome. *Prenat Diagn* [Internet]. 2002 May [cited 2019 Feb 19];22(5):415–7. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12001198>
93. Payne MS, Nadell JM, Lacassie Y, Tilton AH. Congenital glaucoma and neurofibromatosis in a monozygotic twin: case report and review of the literature. *J Child Neurol* [Internet]. 2003 Jul;18(7):504–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12940659>
  94. Karpouzas J, Papaioannou AC. Noonan syndrome in twins. *J Pediatr* [Internet]. 1974 Jul [cited 2019 Feb 19];85(1):84–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4853368>
  95. Detjen AK, Tinschert S, Kaufmann D, Algermissen B, Nürnberg P, Schuelke M. Analysis of Mitochondrial DNA in Discordant Monozygotic Twins With Neurofibromatosis Type 1. *Twin Res Hum Genet* [Internet]. 2007 Jun 21 [cited 2019 Feb 19];10(03):486–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17564507>
  96. Melean G, Hernández AM, Valero MC, Hernández-Imaz E, Martín Y, Hernández-Chico C. Monozygotic twins with Neurofibromatosis type 1, concordant phenotype and synchronous development of MPNST and metastasis. *BMC Cancer* [Internet]. 2010 Dec 5 [cited 2019 Feb 19];10(1):407. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20687928>
  97. Rieley MB, Stevenson DA, Viskochil DH, Tinkle BT, Martin LJ, Schorry EK. Variable expression of neurofibromatosis 1 in monozygotic twins. *Am J Med Genet Part A* [Internet]. 2011 Mar [cited 2019 Feb 19];155(3):478–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21337692>
  98. Vogt J, Kohlhase J, Morlot S, Kluwe L, Mautner V-F, Cooper DN, et al. Monozygotic twins discordant for neurofibromatosis type 1 due to a postzygotic NF1 gene mutation. *Hum Mutat* [Internet]. 2011 Jun [cited 2019 Feb 19];32(6):E2134–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21618341>
  99. Sites ER, Smolarek TA, Martin LJ, Viskochil DH, Stevenson DA, Ullrich NJ, et al. Analysis of copy number variants in 11 pairs of monozygotic twins with neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet Part A* [Internet]. 2017 Mar [cited 2019 Feb 19];173(3):647–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27862945>
  100. Lin I-S, Wang J-N, Chao S-C, Wu J-M, Lin S-J. PTPN11 Mutations in LEOPARD Syndrome: Report of Four Cases in Taiwan. *J Formos Med Assoc* [Internet]. 2009 Oct [cited 2019 Feb 19];108(10):803–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19864201>
  101. Lee A, Sakhalkar M V. Ocular manifestations of Noonan syndrome in twin siblings: a case report of keratoconus with acute corneal hydrops. *Indian J Ophthalmol* [Internet]. 2014 Dec;62(12):1171–3. Available from: <http://www.ijo.in/text.asp?2014/62/12/1171/126992>
  102. Mathur D, Somashekar S, Navarrete C, Rodriguez MM. Twin infant with lymphatic dysplasia diagnosed with Noonan syndrome by molecular genetic testing. *Fetal Pediatr Pathol* [Internet]. 2014 Aug;33(4):253–7.

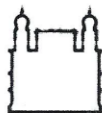
- Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24754368>
103. Easton DF, Ponder MA, Huson SM, Ponder BA. An analysis of variation in expression of neurofibromatosis (NF) type 1 (NF1): evidence for modifying genes. *Am J Hum Genet* [Internet]. 1993 Aug [cited 2019 Feb 19];53(2):305–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8328449>
  104. Schollen E, Matthijs G, Gewillig M, Fryns J-P, Legius E. PTPN11 mutation in a large family with Noonan syndrome and dizygous twinning. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2003 Jan;11(1):85–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12529711>
  105. Liu G, Bai H, Yan Z, Ma Y, Li H. Differential expression of proteins in monozygotic twins with discordance of infantile esotropic phenotypes. *Mol Vis* [Internet]. 2011 [cited 2019 Feb 19];17:1618–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21738391>
  106. Liu C, Molenaar PCM, Neiderhiser JM. The Impact of Variation in Twin Relatedness on Estimates of Heritability and Environmental Influences. *Behav Genet* [Internet]. 2018 Jan 2;48(1):44–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10519-017-9875-x>
  107. Riccardi VM. Genotype-phenotype correlations in the genomic age: Concordance in monozygous twin pairs. *Am J Med Genet Part A* [Internet]. 2011 Mar;155(3):476–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.a.33850>
  108. Castillo-Fernandez JE, Spector TD, Bell JT. Epigenetics of discordant monozygotic twins: implications for disease. *Genome Med* [Internet]. 2014 Jul 31;6(7):60. Available from: <http://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-014-0060-z>
  109. Silva VR, Secolin R, Vemuganti R, Lopes-Cendes I, Hazell AS. Acute liver failure is associated with altered cerebral expression profiles of long non-coding RNAs. *Neurosci Lett* [Internet]. 2017 Aug;656:58–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2017.06.038>
  110. Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Publ Gr*. 2016;17(1):47–62.
  111. Montor WR. *Uso de técnicas de proteoma e genoma funcional para revelar as bases moleculares da ação anti-tumoral de ácido retinóico*. Universidade de São Paulo; 2005.
  112. Braga Emidio N, Girardi Carpanez A, Ramos Quellis L, Silva Farani P, Gomes Vasconcelos E, Faria-Pinto P. *Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações*. *HU Rev* [Internet]. 2015;41(3 e 4):101–11. Available from: <http://www.piercenet.com/method/sample->
  113. Joaquim HPG. *Proteômica da esquizofrenia: busca por biomarcadores em plaquetas*. Universidade de São Paulo; 2017.
  114. Silbiger VN. *Transcriptoma e proteoma em sangue periférico na busca de*

- novos marcadores de doenças cardiovasculares. Universidade de São Paulo; 2010.
115. Bjelosevic S, Ignjatovic V. Unravelling age-specific differences in the human proteome and the implications for medicine. *Expert Rev Proteomics* [Internet]. 2017 Apr 3;14(4):281–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14789450.2017.1291346>
  116. Chen Y-N, Du H-Y, Shi Z-Y, He L, He Y-Y, Wang D. Serum proteomic profiling for autism using magnetic bead-assisted matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a pilot study. *World J Pediatr* [Internet]. 2018 Jun 24;14(3):233–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12519-017-0102-x>
  117. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* [Internet]. 2001 Dec [cited 2017 Jun 11];25(4):402–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202301912629>
  118. UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 Jan 8 [cited 2019 May 13];47(D1):D506–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30395287>
  119. Benito-Martin A, Peinado H. FunRich proteomics software analysis, let the fun begin! *Proteomics* [Internet]. 2015 Aug [cited 2019 Mar 25];15(15):2555–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26149235>
  120. Pathan M, Keerthikumar S, Ang C-S, Gangoda L, Quek CYJ, Williamson NA, et al. FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. *Proteomics* [Internet]. 2015 Aug [cited 2019 Mar 25];15(15):2597–601. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.201400515>
  121. Srivastava D. Making or Breaking the Heart: From Lineage Determination to Morphogenesis. *Cell* [Internet]. 2006 Sep;126(6):1037–48. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406011500>
  122. Cannistraci C V., Ogorevc J, Zorc M, Ravasi T, Dovc P, Kunej T. Pivotal role of the muscle-contraction pathway in cryptorchidism and evidence for genomic connections with cardiomyopathy pathways in RASopathies. *BMC Med Genomics* [Internet]. 2013 Dec 14;6(1):5. Available from: <http://bmcmmedgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1755-8794-6-5>
  123. Israeli-Rosenberg S, Manso AM, Okada H, Ross RS. Integrins and Integrin-Associated Proteins in the Cardiac Myocyte. *Circ Res* [Internet]. 2014 Jan 31;114(3):572–86. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.00501.2014>
  124. Ryu H-H, Lee Y-S. Cell type-specific roles of RAS-MAPK signaling in learning and memory: Implications in neurodevelopmental disorders. *Neurobiol Learn Mem* [Internet]. 2016 Nov;135:13–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2016.06.006>

