



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

CYNTHIA SILVEIRA

**Investigação das displasias esqueléticas associadas a luxações e outros problemas articulares a partir do sequenciamento de um painel de genes *FLNB, CANT1, XYLT1, KIF22, B3GALT6, CHST3, SLC26A2/DTDST e IMPAD1*.**

CAMPINAS

2016

**CYNTHIA SILVEIRA**

**Investigação das displasias esqueléticas associadas a luxações e outros problemas articulares a partir do sequenciamento de um painel de genes *FLNB, CANT1, XYLT1, KIF22, B3GALT6, CHST3, SLC26A2/DTDST e IMPAD1*.**

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências Médicas, área de concentração Ciências Biomédicas.

**ORIENTADORA:** DENISE PONTES CAVALCANTI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL  
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA  
ALUNA CYNTHIA SILVEIRA E ORIENTADA PELA  
PROFA. DRA. DENISE PONTES CAVALCANTI.

CAMPINAS

2016

# **BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO**

CYNTHIA SILVEIRA

**Orientadora PROFA. DRA. DENISE PONTES CAVALCANTI**

## **MEMBROS:**

**1. PROFA. DRA. DENISE PONTES CAVALCANTI**

**2. PROF. DR. ROBERT EDWARD POGUE**

**3. PROFA. DRA. ANTONIA PAULA MARQUES DE FARIA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

**Data: 28/07/2016**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos pela ajuda e apoio, sem vocês essa trajetória teria sido muito mais difícil. Contem comigo assim como eu sei que posso contar com vocês:

Aos meus pais, **Walter e Sueli**, pela compreensão nos momentos de ausência, pelo apoio, por acreditarem em mim, por respeitarem sempre minhas escolhas e decisões e, acima de tudo pelos valores e educação que tenho recebido durante todos esses anos de vida, herança maior não há. Terei uma eterna gratidão a vocês.

Aos meus irmãos, **Leonardo e Marcelo**, pela nossa harmonia e nossa irmandade. Tenho muita sorte de ter vocês ao meu lado e poder contar sempre com essa amizade que nossos pais fazem questão que esteja sempre presente em nossa família.

Aos meus sobrinhos, **Cauê e Miguel**, estar com vocês me enche de alegria. Contem sempre comigo, mesmo distante estarei disposta ajudá-los em todos os momentos.

À minha prima, **Camila**, por compartilhar o mesmo sentimento de amor. Crescemos juntas e seguimos nossos caminhos por trilhas paralelas, mas estamos sempre em sintonia e nos reencontrando em momentos especiais. Que continuemos seguindo nossos sonhos com muita paixão, mesmo que esses incluam longos e distantes voos. Obrigada!

Aos meus **avôs, avós, tios, tias, primos e primas**, a toda a minha **família**, pelo apoio e incentivo de sempre. A caminhada é longa e cheia de obstáculos, ter vocês ao meu lado me dá força e ânimo para superar as dificuldades. Obrigada pelo amor e união presente em nossa família.

À **Denise Pontes Cavalcanti**, minha orientadora, pelo apoio, estímulo, compreensão e paciência. Tenho uma imensa gratidão e orgulho por ser sua aluna e por participar do grupo das **Displasias Esqueléticas**.

À **Tathiane Yoshie Kanazawa e Karina da Costa Silveira**, com toda paciência e dedicação vocês me ensinaram e continuam me ensinando muito não só no laboratório. Muito obrigada por estarem sempre ao meu lado dispostas a me ajudar. Não hesitem em sempre contar comigo.

À **Carolina Moreno, Thaís Fenz Araújo e Maria Dora Lacarrubba**, obrigada por estarem ao meu lado e por me ajudarem, vocês também fazem parte dessa conquista.

À **Luciana Bonadia**, pelos ensinamentos e ajuda em todos os momentos, pelas conversas e cafés, muito obrigada!

Às alunas e alunos do Laboratório de Genética Molecular, em especial, **Luciana Rezende, Stephanie Villa-Nova, Simoni Avansini, Roby Will Vencatto, Alexandre Hilário, Thiago Mazzo Peluzzo**. Ter a companhia de vocês no dia a dia tornou essa etapa mais divertida, que continue assim por muito tempo.

Aos membros da banca (titulares e suplentes) pelos comentários e sugestões apresentadas na defesa.

Às famílias/pacientes que participaram do projeto.

Aos colaboradores externos que contribuíram com o envio dos casos.

Às agências de fomento à pesquisa que contribuíram para a execução do projeto: CAPES, CNPq e FAPESP.

## RESUMO

As displasias esqueléticas ou osteocondrodismplasias (OCDs) são doenças genéticas que afetam o crescimento e o desenvolvimento do tecido ósseo e cartilaginoso produzindo, em geral, baixa estatura e contribuindo para morbimortalidade infantil. Algumas displasias esqueléticas apresentam um acometimento particular das articulações seja com luxações seja com frouxidão ligamentar. Na atual nosologia e classificação das desordens esqueléticas, o grupo de OCD associadas a luxações múltiplas inclui a displasia de *Desbuquois* e seus subtipos (todos associados aos genes *CANT1*, *XYLT1*), a displasia pseudodistrófica (ainda sem gene conhecido), e as displasias espôndilo-epi-metafisária tipo leptodactílico (*KIF22*) e a tipo Beighton (*B3GALT6*). Além dessas, outras OCD também apresentam um comprometimento articular importante – a displasia distrófica (*SLC26A2/DTDST*), a síndrome de Larsen (*FLNB*) e um novo fenótipo associado ao gene *IMPAD1*. Visto que a correlação genótipo-fenótipo dessas OCDs não está bem estabelecida, o objetivo do presente estudo foi investigar os genes *FLNB*, *CANT1*, *XYLT1*, *KIF22*, *B3GALT6*, *CHST3*, *SLC26A2/DTDST* e *IMPAD1* em uma coorte de pacientes com fenótipos sugestivos das OCD supracitadas. Foram estudados 17 pacientes com OCD associada a um comprometimento articular seguindo um fluxograma direcionado pelo diagnóstico clínico inicial. A análise molecular foi feita pelo sequenciamento automático bidirecional de Sanger. Foram identificadas 13 mutações em 11 pacientes que apresentavam os seguintes diagnósticos: Síndrome de Larsen (*FLNB*), DBQDII (*XYLT1*), SEMD-JL tipo leptodactílico (*KIF22*), SEMD-JL tipo Beighton (*B3GALT6*), SED tipo *CHST3* (*CHST3*), AO2 (*SLC26A2/DTDST*) e DTD (*SLC26A2/DTDST*). Foram encontradas: oito variantes do tipo *missense* (cinco inéditas), três *frameshifts* (2 inéditas), duas em sítio de *splicing*. Das variantes do tipo *missense*, apenas uma, p.R279W no gene *DTDST*, foi recorrente em quatro pacientes. Em seis pacientes nenhuma mutação foi encontrada no painel de genes estudado. Concluindo, os resultados deste estudo permitiram a definição diagnóstica em 11 pacientes (Síndrome de Larsen [1], DBQDII [1], SEMD-JL tipo leptodactílico [3], SEMD-JL tipo Beighton [1], SED tipo *CHST3* [1], AO2 [1] e DTD [3]) confirmando a correlação gene-

fenótipo inicialmente suspeitada, com exceção do *KIF22*, no qual foi identificada uma variante fora da região de *hot spot*. Em seis casos as bases moleculares permanecem desconhecidas, sugerindo a adoção de novas tecnologias, como o sequenciamento de nova geração, para dar continuidade a investigação desses fenótipos.

Palavras-chave: luxação, frouxidão ligamentar, displasias esqueléticas.

## ABSTRACT

The skeletal dysplasias are part of a group of genetic development disorders that affect the growth and development of bones and cartilage tissue, producing in general growth alterations, such as short stature, which contributes to child morbi-mortality. Some skeletal dysplasias have a particular joint involvement with dislocations and joint laxity. The current nosology and classification of genetic skeletal disorders, the group of dysplasias with multiple joint dislocations includes *Desbuquois* Dysplasias and its subgroup (related to *CANT1* and *XYLT1* genes), pseudodiastrophic dysplasia (without gene related), and the Spondyloepimetaphyseal dysplasia with Leptodactylic-type joint laxity (*KIF22*) and Beighton type (*B3GALT6*). There are others Skeletal Dysplasias which also exhibit an important joint involvement – Diastrophic dysplasia (*SLC26A2/DTDST*), Larsen syndrome (*FLNB*) and a new phenotype related to *IMPAD1* gene. Been aware that the genotype phenotype correlation of these conditions are not well established, the purpose of the present project was to investigate the genes *FLNB*, *CANT1*, *XYLT1*, *KIF22*, *B3GALT6*, *CHST3*, *SLC26A2/DTDST* e *IMPAD1* in a cohort of 17 patients with the suggestive phenotypes mentioned above, with dislocations and joint laxity following a flowchart directed by the initial clinical diagnosis. The molecular analyses were performed by automated Sanger bidirectional sequencing. Thirteen variants were identified in 11 patients with the diagnosis: Larsen Syndrome (*FLNB*), DBQDII (*XYLT1*), SEMD-JL leptodactylic-type (*KIF22*), SEMD-JL Beighton-type (*B3GALT6*), SED *CHST3*-type (*CHST3*), AO2 (*SLC26A2/DTDST*) and DTD (*SLC26A2/DTDST*). The identified variants were: eight missense (five news), three frameshifts (two news) and two splicing site. Among the missense variants, only one was recurrent p.R279W in the *SLC26A2/DTDST* gene in four patients. In six patients, no pathogenic variants were identified in the gene panel. In conclusion, the results of this study allowed the diagnostic confirmation in 11 patients (Larsen Syndrome [1], DBQDII [1], SEMD-JL leptodactylic-type [3], SEMD-JL Beighton-type [1], SED *CHST3*-type [1], AO2 [1] e DTD [3]) establishing the gene-phenotype association initially suspected, with the exception of *KIF22* gene which was identified a mutation outside of the hotspot region. In six cases the molecular bases remains unknown, reinforcing

the continuation of this study with the introduction of new technologies as next-generation sequencing.

Key-words: dislocations, joint laxity, skeletal dysplasias.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1.** Representação esquemática do início da formação dos PGs pela associação da proteína central ao GAG através de um tetrassacarídeo de ligação (Adaptado de Jones *et al.*, 2015).

**Figura 2.** Apresentação simplificada da frequência dos tipos de mutações encontradas nos pacientes do estudo.

**Figura 3.** À direita, foto da mão paciente 1 apresentando o polegar espatulado. À esquerda, eletroferogramas parciais do éxon 7 do gene *FLNB*, do paciente (A) mostrando a troca de uma Guanina por uma Timina em heterozigose e de um indivíduo controle (B) sem a alteração.

**Figura 4.** Radiografias do indivíduo 12 pós-óbito. Note em (A) Úmero bífido, (B) *clef* coronal dos corpos vertebrais torácicos e lombares, (C) fêmur com aparência de chave sueca e (D) avanço de ossificação dos ossos do tarso.

**Figura 5.** À esquerda, radiografias do paciente 3 aos 2 anos e 10 meses. (A) Metáfises alargadas e epífises minúsculas, (B) metacarpos delgados e ausência de ossificação de ossos do carpo. À direita, eletroferograma parcial do éxon 4 do gene *KIF22* do paciente 3 mostrando a troca de uma Citosina por uma Timina em heterozigose.

**Figura 6.** À esquerda radiografias do paciente 4 aos 2 anos 3 meses mostram: (A) metáfises alargadas (B) metacarpos delgados e ausência de ossificação dos ossos do carpo. À direita eletroferograma parcial do éxon 4 do gene *KIF22* do paciente 4 mostrando a troca de uma Guanina por uma Adenina em heterozigose.

**Figura 7.** Radiografias do paciente 5. Mostrando aos 6 anos (A) escoliose, (B) metáfises alargadas, aos 2 anos e 6 meses (C) metacarpos delgados e ausência de ossificação dos ossos do carpo.

**Figura 8.** Eletroferograma parcial do éxon 5 do gene *KIF22* do paciente 5 mostrando a troca de uma Guanina por uma Adenina em heterozigose.

**Figura 9.** Radiografias do paciente 6. (A) 1 ano e 3m, observa-se alargamento, colos femorais encurtados, leve hipoplasia de asas ilíacas, irregularidade dos acetábulos e estreitamento da chanfradura ciática. (B) 1 ano e 3 meses observa-se discreta platispondilia com certa irregularidade de vértebras lombares. (C) 1 ano observa-se avanço de maturação carpal.

**Figura 10.** Eletroferograma parcial do éxon 1 do gene *B3GALT6* do paciente. À esquerda se observa a duplicação de uma guanina e à direita a troca de um citosina por uma timina, ambas em heterozigose.

**Figura 11.** Radiografias do paciente 7. Úmero distal bífido à direita.

**Figura 12.** Eletroferograma parcial do trio. O qual o pai não apresenta as variantes, enquanto a mãe apresenta em heterozigose e o propósito a apresenta em homozigose.

**Figura 13.** Fotografia do gel de eletroforese mostrando os fragmentos amplificados do éxon 3A do gene *CHST3* referente ao Propósito (Pr), Pai (P), Mãe (M) e Controle (C), nos ciclos: 24, 26, 27, 28 e 35 e o branco.

**Figura 14.** Histograma obtido no *software ImageJ 1.50i* referente ao Propósito, Pai, Mãe e controle respectivamente.

**Figura 15.** Radiografias do indivíduo 8. Em A, ossos longos encurtados, alargamento metafisário. Em (B), metáfise distal de úmero com afilamento da porção distal e polegares típicos.

**Figura 16.** Parte do eletroferograma do propósito mostrando as mutações c.[1905delG] p.[T627L\*23] em A, e c.[862C>T] p.[R279W] em B.

**Figura 17.** Radiografias dos pacientes 9 e 10. Pode-se observar o polegar em caroneiro nos dois casos (A e C), úmero distal bífido (B) no paciente 9 e ossos longos encurtados no paciente 10 em D.

**Figura 18.** Parte do eletroferograma dos pacientes 9, 10 e 11 respectivamente do gene *SLC26A2/DTDST* mostrando as variantes identificadas, em heterozigose. Em A e B (paciente 9), se observa a troca de um citosina por uma timina e em a deleção de uma adenina, ambas em heterozigose. Em C e D (paciente 10) se observa a troca de uma citosina por uma timina e a troca de uma guanina por uma citosina. Em E e F se observa a troca de uma guanina por uma citosina e uma citosina por uma timina.

**Figura 19.** Fotos e radiografias do paciente 13 aos 2 anos. Em A, *Pectus carinatum* em evidência, em B lordose lombar acentuada, em C subluxação de quadril, luxação de quadril, em D alargamento metafisário de joelhos e, em E avanço de maturação carpal.

**Figura 20.** A - Braquidactilia com desvio radial dos dedos, B - ptose palpebral, C - Luxação do quadril, D e E- atraso de maturação carpal e falanges delta em mãos.

**Figura 21.** Paciente 15. A - Encurtamento de polegares, C - luxação de quadril com proeminência de trocanter menor (~chave sueca), E e F - braquidactilia e aumento de maturação carpal.

**Figura 22.** Paciente 16 . A- Assimetria corporal, B- braquidactilia, C - escoliose, D – Displasia de quadril, E- luxação de joelhos.

**Figura 23.** A - *pectus carinatum*, luxação de joelhos, pés tortos. B e D – ausência de centros de ossificação carpal e tarsal, C - cifose cervical, D – luxação.

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1.** Grupos relacionados a OCDs com luxações, segundo a última nosologia seus respectivos fenótipos e genes associados.

**Quadro 2.** Relação dos pacientes incluídos na casuística, diagnóstico e a mutação encontrada.

**Quadro 3.** Relação das variantes encontradas nos pacientes da casuística de acordo com a sua classificação.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACGIB</b>	Acondrogênese do tipo IB
<b>Ala (A)</b>	Alanina
<b>AMP</b>	Monofosfato de adenosina
<b>AO2</b>	Atelosteogênese tipo II
<b>Arg (R)</b>	Arginina
<b>Asn (N)</b>	Asparagina
<b>Asp (D)</b>	Aspartato
<b>B3GALT6</b>	<i>Beta-1,3-galactosyltransferase 6</i>
<b>CAISM</b>	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
<b>CANT1</b>	<i>Calcium Activated Nucleotidase 1</i>
<b>CoSMO-B</b>	<i>Congenital Malformations and Osteochondrodysplasias in Brazil</i> (Malformações Esqueléticas Congênitas e Osteocondrodismplasias no Brasil)
<b>Cys (C)</b>	Cisteína
<b>CGH</b>	<i>Comparative genomic hybridization</i> (hibridização genômica comparativa)
<b>DBQD</b>	Displasia de <i>Desbuquois</i>
<b>DBQDI</b>	Displasia de <i>Desbuquois</i> tipo I
<b>DBQDII</b>	Displasia de <i>Desbuquois</i> tipo II
<b>dbSNP</b>	<i>Database of Short Genetic Variation</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico)
<b>dNTP</b>	<i>deoxyribonucleotide triphosphates</i> (desoxirribonucleotídeo trifosfato)
<b>DTD</b>	Displasia Diastrófica
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetraacético
<b>EVS</b>	<i>Exome Variant Server</i>
<b>ExAC</b>	<i>Exome Aggregation Consortium</i>
<b>FLNB</b>	gene que codifica a proteína Filamina b
<b>Fs</b>	<i>Frameshift</i> (Mudança na matriz de leitura)
<b>GAG</b>	Glicosaminoglicano
<b>GalNAc</b>	N-acetilgalactosamina
<b>GlcUA</b>	Ácido glucurônico
<b>Gly (G)</b>	Glicina
<b>Gln (Q)</b>	Glutamina
<b>Glu (E)</b>	Glutamato
<b>gPAPP</b>	3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato - residente do Golgi (g-PAPP do inglês, <i>Golgi-resident PAP phosphatase</i> ),
<b>HC</b>	Hospital de Clínicas
<b>HGMD®</b>	<i>Human Gene Mutation Database</i>
<b>HGVS</b>	<i>Human Genome Variation Society</i> (Sociedade de Variações do Genoma Humano)
<b>His (H)</b>	Histidina
<b>Ile (I)</b>	Isoleucina

<b>IMPAD1</b>	gene <i>Inositol Monophosphatase Domain Containing 1</i>
<b>KIF22</b>	<i>Kinesin family member 22</i>
<b>Leu (L)</b>	Leucina
<b>Lis (L)</b>	Lisina
<b>MEC</b>	Matriz Extracelular
<b>Met (M)</b>	Metionina
<b>MgCl<sup>2</sup></b>	Cloreto de magnésio
<b>OCD</b>	Osteocondrodisplasia
<b>OMIM</b>	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
<b>PG</b>	Proteoglicano
<b>Pro (P)</b>	Prolina
<b>rMED</b>	Displasia Múltipla Epifisária recessiva (do inglês <i>Recessive Multiple Epiphyseal Dysplasia</i> )
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sódio
<b>SED</b>	Displasia espôndilo-epifisária
<b>SEMD</b>	Displasia espôndilo-epi-metafisária
<b>SEMD-JL</b>	Displasia espôndilo-epi-metafisária com frouxidão ligamentar
<b>Ser (S)</b>	Serina
<b>SLC26A2/DTDST</b>	<i>Solute carrier family 26 member 2</i> - gene que codifica a proteína transportadora de sulfato / <i>Diastrophic Dysplasia Sulfate Transporter</i>
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>Thr (T)</b>	Treonina
<b>Tyr (T)</b>	Tirosina
<b>Trp (W)</b>	Triptofano
<b>UDP</b>	Uridina difosfato
<b>UNICAMP</b>	Universidade Estadual de Campinas
<b>Val (V)</b>	Valina
<b>XTI</b>	Enzima xilosiltransferase I
<b>XYLT1</b>	<i>Xylosyltransferase 1</i>

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	6
<b>ABSTRACT</b>	8
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b>	10
<b>LISTA DE QUADROS</b>	13
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	14
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	18
1.1. Revisão da Literatura	18
1.1.1 Grupo das filaminas	20
1.1.2 Displasias esqueléticas com luxações múltiplas	21
1.1.2.1 Displasia de <i>Desbuquois</i>	21
1.1.2.2 Displasias espôndilo-epi-metafisária tipo leptodactílico e tipo Beighton	23
1.1.3 Grupo dos defeitos de sulfatação	24
1.1.3.1 Displasia espôndilo-epifisária (SED) tipo <i>CHST3</i>	25
1.1.3.2 Atelosteogênese II (AO2) e Displasia Diastrófica (DTD)	25
1.1.3.3 Condrodisplasia com luxações tipo gPAPP	27
1.1.4 Articulações	27
1.1.5 Matriz extracelular e Proteoglicanos	29
<b>2. OBJETIVOS</b>	30
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
<b>3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS</b>	30
3.1. Casuística	30
3.2. Métodos	31
3.2.1. Extração de DNA genômico	31
3.2.2. Desenho e padronização de <i>Primers</i>	31
3.2.3. Amplificação de DNA - Reação em cadeia da polimerase (PCR - <i>Polymerase Chain Reaction</i> )	32
3.2.4. Reação de ExoStar™ Illustra™	33
3.2.5. Sequenciamento por eletroforese em capilar (método de Sanger)	34
3.2.6. Sequenciamento de controles	34
3.2.7. Análises computacionais	34
3.2.8. Análise semiquantitativa por PCR	35
<b>4. RESULTADOS</b>	37
4.1. Síndrome de Larsen ( <i>FLNB</i> )	40

4.2. Displasias de <i>Desbuquois</i> ( <i>CANT1</i> e <i>XYLT1</i> ).....	40
4.3. SEMD-JL tipo leptodactílico ( <i>KIF22</i> ).....	41
4.4. SEMD-JL tipo Beighton ( <i>B3GALT6</i> ) .....	43
4.5. SED tipo <i>CHST3</i> .....	45
4.6. AO2 e DTD ( <i>SLC26A2/DTDST</i> ).....	47
4.7. Condrodisplasia com luxações tipo gPAPP ( <i>IMPAD1</i> ) .....	49
4.8. Pacientes com fenótipos presuntivos .....	50
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	52
5.1. Síndrome de Larsen ( <i>FLNB</i> ).....	53
5.2. Displasia de <i>Desbuquois</i> ( <i>CANT1</i> e <i>XYLT1</i> ) .....	53
5.3. SEMD-JL tipo leptodactílico ( <i>KIF22</i> ).....	54
5.4. SEMD-JL tipo Beighton ( <i>B3GALT6</i> ) .....	55
5.5. SED tipo <i>CHST3</i> .....	56
5.6. AO2 e DTD ( <i>SLC26A2/DTDST</i> ).....	57
5.7. Condrodisplasia com luxações tipo gPAPP ( <i>IMPAD1</i> ) .....	57
5.8. Pacientes com fenótipos presuntivos .....	58
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	59
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	59
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	61
<b>9. RECURSOS DA INTERNET</b> .....	68
<b>10. ANEXOS</b> .....	68
<b>Anexo 1:</b> Parecer do Comitê de ética em Pesquisa .....	74
<b>Anexo 2:</b> Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	75
<b>Anexo 3:</b> Artigo publicado – American Journal of Medical Genetics: Part A.....	78
<b>11. APÊNDICES</b> .....	86

## 1. INTRODUÇÃO

Displasias esqueléticas ou osteocondrodisplasias (OCDs) são doenças genéticas que afetam o crescimento e o desenvolvimento do tecido ósseo e cartilaginoso produzindo, em geral, alterações do crescimento que podem se manifestar durante o período pré e pós-natal, produzindo uma variedade de fenótipos, cujo sinal mais comum costuma ser a baixa estatura. A maioria das OCDs são raras, no entanto, a prevalência daquelas que tem manifestação perinatal, no seu conjunto, é de 3,2/10.000<sup>1</sup>.

As OCDs são agrupadas dentro da nosologia e classificação das doenças ósseas em famílias ou grupos, levando em conta não só aspectos clínicos e radiológicos, como também as suas bases moleculares<sup>2</sup>.

Algumas displasias esqueléticas apresentam um acometimento particular das articulações, seja com luxações seja com frouxidão ligamentar. Além das OCDs classificadas no grupo das displasias com múltiplas luxações articulares – Displasia de Desbuquois [DBQDI, OMIM 251450], e seus dois subtipos (D. Desbuquois-II [DBQDI, OMIM 615777] e a variante Kim [OMIM 251450]), Displasia pseudodistrófica (OMIM 264180), Displasias espôndilo-epi-metafisária (SEMD do inglês) tipo leptodactílico (OMIM 603546) e SEMD tipo *Beighton* (OMIM 271640), outras OCDs ora classificadas em outros grupos na atual nosologia, também apresentam um comprometimento *major* das articulações. O conhecimento das bases moleculares dessas condições tem mostrado que a maioria delas tem em comum o envolvimento de genes associados à síntese dos proteoglicanos, substâncias abundantes nas cartilagens articulares<sup>2</sup>.

A finalidade desse projeto foi investigar uma coorte de pacientes com displasias esqueléticas associadas a luxações e outros problemas articulares por meio do sequenciamento direto de um painel de genes de modo a contribuir para uma melhor compreensão dessas condições.

### 1.1. Revisão da Literatura

Desde 1970 as OCDs vem sendo classificadas dentro de um grupo de doenças ósseas constitucionais, mais recentemente denominado Nosologia e

Classificação das Doenças Genéticas Esqueléticas<sup>2,3</sup>. Essa classificação é periodicamente atualizada, com o objetivo, de incluir novas condições e novos genes conhecidos, facilitar o diagnóstico e ajudar e melhorar o reclassificar condições a partir do melhor conhecimento das bases moleculares, entre outros<sup>2</sup>.

