

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

CYNTHIA SILVEIRA

Sequenciamento de Nova Geração na investigação molecular das Displasias Esqueléticas associadas a um comprometimento articular *major*.

> CAMPINAS 2021

CYNTHIA SILVEIRA

Sequenciamento de Nova Geração na investigação molecular das Displasias Esqueléticas associadas a um comprometimento articular *major*.

> Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de doutora em Ciências, na área de concentração de Genética Médica.

ORIENTADOR: DENISE PONTES CAVALCANTI

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

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Si39s	Silveira, Cynthia, 1989- Sequenciamento de nova geração na investigação molecular das displasias esqueléticas associadas a um comprometimento articular <i>major</i> / Cynthia Silveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.
	Orientador: Denise Pontes Cavalcanti. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.
	 Displasias esqueléticas. 2. Articulações. 3. Luxação. 4. Sequenciamento de nova geração. I. Cavalcanti, Denise Pontes, 1957 II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Molecular investigation of skeletal dysplasias associated with major joint impairment using Next-generation sequencing Palavras-chave em inglês: Skeletal dysplasias Joints Joint dislocations Next-generation sequencing Área de concentração: Genética Médica Titulação: Doutora em Ciências Banca examinadora: Denise Pontes Cavalcanti [Orientador] Carmen Silvia Bertuzzo Cristiane de Souza Rocha Nara Lygia de Macena Sobreira Maria Teresa Vieira Sanseverino Data de defesa: 30-06-2021 Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a) - ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0002-9034-1217 - Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/1109993208964021

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

CYNTHIA SILVEIRA

ORIENTADOR: DENISE PONTES CAVALCANTI

MEMBROS TITULARES:

1. PROFA. DRA. DENISE PONTES CAVALCANTI

2. PROFA. DRA. CARMEN SILVIA BERTUZZO

3. PROFA. DRA. CRISTIANE DE SOUZA ROCHA

4. PROFA. DRA. NARA LYGIA DE MACENA SOBREIRA

5. PROFA. DRA. MARIA TERESA VIEIRA SANSEVERINO

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 encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 30/06/2021

AGRADECIMENTOS

À minha família, amigas e amigos que caminharam junto comigo ao longo desses anos.

À Profa. Dra. Denise Pontes Cavalcanti, pela orientação e contribuição à minha formação.

Ao Grupo de Displasias Esqueléticas do Departamento de Medicina Translacional da Faculdade de Ciências Médicas, pelo trabalho em conjunto e pelas discussões.

Aos funcionários, pesquisadores e alunos do Laboratório de Genética Molecular da Faculdade de Ciências Médicas, pelas trocas e ensinamentos.

Aos membros da banca, pelas sugestões e comentários apresentados na defesa da tese.

Aos pacientes e familiares, pelo consentimento em participar da pesquisa possibilitando a realização desse projeto.

Aos médicos externos à Unicamp: Juan Llerena (Luisa Lorena, Sheila Taboti) Mauricio T Sakata, Pricila Bernardi, Mireille Gomes, Erlane Marques Ribeiro,

Isabella Monlleó, Cecilia Barbosa Oliveira Buck e Hector Yuri Wanderley, pela colaboração com a avaliação e envio dos casos.

Aos colaboradores Benilton de Sá Carvalho e Carlos Ferreira, pelo auxílio na investigação dos casos.

Às agências de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) processo nº 590148/2011-7 e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2015/22145-6 e 1998/16006-6, pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

RESUMO

As displasias esqueléticas (DE) ou osteocondrodisplasias (OCD) com comprometimento articular major compreendem atualmente um grupo de 29 condições, em sua maioria de herança autossômica recessiva, e estão relacionadas a 23 genes, a maioria deles relacionados a via dos Proteoglicanos – PGs. Embora algumas dessas condições tenham um fenótipo típico, no seu conjunto são de difícil diagnóstico devido à sobreposição fenotípica e à heterogeneidade genética, e, vários fenótipos ainda não tem suas bases moleculares bem definidas. Dada a dificuldade diagnóstica desse grupo de OCD, o presente estudo teve como objetivo definir as bases moleculares de um grupo de pacientes utilizando técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS) e permitindo um refinamento da correlação fenótipo-genótipo. Foi realizada uma investigação molecular em uma coorte de 14 pacientes por meio de NGS com painel de genes customizado (Painel-NGS), bem como utilizando o exoma (Whole Exome Sequencing – WES). O sequenciamento Sanger (SS) também foi utilizado para alguns pacientes específicos, bem como para confirmação das variantes obtidas por NGS e para estudo de segregação. Os 14 pacientes foram classificados clinicamente como típicos (7) e não-típicos (7), sendo os típicos: Acondrogênese 1B (ACG-1B) [1], Atelosteogênese 2 (AO-2) [1], Displasia Diastrófica (DD) [1], Displasia de Desbuguois (DBQD) [1], Diplasia Espôndilo Epi-Metafisária com Frouxidão Ligamentar (SEMD-JL) tipo Leptodactílico [2] e tipo Beighton [1]. Todos esses pacientes foram confirmados pela investigação molecular. Entre os pacientes não típicos, foi possível definir ou propor um diagnóstico molecular em quatro pacientes. Estes foram associados aos seguintes genes DTDST/SLC26A2 (fenótipo intermediário), IMPAD1, SLC39A8 (CDG com aparência de DBQD) e KYNU (fenótipo tipo Catel-Manzke-like). A taxa geral de resultados positivos foi de 78,5% (11/14), a positividade entre os fenótipos atípicos foi de 57,14% (4/7). O presente estudo, portanto, mostrou uma alta taxa de positividade, esta justificada pela seleção prévia dos pacientes baseada no diagnóstico clínicoradiológico. Além disso permitiu inferir outra mutação que não as previamente reconhecidas como hot-spots para o fenótipo SEMD-JL tipo Leptodactílico (c.664G>C / p.Glu222Gln), e mostrou dois novos genes - SLC39A8 e KYNU, associados a fenótipos classificados entre as OCD com comprometimento articular major.

Palavras-chaves: Displasias esqueléticas; Articulações; Luxação; Sequenciamento de nova geração.

ABSTRACT

Skeletal dysplasias (SD) or osteochondrodysplasias (OCD) with major joint involvement comprise a group of 29 conditions, most with autosomal recessive inheritance and related to 23 genes that are involved in the synthesis of Proteoglycans – PGs. Some conditions are characterized by a typical and welldefined phenotype, while others have atypical phenotypes that are difficult to diagnose due to the characteristics of phenotypic overlap, and genetic heterogeneity. Furthermore, some conditions still have unknown molecular bases. Considering the difficulty in diagnosing this OCD group, the aim of the present study was to perform a molecular investigation in a group of patients using next-generation sequencing techniques (NGS) to better understand the genotype-phenotype correlation. A cohort of 14 patients was investigated by a customized gene panel (Targeted-NGS) and exome (Whole Exome Sequencing - WES). Sanger sequencing (SS) was performed for some specific patients and also in the following situations - for validation of variants found by the NGS and for segregation analyses. The 14 patients were clinically classified as typical (7) and atypical (7), the following being typical: Achondogenesis 1B (ACG-1B) [1], Atelosteogenesis 2 (AO-2) [1], Diastrophic Dysplasia (DD) [1], Desbuquois dysplasia (DBQD) [1], Spondilo Epi-Metaphyseal Dysplasia with Joint Laxity Leptodactylic type (SEMD-JL) [2] and Beighton type [1]. The investigation confirmed the molecular basis in all of these patients. Considering the atypical patients, it was possible to define or propose a molecular diagnosis in four patients with mutations associated with the following genes: DTDST/SLC26A2 (intermediated phenotype), IMPAD1, SLC39A8 (CDG-with DBQD appearance), and KYNU (Catel-Manzke-like phenotype). The overall positivity rate was 78.5% (11/14), being 57.14% (4/7) in the atypical phenotypes. The high rate of positivity in the current study is justified by the previous selection based on the clinical-radiological diagnosis. In addition, the results allowed inferring another mutation rather than those recognized as a hotspot for the SEMD-JL Leptodactylic type (c.664G>C / p.Glu222Gln), and also present two novel genes SLC39A8 and KYNU related to phenotypes of this group, i.e., OCD with major joint involvement.

Keywords: Skeletal dysplasias; Joints; Joint dislocations; Next-generation sequencing

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Genes associados ao grupo OCD com comprometimento articular (OCD- lux), listados de acordo com os grupos segundo a última revisão da nosologia (1)16
Figura 1 Representação esquemática do resumo da biossíntese dos proteoglicanos (PGs) incluindo os principais genes relacionados ao grupo OCD-lux abordados nesse estudo (Adpatado de Chen et al., 2018; Ritelli et al., 2019; Ehmke et al., 2020 – criado com BioRender.com)
Figura 2 Estratégia de estudo dos pacientes da casuística
Quadro 1 Pacientes da casuística, sua origem quanto a seleção, seus respectivos diagnósticos iniciais e as abordagens da investigação
Quadro 2 Resultado da investigação molecular dos pacientes da casuística com as variantes identificadas, seus diagnósticos finais e segregação quando disponível38
Quadro 3 Predição in silico das variantes inéditas e classificação ACMG
Quadro 4 Genes com variantes identificadas no paciente RFOCD165. Em destaque os genes em que as variantes apresentaram baixa frequência populacional, ausência de homozigotos e scores de patogenicidade41
Quadro 5 Genes com variantes identificadas no paciente RF3717. Em destaque os genes que apresentaram as variantes homozigose no propósito segregando de forma AR43
Quadro 6 Genes com variantes identificadas no paciente RFOCD197 pós filtros, em destaque os genes inicias que apresentaram as variantes homozigose no propósito. 45
Quadro 7 Genes com variantes identificadas no paciente RFOCD118 pós filtros. Em destaque os genes em que as variantes apresentaram baixa frequência populacional, ausência de homozigotos e scores de patogenicidade45
Quadro 8 Genes com variantes identificadas no paciente RFOCD121. Em destaque os genes em que as variantes apresentaram baixa frequência populacional, ausência de homozigotos e scores de patogenicidade46

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACG-1B	Acondrogênese tipo 1B
ACMG	Colégio Americano de Genética Médica
AD	Autossômico dominante
AO-2	Atelosteogênese tipo 2
AR	Autossômico recessivo
В	Variante benigna (<i>benign</i>)
BC	Cobertura insuficiente (bad coverage)
BWA	Burrows-wheeler aligner
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CDG	Doenças Congênitas da Glicosilação
CGH	Hibridização Genômica Comparativa por microarranjo
Csg	Consanguinidade
DBQD	Displasia de Desbuquois
dbSNP	Single nucleotide polymorphism database
DD	Displasia diastrófica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EX	Exac (Exome Aggregation Consortium)
gAD	Gnomad (Genome Aggregation Database)
GAGs	Glicosaminoglicanos
GalT-I/II	Galactosiltransferase tipo I e tipo II
GIcAT-I	Glucuronosiltransferase I
gPAPP	3'-fosfoadenosina 5'-fosfato presente no Golgi
HD	Hipótese diagnóstica
HGMD	Human gene mutation database
HGVS	Human genome variation society
HMZ	Homozigoto
HTZ	Heterozigoto
IGV	Integrative genomics viewer
PP	Variante provavelmente patogênica
PossP	Variante possivelmente patogênica
MAF	Frequência do alelo menor (<i>Minor Allele Frequency</i>)
NAD+	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
ND	Não disponível
NGS	Sequenciamento de última geração (Next Generation Sequencing)
OCD	Osteocondrodisplasia
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
	Osteogenese Imperfeita
Р.	Variante patogênica (<i>Pathogenic</i>)
pb	Pares de bases

PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polimerase Chain Reaction)
PF	Sequências passing filter
PGs	Proteoglicanos
PH	Padrão de herança
rMED	Displasia múltipla epifisária recessiva
RF	Registro familiar
RFOCD	Registro de famílias com osteocondrodisplasias
SEMD	Displasia espôndilo meta epifisária
SEMD-JL	Displasia Espôndilo-Epi-Metafisiária com frouxidão ligamentar Tipo
Beighton	Beighton
SEMD-JL	Displasia Espôndilo-Epi-Metafisiária com frouxidão ligamentar tipo
	3; EXULOB Displacia Espândila Eni Matafisiária som frauvidão lizementar Tina
JLLepto	Leptodactílico ou tipo Hall
SHH	Sonic hedgehog
SIFT	Sorting intolerant from tolerant
SS	Sequenciamento de Sanger
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
ТМ	Temperatura anelamento (Temperature Melting)
UDP	Uridina difosfato
UMP	Uridina monofosfato
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
VUS	Variante de significado incerto
WES	Sequenciamento completo do exoma (Whole Exome Sequencing)
Wt	Alelo selvagem (<i>wild type</i>)

SUMÁRIO

1.	INTRO	DUÇÃO	14			
	1.1.	Revisão da literatura	14			
	1.2. Proteog	Bases moleculares das OCD com comprometimento articular <i>major</i> e	∍os 17			
2.	OBJET	IVOS	23			
	2.1.	Objetivo Geral	23			
	2.2.	Objetivos Específicos	23			
3.	CASUÍS	STICA E MÉTODOS	24			
	3.1.	Aspectos Éticos	24			
	3.2.	Casuística	24			
	3.3.	Métodos laboratoriais	24			
	3.3.1.	Extração de DNA e preparo das amostras	25			
	3.3.2.	Técnicas de Sequenciamento	25			
	3.3.2.1.	Sequenciamento bidirecional de Sanger (SS)	25			
	3.3.2.2.	Painel de genes customizado (Painel-NGS)	28			
	3.3.2.3. Sequenciamento completo do Exoma (<i>Whole Exome Sequencing</i> – WES) 29					
	3.3.3.	Metodologia de Array	29			
	3.4.	Estratégia de Estudo	30			
	3.5.	Processamento pós sequenciamento e softwares	31			
	3.6.	Análises e interpretação das variantes	32			
4.	RESUL	TADOS	34			
	4.1.	Abordagem utilizada e rendimento diagnóstico	35			
	4.2.	Resultados moleculares gerais	36			
	4.2.1.	Resultados por grupo de pacientes ou individuais	40			
	4.2.1.1.	OCDs do espectro DTDST/SLC26A2	40			
	4.2.1.2.	Displasia de <i>Desbuquois</i> (DBQD-1)	40			
	4.2.1.3. Lepto)	Displasia Espôndilo Epi Metafisária Tipo Leptodactílico (SEMD–JL 40				
	4.2.1.4. Beighto	Displasia Espôndilo Epi Metafisária Tipo Beighton (SEMD-JL n) 41				
	4.2.2.	Outros fenótipos	42			
	4.2.2.1.	OCD-IMPAD1 related (Paciente RFOCD246)	42			
	4.2.2.2.	CDG com aparência de DBQD (Paciente RF3717)	43			
	4.2.2.3.	OCD- <i>KYNU</i> (Paciente RFOCD197)	44			

	4.2.3.	Resultados negativos ou inconclusivos4	5
	4.2.3.1.	OCD-lux (Paciente RFOCD118)4	5
	4.2.3.2.	OCD-lux (Paciente RFOCD121)4	6
	4.2.3.3.	OCD-lux (Paciente RFOCD204)4	6
5.	DISCUS	SSÃO GERAL4	8
6.	CONCL	.USÕES5	1
7.	REFER	ÊNCIAS5	2
8.	APÊND	ICES5	9
	8.1. NGS	Apêndice 1 Tabela - Resumo das métricas de cobertura do Painel- 5	9
	8.2.	Apêndice 2 Tabela - Resumo das métricas de cobertura do WES6	0
	8.3. por WE	Apêndice 3 Caracterização e classificação das variantes identificadas S após filtros6	1
	8.4. das vari	Apêndice 4 Descrição dos critérios ACMG presente nas classificações antes6	4
	8.5. respect	Apêndice 5 Variantes no gene <i>SLC39A8</i> descritas na literatura e seus ivos fenótipos	5
	8.6. SLC264 review o	Apêndice 6 Artigo - Another intermediate phenotype associated with A2/DTDST among a cohort of twelve patients, and a comprehensive of the genotype-phenotype correlation6	6
9.	ANEXO	9S9	6
	9.1. 17 gene	Lista dos 85 genes presentes no painel Target-NGS, em destaque os es de interesse para o estudo9	6
	9.2.	Parecer do Comitê de Ética9	7
	9.3.	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)10	1
	9.4.	Equipe do Projeto de Pesquisa Cadastrada na Plataforma Brasil10	4

1. INTRODUÇÃO

As displasias esqueléticas ou osteocondrodisplasias (OCD) correspondem a um grupo de doenças genéticas raras relacionadas ao desenvolvimento do tecido ósseo e cartilaginoso provocando, em geral, alterações esqueléticas progressivas e baixa estatura.

As OCD, juntamente com outras condições genéticas com comprometimento esquelético importante, vêm sendo classificadas na nosologia e classificação das desordens genéticas esqueléticas de acordo com os aspectos clínicos-radiológicos e bases moleculares. Na última revisão, 92% do conjunto dessas condições possuem bases moleculares definidas associadas a 437 genes (1).

Entre as OCD, um grupo de condições com comprometimento importante das articulações, especialmente luxações articulares (OCD-lux), tem se destacado nos últimos anos, sobretudo por sua heterogeneidade clínico-radiológica que encontra em muitos casos bases moleculares interligadas pela via dos proteoglicanos.

O diagnóstico dessas condições costuma ser baseado na tríade de avaliação - achados clínicos, radiológicos e moleculares. Esta última, na quase totalidade das vezes, utilizando o sequenciamento gênico que pode ser realizado por meio do sequenciamento clássico de Sanger (SS) ou com o uso de tecnologias moleculares de larga escala conhecidas como Sequenciamento de Nova Geração (NGS, *Next Generation Sequencing*) e, em alguns casos, com a complementação da investigação com o uso de técnicas citogenômicas como array CGH (2,3).

Esse trabalho foi desenhado para avaliar uma coorte de indivíduos com OCD-lux identificando suas bases moleculares e avaliando ambos, rendimento das técnicas empregadas e a abordagem escolhida para o diagnóstico.

1.1. Revisão da literatura

Um grupo heterogêneo entre as OCDs, as aqui denominadas OCD-lux, apresenta comprometimento importante das articulações, seja com luxação ou com frouxidão ligamentar, associado a um comprometimento esquelético variável incluindo diversas combinações das três regiões mais comumente envolvidas nas OCD, coluna, epífises e metáfises. Outros achados observados nos pacientes desse grupo e compartilhados por alguns pacientes com fenótipos distintos são: centros extra de ossificação, braquidactilia, avanço de maturação carpal ou carpotarsal, e manifestações extra-esqueléticas como dismorfismos faciais, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e, mais raramente cardiopatias e/ou outra malformações internas (1).

No passado, quando as OCD eram classificadas predominantemente com base no critério radiológico, reconhecia-se como fenótipos hoje classificados no grupo OCD-lux apenas por três condições - a Síndrome de Larsen (fenótipo clássico reconhecido desde 1950), Síndrome de Desbuquois e um fenótipo classificado na época como Displasia espondilo-epi-metafisiária com frouxidão ligamentar (SEMD-JL) (4). A síndrome de Larsen, fenótipo mais conhecido na época caracteriza-se pelo acometimento das grandes articulações com luxações congênitas de joelhos/e ou quadril, alterações na coluna e na ossificação carpal além de polegares espatulados e dismorfismos faciais (5).

Atualmente 29 condições distintas são consideradas nesse grupo denominado OCD-lux e aparecem listadas na tabela 1 (1). Até o momento, 23 genes estão relacionados a esses fenótipos que, na última revisão da nosologia de condições genéticas que envolvem o esqueleto, encontram-se dispersas nos seguintes grupos: DE com luxações múltiplas (grupo 20), Filaminas (grupo 7), Distúrbios Sulfatação 4), Braquidactilias da (grupo com manifestação extraesquelética (grupo 38), OI e diminuição da densidade óssea (grupo 35) e mais recentemente Disostoses com predominância vertebral com ou sem envolvimento costal (grupo 35). Além desses fenótipos, uma possível associação entre o gene NIN (OMIM 608684) e a displasia espôndilo-epi-metafisária leptodactilico com frouxidão ligamentar também tem sido discutida (tabela 1) (1,6).