125. Schreiber J, Grimbergen LA, Overwater I, Van Der Vaart T, Stedehouder J, Schuhmacher AJ, et al. Mechanisms underlying cognitive deficits in a mouse model for Costello Syndrome are distinct from other RASopathy mouse models. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-01218-0>
126. Goyal Y, Jindal GA, Pelliccia JL, Yamaya K, Yeung E, Futran AS, et al. Divergent effects of intrinsically active MEK variants on developmental Ras signaling. *Nat Genet* [Internet]. 2017 Mar 6;49(3):465–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/ng.3780>
127. Iliott NE, Heward JA, Roux B, Tsitsiou E, Fenwick PS, Lenzi L, et al. Inflammatory response in human monocytes. *Nat Commun* [Internet]. 2014;5:1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms4979>
128. Wang P, Xue Y, Han Y, Lin L, Wu C, Xu S, et al. The STAT3-Binding Long Noncoding RNA Inc-DC Controls Human Dendritic Cell Differentiation. 2014;344(April):310–4.
129. Alikhah A, Pahlevan Kakhki M, Ahmadi A, Dehghanzad R, Boroumand MA, Behmanesh M. The role of Inc-DC long non-coding RNA and SOCS1 in the regulation of STAT3 in coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* [Internet]. 2018 Mar [cited 2019 May 14];32(3):258–65. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1056872717311042>
130. Hah N, Murakami S, Nagari A, Danko CG, Kraus WL. Enhancer transcripts mark active estrogen receptor binding sites. 2013;1210–23.
131. Attema JL, Bert AG, Lim Y, Kolesnikoff N, Lawrence DM, Pillman KA, et al. Identification of an Enhancer That Increases miR-200b ~ 200a ~ 429 Gene Expression in Breast Cancer Cells. 2013;8(9):1–15.
132. Xu G, Chen J, Pan Q, Huang K, Pan J, Zhang W, et al. Long Noncoding RNA Expression Profiles of Lung Adenocarcinoma Ascertained by Microarray Analysis. 2014;9(8):1–7.
133. Takayama K, Horie-inoue K, Katayama S, Suzuki T, Tsutsumi S, Ikeda K, et al. Androgen-responsive long noncoding RNA CTBP1-AS promotes prostate cancer. *EMBO J* [Internet]. 2013;32(12):1665–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2013.99>
134. Liu Z, Hao C, Song D, Zhang N, Bao H, Qu Q. Androgen Receptor Coregulator CTBP1-AS Is Associated With Polycystic Ovary Syndrome in Chinese Women : A Preliminary Study. 2015;22(7):829–37.
135. Athié MCP. Análise da expressão gênica e proteômica em pacientes com doença de Alzheimer: busca de marcadores periféricos. Universidade de São Paulo; 2010.
136. Pierpont EI, Tworog-Dube E, Roberts AE. Learning and memory in children with Noonan syndrome. *Am J Med Genet Part A* [Internet]. 2013 Sep;161(9):2250–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.a.36075>

137. Riecken LB, Tawamie H, Dornblut C, Buchert R, Ismayel A, Schulz A, et al. Inhibition of RAS Activation Due to a Homozygous Ezrin Variant in Patients with Profound Intellectual Disability. *Hum Mutat* [Internet]. 2015 Feb;36(2):270–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/humu.22737>
138. Altmüller F, Pothula S, Annamneedi A, Nakhaei-Rad S, Montenegro-Venegas C, Pina-Fernández E, et al. Aberrant neuronal activity-induced signaling and gene expression in a mouse model of RASopathy. Petrou S, editor. *PLOS Genet* [Internet]. 2017 Mar 27;13(3):e1006684. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1006684>
139. Ryu H-H, Kim T, Kim J-W, Kang M, Park P, Kim YG, et al. Excitatory neuron-specific SHP2-ERK signaling network regulates synaptic plasticity and memory. *Sci Signal* [Internet]. 2019 Mar 5;12(571):eaau5755. Available from: <http://stke.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/scisignal.aau5755>
140. Oliveira LAM. Análise Morfológica e Funcional da Integrina Beta 2 ( CD18 ) durante o Desenvolvimento Cardíaco. Universidade Federal de Minas Gerais; 2009.
141. Masliah-Planchon J, Garinet S, Pasmant E. RAS-MAPK pathway epigenetic activation in cancer: miRNAs in action. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Jun 21 [cited 2019 May 14];7(25):38892–907. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26646588>
142. Ware SM, Jefferies JL. New Genetic Insights into Congenital Heart Disease. *J Clin Exp Cardiol* [Internet]. 2012 [cited 2019 May 14];(8). Available from: <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9880.S8-003>
143. Pierpont ME, Brueckner M, Chung WK, Garg V, Lacro R V, Mcguire AL, et al. On behalf of the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; and Council on Genomic and Precision Medicine. *Circulation* [Internet]. 2018 [cited 2019 May 14];138:653–711. Available from: <http://ahajournals.org>
144. Fleischman LF, Holtzclaw L, Russell JT, Mavrothalassitis G, Fisher RJ, et al. ets-1 in astrocytes: expression and transmitter-evoked phosphorylation. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1995 Feb [cited 2019 May 14];15(2):925–31. Available from: <http://mcb.asm.org/lookup/doi/10.1128/MCB.15.2.925>
145. Xing L, Larsen RS, Bjorklund GR, Li X, Wu Y, Philpot BD, et al. Layer specific and general requirements for ERK/MAPK signaling in the developing neocortex. *Elife* [Internet]. 2016 Feb 5 [cited 2019 May 14];5. Available from: <https://elifesciences.org/articles/11123>
146. Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2005 Nov;6(11):826–35. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrg1710>

# APÊNDICE I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Ministerio da Saude  
 FIOCRUZ  
 Fundação Oswaldo Cruz



INSTITUTO NACIONAL FERNANDES FIGUEIRA  
 DE SAÚDE DA MULHER, DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Título do Estudo:** “Consórcio Molecular para Estudo das Doenças Genéticas de Caráter Crônico Associado aos Defeitos Congênitos, Doença do Desenvolvimento e Câncer Infantil. Um Modelo para o SUS a partir da Via Celular das RASopatias”.

**Instituição:** Instituto Fernandes Figueira (IFF-Centro de Genética Médica)

**Pesquisador:** Juan Clinton Llerena Junior (Médico-Geneticista)

**Nº CAAE (CEP-IFF):**

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_

Prontuário: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Responsável: \_\_\_\_\_

Prezado(a) Senhor(a),

venho por meio deste termo convidar você ou seu filho (a) a participar deste projeto de pesquisa cujo objetivo será estudar as características genéticas associadas a sua doença ou do seu filho (a) através de uma técnica de laboratório simplificada chamada de sequenciamento do Exoma. Esta técnica avalia as regiões do DNA relacionadas com a sua doença ou do seu filho (a). Para compreender melhor a sua doença ou de seu filho (a) também iremos investigar outros tipos de material (RNAs e proteínas), que podem alterar as características da sua doença. Tudo que aprendemos nessa pesquisa ajuda os médicos a entender melhor como devemos tratar essas doenças raras no futuro.

APROVAÇÃO PRORROGADA

Válido até 22/08/2020  
 Comitê e Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
 INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIOCRUZ  
 Telefone 2552-8491 / 2554-1700 R.1730

Validação do Comitê de Ética em Pesquisa e em Seres Humanos  
 INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIOCRUZ

TCLE Versão 03

\_\_\_\_\_  
 Rubrica paciente

\_\_\_\_\_  
 Rubrica pesquisador

Você ou seu filho (a) foi encaminhado ao Ambulatório de Genética Médica para investigar a causa de uma doença relacionada ao seu desenvolvimento ou a características físicas de um grupo de doenças chamadas RASopatias.

O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre o estudo que estamos realizando, então leia atentamente; ou caso não souber ler eu devo ler para você. Todas suas dúvidas serão respondidas e sua colaboração será muito importante para o projeto. Porém caso você não queira participar ou venha a desistir em qualquer momento da pesquisa, isto não prejudicará você ou sua família no atendimento clínico do seu filho.

Você ou seu filho (a) será examinado por médico geneticista e caso preencha os critérios de seleção para o estudo iremos coletar sangue (um total de 3ml à 5ml) exclusivamente para este estudo, que será realizado no Centro de Genética Médica do Instituto Fernandes Figueira (Fiocruz), que fará a análise do seu DNA, RNA e proteínas. A coleta de sangue será realizada por pessoas experientes. O seu filho poderá sentir um desconforto ou dor decorrente da coleta.

A assistência médica prestada a seu filho (a) não será modificada em função da aceitação ou não em participar desta pesquisa. A participação de seu filho (a) não envolverá custo adicional e é voluntária. As informações obtidas através dessa pesquisa manterão o seu anonimato, serão confidenciais e serão divulgadas somente sob forma de publicação científica, anexando uma cópia do resultado ao prontuário médico do seu filho (a) e uma cópia original a vocês.

Estou ciente que:

- Este estudo pesquisará as possíveis causas da doença de seu filho (a) que fazem parte de um grupo de doenças chamadas RASopatias.
- Deverá ser feito a coleta de 6 ml de sangue do meu (minha) filho(a) em veia superficial e/ou biópsia de pele. Este material será analisado e armazenado até sua plena utilização nesta pesquisa.
- Poderá ser coletada informações do prontuário ou a história clínica assim como a história familiar que possam colaborar para o esclarecimento da doença.
- Poderá ser tirada fotos ou cópias de registros de exames de alterações físicas, laboratoriais ou exames de imagem que possam contribuir para este estudo desde que mantido em sigilo.