A nona e última revisão da nosologia de 2015 mantém a classificação dessas condições levando em conta não somente os aspectos clínico-radiológicos como também suas bases moleculares e inclui outros grupos nosológicos além das displasias esqueléticas propriamente ditas<sup>2</sup>.

Algumas OCDs apresentam um acometimento particular das articulações seja com luxações seja com frouxidão ligamentar, dentre essas destacam-se 10 fenótipos classificados em três grupos – grupo das filaminas (Síndrome de Larsen – OMIM 150250), grupo dos defeitos de sulfatação e o grupo das OCDs associadas a luxações múltiplas. O Quadro 1 abaixo apresenta os grupos citados acima, seus fenótipos e genes relacionados, segundo a última nosologia<sup>2</sup>. Entre as displasias associadas a luxações, o fenótipo mais conhecido é a síndrome de Larsen decorrente de mutações no gene *FLNB* (MIM# 603381) No grupo dos defeitos de sulfatação tem-se a displasia espândilo-epifisária (SED) (OMIM 143095), tipo *CHST3* (MIM# 603799), a atelosteogênese II – AO2 (OMIM 256050) e a displasia diastrófica - DTD (OMIM 222600) associadas ao gene *SLC26A2/DTDS* (MIM# 606718) e recentemente um novo fenótipo, a condrodisplasia com luxações tipo gPAPP (OMIM 614078) foi descrito associado ao gene *IMPAD1* (MIM# 614010). No grupo das displasias com luxações múltiplas estão a displasia de Desbuquois e seus subtipos, associadas aos genes *CANT1*(MIM#613165) e *XYLT1* (MIM#608124), displasias espândilo-epi-metafisária tipo leptodactílico (SEMD-JL tipo leptodactílico ou tipo Hall, associado ao gene *KIF22* (MIM# 603213) e a tipo Beighton (SEMD-JL tipo Beighton, associado ao gene *B3GALT6* (MIM# 615291)<sup>2</sup>.

**Quadro 1.** Grupos relacionados à OCDs com luxações aqui estudados, segundo a última nosologia seus respectivos fenótipos e genes associados.

Grupo	Fenótipo	Gene
Grupo 7: Filaminas	Síndrome de Larsen	<i>FLNB</i>
Grupo 20: Displasias com luxações múltiplas	DBQDI, DBQDII e DBQD variante Kim	<i>CANT1</i>
	DBQDII	<i>XYLT1</i>
	SEMD-JL tipo leptodactílico	<i>KIF22</i>
	SEMD-JL tipo Beighton	<i>B3GALT6</i>
Grupo 4: Distúrbios de sulfatação	SED tipo <i>CHST3</i>	<i>CHST3</i>
	AO2, DTD	<i>SLC26A2/</i> <i>DTDST</i>
	Condrodisplasia com luxações tipo gPAPP	<i>IMPAD1</i>

Com o avanço das técnicas de biologia molecular e a identificação dos genes associados a essas condições, observa-se que a maioria delas estão associadas a genes envolvidos na síntese de proteoglicanos (PGs), presentes, em grande quantidade, na matriz extracelular<sup>4</sup>.

#### 1.1.1 Grupo das filaminas

Na atual nosologia, o grupo 7 corresponde a filamina e condições relacionadas decorrentes de mutações nos genes *FLNA*, *FLNB* e *SH3PXD2B*. Dentre as doenças relacionadas ao gene *FLNB* destaca-se aqui a Síndrome de Larsen por seu comprometimento articular<sup>2</sup>.

Dentre as displasias com luxações, a síndrome de Larsen corresponde a um fenótipo clássico conhecido desde 1950, com padrão de herança autossômico dominante, caracterizado pelo acometimento de grandes articulações em membros inferiores e superiores, associado a anormalidades

em pés, mãos e face. Pacientes com essa condição costumam apresentar luxações congênitas de joelhos e/ou quadril, pé torto e dedos longos com polegares geralmente espatulados, a face se apresenta achatada com hipertelorismo, fronte proeminente e ponte nasal baixa. Os metacarpos são pequenos e há múltiplos centros de ossificação no carpo, as alterações da coluna vertebral incluem escoliose e cifose cervical<sup>5,6</sup>.

Em 2004, foram identificadas mutações em heterozigose no gene da filamina B (*FLNB*) em cinco indivíduos acometidos pela síndrome de Larsen<sup>7</sup>. O gene *FLNB*, localizado braço curto do cromossomo 3 (3p.14), possui 46 éxons e sua proteína contém 2633 aminoácidos<sup>8</sup>. Embora haja mais de oitenta mutações descritas nesse gene até o momento, pouco mais de vinte foram descritas relacionadas a esse fenótipo (Tabela 1). As mutações não estão distribuídas aleatoriamente, *clusters* de mutações são evidentes na síndrome de Larsen nos éxons 2 ao 4 e nos éxons 25 ao 33<sup>9</sup>.

O *FLNB* é responsável por codificar a Filamina b, uma proteína do citoesqueleto que interage com a actina como uma proteína de ancoragem durante o desenvolvimento do esqueleto, influenciando na segmentação vertebral, ossificação endoncondral e formação articular<sup>10</sup>. A Filamina b é expressa em vários tecidos, mas é predominante em condrócitos<sup>9</sup>.

### 1.1.2 Displasias esqueléticas com luxações múltiplas

Na atual nosologia, o grupo 20 corresponde às displasias esqueléticas com luxações múltiplas decorrentes de mutações nos genes *CANT1* (DBQDI, DBQDII e DBQD variante-Kim), *XYLT1* (DBQDII), *KIF22* (SEMD-JL *tipo* leptodactílico) e *B3GALT6* (SEMD-JL *tipo* Beighton). Com exceção do *KIF22*, os demais genes desse grupo estão envolvidos na síntese de proteoglicanos (PGs) presentes na matriz extracelular<sup>2</sup>.

#### 1.1.2.1 Displasia de Desbuquois

A displasia de Desbuquois (DBQD) é uma condição com padrão de herança autossômico recessivo descrita em 1966 por Desbuquois et al<sup>11</sup> em

duas irmãs com baixa estatura desproporcional, frouxidão ligamentar, luxações e, ossificação desorganizada em mãos e pés<sup>11</sup>.

A DBQD é clinicamente caracterizada por atraso de crescimento pré e pós-natal, frouxidão ligamentar, fenda palatina, olhos proeminentes e hipoplasia de face média. Os achados radiológicos incluem luxações articulares múltiplas, projeção dos trocanteres menores produzindo uma aparência característica do fêmur proximal chamada de chave sueca – “*Swedish key*” ou “*Monkey wrench*”<sup>12</sup>.

Em 2004, Faivre et al<sup>12</sup> ao revisar 35 pacientes com DBQD, classificaram em dois subgrupos, de acordo com a presença ou a ausência de alterações típicas em mãos (avanço de ossificação carpal e tarsal, falange delta e luxações em falanges): DBQD tipo I, e DBQD tipo II, respectivamente. Posteriormente outro subtipo de DBQD foi reconhecido e denominado de DBQD variante-Kim, caracterizado pela idade óssea carpal avançada, braquimetacarpia com aparência alongada das falanges, mas sem centro de ossificação acessório<sup>12,13</sup>.

Até o momento, mutações em dois genes *CANT1* e *XYLT1* foram associados a essas condições, sendo o segundo preferencialmente associado à DBQD-II. Um número de casos com fenótipo de DBQDII não apresenta mutações em nenhum desses dois genes, sugerindo heterogeneidade genética<sup>14,13,15</sup>.

O gene *CANT1* está localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q25.3), possui 4 éxons e 401 aminoácidos<sup>8</sup>. Embora o éxon 1 não seja traduzido mutações nesse éxon já foram descritas<sup>14,16</sup>.

O *CANT1* codifica uma proteína enzimática – Nucleotidase 1 cálcio-ativada, necessária para a síntese de PGs através da hidrólise da UDP, um produto das reações das glicosiltransferases<sup>16</sup>.

O gene *XYLT1* está localizado braço curto do cromossomo 16 (16p12.3), possui 12 éxons, 959 aminoácidos<sup>8</sup>. Ele codifica uma proteína enzimática – xilotransferase I (XTI), envolvida na formação do tetrassacarídeo de ligação, o primeiro passo da síntese de PGs, iniciada pela adição de duas xiloses pelas xilosiltransferases I e II, seguido por duas moléculas de galactose e um ácido glucurônico<sup>17</sup>.

### 1.1.2.2 Displasias espôndilo-epi-metafisária tipo leptodactílico e tipo Beighton

As Displasias Espôndilo-epi-metafisárias (SEMD do inglês, *Spondyloepimetaphyseal Dysplasia*) constituem um grupo geneticamente heterogêneo de gravidade variável, caracterizadas pelo envolvimento de epífises, metáfises e corpos vertebrais e as SEMD do tipo leptodactílico e tipo Beighton tem um padrão de herança autossômico recessivo e podem apresentar um comprometimento articular importante<sup>18,19</sup>.

A displasia espôndilo-epimetafisária com frouxidão ligamentar tipo leptodactílico ou tipo Hall (SEMD-JL do inglês, *Spondyloepimetaphyseal Dysplasia with Joint Laxity*) constitui um fenótipo típico, e dentre as características mais marcantes, chama a atenção o aspecto delgado dos ossos dos metacarpos e das falanges (que confere ao nome dessa condição o termo 'leptodactílico') com atraso de maturação/ossificação óssea, luxação de grandes articulações e frouxidão ligamentar generalizada, escoliose progressiva, epífises hipoplásicas e irregulares, metáfises irregulares (alargadas), hipoplasia de face média e baixa estatura proporcionada. Em 2011, mutações em heterozigose no gene *KIF22* foram associadas a essa condição<sup>19</sup>.

Com base em estudos funcionais de *knockout* e *knockdown*, sabe-se que funções do *KIF22* incluem participação na formação do fuso mitótico, movimentação cromossômica e estabilização dos microtúbulos. No entanto, sua função relacionada às displasias esqueléticas ainda não está estabelecida, porém, por analogia aos outros membros dessa família, o *KIF22* pode ter um papel importante no tráfico condrocitos e, mutações domínio motor desse gene podem interferir outras cinecinas presentes na matriz. Ele é expresso em ossos, cartilagens, cápsula articular, ligamentos e pele<sup>19</sup>.

Este gene está localizado no braço curto do cromossomo 16 (16p11.21), possui 14 *éxons* e codifica uma proteína motora de 665 aminoácidos<sup>8</sup>. Até o momento foram descritas apenas quatro mutações associadas à SEMD tipo leptodactílico e todas elas ocorreram no *éxon* 4 (localizado no domínio motor da proteína), caracterizando essa região como *hot spot*<sup>19,20</sup>. Sabe-se, porém, que alguns pacientes com esse fenótipo não apresentam mutações nesse *hot*

*spot* (comunicação pessoal). Recentemente, dois outros genes foram associados a um fenótipo SEMD-JL tipo *Hall-like*, são eles: *NIN* e *EXOC6B*, sugerindo uma heterogeneidade genética<sup>22,22</sup>.

Ele é expresso em ossos, cartilagens, cápsula articular, ligamentos e pele<sup>19</sup>.

A Displasia espôndilo-epi-metafisária tipo *Beighton*, tem padrão de herança autossômico recessivo e apresenta como características: dismorfismos craniofacial leve (olhos proeminentes, esclera azulada, lábio superior longo, mandíbula pequena com fenda palatina), as articulações apresentam luxação, frouxidão ligamentar, sobretudo nas mãos, platispondilia moderada, ílio hipoplásico, cifoescoliose progride com a idade levando a um tronco curto, enquanto platispondilia pode tornar-se menos visível e os corpos vertebrais aparecem quadrado em forma com a idade<sup>18</sup>. Em 2013 mutações no gene *B3GALT6* foram associadas a esse fenótipo<sup>23</sup>.

O gene *B3GALT6* (NM\_080605.3) está localizado braço curto do cromossomo 1 (1p36.33), possui apenas 1 éxon e codifica uma proteína de 329 aminoácidos<sup>8</sup>. A proteína enzimática, ( $\beta$ 1,3-galactosiltransferase II - GalT-II), codificada por esse gene está envolvida na formação do tetrassacarídeo de ligação na síntese de PGs, pela adição de uma molécula de galactose<sup>17</sup>. Ele é expresso predominantemente em cartilagens e ossos<sup>23</sup>.

### 1.1.3 Grupo dos defeitos de sulfatação

O grupo 4 da nosologia compreende as condições decorrentes de mutações nos genes *CHST3*, *SLC26A2/DTDST*, *IMPAD1*, *PAPSS2* e *CHST14*, envolvidos com defeitos de sulfatação de proteoglicanos. Nesse grupo destacam-se quatro condições associadas a problemas articulares: a displasia espôndilo-epifisária (SED) tipo *CHST3* (*SED-CHST3*), Atelosteogênese II (AO2) e Displasia Diastrófica (DTD) relacionadas ao gene *SLC26A2/DTDST*, e a Condrodisplasia com luxações tipo gPAPP, um fenótipo recentemente associado ao gene *IMPAD1*<sup>2</sup>.

### 1.1.3.1 Displasia espândilo-epifisária (SED) tipo *CHST3*

Em 2008, Hermanns et al<sup>24</sup> descreveram a Displasia Espândilo-Epifisária (SED) decorrente de mutações no gene *CHST3*, que tem certa semelhança com o da Síndrome de Larsen, porém de herança autossômica recessiva e caracterizada por alterações radiológicas típicas como *cleft* coronal dos corpos vertebrais, bifurcação distal do úmero e ossificação prematura do carpo, além de luxações do quadril e joelhos ao nascimento como observado no fenótipo da síndrome de Larsen<sup>24</sup>.

O gene *CHST3* está localizado braço longo do cromossomo 10 (10q22.1) possui 3 éxons entretanto, apenas parte do éxons 2 e 3 são codificantes e sua proteína contém 479 aminoácidos<sup>8</sup>.

O *CHST3* codifica a enzima condroitina 6-O-sulfotransferase-1 (C6ST1) grupo das sulfotransferases, essencial para a sulfatação de proteoglicanos que contém condroitina como o agrecan, proteoglicano presente na cartilagem. As cadeias de sulfato de condroitina repetem as unidades de dissacarídeo de N-acetilgalactosamina (GalNAc) e do ácido glucurônico (GlcUA), nas quais, ambos são sulfatados nas posições de C-6 ou C-4 de GalNAc<sup>25</sup>. Os distúrbios no fornecimento e na utilização do sulfato de condroitina podem resultar em condições que afetam as cartilagens e o esqueleto<sup>26</sup>.

### 1.1.3.2 Atelosteogênese II (AO2) e Displasia Diastrófica (DTD)

A Atelosteogênese II (AO2) e a Displasia Diastrófica (DTD) juntamente com a Acondrogênese tipo IB (ACG1B – OMIM 600972) e a Displasia Múltipla Epifisária recessiva (rMED, do inglês *Recessive Multiple Epiphyseal Dysplasia* - OMIM 226900) constituem um espectro fenotípico de displasias esqueléticas com padrão de herança autossômico recessivo. Mutações no gene *SLC26A2/DTOST* são conhecidas de longa data como responsáveis por provocar essas condições<sup>27</sup>.

Em ordem de gravidade duas são letais, ACG1B e AO2 e, duas não são letais, DTD e rMED. Dentre esses, apenas a AO2 e a DTD apresentam um comprometimento articular significativo, sendo a DTD diagnóstico diferencial para a DBQD em alguns casos<sup>28</sup>.

As características da DTD são baixa estatura desproporcionada, membros curtos, abdução dos polegares (polegar do caroneiro – característica marcante dessa condição), limitação da extensão dos cotovelos, pé torto congênito com espaço aumentado entre o hálux e o segundo dígito, fenda palatina e ponte nasal baixa<sup>29</sup>.

A AO2 é uma condição letal caracterizada por baixa estatura desproporcionada com membros curtos, polegares em caroneiro – característica marcante dessa condição assim como a DTD, com desvio ulnar dos demais dedos, pé torto congênito com espaço aumentado entre o hálux e o segundo dígito, fenda palatina e ponte nasal baixa. Dentre as características radiológicas chama atenção o encurtamento dos ossos longos e tórax estreito, em alguns podem ocorrer casos *cleft* coronal e o úmero distal pode ser bífido<sup>29</sup>.

O gene *DTDST* inicialmente conhecido como *SLC26A2* codifica um transportador de sulfato transmembrânico e mutações em seus diferentes domínios afetam o transporte de sulfato inorgânico para os condrócitos levando a baixa sulfatação de PGs<sup>27</sup>.

Esse gene está localizado no braço longo do cromossomo 5 (5q31-q34) possui 3 éxons, sendo que apenas o 2 e 3 são codificantes e aproximadamente 50 mutações já foram descritas nesses éxons. Embora o éxon 1 não seja codificante, existe uma mutação descrita na região de *splicing* do éxon 1<sup>8,31</sup>. Sua proteína contém 739 aminoácidos com treze domínios, doze domínios transmembrânicos e um domínio transportador de sulfato e antagonista de fatores anti-sigma (*STAS* do inglês, *Sulfate transporter and anti-sigma factor antagonist*)<sup>31</sup>.

Há uma correlação genótipo-fenótipo, mutações *nonsense* ou *missense* no domínio transmembrana provocam fenótipos mais graves e, mutações *missense* ou em sítio de Splice em domínios não transmembrânicos produzem um fenótipo mais leve<sup>27</sup>.

A correlação do fenótipo com as mutações descritas sugere que a gravidade do fenótipo está relacionada com a localização das mutações nos domínios protéicos, com o tipo de mutação e sua consequência na proteína, bem como com a apresentação da mesma, em homozigose ou em heterozigose (heterozigoto composto). Um exemplo é o caso da mutação R279W, localizada em uma alça extracelular, quando em homozigose causa a

rMED (condição mais leve desse espectro) e quando combinada com uma mutação mais grave como uma *frameshift* em região de splice ou ainda na região transmembrana como a c.727-1G>C provoca um fenótipo mais grave como a DTD<sup>29</sup>.

#### 1.1.3.3 Condrodisplasia com luxações tipo gPAPP

A condrodisplasia com luxações tipo gPAPP, condição de herança recessiva, foi descrita recentemente como um novo fenótipo de displasia associado ao gene *IMPAD1* caracterizado por luxações congênitas relevantes, baixa estatura, micrognatia e fenda palatina<sup>31</sup>.

O gene *IMPAD1* está localizado braço longo do cromossomo 8 (8q12.1), possui 5 éxons e codifica uma proteína enzimática de 359 aminoácidos<sup>8</sup>, a 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato - residente do Golgi (g-PAPP do inglês, *Golgi-resident PAP phosphatase*), envolvida na sulfatação dos glicosaminoglicanos em sulfoglicosaminoglicanos através da hidrólise da fosfoadenosina fosfosulfato, um produto das sulfotransferases<sup>33</sup>. Até o momento apenas nove pacientes foram descritos com esse fenótipo dos quais apenas seis apresentaram mutações nesse gene nos éxon 1, 2 e 3<sup>31,33</sup>.

#### 1.1.4 Articulações

As articulações são as regiões do esqueleto onde dois ou mais ossos se encontram e se articulam; algumas dessas junções são estabilizadas por conexões de tecido fibroso enquanto outras são estabilizadas por ligamentos resistentes, porém flexíveis, que além de manter os ossos em contato, também transmitem forças entre os ossos e possibilitam o movimento com graus variados de mobilidade<sup>34,35</sup>.

O desenvolvimento das articulações se inicia durante a sexta semana com o aparecimento do mesênquima interzonal e no final da oitava semana se assemelham a articulações adultas. Placas do mesênquima interzonal marcam os locais das futuras articulações. Seus desenvolvimentos subsequentes variam de acordo com o tipo de articulação a ser formada e podem ser convertidos em tecido fibroso, cartilagem hialina ou fibrocartilagem dependendo

se a articulação será do tipo fibroso, sincondrose ou sínfise. Elas são classificadas em três grupos de acordo com suas estruturas e amplitude de movimento: fibrosas, cartilaginosas e sinoviais<sup>35,36</sup>.

Nas fibrosas, a articulação é fixa e, portanto a mobilidade é extremamente reduzida. Os três tipos de articulações que compõe essa classe são as suturas (restritas ao crânio), gonfose (articulação dentoalveolar) e sindesmose (tíbiofibular – entre as extremidades distais da fíbula e da tíbia)<sup>35</sup>.

As cartilaginosas ocorrem pela interposição de uma camada de cartilagem, essas tendem a ser menos rígidas do que as fibrosas e podem permitir movimento, ainda que de amplitude restrita. Elas podem ser classificadas como primárias (sincondroses) e secundárias (sínfise), dependendo da natureza da cartilagem interveniente<sup>34</sup>.

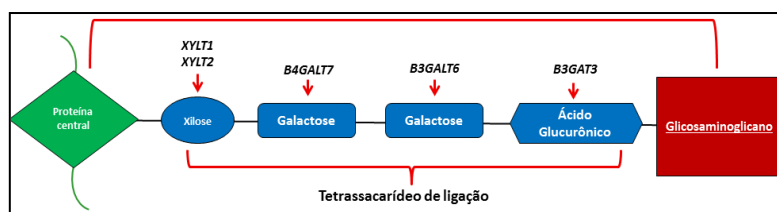
A articulação sinovial é composta por estruturas e tecidos que funcionam em conjunto, dentre essas, a cartilagem articular e o líquido denominado sinóvia, ou líquido sinovial são estruturas que proporcionam a capacidade do movimento. Outras partes dessa articulação incluem ligamentos, cápsula articular, tendões que têm por finalidade manter a união entre os ossos, e impedir o movimento em planos indesejáveis. Elas incluem a maioria das articulações do corpo, por exemplo, articulações dos cotovelos, joelhos, quadril. Essas articulações estão cobertas por cartilagem articular e ela possui uma matriz extracelular essencial para a função articular composta por colágenos, proteoglicanos e outras proteínas não-colagênicas. A sua composição e organização garantem as suas propriedades, como resistência, elasticidade e compressibilidade, necessárias para dissipar e amortecer as forças<sup>37</sup>.

Os ligamentos atuam impedindo que os movimentos articulares ultrapassem amplitudes consideradas fisiológicas. A frouxidão ligamentar ocorre quando a amplitude do movimento da articulação é maior do que a esperada para ela e pode ser um achado isolado ou generalizado e estar, ou não, associada a síndromes genéticas. Indivíduos com frouxidão ligamentar estão suscetíveis a outros problemas articulares como as luxações. Estas ocorrem quando a extremidade de um osso se separa da articulação, ficando conseqüentemente desalinhada<sup>38</sup>.

### 1.1.5 Matriz extracelular e Proteoglicanos

Proteoglicanos (PGs) juntamente com glicoproteínas não-colagênicas são os componentes não fibrilares da matriz extracelular. Consistem em um complexo macromolecular formado por uma proteína central covalentemente ligada a ao menos uma cadeia de glicosaminoglicano (GAG) – carboidratos formados por uma estrutura dissacarídica repetitiva – linear e de comprimento variável, apresentando cargas negativas devido à presença de radicais carboxílicos e sulfatados. Atraem cátions e são altamente hidrofílicos, característica essa que confere aos PGs a função de proporcionar a matriz extracelular um ambiente altamente hidratado, além disso, esses complexos são importantes em tecidos sujeitos a pressão como cartilagem articular pois, promovem a rigidez permitindo, por exemplo, que as articulações absorvam grandes alterações de pressão<sup>17,39</sup>.

A síntese dos PGs depende da ação coordenada de enzimas que são codificadas por diversos genes. Ela se inicia nos ribossomos, onde o esqueleto protéico é sintetizado por meio de um tetrassacarídeo de ligação composto por glicosiltransferases (uma xilose, duas galactoses e um ácido glucurônico) e transferido para o retículo endoplasmático rugoso. A ligação com cadeias de GAGs é efetuada no aparelho de Golgi em etapas que também envolvem atividades enzimáticas. Após a síntese, o PG é transportado por vesículas secretoras e endereçado para grânulos intracelulares, superfície celular ou matriz extracelular (Figura 1)<sup>39</sup>.



Erro! Fonte de referência não encontrada.

Os PGs estão presentes em grande quantidade na cartilagem articular sendo essenciais para a função tecidual e, alterações em sua abundância e/ou estrutura podem levar a consequências na formação da cartilagem no embrião, placa de crescimento na juventude e função articular no adulto<sup>40</sup>.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Selecionar pacientes com fenótipo de OCD associado ao comprometimento articular e submetê-los à investigação molecular com um painel de genes associados a essas condições.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Pesquisar mutações nos genes *FLNB*, *CANT1*, *XYLT1*, *KIF22*, *B3GALT6*, *CHST3*, *SLC26A2/DTDST* e *IMPAD1* por meio do sequenciamento direto de uma série de pacientes com fenótipo típico ou duvidoso das respectivas OCDs associadas aos genes acima mencionados;
- Correlacionar as mutações observadas com os diagnósticos clínicos tentando contribuir para uma melhor compreensão dessas condições.

## 3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Casuística

A casuística do projeto foi selecionada a partir da triagem de pacientes nos seguintes locais:

- Ambulatório de Displasias Esqueléticas do Hospital das Clínicas (HC-UNICAMP).
- Programa de Genética Perinatal do Departamento de Genética Médica - CAISM / UNICAMP;
- Pacientes derivados de outros centros e encaminhados a partir da lista de discussão - CoSMO-B - [cosmo-b@googlegroups.com](mailto:cosmo-b@googlegroups.com);
- Pacientes derivados do site de auxílio diagnóstico criado pelo grupo local – [www.oed.med.br](http://www.oed.med.br)

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FCM-UNICAMP (Anexo 1). Todos os participantes da pesquisa foram orientados quanto à proposta de estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2).