15

Grupo	Condição (OMIM #)	PH	Gene (OMIM#)
7	Síndome Larsen (OMIM # 150250)	AD	<i>FLNB</i> (603381)
	Displasia de Desbuquois tipo 1 (DBQD1 - OMIM # 251450), tipo 2 (DBQD2 - OMIM # 615777) e Kim Variante (OMIM # 251450) (braquimetacarpia) Displasia Pseudodiastrófica (OMIM # 264180)	AR	<i>CANT1</i> (613165)*
	Displasia de Desbuquois tipo 2 (DBQD2 - OMIM # 615777)	AR	XYLT1 (608124)*
	Displasia espôndilo-epi-metafisiária com frouxidão ligamentar tipo leptodactílico ou tipo Hall (SEMD-JL tipo Hall – OMIM # 603546)	AD	<i>KIF</i> 22 (603213)
	Displasia espôndilo-epi-metafisiária com frouxidão ligamentar tipo Beighton (SEMD-JL tipo Beighton – OMIM # 271640)	AR	B3GALT6 (615291)*
	Displasia espôndilo-epi-metafisiária com frouxidão ligamentar tipo 3; EXOC6B (SEMD-JL tipo EXOC6B – OMIM # 618395)	AR	<i>EXOC6B</i> (607880)
20	OCD leve com frouxidão ligamentar e avanço de idade óssea (<i>Desbuquois-like)</i> (OMIM # 618870)	AR	CSGALNACT1 (616615)*
	Deficiência B3GAT3 (OMIM # 245600 Luxações múltiplas, baixa estatura, dismorfismos faciais com ou sem defeitos cardíacos congênitos - Larsen- <i>like</i>),	AR	B3GAT3 (606374)*
	Displasia Pseudodiastrófica (OMIM # 264180)		
	Baixa estatura com frouxidão ligamentar e miopia (OMIM # 617662 Larsen- <i>like</i>)	AR	<i>GZF1</i> (613842)
	Luxações Múltiplas com amelogênese imperfeita (OMIM # 618363)		<i>SLC10A7</i> (611459)*
	Displasia de membro curto neonatal (letal) com luxações múltiplas Desbuquois-like	AR	FAM20B (611063)*
	Ehlers-Danlos tipo cifoescoliótico 1 (OMIM # 225400)	AR	PLOD1 (153454) FKBP14
	Ehlers-Danlos tipo cifoescoliótico 2 (OMIM # 614557)	AR	(614505)
	Acondrogênese 1B (ACG-1B – OMIM # 600972), Atelosteogênse 2 (AO-2 – OMIM # 256050), Displasia Diastrófica (DD – OMIM # 222600), Displasia Enifisária Múltinla Recessiva (rMED – OMIM #226900)		SLC26A2/DTDST (606718)*
Д	Condrodisplasia com luxações articulares, tipo gPAPP (síndrome Catel- Manzke- <i>like – OMIM # 614078</i>)	AR	IMPAD1/BPNT2 (614010)*
т	Displasia espôndilo-epifisária com múltiplas luxações congênitas (OMIM # 143095)	AR	CHST3 (603799)*
	Ehlers–Danlos músculo contracturado 1 (OMIM # 601776)	AR	CHST14 (608429)*
	Ehlers–Danlos músculo contracturado 2 (OMIM # 615539)	AR	DSE (605942)*
38	Braquidactilia tipo Temtamy (OMIM # 605282)	AR	CHSY1 (608183)*
	Síndrome Catel–Manzke (OMIM # 616145)	AR	TGDS (616146)*
25	Ehlers-Danlos espondilodisplásico (OMIM # 130070)	AR	B4GAL17 (604327)*

Tabela 1 - Genes associados ao grupo OCD com comprometimento articular (OCD-lux), listados de acordo com os grupos segundo a última revisão da nosologia (1).

35	Deficiência de NAD ⁺ com efeitos vertebrais, cardíacos, renais e de membros						
00	(OMIM # 617661)	AR	KYNU (605197)*				
	Displasia espôndilo-epi-metafisiária com frouxidão ligamentar tipo						
-	leptodactílico-like	AR	NIN (608684)				
Observação: Os grupos acima se referem aos grupos da Nosologia atual (1). Grupo 7: Filamina, Grupo 20: OCDs							
com luxações articulares múltiplas, Grupo 4: Distúrbios da sulfatação, Grupo 38: Braquidactilias com							
manifestações extra-esqueléticas, Grupo 25: OI e diminuição densidade óssea, Grupo 35: Disostoses com							
predomi	redominância vertebral com ou sem envolmimento costal : ausente na nosologia; * genes presentes nas vias						
do meta	lo metabolismo de proteoglicanos. PH: padrão de herança; AD: autossômico dominante; AR autossômico						

recessivo

1.2. Bases moleculares das OCD com comprometimento articular *major* e os Proteoglicanos.

A maioria dos fenótipos agrupados nesse grupo denominado OCD-lux está relacionada a genes com funções importantes na via dos proteoglicanos (PG) seja na formação do tetrassacarídeo de ligação: XYLT1 (OMIM # 608124), FAM20B (OMIM # 611063), B4GALT7 (OMIM # 604327), B3GALT6 (OMIM # 615291), sulfatação B3GAT3 (OMIM # 606374), síntese das cadeias ou de glicosaminoglicanos (GAGs): CSGALNACT1 (OMIM # 616615), CHST3 (OMIM # 603799), CHST14 (OMIM # 608429), CHSY1 (OMIM # 608183), DSE (OMIM # 605942), SLC26A2/DTDST (OMIM # 606718), IMPAD1/BPNT2 (OMIM # 614010) ou hidrólise de produtos finais ou produção de cofatores como os genes CANT1 (OMIM # 613165), TGDS (OMIM # 616146), SLC10A7 (OMIM # 611459) e mais recentemente o KYNU (OMIM # 605197) (7,8) (Figura 1).

Alguns fenótipos particulares (Síndome Larsen e SEMD-JL tipo Hall) não estão associados a genes da via dos PG e sim a genes estruturais - *FLNB* (OMIM # 603381) que codifica uma proteína presente no citoesqueleto e o *KIF22* (OMIM # 603213). Diferentemente dos fenótipos associados a genes da via dos PG que tem padrão de herança AR, estes dois acima apresentam padrão de herança AD (9–11).

Entre os demais genes associados aos fenótipos OCD-lux, os genes *EXOC6B* (OMIM # 607880) e *NIN* (OMIM # 608684), embora ainda não tenham uma função claramente definida, a ambos têm sido sugerido uma relação no processo de ciliogênese (6,12). Os três genes restantes relacionados às OCD-lux, mas não associados a via dos PG são o *PLOD1* (OMIM # 153454) e o *FKBP14* (OMIM #614505), ambos relacionados à Síndrome de Ehlers-Danlos tipo cifoescoliótico tipo 1 e tipo 2 respectivamente. O gene *PLOD1* é responsável por codificar uma enzima

lisil hidroxilase na hélice do colágeno e o *FKBP14* atua no dobramento atuando como chaperona para o colágeno dos tipos III, VI e X, já o gene *GZF1* (OMIM #613842) relacionado a baixa estatura com frouxidão ligamentar e miopia - Larsenlike, codifica uma proteína reguladora de transcrição, porém ainda sem mecanismos conhecidos relacionados diretamente a condição associada (13–15).

O gene KIF22 é membro família de proteínas "motores moleculares dependentes de microtúbulos" que movimentam os cromossomos durante a divisão celular com implicação no transporte intracelular e/ou mecanismos de transporte associados aos cílios. Variantes nesse gene são responsáveis pela SEMD-JL tipo Hall (OMIM 603546). Embora o gene seja composto por 14 exons, até o momento a correlação genótipo-fenótipo descrita na literatura mostra 41 pacientes com variantes envolvendo apenas os aminoácidos 148 (p.Pro148Ser e p.Pro148Leu) e 149 (p.Arg149Gln e p.Arg149Leu) no éxon 4, localizado no domínio motor da proteína (10,11,16). O fenótipo produzido por essas variantes é típico, com características marcantes como o aspecto delgado dos ossos da mão (metacarpos e falanges), atraso de maturação óssea importante, aspecto característico do colo femoral, luxação com frouxidão ligamentar, hipoplasia de face média e baixa estaura (17). Há relatos de pacientes com fenótipo típico, porém sem variantes patogênicas no KIF22, no entanto, variantes em outros dois genes: EXOC6B (Displasia espôndiloepi-metafisiária com frouxidão ligamentar tipo EXOC6B - SEMD-JL tipo EXOC6B), e no gene NIN (OMIM 608684) em uma família consanguínea com uma forma de displasia espôndilo-epi-metafisária leptodactilico com frouxidão ligamentar, foram relatados em pacientes com fenótipo típico àquele observado nos pacientes com mutações no KIF22 (6,12).

As formas sobrepostas de SEMD-JL Leptodactílico-*like* representadas pelos genes *EXOC6B* (OMIM # 607880) e *NIN* (OMIM # 608684) têm sido relacionadas a partir de suas funções, visto que o primeiro é um componente do complexo exocisto necessário para a ciliogênese e o segundo uma proteína centrossomal importante também nesse processo. Assim, tem sido sugerido que a disfunção de *KIF22*, *EXOC6B*, e *NIN* afeta negativamente a ciliogênese levando ao quadro semelhante (6,12).

Com relação aos principais genes da figura 1, pode-se resumir a via dos PG e a relação dos principais genes relacionados com as OCD-lux como descrito a seguir. A biossíntese dos GAGs se inicia com a formação de uma região de ligação (*linker region*) composta por tetrassacarídeos ligados à uma proteína central (resíduo de serina) envolvendo a ação de glicosiltransferases específicas. O início se dá com a transferência de um resíduo de xilose por xilosiltransferases (XyIT-I/II codificadas por *XYLT1* e *XYLT2*, respectivamente), seguida pela sua fosforilação através do gene *FAM20B*, e pela adição de dois resíduos de galactose por galactosiltransferase tipo I (GaIT-I codificado por *B4GALT7*) e tipo II (GaIT-II codificado por *B3GALT6*). A região do ligador se completa pela transferência de ácido glucurônico catalisado pela glucuronosiltransferase I (GIcAT-I codificado por *B3GAT3*). A identificação de variantes patogênicas nos genes que codificam as enzimas-chave na síntese da região de ligação originou a classificação dessas condições como linkeropatias (do inglês, *linkeropathies*) (18).

Figura 1 Representação esquemática do resumo da biossíntese dos proteoglicanos (PGs) incluindo os principais genes relacionados ao grupo OCD-lux abordados nesse estudo (Adpatado de Chen et al., 2018; Ritelli et al., 2019; Ehmke et al., 2020 – criado com BioRender.com)



O gene XYLT1 iniciador do tetrassacerídeo de ligação está relacionado a DBQD-2 (OMIM 615777), condição relacionada a um espectro clínico, no qual se reconhece também DBQD-1 (OMIM 251450) e a chamada DBQD-variante Kim (OMIM 251450), essas últimas associadas a variantes patogênicas no gene *CANT1*

(2,19–21). O principal achado radiológico nesses pacientes é a projeção maior do trocanter menor do fêmur produzindo um aspecto que lembra a chave Sueca ou *monkey wrench/Swedish key*. Além disso, a classificação desses fenótipos também se baseia na presença (DBQD-1) ou ausência (DBQD-2) de anomalias esqueléticas nas mãos, incluindo centro de ossificação extra distal ao segundo metacarpo, enquanto que a DBQD-variante Kim (OMIM 251450) apresenta braquimetacarpia com falanges alongadas (20).

O gene *CANT1* codifica a nucleotidase 1 ativada por cálcio, hidrolisa a uridina difosfato (UDP) em uridina monofosfato (UMP), assim removida para o citoplasma através de um transportador. Essa etapa, bem como a remoção é fundamental pois a sua presença inibe as glicosiltransferases (22). Recentemente duas condições similares ao espectro DBQD chamadas de Desbuquois-*like* foram descritas associadas aos genes *CSGALNACT1* e *FAM20B*, ambos participantes dessa região de ligação e, portanto, associados ao grupo das likeropatias (23,24). Mais recentemete a Displasia Pseudodiastrófica (OMIM 264180), foi relacionada aos genes *CANT1* e *B3GAT3* (25).

Seguindo a formação do tetrassacarídeo têm-se a atuação de galactosiltransferases tipo I e II codificadas pelos genes *B4GALT7* e *B3GALT6* se completando pela glucuronosiltransferase I codificado por *B3GAT3*. Variantes patogênicas no gene *B4GALT7* têm sido associadas à Síndrome Ehlers-Danlos tipo espondilodisplásico (OMIM # 130070) e a um tipo Síndrome de Larsen pertencente a uma região geográfica específica com o fenótipo se sobrepondo entre Larsen clássica, DBQD e SED tipo *CHST3* (26). Variantes no gene *B3GALT6* estão relacionadas a SEMD-JL tipo Beighton (OMIM 271640) caracterizada principalmente por alterações vertebrais com cifoescoliose progressiva, assimetria torácica, luxações e frouxidão ligamentar (27–30). Mais recentemente pacientes com baixa estatura, frouxidão ligamentar e miopia foram identificadas como Larsen-*like* apresentarando variantes em dois genes *B3GAT3* e *GZF1* expandindo a heterogeneidade genética dessa condição (14,18).

Outras enzimas codificadas por alguns genes [CHSY1, CHST11 CSGALNACT1, CHST3, CHST14, IMPAD1/BPNT2, SLC10A7, SLC26A2/DTDST], também estão presentes no grupo OCD-lux atuando em determinadas etapas da biossíntese de PGs, após formação do tetrassacarídeo de ligação, na extensão das cadeias de Sulfato de Condroitina, Dermatan Sulfato e Heparan Sulfato com a adição alternada de dissacarídeos e posteriormente modificados (epimerização e sulfatação) por sulfotransferases (Figura 1) (18,23,31,32).

O gene *CHST3* codifica a enzima condroitina 6- sulfotransferase (C6ST), presente na sulfatação de PGs em especial o sulfato de condroitina. Variantes patogênicas nesse gene estão associadas à displasia espôndilo-epifisária com múltiplas luxações congênitas (Displasia espôndilo-epifisária com múltiplas luxações congênitas, OMIM 143095) também conhecida como a forma recessiva da Síndrome de Larsen devido a presença de luxações (joelhos, cotovelos e quadril), pé torto congênito, baixa estatura ao nascimento e cifose progressiva em alguns casos, alguns achados radiológicos típicos como *cleft* coronal dos corpos vertebrais, bifurcação distal do úmero e avanço de ossificação nos ossos do carpo. (33,34). Segundo a última revisão publicada aproximadamente 50 pacientes estão descritos como perda auditiva ou envolvimento cardíaco apresentando variantes localizadas em posições específicas no gene. Até o momento 46 variantes patogênicas estão descritas nesse gene (35–37).

O gene *SLC26A2/DTDST* codifica uma proteína transportadora de sulfato e variantes patogênicas levam a um espectro bem reconhecido de displasias esqueléticas com gravidade variável de letal a leve. Este espectro, classicamente inclui duas condições letais - acondrogênese tipo 1B (ACG-1B, OMIM #600972) e atelosteogênese tipo 2 (AO-2, OMIM #256050), uma displasia grave, mas não letal displasia diastrófica (DD, OMIM #222600), e um fenótipo leve - displasia epifisária múltipla recessiva (rMED, OMIM #226900) (38) . Dentre essas, a DD e rMED apresentam um comprometimento articular significativo. Além da variabilidade clínico-radiológica dentro de cada fenótipo, alguns pacientes são descritos com sobreposição entre dois deles no espectro clássico. Outros pacientes referidos com um fenótipo intermediário (DD/DBQD e DD/rMED/DBQD) foram descritos com a característica da chave sueca presente na DBQD (39,40).

O gene *IMPAD1/BPNT2* codifica o cofator a 3'-fosfoadenosina 5'-fosfato 3'-fosfatase presente no Golgi (gPAPP), e sua deficiência leva ao acúmulo de PAP, inibidor de sulfotransferases. Até o momento há poucas publicações de pacientes com variantes nesse gene (4 variantes incluindo *missenses*, *nonsense*, *frameshift* e uma grande deleção 8q – exon 1 ao 5) relacionadaos a Condrodisplasia com luxações articulares, tipo gPAPP também chamada de síndrome Catel-Manzke-*like* (3,41,42).

A síndrome de Catel-Mankze corresponde a uma condição descrita em 1961 por Catel e reavalida por Mankze em 1966 em pacientes com hiperfalangismo (osso acessório entre as falanges proximais do segundo e terceiro dedo) em mãos e micrognatia. Somente em 2014 foram identificadas variantes patogênicas no gene *TGDS* relacionadas a essa condição e acredita-se que esse gene desempenha um papel na síntese ou sulfatação de PGs devido a sobreposição fenotípica (43). O hiperfalangismo está presente também na Braquidactilia pré-axial tipo Temtamy (OMIM #608183 - *CHSY1*) e da DBQD 1 (44).

Recentemente pacientes apresentando um fenótipo Catel-Manzke com hiperfalangismo foram descritos com variantes patogênicas no gene *KYNU* (8). O gene *KYNU* já havia sido associado com a causa de uma síndrome de malformação complexa, com defeitos vertebrais, cardíacos, renais e de membros (VCRL2, OMIM# 617661), porém sem hiperfalangismo (45).

Embora os genes *CHSY1* e *TGDS* estejam presentes no grupo 38 braquidactilias com manifestações extra-esqueléticas, são importantes na correlação genótipo-fenótipo com o grupo da sulfatação devido a característica radiológica particular de hiperfalangismo se sobrepondo com os pacientes com variantes no gene *IMPAD1/BPNT2* (43,44,46).

Mais recentemente, a importância dos genes *TGDS* e *KYNU* também foi reconhecida na síntese do PGs. O gene *TGDS* codifica a enzima TDP-glicose 4,6-desidratase, embora sua função em mamíferos ainda seja desconhecida, seu homólogo mais próximo é o gene *UXS1* que codifica UDP-xilose sintase que descarboxila o ácido UDP-glucurônico em UDP-xilose no Golgi. Este UDP-xilose é então usado como um substrato para a síntese da região do tetrassacarídeo. *TGDS* é uma enzima dependente de NAD+. Assim, uma deficiência de quinurenina (metabólito do triptofano), codificada pelo gene *KYNU*, poderia prejudicar sua função, devido à falta de síntese do seu cofator (NAD⁺). Esse mecanismo hipotético pode estar relacionado à característica em comum de hiperfalangismo presente nas duas condições (8,43).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigação das bases moleculares de um grupo de pacientes com displasias esqueléticas com comprometimento articular *major* (OCD-lux) por meio da utilização do sequenciamento de alto rendimento na tentativa de refinar a correlação genótipo-fenótipo de um grupo heterogêneo e de difícil diagnóstico clínicoradiológico.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar as bases moleculares de um grupo de pacientes previamente selecionado e classificado dentro do grupo OCD-lux apresentando ou não o diagnóstico radiológico específico;
- Avaliar o rendimento diagnóstico com os diferentes métodos de investigação das bases moleculares;
- Avaliar a abordagem utilizada para a investigação da presente coorte;
- Identificar possíveis novas correlações genótipo-fenótipo a partir dos resultados da presente coorte.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Aspectos Éticos

Os pacientes e/ou responsáveis selecionados para o estudo foram informados quanto a pesquisa durante o atendimento de rotina. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo 1), previamente aprovado pelo comitê de ética local sob o número CAAE 64339717.0.0000.5404 (Anexo 2), foi aplicado à assinatura aos que aceitaram participar do estudo.

3.2. Casuística

Esse trabalho faz parte de um projeto maior do Grupo de Displasias Esqueléticas (Departamento de Medicina Translacional – Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp) intitulado "Contribuição ao estudo clínico-etiológico das displasias esqueléticas e disostoses no Brasil". Para o presente trabalho foram derivados os pacientes com diagnóstico clínico-radiológico dentro do grupo OCD-lux.

No período Julho/2016 – Março/2021 foram selecionados 14 pacientes com características radiológicas compatíveis com o grupo OCD-lux pelo grupo de Displasias Esqueléticas local a partir da avaliação direta ou indireta de pacientes nos seguintes locais:

- Ambulatório de Displasias Esqueléticas (Hospital de Clínicas UNICAMP)
- Ambulatório de Genética Perinatal (Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher – CAISM - UNICAMP)
- Website <u>www.ocd.med.br</u>

Os 14 pacientes selecionados foram classificados de acordo com a avaliação radiológica da seguinte maneira:

Pacientes típicos: pacientes classificados com um diagnóstico específico.