APROVAÇÃO PRORROGADA

Válido até 17/08/2010  
 Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
 INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - FFF/CCRUZ  
 Telefone 2552-3401 / 2554-1700 R.1730

Doonema, J. do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
 INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - FFF/CCRUZ

ml

TCLE Versão 03

\_\_\_\_\_  
 Rubrica paciente

\_\_\_\_\_  
 Rubrica pesquisador



- Esta coleta será feita apenas para este estudo e não vai causar nenhum problema de saúde exceto um pequeno incomodo de dor no momento da coleta.

- A participação neste estudo não tem o objetivo de submetê-los a nenhum experimento e também não terá nenhum custo extra.

- Não há ganho financeiro pela participação na pesquisa, nem despesas.

- Informamos que você e/ou sua família não receberá nenhuma forma de pagamento financeiro ao participarem da pesquisa.

- O resultado deste estudo pode não encontrar a causa específica da doença sendo investigada; porém, se faz necessário para que sejam conhecidos os mecanismos genéticos que eventualmente possam contribuir para sua condição.

- Tais estudos serão sigilosos e os resultados publicados apenas em periódicos científicos de maneira anônima.

- Tenho a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo a qualquer momento.

- A desistência não causará nenhum prejuízo à saúde do meu (minha) filho(a) ou bem estar físico e não irá interferir no atendimento médico prestado ao meu (minha) filho(a) ou a meus familiares.

- Os resultados obtidos durante este trabalho serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas desde que os dados pessoais do meu (minha) filho(a) não sejam mencionados.

- Caso eu deseje, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa, obedecendo a regra de sigilo profissional, no sentido de resguardar o teor das informações a que tenho direito.

- Minha participação ou do meu filho é voluntária.

- Você e/ou sua família terá direito a uma indenização caso sintam-se prejudicados pela pesquisa diante de qualquer informação omitida e/ou infração que o resultado da pesquisa possa eventualmente trazer não tendo sido previamente antecipada no momento da assinatura deste documento.

A análise realizada neste estudo avaliará o seu material genético (DNA e RNA) e proteínas que pode ter influência na sua doença. Além disso, apenas regiões do seu DNA associadas a doença em questão serão investigadas. Porém, é inerente à técnica de investigação obter informações de outras regiões do DNA que, se alteradas, poderão predizer o

APPROVAÇÃO PRORROGADA

Válido até 11/10/2020  
 Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
 INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/IOCRUZ  
 Telefone: 2552-8491 / 2554-1700 R.1730

ml  
 Diretoria do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
 INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/IOCRUZ

TCLE Versão 03

\_\_\_\_\_  
 Rubrica paciente

\_\_\_\_\_  
 Rubrica pesquisador

desenvolvimento de outras doenças. Nestas circunstâncias, discutiremos os resultados identificados ao acaso com vocês.

Tendo em vista o nível de incerteza de muitas destas alterações, havendo também muitas vezes impossibilidade de um tratamento efetivo ou a existência de protocolos de seguimento clínico para muitas destas alterações, será importante saber se desejam ser informados destas alterações.

É direito do paciente saber todas as informações conhecidas a respeito dos achados incidentais no material genético assim como o de não querer saber, ou mudar de opinião em qualquer momento enquanto tais informações permanecerem armazenadas.

( ) Desejo ser informado das alterações incidentais (ao acaso) identificadas no DNA não relacionadas com as RASopatias.

( ) NÃO Desejo ser informado das alterações incidentais (ao acaso) identificadas no DNA e não relacionadas com as RASopatias.

Desejo ser abordado novamente, após o resultado, para confirmação desta decisão.

( ) Sim ( ) Não.

Permito que meu filho(a) e seus exames sejam fotografados e armazenados com a finalidade de documentação médica e científica. Estou ciente que terei todo e qualquer esclarecimento sobre este assunto durante e após a duração do projeto. Fui informada que esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Fundação Oswaldo Cruz. Declaro que li, entendi e concordo com o que me foi explicado.

( ) Sim ( ) Não.

Fui informado que esta pesquisa foi submetida e aprovada no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Fernandes Figueira da Fundação Oswaldo Cruz sob o registro CAAE:

Paciente entre 12 e 18 anos com plena capacidade cognitiva e entendimento dos seus direitos:

Autorização/Assinatura: \_\_\_\_\_

Paciente maior de 18 anos com plena capacidade cognitiva e entendimento dos seus direitos:

Autorização/Assinatura: \_\_\_\_\_

APROVAÇÃO PRORROGADA

Válido até 17/08/2020  
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIOCRUZ  
Telefone 2552-8401 / 2554-1700 R. 17/30

*ml*  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIOCRUZ

Responsável, maior, com plena capacidade cognitiva e entendimento dos seus direitos:

Autorização/Assinatura: \_\_\_\_\_

Testemunha, maior, com plena capacidade cognitiva e entendimento dos seus direitos:

Autorização/Assinatura: \_\_\_\_\_

Rio de Janeiro, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

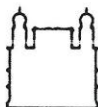
Juan Clinton Llerena Jr – CRM: 52369217-0

Departamento de Genética Médica – IFF/FIOCRUZ – Av. Rui Barbosa, 716 – Flamengo, Rio de Janeiro. Telefones: 021-25541752; 021-25541709.

*ml*  
Diretor(a) do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIOCRUZ

APROVAÇÃO PRORROGADA  
Válido até 17/08/2020  
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIOCRUZ  
Telefone 2552-8491 / 2554-1700 R-1730

## APÊNDICE II – Termo de Assentimento para Pacientes de 6 a 11 anos



Ministerio da Saude  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



IFF  
INSTITUTO NACIONAL  
DE SAÚDE DA INFÂNCIA E DO ADOLESCENTE  
FERNANDES FIGUEIRA

### *Termo de Assentimento para Pacientes de 06 a 11 anos*

Instituto Fernandes Figueira  
Centro de Genética Médica Dr. José Carlos Cabral de Almeida  
Av. Rui Barbosa, 716 - Flamengo  
Rio de Janeiro - RJ  
CEP 22250-020  
Tel: (21) 2553-0052 ramais 5209/5208 e-mail: [llerena@iff.fiocruz.br](mailto:llerena@iff.fiocruz.br)

#### Introdução:

Você está sendo convidado a participar do Projeto *Consórcio Molecular para Estudo das Doenças Genéticas de Caráter Crônico Associado aos Defeitos Congênitos, Doença do Desenvolvimento e Câncer Infantil. Um Modelo para o SUS a partir da Via Celular das RASopatias*. Esse termo contém informações sobre o Projeto que irão ajudar você a decidir se gostaria de participar.

Sua participação no Projeto depende da sua vontade e da vontade dos seus pais/ representantes legais. Você deve entender plenamente o que acontecerá se você participar do programa da pesquisa. Esse termo descreve o que é a pesquisa, o tipo de informação que vai ser coletada e o que vai acontecer com a informação, uma vez que você entre no projeto. Você deve conversar sobre qualquer dúvida que você tiver com seus pais/ representantes legais e com seu médico. Se você e seus pais/ representantes legais decidirem que você irá participar desse projeto, será solicitado que você assine esse termo de consentimento para mostrar que você está de acordo.

#### O que é o Projeto?

A pesquisa visa estudar as características físicas com que você nasceu e identificar a causa através de um exame de sangue para analisar seu material genético (DNA e RNA) e

*ml*  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIOCRUZ

APROVAÇÃO PRORROGADA  
Válido até 17/08/2020  
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIOCRUZ  
Telefone: 2552-8491 / 2554-1700 R. 1730

TALE Versão 02

\_\_\_\_\_  
Rubrica paciente

\_\_\_\_\_  
Rubrica pesquisador

proteínas herdado dos seus pais. Uma das técnicas de laboratório que vai ser usada se chama, simplificada, sequenciamento do Exoma. Esta técnica avalia as regiões do DNA, herdadas do seu pai e mãe, relacionadas com a sua doença.

Para compreender melhor a sua doença ou de seu filho (a) também iremos investigar outros tipos de material (RNAs e proteínas), que podem alterar as características da sua doença. Tudo que aprendemos nessa pesquisa ajuda os médicos a entender melhor como devemos tratar essas doenças raras no futuro.

Você foi encaminhado ao Ambulatório de Genética Médica para investigar a causa de uma doença relacionada ao seu desenvolvimento ou características físicas de um grupo de doenças chamadas RASopatias.

Você, caso queira, poderá interromper a sua participação na pesquisa a qualquer momento, conforme detalhado abaixo.

#### **O que significa fazer parte desse Projeto?**

Você não precisa passar por nenhum outro tipo de exame se você decidir participar dessa pesquisa. Seu médico vai tomar conta de você, vai pedir os exames para avaliar a sua saúde. Os seus pais serão informados sobre como suas informações serão utilizadas.

#### **Eu sou obrigado a participar da pesquisa?**

Isso depende da sua vontade e da vontade dos seus pais/ representantes legais. Você não precisa participar se você não quiser. Se você começar a participar da pesquisa e depois não quiser mais, tudo que você precisa fazer é falar para o seu médico. Você não precisa nem falar o porquê para sair da pesquisa e o seu médico vai continuar tratando de você da melhor forma possível.