### 3.2. Métodos

Dentre os pacientes selecionados, dois grupos foram identificados: com fenótipo típico de uma displasia conhecida ou sem fenótipo definido de um tipo específico de OCD. Portanto, foi elaborada uma estratégia de estudo para mutações desenvolvimento do estudo molecular.

O estudo molecular da casuística foi realizado através do Sequenciamento por eletroforese em capilar (método de Sanger)<sup>40</sup>, com exceção de dois pacientes (1 e 15) que inicialmente foram submetidos à análise do gene *FLNB* através do painel *Ion Torrent Personal Genome Machine PGM™ - Life Technologies*, por ser um gene com 46 éxons. Desta maneira, tanto para os casos típicos quanto para os casos presuntivos, o estudo foi iniciado pelo(s) gene(s) associado(s) ao diagnóstico e em casos negativos, deu-se a continuidade do estudo com os demais genes.

#### 3.2.1. Extração de DNA genômico

Na maioria dos casos foi utilizado DNA de sangue periférico extraído através do protocolo de fenol e clorofórmio adaptado de Sambrook & Russel que proporciona a obtenção de uma grande quantidade de DNA<sup>42</sup>. Em alguns casos, o DNA foi obtido a partir de saliva e, para tal, utilizou-se o kit comercial Oragene DNA (OG-575) da DNA genotek®. Sempre que possível o DNA dos pais a partir de sangue periférico, também foi extraído.

#### 3.2.2. Desenho e padronização de *Primers*

Para a amplificação e sequenciamento dos éxons dos genes foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*). Cada par de *primer* amplifica uma região formando os chamados *amplicons*. Foram construídos

*primers* para as regiões codificantes dos genes (éxons) cobrindo suas junções íntron/éxon e também para as regiões não codificantes desde que houvessem mutações descritas (genes *SLC26A2/DTDST* e *CANT1*) para que desse modo todos os pontos de mutação fossem cobertos. Os *primers* foram desenhados com o auxílio dos programas *Gene Runner®* e *Primer 3®*. Para os casos em que os éxons são muito extensos, foram desenhados mais de um par de *primers*. Para a confecção dos *primers*, foram consideradas as recomendações já padronizadas em nosso laboratório como tamanho dos *primers* de 18 a 25 nucleotídeos, ausência de complementariedade entre os *primers*, porcentagem semelhante do conteúdo de citosina e guanina dos dois *primers* e temperaturas próximas de anelamento entre os pares de *primers*.

No total, foram utilizados 46 pares de *primers* para a amplificação dos éxons dos genes *FLNB* (somente o éxon 7 para confirmação por Sanger), *CANT1*, *XYLT1*, *KIF22*, *B3GALT6*, *CHST3*, *SLC26A2/DTDST* e *IMPAD1*. Os *primers* foram submetidos a gradientes de temperatura para encontrar a temperatura de anelamento ideal para cada par. O Apêndice 2 apresenta as sequências nucleotídicas dos *primers* e suas respectivas temperaturas de anelamento.

Devido ao grande número de *primers* foram padronizados vários protocolos, cinco no total, para se obter uma amplificação específica do *amplicon* de interesse (ver apêndice).

### 3.2.3. Amplificação de DNA - Reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*)

Os fragmentos de DNA genômico foram amplificados pela técnica de PCR, utilizando-se *primers* específicos para cada *éxon/íntron* dos genes. Os *primers* foram submetidos gradientes de temperatura para encontrar a temperatura de anelamento ideal para cada par.

As reações de PCR foram realizadas de acordo com o protocolo específico para cada par de *primer* (apêndice 2). O protocolo padrão utilizado foi realizado com um volume final de 10uL, contendo 50ng de DNA genômico; 10 picomoles de cada iniciador; 1,5U de Taq polimerase e concentrações finais de 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 80µM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTP's), tampão

1X com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [20mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 75mM de Tris-HCl pH8,4; 0,01% (v/v) de Tween 20]. Para alguns os pares de *primers*, foi necessário o uso dos reagentes PCR buffer (10X) (Qiagen®) e Q-solution (Qiagen®), e em outros a adição de dimetilsulfóxido (DMSO) em uma porcentagem de 5% para a otimização da reação.

As condições para a realização da PCR foram desnaturação inicial à 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos à temperatura de anelamento específica dos pares de *primers* e 1 minuto à 72°C; seguida da extensão final à 72°C por 10 minutos.

Visando minimizar o surgimento de bandas inespecíficas no processo de amplificação dos *amplicons* de interesse, foi utilizada a técnica de *Touchdown* PCR<sup>43</sup>. Nessa técnica, a temperatura de anelamento no primeiro ciclo é programada para 10°C acima da anelamento específica do par de *primers*. Em cada ciclo, a temperatura diminui 0,5°C e, após 20 ciclos, atinge a temperatura de anelamento ideal.

A confirmação da especificidade da PCR foi realizada pela aplicação de 2µL de cada produto da reação, misturada a 2µL de solução de azul de bromofenol em gel de agarose corado com o corante *SYBR® Safe* (Invitrogen), para a visualização da banda referente ao *amplicom* de cada par de *primers* a fim de avaliar a qualidade e especificidade da reação. Foi utilizado marcador de peso molecular de 100 pares de base (Thermo SCIENTIFIC GeneRuler 100pb DNA Ladder). A corrida da eletroforese foi realizada por aproximadamente 30 minutos a 90v e revelada sob luz ultravioleta.

#### 3.2.4. Reação de ExoStar™ Illustra™

Na preparação das amostras para o sequenciamento utilizou-se a purificação com ExoStar/Illustra™ para remover o excesso de primers e dNTP's. Foram adicionados 0,2 µL do reagente para cada 2,0 µL de PCR a ser purificada. As amostras foram incubadas a 37°C por 15 minutos e depois aquecidas a 80°C por mais 15 minutos para a inativação das enzimas.

### 3.2.5. Sequenciamento por eletroforese em capilar (método de Sanger)

Para realizar o sequenciamento pelo método de Sanger, foi utilizado o equipamento ABI 3500XL (Applied Biosystems® – by Life Technologies™).

As reações de sequenciamento foram feitas para um volume final de 10µl, contendo 2µl de solução tampão fornecida, 1,0µl de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems® – by Life Technologies™), 0,5µl de iniciador *Foward* ou *Reverse* (10pmol/µl), 1,0µl de PCR e 5,5µl de água. As condições para a realização do sequenciamento foram: 35 ciclos de 20 segundos à 95°C, 15 segundos à temperatura de anelamento de cada primer ou à 55°C e 1 minuto à 60°C.

A purificação das amostras para o sequenciamento foi realizada com EDTA e etanol de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems®). Após a finalização do processo de purificação, as amostras foram solubilizadas em 10 µL de formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems®). Como protocolo padrão, os sequenciamentos com resultados positivos foram confirmados (refeitos desde o início com uma nova PCR).

### 3.2.6. Sequenciamento de controles

Para os casos em que foram identificadas variantes inéditas e possivelmente deletérias, as mesmas foram sequenciadas em grupo de 50 indivíduos controle (100 cromossomos), a fim de se descartar a possibilidade de serem polimorfismos encontrados na população.

### 3.2.7. Análises computacionais

O resultado do sequenciamento foi obtido em arquivo com extensão “.ab1” e a análise dos mesmos, foi realizada com o programa *Codon Code Aligner* versão 6.0.2, que permite a visualização do eletroferograma de cada reação sequenciada, alinha e detecta alterações nucleotídicas. Os resultados obtidos foram comparados com bancos de dados como *Ensembl*, HGMD®, dbSNP, Exome Variant Server e *Exome Aggregation Consortium ExAC Browser*.

Os resultados que mostraram variantes não descritas na literatura foram submetidos à análise *in silico* utilizando diferentes algoritmos (Anexo Quadro 1), a fim de avaliar seu efeito na estrutura e função da proteína. Essas análises levam em consideração as diferenças físico-químicas entre o aminoácido original e o alterado avaliando a substituição da base nitrogenada baseando-se numa combinação de parâmetros funcionais e estruturais das proteínas, a posição da alteração e o nível de conservação entre sequências homólogas.

### 3.2.8. Análise semiquantitativa por PCR

Para determinar possível deleção de um fragmento de um alelo, foi realizada uma análise semiquantitativa por PCR adaptada do protocolo utilizado no Laboratório de Pediatria Molecular do CHUV-Lausanne, Suíça (B. Xavier, comunicação pessoal).

Essa técnica baseia-se na cinética da PCR, uma vez que a quantidade de DNA da sequência alvo aumenta exponencialmente a cada ciclo<sup>44</sup>. A análise do produto da PCR nessa técnica deve ser realizada, portanto na fase exponencial (normalmente correspondente ao 25º ciclo) para que seja possível inferir quanto ao número de cópias amplificadas a partir de uma observação morfológica da intensidade das bandas.

Considerando que a quantidade total de amplificações na fase exponencial é proporcional a quantidade de alvos iniciais, os DNAs utilizados (paciente, pais e controles) foram diluídos 20ng/μL e quantificados inicialmente no *Epoch™ Microplate Spectrophotometer* e posteriormente no Quibit® 2.0. para garantir a mesma concentração de DNA em todos os tubos de reação.

As PCRs foram realizadas nas seguintes condições em um volume final de 10 μL: 1,0 μL PCR buffer (10X) (Qiagen®), 2,00 μL Q-solution (Qiagen®), 2,5 μL de DNA genômico (20ng/μL), 1,0 μL de cada par de *primers* específicos (0,5 pmol *forward* e *reverse*); 1 μL de dNTP mix (contendo 0,2 mM de cada dNTP- Thermo Scientific); 0,15 μL Taq e água para o volume final de 10μL.

Após o preparo, as reações foram submetidas à temperatura de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidas de 24, 26, 27, 28 e 35 ciclos (5 tubos de reação para cada caso estudado, sendo esses retirados da máquina nos ciclos 24, 26, 27 e 28) de 30 segundos a 95°C, 30 segundos à

temperatura de anelamento e 72°C por 1 minuto, a extensão final (72°C à 10 min) dos tubos que foram retirados nos ciclos anteriores ao 35º foi realizada em outro termociclador (GeneAmp® PCR System 9700).

Para garantir que a reação seria retirada na fase exponencial, diversos números de ciclos foram testados (20, 22, 24, 26, 27, 28 e 35). O ciclo utilizado foi desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidas de n ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos à 55,4° e 72°C por 1 minuto. A extensão final (72°C à 10 min) dos tubos que foram retirados nos ciclos anteriores ao 35º foi realizada em outro termociclador (GeneAmp® PCR System 9700).

Como essa técnica exige o conhecimento prévio da cinética da reação, foram feitos testes nos ciclos 20, 22 e 24. Observou-se, portanto, que a fase exponencial se iniciou a partir do ciclo 24. Com base nesse resultado, foi realizada a técnica nos ciclos 24, 26, 27, 28 e 35.

A confirmação da especificidade da PCR foi realizada através da aplicação de 2µL de cada produto da reação, misturada a 2µL de solução de azul de bromofenol em gel de agarose corado com o corante *SYBR® Safe* (Invitrogen), para a visualização da banda referente ao *amplicom* de cada par de *primers* a fim de avaliar a qualidade e especificidade da reação. Foi utilizado marcador de peso molecular de 100 pares de base (Thermo SCIENTIFIC GeneRuler 100pb DNA Ladder). A corrida da eletroforese foi realizada por ~30 minutos a 90v e revelada sob luz ultravioleta.

A análise “morfológica” da intensidade das bandas foi feita de duas maneiras: comparação do produto da PCR do paciente, pais e indivíduo controle através da simples visualização da espessura de bandas obtidas na fotografia do gel e posterior análise no *ImageJ* 1.50i, um *software* de domínio público.

O *ImageJ* 1.50i é um software que processa e analisa imagens através da intensidade da tonalidade das mesmas. Ele realiza a densitometria das bandas obtidas, traçando uma relação entre a densidade óptica da banda da sequência-alvo e a densidade óptica da banda controle. O programa gera uma curva, cujos picos representam as regiões de maior densidade óptica e isola-se este pico com as ferramentas oferecidas. A partir daí, se analisa a diferença entre os picos de cada banda dos casos estudados e da banda controle.

#### 4. RESULTADOS

Dezessete pacientes com diagnóstico clínico-radiológico de displasia esquelética associada a comprometimento articular foram investigados quanto as suas bases moleculares.

Os pacientes estão distribuídos no Quadro 2 conforme o fenótipo, gene(s) estudado(s) e mutação(ões) encontrada(s). Dos 17 pacientes estudados, 13 deles apresentaram um fenótipo típico: Síndrome de Larsen (paciente 1), DBQDII (paciente 2 e 12), SEMD-JL tipo leptodactílico (pacientes 3, 4 e 5), SEMD-JL tipo Beighton (paciente 6), SED tipo *CHST3* (paciente 7), AO2 (paciente 8), DTD (pacientes 9, 10 e 11), Displasia Esquelética com luxações tipo gPAPP (paciente 13) e 4 deles apresentaram um fenótipo presuntivo: Displasia Esquelética com luxações tipo gPAPP (paciente 14), DBQDII (pacientes 15 e 16), e SED tipo *CHST3* (paciente 17). Dos 13 casos com fenótipo típico foram identificadas variantes em 11 deles (84,6%) e no total 13 alterações foram identificadas, sendo sete delas inéditas. As frequências das mutações estão representadas na Figura 3.

O Quadro 3 mostra a relação das variantes identificadas, 13 no total, de acordo com a sua classificação. Foram identificadas oito alterações do tipo *missense* ou “sentido trocado” (cinco inéditas e três já descritas), três *frameshifts* (duas inéditas e uma descrita) e duas mutações descritas foram identificadas em junções intron-éxon, regiões essenciais para o processo de *splicing*. De todas as variantes, apenas uma do tipo *missense*, foi recorrente em quatro pacientes: p.R279W no gene *DTDST*.

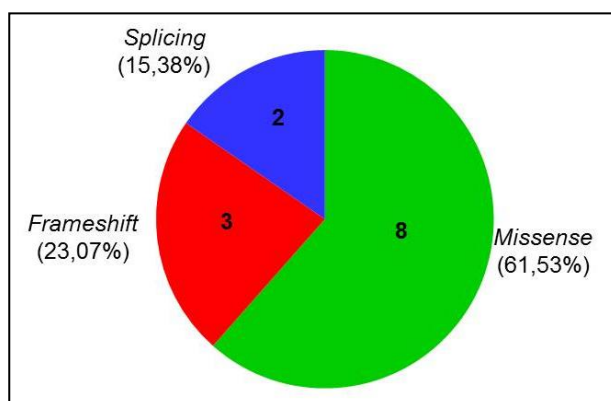
**Quadro 2.** Relação dos pacientes incluídos na casuística, diagnóstico e a mutação encontrada.

Paciente	Fenótipo, Padrão de herança	Genes Estudados	Mutação		Sequenciamento		Ref.
			Troca nucleotídica	Troca proteína	Pai	Mãe	
1	Síndrome de Larsen, AD	<i>FLNB</i>	c.[1088G>T];[=]	p.[G363V];[=]	***	***	Inédita
2	DBQDII, AR	<i>CANT1, XYLT1**</i>	c.[1651C>T];[1651C>T]	p.[R551C];[R551C]	p.[R551C];[=]	p.[R551C];[=]	Inédita
3	<i>SEMD-JL</i> tipo leptodactílico, AD	<i>KIF22</i>	c.[443C>T];[=]	p.[P148L];[=]	***	***	19,20
4	<i>SEMD-JL</i> tipo leptodactílico, AD	<i>KIF22</i>	c.[446G>A];[=]	p.[R149Q];[=]	***	***	19,20
5	<i>SEMD-JL</i> tipo leptodactílico, AD	<i>KIF22</i>	c.[664G>C];[=]	p.[E222Q];[=]	A	A	Inédita
6	<i>SEMD-JL</i> tipo Beighton, AR	<i>B3GALT6</i>	c.[588dupG];[182C>T]	p.[R197Afs*246];[V61A]	p.[V61A];[=]	p.[R197Afs*246];[=]	Inédita
7	SED tipo <i>CHST3</i> , AR	<i>CHST3</i>	c.[141-1_141delinsCC];[del]	p.?	A	c.[141-1_141delins];[=]	24
8	AO2, AR	<i>DTDST</i>	c.[1905delG];[862C>T]	p.[T627Lfs*23];[R279W]	***	***	Inédita;45
9	DTD, AR	<i>DTDST</i>	c.[1751delA];[862C>T]	p.[K575Sfs*10];[R279W]	p.[K575Sfs*10];[=]	p.[R279W];[=]	45
10	DTD, AR	<i>DTDST</i>	c.[727-1G>C];[862C>T]	p. ? p.[R279W]	c.[727-1G>C];[=]	p.[R279W];[=]	45
11	DTD, AR	<i>DTDST</i>	c.[371G>C];[c.862C>T]	p.[G115A];[p.R279W]	***	p.[R279W];[=]	Inédita; 45
12	DBQDII, AR	<i>CANT1, XYLT1, DTDST, CHST3, IMPAD1 e B3GALT6.</i>	-	-	***	***	Inédita
13	Displasia Esquelética com luxações tipo <i>IMPAD1</i> , AR	<i>IMPAD1, CANT1, XYLT1, B3GALT6, DTDST, IMPAD1 e CHST3</i>	-	-	***	***	
14	Displasia Esquelética com luxações tipo <i>IMPAD1</i> , AR	<i>IMPAD1, CANT1, XYLT1, B3GALT6, DTDST, IMPAD1 e CHST3</i>	-	-	***	***	
15	Displasia Esquelética com luxações DBQDII, AR	<i>FLNB, CANT1, XYLT1, B3GALT6, DTDST, IMPAD1 e CHST3</i>	-	-	***	***	
16	Displasia Esquelética com luxações DBQDII, AR	<i>CANT1, XYLT1, B3GALT6, DTDST, IMPAD1 e CHST3, FGFR1</i>	-	-	***	***	
17	SED tipo <i>CHST3</i> , AR	<i>CHST3, IMPAD1 e CANT1.</i>	-	-	***	***	

Legenda: AD: Autossômico Dominante; AR: Autossômico Recessivo; \*:stop códon; \*\*: Gene com mutação; \*\*\* não foi realizado o estudo; A: ausência da mutação observada no filho; - = ausência de mutação nos genes estudados

**Quadro 3.** Relação das variantes encontradas nos pacientes da casuística de acordo com a sua classificação.

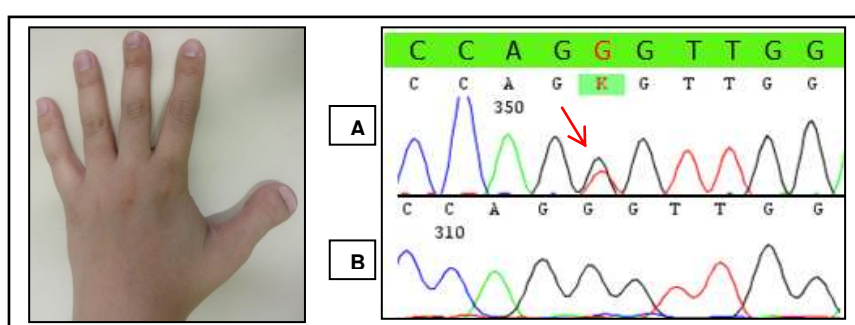
Tipo de Mutação	Gene	Mutação		Referência
		Troca nucleotídica	Troca proteína	
<i>Missense</i> (Sentido trocado)	<i>FLNB</i>	c.[1088G>T]	p.[G363V]	<b>Inédita</b>
	<i>XYLT1</i>	c.[1651C>T]	p.[R551C]	<b>Inédita</b>
	<i>KIF22</i>	c.[443C>T]	p.[P148L]	19,19
	<i>KIF22</i>	c.[446G>A]	p.[R149Q]	19,19
	<i>KIF22</i>	c.[664G>C]	p.[E222Q]	<b>Inédita</b>
	<i>B3GALT6</i>	c.[182C>T]	p.[V61A]	<b>Inédita</b>
	<i>DTDST</i>	c.[862C>T]	p.[R279W]	45
	<i>DTDST</i>	c.[371G>C]	p.[G115A]	<b>Inédita</b>
<i>Frameshift</i> (Mudança na matriz de leitura)	<i>B3GALT6</i>	c.[588dupG]	p.[R197Afs*246]	<b>Inédita</b>
	<i>DTDST</i>	c.[1905delG]	p.[T627Lfs*23]	<b>Inédita</b>
	<i>DTDST</i>	c.[1751delA]	p.[K575Sfs*10]	45
<i>Splicing</i> (Sítio de Recomposição)	<i>CHST3</i>	c.141-1_141delinsCC	p.?	24
	<i>DTDST</i>	c.[727-1G>C]	p.?	45



**Figura 2** Apresentação simplificada da frequência dos tipos de mutações encontradas nos pacientes do estudo.

#### 4.1. Síndrome de Larsen (*FLNB*)

O paciente 1, apresentou fenótipo clínico típico, incluindo face achatada, e háluces alargados (Figura 3). O estudo molecular nesse caso se deu pela análise do gene *FLNB* através do painel *Ion Torrent Personal Genome Machine PGM™ - Life Technologies* no qual foi detectada uma variante inédita do tipo *missense* em heterozigose: c.[1088G>T] p.[G363V] no éxon 7 do gene *FLNB*, considerada deletéria por todos os sites de predição utilizados (Tabela 8). O sequenciamento por Sanger confirmou a variante. Por último, essa variante não foi encontrada em nenhum dos 50 controles (100 cromossomos) avaliados.



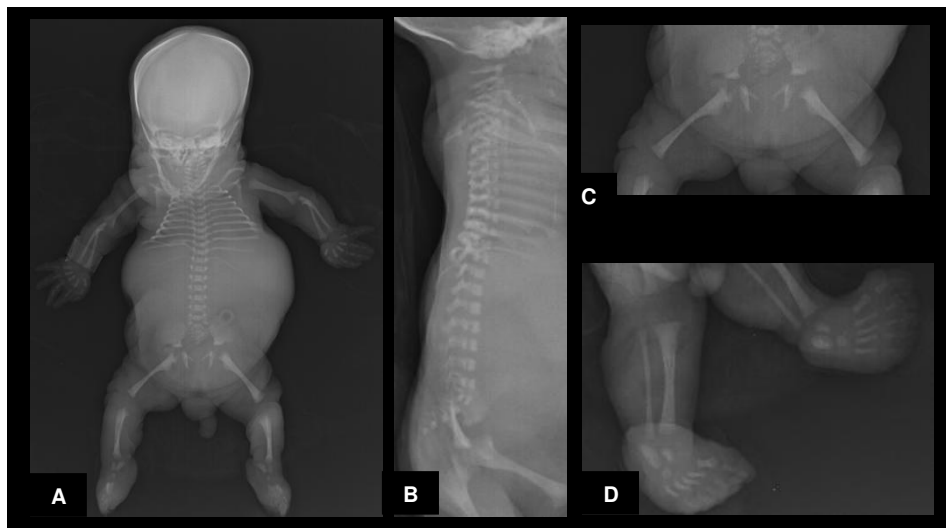
**Figura 3.** À direita, foto da mão paciente 1 apresentando o polegar espatulado. À esquerda, eletroferogramas parciais do éxon 7 do gene *FLNB*, do paciente (A) mostrando a troca de uma Guanina por uma Timina em heterozigose e de um indivíduo controle (B) sem a alteração.

#### 4.2. Displasias de *Desbuquois* (*CANT1* e *XYLT1*)

Dois indivíduos da casuística tiveram diagnóstico típico de DBQD, os pacientes 2 e 12. o primeiro está apresentado no artigo em anexo (Anexo 3) publicado no *American Journal of Medical Genetics: Part A*<sup>47</sup>.

O indivíduo 12 é um natimorto, do sexo masculino (46,XY), pré-termo (34 semanas), filho de casal consanguíneo com histórico de um óbito neonatal prévio. Em ultrassons durante o pré-natal (14<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup> e 22<sup>a</sup> semanas) foram observados: aumento da translucência nuchal, artéria umbilical única, ossos longos encurtados, tórax estreito, hidronefrose bilateral como oligo/âmnio e hipoplasia pulmonar. O natimorto apresentava face achatada (facies de Potter), hipoplasia da musculatura abdominal, encurtamento de membros com excesso de pele, pescoço curto, hipoplasia pulmonar, pés tortos congênitos com desvio do hálux e sobreposição do 4º e 5º dedo, displasia cística bilateral e

lissencefalia. Ao raio-X: porção distal do úmero bífido, luxação do rádio, avanço de ossificação de ossos do carpo e tarso, fêmur com aparência de chave sueca e *cleft* coronal dos corpos vertebrais torácicos e lombares (Figura 4).