Pacientes atípicos: pacientes sem um diagnóstico específico. Esses foram chamados de *Like* quando o fenótipo apenas sugeria um dado diagnóstico ou OCD-Lux, quando nenhum diagnóstico pôde ser sugerido.

3.3. Métodos laboratoriais

3.3.1. Extração de DNA e preparo das amostras

O DNA genômico extraído dos pacientes e seus familiares (quando disponíveis) foi coletado a partir de amostras de sangue periférico, e pele (somente em um caso de óbito). Para tais, foram utilizados protocolos de extração por fenol e clorofórmio (47) adaptados para sangue e pele "*in house*" e o kit de extração *Invisorb® Blood Universal Kit* (Stratec Molecular GMBH, Berlim, Alemanha) seguindo recomendações do fabricante.

Uma alíquota de 2µl do DNA extraído foi submetida ao espectrofotômetro Epoch™ UV-visível Biotek e analisado através do Gen5™ - All-in-one microplate reader software, quantificado em ng/µl e sua pureza avaliada com valores de taxa de absorbância em comprimentos de onda 260/280nm. Além disso, a integridade do DNA foi testada através do mix de 1µl à 50ng/µl de DNA em 4µl de azul de bromofenol e 1µl de água. Esse *mix* foi aplicado em um preparo de gel de agarose à 1% (com SYBR® Safe) juntamente com 1,5µl de marcador de peso molecular de Thermo Scientific® GeneRuler 1kb DNA Ladder e testado em eletroforese (40min-80V). Amostras consideradas de boa qualidade para utilização nos sequenciamentos devem seguir padrões de concentrações acima de 100ng/µl, absorbância entre 1.8 e 2.0 e DNA com fragmentos de boa integridade visualizados no gel de agarose. Essa etapa foi realizada para os três tipos de sequenciamentos utilizados no presente estudo.

Para utilização das amostras nos SS, Painel-NGS e WES, foram realizadas diluições (com a mesma solução eluída na etapa prévia de extração) para uma concetração final de 50ng/µl no SS e 5ng/µl no Painel-NGS. Para as técnicas de NGS as quantificações pré e pós diluição foram realizadas no quantificador fluorométrico *Qubit*® (*Kit Qubit dSDNA BR Assay Kit - Thermo Scientific*®).

3.3.2. Técnicas de Sequenciamento

3.3.2.1. Sequenciamento bidirecional de Sanger (SS)

O SS foi utilizado para os casos típicos com gene ou éxon alvo, validação de variantes consideradas candidatas para o fenótipo, segregação dos genitores e cobertura de regiões específicas que foram consideradas como insuficientemente cobertas pelo Painel-NGS.

Desenho de oligonucleotídeos iniciadores (primers)

Para o ínicio do SS, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) flanqueando de regiões limítrofes íntron-éxon. Os primers foram desenhados manualmente através das sequências disponíveis no website Ensembl – Human GRCh37.p13 (também conhecido como hg19 – <u>http://ensembl.org</u>).

Para cada par de *primer* desenhado, foram seguidas recomendações com a finalidade de gerar fragmentos específicos para a região desejada e otimizar a sua padronização: sequências dos *primers* com tamanho aproximado de 20 a 25 nucleotídeos priorizando as extremidades sem polimorfimos, porcentagem aproximada de 50% do conteúdo de citosina e guanina entre os pares, de temperaturas anelamento (TM) entre os pares semelhantes e próxima à 60°C, (calculado através da formula TM = 2AT+ 4CG), tamanho do fragmento (*amplicon*) a ser amplificado de até 750pb (pares de bases) e ausência de complementariedade entre os primers. Finalmente, as estruturas secundárias foram analisadas pelo programa GeneRunner® (versão 6.5.27 – <u>http://generunner.net</u>) e os fragmentos formados foram verificados quanto a sua especificidade pelo *Primer-BLAST* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/).

<u>Amplificação do DNA por Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase</u> <u>Chain Reaction - PCR) e purificação enzimática</u>

Os *primers* desenhados foram submetidos a gradientes de temperatura para testar a temperatura ideal para cada par no termociclador Mastercycler® Gradiente, Eppendorf. Embora as regras de desenho de primer acima tenham sido aplicadas, a padronização de alguns pares de primes deu-se de forma mais dificultosa (em especial o exon 1 dos genes), sendo necessário realizar dois ou mais testes em diferentes protocolos, reagentes e temperaturas para obter um resultado satisfatório.

Para a maioria dos primers a enzima Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen®) foi utilizada, no entanto nos casos mais trabalhosos, foi necessário o uso da enzima HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen®) com adição de Q-solution (para regiões ricas em GC), e em outros a adição de dimetilsulfóxido (DMSO) em uma porcentagem de 5% para maior especificidade da reação.

Visando minimizar o surgimento de bandas inespecíficas no processo de amplificação dos amplicons de interesse, foi utilizada a técnica de *Touchdown* PCR no qual a temperatura de anelamento no primeiro ciclo é programada para 10°C acima do 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. Após a padronização, cada mix de cada reação foi realizada com um controle sem DNA com a finalidade de identificar possíveis contaminações.

Após a amplificação dos fragmentos de DNA genômico através da técnica de PCR, foi realizada a eletroforese (40min-80V) em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR® Safe para a visualização da banda referente ao fragmento e assim avaliar a especificidade da reação. Em cada poço do gel, foi aplicado um *mix* de 2µl da reação de PCR junto à 2µl de azul de bromofenol. O marcador de peso molecular utilizado nessa etapa foi o de 100pb (*Thermo Scientific*® *GeneRuler 100bp DNA Ladder*).

Para a purificação das PCRs, remoção de primers e dNTPs não incorporados, foi utilizada a enzima Exonuclease I e fostatase alcalina (illustra ™ ExoProStar 1-Step). Essa é uma etapa rápida, porém importante para a garantia da qualidade do SS, nela as amostras (2 µI de cada produto da PCR) junto com a ExoProStar (0,3µI para cada 1µI de PCR) são incubadas no termociclador a 37º por 15 minutos e em seguida aquecidas a 80ºC por mais 15 minutos, inativando assim a ação da enzima.

Reação de Sequenciamento

Ensaios através do sequenciamento bidirecional do gene/éxon em questão foram submetidas à eletroforese capilar no sequenciador automático ABI Prism Genetic Analyzer ABI 3500XL (*Applied Biosystems*[™], by Life Technologies[™], Califórnia, EUA) do Laboratório de Genética Molecular (Departamento de Medicina Translacional / FCM-UNICAMP).

A reação de sequenciamento foi feita para um volume final de 10 µl, contendo 1 µl de solução tampão fornecida, 0,4µl de *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* Kit (*Applied Biosystems*[™]), 0,5µl de primer senso ou anti-senso (10 pmol/µl), 1µl do produto tratado previamente com *ExoProStar 1-Step* e o restante de água. As condições para a realização do sequenciamento foram: 35 ciclos de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 55°C e 1 minuto a 60°C.

Após a reação de sequenciamento, as amostras foram purificadas utilizando EDTA e etanol, conforme o protocolo sugerido pelo fabricante. Em seguida, as amostras foram ressuspendidas em 10µl de Formamida Hi-DiTM[™] (*Applied Biosystems*[™])

3.3.2.2. Painel de genes customizado (Painel-NGS)

A seleção de genes para a customização do painel feita através da hipótese diagnóstica dos pacientes e seus diagnósticos diferenciais englobando o projeto principal, sendo assim, foram incluídos 85 genes para displasias esqueléticas baseado na nosologia vigente na época, sendo 17 deles de interesse para o presente estudo (Anexo 1). O painel foi desenhado utilizando o software online Design Studio 1.7 (Illumina software) e o preparo da biblioteca foi o *Illumina Nextera® Rapid Capture Enrichment Paired-end, MiSeq Reagent Kit v2.*

As amostras e bibliotecas foram preparadas no Laboratório de Genética Medicina Translacional – FCM /UNICAMP). Molecular (Departamento de Brevemente, o início deu-se pela quantificação do DNA por Epoch e normalizado a 10ng/µl. Posteriormente, foi requantificado pelo Qubit 2.0 e normalizado a 5ng/µl, as demais etapas seguiram conforme protocolo do fabricante. O preparo da biblioteca foi realizado de acordo com as instruções do fabricante e consiste resumidamente em etapas de: fragmentação do DNA, tagmentação (adição de adaptadores no DNA genômico a fim de obter bibliotecas enriquecidas que possam ser utilizadas para aplicações de sequenciamento por alvo), hibridação com sonda de captura e amplificação da biblioteca. A quantificação das amostras durante a biblioteca e avaliação de tamanhos dos fragmentos foram realizados com o Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA). O sequenciamento foi realizado com o equipamento Illumina Miseq (Illumina Inc., San Diego, Califórnia, EUA), ao todo foram realizados 4 sequenciamentos contendo amostras do presente estudo e do projeto principal.

3.3.2.3. Sequenciamento completo do Exoma (*Whole Exome* Sequencing – WES)

Para o WES, as amostras de DNA genômico foram encaminhadas para a empresa de biotecnologia Macrogen Inc. (Coreia do Sul), local em que foi realizado o preparo das bibliotecas utilizando o *Kit SureSelect All Exon V5 e V6* (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA), o sequenciamento foi realizado no sequenciador *Illumina HiSeq4000* (Illumina Inc., San Diego, Califórnia, EUA). Os dados dos sequenciamentos foram fornecidos pela empresa em formato fastq. com uma cobertura esperada de 100x.

3.3.3. Metodologia de Array

Para a técnica de CNV-array, uma alíquota de DNA genômico de um único paciente foi enviada para a equipe do Laboratório de Citogenômica – HCFMUSP na Universidade de São Paulo, local em que foi realizado todo o experimento. Brevemente essa técnica consiste em amplificação, fragmentação e hibridação do DNA genômico no beadchip® com posterior leitura dos chips utilizando um scanner.

Para a técnica, foi utilizando o Infinium CytoSNP-850K v1.1 BeadChip® (Illumina®, San Diego, CA, EUA) conforme instruções do fabricante. A intensidade da fluorescência das beads foi escaneada por meio do equipamento iScan System® (Illumina®, San Diego, CA, EUA).

Este Beadchip contém, aproximadamente, 850.000 sondas (probes) de oligonucleotídeos de 50-mers, com espaçamento médio de 1,8kb entre elas e cobertura de 3.262 genes. Essas sondas abrangem todo o genoma e são consideradas sondas alvo para todas as regiões de importância citogenética conhecidas, incluindo regiões subteloméricas, pericentroméricas e dos cromossomos sexuais.

O processamento do arquivo original e a análise foram feitas com softwares específicos, disponibilizado no site da Illumina®. O arquivo original (.idat) foi convertido em .gtc através do programa Beeline 2.0 e esse analisado com o auxílio BlueFuse Multi 4.5[®] (BlueGenome[®], UK) para avaliar a qualidade do experimento e chamar as alterações. Os arquivos de referência utilizados no software foram:

Manifest file: CytoSNP-850Kv1-1_iScan_C1_Manifest.bpm Cluste file: CytoSNP-850Kv1-1_iScan_C1_ClusterFile.egt Annotation DB: BG_Annotation_Ens74_20180801.db

Para a análise, foram consideradas as deleções e as duplicações que envolviam pelo menos 10 sondas consecutivas. Os bancos de dados recomendados para análise das CNVs identificadas incluem: Database of Genomic Variants (DGV http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home), Clinical Genome Resource (CliGen https://www.clinicalgenome.org), Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources (DECIPHER http://decipher.sanger.ac.uk/) e UCSC Genome Browser (http://genome.ucsc.edu).

3.4. Estratégia de Estudo

A estratégia de estudo para os pacientes foi definida baseada nas características clínico-radiológicas de cada paciente, considerando a hipótese diagnóstica inicial, classificação dentro do grupo OCD-lux, e o tamanho do gene de interesse a ser investigado (Figura 2). O Painel-NGS foi utilizado para os casos típicos e atípicos e o WES em casos atípicos negativos no Painel-NGS ou sem gene candidato. Já o SS foi utilizado para os fenótipos típicos com gene alvo de tamanho pequeno (até 3 éxons) ou *hotspot* mutacional.

Figura 2 Estratégia de estudo dos pacientes da casuística.



3.5. Processamento pós sequenciamento e softwares

Para cada tipo de sequenciamento foi utilizada uma abordagem diferente para análise dos dados.

As sequências provenientes do SS foram obtidas em arquivos com extensão ".abi" e as análises foram realizadas utilizando o programa Codon Code Aligner versão 9.0.1 demo (disponível para *download* em: <u>https://www.codoncode.com/aligner/download.htm</u>), que permite o alinhamento de cada fita sequenciada comparando com o genoma humano de referência GRCh37/hg19 e ressaltando as alterações nucleotídicas.

Para o Painel-NGS, o processamento dos dados brutos obtidos no sequenciamento foi realizado pela plataforma BaseSpace da *Illumina* (https://basespace.illumina.com/), com o alinhamento com o genoma humano de referência GRCh37/hg19 através do *Burrows-Wheeler Aligner (BWA)* e as chamadas de variantes com o *Genome Analysis Tool Kit* (GATK), Free Bayes e ANNOVAR. Os arquivos em formato .vcf de cada amostra foram inseridos no *website* público myPhenoDB para posterior análise em tabelas (.xlsx) compatíveis com o programa *Excel* (48).

Para o WES, optou-se por realizar o processamento, montagem e anotação dos dados pela plataforma Varstation (<u>https://varstation.com/pt/</u>) através do *upload* dos arquivos .fastq, o pipeline nessa plataforma segue com as leituras *paired-end* de 150bp alinhadas com o genoma de referência GRCh37/hg19 usando o alinhador BWA, as variantes chamadas usando o GATK e *FreeBayes*, anotadas com ANNOVAR e ferramentas desenvolvidas e validadas internamente pelo Varstation. Após processamento um relatório de variantes é fornecido e a análise é realizada através dos algoritmos internos VarsSmartFilter® que as pré-classifica otimizando a análise e garantindo uma análise objetiva (49).

Nos sequenciamentos Target-NGS e WES, os arquivos *.bam* e .vcf foram analisados visualmente para checar a presença das variantes de interesse e também a avaliação de cobertura das regiões de interesse em casos específicos através do *software* gratuito *IGV* versão 2.8.9 (*Integrative Genomics Viewer – Broad Institute –* disponível para *download* em https://software.broadinstitute.org/software/igv/download) (50).

3.6. Análises e interpretação das variantes

A análise e interpretação das variantes se deu de maneira igual em todas as técnicas de sequenciamentos priorizando: localização na região exônica e intronéxon (limítrofe e aproximadamente 15 bases em seu entorno), frequência alélica populacional em banco de dados públicos globais e nacional, predição *in silico* de dano à proteína, bancos de associação com doenças e posteriormente classificadas através do *website* público VarSome (https://varsome.com/) de acordo com as recomendações do *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) em patogênicas, provavelmente patogênicas, benignas, provavelmente benignas e de significado incerto (os critérios e suas definições para as variantes finais estão listadas no Apêndice 4), além dos critérios *genotype quality* e *read depth* \geq 20 utilizados nos sequenciamentos NGS (51,52).

A frequência alélica populacional de cada variante foi analisada priorizando-se critérios de baixa frequência (<1% na população) e ausência de homozigose, nos bancos de dados: *Genome Aggregation Database v2* e *v3* e *Exome Aggregation Consortium* (ExAC) acessados atráves do gnomAD *browser* (<u>https://gnomad.broadinstitute.org/</u>) e Arquivo Brasileiro Online de Mutações (ABraOM - <u>http://abraom.ib.usp.br/</u>) (53,54). Todas as variantes e genes de interesse foram verificadas nos seguintes bancos de associação variantes/genes/doenças: OMIM, HGMD, ClinVar e dbSNP, além da busca na literatura através do PubMed.

O uso de algoritmos para predição de dano à proteína *in silico* foi feita de acordo com o tipo de variante identificada. Para todas as variantes, o *site Mutation Taster* pôde ser utilizado visto que avalia o potencial patogênico das alterações na sequência de DNA (55). Já o PolyPhen-2 e SIFT para variantes *missenses*, que avaliam a substituição de aminoácidos na estrutura e função da proteína considerando a conservação dos aminoácidos em alinhamentos de sequência relacionadas (56,57). Para as alterações em regiões de splice foram utilizados os algoritmos: CADD v1.6 (*Combined Annotation Dependent Depletion*) e SpliceAI lookup. Para análise de conservação evolutiva quando de interesse foi utilizado o critério GERP (*Genomic Evolutionary Rate Profiling*) acessado através do Varsome.

Os algoritmos I-Mutant 2.0 (<u>http://folding.uib.es/i-mutant/i-mutant2.0.html</u>) e HOPE v1.1.1 (<u>http://www.cmbi.ru.nl/hope/</u>) foram utilizados para predição da estabilidade proteica em relação as variantes *missenses* nas quais os algoritmos não foram concordantes (58,59).

As variantes novas foram descritas seguindo as regras de nomenclatura recomendadas pela *Human Genome Variation Society* (HGVS) e conferidas no website *Mutalyzer* versão 2.0.33 (<u>https://mutalyzer.nl/</u>) (60,61).

4. RESULTADOS

Um total de 14 pacientes foram estudados e para melhor ordenação os resultados foram agrupados por fenótipo-gene. Quanto ao local de atendimento para a seleção dos pacientes: nove pacientes foram selecionados a partir do *website*, três foram avaliados no Ambulatório de Genética Perinatal (GenPeri) e dois foram selecionados no Ambulatório de Displasias Esqueléticas (Disesq). Os pacientes foram classificados em dois grupos de acordo com a avaliação radiológica: sete pacientes com fenótipos típicos (OCD-lux típico) e sete pacientes com fenótipos atípicos) (Quadro 1).

Seguindo a estratégia do estudo, 10 pacientes (quatro típicos e seis atípicos) foram submetidos ao Painel-NGS e cinco pacientes ao WES (um típico e quatro atípicos), em um paciente utilizou-se a abordagem do WES para o trio (propósito e genitores). O SS foi utilizado na investigação de três pacientes pois o diagnóstico inicial direcionou para um gene ou éxon específico. Em um paciente o estudo de CNV-Array foi realizado para complementar a investigação.

Paciente	Local de atendimento	IPA	Csg	Diagnóstico inicial	Gene de interesse	Abordagem de Investigação
RF3496 [∓]	GenPeri	OF (25s)	N	ACG-1B		Painel-NGS/Array
RFOCD340 [∓]	website	ON	Ν	AO-2	SLC26A2/DTDST	SS
RF5266 [∓]	GenPeri	1d	Ν	DD		SS
RFOCD323 [∓]	website	6d*	Ν	DBQD 1	CANT1	Painel-NGS
RFOCD261 [∓]	website	1a	Ν	SEMD II Lonto	KIE22	SS
RFOCD165 [∓]	website	6a	Ν	SEMD-JE Lepto	NII 22	Painel-NGS/WES
RFOCD287 [∓]	website	6a	Ν	SEMD-JL Beighton	B3GALT6	Painel-NGS
RFOCD289	website	2a	Ν	DBQD-like	CANT1	Painel-NGS
RFOCD246	website	-	Ν	DBQD-like	CANT1	Painel-NGS
RF3717	GenPeri	OF (33s)	s	DBQD-like	CANT1	WES (trio)
RFOCD197	website	-	S	Catel Manzke-like	IMPAD1/BPNT2, TGDS e CHSY1	Painel-NGS/WES
RFOCD118	Disesq	2a4m	Ν	OCD-lux	IMPAD1/BPNT2	Painel-NGS/WES
RFOCD121	Disesq	6a8m	Ν	OCD-lux	CANT1	Painel-NGS/WES
RFOCD204	website	-	S	OCD-lux	CANT1	Painel-NGS

Quadro 1 Pacientes da casuística, sua origem quanto a seleção, seus respectivos diagnósticos iniciais e as abordagens da investigação.

Códigos internos de registro: RF: registro familiar; RFOCD: registro de famílias com osteocondrodisplasias. Csg: consanguinidade parental declarada; GenPeri: ambulatório de genética perinatal; Disesq: ambulatório de displasias esqueléticas; IPA: idade à primeira avaliação (dias, semanas, anos e meses); ON: óbito neonatal; OF: óbito fetal; N: não; S: sim; *: óbito; -: informação não disponível; Ŧ: pacientes classificados com fenótipo típico.