Seus pais / representantes legais irão receber mais informações sobre a pesquisa e poderão ajudar você a entender e decidir se você pode fazer parte dele. Seu médico também pode te explicar melhor.

#### **Fazer parte da pesquisa pode me ajudar?**

Tudo que aprendemos nessa pesquisa ajuda os médicos a entender melhor como devemos tratar essas doenças raras no futuro. Além disto, poderemos identificar a causa que levou seu material genético (DNA e RNA) e proteínas a se modificar resultando no que você apresenta fisicamente.

APROVAÇÃO PRORRUGADA

Válido até 11/08/2020  
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FOCRUZ  
Telefone: 2552-8491 / 2554-1700 R.1730

*ml*  
Doutoranda, J. do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FOCRUZ

TALE Versão 02

\_\_\_\_\_  
Rubrica paciente

\_\_\_\_\_  
Rubrica pesquisador

**Quais informações serão coletadas na pesquisa?**

Serão coletadas informações pessoais da sua gravidez; de como nasceu; quantos quilos e comprimento nasceu; como foi sua evolução do desenvolvimento. Como está sua saúde e quais exames já foram realizados. Qualquer tratamento que você possa estar recebendo, resultados de testes de laboratório e outros exames poderão nos ajudar a compreender a sua doença.

Para ajudá-lo a decidir se você quer participar deste estudo, é importante que você compreenda o que acontece com as suas informações, assim que elas forem para a pesquisa.

O principal objetivo da pesquisa será a utilização de um novo método de estudar o seu material genético de forma mais eficaz e rápido. Uma vez conseguido estabelecer a técnica iremos recomendar este tipo de estudo para ser oferecido no Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil.

Seu médico poderá usar as informações da pesquisa para auxiliá-lo a tomar decisões quanto aos seus cuidados médicos. O seu médico poderá, inclusive, dividir essa informação com outros médicos que tratam você no mesmo hospital (Instituto Fernandes Figueira).

Suas informações também poderão ser utilizadas em conjunto com as informações de outros pacientes e serem usadas em artigos científicos, em grandes reuniões com outros médicos ou outras maneiras.

Esses são alguns dos acontecimentos que podem ocorrer se você optar por fazer parte desta pesquisa. Os seus pais/ representantes legais irão saber sobre todas as formas que as suas informações serão utilizadas.

**Quais são os riscos em participar da Pesquisa?**

Não há nenhum risco de prejuízo físico para você ao participar da pesquisa, exceto na colheita de sangue onde você poderá sentir um pequeno incômodo.

Não é possível descartar as ocorrências de riscos psíquico, moral, intelectual, social, cultural e espiritual.

**Quais são os possíveis Benefícios em participar do registro?**

Os benefícios são: identificação do erro no material genético que ocasionou sua doença; orientar seus pais sobre a possibilidade deste erro ocorrer novamente; ajudar o médico que trata da sua saúde a solicitar novos exames para a Promoção da sua Saúde.

APROVAÇÃO PRORRUGADA

Válido até: 17/08/2020  
 Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
 INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FFOCRUZ  
 Telefone: 2552-3431 / 2554-1700 F. 1730

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa e em Seres Humanos  
 INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FFOCRUZ

TALE Versão 02

\_\_\_\_\_  
 Rubrica paciente

\_\_\_\_\_  
 Rubrica pesquisador

**Participação Voluntária/ Retirada da Participação**

A sua participação na pesquisa é voluntária. Mesmo que você assine este termo, você pode interromper sua participação na pesquisa a qualquer momento. Para fazer isso, você precisa avisar os seus pais / representantes legais, o seu médico ou enfermeira. Eles não ficarão bravos ou desapontados com você.

A garantia de sigilo e privacidade dos seus dados, de acordo com as normas brasileiras, será assegurada.

Toda informação obtida durante o registro, incluindo os seus registros médicos, dados pessoais e do registro são confidenciais.

**Quanto vai custar para participar?**

Não existem custos para você e seus pais/representantes legais participarem da pesquisa.

**Eu serei pago para participar do Registro?**

Você e seus pais/ representantes legais não serão pagos por sua participação na pesquisa.

O coordenador da pesquisa (Dr. Juan C. Llerena Jr), lhe assegura assistência integral, pelo tempo que for necessário no Instituto Fernandes Figueira, sem nenhum custo para você, para qualquer problema (dano), mencionado ou não neste termo, devido a sua participação no registro, bem como uma eventual indenização.

**O que fazer se você tiver mais perguntas?**

Você pode sempre perguntar para o seu médico sobre qualquer dúvida envolvendo o Registro. O médico principal do projeto é o Dr. Juan Clinton Llerena Júnior, que pode ser encontrado no seguinte endereço: Av. Rui Barbosa, 716 – Flamengo, Rio de Janeiro- RJ e telefone (21) 2554-1709 (horário comercial) e (21) 99439-2166 (fora do horário comercial).

Este estudo foi aprovado por um Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e está de acordo com as normas nacionais e internacionais para sua realização. Se você tiver alguma dúvida ou quiser mais informações sobre seus direitos como participante de pesquisa/voluntário ou sobre os aspectos éticos do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Fernandes Figueira, no endereço Av. Rui Barbosa, 716 – Flamengo, Rio de Janeiro- RJ -

APROVAÇÃO PRORRUGADA  
Válido até 17.10.2020

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIOCRUZ  
Telefone 2552.3671 - Fax 51.1700 R.1730

Coordenador, Jr do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIOCRUZ

TALE Versão 02

\_\_\_\_\_  
Rubrica paciente

\_\_\_\_\_  
Rubrica pesquisador

CEP: 22250-020 e no telefone (21) 2554-1730 de segunda a sexta das 8h às 17h ou com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP no endereço: **SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º** andar - Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde - CEP: 70750-521 - Brasília-DF, Telefone: **(61) 3315-5878** de segunda a sexta das 8h às 18h.

Você terá uma via desse documento assinado e rubricado por mim e por todas as pessoas envolvidas na assinatura deste assentimento em todas as páginas do documento.

### Assentimento

Assinar (escrever) o seu nome nessa página significa que você concorda em participar do programa de registro, sabe o que vai acontecer com você e que você teve a oportunidade de fazer perguntas.

\_\_\_\_\_

Assinatura da Criança

\_\_\_\_\_

Data

\_\_\_\_\_

Assinatura do Pai/ Mãe / Representante Legal

\_\_\_\_\_

Data

\_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador

\_\_\_\_\_

Data

#### APROVAÇÃO PRORROGADA

Válido até 17/10/2020  
 Comitê e Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
 INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIDC/CRUZ  
 Telefone: 2552-8491 / 2554-1700 R.1730

TALE Versão 02

\_\_\_\_\_

Rubrica paciente

\_\_\_\_\_

Rubrica pesquisador

*mf*  
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
 INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIDC/CRUZ





proteínas herdado dos seus pais. Uma das técnicas de laboratório que vai ser usada se chama, simplificada, sequenciamento do Exoma. Esta técnica avalia as regiões do DNA, herdadas do seu pai e mãe, relacionadas com a sua doença.

Para compreender melhor a sua doença ou de seu filho (a) também iremos investigar outros tipos de material (RNAs e proteínas), que podem alterar as características da sua doença. Tudo que aprendemos nessa pesquisa ajuda os médicos a entender melhor como devemos tratar essas doenças raras no futuro.

Você foi encaminhado ao Ambulatório de Genética Médica para investigar a causa de uma doença relacionada ao seu desenvolvimento ou características físicas de um grupo de doenças chamadas RASopatias.

Você, caso queira, poderá interromper a sua participação na pesquisa a qualquer momento, conforme detalhado abaixo.

#### O que significa fazer parte desse Projeto?

Você não precisa passar por nenhum outro tipo de exame se você decidir participar dessa pesquisa. Seu médico vai tomar conta de você, vai pedir os exames para avaliar a sua saúde. Os seus pais serão informados sobre como suas informações serão utilizadas.

#### Eu sou obrigado a participar da pesquisa?

Isso depende da sua vontade e da vontade dos seus pais/representantes legais. Você não precisa participar se você não quiser. Se você começar a participar da pesquisa e depois não quiser mais, tudo que você precisa fazer é falar para o seu médico. Você não precisa nem falar o porquê para sair da pesquisa e o seu médico vai continuar tratando de você da melhor forma possível.

Seus pais/representantes legais irão receber mais informações sobre a pesquisa e poderão ajudar você a entender e decidir se você pode fazer parte dele. Seu médico também pode te explicar melhor.

#### Fazer parte da pesquisa pode me ajudar?

Tudo que aprendemos nessa pesquisa ajuda os médicos a entender melhor como devemos tratar essas doenças raras no futuro. Além disto, poderemos identificar a causa que levou seu material genético (DNA e RNA) e proteínas a se modificar resultando no que você apresenta fisicamente.