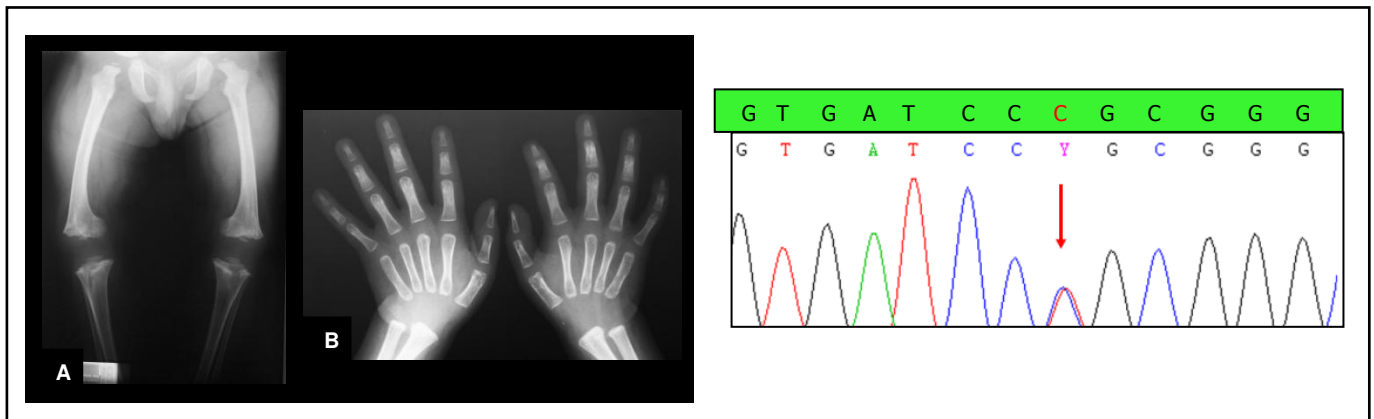
**Figura 4.** Radiografias do indivíduo 12 pós-óbito. Note em (A) Umero bífido, (B) *cleft* coronal dos corpos vertebrais torácicos e lombares, (C) fêmur com aparência de chave sueca e (D) avanço de ossificação dos ossos do tarso.

O estudo molecular foi negativo para variantes possivelmente deletérias nos genes *CANT1* e *XYLT1*, assim como para os demais genes avaliados no painel sob investigação.

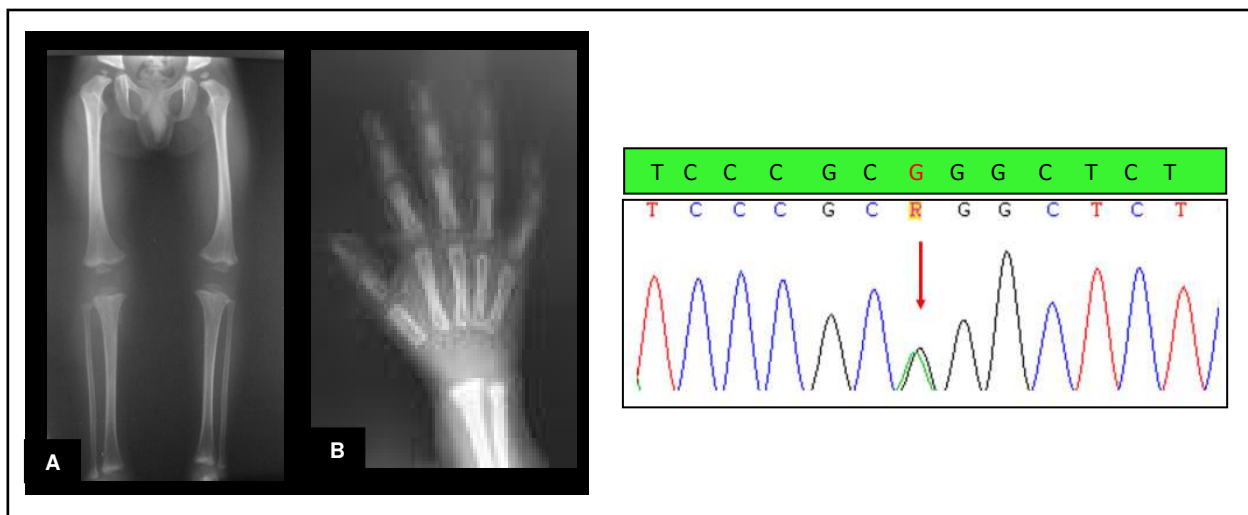
#### 4.3. SEMD-JL tipo leptodactílico (*KIF22*)

Para o estudo dos pacientes 3, 4 e 5 foi feito o sequenciamento apenas do gene *KIF22*, pois os mesmos apresentaram o fenótipo típico de SEMD-JL tipo Hall.

A figura 5 e 6 estão apresentando os Rxs e eletroferogramas dos paciente 3 e 4. Na análise do sequenciamento de ambos foram identificadas mutações *missense* descritas no éxon 4 em heterozigose: c.[443C>T] p.[P148L] e c446G>A p.[R149G]<sup>19,20</sup>.

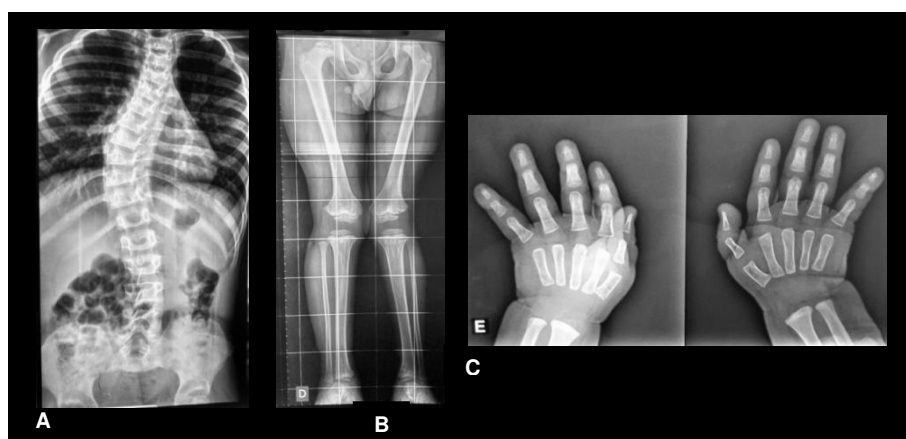


**Figura 5.** À esquerda, radiografias do paciente 3 aos 2 anos e 10 meses. (A) Metáfises alargadas e epífises minúsculas, (B) metacarpos delgados e ausência de ossificação de ossos do carpo. À direita, eletroferograma parcial do éxon 4 do gene *KIF22* do paciente 3 mostrando a troca de uma Citosina por uma Timina em heteroziosse



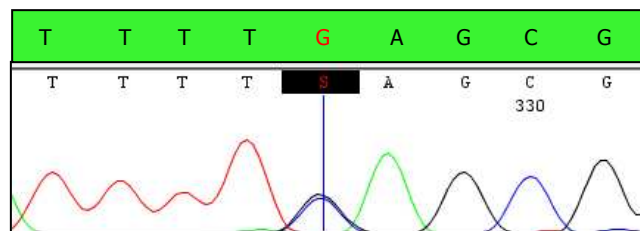
**Figura 6.** À esquerda radiografias do paciente 4 aos 2 anos 3 meses mostram: (A) metáfises alargadas (B) metacarpos delgados e ausência de ossificação dos ossos do carpo. À direita eletroferograma parcial do éxon 4 do gene *KIF22* do paciente 4 mostrando a troca de uma Guanina por uma Adenina em heteroziosse.

O paciente 5, sexo masculino, filho único de casal não consanguíneo, apresentou um fenótipo típico de SEMD-JL tipo leptodactílico. Dentre as características clínicas observam-se narinas antevertidas, ponte nasal baixa, escoliose, geno valgo e membros curtos. Ao raio-x. se observa escoliose, metáfises alargadas, metacarpos delgados e ausência de ossificação dos ossos do carpo (Figura 7).



**Figura 7** Radiografias do paciente 5. Mostrando aos 6 anos (A) escoliose, (B) metáfises alargadas, aos 2 anos e 6 meses (C) metacarpos delgados e ausência de ossificação dos ossos do carpo.

Na análise do sequenciamento do paciente 5 não foi identificado nenhuma variante possivelmente patogênica no éxon 4 (*hot spot*). Precedeu-se então ao sequenciamento dos demais éxons. Desse modo, foi identificada uma variante ainda não descrita em heterozigose no éxon 5 c.[664G>C] p.[E222Q] (Figura 8). Para essa alteração, foi feita a análise *in silico* e estudo em controles. Essa variante não foi encontrada no sequenciamento dos pais nem no sequenciamento de 50 indivíduos controles (100 cromossomos).



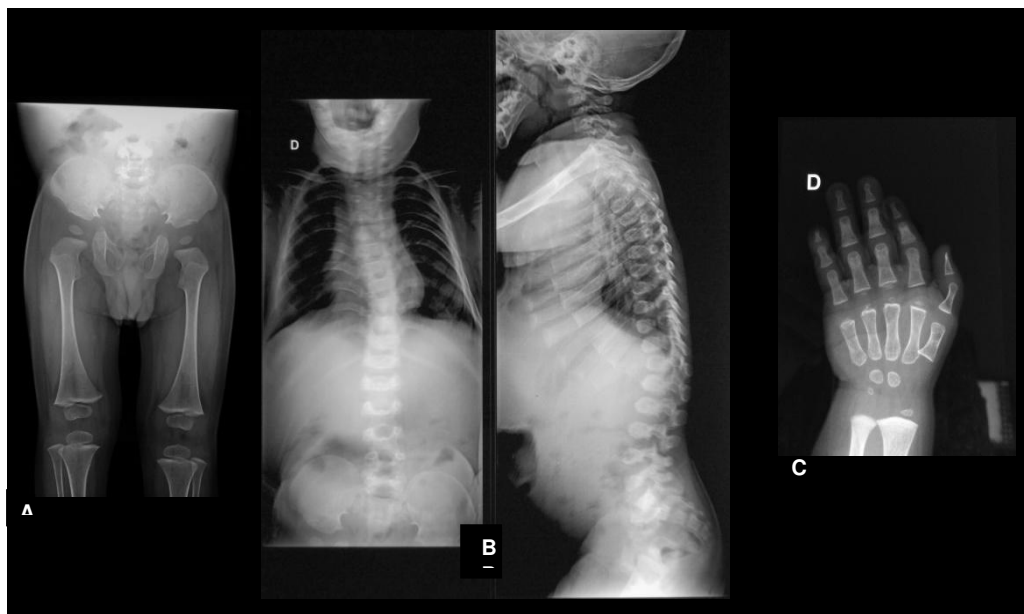
**Figura 8** Eletroferograma parcial do éxon 5 do gene KIF22 do paciente 5 mostrando a troca de uma Guanina por uma Adenina em heterozigose.

#### 4.4. SEMD-JL tipo Beighton (*B3GALT6*)

Para o estudo do paciente 6, foi feito o sequenciamento do gene *B3GALT6*, por apresentar fenótipo típico de SEMD-JL tipo Beighton.

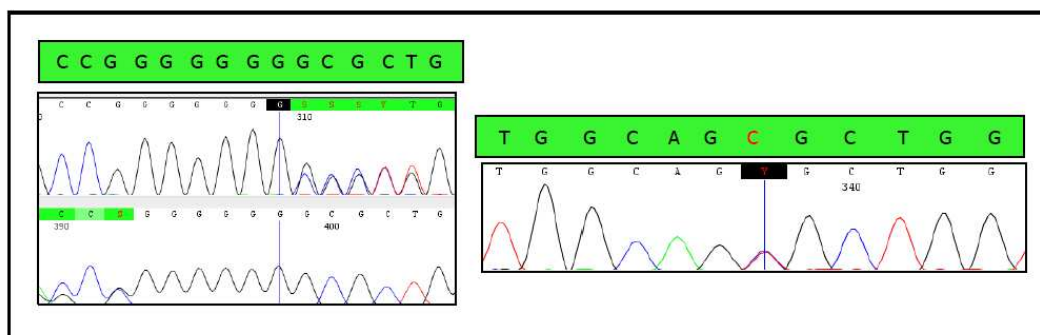
Trata-se de um paciente do sexo masculino, avaliado com 1 ano e 4 meses, com atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, frouxidão ligamentar e calcâneos proeminentes. Dentre as características radiológicas, apresentava

encurtamento de ossos longos, alargamento metafisário em regiões dos joelhos, colos femorais encurtados, leve hipoplasia de asas ilíacas, irregularidade dos acetábulos e estreitamento da chanfradura ciática. Observa-se ainda discreta platisspondilia com certa irregularidade de vértebras lombares e avanço de maturação carpal (Figura 9).



**Figura 9.** Radiografias do paciente 6. (A) 1 ano e 3m, observa-se alargamento, colos femorais encurtados, leve hipoplasia de asas ilíacas, irregularidade dos acetábulos e estreitamento da chanfradura ciática. (B) 1 ano e 3 meses observa-se discreta platisspondilia com certa irregularidade de vértebras lombares. (C) 1 ano observa-se avanço de maturação carpal.

Na análise do sequenciamento do paciente 6, foram identificadas duas variantes inéditas em heterozigose (heterozigoto composto): uma *missense* c.[182C>T] p.[V61A] e uma *frameshift* c.[588dupG] p.[R197Afs\*246], a duplicação de uma guanina o que leva a troca de uma Arginina por uma Alanina provocando a perda do *stop códon* (Figura 10).



**Figura 10.** Eletroferograma parcial do éxon 1 do gene *B3GALT6* do paciente. À esquerda se observa a duplicação de uma guanina e à direita a troca de um citosina por uma timina, ambas em heterozigose.

Ao analisar a variante p.[V61A] nos sites de predição (anexo Tabela 8), apenas o *Mutation Taster*® a considerou como deletéria. Essa alteração foi encontrada somente no sequenciamento do pai do paciente (em heterozigose), e ausente no sequenciamento de controles.

A variante p.[R197Afs\*246] é uma *frameshift* que por definição já é deletéria. Dos sites de predição utilizados, apenas o *Mutation Taster*® analisa esse tipo de mutação e a considerou deletéria. Essa alteração foi encontrada também no sequenciamento da mãe do paciente (em heterozigose) e ausente no sequenciamento de controles.

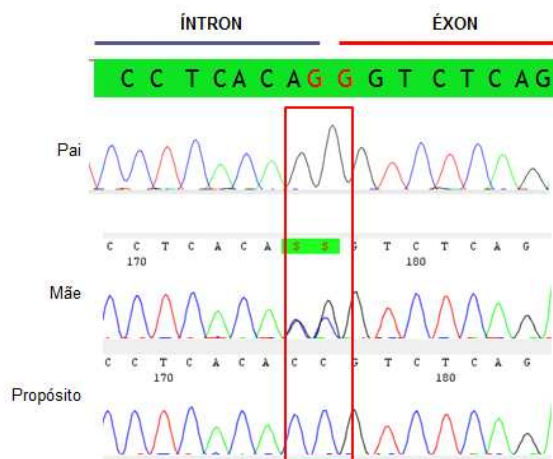
#### 4.5. SED tipo *CHST3*

O paciente 7 apresentou o fenótipo de SED-tipo *CHST3* (Figura 11). O resultado da investigação molecular desse paciente é mostrada na Figura 13. Foi identificada uma mutação envolvendo dois nucleotídeos adjacentes aparentemente em homozigose, uma em região aceitadora do sítio de *splicing* e uma *missense*. Hermanns et al.<sup>24</sup>, publicaram essa mutação como IVS2-1G>C + c.[141G>C];p.[R57S], porém de acordo com as regras de nomenclatura do HGVS (*Human Genome Variation Society*) sua nomenclatura correta de é c.141-1\_141delinsCC.

O sequenciamento dos pais mostrou as mesmas variantes em heterozigose apenas na mãe (Figura 12).

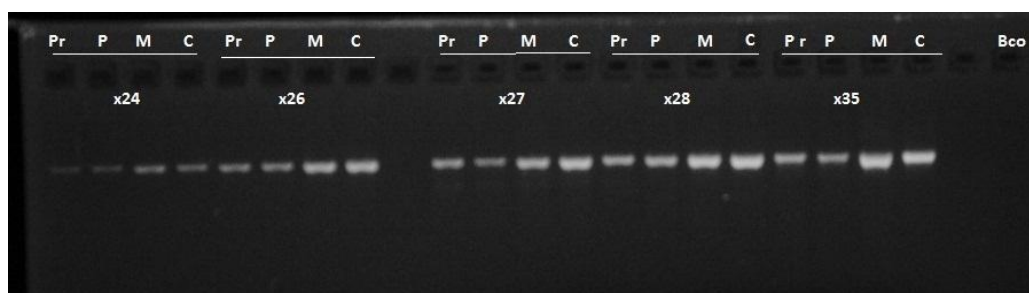


**Figura 11.** Radiografias do paciente 7. Umero distal bífido à direita.



**Figura 12** - Eletroferograma parcial do trio. O pai não apresenta as variantes, enquanto a mãe apresenta em heterozigose e o propósito a apresenta em homozigose.

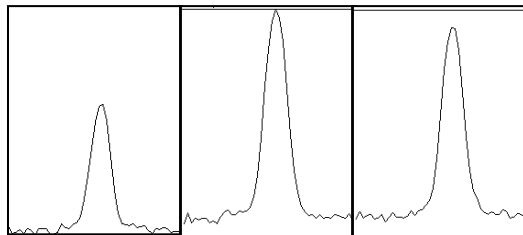
Como o sequenciamento do pai não apresentou nenhuma das duas variantes levantou-se a hipótese de uma possível deleção nessa região em um dos alelos do pai. Para avaliar essa hipótese foi realizada a técnica de análise semiquantitativa por PCR. A Figura 13 mostra os fragmentos amplificados do éxon 3 do gene *CHST3* respectivamente do Propósito (Pr), Pai (P), Mãe (M) e controle (C). A partir do ciclo 24 já é possível observar a semelhança de intensidade dos fragmentos do propósito e do pai em relação aos fragmentos da mãe e a do controle. Isso se torna mais evidente nos ciclos 26, 27, 28 e até mesmo no 35º.



**Figura 13.** Fotografia do gel de eletroforese mostrando os fragmentos amplificados do éxon 3A do gene *CHST3* referente ao Propósito (Pr), Pai (P), Mãe (M) e Controle (C), nos ciclos: 24, 26, 27, 28 e 35 e o branco.

Ao analisar a imagem do gel de agarose acima no *software ImageJ 1.50i* (Figura 14) foi obtido como resultado um histograma onde os picos do

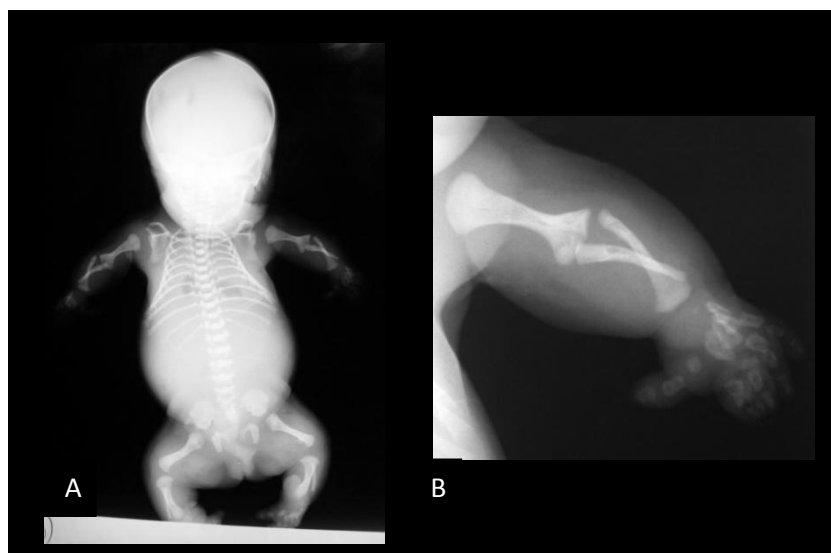
propósito e do pai correspondem praticamente a metade do tamanho dos picos da mãe e do controle.



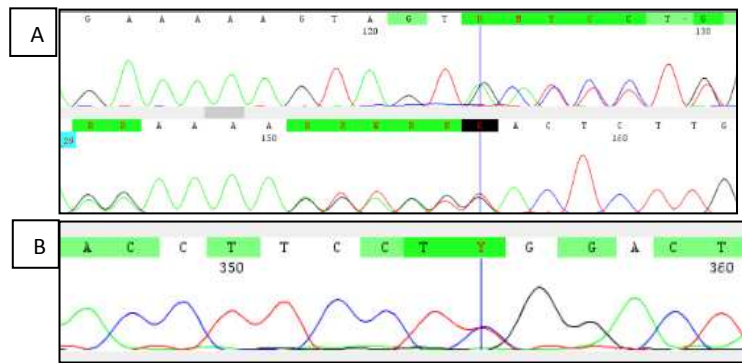
**Figura 14.** Histograma obtido no *software ImageJ 1.50i* referente ao Propósito, Pai, Mãe e controle respectivamente.

#### 4.6. AO2 e DTD (*SLC26A2/DTDST*)

No indivíduo 8, óbito fetal, com diagnóstico de AO2 (Figura 15), o sequenciamento do gene *DTDST/SLC26A2* identificou duas mutações já descritas em heterozigose (heterozigoto composto): uma *missense* c.[862C>T] p.[R279W] e uma deleção c.[1905delG] p.[T627L\*23] que resulta em mudança na matriz de leitura e, portanto, classificada como *frameshift* (Figura 16).



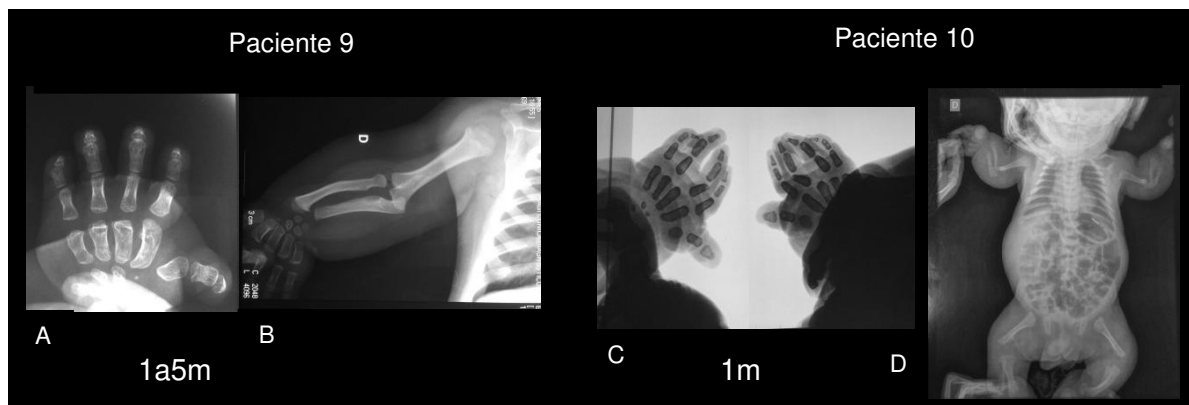
**Figura 15.** Radiografias do indivíduo 8. Em A, ossos longos encurtados, alargamento metafisário. Em (B), metáfise distal de úmero com afilamento da porção distal e polegares típicos.



**Figura 16** - Parte do eletroferograma do propósito mostrando as mutações c.[1905delG] p.[T627L\*23] em A, e c.[862C>T] p.[R279W] em B.

Os pacientes 9, 10 e 11 apresentaram fenótipo típico de Displasia Diastrófica (Figura 17).

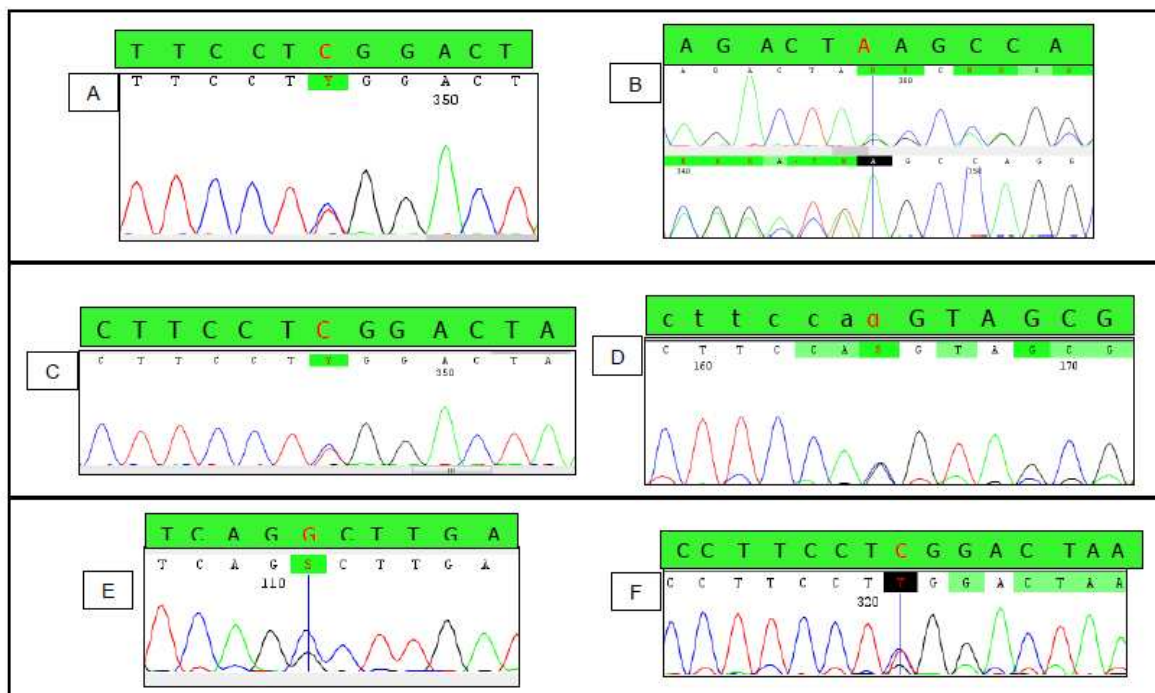
Em todos os casos foram identificadas mutações em heterozigose tipo heterozigoto composto.



**Figura 17.** Radiografias dos pacientes 9 e 10. Pode-se observar o polegar em caroneiro nos dois casos (A e C), úmero distal bífido (B) no paciente 9 e ossos longos encurtados no paciente 10 em D.