4.1. Abordagem utilizada e rendimento diagnóstico

A taxa de pacientes com resultado positivo foi de 78,5% (11/14) (Quadro 2). Os resultados positivos também foram avaliados quanto aos dois subgrupos, típicos e atípicos, e quanto ao método utilizado.

Os diagnósticos inicias dos sete pacientes OCD-lux típicos se confirmaram com o estudo molecular através do Painel-NGS nos pacientes: RF3496 [ACG-1B - *SLC26A2/DTDST*], RFOCD323 [DBQD-1 – *CANT1*], RFOCD165 [SEMD-JL Lepto – *KIF22*] e RFOCD287 [SEMD-JL Beighton – *B3GALT6*] e através do SS nos casos: RFOCD340 [AO-2 – *SLC26A2/DTDST*], RF5266 [DD – *SLC26A2/DTDST*], RFOCD261 [SEMD-Lepto – *KIF22*]. Um paciente desse grupo (RFOCD165) foi submetido também ao WES devido a identificação de uma variante fora do *hotspot* e a análise não identificou outro gene que poderia ter uma correlação com o fenótipo, já o paciente RF3496 foi submetido à técnica de CNV-array para

investigar uma possível deleção, visto que pelo Painel-NGS foi identificada somente uma variante patogênica em heterozigose.

Em relação aos pacientes OCD-lux atípicos, foram identificadas bases moleculares em 4 de 7 (57,14%): em dois pacientes através do Painel-NGS: RFOCD289 [DBQD/DD/rMED - *SLC26A2/DTDST*] e RFOCD246 [DBQD-*like* apresentando uma variante em heterozigose no gene *IMPAD1/BPNT2*]. A técnica de WES permitiu identificar variantes nos pacientes atípicos: RF3717 (CDG-*SLC39A8 with* DBQD *appearance* - *SLC39A8*] e no RFOCD197 [OCD-*KYNU related*]. Em três pacientes classificados como OCD-lux (RFOCD118, RFOCD121 e RFOCD204) não foi possível estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo.

4.2. Resultados moleculares gerais

Os resultados moleculares e diagnósticos finais de cada paciente estão apresentados no Quadro 2. Ao total foram identificadas 13 variantes: 5 *missenses* (uma recorrente em 3 pacientes), 4 *frameshifts*, 1 *nonsense* (recorrente em 2 pacientes), 1 deleção *in frame* e 2 em região de splice. Dessas, 4 são consideradas inéditas e foram adicionadas no banco de dados LOVD. Os resultados das análises de predição *in silico*, a classificação de acordo com a ACMG e frequência populacional das variantes novas estão apresentadas do Quadro 3.

Em relação a zigosidade, cinco pacientes (AO-2, DD, rMED/DBQD, DBQD-1 e SEMD-JL Beighton) apresentaram variantes em heterozigose composta sendo ao menos uma dessas *frameshift* ou *nonsense*, dois pacientes apresentaram variantes em homozigose (CDG-*SLC39A8* with DBQD *appearance* e OCD-*KYNU related*), variantes em heterozigose para doenças AR foram identificadas em dois casos RF3496 (ACG-1B) e RFOCD246 (OCD-IMPAD1), além dos dois casos de SEMD-JL tipo Leptodactílico (AD).

Em relação a análise da qualidade dos sequenciamentos nos Painel-NGS e WES, foi observado uma profundidade média de cobertura de 82,7x e 53,14x, respectivamente. No entanto, no Painel-NGS algumas amostras apresentaram valores abaixo do esperado (Apêndice 1), dentre essas os pacientes RFOCD287 (38,2x), RFOCD323 (25,4x) e o RFOCD246 (16,3x). Nos dois primeiros casos, a hipótese diagnóstica inicial foi fundamental para a avaliação dos genes de interesse
e com isso foi possível identificar as variantes responsáveis pelos fenótipos. A análise do paciente RFOCD287 [SEMD-JL Beighton – *B3GALT6*] identificou apenas uma duplicação de uma guanina em heterozigose e mostrou uma baixa cobertura no início do gene, após o ressequenciamento dessa região pelo SS foi possível identificar a segunda variante (p.[R6W]), já no paciente RFOCD323 [DBQD-1 – *CANT1*] foram identificadas duas variantes patogênicas em heterozigose composta no gene pois esse apresentou uma boa cobertura, e no paciente RFOCD246 (OCD-*IMPAD1 related*) somente uma variante em heterozigose foi identificada no gene *IMPAD1/BPNT2*, além de uma baixa cobertura nos demais éxons, o que levou ao ressequenciamento com o SS, porém devido a baixa qualidade do DNA e somado a uma região de difícil amplificação, um *gap* de 132 bases finais continuam sem cobertura.

		Padrão de		Variante [Ale	lo 1];[Alelo 2]				Referência/dbSNP/ClinVar
Paciente	Diagnóstico final	herança	Gene	cDNA	Proteína	Zig	AM	AP	(Alelo1);(Alelo2)
RF3496 [∓]	ACG-1B	AR		c.[1045_1047del];[?]	p.[V340del];[?]	htz	ND	?	(62);(?)
RFOCD340 [∓]	AO-2	AR		c.[862C>T];[559C>T]	p.[R279W];[R178*]	htzc	Alelo 2	Alelo 1	(63);(62)
RF5266 [∓]	DD	AR	SLUZOAZ/DIDSI	c.[862C>T];[559C>T]	p.[R279W];[R178*]	htzc	ND	ND	
RFOCD289	DBQD/DD/rMED	AR		c.[862C>T];[2182del]	p.[R279W];[A719Qfs*16]	htzc	Alelo 1	Alelo 2	(63);(inédita)
RFOCD323 [∓]	DBQD-1	AR	CANT1	c.[277_278del];[1048del]	p.[L93Vfs*89];[I350Sfs*44]	htzc	ND	ND	(64);(rs1294064847)
RFOCD261 [∓]				c.[443C>T];[wt]	p.[P148L];[wt]	htz	Alelo 1**	ND	(10,11)
RFOCD165 [∓]	SEMD-JL Lepto	AD	KIF22	c.[664G>C];[wt]	p.[E222Q];[wt]	htz	Ausente	Ausente	(Inédita)
RFOCD287 [∓]	SEMD-JL Beighton	AR	B3GALT6	c.[16C>T];[588dup]	p.[R6W];[R197Afs*246]	htzc	Alelo 2	Alelo 1	(29);(rs533071750/ID427130)
RFOCD246	OCD-IMPAD1 related	AR	IMPAD1/BPNT2	c.[976A>T];[wt]	p.[T326S];[wt]	htz	ND	ND	(Inédita)
	CDG com aparência de								
RF3717	DBQD	AR	SLC39A8	c.[220-5T>A];[c.220-5T>A]	p.?	hmz	Alelo 1	Alelo 2	(Inédita)
RFOCD197	OCD-KYNU related	AR	KYNU	c.[902+1G>A];[902+1G>A]	p.?	hmz	Alelo 1	Alelo 2	rs754953201
RFOCD118	IMPAD1-like	-	-	-			-	-	-
RFOCD121	OCD-lux	-	-	-			-	-	-
RFOCD204	OCD-lux	-	-	-			-	-	-

Quadro 2 Resultado da investigação molecular dos pacientes da casuística com as variantes identificadas, seus diagnósticos finais e segregação quando disponível.

Observações: Códigos internos de registro: RF: registro familiar; RFOCD: registro de famílias com osteocondrodisplasias. ⁺ : paciente classificado com fenótipo típico; *: códon de terminação; **: mãe afetada; - :sem base molecular identificada; ?: variante no alelo não identificada; A: alanina; ACG-1B: acondrogênese 1B; AO-2: atelosteogênese 2; AM: alelo materno; AP: alelo paterno; CDG: Doenças Congênitas da Glicosilação; DBQD: displasia de Desbuquois; DD: displasia diastrófica; Del: deleção; E: ácido glutâmico ID: identificação da variante no ClinVar hmz: homozigose; htz: heterozigose; htz: heterozigose composta; I: isoleucina; L:leucina; ND: DNA para segregação não disponível; P: prolina; Q: glutamina; R: arginina; W: triptofano; rMED: displasia múltipla epifisária recessiva; rs: identificação da variante no banco de dados dbSNP; S: serina; SEMD-JL: Displasia espôndilo-epi-metafisiária com frouxidão ligamentar; T: treonina; V: valina, wt: *wild type* (alelo selvagem); Zig: zigosidade.

Gene		Var	riante	Predição <i>in silico</i>						Varsome (ACM	LOVD	
(localização cromossômica)	Local	cDNA	Proteína	Polyphen 2 (HDIV/HVAR)	SIFT	мт	CADD	Splice Al	GERP	Critérios	Class	
SLC6A2/DTDST (chr5:149361311)	Exon 3	c.2182del	p.A719Qfs*16	NA	NA	Ρ	NA	NA	5,71	PVS1,PM2, PP3	Р	LOVD#0000473814
<i>KIF22</i> (chr16:29810410)	Exon 5	c.664G>C	p.E222Q	B/B	т	Р	23,4	0,11	5,94	PM1,PM2, PP2,PS2	PP	LOVD #0000132546
IMPAD1/BPNT2 (chr8:57876456)	Exon 5	c.976A>T	p.T326S	B/B	Т	Ρ	16,36	0,00	5,32	PM2,PP2, BP4	VUS	LOVD#0000473818
SLC39A8 (chr4:103236992)	Íntron 1-2	c.220-5T>A	p.?	NA	NA	Ρ	16,92	0,04	4,19	PM2,BP4	VUS	LOVD#0000760939

Quadro 3 Predição in silico das variantes inéditas e classificação ACMG.

-: ausente; NA: não aplicável; Classificação ACGM: P: patogênico, PP: provavelmente patogênico; VUS: variante de significado incerto. As definições dos critérios ACGM estão referidas no Apêndice 4.

Predição in silico:

-CADD: *score* ≥ 10 (predição da variante estar entre as 10% mais deletérias); ≥ 20 (indica a variante presente entre as 1% mais deletérias no genoma humano)

-GERP: score range -12,3 a 6,17 sendo 6,17 o valor mais conservado.

-Mutation Taster (MT): P: patogênico (*disease causing*)

-Polyphen: Benigno (B)

-SIFT: Tolerado (T); Patogênico (P)

- SpliceAl lookup: score range 0-1, resultados próximos 1 possuem com maior chance de afetar o splicing

4.2.1. Resultados por grupo de pacientes ou individuais

4.2.1.1. OCDs do espectro DTDST/SLC26A2

O grupo de pacientes com OCD associados ao *SLC26A2/DTDST*: RF3496 (ACG-1B), RFOCD340 (AO-2), RF5266 (DD) e RFOCD289 (DBQD/DD/rMED) foi analisado separadamente a partir da identificação de um fenótipo intermediário que resultou na descrição desse paciente associada a uma extensa revisão da literatura. Esses dados foram resumidos num manuscrito submetido à publicação na revista *Molecular Syndromology* e encontra-se no Apêndice 6.

4.2.1.2. Displasia de *Desbuquois* (DBQD-1)

A análise do Painel-NGS no paciente RFOCD323 identificou duas deleções de bases (do tipo *frameshift*) em heterozigose composta no gene *CANT1*.A deleção de CT localizada no éxon 2 c.277_278del / p.Leu93Valfs*89 é a mais frequente descrita em pacientes com DBQD-1 em homozigose ou heterozigose composta (64). No éxon 4 foi identificada uma deleção de A c.1048del / p.Ile350Serfs*44 ainda não descrita na literatura, porém já depositada no banco de dados dbSNP: rs1294064847. A predição *in silico* no site *Mutation Taster* a considerou como patogênica e a classificação ACGM como provavelmente patogênica cumprindo as regras PVS1 e PM2. Foi realizada a validação por SS do paciente, porém não foi possível realizar a análise de segregação por ausência de DNA materno e paterno.

4.2.1.3. Displasia Espôndilo Epi Metafisária Tipo Leptodactílico (SEMD– JL Lepto)

O SS direcionado no éxon 4 do gene *KIF22* no paciente RFOCD261 identificou uma variante *missense* em heterozigose c.443C>T / p.Pro148Leu já descrita na literatura (10,11) confirmando o diagnóstico. Sua mãe, também afetada, apresentou a mesma variante patogênica.

O SS do éxon *hotspot* do paciente RFOCD165 não mostrou nenhuma variante. No WES a chamada de variantes retornou 22.983 genes e 284.276

variantes. Após o pipeline com os filtros, 19 genes (Quadro 4) e 27 variantes foram selecionados. Porém apenas 4 variantes em 4 genes (Apêndice 3) cumpriram os critérios de ausência de homozigotos em bancos de dados populacionais e *scores* de patogenicidade. Uma variante inédita em heterozigose c.664G>C / p.Glu222Gln no éxon 5 do gene *KIF22* foi identificada, ausente nos pais e bancos de dados. Embora essa variante não esteja localizada no éxon 4, a posição 222 está localizada no domínio motor da proteína. A predição *in silico* de dano à proteína não forneceram *scores* concordantes para considerar a variante como patogênica, a classificação ACMG a indicou como uma variante de significado incerto, contemplando as regras: PM1, PM2 e PP2; somando-se a essas regras a ausência da variante nos pais (variante de novo) através da PS2, a variante se torna Provavelmente Patogênica.

A análise no *website* HOPE mostrou que a troca do Ácido Glutâmico para a Glutamina apresenta diferenças em relação a carga (negativo para neutro), essa perda de carga pode causar perda de interações com outras moléculas, a análise no *website* I-Mutant mostrou que essa troca pode provocar uma influência na estabilidade termodinâmica da proteína causando danos a mesma.

Por se tratar de uma variante não esperada e apresentar discordâncias entre os sites de predição *in silico* somente estudos mais profundos poderão indicar a patogenicidade da mesma.

Quadro 4 Genes com variantes identificadas no paciente RFOCD165. Em destaque os genes em que as variantes apresentaram baixa frequência populacional, ausência de homozigotos e scores de patogenicidade.

HMCN1	LY75-CD302	NOD2	ROBO3	TINAG
KIF22	MAGEC1	OVGP1	SIK1	TMPRSS13
KRT4	MAML3	PABPC3	STARD9	TRAK1
KRTAP5-5	MARCO	PLXNB3	SYTL5	

4.2.1.4. Displasia Espôndilo Epi Metafisária Tipo Beighton (SEMD-JL Beighton)

A análise inicial do Painel-NGS no paciente RFOCD287 mostrou no gene B3GALT6 uma duplicação (do tipo *frameshift*) de G na posição c.588dup / p.Arg197Alafs*246 em heterozigose. Essa duplicação já foi reportada no ClinVar (ID: 427130) em pacientes com o mesmo fenótipo, e embora ainda não tenha sido descrita em artigos, está localizada no mesmo ponto de uma deleção já conhecida (c.588del / p.Arg197Alafs*81) (29). A predição *in silico* como patogênica assim como a classificação ACGM.

Ao analisar visualmente o arquivo .bam gerado no IGV, observou-se um gap de cobertura na região inicial do gene gerando a perda de cobertura dos 80 aminoácidos iniciais. O *B3GALT6* é um gene de éxon único com aproximadamente 76% de GC, o que gera uma dificuldade em sua amplificação, devido a relação genótipo-fenótipo bem definida do paciente, foi feito SS para essa região que identificou a segunda variante, uma troca de bases (do tipo *missense*) na posição c.16C>T / p.Arg6Trp, já descrita na literatura (29).

4.2.2. Outros fenótipos

4.2.2.1. OCD-IMPAD1 related (Paciente RFOCD246)

O paciente RFOCD246, apresentou uma hipótese inicial, baseada no achado radiológico da característica do fêmur para DBQD. Portanto o início do estudo se deu com a triagem do sequenciamento do gene *CANT1*. Devido ao resultado negativo e a heterogeneidade genética da condição, a estratégia empregada na tentativa de identificar o gene responsável por esse fenótipo foi o Painel-NGS.

A análise inicial do sequenciamento mostrou no gene *IMPAD1/BPNT2* uma troca de bases (do tipo *missense*) na posição c.976A>T / p.Thr326Ser em heterozigose, ausente na literatura e nos bancos de dados. Os sites de predição não mostram uma concordância entre a patogenicidade dessa variante e a classificação ACGM indica uma variante de significado incerto.

Ao analisar visualmente o arquivo .bam gerado no IGV, observou-se regiões mal cobertas nos demais éxons desse gene. Com o SS foi possível confirmar a variante identificada e sequenciar as regiões de baixa cobertura, com exceção do éxon 1 deixando um *gap* de 132 bases finais sem cobertura. Até o momento esse paciente é considerado positivo heterozigoto para o gene *IMPAD1/BPNT2*.

4.2.2.2. CDG com aparência de DBQD (Paciente RF3717)

Heredograma:



O paciente RF3717 (OF), segundo filho de um casal consanguíneo, apresentou ao exame radiológico características semelhantes a DBQD. Portanto, o direcionamento inicial do estudo molecular se iniciou com o sequenciamento dos genes *CANT1* e *XYLT1*. Devido ao resultado negativo e a ausência de outro gene candidato, a estratégia empregada na tentativa de identificar o gene responsável por esse fenótipo foi o WES no trio (paciente e genitores), uma vez que o histórico familiar sugeriu um padrão de herança autossômico recessivo.

Inicialmente a chamada de variantes retornou 22.777 genes e 256.045 variantes. Após aplicação dos filtros, 26 genes (Quadro 5) e 43 variantes foram consideradas, porém apenas 4 variantes (Apêndice 3) em 4 genes cumpriram o critério de segregação (considerando a consanguinidade familiar) e ausência de homozigotos em bancos de dados populacionais.

ABCG8	DNAH17	GUCY2C	ITGA6	NSUN2	PRUNE1	TFRC
CDT1	DSG4	HLA-DQA1	LAMA1	PDHB	RELN	WBP2
CLDN1	EMG1	HLA-DQB1	LDLR	POMT1	SLC39A8	
CYC1	GAA	HLA-H	МҮОЗА	PRODH	SOHLH1	

Quadro 5 Genes com variantes identificadas no paciente RF3717. Em destaque os genes que apresentaram as variantes homozigose no propósito segregando de forma AR.

Dos 4 genes listados, o *SLC39A8* foi considerado um gene candidato em potencial por sua função e relação com os pacientes já descritos. O *SLC39A8* (*Solute carrier family 39*) contém 8 éxons e codifica um transportador transmembrana que atua na entrada de Manganês, Zinco, Ferro Cádmio e Cobalto na célula (65). Com isso, a alteração nesse gene prejudica a ação de enzimas

dependentes desses elementos em especial o manganês, necessário para a ação das enzimas codificadas pelos genes *B4GALT1* e *B4GALT2* (presentes no Complexo de Golgi) essenciais para a biossíntese das glicoproteínas e o gene MnSOD localizado na Mitocôndria (65). Na literatura, variantes no gene *SLC39A8* estão descritas em pacientes que apresentam Doenças Congênitas da Glicosilação (CDGs), alterações esqueléticas, comprometimento neurológico e escoliose idiopática (Apêndice 3). (66–71).

A variante identificada (c.220-5T>A) no *SLC39A8* não foi encontrada em bancos de dados populacionais e está localizada na região de polipirimidina 3' de *splicing* do íntron 2. A predição *in silico* a considerou como patogênica pelo Mutation Taster e com score no CADD o que pode sugerir um efeito deletério em um local de ligação de fatores de regulação de splice, além disso, um bom score de conservação no GERP, porém foi classificada como uma variante de significado incerto (PM2 e BP4). A validação por SS foi confirmada no paciente, nos pais (heterozigose) e ausente na irmã não afetada (II-3).

4.2.2.3. OCD-KYNU (Paciente RFOCD197)

O paciente RFOCD197, filha de casal consanguíneo, apresentou características ao exame físico e radiológico que se assemelhavam a Síndrome de Catel-Mankze *like*, em especial o hiperfalangismo. Devido a sobreposição fenotípica e heterogeneidade genética, optou-se por submetê-lo ao Painel-NGS (negativo) e em seguida ao WES.