APROVAÇÃO PRORROGADA

Válido até 17/08/2020  
Comitê e Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - FFF/IOCRUZ  
Telefone: 2552.8401 / 2554-1700 R.1730

Donatiana, Jr do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - FFF/IOCRUZ

TALE Versão 02

\_\_\_\_\_  
Rubrica paciente

\_\_\_\_\_  
Rubrica pesquisador

**Quais informações serão coletadas na pesquisa?**

Serão coletadas informações pessoais da sua gravidez; de como nasceu; quantos quilos e comprimento nasceu; como foi sua evolução do desenvolvimento. Como está sua saúde e quais exames já foram realizados. Qualquer tratamento que você possa estar recebendo, resultados de testes de laboratório e outros exames poderão nos ajudar a compreender a sua doença.

Para ajudá-lo a decidir se você quer participar deste estudo, é importante que você compreenda o que acontece com as suas informações, assim que elas forem para a pesquisa.

O principal objetivo da pesquisa será a utilização de um novo método de estudar o seu material genético de forma mais eficaz e rápido. Uma vez conseguido estabelecer a técnica iremos recomendar este tipo de estudo para ser oferecido no Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil.

Seu médico poderá usar as informações da pesquisa para auxiliá-lo a tomar decisões quanto aos seus cuidados médicos. O seu médico poderá, inclusive, dividir essa informação com outros médicos que tratam você no mesmo hospital (Instituto Fernandes Figueira).

Suas informações também poderão ser utilizadas em conjunto com as informações de outros pacientes e serem usadas em artigos científicos, em grandes reuniões com outros médicos ou outras maneiras.

Esses são alguns dos acontecimentos que podem ocorrer se você optar por fazer parte desta pesquisa. Os seus pais/ representantes legais irão saber sobre todas as formas que as suas informações serão utilizadas.

**Quais são os riscos em participar da Pesquisa?**

Não há nenhum risco de prejuízo físico para você ao participar da pesquisa, exceto na colheita de sangue onde você poderá sentir um pequeno incômodo.

Não é possível descartar as ocorrências de riscos psíquico, moral, intelectual, social, cultural e espiritual.

**Quais são os possíveis Benefícios em participar do registro?**

Os benefícios são: identificação do erro no material genético que ocasionou sua doença; orientar seus pais sobre a possibilidade deste erro ocorrer novamente; ajudar o médico que trata da sua saúde a solicitar novos exames para a Promoção da sua Saúde.

APROVAÇÃO PROROGADA

Válido até 17/08/2020  
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIOCRUZ  
Telefone 2552-8491 / 2554-1700 R.1730

Dr. Wilson Jr do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIOCRUZ

*ml*

TALE Versão 02

\_\_\_\_\_  
Rubrica paciente

\_\_\_\_\_  
Rubrica pesquisador

**Participação Voluntária/ Retirada da Participação**

A sua participação na pesquisa é voluntária. Mesmo que você assine este termo, você pode interromper sua participação na pesquisa a qualquer momento. Para fazer isso, você precisa avisar os seus pais / representantes legais, o seu médico ou enfermeira. Eles não ficarão bravos ou desapontados com você.

A garantia de sigilo e privacidade dos seus dados, de acordo com as normas brasileiras, será assegurada.

Toda informação obtida durante o registro, incluindo os seus registros médicos, dados pessoais e do registro são confidenciais.

**Quanto vai custar para participar?**

Não existem custos para você e seus pais/representantes legais participarem da pesquisa.

**Eu serei pago para participar do Registro?**

Você e seus pais/ representantes legais não serão pagos por sua participação na pesquisa.

O coordenador da pesquisa (Dr. Juan C. Llerena Jr), lhe assegura assistência integral, pelo tempo que for necessário no Instituto Fernandes Figueira, sem nenhum custo para você, para qualquer problema (dano), mencionado ou não neste termo, devido a sua participação no registro, bem como uma eventual indenização.

**O que fazer se você tiver mais perguntas?**

Você pode sempre perguntar para o seu médico sobre qualquer dúvida envolvendo o Registro. O médico principal do projeto é o Dr. Juan Clinton Llerena Júnior, que pode ser encontrado no seguinte endereço: Av. Rui Barbosa, 716 – Flamengo, Rio de Janeiro- RJ e telefone (21) 2554-1709 (horário comercial) e (21) 99439-2166 (fora do horário comercial).

Este estudo foi aprovado por um Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e está de acordo com as normas nacionais e internacionais para sua realização. Se você tiver alguma dúvida ou quiser mais informações sobre seus direitos como participante de pesquisa/voluntário ou sobre os aspectos éticos do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Fernandes Figueira, no endereço Av. Rui Barbosa, 716 – Flamengo, Rio de Janeiro- RJ -

APROVAÇÃO PRORRUGADA

Válido até 10/10/2020  
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIOCRUZ  
Telefone 2552-8491 / 2554-1700 R.1730

Dr. Juan C. Llerena Jr do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIOCRUZ

*ml*

TALE Versão 02

\_\_\_\_\_  
Rubrica paciente

\_\_\_\_\_  
Rubrica pesquisador

CEP: 22250-020 e no telefone (21) 2554-1730 de segunda a sexta das 8h às 17h ou com a **Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP** no endereço: **SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º andar** - Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde - CEP: 70750-521 - Brasília-DF, Telefone: **(61) 3315-5878** de segunda a sexta das 8h às 18h.

Você terá uma via desse documento assinado e rubricado por mim e por todas as pessoas envolvidas na assinatura deste assentimento em todas as páginas do documento.

### Assentimento

Assinar (escrever) o seu nome nessa página significa que você concorda em participar do programa de registro, sabe o que vai acontecer com você e que você teve a oportunidade de fazer perguntas.

\_\_\_\_\_

Assinatura da Criança

\_\_\_\_\_

Data

\_\_\_\_\_

Assinatura do Pai/ Mãe / Representante Legal

\_\_\_\_\_

Data

\_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador

\_\_\_\_\_

Data

APROVAÇÃO PRORRUGADA

Válido até 27/08/2020  
 Comitê e Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
 INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/IOCRUZ  
 Telefone 2552-8491 / 2554-1700 R.1730

*me*

Doutora, J. do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
 INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/IOCRUZ