Na análise do sequenciamento do paciente 9 foram identificadas duas mutações já descritas: uma *missense* c.[862C>T] p.[R279W] e uma deleção c.[1751delA] p.[K575Sfs\*10] que resulta em mudança na matriz de leitura e, portanto, classificada como *frameshift* (Figura 18). Na análise do sequenciamento do paciente 10 foram identificadas duas mutações já descritas: uma *missense* c.[862C>T] p.[R279W] e uma na região de sítio de *splicing* c.[727-1G>C].

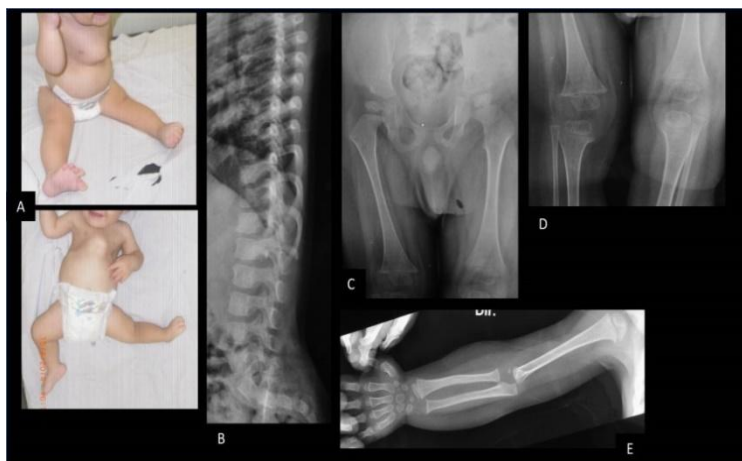
Na análise do sequenciamento do paciente 11 foram identificadas duas alterações do tipo *missense* c.[862C>T] p.[R27W] e uma inédita c.[371G>C] p.[G115A]. Todos os sites de predição utilizados a consideraram como deletéria (anexo Tabela 8). Essa variante não foi encontrada no sequenciamento de 30 controles



**Figura 18.** Parte do eletroferograma dos pacientes 9, 10 e 11 respectivamente do gene *SLC26A2/DTDS2* mostrando as variantes identificadas, em heterozigose. Em A e B (paciente 9), se observa a troca de um citosina por uma timina e em a deleção de uma adenina, ambas em heterozigose. Em C e D (paciente 10) se observa a troca de uma citosina por uma timina e a troca de uma guanina por uma citosina. Em E e F se observa a troca de uma guanina por uma citosina e uma citosina por uma timina.

#### 4.7. Condrodisplasia com luxações tipo gPAPP (*IMPAD1*)

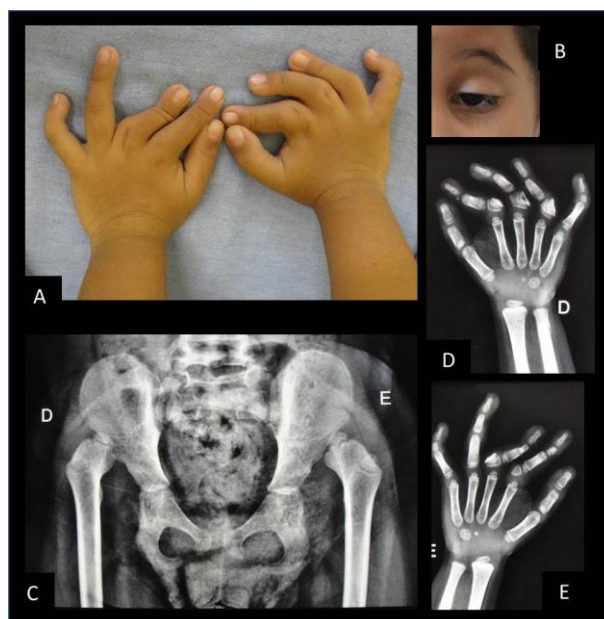
O Paciente 13 apresentou características típicas de um novo fenótipo associado a mutações no gene *IMPAD1* (Figura 19). O estudo molecular foi negativo para o gene *IMPAD1*, assim como para os demais genes avaliados no painel sob investigação.



**Figura 19.** Fotos e radiografias do paciente 13 aos 2 anos. Em A, *Pectus carinatum* em evidência, em B lordose lombar acentuada, em C subluxação de quadril, luxação de quadril, em D alargamento metafisário de joelhos e, em E avanço de maturação carpal.

#### 4.8. Pacientes com fenótipos presuntivos

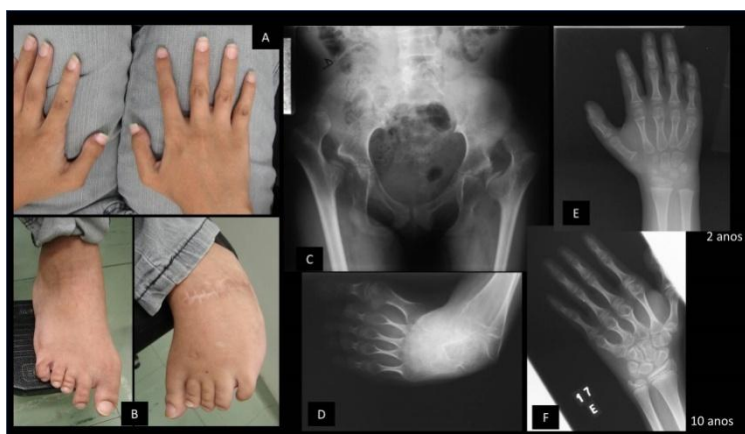
O Paciente 14 apresentou as características presuntivas de Condrodisplasia com luxações tipo gPAPP (Figura 20). O estudo molecular se iniciou com o gene *IMPAD1* negativo para esse, assim como para os demais genes avaliados no painel sob investigação.



**Figura 20.** A - Braquidactilia com desvio radial dos dedos, B - ptose palpebral, C - Luxação do quadril, D e E- atraso de maturação carpal e falanges delta em mãos.

Os Pacientes 15 e 16 apresentaram características sugestivas de DBQD (Figura 21 e 22). O estudo molecular do paciente 15 foi iniciado pelo do painel *Ion Torrent Personal Genome Machine PGM™ - Life Technologies*, com a análise do gene *FLNB*, pois apresentou háluces sugestivo de Larsen. No sequenciamento de Sanger o estudo se iniciou com os genes *CANT1* e *XYLT1*, negativo para esses bem como para os demais genes avaliados no painel sob investigação.

O estudo do paciente 16 se iniciou com um grupo colaborativo, foi realizado cariótipo e *array CGH* sem alterações, foi realizado também o sequenciamento de Sanger (negativo) para o gene *FGFR1* (MIM #136350), para afastar a hipótese de Displasia osteoglofonica (OMIM #166250).



**Figura 21.** Paciente 15. A - Encurtamento de polegares, C - luxação de quadril com proeminência de trocanter menor (~chave sueca), E e F - braquidactilia e aumento de maturação carpal.



**Figura 22.** Paciente 16. Em A, Assimetria corporoal, B- braquidactilia, C - escoliose, D – Displasia de quadril, E- luxação de joelhos.

O Paciente 17 apresentou características que se assemelhavam a de SED tipo *CHST3* (Figura 23). O estudo molecular se iniciou com esse gene, negativo para o mesmo, assim como para os demais. Por falta de mais informações clínicas-radiológicas e especialmente material biológico, não foi possível finalizar o estudo desse paciente.



**Figura 23.** A - *Pectus carinatum*, luxação de joelhos, pés tortos. B e D – ausência de centros de ossificação carpal e tarsal, C - cifose cervical, D – luxação.

## 5. DISCUSSÃO

No presente projeto, foram estudadas OCDs com comprometimento *major* das articulações. O conhecimento das bases moleculares dessas condições tem mostrado que a maioria delas têm em comum o envolvimento de genes associados aos PGs, razão da análise específica dos mesmos, com exceção do *FLNB* e *KIF22*.

Foram investigados 17 indivíduos cujos fenótipos foram típicos ou casos presuntivos, conforme as características clínicas-radiológicas. Dentre os 12 casos típicos, foi possível estabelecer os diagnósticos de: Síndrome de Larsen (1), DBQDII (2), SEMD-JL tipo leptodactílico (3), SEMD-JL tipo Beighton (1), SED-tipo *CHST3* (1), AO2 (1) e DTD (3). Os quatro pacientes sem diagnóstico inicial apresentaram características que se assemelhavam a: Displasia Esquelética com luxações tipo gPAPP (1), DBQDII (2), e SED tipo *CHST3* (1).

No conjunto dos 17 pacientes investigados, foram identificadas 13 alterações deletérias em 11 pacientes (64,7%) condizentes com o diagnóstico inicial, retirando-se os casos presuntivos (pacientes 14, 15, 16 e 17) a porcentagem de pacientes com alteração identificada sobe para 84,61%, o que indica uma alta taxa de positividade, reiterando a importância da avaliação clínico-radiológica prévia ao estudo molecular.

### 5.1. Síndrome de Larsen (*FLNB*)

Até o momento, mais de vinte mutações foram descritas no gene *FLNB* relacionados à Síndrome de Larsen. O estudo molecular do paciente 1 identificou uma variante inédita em heterozigose c.[1088G>T] p.[G363V] do tipo *missense* no éxon 7 do gene *FLNB*. Todos os sites de predição utilizados a consideraram como deletéria e essa alteração não foi identificada no sequenciamento de controles.

Ao analisar essa variante nos bancos de dados, observou-se que ela está na mesma posição de uma mutação descrita em 2007 em um paciente com síndrome de Larsen, no entanto, nessa ocorre a troca de uma guanina por uma adenina, o que leva a troca de uma glicina por um glutamato c.[1088G>A] p.[G363E]<sup>46</sup>.

Embora essa variante não esteja localizada no *cluster* conhecido das mutações para o gene *FLNB*, pode-se inferir que ela seja causativa, pois houve concordância de resultados na análise *in silico*, ausência da mesma em controles e nesse mesmo ponto há descrito uma mutação como mencionado acima.

### 5.2. Displasia de *Desbuquois* (*CANT1* e *XYLT1*)

Dois pacientes (2 e 12) foram associados a este fenótipo e sequenciados os genes *CANT1* e *XYLT1*. O paciente dois está apresentado no artigo em anexo (Anexo 3) publicado no *American Journal of Medical Genetics: Part A*. 2016 Nov;170(11):3043-3047<sup>47</sup>.

O indivíduo 12 apresentou um fenótipo sugestivo de DBQDII e, assim como no caso 2, o estudo molecular se iniciou pelo sequenciamento do gene

*CANT1* e, em seguida o gene *XYLT1* (incorporado ao painel posteriormente), porém nenhuma variante causativa foi identificada. Seguindo a estratégia de estudo, procedeu-se então ao sequenciamento dos demais genes e também não foi identificada nenhuma variante possivelmente patogênica.

Embora o perfil facial do paciente 12 seja sugestivo de DBQDII, as malformações internas bem como a letalidade não são referidas em casos com mutações no gene *XYLT1*<sup>15,47,49</sup>. No entanto, ele apresenta achados importantes como encurtamento de membros, avanço de ossificação de ossos do carpo e tarso, fêmur com aparência de chave sueca e *clef* coronal dos corpos vertebrais torácicos e lombares.

A DBQD apresenta variabilidade clínica e heterogeneidade genética, e como há na literatura onze casos descritos sem mutação identificada, acredita-se que outro gene esteja associado a esse fenótipo<sup>15</sup>. Não se pode, porém, descartar a possibilidade de que esse paciente apresente uma variante em região não coberta pelo sequenciamento de Sanger, visto que além de mutações pontuais, há relato de um paciente com uma deleção de 3.3Mb envolvendo o *XYLT1* além de outros sete genes<sup>49</sup>.

De todo modo, através de um projeto futuro, a continuidade do estudo desse paciente se dará através de outras técnicas como o Sequenciamento de Nova Geração e *Array CGH*.

### 5.3. SEMD-JL tipo leptodactílico (*KIF22*)

Associado a este fenótipo três pacientes (3, 4 e 5) foram selecionados para esse trabalho.

O estudo molecular dos mesmos foi direcionado para o gene *KIF22*. O início do estudo molecular deu-se pelo *éxon* 4, pois é *hot spot* para esse gene, sendo identificadas duas mutações descritas em heterozigose: c.[443C>T] p.[P148L] e c.[446G>A] p.[R149Q] nos pacientes 3 e 4, essas mutações já foram descritas em outros pacientes com esse fenótipo, ratificando a correlação genótipo-fenótipo<sup>19,19</sup>.

No paciente 4, não foram identificadas variantes possivelmente patogênicas no *éxon* 4, porém, no sequenciamento dos demais éxons foi identificada uma variante no *éxon* 5 (c.[664G>C] p.[E222Q]). Não se esperava

encontrar variante em um éxon diferente do 4, pois até o momento sabe-se que as mutações responsáveis por esse fenótipo estão presentes apenas no *hot spot* por estar em um domínio importante para a proteína.

Os sites de predição de análise *in silico* apresentaram discrepâncias e, com isso não foi possível apenas por esses programas inferir se essa variante estaria provocando ou não o fenótipo, no entanto, o éxon 5 está no mesmo domínio protéico que o éxon 4 e o aminoácido Glu222 está localizado em uma região conservada entre as espécies, além disso, essa alteração não foi encontrada no sequenciamento dos pais e nem no sequenciamento de controles. Essas evidências, portanto, sugerem que essa variante pode ter implicações deletérias.

Até o momento o *KIF22* é o principal gene associado a esse fenótipo, no entanto, há registro de pacientes com o fenótipo típico, e sem variantes identificadas nesse gene (A. Superti-Furga, comunicação pessoal). Recentemente, mutações em dois genes *NIN* e *EXOC6B* foram associadas a um fenótipo SEMD-JL tipo Hall-*like* sugerindo uma heterogeneidade genética<sup>21,22</sup>.

#### 5.4. SEMD-JL tipo Beighton (*B3GALT6*)

Com esse fenótipo foi identificado apenas um paciente típico (paciente 6). O estudo do gene *B3GALT6* identificou duas variantes inéditas em heterozigose (heterozigoto composto): a duplicação de uma guanina c.[588dupG]p.[R197Afs\*442] o que leva a troca de uma Arginina por uma Alanina provocando a perda o *stop códon* e acrescentando 112 aminoácidos à proteína e uma *missense* inédita c.[182C>T] p.[V61A].

A variante p.[R197Afs\*246] é uma mutação *frameshift*, portanto, deletéria por definição. De todo modo, o site *Mutation Taster*® analisa esse tipo de mutação e, de fato, a considerou deletéria. Essa alteração foi encontrada somente no sequenciamento da mãe do paciente (em heterozigose) e ausente no sequenciamento de controles.

A análise *in silico* da variante p.[V61A] não foi concordante, apenas o *Mutation Taster*® a considerou como deletéria. Essa alteração foi encontrada no sequenciamento do pai do paciente (em heterozigose), ausente no

sequenciamento da mãe e em indivíduos controle. Apenas com a análise *in silico* não é possível afirmar que essa variante seja causativa, porém esse paciente apresenta um fenótipo típico e somente essas duas variantes foram identificadas no gene.

### 5.5. SED tipo *CHST3*

A investigação molecular do paciente 7 identificou uma mutação envolvendo dois nucleotídeos adjacentes aparentemente em homozigose: c.141-1\_141delinsCC já descrita em combinação com a c.617\_618TC>CA p.[F206X]<sup>24</sup>.

Acredita-se que a variante responsável pelo fenótipo seja a que está na região aceitadora do sítio de *splicing* (última base antes do início do éxon 3), pois pode estar provocando a perda do reconhecimento do mecanismo de *splicing*. Embora essa mutação já tenha sido descrita, foi feita a análise de sua patogenicidade no algoritmo *Fruitfly- Berkeley Drosophila Genome Project* que indicou a abolição do reconhecimento do sítio de *splicing*

Ao analisar visualmente a imagem do gel de agarose, a partir do ciclo 24, já é possível observar que a intensidade da banda do propósito é semelhante a do pai e, ambas são mais fracas do que a banda da mãe e a do controle. Isso se torna mais evidente nos ciclos 26, 27, 28 e até mesmo no 35, demonstrando que há uma quantidade diferente de moléculas amplificadas, sugerindo que há uma deleção no propósito herdada do pai.

Ao analisar a imagem do gel de agarose no *software ImageJ 1.50i* foi obtido como resultado um histograma onde os picos do propósito e do pai são correspondente a metade em relação aos picos da mãe e do controle e, isso se torna mais evidente nos ciclos 26, 27, 28 e até mesmo no 35, sugerindo que o propósito tem uma deleção herdada do pai.

Com base nos resultados obtidos pela análise do sequenciamento do propósito, pai, mãe e controles e na técnica de análise semiquantitativa por PCR, foi possível inferir que as duas variantes identificadas aparentemente em homozigose no paciente 1, pode corresponder apenas à amplificação do alelo herdado da mãe (com a variante) e, por haver simultaneamente uma deleção

(do alelo paterno), não se observa o outro alelo. Dessa forma as mutações ocorrendo nos dois alelos justificariam o fenótipo do paciente.

#### 5.6. AO2 e DTD (*SLC26A2/DTDST*)

Foram estudados três indivíduos classificados no espectro fenotípico do gene *SLC26A2/DTDST*. Um fenótipo letal (AO2) e três com DTD. Todos apresentaram a mutação R279W em heterozigose (heterozigoto composto).

Acredita-se que o espectro fenotípico dessas condições esteja relacionado a mutações nos diferentes domínios desse gene <sup>27</sup>. A correlação do fenótipo com as mutações encontradas sugere que mutações que causam alterações nos domínios transmembrana poderiam abolir a atividade do *SLC26A2/DTDST* provocando um fenótipo mais grave. As substituições de aminoácidos nos domínios citoplasmáticos N-terminal ou C-terminal resultam em alguma atividade residual como no caso a R279W localizada no domínio c-terminal provocando um fenótipo menos grave quando combinado com outra mutação, como nos casos da DTD. Logo, a gravidade do fenótipo depende da localização da mutação, do tipo de mutação e de sua combinação (heterozigoto composto) <sup>29</sup>.

#### 5.7. Condrodisplasia com luxações tipo gPAPP (*IMPAD1*)

Embora a avaliação inicial do fenótipo do paciente 13 tenha sido compatível com o diagnóstico de Condrodisplasia com luxações tipo gPAPP, não encontramos mutações no gene *IMPAD1*. O estudo molecular estendido para os demais genes do painel também foi negativo. É possível que o diagnóstico inicial tenha sido equivocado. Até o momento mutações no gene *IMPAD1* foram encontradas em apenas seis pacientes sendo quatro com Condrodisplasia com luxações tipo gPAPP e dois com fenótipo Catel–Manzke *like* <sup>32,33</sup>.

## 5.8. Pacientes com fenótipos presuntivos

Nesses pacientes nenhuma variante que pudesse justificar o fenótipo foi identificada.

A partir da avaliação clínico-radiológica do paciente 14, foram sugeridos três genes que poderiam estar associados a esse fenótipo: *IMPAD1*, *TDGS* (Catel Manzke) e *CHSY1* (Síndrome braquidactilia preaxial Temtamy). Inicialmente o estudo molecular foi realizado no *IMPAD1*, pois dos três era o único presente no painel, e como o resultado foi negativo, deu-se continuidade aos demais sob investigação. O estudo molecular foi negativo para o gene *IMPAD1*, assim como para os demais genes avaliados no painel. Através de um projeto futuro, a continuidade do estudo desse paciente se dará através de um painel de Sequenciamento de Nova Geração, espera-se no entanto identificar mutações no gene *CHSY1*, sugerido no início do estudo do mesmo.

Os pacientes 15 e 16 apresentaram características sugestivas de DBQD. O estudo molecular do paciente 15 foi iniciado com o painel Ion Torrent Personal Genome Machine PGM™ - Life Technologies, com a análise do gene *FLNB*. No sequenciamento de Sanger o estudo de ambos se iniciou com os genes *CANT1* e *XYLT1*, negativo para esses bem como para os demais genes avaliados no painel sob investigação. Para ambos os casos, o fenótipo deverá ser reavaliado para assim submetê-los a investigação em um painel de Sequenciamento de Nova Geração.

O Paciente 17 apresentou características sugestivas de SED tipo *CHST3* (figura). O estudo molecular foi negativo para o mesmo, assim como para o *IMPAD1* e *CANT1*. Por falta de material biológico, não foi possível finalizar o estudo desse paciente.

Os casos nos quais as bases moleculares permanecem desconhecidas reforçam a complexidade dos fenótipos que apresentam um comprometimento *major* das articulações e, favorece a continuidade da investigação através da utilização de outras técnicas como o Sequenciamento de Nova Geração.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foram analisados apenas *éxons*, junções íntron-éxon e íntron (em dois genes *CANT1* e *SLC26A2/DTDST*), por isso, não se pode descartar a possibilidade de que mutações em regiões promotoras, reguladoras, mutações intrônicas distantes, grandes inserções/deleções estejam implicadas na patogenia dos fenótipos dos pacientes 12, 13, 14, 15, 16 e 17. Além disso, com o avanço da tecnologia de NGS novos genes relacionados a essas condições tem sido descoberto com grande rapidez.

## 7. CONCLUSÕES

A análise dos resultados do presente trabalho permitiu concluir que:

- A estratégia utilizada para o estudo molecular possibilitou a identificação de alterações em 11 pacientes com fenótipos típicos: Síndrome de Larsen (1), DBQDII (1), SEMD-JL tipo leptodactílico (3), SEMD-JL tipo Beighton (1), SED tipo *CHST3* (1), AO2 (1) e DTD (3) confirmando a correlação genótipo-fenótipo inicialmente suspeitada.
- A alta taxa de positividade (84,6%) nos casos típicos ressalta a importância da avaliação clínica-radiológica prévia ao estudo molecular.
- Dentre as variantes identificadas, apenas a p.[R279W] no gene *SLC26A2/DTDST*, a mais comum nesse gene, foi recorrente em quatro pacientes. Sete variantes inéditas foram identificadas: cinco do tipo *missense* (*FLNB*, *XYLT1*, *KIF22* e *B3GALT6*) e duas *frameshifts* (*B3GALT6* e *SLC26A2/DTDST*) contribuindo com a literatura.

- Os fenótipos do espectro *SLC26A2/DTDS* são típicos e ao realizar a investigação molecular dos pacientes, a positividade foi de 100% ratificando a correlação-fenótipo.
- Em dois pacientes com fenótipo típico (12 e 13) não foi possível identificar variantes:
  - A negatividade no indivíduo 12 (DBQDII) corrobora com a hipótese de heterogeneidade genética, visto que outros pacientes sem mutação já foram descritos.
  - Embora a avaliação inicial do paciente 13 tenha sido compatível com o diagnóstico (Condrodisplasia com luxações tipo gPAPP), não foi possível identificar variante no gene *IMPAD1*. É possível que o diagnóstico inicial tenha sido equivocado. De todo modo, esse fenótipo foi descrito recentemente e dentre os nove pacientes descritos, apenas seis apresentaram mutações nesse gene.
- Em seis casos com fenótipos presuntivos, as bases moleculares permanecem desconhecidas reforçando a complexidade dos fenótipos que apresentam um comprometimento *major* das articulações.
- Os pacientes para os quais não foi possível a identificação de variantes patogênicas favorecem a continuidade da investigação através de um projeto futuro através da introdução novas tecnologias como sequenciamento de última geração (NGS) através de um painel ampliado com genes relacionados às displasias esqueléticas com comprometimento articular importante.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Barbosa-Buck CO, Orioli IM, da Graça Dutra M, Lopez-Camelo J, Castilla EE, Cavalcanti DP. Clinical epidemiology of skeletal dysplasias in South America. *Am J Med Genet A*. 2012 May;158A(5):1038–45.
2. Bonafe L, Cormier-Daire V, Hall C, Lachman R, Mortier G, Mundlos S et al. 2015. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2015 revision. *Am J Med Genet Part A* 2015 Dec;167A(12):2869-2892.
3. International nomenclature of constitutional diseases of bones. *Ann Radiol* 1970;13(7):455–464.
4. Sasarman F, Maftai C, Campeau PM, Brunel-Guitton C, Mitchell GA, Allard P. Biosynthesis of glycosaminoglycans: associated disorders and biochemical tests. *J Inherit Metab Dis*. 2016 Mar;39(2):173-88.
5. Larsen LJ, Schottdaedt ER & Bost FC. Multiple congenital dislocations associated with characteristic facial abnormality. *J. Pediatr*. 1950 Oct;37(4):574–584.
6. Bicknell LS, Farrington-Rock C, Shafeghati Y, Rump P, Alanay Y, Alembik Yet al. A molecular and clinical study of Larsen syndrome caused by mutations in *FLNB*. *J Med Genet*. 2007 Feb;44(2):89–98.
7. Krakow D, Robertson SP, King LM, Morgan T, Sebald ET, Bertolotto C, et al. Mutations in the gene encoding filamin B disrupt vertebral segmentation, joint formation and skeletogenesis. *Nat Genet* 2004 Apr;36(4):405-10.
8. Ensembl Genome Browser. 2016. Disponível em: [www.ensembl.org/](http://www.ensembl.org/)
9. Girisha KM, Bidchol AM, Graul-Neumann L, Gupta A, Hehr U, Lessel D et al. Phenotype and genotype in patients with Larsen syndrome: clinical homogeneity and allelic heterogeneity in seven patients. *BMC Med Genet*. 2016 Apr;6(1):17-27
10. Lu J, Lian G, Lenkinski R, De Grand A, Vaid RR, Bryce T et al. Filamin B mutations cause chondrocyte defects in skeletal development. *Hum Mol Genet*. 2007 Jul;16(14):1661–1675.