Inicialmente a chamada de variantes retornou 23.343 genes e 289.996 variantes. Após aplicação dos filtros, 16 genes (Quadro 6) e 18 variantes foram consideradas, porém apenas 8 variantes (Apêndice 3) cumpriram os critérios de ausência de homozigotos em bancos de dados populacionais e *scores* de patogenicidade. Desses, o gene *KYNU* chama a atenção devido a associação de pacientes já reportados apresentando o hiperfalangismo (8). A variante, em homozigose, está presente na região reguladora do sítio 5' de *splicing* do íntron 10 c.902+1G>A confirmada por SS no paciente e em heterozigose nos pais, embora presente em bancos de dados, sua frequência é baixa e não foi observada em homozigose. A predição *in silico* considerou como patogênica pelo Mutation Taster e

com score nos algoritmos CADD, Splice AI e GERP sugerindo um efeito deletério. A classificação ACMG indicou como Patogênica cumprindo os critérios PVS1, PM2 e PP3. Para complementação do estudo foi realizado um ensaio de metabolômica (em colaboração) no plasma e urina que indicou aumento dos metabólitos xanturenato, quinurenina e 3-hidroxiquinurenina e a não detecção de outros como o picolinato e quinolinato.

Quadro 6 Genes com variantes identificadas no paciente RFOCD197 pós filtros, em destaque os genes inicias que apresentaram as variantes homozigose no propósito.

CABP4	DHX38	EMG1	GUCY2C	KYNU	OTOG	PKD1L1	VAC14
CYC1	DNAH17	FERMT1	KRT14	NDUFC2	PEX6	TIMM50	VPS11

4.2.3. Resultados negativos ou inconclusivos

4.2.3.1. OCD-lux (Paciente RFOCD118)

O paciente RFOCD118, apresentou achados clinico-radiológicos que sugeriram uma hipótese inicial de um fenótipo atípico associado a variantes no gene *IMPAD1/BPNT2*, portanto a estratégia empregada no estudo foi o Painel-NGS (negativo) e WES.

Inicialmente a chamada de variantes retornou 23.574 genes e 315.302 variantes. Após o pipeline com os filtros, 58 genes (Quadro 7) e 64 variantes foram selecionados. Apenas 7 variantes em 7 genes (Apêndice 3) cumpriram os critérios de ausência de homozigotos em bancos de dados populacionais e *scores* de patogenicidade, porém até o momento não há um resultado molecular definido para o paciente RFOCD118.

Quadro 7 Genes com variantes identificadas no paciente RFOCD118 pós filtros. Em destaque os genes em que as variantes apresentaram baixa frequência populacional, ausência de homozigotos e scores de patogenicidade.

ABCA4	CDC27	DMP1	GALNT12	LRP2	PEX14	SLC29A3	VWF
ADA2	CDH23	DNAH11	GFAP	LRP4	PMM2	SLC4A4	ZNF469
ADAMTSL2	CEP290	DSG2	HAL	MEN1	PRKDC	SNURF	
ANAPC15	CFTR	DYSF	HBB	MGAT2	RBM20	STAT1	
ANKRD36C	CNGB3	EVC	IGSF3	MGME1	SCO1	TNPO3	
CA4	CUBN	F5	KCNT1	MYH8	SDCCAG8	TRAF3IP1	

CABP4	CYP11B1	FYC01	KIR2DL3	МҮОЗА	SH3BP2	TTLL5	
CBS	DHX38	GALK1	KMT2C	NAGA	SLC26A4	TUBA1A	

4.2.3.2. OCD-lux (Paciente RFOCD121)

O paciente RFOCD121, apresentou nos exames clínicos e radiológicos características sugestivas de uma hipótese inicial associada a DBQD, portanto a estratégia empregada no estudo foi o Painel-NGS (negativo) e WES.

Inicialmente a chamada de variantes retornou 23.483 genes e 314.615 variantes. Após o pipeline com os filtros, 53 genes (Quadro 8) e 65 variantes foram selecionados. Porém apenas 10 variantes (Apêndice 3) em 9 genes cumpriram os critérios de ausência de homozigotos em bancos de dados populacionais e *scores* de patogenicidade. Não foi possível identificar um gene responsável pelo fenótipo e até o momento não há um resultado molecular definido para o paciente RFOCD121.

patogenicidade	9.			
ACSL4	CNGB1	IGSF3	MTHFR	SLC29A3
ADA2	CRB1	ILDR1	МҮН9	SPTB
ADAMTS13	DAG1	KIR2DL3	MYL3	SPTBN2
ADAMTSL2	DNAH1	KMT2C	MYO15A	SUFU
AHI1	DNAH5	KRT8	NEB	SYNE2
AP5Z1	DSG4	LEPR	NECTIN4	TFG
ATP13A2	EVC	LOXHD1	PAX8	TTN
CABP4	FANCC	LRBA	PCNT	VPS13A
CACNA1A	FERMT1	LRP2	PKLR	ZNF469
CCDC40	ICOS	LRTOMT	PLCG2	

Quadro 8 Genes com variantes identificadas no paciente RFOCD121. Em destaque os genes em que as variantes apresentaram baixa frequência populacional, ausência de homozigotos e scores de patogenicidade.

4.2.3.3. OCD-lux (Paciente RFOCD204)

MC2R

CDC27

*IGHMBP*2

O paciente RFOCD204, de colaboração, é filha de casal consanguíneo. O estudo se iniciou fora com cariótipo e array CGH 180k sem alterações além do estudo do gene *FGFR1* relacionado a Displasia Osteoglofonica (OMIM #166250). A avaliação clinico-radiológica mostrou características sugestivas de uma hipótese inicial associada a DBQD, direcionando o estudo molecular para o Painel-NGS.

RYR2

A análise inicial considerando variantes em homozigose devido ao padrão de herança autossômico recessivo nos genes relacionados a luxação não apresentou nenhuma variante candidata. Como complementação da investigação, foram analisados os outros genes presentes no painel Painel-NGS, e foi identificada uma variante *missense* em homozigose (c.2866G>A, p.Gly956Ser) presente na posição chr6:43013137 no exon 12 do gene *CUL7* (OMIM #609577) relacionado a Síndrome 3-M, com padrão de herança autossômico recessivo.

A variante encontrada no *CUL7* ainda não foi descrita na literatura, mas já foi reportada no dbSNP, ClinVar e COSMIC (rs61750320, ID:282333, COSV54819528) porém sem associação com o fenótipo 3-M. Os sites de predição Mutation Taster, SIFT e Polyphen a consideram como patogênica e deletéria e provavelmente patogênica, respectivamente. Essa variante é rara nos bancos de frequência populacional sem homozigotos reportados. A classificação ACGM indica uma variante de significado incerto, contemplando as seguintes regras: PM2 e PP3.

Embora tenha sido encontrado uma variante patogênica não esperada não é possível afirmar que esse gene é o responsável pelo fenótipo, assim até o momento não há um resultado molecular definido para o paciente RFOCD204.

5. DISCUSSÃO GERAL

As OCD-lux com comprometimento articular major continuam sendo um grupo que apresenta um desafio no diagnóstico e embora algumas das condições se caracterizem por um fenótipo típico outras apresentam sobreposição fenotípica e heterogeneidade genética impossibilitando o estudo molecular a partir de um gene alvo.

A taxa geral de pacientes positivos na casuística de 78,5% (11/14) é maior do que outro estudo similar na literatura. Usando WES com análise de um painel direcionado à 15 genes Ranza et al.(3) investigou um grupo de 30 pacientes OCD-lux, sendo 17 deles com hipóteses diagnósticas mais bem definidas e 13 atípicos, identificando variantes patogênicas em 60% (18/30). Considerando os fenótipos mais bem definidos no presente estudo, essa positividade também é maior já que as bases moleculares foram identificadas em todos os casos, já no estudo mencionado foi de 70,5% (12/17). Considerando os fenótipos atípicos do presente estudo a taxa de pacientes com resultado positivo foi de 57,14% (4/7) maior do que estudo 46% (6/13) publicado por Ranza et al (3).

Pode-se correlacionar a gravidade fenotípica com o tipo de variante identificada em alguns casos, como o paciente RFOCD323 (DBQD-1, letal – *CANT1*) apresentando duas variantes *frameshifts* em heterozigose. Embora haja algumas variantes *missenses*, a maioria dos genótipos nessa condição apresentam ao menos uma variante *frameshift* e/ou *nonsense* (21). As variantes identificadas no paciente RFOCD287 (SEMD-JL Beighton – *B3GALT6*) corroboram com a última revisão da literatura em que 32/45 pacientes apresentam heterozigose composta no gene *B3GALT6*, sendo alguns desses presente a combinação de variante *missense* com uma *frameshift* (30)

A identificação de um paciente SEMD–JL Lepto, um fenótipo típico, com uma variante nova localizada em uma posição não esperada, contrasta com a maioria dos casos descritos (10,11). A predição *in silico* de dano à proteína não forneceu *scores* concordantes para considerar a variante como patogênica, porém, considerando a variante *de novo*, a sua classificação ACMG e sua localização no domínio motor da proteína, pode-se sugerir uma possível nova correlação. Em relação a ausência de uma segunda variante (em heterozigose) identificada em dois casos que apresentaram condições com padrão de herança AR, em um deles (RF3496) as técnicas Painel-NGS e CNV-array não foram capazes de identificar a segunda variante, e em outro (RFOCD246) embora o Painel-NGS tenha identificado uma variante, não foi possível finalizar o SS das últimas bases do exon 1. Acredita-se que no primeiro caso a segunda variante possa estar localizada em regiões não avaliadas pelos sequenciamentos ou que outros mecanismos ainda precisam ser descobertos, visto que há outros casos descritos na literatura, já no segundo caso o sequenciamento deve ser finalizado.

A partir dos resultados do WES, foi possível identificar duas novas correlações nos pacientes atípicos RF3717 e RFOCD197.

A análise do paciente RF3717 (CDG-SLC39A8 com aparência de DBQD) sugere uma nova correlação genótipo-fenótipo no gene SLC39A8. A variante identificada (c.220-5T>A) está localizada em uma região sinalizadora de splicing conhecida como trato de polipirimidina no qual se liga a subunidade U2AF65, uma variante nessa localização pode implicar em uma alteração no seu reconhecimento e processamento (72). Até o momento nove variantes já foram descritas nesse gene, entre elas missenses e uma sinônima. Com exceção de dois trabalhos que estudaram uma grande coorte de pacientes com escoliose idiopática (identificando as variantes p.A391T e p.G267=), a variante mais frequente, publicada até o momento, é a p.G38R descrita em 8 pacientes com deficiência intelectual e atrofia cerebelar e em 2 casos de CDG (66,67,69–71). Além do comprometimento neurológico, alguns pacientes descritos apresentam também alterações esqueléticas como baixa estatura, hipermobilidade articular e cifoescoliose, um caso em especial descrito por Park et al., 2015 com fenótipo de CDG II com atrofia cerebral e alterações esqueléticas chama a atenção pela similaridade com o RF3717 apresentando também uma leve projeção do troncanter menor (comunicação pessoal) e baixa estatura desproporcionada com membros encurtados.

A análise do paciente RFOCD197, inicialmente classificado como Catel Manzke-*like*, identificou uma variante patogênica em homozigose (c.902+1G>A) no gene *KYNU* responsável por codificar a enzima quinureninase, presente na conversão da niacina através da via do catabolismo do triptofano. Shi et al. (2017) descreveram dois pacientes com variantes patogênicas nesse gene apresentando

um fenótipo associado a deficiência de NAD com defeitos de segmentação, cardíacos, renais, encurtamento de membros e baixa estatura. Recentemente Ehmke et al. (2020) identificaram variantes nesse gene em três pacientes apresentando hiperfalangismo associado a defeitos cardíacos, baixa estatura e atraso de desenvolvimento, também diagnosticados inicialmente como Catel Manzke-*like* (8,45). As alterações identificadas na análise dos metabólitos presentes na via da quinurenina no paciente RFOCD197 devido a variante identificada no gene *KYNU* corrobora com os pacientes já descritos e acrescenta mais um caso à essa recente associação reforçando a correlação genótipo-fenótipo nos pacientes que apresentam hiperfalangismo sem mutações nos genes anteriormente conhecidos.

O uso do sequenciamento em larga escala parece ser o método ideal para a investigação das condições que apresentam um grupo grande de genes associados. Embora o Painel-NGS não seja indicado para descobrir novos genes, pode ser útil em casos de sobreposição fenotípica já descrita como o paciente DD/rMED/DBQD que apresentou variantes patogênicas no gene *SLC26A2/DTDST e* no paciente OCD-*IMPAD1*. A decisão sobre a escolha do uso do painel Painel-NGS ou WES deve ser um ponto a ser discutido com cautela visto que identificação e publicação de novos genes pode tornar o painel desatualizado em um curto período de tempo.

Como o painel Painel-NGS foi desenhado baseado em 85 genes de outras displasias esqueléticas, um achado não esperado foi identificado no caso RFOCD204, uma variante *missense* em homozigose no gene *CUL7*, gene relacionado a Síndrome 3-M. Embora ainda não seja possível definir uma correlação genótipo-fenótipo, manifestações esqueléticas nessa condição incluem comprometimento articular se assemelhando ao grupo do presente estudo (73).

O uso da metodologia de Sanger necessita de uma triagem clinicoradiológica bem estabelecida, deve-se, porém, considerar o tamanho do gene em questão, nesse estudo indicou um bom rendimento para os casos mais bem definidos, visto que foi possível identificar variantes em todos eles dentro do grupo OCD-lux típicos. Além disso, continua sendo útil para regiões com baixa cobertura no Painel-NGS, validação e segregação da variante nos familiares.

6. CONCLUSÕES

A alta taxa de positividade no diagnóstico de OCD-lux, em especial o grupo OCDs-lux típicos, pode ser atribuída a seleção prévia baseada em critérios clínico-radiológicos e eventualmente o uso do SS pode ser factível em fenótipos típicos direcionado ao gene alvo ou éxon *hotspot*.

Nesse estudo o Painel-NGS apresentou uma estratégia com bom rendimento diagnóstico visto que:

- Os diagnósticos inicias dos quatro pacientes OCD-lux típicos se confirmaram com o estudo molecular;
- Embora o Painel-NGS não seja indicado para descobrir novos genes, pode ser útil em casos de sobreposição fenotípica, porém com uma boa hipótese diagnóstica como em dois casos OCD-lux atípicos.

A abordagem do WES foi fundamental para confirmar a correlação entre a variante identificada no gene *KIF22* e o paciente SEMD–JL Lepto, além disso, para o grupo OCD-lux atípico sua utilização nesse estudo foi possível:

- Identificar uma possível correlação entre o gene SLC39A8 e o paciente CDG-SLC39A8 with DBQD appearance;
- Identificar a correlação genótipo-fenótipo no gene KYNU no paciente OCD-KYNU related.

A técnica de Painel-NGS e WES em três OCD-lux atípicos sem bases moleculares definidas reforçam a complexidade dos fenótipos das OCDs que apresentam um comprometimento articular *major*, o que favorece a continuidade do estudo com outras tecnologias como por exemplo o sequenciamento completo do genoma.

7. REFERÊNCIAS

- Mortier GR, Cohn DH, Cormier-Daire V, Hall C, Krakow D, Mundlos S, et al. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2019 revision. Am J Med Genet Part A. 2019;179(12):2393–419.
- 2. van Koningsbruggen S, Knoester H, Bakx R, Mook O, Knegt L, Cobben JM. Complete and partial XYLT1 deletion in a patient with neonatal short limb skeletal dysplasia. Am J Med Genet Part A. 2016;170(2):510–4.
- Ranza E, Huber C, Levin N, Baujat G, Bole-Feysot C, Nitschke P, et al. Chondrodysplasia with multiple dislocations: comprehensive study of a series of 30 cases. Clin Genet. 2017;91(6):868–80.
- Beighton P, Giedion A, Gorlin R, Hall J, Horton B, Kozlowski K, et al. International classification of osteochondrodysplasias. Eur J Pediatr. 1992;151:407–15.
- 5. Larsen L, Schottstaedt E, Bost F. Multiple congenital dislocations associated with characteristic facial abnormality. J Pediatr. 1950;37(4):574–81.
- 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 Biol [Internet]. 2013;32(7–8):387–92. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2013.05.001
- 7. Paganini C, Costantini R, Superti-Furga A, Rossi A. Bone and connective tissue disorders caused by defects in glycosaminoglycan biosynthesis: a panoramic view. FEBS J. 2019;286(15):3008–32.
- Ehmke N, Cusmano-Ozog K, Koenig R, Holtgrewe M, Nur B, Mihci E, et al. Biallelic variants in KYNU cause a multisystemic syndrome with hand hyperphalangism. Bone [Internet]. 2020;133:115219. Available from: https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.115219
- 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;16(14):1661–75.
- Min B, Kim N, Chung T, Kim O, 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 [Internet]. 2011;89(6):760–6. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.10.015
- Boyden ED, Campos-xavier AB, Kalamajski S, Cameron TL, Suarez P, Tanackovich 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;89(6):767–72.
- 12. 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;24(8):1206–10.

- Lim P, Lindert U, Optiz L, Hausser I, Rohrbach M, Giunta C. Transcriptome Profiling of Primary Skin Fibroblasts Reveal Distinct Molecular Features Between Fibroblasts and FKBP14-Kyphoscoliotic Ehlers-Danlos Syndrome. Genes (Basel). 2019;10(7):517.
- Patel N, Shamseldin HE, Sakati N, Khan AO, Softa A, Al-Fadhli FM, et al. GZF1 Mutations Expand the Genetic Heterogeneity of Larsen Syndrome. Am J Hum Genet [Internet]. 2017;100(5):831–6. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.04.008
- Zeng L, Li Z, Pan L, Li H, Wu J, Yuan X, et al. Novel GZF1 pathogenic variants identified in two Chinese patients with Larsen syndrome. Clin Genet. 2020;99(2):281–5.
- 16. Tüysüz B, Saliha Y, Erener-ercan T. Spondyloepimetaphyseal dysplasia with joint laxity, leptodactylic type: longitudinal observation of radiographic findings in a child heterozygous for a KIF22 mutation. Pediatr Radiol. 2014;45(5):771–6.
- 17. Hall CM, Elçioglu NH, Shaw DG. A distinct form of spondyloepimetaphyseal dysplasia with multiple dislocations. J Med Genet. 1998;35(7):566–72.
- Ritelli M, Cinquina V, Giacopuzzi E, Venturini M, Chiarelli N, Colombi M. Further defining the phenotypic spectrum of B3GAT3 mutations and literature review on linkeropathy syndromes. Genes (Basel). 2019;10(9):1–19.
- Huber C, Oulès B, Bertoli M, Chami M, Alanay Y, Al-gazali LI, et al. Identification o f CANT1 Mutations in Desbuquois Dysplasia. Am J Hum Genet. 2009;85(13):706–10.
- Kim O, Nishimura G, Song H, 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;152A(4):875–85.
- 21. Kuang L, Liu B, Peng R, Xi D, Gao Y. Original Article A novel homozygous variant in CANT1 causes Desbuquois dysplasia type 1 in a Chinese family and review of literatures. Int J Clin Exp Pathol. 2020;13(8):2137–42.
- Paganini C, Monti L, Costantini R, Besio R, Lecci S, Biggiogera M, et al. Calcium activated nucleotidase 1 (CANT1) is critical for glycosaminoglycan biosynthesis in cartilage and endochondral ossification. Matrix Biol [Internet]. 2019;81:70–90. Available from: https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.11.002
- Vodopiutz J, Mizumoto S, Lausch E, Rossi A, Unger S, Janocha N, et al. Chondroitin Sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase-1 (CSGalNAcT-1) Deficiency Results in a Mild Skeletal Dysplasia and Joint Laxity. Hum Mutat. 2017;38(1):34–8.