TALE Versão 02

\_\_\_\_\_

Rubrica paciente

\_\_\_\_\_

Rubrica pesquisador

## APÊNDICE IV – Tabela de Cálculo da Expressão Gênica

| RNA            | S16    |        |          |        | S17    |        |          |        | Média dos Calibradores = 30,649 |                    |
|----------------|--------|--------|----------|--------|--------|--------|----------|--------|---------------------------------|--------------------|
|                | CT     | CT     | Média Ct | ΔCt    | CT     | CT     | Média Ct | ΔCt    | ΔΔCt                            | 2 <sup>Δ-ΔCt</sup> |
| ACSL1 e        | 28,786 | 28,322 | 28,554   | -2,095 | 28,548 | 28,479 | 28,514   | -2,135 | -0,040                          | 1,028              |
| AZIN1e         | 26,289 | 25,814 | 26,051   | -4,597 | 26,457 | 26,465 | 26,461   | -4,188 | 0,410                           | 0,753              |
| CA12e          | 28,767 | 28,580 | 28,674   | -1,975 | 28,249 | 28,323 | 28,286   | -2,363 | -0,387                          | 1,308              |
| Lnc-KLF14-1    | 28,970 | 29,154 | 29,062   | -1,587 | 29,628 | 29,399 | 29,514   | -1,135 | 0,452                           | 0,731              |
| Linc-LAMA4-3   | 28,380 | 27,949 | 28,164   | -2,484 | 28,107 | 28,463 | 28,285   | -2,364 | 0,121                           | 0,920              |
| Lnc-LYZL2-1    | 28,985 | 29,152 | 29,069   | -1,580 | 28,896 | 28,737 | 28,816   | -1,832 | -0,252                          | 1,191              |
| Linc-LAMA4-2   | 28,514 | 28,473 | 28,493   | -2,155 | 28,659 | 28,565 | 28,612   | -2,037 | 0,119                           | 0,921              |
| Lnc-LCP2-1:1   | 29,409 | 28,872 | 29,141   | -1,508 | 28,958 | 28,813 | 28,885   | -1,763 | -0,255                          | 1,193              |
| Lnc-FABP5-2:1  |        | 28,439 | 28,439   | -2,210 | 29,045 | 28,877 | 28,961   | -1,688 | 0,522                           | 0,696              |
| Lnc-TMTC3-6:2  | 28,693 | 28,229 | 28,461   | -2,188 | 28,699 | 28,652 | 28,675   | -1,973 | 0,214                           | 0,862              |
| Lnc-C21orf33-1 | 28,135 |        | 28,135   | -2,514 | 26,766 | 26,792 | 26,779   | -3,870 | -1,356                          | 2,560              |
| ERBS3/SBNO2 e  | 29,386 | 29,711 | 29,549   | -1,100 | 28,552 | 28,233 | 28,392   | -2,256 | -1,156                          | 2,228              |
| Epha4 e        |        | 27,814 | 27,814   | -2,835 | 27,571 |        | 27,571   | -3,078 | -0,243                          | 1,183              |
| FKBP5 e        | 28,585 | 28,656 | 28,620   | -2,028 | 27,866 | 27,575 | 27,720   | -2,928 | -0,900                          | 1,866              |
| FOXC1 e        | 29,337 | 28,377 | 28,857   | -1,792 | 28,691 | 28,500 | 28,595   | -2,053 | -0,262                          | 1,199              |
| IRS2 e         | 28,654 |        | 28,654   | -1,995 | 27,958 | 27,784 | 27,871   | -2,778 | -0,783                          | 1,721              |
| KLF6 e         | 29,218 | 28,583 | 28,901   | -1,748 | 28,325 | 27,874 | 28,100   | -2,549 | -0,801                          | 1,742              |
| KLK3 e         | 28,437 | 28,237 | 28,337   | -2,312 |        | 27,529 | 27,529   | -3,120 | -0,808                          | 1,751              |
| MARCKS e       | 36,145 | 35,299 | 35,722   | 5,073  | 35,575 | 35,395 | 35,485   | 4,836  | -0,237                          | 1,179              |
| miR-200b e     | 27,871 | 27,375 | 27,623   | -3,026 | 26,265 | 26,011 | 26,138   | -4,511 | -1,485                          | 2,799              |
| Nanog e        | 27,855 | 27,507 | 27,681   | -2,968 | 28,203 | 27,531 | 27,867   | -2,782 | 0,186                           | 0,879              |
| NKX31e         | 28,557 | 27,837 | 28,197   | -2,452 | 28,500 | 28,161 | 28,330   | -2,318 | 0,134                           | 0,912              |
| NRIP1e         | 28,317 | 27,914 | 28,115   | -2,533 | 28,079 | 28,484 | 28,281   | -2,367 | 0,166                           | 0,891              |
| P2RY2 e        | 28,769 | 28,235 | 28,502   | -2,147 | 27,643 | 27,495 | 27,569   | -3,080 | -0,933                          | 1,909              |
| P53BER2        | 30,009 | 30,057 | 30,033   | -0,616 | 31,007 | 30,229 | 30,618   | -0,031 | 0,585                           | 0,667              |
| PCBP1 e        | 30,135 | 29,976 | 30,056   | -0,593 | 30,763 |        | 30,763   | 0,114  | 0,708                           | 0,612              |
| PGRe           | 28,087 | 27,627 | 27,857   | -2,792 | 28,764 | 28,348 | 28,556   | -2,093 | 0,699                           | 0,616              |
| SIAH2e1        | 28,763 | 28,379 | 28,571   | -2,078 | 28,863 | 28,372 | 28,618   | -2,031 | 0,047                           | 0,968              |
| SLC30A4 e      |        | 29,183 | 29,183   | -1,466 | 29,765 |        | 29,765   | -0,884 | 0,582                           | 0,668              |
| SMAD7 e        | 29,288 | 28,990 | 29,139   | -1,510 | 28,720 | 28,313 | 28,516   | -2,132 | -0,623                          | 1,540              |
| SOCS3 e        |        | 28,887 | 28,887   | -1,762 | 28,953 | 28,066 | 28,509   | -2,139 | -0,377                          | 1,299              |
| TFF1 e         | 29,159 | 28,651 | 28,905   | -1,744 | 28,340 | 28,007 | 28,174   | -2,475 | -0,731                          | 1,660              |
| TNFSF8e        | 28,995 | 29,070 | 29,033   | -1,616 | 28,873 | 29,265 | 29,069   | -1,580 | 0,036                           | 0,975              |
| XBP1 e         |        | 28,186 | 28,186   | -2,463 | 28,837 |        | 28,837   | -1,812 | 0,651                           | 0,637              |
| CBR3-AS1       | 29,575 | 29,188 | 29,382   | -1,267 | 29,075 | 29,286 | 29,181   | -1,468 | -0,201                          | 1,149              |

| RNA                   | S16    |        |          |             | S17    |        |          |             | Média dos Calibradores = 30,649 |                             |
|-----------------------|--------|--------|----------|-------------|--------|--------|----------|-------------|---------------------------------|-----------------------------|
|                       | CT     | CT     | Média Ct | $\Delta$ Ct | CT     | CT     | Média Ct | $\Delta$ Ct | $\Delta\Delta$ Ct               | $2^{\wedge-\Delta\Delta$ Ct |
| CD48-AS-              | 29,192 | 28,935 | 29,063   | -1,585      | 29,609 | 29,174 | 29,391   | -1,257      | 0,328                           | 0,797                       |
| CTBP1-AS              | 28,189 | 27,874 | 28,031   | -2,617      | 26,942 | 26,760 | 26,851   | -3,798      | -1,181                          | 2,267                       |
| ERIC                  | 29,685 | 28,993 | 29,339   | -1,310      | 29,199 | 28,750 | 28,974   | -1,674      | -0,365                          | 1,287                       |
| FIRRE                 | 28,793 | 28,407 | 28,600   | -2,049      | 28,556 | 28,263 | 28,410   | -2,239      | -0,190                          | 1,141                       |
| HAS2-AS1              | 28,558 |        | 28,558   | -2,091      | 28,534 | 28,181 | 28,358   | -2,291      | -0,201                          | 1,149                       |
| HOTTIP                | 29,270 | 28,771 | 29,021   | -1,628      | 29,193 | 28,973 | 29,083   | -1,566      | 0,063                           | 0,958                       |
| lL7-mf-lncRNA         | 28,238 | 27,826 | 28,032   | -2,617      | 28,459 | 28,302 | 28,380   | -2,268      | 0,348                           | 0,785                       |
| Lnc_DC                | 28,450 |        | 28,450   | -2,199      | 27,434 |        | 27,434   | -3,215      | -1,016                          | 2,022                       |
| lncRNA-508851         | 28,814 |        | 28,814   | -1,835      | 27,910 |        | 27,910   | -2,739      | -0,904                          | 1,871                       |
| lncRNA-ATB            | 25,889 | 25,443 | 25,666   | -4,983      | 25,900 | 25,631 | 25,766   | -4,883      | 0,099                           | 0,933                       |
| MRUL                  | 28,580 |        | 28,580   | -2,069      | 29,046 |        | 29,046   | -1,603      | 0,466                           | 0,724                       |
| ncRNA-a1-same as FAI1 | 25,206 | 26,189 | 25,697   | -4,951      | 25,559 | 25,182 | 25,370   | -5,278      | -0,327                          | 1,254                       |
| ncRNA-a3              | 29,578 | 28,946 | 29,262   | -1,387      | 28,887 | 28,708 | 28,797   | -1,851      | -0,464                          | 1,380                       |
| ncRNA-a6              | 29,543 | 29,218 | 29,380   | -1,268      | 29,361 | 29,325 | 29,343   | -1,306      | -0,037                          | 1,026                       |
| NONCO2077             | 29,524 | 29,182 | 29,353   | -1,296      | 28,698 | 28,408 | 28,553   | -2,096      | -0,800                          | 1,741                       |
| NONCO2807             | 29,691 | 29,236 | 29,464   | -1,185      | 29,668 | 29,079 | 29,373   | -1,275      | -0,090                          | 1,064                       |
| NONCO2823             | 29,986 | 29,859 | 29,922   | -0,726      | 29,735 | 29,988 | 29,862   | -0,787      | -0,061                          | 1,043                       |
| NONCO526              | 29,193 | 28,678 | 28,936   | -1,713      | 28,907 | 28,665 | 28,786   | -1,863      | -0,149                          | 1,109                       |
| OIP5-mf               | 26,693 | 26,408 | 26,551   | -4,098      | 26,579 | 26,335 | 26,457   | -4,192      | -0,094                          | 1,067                       |
| PAUPAR                | 29,273 | 28,621 | 28,947   | -1,702      | 29,314 | 28,791 | 29,052   | -1,596      | 0,105                           | 0,929                       |
| PCAT-1                |        | 27,985 | 27,985   | -2,664      | 28,972 | 28,368 | 28,670   | -1,979      | 0,685                           | 0,622                       |
| PCGEM1                | 27,888 | 27,276 | 27,582   | -3,067      | 28,090 |        | 28,090   | -2,559      | 0,508                           | 0,703                       |
| PCNA-AS1              | 28,974 | 28,338 | 28,656   | -1,993      | 27,966 | 27,794 | 27,880   | -2,769      | -0,776                          | 1,712                       |
| RPLP0P2               | 28,959 | 27,916 | 28,438   | -2,211      | 28,218 | 27,651 | 27,934   | -2,714      | -0,503                          | 1,417                       |
| SPRY4-IT1             | 29,101 | 28,168 | 28,634   | -2,014      | 27,997 | 27,727 | 27,862   | -2,787      | -0,773                          | 1,708                       |
| T-ALL-R-LncR1         |        | 27,862 | 27,862   | -2,787      | 28,198 | 28,291 | 28,245   | -2,404      | 0,383                           | 0,767                       |
| Thril                 | 29,286 | 28,753 | 29,019   | -1,629      | 28,235 | 28,218 | 28,227   | -2,422      | -0,793                          | 1,733                       |
| FOXO3                 | 27,766 | 27,403 | 27,585   | -3,064      | 27,537 | 27,299 | 27,418   | -3,231      | -0,167                          | 1,122                       |
| Actin                 | 30,283 | 30,160 | 30,222   | -0,427      | 29,715 | 29,158 | 29,437   | -1,212      | -0,785                          | 1,723                       |
| u6                    | 35,313 | 34,766 | 35,039   | 4,391       | 34,193 |        | 34,193   | 3,544       | -0,846                          | 1,798                       |

\* Células em amarelo: gráficos excluídos por não estarem dentro dos padrões de qualidade.