11. Desbuquois G, Grener B, Michel J, Rossignol C. Chondrodystrophique avec ossification anarchique et poiy-malformabons chez deux soeurs. Arch Fr Pediatr 1966;(23):573-687.
12. Faivre L, Cormier-Daire V, Elliott AM, Field F, Munnich A, Maroteaux P et al. Desbuquois dysplasia, a reevaluation with abnormal and 'normal' hands: radiographic manifestations. Am J Med Genet 2004 Jan;124A(1):48-53.
13. Kim O-H, Nishimura G, Song H-R, Matsui Y, Sakazume S, Yamada M et al. A variant of Desbuquois dysplasia characterized by advanced carpal bone age, short metacarpals, and elongated phalanges: Report of seven cases. Am J Med Genet Part A 2010 Apr;152A(4):875-885.
14. Huber C, Oulès B, Bertoli M, Chami M, Fradin M, Alanay Y et al. Identification of CANT1 mutations in Desbuquois dysplasia. Am J Hum Genet 2009 Nov;(85):706-710.
15. Bui C, Huber C, Tuysuz B, Alanay Y, Bole-Feysot C, Leroy JG et al. XYLT1 mutations in Desbuquois dysplasia type 2. Am J Hum Genet 2014 Mar;94(3):405-414.
16. Nizon M, Huber C, De Leonardis F, Merrina R, Forlino A, Fradin M *et al.* Further delineation of *CANT1* phenotypic spectrum and demonstration of its role in proteoglycan synthesis. Hum Mutat 2012 Aug;33(8):1261-1266.
17. Prydz K and Dalen KT. 2000. Synthesis and sorting of proteoglycans. J Cell Sci 2000 Jan;113:193–205.
18. Beighton P, Kozlowski K. Spondylo-epi-metaphyseal dysplasia with joint laxity and severe, progressive kyphoscoliosis. Skeletal Radiol 1980;5(4):205-212.
19. Min BJ, Kim N, Chung T, Kim OH, Nishimura G, Chung CY et al. Whole-exome sequencing identifies mutations of *KIF22* in spondyloepimetaphyseal dysplasia with joint laxity, leptodactylic type. Am J Hum Genet 2011 Dec;89(6):760-766.
20. Boyden ED, Campos-Xavier AB, Kalamajski S, Cameron TL, Suarez P, Tanackovic G et al. Recurrent dominant mutations affecting two adjacent residues in the motor domain of the monomeric kinesin KIF22 result in skeletal dysplasia and joint laxity. Am J Hum Genet 2011 Dec;89(6):767-772.

21. Girisha KM, Kortüm F, Shah H, Alawi M, Dalal A, Bhavani GS et al. A novel multiple joint dislocation syndrome associated with a homozygous nonsense variant in the EXOC6B gene. *Eur J Hum Genet* 2016 Aug;24(8):1206-1210.
22. Grosch M, Grüner B, Spranger S, Stütz AM, Rausch T, Korbel JO et al. Identification of a Ninein (NIN) mutation in a family with spondyloepimetaphyseal dysplasia with joint laxity (leptodactylic type)-like phenotype. *Matrix Biology* 2013 Oct;32(7-8):387–392.
23. Nakajima M, Mizumoto S, Miyake N, Kogawa R, Iida A, Ito H et al. Mutations in *B3GALT6*, which encodes a glycosaminoglycan linker region enzyme, cause a spectrum of skeletal and connective tissue disorders. *Am J Hum Genet* 2013 Jun;92(6):927-934.
24. Hermanns P, Unger S, Rossi A, Perez-Aytes A, Cortina H, Bonafé L et al. Congenital Joint Dislocations Caused by Carbohydrate Sulfotransferase 3 Deficiency in Recessive Larsen Syndrome and Humero-Spinal Dysostosis *Am J Hum Genet* 2008 Jun;82(6):1368-1374.
25. Unger S, Lausch E, Rossi A, Mégarbané A, Sillence D, Alcausin M et al. Phenotypic features of carbohydrate sulfotransferase 3 (*CHST3*) deficiency in 24 patients: congenital dislocations and vertebral changes as principal diagnostic features. *Am J Med Genet* 2010 Oct;152A(10):2543-2549.
26. Thiele H, Sakano M, Kitagawa H, Sugahara K, Rajab A, Hohne W et al. Loss of chondroitin 6-O-sulfotransferase-1 function results in severe human chondrodysplasia with progressive spinal involvement. *Proc Nat Acad Sci* 2004 Jul;101(27):10155-10160.
27. Hastbacka J, de la Chapelle A, Mahtani MM, Clines G, Reeve-Daly MP, Daly M et al. The diastrophic dysplasia gene encodes a novel sulfate transporter: positional cloning by fine-structure linkage disequilibrium mapping. *Cell* 1994 Sep;78(6):1073–1087.
28. Panzer KM, Lachman R, Modaff P, Pauli RM: A phenotype intermediate between Desbuquois dysplasia and diastrophic dysplasia secondary to mutations in DTDST. *Am J Med Genet A* 2008 Nov;146A(22): 2920–2924.
29. Barbosa M, Sousa AB, Medeira A, Lourenço T, Saraiva J, Pinto-Basto J, Clinical and molecular characterization of Diastrophic Dysplasia in the Portuguese population. *Clin Genet.* 2011 Dec;80(6):550-557.

30. Newbury-Ecob R. Atelosteogenesis type 2. J. Med. Genet. 1998 Jan;35(1):49-53.
31. Rossi A, Superti-Furga A. Mutations in the diastrophic dysplasia sulfate transporter (*DTDST*) gene (*SLC26A2*): 22 novel mutations, mutation review, associated skeletal phenotypes, and diagnostic relevance. Hum. Mutat 2001 Mar;17(3):159-171.
32. Vissers LE, Lausch E, Unger S, Campos-Xavier B, Gilissen C, Rossi A et al. Chondrodysplasia and abnormal joint development associated with mutations in *IMPAD1*, encoding the golgi-resident nucleotide phosphatase, gPAPP. Am J Hum Genet 2011 May;88(5):608–615.
33. Nizon M, Alanay Y, Tuysuz B, Kiper PO, Geneviève D, Sillence D et al. *IMPAD1* mutations in two Catel-Manzke like patients. Am J Med Genet A. 2012 Sep;158A(9):2183-2187.
34. Dangelo JG, Fattini CA. Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar. 3 ed. São Paulo: Atheneu. 2000.
35. Standring S. Gray's, anatomia. [Tradução de: Gray's anatomy, 40th ed. Denise Costa Rodrigues *et al*]. - Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
36. More KL, Persaud TVN. Embriologia Básica. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
37. Lories RJ & Luyten FP. Overview of Joint and Cartilage Biology. In: Thakker RV, Whyte MP, Eisman JA, Igarashi T. Genetics of Bone Biology and Skeletal Disease. Elsevier; 2013. p.35-45.
38. Grahame R. Joint hypermobility and genetic collagen disorders: are they related? Arch Dis Child. 1999 Feb;80(2):188-191.
39. Carvalho HF; RECCO-PIMENTEL, SM. A célula. 2. ed. Barueri: Manole, 2007.
40. Roughley PJ. The structure and functions of cartilage proteoglycans. Eur Cell Mater 2006 Nov;12:92-101

41. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463–5467.
42. Sambrook J, Russel D w. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.
43. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. “Touchdown” PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 1991 Jul;19(14):4008.
44. McPherson MJ, Moller SG. *PCR, Second Edition*. 2<sup>e</sup> Ed. Taylor & Francis Group 2006.
45. Hästbacka J, Superti-Furga A, Wilcox WR, Rimoin DL, Cohn DH, Lander ES. Atelosteogenesis type II is caused by mutations in the diastrophic dysplasia sulfate-transporter gene (DTDST): evidence for a phenotypic series involving three chondrodysplasias. *Am J Hum Genet*. 1996 Feb;58(2):255-262.
46. Bicknell LS, Farrington-Rock C, Shafeghati Y, Rump P, Alanay Y, Alembik Y et al. A molecular and clinical study of Larsen syndrome caused by mutations in *FLNB*. *J Med Genet*. 2007 Feb;44(2):89-98.
47. Silveira C, Leal GF, Cavalcanti DP. Desbuquois dysplasia type II in a patient with a homozygous mutation in *XYLT1* and new unusual findings. *Am J Med Genet A*. 2016 Nov;170(11):3043-3047.
48. Schreml J, Durmaz B, Cogulu O, Keupp K, Beleggia F, Pohl E et al. The missing 'link': an autosomal recessive short stature syndrome caused by a hypofunctional *XYLT1* mutation. *Hum Genet* 2014 Jan;133(1):29-39.
49. Koningsbruggen S, Knoester H, Bakx R, Mook O, Knecht L, Cobben JM. Complete and partial *XYLT1* deletion in a patient with neonatal short limb skeletal dysplasia. *Am J Med Genet* 2016 Feb;170:(2)510-514.
50. Dobbs MB, Boehm S, Grange DK, Gurnett CA. Case report: Congenital knee dislocation in a patient with larsen syndrome and a novel filamin B mutation. *Clin Orthop Relat Res* 2008 Jun;466(6):1503–1509.
51. Jones KL, Schwarze U, Adam MP, Byers PH, Mefford HC. A homozygous *B3GAT3* mutation causes a severe syndrome with multiple fractures,

- expanding the phenotype of linkeropathy syndromes. *Am J Med Genet* 2015 Nov;167(11):2691-2696.
52. Zhang D, Herring JA, Swaney SS, McClendon TB, Gao X, Browne RH et al. Mutations responsible for Larsen syndrome cluster in the FLNB protein. *J Med Genet* 2006 May;43(5):e24.
  53. Faden M, Al-Zahrani F, Arafah D, Alkuraya FS. Mutation of *CANT1* causes Desbuquois dysplasia. *Am J Med Genet* 2010 May;152(5):1157–1160.
  54. Furuichi T, Dai J, Cho TJ, Sakazume S, Ikema M, Matsui Y et al. *CANT1* mutation is also responsible for Desbuquois dysplasia, type 2 and Kim variant. *J Med Genet* 2011 Jan;48(1):32-37.
  55. Laccone F, Schoner K, Krabichler B, Kluge B, Schwerdtfeger R, Schulze B, et al. Desbuquois dysplasia type I and fetal hydrops due to novel mutations in the *CANT1* gene. *Eur J Hum Genet* 2011 Nov;19(11):1133–1137.
  56. Inoue S, Ishii A, Shirotani G, Tsutsumi M, Ohta E, Nakamura M et al. Case of Desbuquois dysplasia type 1: potentially lethal skeletal dysplasia. *Pediatr Int*. 2014 Aug;56(4):e26-9. doi: 10.1111/ped.12383.
  57. Singh A, Kim OH, Iida A, Park WY, Ikegawa S, Kapoor S. A novel *CANT1* mutation in three Indian patients with Desbuquois dysplasia Kim type. *Eur J Med Genet* 2015 Feb;58(2):105-110.
  58. Jamsheer A, Olech EM, Kozłowski K, Niedziela M, Sowińska-Seidler A, Obara-Moszyńska M et al. Exome sequencing reveals two novel compound heterozygous *XYLT1* mutations in a Polish patient with Desbuquois dysplasia type 2 and growth hormone deficiency. *J Hum Genet* 2016 Jul;61(6):577-583.
  59. Vorster AA, Beighton P, Ramesar RS. Spondyloepimetaphyseal dysplasia with joint laxity (Beighton type); mutation analysis in eight affected South African families. *Clin Genet*. 2015 May;87(5):492-495.
  60. Malfait F, Kariminejad A, Van Damme T, Gauche C, Syx D, Merhi-Soussi F et al. Defective initiation of glycosaminoglycan synthesis due to *B3GALT6* mutations causes a pleiotropic Ehlers-Danlos-syndrome-like connective tissue disorder. *Am J Hum Genet*. 2013 Jun 6;92(6):935-945.

61. Ritelli M, Chiarelli N, Zoppi N, Dordoni C, Quinzani S, Traversa M et al. Insights in the etiopathology of galactosyltransferase II (GalT-II) deficiency from transcriptome-wide expression profiling of skin fibroblasts of two sisters with compound heterozygosity for two novel B3GALT6 mutations. *Mol Gen and Metab Reports* 2015 Mar;2:1–15.
62. Tanteles GA, Dixit A, Dhar S, Suri M. Two Somali half-siblings with CHST3-related chondrodysplasia illustrating the phenotypic spectrum and intrafamilial variability. *Am J Med Genet* 2013 Oct;161(10):2588-2593.
63. Waryah AM, Shahzad M, Shaikh H, Sheikh SA, Channa NA, Hufnagel RB et al. A novel CHST3 allele associated with spondyloepiphyseal dysplasia and hearing loss in Pakistani kindred. *Clin Genet* 2016 Jul;90(1):90-95.

## 9. RECURSOS DA INTERNET

<i>Codon Code Aligner</i> (Download)	<a href="http://www.codoncode.com/aligner/download.htm">http://www.codoncode.com/aligner/download.htm</a>
<i>Ensembl</i>	<a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a>
<i>Gene Runner</i> (Download)	<a href="http://www.generunner.net/">http://www.generunner.net/</a>
<i>ImageJ</i> 1.50i (Download)	<a href="https://imagej.nih.gov/ij/download.html">https://imagej.nih.gov/ij/download.html</a>
<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> (OMIM)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim</a>
<i>Primer 3</i>	<a href="http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/">http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/</a>

## 10. ANEXOS

**Tabela 1** – Mutações gene *FLNB* associadas à Síndrome de Larsen.

Tipo de Mutação	Troca de Nucleotídeo	Troca de AA	Referência
<i>Missense</i>	c. 482T>G	p.F161C	7
<i>Missense</i>	c.679G>A	p. E227K	7
Deleção	c.4711_4713delAAT	p. 1571delN	7
<i>Missense</i>	c.4756G>A	p. G1586R	7
<i>Missense</i>	c.5071G>A	p. G1691S	7
<i>Missense</i>	c. 479A>C	p. N160T	52
<i>Missense</i>	c.4604G>A	p.S1535N	52
<i>Missense</i>	c. 4640C>A	p.A1547D	52
<i>Missense</i>	c.4930G>T	p.G1644W	52
<i>Missense</i>	c.502G>A	p.G168S	46
<i>Missense</i>	c.700C>G	p.L234V	4
<i>Missense</i>	c.1081G>A	p.G361S	4
<i>Missense</i>	c.1088G>A	p.G363E	4
<i>Missense</i>	c.4292T>G	p.L1431R	4
<i>Missense</i>	c.4775T>A	p.V1592D	4
<i>Missense</i>	c.4808C>T	p.P1603L	4
<i>Missense</i>	c.5500G>A	p.G1834R	4

<i>Missense</i>	c. 508G>C	p.A170P	50
<i>Missense</i>	c.4927G>A	p.G1643S	9
<i>Missense</i>	c.5164G>A	p.G1722S	9
<i>Missense</i>	c.4876G>T	p.G1626W	9
<i>Missense</i>	c.4664G>A	p.G1555D	9
<i>Missense</i>	c.2055G>C	p.Q685H	9
<i>Missense</i>	c.5021C>T	p.A1674V	9

**Tabela 2-** Mutações no gene *CANT1*.

<b>Tipo de mutação</b>	<b>Troca nucleotídeo</b>	<b>Troca AA</b>	<b>Referência</b>
<i>Frameshift</i>	c.734delC	p.P245Rfs*3	14
<i>Missense</i>	c.898C>T	p.R300C	14
<i>Missense</i>	c.899G>A	p.R300H	14
<i>Frameshift</i>	c.907_911insGCGCC	p.S303Afs*X20	14
<i>Nonsense</i>	c.374G>A	p.W125X	14
<i>Missense</i>	c.896C>T	p.P299L	14
Deleção	del2793 pb	p.?	14
<i>Frameshift</i>	c.893_894insGCCGC	p.L299fs*325	53
<i>Missense</i>	c.676G>A	p.V226M	13
<i>Frameshift</i>	c.228_229insC	p.W77Lfs*13	54
<i>Missense</i>	c.671T>C	p.L224P	54
<i>Missense</i>	c.375G>C	p.W125C	54
<i>Nonsense</i>	c.861C>A	p.C287X	54
<i>Missense</i>	c.494T>C	p.M165T	54
<i>Missense</i>	c.1079C>A	p.A360D	54
<i>Splicing</i>	IVS2-9G>A	p.G279VfsX8	54
<i>Missense</i>	c.336C>A	p.D112E	55
<i>Frameshift</i>	c.277_278delCT	p.L93fsX89	55
<i>Missense</i>	c.1121T>A	p.Ile374Asn	33
<i>Frameshift</i>	c.100delinsTT	p.Ala34Phefs*56	33
<i>Frameshift</i>	c.358delC	p.Gln120Lysfs*10	33
<i>Frameshift</i>	c.531_532delCT	p.Tyr178Leufs*4	33

<i>Missense</i>	c.909C>G	p.Ser303Arg	33
<i>Splicing</i>	c.-342+1G>A	p.?	33
<i>Frameshift</i>	c.805delC	p.L269CfsX54	56
<i>Missense</i>	c.467C>T	p.Ser156Phe	57

**Tabela 3-** Mutações no gene *XYLT1* associadas á DBQDII.

<b>Tipo de Mutação</b>	<b>Troca de Nucleotídeo</b>	<b>Troca de AA</b>	<b>Referência</b>
<i>Missense</i>	c.1792C>T	p.R598C	15
<i>Missense</i>	c.439C>T	p.R147*	15
<i>Frameshift</i>	c.276dupG	p.P93Afs*69	15
<i>Splicing</i>	c.1588-3C>T	c.1588-3C>T	15
<i>Splicing</i>	c.1290-2A>C	c.1290-2A>C	15
<i>Missense</i>	c.1441C>T	p.R481W	47
Deleção	c.[1588-10_1595del]; [del 3.3 Mb*]	-	49
<i>Nonsense</i>	c.595C>T	p.Gln199X	58
<i>Missense</i>	c.1651C>T	p.Arg551Cys	Estudo presente; 58

**Tabela 4-** Mutações no gene *KIF22* associadas à SEMD-JL tipo leptodactílico.

<b>Tipo de Mutação</b>	<b>Localização</b>	<b>Troca de Nucleotídeo</b>	<b>Troca de AA</b>	<b>Referência</b>
<i>Missense</i>	Éxon 4	c.442C>T	p.Pro148Ser	19
<i>Missense</i>	Éxon 4	c.446G>A	p.Arg149Gln	19
<i>Missense</i>	Éxon 4	c.443C>T	p.Pro148Leu	19
<i>Missense</i>	Éxon 4	c.446G>T	p.Arg149Leu	20

**Tabela 5 -** Mutações no gene *B3GALT6* associadas á SEMD-JL tipo Beighton.

<b>Tipo de mutação</b>	<b>Troca do Nucleotídeo</b>	<b>Troca do AA</b>	<b>Referência</b>
<i>Missense</i>	c.1A>G	p.Met1Val	23
<i>Missense</i>	c.193A>G	p. Ser65Gly	3

<i>Missense</i>	c.200C>T	p. Pro67Leu	3
<i>Frameshift</i>	c.227delT	p.Ile76Thrfs*202	61
<i>Missense</i>	c.235A>G	p. Thr79Ala	59
<i>Missense</i>	c.466G>A	p. Asp156Asn	3
<i>Missense</i>	c.619G>C	p.Asp207His	60
<i>Missense</i>	c.649G>A	p.Gly217Ser	60
<i>Missense</i>	c.694C>T	p.Arg232Cys	3
<b>61</b>	c.766C>T	p.Arg256Trp	61
<i>Missense</i>	c.899G>C	p.Cys300Ser	3

**Tabela 6-** Mutações no gene *IMPAD1* associadas á Condrodisplasia com luxações tipo gPAPP.

<b>Tipo de mutação</b>	<b>Troca do Nucleotídeo</b>	<b>Troca do AA</b>	<b>Referência</b>
<i>Missense</i>	c.529G>A	p.Asp177Asn	31
<i>Missense</i>	c.547A>C	p.Thr183Pro	31
<i>Nonsense</i>	c.559C>T	p.Arg187X	33
<i>Frameshift</i>	c.324delC	p.Ser108Argfs*48	33

**Tabela 7 –** Mutações no *CHST3* associadas à SED tipo *CHST3*.

<b>Tipo de Mutação</b>	<b>Troca de Nucleotídeo</b>	<b>Troca de AA</b>	<b>Referência</b>
<i>Missense</i>	c.776T>C	p.L259P	24
<i>Missense</i>	c.664C>T	p.R222W	24
<i>Missense</i>	c.920T>C	p.L307P	24
<i>Frameshift</i>	c.1086delG	p.G363AfsX393	24
<i>Nonsense</i>	c.603C>A	p.Y201X	24
<i>Nonsense</i>	c.617-618TC>GA	p.F206X	24
<i>Splicing</i>	IVS2-1G>C	p.?	24
<i>Missense</i>	c.141G>C	p.R74S	24
<i>Missense</i>	c.1114G>A	p.E372K	24
<i>Missense</i>	c.425G>T	p.R142L	25

<i>Missense</i>	c.475T>A	p.F159I	25
<i>Missense</i>	c.481C>T	p.L161F	25
<i>Missense</i>	c.501C>A	p.H167Q	25
<i>Frameshift</i>	c.533_534insG	p.A179RfsX140	25
<i>Missense</i>	c.620T>G	p.I207S	25
<i>Missense</i>	c.661C>T	p.R221C	25
<i>Missense</i>	c.675C>A	p.S225R	25
<i>Nonsense</i>	c.718A>T	p.K240X	25
<i>Missense</i>	c.758G>A	p.G253D	25
<i>Missense</i>	c.791G>A	p.C264Y	25
<i>Missense</i>	c.928C>T	p.R310C	25
<i>Nonsense</i>	c.988C>T	p.Q330X	25
Indel	c.1083_1090del8insCGGCA	p.361-364WLRG>CGS	25
<i>Missense</i>	c.1148G>C	p.R383P	25
<i>Missense</i>	c.1285C>T	p.R429C	25
<i>Missense</i>	c.1063G>A	p.G355R	62
<i>Nonsense</i>	c.802G>T	p.E268X	63


**Tabela 8-** Predição das variantes inéditas encontradas nos pacientes da casuística.

Paciente	Gene	Mutação	<i>POLYPHEN2®</i>	<i>SNPs&amp;GO®</i>	<i>HOPE®</i>	<i>SIFT®</i>	<i>Panther®</i>	<i>Mutation Taster®</i>
1	<i>FLNB</i>	p.[G363V]	Provavelmente Deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria
2	<i>XYLT1</i>	p.[R551C]	Provavelmente Deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria
5	<i>KIF22</i>	p.[E222Q]	Provavelmente Deletéria	Neutra	Neutra	Neutra	Neutra	Deletéria
6	<i>B3GALT6</i>	p.[V61A]	Neutra	Neutra	Neutra	Neutra	Neutra	Deletéria
6	<i>B3GALT6</i>	p.[R197Afs*442]	Não analisa	Não analisa	Não analisa	Não analisa	Não analisa	Deletéria
8	<i>DTDST</i>	p.[T627Lfs*23]	Não analisa	Não analisa	Não analisa	Não analisa	Não analisa	Deletéria
11	<i>DTDST</i>	p.[G115A]	Provavelmente Deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria	Deletéria

**Quadro 1** - Algoritmos utilizados para a análise *in silico* das variantes.

<b>NOME DO ALGORITMO</b>	<b>ENDEREÇO ELETRÔNICO</b>
SIFT® ( <i>Sorting Intolerant from Tolerant</i> )	<a href="http://sift.jcvi.org/">http://sift.jcvi.org/</a>
Polyphen 2® ( <i>Polymorphism Phenotyping</i> )	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/</a>
SNPs&GO®	<a href="http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/">http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/</a>
Panther	<a href="http://www.pantherdb.org/">http://www.pantherdb.org/</a>
HOPE®	<a href="http://www.cmbi.ru.nl/hope/">http://www.cmbi.ru.nl/hope/</a>
Mutation Taster®	<a href="http://www.mutationtaster.org/">http://www.mutationtaster.org/</a>
<i>Fruitfly- Berkeley Drosophila Genome Project</i>	<a href="http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html">http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html</a>

**Anexo 1: Parecer do Comitê de ética em Pesquisa**

<div><div>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS</div><div></div></div>
<b>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b>

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Investigação das displasias esqueléticas associadas a luxações e outros problemas articulares a partir do sequenciamento de um painel de genes CHST3, KIF22, CANT1, DTDST, IMPAD, B3GALT6, XYLT1.

**Pesquisador:** CYNTHIA SILVEIRA

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 33110313.9.0000.5404

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 942.377

## Anexo 2: Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Faculdade de Ciências Médicas – Departamento de Genética Médica

### Folha de Informação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Projeto de investigação clínico-molecular sobre as displasias esqueléticas
--

#### **Pesquisador principal:**

Denise Pontes Cavalcanti

Departamento de Genética Médica FCM – UNICAMP, Campinas, SP

Tel/Fax: (19) 3521-0385

Email: [denisepc@unicamp.br](mailto:denisepc@unicamp.br)

[denisepcavalcanti@gmail.com](mailto:denisepcavalcanti@gmail.com)

#### **Pesquisador responsável pelo Projeto**

Cynthia Silveira

Departamento de Genética Médica FCM-UNICAMP, Campinas, SP

Tel: 019 3521-8902

Email: [cynthia.silveira@hotmail.com](mailto:cynthia.silveira@hotmail.com)

#### **INTRODUÇÃO / OBJETIVO DA PESQUISA:**

A pesquisa médica, em geral, ajuda no entendimento sobre as causas das doenças bem como na tentativa de encontrar terapias para melhorar a vida das pessoas afetadas. Nós estamos lhe convidando para participar desse estudo porque você ou algum membro de sua família tem problemas com seus ossos e/ou suas articulações. Acreditamos que a doença óssea na sua família pode ser causada por alteração de algum gene (pequeno erro na sua informação genética) relacionado com a formação/desenvolvimento do esqueleto.