- Kuroda Y, Murakami H, Enomoto Y, Tsurusaki Y, Takahashi K, Mitsuzuka K, et al. A novel gene (FAM20B encoding glycosaminoglycan xylosylkinase) for neonatal short limb dysplasia resembling Desbuquois dysplasia. Clin Genet. 2019;95(6):713–7.
- 25. Byrne AB, Mizumoto S, Arts P, Yap P, Feng J, Schreiber AW, et al. Pseudodiastrophic dysplasia expands the known phenotypic spectrum of defects in proteoglycan biosynthesis. J Med Genet. 2020;57(7):454–60.
- Cartault F, Munier P, Jacquemont ML, Vellayoudom J, Doray B, Payet C, et al. Expanding the clinical spectrum of B4GALT7 deficiency: Homozygous p.R270C mutation with founder effect causes Larsen of Reunion Island syndrome. Eur J Hum Genet. 2015;23(1):49–53.
- 27. Beighton P, Kozlowski K. Spondylo-Epi-Metaphyseal Dysplasia with Joint Laxity and Severe, Progressive Kyphoscoliosis. Skeletal Radiol. 1980;5(4):205–12.
- 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 [Internet]. 2013;92(6):935–45. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.04.016
- 29. 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;92(6):927–34.
- Caraffi Giuseppe S, Maini I, Ivanovski I, Pollazzon M, Giangiobbe S, Valli M, et al. Severe Peripheral Joint Laxity is a Distinctive Clinical Feature of Spondylodysplastic-Ehlers-Danlos Syndrome (EDS)-B4GALT7 and Spondylodysplastic-EDS-B3GALT6. Genes (Basel). 2019;10(10):799.
- Chen YH, Narimatsu Y, Clausen TM, Gomes C, Karlsson R, Steentoft C, et al. The GAGOme: a cell-based library of displayed glycosaminoglycans. Nat Methods. 2018;15(11):881–8.
- 32. Koike T, Izumikawa T, Tamura JI, Kitagawa H. FAM20B is a kinase that phosphorylates xylose in the glycosaminoglycan-protein linkage region. Biochem J. 2009;421(2):157–62.
- Thiele H, Sakano M, Kitagawa H, Sugahara K, Rajab A, Höhne W, et al. Loss of chondroitin 6-O-sulfotransferase-1 function results in severe human chondrodysplasia with progressive spinal involvement. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(27):10155–60.
- Tuysuz B, Mizumoto S, Sugahara K, Çelebi A, Mundlos S, Turkmen S. Omanitype spondyloepiphyseal dysplasia with cardiac involvement caused by a missense mutation in CHST3. Clin Genet. 2009;75(4):375–83.

- 35. Tanteles GA, Dixit A, Dhar S, Suri M. Two somali half-siblings with CHST3related chondrodysplasia illustrating the phenotypic spectrum and intrafamilial variability. Am J Med Genet Part A. 2013;161A(10):2588–93.
- 36. Waryah AM, Shahzad M, Shaikh H, Sheikh SA, Channa Naseem A., Hufnagel RB, et al. A novel CHST3 allele associated with Spondyloepiphyseal dysplasia and hearing loss in Pakistani kindred. Clin Genet. 2016;90(1):90–5.
- Bugrahan M, Topak A. Recurrent c . 776T > C mutation in CHST3 with four other novel mutations and a literature review. Clin Dysmorphol. 2020;29(4):167–72.
- 38. Superti-furga A, Rossi A, Steinmann B, Gitzelmann R. A Chondrodysplasia Family Produced by Mutations in the Diastrophic Dysplasia Sulfate mansporter Gene : GenotypePhenotype Correlations. Am J Med Genet. 1996;63:144–7.
- Miyake A, Nishimura ÆG, Futami ÆT, Furuichi T, Ikegawa ÆS. A compound heterozygote of novel and recurrent DTDST mutations results in a novel intermediate phenotype of Desbuquois dysplasia, diastrophic dysplasia, and recessive form of multiple epiphyseal dysplasia. J Hum Genet. 2008;53(8):764–8.
- Panzer KM, Lachman R, Modaff P, Pauli RM. Clinical Report A Phenotype Intermediate Between Desbuquois Dysplasia and Diastrophic Dysplasia Secondary to Mutations in DTDST. Am J Med Genet Part A. 2008;146A(22):2920–4.
- 41. Vissers ELML, Lausch E, Unger S, Campos-xavier AB, 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;13(88):608–15.
- Nizon M, Alanay Y, Tuysuz B, Ozlem P, Kiper S, Genevi D, et al. IMPAD1 Mutations in Two Catel-Manzke Like Patients. Am J Med Genet Part A. 2012;158A(9):1–5.
- 43. Ehmke N, Caliebe A, Koenig R, Kant SG, Stark Z, Cormier-Daire V, et al. Homozygous and compound-heterozygous mutations in TGDS cause catelmanzke syndrome. Am J Hum Genet. 2014;95(6):763–70.
- 44. Temtamy SA, Meguid N, Ismall S, Ramzy M. A new multiple congenital anomaly, mental retardation syndrome with preaxial brachydactyly, hyperphalangism, deafness and orodental anomalies. Clin Dysmorphol. 1998;7(4):249–55.
- 45. Shi H, Enriquez A, Rapadas M, Martin EMMA, Wang R, Moreau J, et al. NAD Deficiency, Congenital Malformations, and Niacin Supplementation. N Engl J Med. 2017;377(6):544–52.
- 46. Tian J, Ling L, Shboul M, Lee H, Connor BO, Merriman B, et al. Loss of CHSY1, a Secreted FRINGE Enzyme, Causes Syndromic Brachydactyly in

Humans via Increased NOTCH Signaling. Am J Hum Genet [Internet]. 2010;87(6):768–78. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.11.005

- Sambrook J, Russel DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Third Edit. Angewandte Chemie International Edition, 6(11), 951–952. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- Sobreira N, Schiettecatte F, Boehm C, Valle D, Hamosh A. New tools for Mendelian disease gene identification: PhenoDB variant analysis module; and GeneMatcher, a web-based tool for linking investigators with an interest in the same gene. Hum Mutat. 2015;36(4):425–31.
- 49. Faria A, Caraciolo M, RM M, TF A, SM P, MC C, et al. Varstation: a complete and efficient tool to support NGS data analysis. bioRxiv 833582. 2019;https://doi.org/10.1101/833582.
- 50. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative Genome Viewer. Nat Biotechnol. 2011;29(1):24–6.
- 51. Kopanos C, Tsiolkas V, E AKC, Monica C, Aguilera A, Meyer R. VarSome: The Human Genomic Variant Search Engine. Bioinformatics. 2018;11(35):1978–80.
- 52. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015;17(5):405–24.
- 53. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. Nature. 2020;581(7809):434–43.
- 54. Naslavsky MS, Yamamoto GL, de Almeida TF, Ezquina SAM, Sunaga DY, Pho N, et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. Hum Mutat. 2017;38(7):751–63.
- Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2 : mutation prediction for the deep-sequencing age. Nat Publ Gr [Internet].
 2014;11(4):361–2. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2890
- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations a. Nat Publ Gr [Internet]. 2010;7(4):248–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nmeth0410-248
- 57. Vaser R, Adusumalli S, Leng SN, Sikic M, Ng PC. protocol UPDATE SIFT missense predictions for genomes. Nat Protoc [Internet]. 2015;11(1):1–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015-123
- 58. Capriotti E, Fariselli P, Casadio R. I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. 2005;33:306–10.

- 59. Venselaar H, Ah T, Kuipers RKP, Hekkelman ML, Vriend G. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. 2010;
- 60. Dunnen JT Den. Describing Sequence Variants Using HGVS Nomenclature. In: Methods in Molecular Biology. 2017. p. 243–51.
- Lefter M, Vis JK, Vermaat M, Dunnen JT Den, Taschner EM, Laros JFJ. Mutalyzer 2 Next Generation HGVS Nomenclature Checker. In: Oxfort University Press. 2021. p. 1–8.
- 62. Superti-Furga A, Hastbacka J, Wilcox WR, Cohn DH, Van der Harten HJ, Rossi A, et al. Achondrogenesis type IB is caused by mutations in the diastrophic dysplasia sulphate transporter gene. Nat Genet. 1996;12(1):100–2.
- 63. Hastbacka J, William AS, 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;58(2):255–62.
- 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 [Internet]. 2011;19(11):1133–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2011.101
- 65. Nebert DW, Liu Z. SLC39A8 gene encoding a metal ion transporter: Discovery and bench to bedside. Hum Genomics. 2019;13(51).
- Park JH, Hogrebe M, Grüneberg M, Duchesne I, Von Der Heiden AL, Reunert J, et al. SLC39A8 Deficiency: A Disorder of Manganese Transport and Glycosylation. Am J Hum Genet. 2015;97(6):894–903.
- Boycott KM, Beaulieu CL, Kernohan KD, Gebril OH, Mhanni A, Chudley AE, et al. Autosomal-Recessive Intellectual Disability with Cerebellar Atrophy Syndrome Caused by Mutation of the Manganese and Zinc Transporter Gene SLC39A8. Am J Hum Genet. 2015;97(6):886–93.
- Riley LG, Cowley MJ, Gayevskiy V, Roscioli T, Thorburn DR, Prelog K, et al. A SLC39A8 variant causes manganese deficiency, and glycosylation and mitochondrial disorders. J Inherit Metab Dis [Internet]. 2017;40(2):261–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s10545-016-0010-6
- Haller G, McCall K, Jenkitkasemwong S, Sadler B, Antunes L, Nikolov M, et al. A missense variant in SLC39A8 is associated with severe idiopathic scoliosis. Nat Commun [Internet]. 2018;9(1). Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-06705-0
- Xu L, Wang Y, Wu Z, Dai Z, Liu Z, Qiu Y, et al. A Novel Coding Variant in SLC39A8 Is Associated with Adolescent Idiopathic Scoliosis in Chinese Han Population. Spine (Phila Pa 1976). 2020;45(4):226–33.

- 71. Park JH, Mealer RG, Elias AF, Hoffmann S, Grüneberg M, Biskup S, et al. Nglycome analysis detects dysglycosylation missed by conventional methods in SLC39A8 deficiency. J Inherit Metab Dis. 2020;43(6):1370–81.
- 72. Anna A, Monika G. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. J Appl Genet. 2018;59(3):253–68.
- 73. Badina A, Pejin Z, Odent T, Buzescu A, Glorion C. Hip dislocation in 3-M syndrome : risk of misdiagnosis. Clin Dysmorphol. 2011;20:114–6.

8. APÊNDICES

Paciente	Profundidade média da região de cobertura (100x)	Uniformidade (%)	10X	Cobert região a 20x	ura da Ilvo (%) 30x	Valor Q30 (%)	Leituras total PF	
RF3496	87,50	87,61	93,60	86,68	82,25	72,22	92,06	355.700
RFOCD323	25,40	86,33	79,83	59,81	37,77	8,73	98,51	96.346
RFOCD165	143,50	88,00	95,70	92,50	89,60	83,40	92,77	538.788
RFOCD287	38,20	89,59	87,54	76,20	61,57	29,37	98,32	150.576
RFOCD289	120,30	85,60	94,10	89,60	85,50	76,50	95,30	435.266
RFOCD246	16,30	84,92	65,72	35,00	14,34	1,84	92,97	61.872
RFOCD197	77,70	87,50	90,65	85,38	79,93	67,82	93,17	302.952
RFOCD118	116,20	87,60	95,00	91,20	87,40	79,10	94,50	430.432
RFOCD121	84,40	87,12	90,64	85,67	80,68	70,01	94,94	318.920
RFOCD204	117,10	85,10	93,60	88,70	84,00	73,70	94,50	427.164
Média	82,7	86.9	88,6	79,1	70,3	56,3	94,7	311.802

8.1. Apêndice 1 Tabela - Resumo das métricas de cobertura do Painel-NGS.

Q30: 1 erro em 1.000 chamadas de base ou uma precisão de 99.9%; PF: sequências *passing filter* identificadas no sequenciador.

Paciente	Profundidad e média da região de cobertura (100x)	Uniformidade (%)	10x	Cober 20x	tura Alv 30x	/ o (%) 50x	100x	Valor Q30 (%)	Leituras total PF
REOCD165	44	71.00	69.00	55.00	45.00	30.00	12.00	92.26	36 110 164
RFOCD3717	43	63 37	64 57	52 30	40,00	32 72	14 24	92,20	32 894 339
RF3717M	45	74 57	74 58	59 58	49 51	35.09	13 42	94 43	34 558 105
RF3717P	48	79.07	79.08	63.03	52.16	36.99	14.84	93.85	37.650.778
RFOCD197	61	96.00	98.00	91.00	79.00	52.00	14.00	91.30	30.285.510
RFOCD118	69	99,11	98,85	93,99	85,08	58,43	18,90	90,73	35.704.086
RFOCD121	62	99,05	98,58	93,30	82,15	54,67	16,43	89,14	34.894.503
				,	,	,	,	, i i i i i i i i i i i i i i i i i i i	
Média	53,14	83,60	83,24	72,60	62,46	42,84	14,83	92,04	34.585.355

8.2. Apêndice 2 Tabela - Resumo das métricas de cobertura do WES.

Q30: 1 erro em 1.000 chamadas de base ou uma precisão de 99.9%; PF: sequências passing filter identificadas no sequenciador.

				Predição in silico						Varsome (ACMG)	
Gene (transcrito)			dbSNP/	Polyphen			CADD-				
posição da variante	Fenótipo Associado (PH)	Variante (zig)	ClinVar	2	SIFT	МТ	Splice	SpliceAl	GERP	Critérios	Class.
Paciente RFOCD165											
KIF22											
(NM_007317)		c.664G>C									
chr16:29810410	SEMD-JL Lepto	p.Glu222Gln (htz)	-	B/B	Т	Р	NA	0,11	5,94	PM1, PM2, PP2	VUS
LY75-CD302		c.1574G>A									
(NM_001198759)		p.Gly525Ala (htz)									
chr2:160735174	-		rs147820690	PossP	Т	Ρ	NA	NA	4,42	PM2, PP3,BP1	VUS
MARCO											
(NM_006770)		c.956G>1			_						
chr2:119739786	-	p.Gly319Val (htz)	rs147907250	PossP	Р	Р	NA	NA	4,65	PM2, PP2, BS1	VUS
PABPC3		- 601 4. 6									
(NM_030979.3)				Deep	_		N1.0	N1.0	0.00		1/1/0
chr13:25671027	-	p.Lysz31Giu (ntz)	rs78826513	POSSP	Р	Р	NA	NA	0,99	PMZ, BP4	VUS
Paciente RF3717	-										
CDT1		4070 450 T									
(NM_030928.4)		c.1276-15C>1				-			4.50		1.4.10
chr16:88873674	Sindrome Meier-Gorlin (AR)	p.?(hmz)	rs/54/3580/	NA	NA	В	5,41	0,11	4,53	PM2, BP4	VUS
МҮОЗА		c.1053+11_1053+12inv									
(NM_017433.5)		(GT>TG)									
chr:10:26356014-26356015	Surdez (AR)	p.? (hmz)	rs386742099	NA	NA	В	NA	NA	5,44	PM2, BP4	VUS
SLC39A8		- 000 FT A									
(NM_001135146.2)	Doença Congenita da	C.22U-51>A			N 1 A		40.00	0.04	5 00		1/1/0
chr4:103236992	Glicosliação tipo IIn (AR)	p.? (nmz)	-	NA	NA	Р	16,92	0,04	5,36	PIMZ, BP4	VUS
TFRC		C.1678-5_1678-4INV									
(NM_001128148.3)			000070400			-			5.04		1410
chr3:195782176-195782177	Imunodeficienica 46 (AR)	p.? (nmz)	rs386670122	NA	NA	в	NA	NA	5,34	PM2, BP4	VUS
Paciente RFOCD197											
CABP4		c.541+7_541+8delinsG									
(NM_145200.4)	Distrofia Cone-rod sináptica	С	rs34039523/								
chr11:67223920-67223921	congênito não progressivo (AR)	p.? (hmz)	ID262579	NA	NA	В	NA	NA	2,18	PM2, BP4	VUS
DNAH17											
(NM_173628.4)		c.5955_5956delinsCC									
chr17:76491127-76491128	Falha Espermatogênica (AR)	p.Met1986Val (hmz)	rs34426129	NA	NA	Р	NA	NA	ND	PM1, PM2, PP3,BP1	VUS
FERMT1											
(NM_017671.4)		c.1575_1577delinsGAA	rs386812146/								
chr20:6065729-6065731	Síndrome Kindler (AR)	p.Arg526Lys (hmz)	ID339213	NA	NA	Р	NA	NA	5,17	PM2, PP3, BP1	VUS
GUCY2C	Diarreia crônica 6 (AD);	c.612-16_612-									
(NM_004963.4)	Obstrução intestinal no recém-	15delCTinsA	rs386760622	NA	NA	Р	NA	NA	ND	PM2, BP4	VUS

8.3. Apêndice 3 Caracterização e classificação das variantes identificadas por WES após filtros.

chr12:14834426-14834427	nascido(AR)	p.? (hmz)									
KYNU	Síndrome de anomalias										
(NM 003937.3)	congénitas vertebral-cardíaco-	c.902+1G>A									
chr2:143743591	renal e membros (AR)	p.? (hmz)	rs754953201	NA	NA	Р	33	0,94	5,84	PVS1, PM2, PP3	Р
PEX6											
(NM_000287.4)	Síndrome Heimler (AR);	c.2814_2816delinsTGT									
chr6:42932200-42932202	Síndrome de Zellweger (AR, AD)	p.Pro939GIn (hmz)	rs386700658	NA	NA	Р	NA	NA	5,84	PM2, PP2, BP4	VUS
VAC14											
(NM_018052.5)	Sindrome da degeneração	c.1312G>A			_	_					
chr16:70796502	estriatonigral (AR)	p.Arg4381rp (hmz)	rs142411323		Р	Р	NA	NA	5,90	PM2, PP2, PP3	VUS
VPS11		c.1748_1749insAGGCT									
(NM_021729.6)	Leucodistrofia hipomelizante	GCAGGGIG				_					
chr11:118948766	(AR)	p.Ala587Valfs*8 (hmz)	rs1565743228	NA	NA	Р	NA	NA	5,38	PM2, PP3	VUS
Paciente RFOCD118											
ANAPC15											
(NM_014042.3)		c.296C>T	rs531848254/								
chr11:71821156	-	p.Pro99Leu (htz)	ID306014	В	Р	Р	NA	NA	ND	PP3, BS1	VUS
	Homocistunúria tipo B6-										
CBS	responsiva e não responsiva,										
(NM_001178008.2)	trombose e	c.833T>C	rs5742905/							PP5,PM2, PM5, PP2,	
chr21:44483184	hiperhomocisteinemia (AR)	p.lle278Thr (htz)	ID120	Р	Р	Р	NA	NA	3,51	PP3	Р
	Miopatia de Miyoshi tipo 1,										
DYSF	Distrofia muscular limb-girdle AR										
(NM_003494.4)	2, Miopatia distal com início tibial	c.3702+9G>T	rs191746041/I								
chr2:71825884	anterior (AR)	p? (htz)	D163303	NA	NA	Р	7,35	0.00	5,40	PM2, BP4	VUS
I RP4	Miastenia Congênita 17.										
(NM 002334 4)	Sindactilia tipo Cenani-Lenz	c.4493G>A	rs764079526/								
chr11:46894741	Esclerosteose 2 (AR, AD)	p.Arg1498Gln (htz)	ID467789	Р	Р	Р	NA	NA	-0,68	PM2,PP2, PP3	VUS
PMM2											
(NM_000303.3)	Doença Congênita da	c.422G>A	rs28936415/							PP5,PM1,	
chr16:8905010	Glicosilação tipo la (AR)	p.Arg141His (htz)	ID7706	Р	Р	Ρ	NA	NA	5,42	PM2,PM5,PP2, PP3	Р
SLC26A4	Surdez AR 4 com Síndrome de										
(NM_000441.2)	Pendred com aqueduto vestibular	c.1616T>C	rs146269871/								
chr7:107340529	alargado	p.lle539Thr (htz)	ID229253	В	Р	Р	NA	NA	5,65	PM1,PM2, PP3, BP1	PP
SLC4A4											
(NM_001134742)	Acidose tubular renal proximal,	c.2311C>T	rs140882617/			_					
chr4:72399974	com anomalias oculares (AR)	p.Pro771Ser (htz)	ID349550	В	Т	Р	NA	NA	ND	PM2,PP2, BP4	VUS
Paciente RFOCD121											
CDC27 (NM 001114091.4)		c.4A>G	rs62077280/								
chr17:45266535	-	p.Thr2Ala (htz)	ID691419	PossP	Р	Р	NA	NA	ND	PM2, BP4	VUS
DNAH1											
(NM_015512.5)	Discinesia ciliar primária (AR),	c.9560A>G	rs201903736/								
chr3:52423541	Falha espermatogênica	p.His3187Arg (htz)	ID837083	PossP	Т	Р	NA	NA	3,71	PM2, PP2, BP4	VUS
FERMT1		c.1575_1577delinsGAA	rs386812146/								
(NM_017671.5)	Síndrome Kindler (AR)	p.Arg526Lys (htz)	ID339213	NA	NA	Р	NA	NA	5,17	PM2, PP3,BP1	VUS

chr20:6065729-6065731											
<i>IGSF</i> 3 (NM_001542.4) chr1:117142868	Defeito do Ducto lacrimal(AR)	c.1784G>A p.Trp595Ter (htz)	rs61730489	NA	NA	Р	NA	NA	4,57	PVS1, PM2, PP3, PP5	Р
<i>ILDR1</i> (NM_175924.4) chr3:121720640	Surdez AR 42	c.451G>A p.Gly151Arg (htz)	rs727503098/ ID163701	Р	Р	Р	NA	NA	5,13	PM1, PM2, PP3, BP1	VUS
<i>LRBA</i> (NM_001199282.2) chr4:151357970		c.6827G>A p.Arg2276His (htz)	rs200802435/ ID837277	Р	Р	Р	NA	NA	5,71	PM2, PP3	VUS
<i>LRBA</i> (NM_001199282.2) chr4:151749437	Imunodeficiência devido a défice de LRBA (AR)	c.5066C>T p.Pro1689Leu (htz)	rs779150358/ ID643322	в	Р	Р	NA	NA	5,71	PM2, PP3	VUS
<i>KMT2C</i> (NM_170606.3) chr7:151927023	Síndrome Kleefstra 2 (AD)	c.2961C>G p.Tyr987Ter (htz)	rs58528565/ ID694634	NA	NA	Р	NA	NA	2,89	PVS1, PM2, PP3	Р
MYH9 (NM_002473.6) chr22:36712669	Surdez AD 17, Macrotrombocitopenia	c.1273A>T p.Met425Leu (hmz)	rs961182177	в	т	Р	NA	NA	5,09	PM1, PM2, PP2	VUS
NECTIN4 (NM_030916.3) chr1:161042657	Displasia ectodérmica - sindactilia (AR)	c.1327C>T p.Arg443Cys (htz)	rs1537044/ ID418440	P	Р	P	NA	NA	4,84	PM2, PP2, PP3	VUS

-: ausente; B: benigna; hmz: homozigoto, NA: não aplicável; PH: padrão de herança; P: patogênica; VSU: variante de significado incerto.