## APÊNDICE V – Lista de Proteínas Exclusivas da Paciente S16

---

### Lista de Proteínas Exclusivas da Paciente S16

---

Rho GTPase-activating protein 45  
Isoform 2 of Histone H2B type 2-F  
Protein ABHD14B  
Isoform 2 of GMP reductase 2  
Arginase-1  
Xaa-Pro dipeptidase  
40S ribosomal protein S9  
Isoform 2 of Programmed cell death 6-interacting protein  
Hermansky-Pudlak syndrome 1 protein  
Cytochrome P450 26B1  
Catalase  
Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase  
Src kinase-associated phosphoprotein 2  
m7GpppX diphosphatase  
Caspase-6  
Serine/arginine-rich splicing factor 3  
Beta-1,4-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase  
Isoform 3 of Protein MEMO1  
Coatomer subunit epsilon  
Isoform 2 of Delta-aminolevulinic acid dehydratase  
Isoform 7 of Interleukin enhancer-binding factor 3  
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B  
Hemopexin  
Serine/arginine-rich splicing factor 7  
Isoform 2 of Actin-related protein 2/3 complex subunit 5  
Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1  
Beta-2-glycoprotein 1  
Dihydropyrimidine dehydrogenase [NADP(+)]  
Dipeptidyl peptidase 2  
40S ribosomal protein S13  
Putative heat shock protein HSP 90-beta 2  
Isoform 5 of Protocadherin-15  
Proto-oncogene vav  
Proteoglycan 3  
Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R  
Aldose 1-epimerase  
Immunoglobulin heavy constant alpha 1



---

**Lista de Proteínas Exclusivas da Paciente S16**

---

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H  
Arachidonate 12-lipoxygenase, 12S-type  
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8  
Isoform 2 of Src substrate cortactin  
Isoform 3 of WAS/WASL-interacting protein family member 1  
Myomesin-3  
Immunoglobulin heavy variable 4-39  
Phostensin  
Protein S100-A4  
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14A  
Isoform B of Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1  
U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm6  
Thiosulfate sulfurtransferase  
Ras-related protein Rab-6A  
Arylsulfatase B  
Isoform 3 of UPF0696 protein C11orf68  
Alpha-1-antitrypsin  
Grancalcin  
ATP-citrate synthase  
Mitogen-activated protein kinase 1  
Actin, cytoplasmic 1  
Cystatin-A  
Platelet glycoprotein IX  
Beta-centractin  
Phosphomannomutase 2  
Isoform SM-B1 of Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and B'  
Glutathione S-transferase P  
Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform  
Isoform 2 of Thymidine phosphorylase  
GTPase Nras  
Galectin-10  
Isoform 2 of Creatine kinase U-type, mitochondrial  
Isoform 2 of Eukaryotic translation initiation factor 5A-1  
2'-deoxynucleoside 5'-phosphate N-hydrolase 1  
C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 3  
Isoform 3 of Nucleoside diphosphate kinase B  
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2  
Docking protein 3  
S-adenosylmethionine synthase isoform type-2  
Calcium-regulated heat-stable protein 1  
T-complex protein 1 subunit beta

---

**Lista de Proteínas Exclusivas da Paciente S16**

---

Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial

D-dopachrome decarboxylase

T-complex protein 1 subunit zeta

Immunoglobulin heavy constant gamma 4

Bifunctional purine biosynthesis protein PURH

Isoform 2 of Calnexin

---

## APÊNDICE VI – Lista de Proteínas Exclusivas da Paciente S17

---

### Lista de Proteínas Exclusivas da Paciente S17

---

WAS/WASL-interacting protein family member 1  
Ras-related protein Rab-27B  
X-ray repair cross-complementing protein 6  
Isoform 4 of Kinesin-like protein KIF2A  
Beta-hexosaminidase subunit beta  
Peroxiredoxin-5, mitochondrial  
Prothrombin  
Translin  
40S ribosomal protein S6  
Bisphosphoglycerate mutase  
Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C  
Isoform 3 of Polypyrimidine tract-binding protein 1  
Alpha-centractin  
tRNA-splicing ligase RtcB homolog  
N-acetylgalactosamine-6-sulfatase  
Src substrate cortactin  
Glutamine-dependent NAD(+) synthetase  
Immunoglobulin lambda-1 light chain  
Isoform 2 of Protein LZIC  
Nuclear valosin-containing protein-like  
AMP deaminase 2  
Delta-aminolevulinic acid dehydratase  
Isoform 3 of Syntaxin-binding protein 2  
Plasminogen activator inhibitor 1  
Isoform 2 of Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic  
Lamin-B receptor  
Isoform 2 of Nucleosome assembly protein 1-like 4  
N-acetylglucosamine-6-sulfatase  
Regulator of G-protein signaling 18  
Quinone oxidoreductase  
Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2  
Isoform 2 of Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 1  
40S ribosomal protein S5  
Isoform 2 of 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13  
Peroxiredoxin-4  
Isoform 2 of Eukaryotic translation initiation factor 4E  
Isoform 2 of Vacuolar protein sorting-associated protein 29

---

**Lista de Proteínas Exclusivas da Paciente S17**

---

Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial  
Tripeptidyl-peptidase 2  
Proteasome subunit beta type-10  
Isoform 7 of Tight junction protein ZO-2  
TP53-regulating kinase  
Hemoglobin subunit gamma-1  
Nuclear transport factor 2  
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2  
Importin subunit beta-1  
T-complex protein 1 subunit delta  
Isoform 2 of Neutral alpha-glucosidase AB  
Cysteine and glycine-rich protein 1  
Isoform 2 of Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1  
Isoform 2 of Septin-11  
DnaJ homolog subfamily C member 8  
Isoform 3 of NADH-cytochrome b5 reductase 3  
Immunoglobulin heavy constant gamma 2  
D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase 1  
Isoform 2 of AP-2 complex subunit alpha-2  
Septin-5  
Glycine--tRNA ligase  
U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa  
Actin-related protein 2/3 complex subunit 5  
POTE ankyrin domain family member F  
60S acidic ribosomal protein P2  
Obg-like ATPase 1  
Ras-related protein Rab-13  
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1  
DNA damage-binding protein 1  
Latexin  
E3 SUMO-protein ligase RanBP2  
Cytosolic non-specific dipeptidase  
Actin, alpha skeletal muscle  
Trem-like transcript 1 protein  
Uncharacterized protein FLJ45252  
Lymphocyte cytosolic protein 2  
Coatmer subunit delta  
EH domain-containing protein 3  
Costars family protein ABRACL  
Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma  
Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial

---

**Lista de Proteínas Exclusivas da Paciente S17**

---

Dynein light chain 2, cytoplasmic  
4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase  
Erythrocyte band 7 integral membrane protein  
Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein  
Hypoxia up-regulated protein 1  
Isoform 3 of Drebrin-like protein  
Immunoglobulin alpha-2 heavy chain  
Isoform 2 of Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1  
Isoform Non-brain of Clathrin light chain A  
Cathelicidin antimicrobial peptide  
ADP-dependent glucokinase  
WD repeat-containing protein 44  
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1  
Isochorismatase domain-containing protein 1  
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J  
Cytoplasmic protein NCK2  
Heme-binding protein 1  
Histidine triad nucleotide-binding protein 1  
High mobility group protein HMG-I/HMG-Y  
Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3  
Ras-related protein Rab-21  
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9  
Nidogen-2  
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1  
Proteasome subunit beta type-9  
HLA class I histocompatibility antigen, Cw-17 alpha chain  
Platelet glycoprotein 4  
Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1  
Isoform 2 of Rho GTPase-activating protein 4  
EH domain-containing protein 1  
Isoform 3 of Vitamin D-binding protein  
EMILIN-1  
Isoform 4 of Selenium-binding protein 1  
Immunoglobulin heavy variable 1-18  
Cathepsin Z  
Isoform 10 of Tropomyosin alpha-1 chain  
Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 8  
Adenosine kinase  
14-3-3 protein beta/alpha  
Coronin-1B  
Bridging integrator 2