O objetivo desta investigação é o de identificar a origem da displasia esquelética em questão e aprofundar no estudo dos mecanismos envolvidos com a mesma. As radiografias, fotos e amostras de sangue do paciente, bem como as informações médicas a respeito da família, poderão ser compartilhadas com outros pesquisadores que trabalham com displasias esqueléticas.

#### **PROCEDIMENTO:**

Concordando em participar deste estudo, os pesquisadores terão necessidade de obter alguns dados da história clínica e familiar do paciente, assim como haverá necessidade de dados do exame clínico, fotos clínicas e radiografias para o estabelecimento ou confirmação do diagnóstico clínico. O sangue para extração de DNA poderá ser coletado em qualquer momento e, normalmente a coleta é feita a partir de punção de uma veia periférica. Em várias situações DNA dos pais, e eventualmente de outros familiares, também será necessário para conclusão dos estudos. Normalmente se coleta de 4 a 10 ml de sangue (quantidade equivalente a uma ou duas colheres de sopa).

#### **RISCOS:**

A participação na presente pesquisa não acarreta riscos adicionais aos que eventualmente um paciente está exposto quando consulta um médico (ex: ser submetido a exames de raios X, coleta de sangue para exames de sangue). Com a coleta de sangue o paciente pode sentir um breve desconforto e o procedimento pode deixar uma pequena marca no local da punção. Esse procedimento dura uns poucos segundos.

#### **VANTAGENS / RESULTADOS:**

Os resultados desta pesquisa devem fornecer um maior conhecimento sobre a doença em questão, embora não seja esperado nenhum benefício direto além do resultado do(s) exame(s) realizado(s). A participação nesta pesquisa não deverá acarretar mudanças no atendimento médico nem no aconselhamento genético imediato. Os resultados da pesquisa serão fornecidos a você e à sua família pelo seu médico assistente ou pelos pesquisadores responsáveis e estarão também referidos no prontuário médico hospitalar.



Faculdade de Ciências Médicas – Departamento de Genética Médica

## **Folha de Informação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

Projeto de investigação clínico-molecular sobre as displasias esqueléticas

### **SIGILO:**

Todas as informações médicas, assim como os resultados dos exames e dos testes genéticos realizados nessa pesquisa, farão parte do prontuário médico e dos bancos de dados do projeto de displasias esqueléticas e serão submetidos aos regulamentos do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM-UNICAMP.

O sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos que possam advir dessa pesquisa por meio da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes. Os resultados ou informações fornecidos devem ser utilizados para fins de publicação científica, no entanto, nenhum nome será utilizado.

### **FORNECENDO INFORMAÇÃO ADICIONAL:**

A qualquer momento é possível obter informações adicionais relativas a presente pesquisa. A Dra. Denise P Cavalcanti e os seus colaboradores estarão disponíveis para responder às suas questões e/ou preocupações pelo Tel: (19) 3521-0385, Campinas, SP. Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação no estudo, relacionadas aos aspectos éticos da pesquisa você pode entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP): Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br.

### **RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:**

A sua participação, bem como dos seus familiares, na presente pesquisa é voluntária. Sendo assim, a qualquer momento você e/ou os seus familiares poderá(ão) se recusar a participar ou retirar o consentimento e interromper a participação na presente pesquisa sem comprometimento dos cuidados médicos que recebe(m) atualmente ou receberá(ão) no futuro. De forma semelhante, os pesquisadores responsáveis podem interromper a participação de qualquer indivíduo da família nessa pesquisa a qualquer momento em que julgarem apropriado.

### **COLETA, FUTURAS PESQUISAS E ARMAZENAMENTO DO MATERIAL GENÉTICO:**

O DNA, material genético obtido a partir de uma amostra de sangue [seu e/ou de outro(s) membro(s) de sua família] será(ão) usado(s) para esse estudo, se você concordar. Nenhum outro teste ou estudo poderá ser feito com as amostras de DNA, a menos que você concorde com isso. Você pode concordar com o uso da sua amostra de sangue apenas para esse estudo (opção 1 do termo de consentimento), ou também para outros estudos (opção 2 e 3). Você pode escolher ser consultado no futuro sobre sua permissão para uso de sua amostra em um outro estudo (opção 2) ou você pode dar sua permissão agora, sem ter que ser solicitado novamente (opção 3). Em qualquer caso, seu nome será conhecido apenas pelo investigador do estudo e ninguém mais. O que os médicos fazem em pesquisa médica deve sempre ser aceito pelo Comitê de Ética, um grupo de pessoas (médicos, advogados e outros) que assegurará que o estudo tenha um bom propósito e seja realizado para atender o interesse das pessoas doentes.

Você tem o direito de se retirar desse estudo a qualquer momento. Se você escolher se retirar, nenhum outro estudo será conduzido com sua amostra.

Se você concordar em participar desse estudo, sua amostra será armazenada no Laboratório de Genética Molecular do Depto. de Genética Médica, FCM, UNICAMP sob a responsabilidade do investigador principal. Essas amostras serão usadas exclusivamente para os propósitos científicos descritos aqui. Você pode requerer a destruição da amostra em qualquer momento. Uma cópia dessa folha de informação será fornecida a você.



Faculdade de Ciências Médicas – Departamento de Genética Médica

### Folha de Informação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Projeto de investigação clínico-molecular sobre as displasias esqueléticas

A assinatura do(s) item(ns) abaixo indica que você foi informado tanto oralmente como pela folha de Informação sobre a pesquisa mencionada acima. Dessa forma, você confirma que leu e entendeu o conteúdo da folha de Informação e que voluntariamente concorda em participar desse estudo. Você também entendeu que pode questionar qualquer coisa sobre a pesquisa ao seu médico e/ou ao pesquisador e que a informação que lhe foi fornecida permitiu-lhe tomar uma decisão livre e completamente informada sobre a sua participação nesse estudo. Você tem o direito de sair desse estudo em qualquer momento sem qualquer consequência para você. Uma cópia desse termo de consentimento será providenciada para você.

I. Escolhendo um dos itens abaixo você estará concordando, ou não, com a utilização do seu DNA e/ou o de seu(ua) filho(a) em outras pesquisas ou apenas na atual pesquisa. Em quaisquer das opções abaixo sua identidade será mantida confidencial (ASSINALE APENAS UM DOS ITENS ABAIXO):

- 1 ☐ Sua amostra de sangue e/ou de seu(ua) filho(a) pode ser usada apenas nesse projeto de pesquisa. Essas amostras não podem ser usadas em nenhum outro projeto. Você não quer ser contatado para outras permissões no futuro.
- 2 ☐ Sua amostra de sangue e/ou de seu(ua) filho(a) pode ser usada apenas nesse projeto, e, para outros projetos com sua permissão. Se essas amostras puderem ser usadas em um outro projeto, você quer ser contatado para que solicitem sua permissão. Uma nova aprovação do Comitê de Ética é necessária para usar sua amostra em um outro estudo.
- 3 ☐ Sua amostra de sangue e/ou de seu(ua) filho(a) pode ser usada para qualquer outro propósito científico envolvendo este ou qualquer outro projeto. Você não quer ser contatado para permissão. Uma nova aprovação do Comitê de Ética é necessária para que a sua amostra seja utilizada em um outro estudo.

II. Assinalando os itens abaixo você estará concordando, ou não, com a utilização de fotos clínicas.

- ☐ Utilização de fotos clínicas apenas para estudo
- ☐ Utilização de fotos clínicas para eventuais apresentações em publicações científicas

Nome:

Data de nascimento:

Assinatura:

Se o participante for menor de idade ou um adulto legalmente incapaz:

Assinatura do(s) pai(s) ou responsável legal:

Relação com o participante:

Local e data:

#### Médico que encaminha

A assinatura abaixo indica que o médico que encaminhou, forneceu uma explicação apropriada sobre a pesquisa, chamou atenção sobre as limitações assinaladas na folha de informação e respondeu as questões dos participantes.

Nome completo:

Assinatura:

Local e data:

Carimbo médico

#### Pesquisador principal:

Denise P Cavalcanti  
Departamento de Genética Médica  
FCM – UNICAMP R. Tessália V. De Camargo, 126  
13083-887 Campinas, S

Assinatura:

Local e data:

## RESEARCH LETTER

AMERICAN JOURNAL OF  
medical genetics PART ADesbuquois Dysplasia Type II in a Patient With a Homozygous Mutation in *XYLT1* and New Unusual FindingsCynthia Silveira,<sup>1</sup> Gabriela F. Leal,<sup>2</sup> and Denise P. Cavalcanti<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Skeletal Dysplasia Group, Department of Medical Genetic, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil<sup>2</sup>Professor Fernando Figueira Integral Medicine Institute (IMIP), Recife, Pernambuco, Brazil

Manuscript Received: 16 December 2015; Manuscript Accepted: 1 July 2016

## TO THE EDITOR:

Desbuquois dysplasia (DBQD) is an autosomal recessively inherited condition first described in 1966 in two sisters with a disproportionate short stature, joint laxity and dislocations, and disorganized ossification of the hands and feet [Desbuquois et al., 1966]. The condition is classified in the group of skeletal dysplasias with multiple joint dislocations [Bonafe et al., 2015].

DBQD is clinically characterized by prenatal and postnatal growth retardation, joint laxity, cleft palate, prominent eyes, and underdeveloped midface. The radiological findings include multiple joint dislocations, projection of the lesser trochanters producing a “Swedish key” or a “monkey wrench” appearance of the proximal femur, advanced carpal and tarsal bone age, a delta phalanx or bifid thumb, and phalangeal dislocations [Faivre et al., 2004]. The latter authors, revised 35 DBQD patients, and classified the patient in two subgroups according to the presence or absence of typical hand changes in: DBQD type I (MIM 251450), and DBQD type II (MIM 615777), respectively. Subsequently, another subtype of DBQD was suggested, characterized by accelerated carpal bone age, shortness of one or all metacarpal bones with elongated appearance of the phalanges but no accessory ossification center, which was suggested to be called DBQD Kim variant [Kim et al., 2010].

In 2009, mutations in *CANT1* (MIM 613165), were identified in ten children with DBQD-I [Huber et al., 2009]. Additional case reports showed mutations in *CANT1* also associated with the DBQD-II phenotype, and in patients presenting the Kim variant phenotype, suggesting a more variable phenotype [Faden et al., 2010; Furuichi et al., 2011; Laccone et al., 2011; Nizon et al., 2012; Inoue et al., 2014; Singh et al., 2015]. The DBQD-II phenotype has also been associated with mutations in *XYLT1* (MIM 608124) [Bui et al., 2014].

Here we report another patient presenting a phenotype compatible with DBQD-II in whom a homozygous mutation in *XYLT1* was identified.

This study was approved by the Committee of Ethics in Research of the Faculty of Medical Sciences of the State University of Campinas, and the informed consent was obtained from the family.

The patient is a girl born to healthy, consanguineous parents (F = 1/16), who had two other healthy daughters and a spontaneous

## How to Cite this Article:

Silveira C, Leal GF, Cavalcanti DP. 2016. Desbuquois dysplasia type II in a patient with a homozygous mutation in *XYLT1* and new unusual findings.

Am J Med Genet Part A 9999A:1–5.

first-trimester miscarriage (Supplemental information Fig. S1). At the 20th gestational week an ultrasound examination showed short limbs. The proband was delivered at term, by C-section, weighing 2,500 g (length and OFC were not recorded). A posterior cleft palate was noticed, and repaired at the age of 12 months. Length at 4 months and 24 months was 47.9 cm (−6.6 SD), and 61 cm (−7.9 SD), respectively. Skull circumferences at the same ages were 43 cm (95 centile) and of 48.5 cm (90 centile), respectively. Psychomotor development was delayed: she walked without support at the age of 30 months and, at the age of 11 years a mental impairment seemed evident, although this was not tested specifically. Audiological evaluation at the age of 10 years disclosed mild bilateral conductive hearing loss. Physical examination at 11.3 years showed round face with full cheeks, palpebral ptosis on the right, a long philtrum, velvet skin, brachydactyly, bilateral genu valgum, and flat feet with overlapping fifth toes (Fig. 1). She weighed 28 kg, height was 98.5 cm (−7.17 SD), and skull circumference was 52.5 cm (>98 centile). Her BMI was 28. Abdominal ultrasound did not show abnormalities.

Conflict of interest: none.

Grant sponsor: CNPq; Grant numbers: 402008/2010-3, 590148/2011-7; Grant sponsor: CAPES; Grant number: 33003017023p6; Grant sponsor: FAPESP; Grant number: 2015/22145-6.

\*Correspondence to:

Denise P. Cavalcanti, M.D., PhD, Skeletal Dysplasia Group, Department of Medical Genetics, UNICAMP, R. Tessália Vieira de Camargo, 126, Campinas, SP 13083-887, Brazil.

E-mail: denisepcavalcanti@gmail.com

Article first published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com): 00 Month 2016

DOI 10.1002/ajmg.a.37858



**FIG. 1.** View of the patient at the age of 9 years and 11 months (A and B), and radiographs at 6 months (C and D), and at 8 years and 9 months (E–H). (A) Note the obesity, round face with full cheek, and right-sided ptosis. (B) Bilateral genu valgum, and flat feet. (C) Mild monkey wrench appearance of the proximal femur, (D) Coronal cleft of thoracic and lumbar vertebral bodies. (E) More evident monkey wrench appearance of the proximal femur. Please, also note wide acetabulae and short femoral neck; (F) Normal spine; (G) Advanced carpal maturation and brachymetacarpia; (H) Patella dislocation. [Color figure can be seen in the online version of this article, available at <http://wileyonlinelibrary.com/journal/ajmga>].

Her karyotype was normal female (46,XX). Radiological evaluation of pelvis, lower limbs, and spine at 6 months of age showed broad acetabular roofs, a mild monkey wrench appearance of the proximal femur, short and stubby long bones, and coronal cleft of some thoracic and lumbar vertebral bodies. A skeletal survey at 8.9 years showed short long bones, advanced carpal maturation, brachymetacarpia, a more defined monkey wrench appearance of the proximal femur, broad acetabular roofs, short femoral neck, dislocation of the patella, and normal spine (Fig. 1).

DNA was extracted from peripheral blood sample of the proband and her parents, and *CANT1* and *XYLT1* were sequenced by the Sanger method. Results of the sequencing analyses were compared to the public databases (See Supplemental information).

No pathogenic mutation in *CANT1* was identified. In *XYLT1* a homozygous missense variation was detected in the proband: a C to T transition, at the 1651 nucleotide in the exon 8, causing a substitution of an arginine to a cysteine at the codon 551 (c.1651C > T; p.Arg551Cys). The parents were heterozygous for the same variation (Supplemental information Fig. S1). In silico analysis indicated the variation as damaging [PolyPhen 2, SNPs&GO, SIFT]. The variation was not identified in any of the 100 chromosomes from control individuals, and the variant was present heterozygously in the ExAC (Exome Aggregation Consortium) in one out of 120,396 alleles. We included this variation in the LOVD database (<http://databases.lovd.nl/shared/variants/0000084862#00022949>).

The arginine at the 551 position is a conserved amino acid through several species. This position is located in an important region for protein activity, suggesting this change might disrupt its

activity. In silico analysis suggested that the wild-type and the mutant amino acid differ in charge and hydrophobicity. While the wild-type is often positively charged, the mutant amino acid is neutral, suggesting a loss of interaction(s) with other molecule(s). In addition, the mutation is likely to introduce a more hydrophobic residue at position 551, which may result in loss of hydrogen bonds and/or disturbance of the correct folding.

*XYLT1* (NM\_022166.3) is mapped at the short arm of the chromosome 16 (16p12.3). It contains 12 exons that encode an enzymatic protein—xylosyltransferase 1 (XT-I), of 959 amino acids and has a type II transmembrane topology with a cytoplasmic tail connected to a transmembrane domain followed by a stem region and a catalytic domain [Götting et al., 2007]. The *XYLT1* protein is involved in proteoglycans (PGs) synthesis. Together with collagens and non-collagen proteins, they are the main components of ECM of connective tissues, which attract cations and bind water, enabling joints and tissues to absorb large pressure changes. In addition, they play an important role in the control of the cell growth and differentiation [Prydz and Dalen, 2000]. PGs are essential for normal tissue function, and changes in their abundance and/or structure can lead to embryonic consequences in cartilage formation, juvenile growth plate function, and adult articular function [Roughley, 2006]. A number of genetic disorders are caused by mutations in genes related to PGs (*B4GALT7*, *B3GALT6*, *B3GAT3*, *SLC26A2/DTDST*, *CHST3*, and *IMPAD1*), and demonstrate a skeletal dysplasia with an important articular involvement [Hastbacka et al., 1994; Okajima et al., 1999; Thiele et al., 2004; Baasanjav et al., 2011; Vissers et al., 2011; Mizumoto et al., 2013; Nakajima et al., 2013].

TABLE I. Clinical and Radiological Findings of Patients With Molecularly Proven the DBQD-II

Reference	Bui et al. [2014]						Schreml et al. [2014]		van Koningsbruggen et al. [2016]		Present report
Family	1	1	2	3	4	5	6	7	7	8	9
<b>Patient</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
Sex	F	M	F	M	NE	NE	NE	F	M	M	F
Consanguinity	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+
Clinical findings											
Long philtrum					+			+	+		+
Flat/round face	+	+		+	+	+	+				+
Prominent eyes	+	+		+		+					—
Blue sclerae				+	+	+					—
Cleft palate				+			+			+	+
Depressed nasal bridge				+				+	+	+	+
Short stature	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Joint laxity	+			+	+	+	+				—
Genu valgum			+	+				+	+		+
Obesity					Mild	+		+	—		+
Radiological features											
Joint dislocation	+	+	+		+	+	+				+
Monkey-wrench (Swedish key)	+	+	+	+		+	+	+	+	—	+
Advanced carpal/tarsal bone age	+	+		+	+	+	+				+
Short long bones	+			+				+	+	+	+
Others											
Intellectual disability	Mild	+	Mild	+	+	Mild	—	Mild	Mild		+

F, female; M, male; NE, not specified; +, presence of feature; —, absence of the feature.  
Radiological and clinical features not marked means that feature was not referred.

Table IS shows the known pathogenic mutations in *XYLT1* so far. They have been recognized in 11 patients of nine families. All families showed different mutations, except families 5 and 6, who showed the same mutation. There is no evidence for a hot spot for mutations in *XYLT1*.

Bui et al. [2014] studying two siblings through exome sequencing from a series of 21 patients with DBQD-II phenotype without *CANT1* mutation, detected homozygous mutations in *XYLT1*, and found other *XYLT1* mutations in five other patients (Table IS). No pathogenic mutations were found in the 14 remaining subjects. Mutations in *XYLT1* have been identified in two siblings from a consanguineous Turkish family by exome sequencing [Schreml et al., 2014]. Although, the phenotype of DBQD-II had not been discussed for these sibs, the clinical and radiological findings presented are compatible with DBQD-II phenotype. Lastly, a male infant with flat face and short limbs but without typical skeletal features was reported to have two *XYLT1* deletions [van Koningsbruggen et al., 2016]. One allele presented an intragenic deletion of the intron 7/exon 8 junction, and the other one showed a complete deletion on *XYLT1* which also included several other genes.

The clinical presentation of the present patient, i.e., short stature, truncal obesity, intellectual disability, flat face, cleft palate, genu valgum with subluxation of knees, plus short long bones, advanced

carpal/tarsal maturation, and the Swedish key appearance of the proximal femur fits well the DBQD type II phenotype. The short metacarpals in the present patient have not been reported in DBQD-II, but are known in the variant Kim [Kim et al., 2010], which adds to the increasing overlap between these subtypes. The present patient also presented a velvet skin and palpebral ptosis, suggesting either these are less frequent characteristics of DBQD type II, possibly specifically associated with the presently detected mutation, or co-occurrence by coincidence.

Features in Table I shows that the patients with molecularly proven DBQD-II mutation are short statured with intellectual disability and demonstrate: a flat and round face, prominent eyes, depressed nasal bridge, cleft palate, joint laxity, genu valgum, and obesity. The main radiological characteristics are the Swedish key appearance of the proximal femur, joint dislocations, advanced bone age in carpal and tarsal bones, and the short long bones.

In summary, we report a patient with the phenotype of DBQD-II, but with some unusual signs, and a mutation in *XYLT1* (c.1651C > T; p.Arg551Cys).

## WEB RESOURCES

The URLs from data presented here in are as follow:

Ensembl Genome Browser <http://www.ensembl.org/index.html>

TABLE I. Clinical and Radiological Findings of Patients With Molecularly Proven the DBQD-II

Reference	Bui et al. [2014]						Schreml et al. [2014]		van Koningsbruggen et al. [2016]		Present report
Family	1	1	2	3	4	5	6	7	7	8	9
<b>Patient</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
Sex	F	M	F	M	NE	NE	NE	F	M	M	F
Consanguinity	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+
Clinical findings											
Long philtrum					+			+	+		+
Flat/round face	+	+		+	+	+	+				+
Prominent eyes	+	+		+		+					—
Blue sclerae				+	+	+					—
Cleft palate				+			+			+	+
Depressed nasal bridge				+				+	+	+	+
Short stature	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Joint laxity	+			+	+	+	+				—
Genu valgum			+	+				+	+		+
Obesity					Mild	+		+	—		+
Radiological features											
Joint dislocation	+	+	+		+	+	+				+
Monkey-wrench (Swedish key)	+	+	+	+		+	+	+	+	—	+
Advanced carpal/tarsal bone age	+	+		+	+	+	+				+
Short long bones	+			+				+	+	+	+
Others											
Intellectual disability	Mild	+	Mild	+	+	Mild	—	Mild	Mild		+

F, female; M, male; NE, not specified; +, presence of feature; —, absence of the feature.  
Radiological and clinical features not marked means that feature was not referred.

Table IS shows the known pathogenic mutations in *XYLT1* so far. They have been recognized in 11 patients of nine families. All families showed different mutations, except families 5 and 6, who showed the same mutation. There is no evidence for a hot spot for mutations in *XYLT1*.

Bui et al. [2014] studying two siblings through exome sequencing from a series of 21 patients with DBQD-II phenotype without *CANT1* mutation, detected homozygous mutations in *XYLT1*, and found other *XYLT1* mutations in five other patients (Table IS). No pathogenic mutations were found in the 14 remaining subjects. Mutations in *XYLT1* have been identified in two siblings from a consanguineous Turkish family by exome sequencing [Schreml et al., 2014]. Although, the phenotype of DBQD-II had not been discussed for these sibs, the clinical and radiological findings presented are compatible with DBQD-II phenotype. Lastly, a male infant with flat face and short limbs but without typical skeletal features was reported to have two *XYLT1* deletions [van Koningsbruggen et al., 2016]. One allele presented an intragenic deletion of the intron 7/exon 8 junction, and the other one showed a complete deletion on *XYLT1* which also included several other genes.

The clinical presentation of the present patient, i.e., short stature, truncal obesity, intellectual disability, flat face, cleft palate, genu valgum with subluxation of knees, plus short long bones, advanced

carpal/tarsal maturation, and the Swedish key appearance of the proximal femur fits well the DBQD type II phenotype. The short metacarpals in the present patient have not been reported in DBQD-II, but are known in the variant Kim [Kim et al., 2010], which adds to the increasing overlap between these subtypes. The present patient also presented a velvet skin and palpebral ptosis, suggesting either these are less frequent characteristics of DBQD type II, possibly specifically associated with the presently detected mutation, or co-occurrence by coincidence.

Features in Table I shows that the patients with molecularly proven DBQD-II mutation are short statured with intellectual disability and demonstrate: a flat and round face, prominent eyes, depressed nasal bridge, cleft palate, joint laxity, genu valgum, and obesity. The main radiological characteristics are the Swedish key appearance of the proximal femur, joint dislocations, advanced bone age in carpal and tarsal bones, and the short long bones.

In summary, we report a patient with the phenotype of DBQD-II, but with some unusual signs, and a mutation in *XYLT1* (c.1651C > T; p.Arg551Cys).

## WEB RESOURCES

The URLs from data presented here in are as follow:

Ensembl Genome Browser <http://www.ensembl.org/index.html>

ExAC (Exome Aggregation Consortium) <http://exac.broadinstitute.org/>

Have yOur Protein Explained (HOPE) <http://www.cmbi.ru.nl/hope/>

LOVD <http://www.lovd.nl/3.0/home>

Polyphen-2 <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>

SIFT <http://sift.jcvi.org/>

SNPs&GO <http://snps.biofold.org/snps-and-go/snps-and-go.html>

## NOTE ADDED IN PROOF

While the present manuscript was under review, another manuscript (Jamsheer et al., J Hum Genet 2016 Mar 31), reported a Polish patient presenting with severe short stature, GH and IGF-1 deficiency, joint laxity, psychomotor retardation, advanced bone age, exaggerated trochanters and short metacarpals, in whom compound heterozygous *XYLT1* mutations (p.Gln199\* + p.Arg551Cys) were detected by exome sequencing.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the patient's family. We also would like to thank the members of the CoSMO-B, a skeletal dysplasias discussion list, for the discussion of the patient.