Predição in silico:

-CADD Splice: *score* ≥ 10 (predição da variante estar entre as 10% mais deletérias); ≥ 20 (indica a variante presente entre as 1% mais deletérias no genoma humano)

-GERP: score range -12,3 a 6,17 sendo 6,17 o valor mais conservado.

-Mutation Taster (MT): P: patogênico (disease causing)

-Polyphen: Patogênico (P); Possivelmente patogênico (PossP); Benigno (B)

-SIFT: Tolerado (T); Patogênico (P)

- SpliceAl lookup: score range 0-1, resultados próximos 1 possuem com maior chance de afetar o splicing

8.4. Apêndice 4 Descrição dos critérios ACMG presente nas classificações

das variantes.

Critérios	DESCRIÇÃO					
BP1	Variante <i>missense</i> em um gene no qual variantes de truncamento são primariamente conhecidas como causadoras de doenças					
BP4	Múltiplas linhas de evidências computacionais sugerem nenhum impacto no gene ou no produto do mesmo (conservação, evolutivo, impacto no splicing)					
BS1	Frequência alélica é maior que a esperada para a doença					
PM1	Localizada em um <i>hotspot</i> de mutacional e/ou crítico e domínio bem de função estabelecido (e.g. local ativo de uma enzima)					
PM2	Ausente nos controles (ou em frequência extremamente baixa se recessiva) no Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project ou no Exome Aggregation Consortium					
PM5	Nova mudança <i>missense</i> em uma posição em que uma <i>missense</i> , determinada como patogênica, foi vista anteriormente					
PP2	Variante <i>missense</i> em um gene que tem uma baixa taxa de <i>missense</i> benignas e que variantes <i>missense</i> são um mecanismo de doença conhecido					
PP3	Múltiplas linhas de evidências computacionais indicam um efeito deletério no gene ou no produto do gene (conservação, evolutivo, impacto no <i>splicing</i> , etc.)					
PP5	Fonte respeitável classifica a variante como patogênica, mas a evidência não está disponível para que o laboratório faça uma avaliação independente					
PVS1	Variante nula (sem sentido, <i>frameshift</i> , canônica com ± 1 ou 2 locais de splice, códon de inicialização, deleção de um ou múltiplos éxons) em um gene no qual a perda de função é um mecanismo de doença conhecido					
PS2	Variante de novo (com maternidade e paternidade confirmadas) em um paciente com doença e sem histórico familiar					

8.5. Apêndice 5 Variantes no gene SLC39A8 descritas na literatura e seus

Variante (SLC39A8)	Fenótipo	Referência	
c.[112G>C];[1019T>A]	CDG II com atrofia cerebral e alterações		
p.[G38R];[I340N]	esqueléticas	(66)	
c.[610G>T;[97G>A;1004G>C]	Atrofia cerebelar	(00)	
p.[G204C];[V33M;S335T]			
c.[112G>C];[112G>C]	Deficiência intelectual com atrofia cerebelar	(67)	
p.[G38R];[G38R]		(07)	
c.[338G>C];[338G>C]	CDG II	(68)	
p.[C113S];[C113S]		(00)	
c.[1171G>T];[1171G>T]	Escoliose Idiopática grave	(69)	
p.[A391T];[A391T]		(00)	
c.[801A>G];[c.801A>G]	Escoliose Idiopática em adolescentes	(70)	
p.[G267=];[G267=]		(10)	
c.[608T>C];[608T>C]			
p.[F203S];[F203S]	CDG	(71)	
c.[112G>C];[112G>C]			
p.[G38R];[G38R]			
c.[200-5T>A];[200-5T>A]		RF3717	
p?	CDG com aparência de DBQD		

respectivos fenótipos

8.6. Apêndice 6 Artigo - Another intermediate phenotype associated with SLC26A2/DTDST among a cohort of twelve patients, and a comprehensive review of the genotype-phenotype correlation

Cynthia Silveira¹, Karina da Costa Silveira^{1#}, Maria Dora Lacarrubba-Flores¹, Maurício Takeshi Sakata¹, Silvia Nora Carbognani³, Juan Llerena Jr.⁴, Carolina Araujo Moreno², Denise Pontes Cavalcanti^{1,2}

¹ Skeletal Dysplasia Group, Department of Translational Medicine, Faculty of

Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, (São Paulo), Brazil

² Perinatal Genetic Program, Department of Translational Medicine, University

of Campinas, Campinas, (São Paulo), Brazil

³ Maternidad Oroño, Rosario, Santa Fé, Argentina.

⁴ Centro de Genética Médica & Centro de Referência para Doenças Raras -IFF/Fiocruz - Brazil

INAGEMP, Brazil.

Running head: SLC26A2/DTDST spectrum/intermediate phenotype

*Corresponding Author

Denise Pontes Cavalcanti

Skeletal Dysplasia Group, Department of Translational Medicine, University of Campinas

Campinas

Tessália Vieira de Camargo, 126

Campinas, São Paulo, 13083-887, Brazil

Tel: + 55 19 35210385

E-mail: denisepcavalcanti@gmail.com

Current position at Department of Medical Genetics, University of Alberta,

Edmonton, Alberta, Canada

Keywords: Skeletal dysplasias, SLC26A2/DTDST, Swedish key proximal femur

Abstract

The SLC26A2/DTDST gene is associated with two lethal conditions -Achondrogenesis 1B (ACG-1B) and Atelosteogenesis 2 (AO-2), a severe dysplasia -Diastrophic dysplasia (DD), and a mild phenotype – recessive-Multiple Epiphyseal Dysplasia (rMED). In this study, we describe a third patient with an intermediate phenotype who shared features of DD, rMED, and also of the Desbuquois Dysplasia (DBQD), related to a genotype in which a severe mutation is associated with the most common variant p.R279W in this gene. A comprehensive review on genotypephenotype correlation, including a local cohort of 12 patients, was also performed. The main results and conclusions are as follows. rMED is the most common phenotype usually associated with the homozygous (hmz) genotype - p.R279W. Unlike, compound heterozygous (chtz) is more associated with DD. Despite a large number of variants (38) among patients with known genotypes, only eight are recurrent with a frequency of around 3% or more (p.R279W, p.C653S, c.-26+2T>C, p.R178*, p.K575Sfs*10, p.V340del, p.G663R, p.T512K). While the two first variants in hmz are associated with rMED, the last three, also in hmz, are related to the lethal phenotypes. The Finnish mutation (c.-26+2T>C), so far only in compound heterozygous outside Finland, has been associated with all four classical phenotypes. The p.R178*, p.K575Sfs*10 variants should be viewed as lethal mutations since both were mainly described with lethal phenotypes and were never reported in hmz. The existence of nine patients with only one mutated allele, suggests that other mutations in the other allele of these patients still need to be unveiled.

1. Introduction

Pathogenic variants in the *SLC26A2/DTDST* (solute carrier family 26 member 2/diastrophic dysplasia sulfate transporter) gene lead to a well-recognized spectrum of skeletal dysplasias (SD) ranging from lethal to mild phenotype. This spectrum, classically includes two lethal conditions - achondrogenesis type 1B (ACG-1B, OMIM #600972) and atelosteogenesis type 2 (AO-2, OMIM #256050), a severe, but not lethal dysplasia - diastrophic dysplasia (DD, OMIM #22600), and a mild phenotype - recessive-Multiple epiphyseal dysplasia (rMED, OMIM #226900) [Superti-Furga et al., 1996b]. Beyond the clinical-radiological variability inside of each phenotype,

some authors described some patients with overlap between two of them into the classic spectrum and named them as intermediate phenotypes. For instance - ACG-1B/AO-2, AO-2/DD, and DD/rMED [Rossi et al., 1996b; Mégarbane et al., 1999; Unger et al., 2001; Maeda et al., 2006; Czarny-Ratajczak et al., 2010; Barbosa et al., 2011; Mattos et al., 2014]. Simultaneously two patients, also named as having an intermediate phenotype, were described with the Swedish key, a typical feature of Desbuquois dysplasia (DBQD) - DD/DBQD and DD/rMED/DBQD [Panzer et al., 2008; Miyake et al., 2008].

The gene *SLC26A2/DTDST* (OMIM #606718) is located on 5q32, encodes a solute carrier transporter transmembrane protein of 739 amino acids, and contains three exons, but only the last two are coding [Hästbacka et al., 1994]. The protein structure of this sulfate transporter is formed by 14 transmembrane domains (TD), a C-terminal Sulfate Transporter Anti-Sigma Antagonist (STAS), three N-glycosylation sites (two putative and one present if the others are mutated), a possible extracellular loop disulfide bridge between amino acids 212 and 216 (EC-DB) besides extracellular and cytosolic loops. [Rapp et al., 2017]. Although non-coding, exon1, or its boundaries, are important because one of the main pathogenic variants, the so-called Finn mutation associated with DD when in hmz (c.-26+2T>C), is located ate the 5' splice donor of the intron 1 [Hästbacka et al., 1999].

Along with the following genes: *PAPSS2*, *BPNT2/IMPAD1*, *CHST3*, *CHST14*, and *DSE*, the *SLC26A2/DTDST* is related to a group of SD with major joint involvement that is classified in the group of sulfation disorders in the last nosology and classification skeletal genetic disorders [Mortier et al., 2019].

The finding of one patient presenting a specific intermediate phenotype among a cohort of 12 patients belonging to the *SLC26A2/DTDST* spectrum led us to report this series of cases highlighting this patient. This also prompted us to perform an extensive review of previously individuals reported with known genotype in *SLC26A2/DTDST*, to better understand the genotype-phenotype correlation associated with this gene.

2. Materials and Methods

2.1. Local cohort

The local cohort included 12 patients from 11 families registered at the Brazilian Skeletal Dysplasia Group of the UNICAMP (Br-OCD). Ten patients were evaluated in one of the two outpatient clinics: the Skeletal Dysplasia or the Perinatal Genetic outpatient clinic, while two ones were evaluated by the website of the Brazilian group of Skeletal Dysplasia (<u>http://ocd.med.br/</u>).

2.2. Sequencing methods

The molecular investigation was carried out by two methods: Sanger Sequencing (SS), and Targeted Gene Panel (TGP-NGS). For SS, primers were designed including the exons-intron boundaries of the gene. The PCR products were sequenced on the ABI PRISM 3500XI Genetic Analyzer (Applied Biosystems [™] – by Life Technologies[™], Carlsbad, CA, USA). Also, DNA from the patient's parents was Sanger sequenced for segregation analysis to confirm the inheritance.

For NGS, it was used a customized panel (including the *SLC26A2/DTDST*) in the Design Studio 1.7 software, Illumina, Nextera[™] Rapid Capture Custom Enrichment Kit (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) 150 bp *paired-end* reads, and sequenced on Illumina MiSeq platform. One patient, evaluated by the website, had the molecular diagnosis performed by a private laboratory.

2.3. Bioinformatic and Analysis

The SS analyses were performed with Codon Code Aligner V9.0.1 (downloaded from: <u>https://www.codoncode.com/aligner/download.htm</u>), using the file with the extension ".ab1". For NGS, the analyses were carried out using the BaseSpace[™] Sequence Hub Illumina software, after aligning the sequences using the hg19/GRCh37 human reference genome. The analyses and identification of variants were performed by inputting the VCF file on the myPhenoDB website [Sobreira et al., 2015]. The IGV (Integrative Genomics Viewer - Broad Institute version 2.8.9 – downloaded from <u>https://software.broadinstitute.org/software/igv/download</u>) software

was used for NGS data visual analyses. All variants were reported according to Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37).

2.4. Variants classification and in silico analyses

Novel variants were considered potentially pathogenic if absent in homozygous (hmz) at public database and predicted to be damaging by the in silico algorithms. The population frequency was evaluated in the global databases: the Genome Aggregation Database (gnomAD browser https://gnomad.broadinstitute.org/), and the 1000 Genomes Project (1000g https://www.internationalgenome.org/); as well as in two Brazilian databases: Online Archive of Brazilian Mutations – AbraOM (https://abraom.ib.usp.br), and Brazilian Initiative on Precision Medicine – BIPMed (<u>http://bipmed.iqm.unicamp.br/</u>). In silico prediction algorithms were accessed with the following web tools: Polymorphism Phenotyping v2 (Polyphen 2 - prediction of functional effects of human nsSNPs -2 http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/), and Mutation Taster (http://www.mutationtaster.org/). The classification of novel variants identified was made using Varsome (https://varsome.com/), an automated classification tool based on the ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics guidelines). All novel variants included in this study are submitted at Leiden Open Variation Database (LOVD v.3.0, https://databases.lovd.nl/shared/genes/SLC26A2).

2.5. Literature review

For the literature review, the search included the period 1994 up to January/2021 in the following databases: MEDLINE electronic bibliographic database (accessing via PubMED), Scientific Electronic Library Online (SciELO), and EMBASE. The search was based on the following terms: "SLC26A2 DTDST mutation" or "SLC26A2 DTDST variant", "Achondrogenesis 1B", "Atelosteogenesis type 2", "Diastrophic Dysplasia" and "Recessive Multiple Epiphyseal Dysplasia". The inclusion criteria for this review took into account only the articles including both the clinical and molecular diagnosis with the patient's genotype. All reviewed patients were listed on a spreadsheet, including the following information for each patient: phenotype, zygosity, and genotype at both levels of changes in nucleotides and amino acids.

3. Results

3.1. Local cohort

The molecular results of the local cohort according to their respective phenotypes are shown in table 1.

In short, we identified eight pathogenic variants, three of which are novel: p.G115A (Polyphen-2: Probably Damaging - score 1.00, Mutation Taster: Disease Causing, Varsome: likely pathogenic), p.T627Lfs*23 23 (Mutation Taster: Disease Causing, Varsome: likely pathogenic) and p.A719Qfs*16 16 (Mutation Taster: Disease Causing, Varsome: pathogenic), which have already been deposited in LOVD v.3.0 (#0000132545, #0000132544 and #0000473814). The variant p.R279W was the most frequent and was identified in hmz in two patients with rMED, and in one of the alleles in all other patients, except in patient 1 (ACG-IB), for whom just one heterozygous (htz) variant (c.1045_1047del, p.V340del), was detected so far. The second allele of the remaining patients the following variant types were observed: frameshift (P2, P5, P6, and P12), nonsense (P3, P8, and P9), missense (P7), and splice mutation (P4). Segregation analysis confirmed the inheritance of the variants in five patients (P3, P4, P5, P6, and P12), however, it was incomplete in three patients (P1 - only paternal DNA was available and did not carry the only variant found in the proband; P7 and P10 - the maternal segregation confirmed the inheritance of one of the alleles). For the other patients (P2, P8, P9, and P11) there was no DNA available from either parent.

3.2. Case report (Patient 12)

Patient 12 (P12), a 6-year-old girl, was referred for genetic evaluation at the age of 27 months because of a presumptive diagnosis of hypochondroplasia. She is the 2nd child of healthy and non-consanguineous parents, she 35, and he, 38 years old at the time of her birth. She was born at 35 weeks by cesarean section. Birth weight was 2,755 g (p75), length was 41cm (p3), OFC was 33cm (p50-75) and the Apgar score at 1st and 5th minutes were 8 and 9 respectively. Evaluation at the age of 35 months showed disproportionate short stature with short limbs (height = 83.5 cm; -3 SD), OFC was 50 cm (p3), atypical face but with a bifid lobe on the left ear. The upper limbs were shortened (rhizomelic) with elbow stiffness, the feet were flat with prominent calcaneus. The girl had an abnormal gait. Complementary examinations

brought at the first consultation – karyotype, abdominal ultrasound examination, and skull CT, were all normal. In her last follow-up, at the age of 3 years and 8 months, she presented a good neuropsychomotor development, however, she complained of pain in the hips and knees after daily activities and had a lateral deviation of the left foot that hindered the use of ordinary shoes. Her anthropometric measurements were in the same standard deviations as described before.

Skeletal surveys at different ages showed short long bones, mild scoliosis, a mild advance of carpal and tarsal ossification but with a delay of epiphyseal ossification of long bones of hands and feet. It was also observed hypoplasia and mild dislocation of the head of the radius, ulnar deviation of the wrists, acetabular dysplasia, Swedishkey of the proximal femur, absence of ossification of the head of the femur and distal epiphysis flattened, tibial deviation of metatarsal bones, and genu varum (Fig. 1).

The Swedish key appearance of the femora led us to initiate the molecular investigation by SS of *CANT1*. Since no pathogenic variant was found she was then investigated by targeted NGS and a compound heterozygous (chtz) genotype was identified in the *SLC26A2/DTDST*: p.R279W and a novel frameshift variant, G deletion at the nucleotide position 2182 producing an Alanine to Glutamine change with a stop codon after 16 amino acids (p.A719Qfs*16) (Fig. 1 Supp mat). The segregation analysis showed that p.R279W was inherited from the mother while p.A719Qfs*16 from the father.

The comparison of the clinical and radiological findings of this patient with those previously reported [Panzer et al., 2008; Miyake et al., 2008], can be seen in the supplementary material (Table 1 Supp. mat).

3.3. Literature review

To follow the criteria of inclusion, patients without known genotype [Rossi and Superti-Furga 2001], or good clinical-radiological descriptions available [Yang et al., 2019; Li et al., 2020; Ruault et al., 2020], were excluded from the analysis. Patients with DD from Finland (179 patients from 147 families) were not included in the allele frequency analysis or in the evaluation of genotypes to avoid ascertainment bias [Hästbacka et al., 1999; Remes et al., 2002; Bonafé et al., 2008; Mäkitie et al., 2015]. Patients described as intermediate phenotype within of the *SLC26A2/DTDST* spectrum [Rossi et al., 1996b; Mégarbane et al., 1999; Unger et al., 2001; Maeda et
al., 2006; Barbosa et al., 2011; Mattos et al., 2014], were here classified as having the more severe phenotype, except the patients reported by Macías-Gómez et al. [2004] and Mégarbane et al. [1999], for whom the milder diagnosis was considered (Table 2 Supp. mat). The intermediate phenotypes considered here were just those that present characteristics of both phenotypes, *SLC26A2/DTDST* spectrum and Desbuquois dysplasia [Panzer et al., 2008; Miyake et al., 2008].

According to the criteria of inclusion, 43 of the 49 articles reported until January 2021 were included in the analysis. In addition, the 12 patients of the present cohort were also included in this analysis. Therefore, this review was based on 320 patients from 266 families. Because of a great number of Finnish individuals with DD due to a founder effect, these patients were reviewed separately. In supp. mat. table 2 (see DD Finnish sheet), all the review is summarized in a spreadsheet with twelve sheets, being the first five sheets related to the genotype and phenotype as well as the allele frequency and the most common genotypes.