---

**Lista de Proteínas Exclusivas da Paciente S17**

---

Osteoclast-stimulating factor 1  
Complement factor B  
D-dopachrome decarboxylase-like protein  
Keratin, type I cytoskeletal 10  
Isoform 2 of Peroxisomal multifunctional enzyme type 2  
40S ribosomal protein S12  
Isoform 2 of Interactor protein for cytohesin exchange factors 1  
Reticulon-4  
Isoform Long of Erythrocyte membrane protein band 4.2  
Isoform 2 of Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase  
COP9 signalosome complex subunit 6  
Plectin  
Pyridoxal kinase  
UPF0587 protein C1orf123  
Wiskott-Aldrich syndrome protein  
Protein DEK  
Immunoglobulin kappa variable 2-40  
Vascular endothelial growth factor receptor 3  
Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2  
Stromal interaction molecule 1  
Kalirin  
Isoform 2 of Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial  
Amyloid beta A4 protein  
Isoform 2 of RNA 3'-terminal phosphate cyclase  
Spectrin alpha chain, erythrocytic 1  
Isoform 2 of Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1  
Ras-related protein Rab-44  
Glycogen [starch] synthase, muscle  
Complement C3  
Quinone oxidoreductase PIG3  
Cathepsin B  
Thymidine phosphorylase  
Isoform 2 of Arginase-1  
Receptor of activated protein C kinase 1  
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A  
Tubulin-folding cofactor B  
AP-3 complex subunit mu-1  
Acyl-protein thioesterase 1  
Isoform Er13 of Ankyrin-1  
Isoform 2 of Integrin alpha-M  
Actin, cytoplasmic 2

---

**Lista de Proteínas Exclusivas da Paciente S17**

---

Proteasome activator complex subunit 2  
Malectin  
Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha  
Glycogen debranching enzyme  
Ribose-5-phosphate isomerase  
Beta-galactosidase  
28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein  
Nucleoside diphosphate kinase B  
Ezrin  
Rho GTPase-activating protein 18  
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1  
Protein SETSIP  
Lysosomal alpha-mannosidase  
Alcohol dehydrogenase class-3  
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial  
Isoform 3 of Interleukin-1 receptor antagonist protein  
Integrin-linked protein kinase  
Rho-associated protein kinase 2  
Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha  
P-selectin  
Protein CDV3 homolog  
Dihydropyridyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial  
Isoform 2 of LIM and SH3 domain protein 1  
NAD(P)H-hydrate epimerase  
Isoform 6 of Zinc finger protein 185  
Coatmer subunit gamma-1  
Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial  
Lysosome-associated membrane glycoprotein 5  
Nidogen-1  
Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic  
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2  
Uroporphyrinogen decarboxylase  
Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1  
Copper chaperone for superoxide dismutase  
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q  
Immunoglobulin heavy constant gamma 3  
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F  
Serine/arginine repetitive matrix protein 1  
Serum deprivation-response protein  
HLA class I histocompatibility antigen, B-7 alpha chain

---

**Lista de Proteínas Exclusivas da Paciente S17**

---

Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic  
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3  
Isoform 2 of Galactokinase  
60 kDa heat shock protein, mitochondrial  
Bleomycin hydrolase  
Tubulin polyglutamylase TTLL4  
Isoform 2 of Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2  
Hexokinase-3  
Isoform 2 of 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1  
NEDD8-conjugating enzyme Ubc12  
40S ribosomal protein S18  
Aconitate hydratase, mitochondrial  
Cyclin-dependent kinase 11B  
Isoform 8 of Protein transport protein Sec31A  
Dynein heavy chain 9, axonemal  
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17  
Beta-2-microglobulin  
Synaptotagmin-like protein 4  
Isoform 2 of Acid ceramidase  
Isoform 2 of Ras-related protein Rab-18

---



## ANEXO I – Folha de Rosto de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

INSTITUTO FERNANDES  
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/  
MS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** CONSÓRCIO MOLECULAR PARA ESTUDO DAS DOENÇAS GENÉTICAS DE CARÁTER CRÔNICO ASSOCIADO AOS DEFEITOS CONGÊNITOS, DOENÇA DO DESENVOLVIMENTO E CÂNCER INFANTIL. UM MODELO PARA O SUS A PARTIR DA VIA CELULAR DAS RASOPATIAS.

**Pesquisador:** Juan Clinton Llerena Junior

**Área Temática:**

**Versão:** 8

**CAAE:** 46884615.3.0000.5269

**Instituição Proponente:** Instituto Fernandes Figueira - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS

**Patrocinador Principal:** Instituto Fernandes Figueira - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.098.913

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda para inclusão nova metodologia de avaliação de proteínas e ajuste do TCLE/TALE ao novo método

#### Objetivo da Pesquisa:

Apresentar emenda para inclusão de nova metodologia de avaliação e ajustes do TCLE/TALE ao novo método

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Pesquisadores incluíram informação sobre a identificação de novos achados pelo método proposto de avaliação de proteínas

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não se aplica

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TALE e TCLE foram ajustados ao novo método de análise

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

**Endereço:** RUI BARBOSA, 716

**Bairro:** FLAMENGO

**CEP:** 22.250-020

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)2554-1730

**Fax:** (21)2552-8491

**E-mail:** cepiff@iff.fiocruz.br

**INSTITUTO FERNANDES  
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/  
MS**



Continuação do Parecer: 3.098.913

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento  | Arquivo  | Postagem               | Autor                       | Situação |
|---|--|------------------------|-----------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto                            | PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_1062315_E4.pdf                    | 06/12/2018<br>10:29:57 |                             | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Proteoma_Termo_de_Assentimento_12_17_anos.docx           | 06/12/2018<br>10:26:23 | Juan Clinton Llerena Junior | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Proteoma_Termo_de_Assentimento_6_11_anos.docx            | 06/12/2018<br>10:26:00 | Juan Clinton Llerena Junior | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Proteoma_Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido.docx | 06/12/2018<br>10:25:47 | Juan Clinton Llerena Junior | Aceito   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                 | Nova_metodologia_PROJETO_RASOP ATIAS.doc                 | 06/12/2018<br>10:25:24 | Juan Clinton Llerena Junior | Aceito   |
| Declaração de Pesquisadores                               | EMENDA_Proteoma.docx                                     | 06/12/2018<br>10:24:41 | Juan Clinton Llerena Junior | Aceito   |
| Declaração de Pesquisadores                               | 30_11Proteoma_Carta_CEP.docx                             | 06/12/2018<br>10:24:20 | Juan Clinton Llerena Junior | Aceito   |
| Folha de Rosto  | 2016_Folha_de_Rosto_Projeto_RASopattias_CEP_IFF.pdf      | 01/02/2016<br>12:56:24 | Juan Clinton Llerena Junior | Aceito   |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 20 de Dezembro de 2018

Assinado por:  
**Ana Maria Aranha Magalhães Costa**  
(Coordenador(a))

Endereço: RUI BARBOSA, 716  
Bairro: FLAMENGO CEP: 22.250-020  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)2554-1730 Fax: (21)2552-8491 E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br

## ANEXO II – Termo de Autorização de Uso de Imagem e de Voz (para Menores de Idade)



### TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE USO DE IMAGEM E VOZ MENOR DE IDADE

Pelo presente instrumento, eu, \_\_\_\_\_, responsável pelo(a) menor \_\_\_\_\_, autorizo, de forma irrevogável e irretroatável, ao Centro de Genética Médica do Instituto Fernandes Figueira da Fundação Oswaldo Cruz, esta, entidade pública criada e mantida pela União Federal, na forma da Lei nº 5.019, de 07 de Junho de 1966, modificada pelo decreto nº 4.725/03, integrante da Administração Federal Indireta, sediada na Avenida Brasil, nº 4.365, Maguinhos, na cidade do Rio de Janeiro, inscrita no CNPJ sob o nº 33.781.055/0001-35, doravante denominada simplesmente “FIOCRUZ”, a utilizar a imagem do meu filho(a) e dos seus exames complementares, fixados nesta data, na íntegra ou em partes, para os específicos fins educativos de pesquisa médica e divulgação científica.

A presente autorização é concedida gratuitamente, sem quaisquer ônus para a FIOCRUZ, conforme definido acima.

Rio de Janeiro, de de 2018

Assinaturas

Nome Completo \_\_\_\_\_

Endereço \_\_\_\_\_

Identidade \_\_\_\_\_

Contato \_\_\_\_\_

Centro de Genética Médica – Instituto Nacional Fernandes Figueira – Rio de Janeiro, RJ. Dr. Juan Llerena Jr (021-25541752) – Dra. Sayonara Gonzalez (021-25541735)

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Nacional Fernandes Figueira – Fiocruz, sito à Rua Rui Barbosa, 716, Flamengo – Rio de Janeiro, RJ. Secretária Maria Auxiliadora (Sra. Dora) 021-25541730