## REFERENCES

- Baasanjav S, Al-Gazali L, Hashiguchi T, Mizumoto S, Fischer B, Horn D, Seelow D, Ali BR, Aziz SA, Langer R, Saleh AA, Becker C, Nürnberg G, Cantagrel V, Gleeson JG, Gomez D, Michel J-B, Stricker S, Lindner TH, Nürnberg P, Sugahara K, Mundlos S, Hoffmann K. 2011. Faulty initiation of proteoglycan synthesis causes cardiac and joint defects. *Am J Hum Genet* 89:15–27.
- Bonafé L, Cormier-Daire V, Hall C, Lachman R, Mortier G, Mundlos S, Nishimura G, Sangiorgi L, Savarirayan R, Silencio D, Spranger J, Superti-Furga A, Warman M, Unger S. 2015. Nosology and classification of genetic skeldisorders: 2015 revision. *Am J Med Genet Part A* 167A: 2869–2892.
- Bui C, Huber C, Tuysuz B, Alanay Y, Bole-Feysot C, Leroy JG, Mortier G, Nitschke P, Munnich A, Cormier-Daire V. 2014. *XYLT1* mutations in Desbuquois dysplasia type 2. *Am J Hum Genet* 94:405–414.
- Desbuquois G, Grener B, Michel J, Rosslgnol C. 1966. Chondrodystrophique avec ossification anarchique et poiy-malformabons chez deux soeurs. *Arch Fr Pediatr* 23:573–687.
- Faden M, Al-Zahrani F, Arafah D, Alkuray FS. 2010. Mutation of *CANT1* causes Desbuquois dysplasia. *Am J Med Genet* 152A:1157–1160.
- Faivre L, Cormier-Daire V, Elliott AM, Field F, Munnich A, Maroteaux P, Le Merrer M, Lachman R. 2004. Desbuquois dysplasia, a reevaluation with abnormal and 'normal' hands: Radiographic manifestations. *Am J Med Genet* 124A:48–53.
- Furuichi T, Dai J, Cho TJ, Sakazume S, Ikema M, Matsui Y, Baynam G, Nagai T, Miyake N, Matsumoto N, Ohashi H, Unger S, Superti-Furga A, Kim O-H, Nishimura G, Ikegawa S. 2011. *CANT1* mutation is also responsible for Desbuquois dysplasia, type 2 and Kim variant. *J Med Genet* 48:32–37.
- Götting C, Kuhn J, Kleesiek K. 2007. Human xylosyltransferases in health and disease. *Cell Mol Life Sci* 64:1498–1517.
- Hastbacka J, de la Chapelle A, Mahtani MM, Clines G, Reeve-Daly MP, Daly M, Hamilton BA, Kusumi K, Trivedi B, Weaver A, Coloma A, Lovett M, Buckler A, Kaitila I, Lander ES. 1994. The diastrophic dysplasia gene encodes a novel sulfate transporter: Positional cloning by fine-structure linkage disequilibrium mapping. *Cell* 78:1073–1087.
- Huber C, Oulès B, Bertoli M, Chami M, Fradin M, Alanay Y, Al-Gazali LI, Aulsems MGEM, Bitoun P, Cavalcanti DP, Krebs A, Le Merrer M, Mortier G, Shafeghati Y, Superti-Furga A, Robertson SP, Le Goff C, Muda AO, Paterlini-Bréchet P, Munnich A, Cormier-Daire V. 2009. Identification of *CANT1* mutations in Desbuquois dysplasia. *Am J Hum Genet* 85:706–710.
- Inoue S, Ishii A, Shirohata G, Tsutsumi M, Ohta E, Nakamura M, Mori T, Inoue T, Nishimura G, Ogawa A, Hirose S. 2014. Case of Desbuquois dysplasia type 1: Potentially lethal skeldisplasia. *Pediatr Int* 56: e26–e29.
- Kim O-H, Nishimura G, Song H-R, Matsui Y, Sakazume S, Yamada M, Narumi Y, Alanay Y, Unger S, Cho T-J, Park SS, Ikegawa S, Meinecke P, Superti-Furga A. 2010. A variant of Desbuquois dysplasia characterized by advanced carpal bone age, short metacarpals, and elongated phalanges: Report of seven cases. *Am J Med Genet Part A* 152A: 875–885.
- Laccone F, Schoner K, Krabichler B, Kluge B, Schwerdtfeger R, Schulze B, Zschocke J, Rehder H. 2011. Desbuquois dysplasia type I and hydrops due to novel mutations in the *CANT1* gene. *Eur J Hum Genet* 19: 1133–1137.
- Mizumoto S, Ikegawa S, Sugahara K. 2013. Human genetic disorders caused by mutations in genes encoding biosynthetic enzymes for sulfated glycosaminoglycans. *J Biol Chem* 288:10953–10961.
- Nakajima M, Mizumoto S, Miyake N, Kogawa R, Iida A, Ito H, Kitoh H, Hirayama A, Mitsubuchi H, Miyazaki O, Kosaki R, Horikawa R, Lai A, Mendoza-Londono, Dupuis L, Chitayat D, Howard A, Leal GF, Cavalcanti D, Tsurusaki Y, Saito H, Watanabe S, Lausch E, Unger S, Bonafé L, Ohashi H, Superti-Furga A, Matsumoto N, Sugahara K, Nishimura G, Shiro Ikegawa S. 2013. Mutations in *B3GALT6*, which encodes a glycosaminoglycan linker region enzyme, cause a spectrum of skeland connective tissue disorders. *Am J Hum Genet* 92:927–934.
- Nizon M, Huber C, De Leonardis F, Merrina R, Forlino A, Fradin M, Tuysuz B, Abu-Libdeh BY, Alanay Y, Albrecht B, Al-Gazali LI, Basaran SY, Clayton-Smith J, Désir J, Gill H, Grealis MT, Koparir E, van Maarle MC, MacKay S, Mortier G, Morton J, Silencio D, Vilain C, Young I, Zerres K, Le Merrer M, Munnich A, Le Goff C, Rossi A, Cormier-Daire V. 2012. Further delineation of *CANT1* phenotypic spectrum and demonstration of its role in proteoglycan synthesis. *Hum Mutat* 33:1261–1266.
- Okajima T, Fukumoto S, Furukawa K, Urano T. 1999. Molecular basis for the progeroid variant of Ehlers-Danlos syndrome. Identification and characterization of two mutations in galactosyltransferase I gene. *J Biol Chem* 274:28841–28844.
- Prydz K, Dalen KT. 2000. Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci* 113:193–205.
- Roughley PJ. 2006. The structure and functions of cartilage proteoglycans. *Eur Cell Mater* 12:92–101.
- Schreml J, Durmaz B, Cogulu O, Keupp K, Beleggia F, Pohl E, Milz E, Coker M, Ucar SK, Nürnberg G, Nürnberg P, Kuhn J, Ozkinay F. 2014. The missing 'link': An autosomal recessive short stature syndrome caused by a hypofunctional *XYLT1* mutation. *Hum Genet* 133:29–39.
- Singh A, Kim OH, Iida A, Park WY, Ikegawa S, Kapoor S. 2015. A novel *CANT1* mutation in three Indian patients with Desbuquois dysplasia Kim type. *Eur J Med Genet* 58:105–110.

Thiele H, Sakano M, Kitagawa H, Sugahara K, Rajab A, Hohne W, Ritter H, Leschik G, Nurnberg P, Mundlos S. 2004. Loss of chondroitin 6-O-sulfotransferase-1 function results in severe human chondrodysplasia with progressive spinal involvement. *Proc Nat Acad Sci* 101:10155–10160.

van Koningsbruggen S, Knoester H, Bakx R, Mook O, Knecht L, Cobben JM. 2016. Complete and partial *XYLT1* deletion in a patient with neonatal short limb skeldysplasia. *Am J Med Genet Part A* 170:510–514.

Vissers LE, Lausch E, Unger S, Campos-Xavier AB, Gilissen C, Rossi A, Del Rosario M, Venselaar H, Knoll U, Nampoothiri S, Nair M, Spranger J,

Brunner HG, Bonafe L, Veltman JA, Zabel B, Superti-Furga A. 2011. Chondrodysplasia and abnormal joint development associated with mutations in *IMPAD1*, encoding the golgi-resident nucleotide phosphatase, gPAPP. *Am J Hum Genet* 88:608–615.

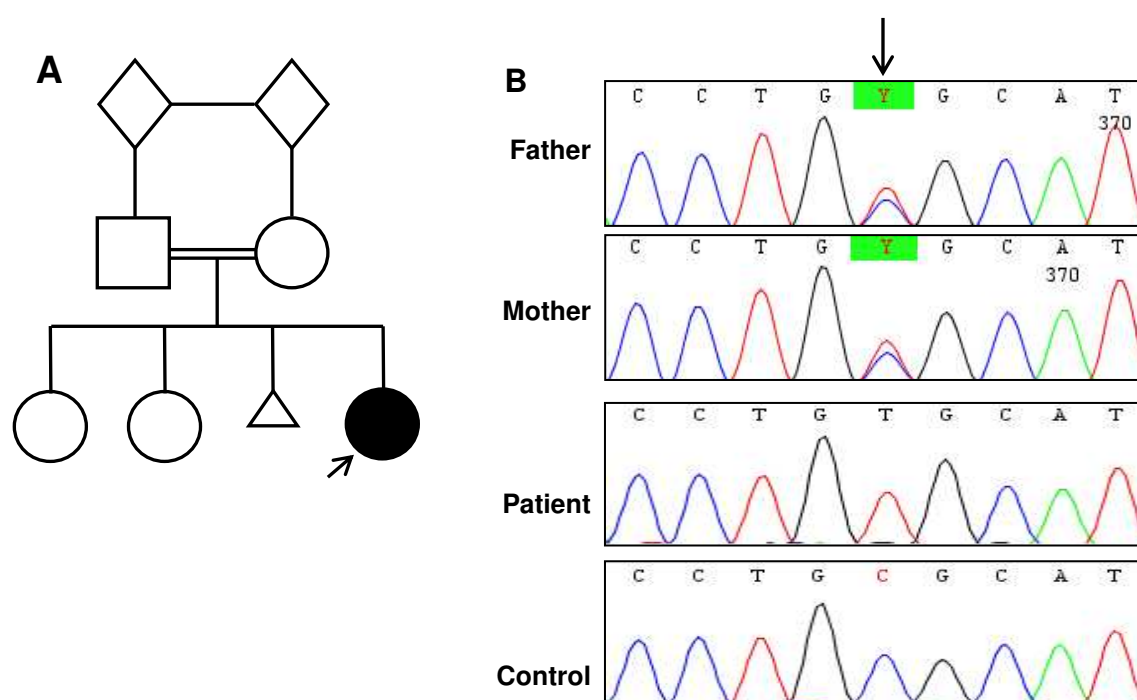
## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

## Supplemental information

### Sequencing methods and analyses

Both genes - *CANT1* and *XYLT1*, were sequenced by the Sanger method. The coding exons with the intron-exon boundaries of *CANT1* and *XYLT1* were amplified with specific primers by polymerase chain reaction (PCR). Although no coding, the exon 1 of the *CANT1* was also amplified because pathogenic mutations were identified in this region [Huber et al., 2009; Nizon et al., 2012]. The amplified products were purified by treatment with the enzyme ExoProStar/illustra™, and then submitted to the bidirectional Sanger sequencing with the BigDye® Terminator Cycle Sequencing Standard Version 3.1. It was used the automatic sequencer ABI 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The analyses were performed with the CodonCode Aligner software version 6.0, and the results of the sequencing analyses were compared to the databases dbSNP, Exome Variant Server, Ensembl, ExAC and the Human Gene Mutation Database.



**FIG. S1.** This figure shows (A) the family pedigree of the reported family, and (B) the partial electropherograms of the exon 8 illustrating the segregation of the mutation c.1651C>T in the parents and in the proband and a wild type control. Black arrow indicates the nucleotide which the mutation has occurred.

**TABLE IS. The Mutations in the *XYLT1* gene in Families Reported Thus far.**

Family	Mutation	Location	Domain	Reference
1	c.1792C>T [p.R598C]	Exon 9	Catalytic	Bui <i>et al.</i> , 2014
2	c.439C>T [p.R147X]	Exon 3	Stem region	Bui <i>et al.</i> , 2014
3	c.276dupG [p.P93AfsX69]	Exon 1	Stem region	Bui <i>et al.</i> , 2014
4	c.1588-3C>T	donor splice site ex8	intron	Bui <i>et al.</i> , 2014
5	c.1290-2A>C	donor splice site ex6	intron	Bui <i>et al.</i> , 2014
6	c.1290-2A>C	donor splice site ex6	intron	Bui <i>et al.</i> , 2014
7	c.1441C>T [p.R481W]	Exon 7	Catalytic	Schreml <i>et al.</i> , 2014
8	c.1588-10_1595del + del 3.3	donor splice site ex8	intron	Van Koningsbruggen <i>et al.</i> , 2015
9	c.1651C>T [p.R551C]	Exon 8	Catalytic	Present report

\*del 3.3 Mb = this deletion involves seven genes (*KIAA0430*, *NDE1*, *MYH11*, *ABCC1*, *ABCC6*, *NOMO3* and *NOMO2*), besides the *XYLT1*.

## 11. APÊNDICES

**Apêndice 1:** Protocolo de extração de DNA pelo método Fenol-Clorofórmio adaptado de Sambrook & Russel<sup>42</sup>.

A extração do DNA genômico realizada a partir das amostras de sangue periférico coletadas dos pacientes e familiares, foi feita utilizando o protocolo manual de extração com fenol clorofórmio descrito a seguir:

1 – Coletar aproximadamente 4mL de sangue venoso de cada paciente em tubos para coleta à vácuo (EDTA).

2 – Centrifugar as amostras por 10 minutos a 2500 rpm e transferir a fase intermediária, contendo os leucócitos, para um tubo cônico de 15mL de propileno.

3 – Adicionar as soluções de RSB 1x, até completar o volume de 11mL, e 60µl de Nonidet R, homogeneizar no agitador durante 10 minutos, centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos e descartar o sobrenadante.

4 – Adicionar 3mL de solução SDS 10%, 0,5mL de RSB 1x, 80µl de proteinase K (100mg/mL) e incubar as amostras a 37° por 24h.

5 – Após a incubação, acrescentar 3mL de fenol, seguido por homogeneização durante 10 minutos e centrifugação por mais 10 minutos a 2500 rpm.

6 – Descartar a fração inferior do tubo. Repetir o processo com 1,5mL de fenol e 1,5mL de solução de clorofórmio:álcool isoamílico. Descartar novamente a fração inferior do tubo e, acrescentar 3mL de solução de clorofórmio:álcool isoamílico, seguido de homogeneização e centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos. 7 – Precipitar o DNA com 6mL de etanol absoluto e armazenar em tubos cônicos de 1,5mL com aproximadamente 200µl de TE 1x.

**Apêndice 2:** Quadro com as sequências nucleotídicas de cada primer.

PRIMERS	SEQUÊNCIA	TEMPERATURA (°C)	PROTOCOLO
FLNB EX7F FLNB EX7F	CTAAAGGTGTGATGTCCCAG AGAGAGGTCCACACCAAGATG	58	Master Mix Quiagen®
CANT1 EX 1 F CANT1 EX 1 R	ACAAACCACAGCTCCCAGCAG CTAGTCCCAGGGATGAGGTGT	64	Padrão Taq
CANT1 EX 2A F CANT1 EX 2A R	GAGTAAGAATGGCCACAGAG CATCCACGGAGTAGAGTTTC	52,8	Padrão Taq
CANT1 EX 2B F CANT1 EX 2B R	ATCGCAGTTATCGCAGAC GTGACAGTAGGCTATGCTCC	57	Padrão Taq
CANT1 EX 3 F CANT1 EX 3 R	CACTGAACCTTCAGGAGCTG GGGTGACAGAGCAAGACTATG	58,8	Padrão Taq
CANT1 EX 4 F CANT1 EX 4 R	GATAACCGAGAACACAGAACC TGAGTCCTGATGGCCTTG	59,1	Padrão Taq
XYLT1 EX 1 F XYLT1 EX 1 R	TGTCTGTCTTCTCTGATCGCC GATGTGGAGTCGGTAGGCTTG	64	Taq Q- Solution
XYLT1 EX 2 F XYLT1 EX 2 R	GCAGTGAGTGAGCTATGATCATG CACACCCACACCATTGCAC	56,7	Padrão Taq
XYLT1 EX 3 F XYLT1 EX 3 R	GACTCACTCTTCAAAGGCCAG GAAGGTCTGAGAAGGTGAGC	56,7	Padrão Taq
XYLT1 EX 4 F XYLT1 EX 4 R	GTGTCCATGTGTCTCTTCCAG CTAGCAATGCAGAAGGAGGG	54,1	Padrão Taq
XYLT1 EX 5 F XYLT1 EX 5 R	CTCAGAAAGTGCCCAACCAG CCTTCTGCCTCGTGAGTTC	55,4	Padrão Taq
XYLT1 EX 6 F XYLT1 EX 6 R	CAGCCTGTGTGCAAATGATC CTCAACCTTTCTGTGGCTG	56,7	Padrão Taq
XYLT1 EX 7 F XYLT1 EX 7 R	GGGTAAATACGGTGACATGC GAGGACAATGTAGGTGGACC	56,7	Padrão Taq
XYLT1 EX 8 F XYLT1 EX 8 R	CGCTCTGAGTTGGACCAC GGTCTGGCCTTGGATTTCTG	55,4	Padrão Taq
XYLT1 EX 9 F XYLT1 EX 9 R	GCTTTGCTTCTAACCACAGG GAGGGTGGCGTTAGATGAG	52,8	Padrão Taq

XYLT1 EX 10 F XYLT1 EX 10 R	GCACCAGAGGACTCAATATC GGCACAGGGTTAGCTTATC	57,9	Padrão Taq
XYLT1 EX 11 F XYLT1 EX 11 R	CTTGAGCAGGTGACTTAGTTGG CTACCAACACCAAAGACCCTC	59,5	Padrão Taq
XYLT1 EX 12 F XYLT1 EX 12 R	CCAGGCACAGGGTAAGTATG CTGCTGACCTTCCCTTTCC	59,5	Padrão Taq
KIF22 EX 1 F KIF22 EX 1 R	CTTCCAGACATCAACGGCTGC CTTCTCGTCCTCGTGGCTAGA	62	Padrão Taq
KIF22 EX 2 F KIF22 EX 2 R	CTATACACCTGCTGCACTTGCT ACCTCTCATCTCTCCCTACAGT	62	Padrão Taq
KIF22 EX 3,4 F KIF22 EX 3,4 R	GAGATGAGGATGGAGTAGGTG GAGTTGTACCATCTGCTACCC	60	Padrão Taq
KIF22 EX 5 F KIF22 EX 5 R	GAGGAGCAACAAAGGGTCAAAG TGCAATAGGCGAGTGAGCTTG	60	Padrão Taq
KIF22 EX 6 F KIF22 EX 6 R	CATGCTGTGCTCCTGGTCAAG GGACCTGGCAGCAAAGTTGAG	62	Padrão Taq
KIF22 EX 7,8 F KIF22 EX 7,8 R	GTGGTAGATGCGCTGAATCA GGAGAGGAACAAGATCACAGC	62	Padrão Taq
KIF22 EX 9 F KIF22 EX 9 R	GTGTTGCGCTGATTCCTG CTTCTCACCTCACATCTGG	58	Padrão Taq
KIF22 EX 10 F KIF22 EX 10 R	CCTGTCTCCTGGTAACCTCC GACTGGTATGTGGTGGGAGA	60	Padrão Taq
KIF22 EX 11 F KIF22 EX 11 R	GGATGGACAAACGAGTAGAGG CTGCCTTCCACCCTAAATGCC	64,2	Padrão Taq
KIF22 EX 12,13,14 F KIF22 EX 12,13,14 R	GACAAGAGAGGAAGAGGCTGG AAGATGGCGCCCAGTGGAGT	58	Padrão Taq
B3GALT6 EX 1A F B3GALT6 EX 1A R	CGCTCCGAGGTTGACCATG AGAGCCGTCCTCGCTGTG	64	Taq Q-Solution
B3GALT6 EX 1B F B3GALT6 EX 1B R	TGATCCGCAGCACGTGGCTT GTCTCCCAAACGCAGACCG	64	Taq Q-Solution
CHST3 EX 2 F CHST3 EX 2 R	ACATCCTCTGCATTCCTCG TGCAGGTCCACAGAGAGC	57,9	Taq para CHST3
CHST3 EX 3A F	GCCTCACTTCCCCATCCAGTAC CAGGTCTTATACTTGCCGG	55,4	Taq Q-Solution

<i>CHST3</i> EX 3A R			
<i>CHST3</i> EX 3B F <i>CHST3</i> EX 3B R	GAGCAGAGAAAGGAGGAGG CAGGTCTTATACTTGCCGG	52,8	Taq para <i>CHST3</i>
<i>CHST3</i> EX 3C F <i>CHST3</i> EX 3C R	GAAGTACCACTGCAAGAACC CACTTCTCGAACTGCTCC	50,8	Taq para <i>CHST3</i>
<i>CHST3</i> EX 3D F <i>CHST3</i> EX 3D R	CTACATGCTGGTGCGCTAC TTCTCCGCAATTAACCCTG	59,5	Taq para <i>CHST3</i>
<i>SLC26A2/DTDST</i> íntron 1F <i>SLC26A2/DTDST</i> íntron1R	GAGTTATTGGCTGGTGGTAG GGGAAATAACCTGACGCAC	59,9	Master Mix Quiagen®
<i>SLC26A2/DTDST</i> EX 2A F <i>SLC26A2/DTDST</i> EX 2A R	CCCTAACCAAGACAAATGAG TCAAGCCTGACATCACATC	54,1	Padrão Taq
<i>SLC26A2/DTDST</i> EX 2B F <i>SLC26A2/DTDST</i> EX 2B R	CAGTGCAGTCCAGCCAAAG GTGGAGTCAGGTTAGGGTTTG	56,7	Padrão Taq
<i>SLC26A2/DTDST</i> EX 3A F <i>SLC26A2/DTDST</i> EX 3A R	CAAAGTTCCTGTCTCACCTG GGCTAATGTGGCTGCTAC	56,7	Padrão Taq
<i>SLC26A2/DTDST</i> EX 3B F <i>SLC26A2/DTDST</i> EX 3B R	CTTCCTCGGACTAATGGTG CTTAGCAGTGCAGAGGACAG	56,7	Padrão Taq
<i>SLC26A2/DTDST</i> EX 3C F <i>SLC26A2/DTDST</i> EX 3C R	CCTGGTTCTTTTGTGGTC CTTCTTTTCAGTGTGTGGATC	56,7	Padrão Taq
<i>SLC26A2/DTDST</i> EX 3D F <i>SLC26A2/DTDST</i> EX 3D R	CAGGCATCAAGATTTTCC GCCATTAGCTTCAAAGGAG	56,7	Padrão Taq
<i>IMPAD1</i> EX 1 F <i>IMPAD1</i> EX 1 R	GTAGGCTAACGTGGAAGTCG GAAGCTCCACATCCCATACTG	64	Taq Q- Solution
<i>IMPAD1</i> EX 2 F <i>IMPAD1</i> EX 2 R	TTGGGTGATTGTTGTCTGAAATAC TTCTGGTTCTCTACTACTAAACGT	62	Taq Q- Solution
<i>IMPAD1</i> EX 3 F <i>IMPAD1</i> EX 3 R	GACTCTGTTTGCTTGAAGGG CTAGGCTCCAGAACTGTCAG	54,1	Padrão Taq
<i>IMPAD1</i> EX 4 F <i>IMPAD1</i> EX 4 R	GCATGGGAATCCTTAAGC CACTCCTCCTCACTTTCTC	56,7	Padrão Taq
<i>IMPAD1</i> EX 5 F <i>IMPAD1</i> EX 5 R	CTGCACACTCCATCCTGCTATT CATGCATAGTCTCCACCAATCC	54	Padrão Taq

EX = éxon; in = íntron; F = *forward*, R = *reverse*

**Apêndice 3:** Protocolos utilizados para a padronização dos *primers* na PCR.

**Protocolo Padrão Taq**

Reagente	Volume(μl)
H <sub>2</sub> O	6,30
Tampão (NH <sub>4</sub> ou KCl)	1,00
MgCl <sup>2</sup>	0,60
dNTP	0,64
Primer <i>Foward</i>	0,20
Primer Reverse	0,20
Taq Polimerase	0,06
DNA (50ng/μl)	1,00
<b>Volume final</b>	<b>10,00</b>

**Protocolo Taq com DMSO**

Reagente	Volume(μl)
H <sub>2</sub> O	5,84
Tampão (NH <sub>4</sub> ou KCl)	1,00
MgCl <sup>2</sup>	0,60
dNTP	0,20
DMSO	0,50
Primer <i>Foward</i>	0,40
Primer Reverse	0,40
Taq Polimerase	0,06
DNA (50ng/μl)	1,00
<b>Volume final</b>	<b>10,00</b>

**Protocolo Taq com Q-Solution**

<b>Reagente</b>	<b>Volume(μl)</b>
H <sub>2</sub> O	2,85
Q-Solution	2,00
Buffer 10x	1,00
dNTP	1,00
<i>Primer Foward</i>	1,0
<i>Primer Reverse</i>	1,0
Taq Polimerase	0,15
DNA (50ng/μl)	1,00
<b>Volume final</b>	<b>10,00</b>

**Protocolo Taq para *CHST3***

<b>Reagente</b>	<b>Volume(μl)</b>
H <sub>2</sub> O	5,84
Tampão (NH <sub>4</sub> ou KCl)	1,00
MgCl <sup>2</sup>	0,60
dNTP	0,20
DMSO	0,50
<i>Primer Foward</i>	0,40
<i>Primer Reverse</i>	0,40
Taq Polimerase	0,06
DNA (50ng/μl)	1,00
<b>Volume final</b>	<b>10,00</b>

**Protocolo com Master Mix Quiagen®**

<b>Reagente</b>	<b>Volume(μl)</b>
H <sub>2</sub> O	2,88
Master Mix	4,00
<i>Primer Foward</i>	0,24
<i>Primer Reverse</i>	0,24
DNA (50ng/μl)	0,64
<b>Volume final</b>	<b>8,00</b>