Most reported patients belonging to the *SLC26A2/DTDST* classical spectrum are represented by the DD phenotype, however, if we do not consider Finnish patients with DD, 52% have rMED, 25% have DD, and both lethal phenotypes, AO-2 and ACG-1B have almost the same proportion. (Fig. 2a).

Figure 2b shows the zygosity among the four classic phenotypes. Most patients with DD are hmz, however, this is true only among Finns; for non-Finnish patients, 76% are chtz. Concerning the other classic phenotypes, while for AO-2, most patients are also chtz, 69% patients with rMED and a half with ACG-1B are hmz.

A total of 56 pathogenic variants in *SLC26A2/DTDST* were reported so far. However, for the main analysis of this review (allelic frequency, zygosity, and genotype-phenotype correlation), only 38 pathogenic variants were considered. The location of all known variants throughout the gene can be seen in figure 3. Most of the variants are in the transmembrane domain (TD) (14 missense, three frameshifts, and one inframe indel), and the STAS domain (five missense and five frameshifts). The other variants are in the following protein domains: extracellular loops (one nonsense and two missense), cytosolic loops (two missense and one frameshift), and N-terminal (one frameshift and one missense). The last two variants are in splice site, being the c. -26+2T>C variant in the 5' splice donor of intron 1 [Hästbacka et al., 1999]. Based

on the protein location of the variant no correlation with severity can be ascertained (see Table 2 Supp. mat - Genotypes_Domain sheet).

While some pathogenic variants are associated with a partial function related to the residual sulfate transport capacity (p.[R279W], p.[Q454P], p.[C653S], p.[G678V], p.[A715V]), other mutations related to severe phenotypes, leading to a null function of the sulfate transport capacity (p.[R178*], p.[G255E], p.[V340del], p.[N425D], p.[L483P], p.[K575Sfs*10], p.[G663R]) (see Table 2 Supp. mat - Functional Studies sheet)[Karniski 2001; Karniski 2004; Maeda et al.,2006].

Among the 38 variants with known genotype, most of them were observed associated with a single phenotype and eight were considered the more frequent for presenting a frequency around or above 3% - p.R279W (50.2%); p.C653S (8.1%);c. -26+2T>C (6.2%); p.R178* (5.9%); p.K575Sfs*10 (2.9%); p.V340del (2.9%); p.G663R (2.6%); and p.T512K (2.6%) (Table 2 Supp. mat – Allelic Freq Non-Finnish DD sheet and Fig. 3). Ten variants (p.[V340del], p.[R178*], p.[R279W], p.[N425D], p.[T512K], p.[K575Sfs*10], p.[C653S], p.[G663R], p.[A715V], c.[-26+2T>C]), were described in more than one phenotype (see Table 2, Supp. mat. - Variants related to known genotype sheet).

The Finnish mutation, c.-26+2T>C, in chtz has been found associated with all phenotypes in non-Finnish. When in hmz this variant has always been associated with the DD phenotype and only reported in Finns so far.

The most common variant, the p.R279W, appeared mainly in hmz (46/141 patients, 32,62%), and associated with the rMED phenotype. It has also been reported in chtz with 16 different variants in the second allele producing the same phenotype or any of the other phenotypes of the spectrum, except ACG-1B (Table 2 Supp. mat. - Frequent genotypes).

While homozygosity was also reported with the following variants with their respective phenotypes: p.C653S (rMED), p.V340del (ACG-1B), p.G663R (ACG-1B), and p.T512K (AO-2); the variants p.R178* and p.K575Sfs*10 were never reported in hmz. In addition, these last two variants were never associated with the milder phenotype (rMED) (Table 2 Supp. mat - Phenotype-Genotype summary sheet).

Among the chtz some genotypes have been found associated with two distinct phenotypes. Thus, the combinations p.[R279W];[R178*], p.[R279W];[K575Sfs*10], and p.[R279W];[N425D]; all of them, were reported with both DD [Macías-Gómez et

al., 2004; Barbosa et al., 2011; Present cohort], and AO-2 [Hästbacka et al., 1996; Rossi et al., 1997; Mattos et al., 2014]. Similarly, the following two genotypes p.[R279W]; c.-26+2T>C, and p.[C653S];[A715V] have been reported with both rMED [Balhausen et al., 2003; Jackson et al., 2011; Makitie et al., 2015], and DD phenotypes [Dwyer et al., 2010; Czarny-Ratajczak et al., 2010; Zechi-Ceide et al., 2013].

Patients with only one allele mutated (htz) have been reported associated with all the phenotypes, except for rMED. Hästbacka et al. [1994] and Rossi et al. [1996b] reported six patients with DD showing only one mutated allele. Hästbacka et al. [1996] and Rossi et al. [1996b] described two htz babies with AO-2. Finally, in the present cohort, we report a fetus with typical ACG-1B for whom only one allele was found to be mutated.

The three patients reported with the intermediate phenotype, DD/DBQD Panzer et al. [2008], DD/rMED/DBQD Miyake et al. [2008], and P12 described here, showed the following genotypes: p.[A133V];[R178*]; p.[T266I];[V340deI], and p.[R279W];[A719Qfs*16], respectively.

Discussion and Conclusions

The present study presents a third patient with an intermediate phenotype (DD/rMED – DBQD) among individuals of a small cohort of the *SLC26A2/DTDST* spectrum. An extensive review of the literature focusing on genotype-phenotype correlation and also the current frequency of the known variants and the zygosity in the different phenotypes associated with this gene were also presented.

Albeit small, the local cohort showed a distribution of variants, genotypes and zygosity similar to other patients already reported (Table 1; table 2 Supp. mat). Except for two unrelated patients with hmz genotype (p.R279W) and rMED phenotype, the remaining patients were chtz being all, but one, with the p.R279W occurring in one of the alleles. Regarding the variant of the second allele, the p.R178* appeared three times in this series of patients, and the genotype p.[R279];[R178*] was associated with two phenotypes – DD and AO-2 as already seen in other patients and discussed further up. Finally, three novel pathogenic

variants were found in this cohort, being one of them observed in the girl with an intermediate phenotype.

Two patients reported almost simultaneously in 2008 presenting a distinct pattern were described as having an intermediate phenotype because they had typical signs of the *SLC26A2/DTDST* spectrum as well as of the Desbuquois dysplasia [Panzer et al., 2008; Miyake et al., 2008]. Likewise as in the patient presented here (P12), in both patients reported in 2008, the first assessment of the proband led to the diagnosis of Desbuquois dysplasia, and the main radiological sign was the Swedish key appearance of the proximal femur. From the clinical and radiological point of view, the patient here reported (P12) presented a combination of clinical and radiological findings closer to the patient described by Miyake et al. [2008], that is a phenotype among DD and rMED and also share radiological findings of DBQD. The child reported by Panzer et al. [2008] had an important disproportion with short limbs, cystic ear, and severe scoliosis, all together leading to a phenotype closer to DD.

These patients with the intermediate phenotype, including P12, presented particular combinations of chtz variants with at least one severe (premature stop codon or inframe deletion) plus one missense at TD or EC-loop. P12 has an in-frame deletion (p.A719Qfs*16) at the STAS domain that led to a shortening of the final part of the protein, associated with the mild variant (p.R279W). This one, the most common variant in this gene, located at the third EC-loop of the protein, presents a residual sulfate uptake rate of ~50% in HEK 293-cells when comparing with the wild-type protein in a study by Karniski [2004], that probably rescued the phenotype as proposed by Rossi and Superti-Furga [2001]. The patient reported by Panzer et al. [2008], DD/DBQD, presented the fourth most common variant p.R178* associated with a missense (p.A133V), this one was only observed in that patient so far, and suggesting to create a subtle effect on the protein function. Therefore, it is reasonable to assume that the severity of the patient's phenotype should be assigned to the variant p.R178*, this a severe variant, more frequently associated with the severest phenotype, as can be observed in the sheet frequent phenotypes of table 2 (Supp. mat.). Although the authors have considered this last a mild variant, the A133 position proposed by Rapp et al. [2017] is located at the border of TD1, near to components of the TD core domain, which could alter these regions and disrupt the conformation of the active site. The patient DD/rMED/DBQD patient

reported by Miyake et al. [2008] presented p.T266I, a missense variant which could change the location of the residue from EC-loop to TD-domain plus a null variant p.V340del (which produces a 100-degree shift in the 3-D helix structure) [Rapp et al., 2019]. This last variant is usually present in patients with the most severe phenotype ACG-1B.

Diastrophic dysplasia is the main phenotype reported so far, however, most of them are from Finland and most frequently associated with the variant c.-26+2T>C, also called the Finn variant, and well known to be associated with a founder effect. [Hästbacka et al., 1999; Remes et al., 2002; Bonafé et al., 2008; Makitie et al., 2015]. Unlike what is known in Finland, the main phenotype related to the *SLC26A2/DTDST* spectrum in the literature is rMED (74 patients or 52,5%), most of them hmz for the variant c.862C>T p.R279W (Fig. 2b).

Out of Finland, patients with DD (35 or 24,8%) were mainly chtz (Fig. 2b), without a preferential genotype (see phenotype-genotype summary sheet in table 2 Supp mat). When severe variants, for instance - p.R178*, c.-26+2T>C, p.K575Sfs*10, c.727-1G>C, p.N425D, p.G115A, p.S157T, p.G663R and p.L707Pfs*4, were observed in combinations with the p.R279W in DD patients, this last variant has been regarded as a change rescuing the phenotype [Macías-Gómez et al., 2004; Maeda et al., 2006; Dwyer et al., 2010; Barbosa et al., 2011; Honório et al., 2013; Pineda et al., 2013; Zechi-Ceide et al., 2013, Present cohort]. Homozygosity in DD was reported in only one patient with unusual features and the variant p.Q454P, located at the TD11 and with a sulfate transport activity of about 39% compared to the wild type [Mégarbané et al., 1999; Karninski 2004].

The two lethal phenotypes were observed in less than 25% of all patients – AO-2 (14 or 9,9%) and ACG-1B (15 or 10,6%) (Fig. 2a). While patients with AO-2 were predominately chtz (58%) without a common genotype, 50% of patients with ACG-1B were hmz. The main mutation in hmz associated with ACG-1B was the p.V340del at the TD and considered a null variant either by the poorly expressed in HEK 293-cells or by the rapid protein degradation. This mutation could also induce a shift in the 3-D helix structure [Karniski, 2004; Rapp et al., 2017]. The homozygosity observed in patients with AO-2 involved three consanguineous families from specific populations, the p.L599F variant reported in India and Bangladesh and p.T512K in a family from Finland [Miller et al., 2008; Bonafé et al., 2008; Vikraman et al., 2016]. Interestingly

the p.T512K variant when in combination with the p.R279W produce the mildest phenotype – rMED [Syvänen et al., 2013; Mäkitie et al., 2015; Kausar et al., 2018]. The variant c.862C>T p.R279W is the most common variant observed in *SLC26A2/DTDST* gene when the Finland population is ruled out of the analysis. The c.862C>T position is located at a CpG dinucleotide, and the C>T (CGG to TGG) substitution is a common change in genes justifying the high frequency. In addition, this variant is associated with a significant sulfate transport function in HEK 293-cells, in hmz is just related to the mildest phenotype of the spectrum, and probably contributes to the phenotype rescue when associated with more severe variants as some frameshift, missense, nonsense, splice site and 5' splice donor of intron 1 [Rossi et al., 2001; Karniski 2004].

As can be observed in table 2 (Supp. mat. - Frequent genotypes sheet), the second most common variant p.C653S has also been reported in hmz associated with the rMED phenotype [Balhausen et al., 2003; Matikie et al., 2003; Hinrichs et al., 2010]. This variant also led to the same phenotype when in chtz with the Finn mutation (c.-26+2T>C) or with the p.A715V [Czarny-Ratajczak et al., 2010; Jackson et al., 2011; Kausar et al., 2018]. This last variant, at the STAS domain, is predicted to force the 3-D helix causing conformational changes where proteins interact [Rapp et al., 2017].

For the genotypes associated with the other six most frequent variants (see Table 2 Supp. mat. - Frequent Genotypes sheet), most are related to severe phenotypes.

Still, regarding the genotype-phenotype correlation, the specific type of mutation and their combinations are more determinant of the severity than the localization of the variant.

It is worth emphasizing that the same genotype was associated with different conditions AO-2 and DD [Hästbacka et al., 1996; Rossi et al., 1997; Rossi et al., 1996b; Macías-Gómez et al., 2004; Barbosa et al., 2011; Mattos et al., 2014; Present cohort] and DD and rMED [Remes et al., 2002; Ballhausen et al., 2003; Dwyer et al., 2010; Zechi-Ceide et al., 2013; Makitie et al., 2015], reinforcing both the absence of a precise genotype-phenotype correlation for most of the known variants and the interfamilial variability among patients with identical genotypes (rMED and DD) [Ballhausen et al., 2003; Mäkitie et al., 2003; Present cohort].

Finally, except for rMED, in the other phenotypes of the spectrum just one mutated allele was reported (ACG-1B, DD, and AO-2) [Hästbacka et al., 1994; Rossi et al., 1996b; Hästbacka et al., 1996; Hästbacka et al., 1999; Present cohort], suggesting that other variants in regions usually not evaluated by gene sequencing, either SS or NGS, are been lost in the analysis or, other unknown mechanisms yet need to be unveiled.

The results of the present study allow for the conclusions as follow.

- All but one of the patients in the cohort studied here presented one allele with the p.R279W variant, reinforcing the high prevalence of this variant. Beyond that, the present cohort adds three novel variants in *SLC26A2/DTDST* gene (p.G115A, p.T627Lfs*23 and p.A719Qfs*16);
- 2. Like the two previously described patients with an intermediate phenotype, P12, here described, first lead to the diagnosis of DBQD because of the Swedish key signal on radiological evaluation. The severity of the variant of one of the alleles in this patient (p.A719Qfs*16) seems to be attenuated by the presence of the p.R279W rescuing the phenotype;
- The main phenotype within the classic SLC26A2/DTDST spectrum, outside Finland, is the rMED. A quarter of patients have DD, followed by the two lethal phenotypes (AO-2 and ACG-1B), both with almost the same proportion;
- Excluding Finnish patients with DD, while 69% of rMED and 50% of ACG-1B patients are homozygous, most of DD and AO-2 patients have a compound heterozygous genotype;
- Despite the large number of pathogenic variants (38) in SLC26A2/DTDST gene among the genotypes known so far, only eight are recurrent with a frequency around 3% or more (p.R279W, p.C653S, c.-26+2T>C, p.R178*, p.K575Sfs*10, p.V340del, p.G663R, p.T512K);
- 6. The p.R279W variant is the most frequent (50.2%) outside Finland, and it occurs more frequently in homozygous (41/91) associated with rMED;
- The Finnish variant (c.-26+2T>C), so far in compound heterozygous outside Finland, has been associated with all four classical phenotypes;
- Homozygosity of the p.C653S variant has also been associated with rMED, however, other frequent variants when in homozygosity lead to lethal phenotypes - p.V340del, and p.G663R (ACG-1B), and p.T512K (AO-2);

- The p.R178*, p.K575Sfs*10 variants must be seen as lethal variants since both were mainly described with lethal phenotypes and were never reported in homozygous;
- 10. Although phenotypic variability is commonly observed in genetic diseases, the same genotype in *SLC26A2/DTDST* has been described in more than one phenotype, for instance, the genotype p.[R279W];p.[R178*] has been described as associated with both, DD and AO-2, suggesting that unknown mechanisms might modulate the effect of some pathogenic variants on this gene;
- 11. Finally, the existence of nine patients presenting the typical phenotypes, except rMED, with only one mutated allele, suggests that other variants in regions not usually covered by common sequencing (SS or NGS), or that other mutation in regulatory sites outside the gene and not yet identified must be present in the other allele of these patients.

Acknowledgment

We thank the patient's families who accepted to participate in the study contributing to this research.

Statement of Ethics

This study was approved by the institutional Committee for Ethics in Research of the Faculty of Medical Sciences at the State University of Campinas (FCM - UNICAMP). Subject's parents or guardians have given their written informed consent to participate in this research.

Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding Sources Statement

This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Financial Code 001; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Grant/Award Number: 590148/2011-7; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Grant/Award Numbers: 2015/22145-6 and 1998/16006-6.

Author Contributions

The study was designed by Denise Pontes Cavalcanti and Cynthia Silveira. Molecular analysis were performed by Cynthia Silveira and Karina da Costa Silveira. Patients were selected by Maria Dora Lacarrubba-Flores, Mauricio Takeshi Sakata, Silvia Nora Carbognani, Juan Llerena Jr., Carolina Araújo Moreno and Denise Pontes Cavalcanti. The manuscript was prepared by Cynthia Silveira and Maria Dora Lacarrubba-Flores and revised by Denise Pontes Cavalcanti.

Data Availability Statement

All data generated or analysed during this study are included in this article and/or its supplementary material files. Further enquiries can be directed to the corresponding author.

References

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations a. Nat Publ Gr 2010;7(4):248–9. https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248

Ballhausen D, Bonafé L, Terhal P, Unger SL, Bellus G, Classen M, et al. Recessive multiple epiphyseal dysplasia (rMED): phenotype delineation in eighteen homozygotes for DTDST mutation R279W. J Med Genet. 2003;40(1):65-71. https://doi.org/10.1136/jmg.40.1.65

Barbosa M, Sousa AB, Medeira A, Lourenço T, Saraiva J, Pinto-Basto J, et al. Clinical and molecular characterization of Diastrophic Dysplasia in the Portuguese population. Clin Genet. 2011;80(6):550-7. https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01595.x

Bonafé L, Hästbacka J, de la Chapelle A, Campos-Xavier AB, Chiesa C, Superti-Furga A, et al. A novel mutation in the sulfate transporter gene SLC26A2 (DTDST) specific to the Finnish population causes de la Chapelle dysplasia. J Med Genet 2008;45(12):827–1. https://doi.org/10.1136/jmg.2007.057158

Cai G, Nakayama M, Hiraki Y, Ozono K. Mutational analysis of the DTDST gene in a fetus with achondrogenesis type 1B. Am J Med Genet 2008;78(1):58–60.

Cho TJ, Kim Ok-H, Lee HR, Shin SJ, Yoo WJ, Park WY, et al. Autosomal Recessive Multiple Epiphyseal Dysplasia in a Korean Girl Caused by Novel Compound Heterozygous Mutations in the DTDST (SLC26A2) Gene. Korean Med Sci 2010;25(7):1105-8. https://doi.org/10.3346/jkms.2010.25.7.1105

Czarny-Ratajczak M, Bieganski T, Rogala P, Glowacki M, Trzeciak T, Kozlowski K. New intermediate phenotype between MED and DD caused by compound heterozygous mutations in the DTDST gene. Am J Med Genet A 2010;152A(12):3036-42. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33707

Czarny-Ratajczak M, Lohiniva J, Rogala P, Kozlowski K, Perälä M, Carter L, et al. A mutation in COL9A1 causes multiple epiphyseal dysplasia: further evidence for locus heterogeneity. Am J Hum Genet A 2001;69(5):969–80. https://doi.org/10.1086/324023

Dwyer E, Hyland J, Modaff P, Pauli RM. Genotype-phenotype correlation in DTDST dysplasias: Atelosteogenesis type II and diastrophic dysplasia variant in one family. Am J Med Genet A 2010;152A(12):3043-50. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33736

Fokkema IF, Taschner PE, Schaafsma GC, Celli J, Laros JF, den Dunnen JT. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. Hum Mutat. 2011;32(5):557-63. https://doi.org/10.1002/humu.21438

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;78(6):1073–87. https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90281-x

Hastbacka J, Kaitila I, Sistonen P, de la Chapelle A. Diastrophic dysplasia gene maps to the distal long arm of chromosome 5. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1990;87(20):8056-9. https://doi.org/10.1073/pnas.87.20.8056

Hastbacka J, Kerrebrock A, Mokkala K, Clines G, Lovett M, Kaitila I, et al. Identification of the Finnish founder mutation for diastrophic dysplasia (DTD). European Journal of Human Genetics 1999;7(6):664–70. https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200361

Hästbacka J, Superti-Furga A, Wilcox WR, Rimoin DL, Cohn DH, et al. 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;58(2):255-62.

Hinrichs T, Superti-Furga A, Scheiderer WD, Bonafé L, Brenner RE. Recessive multiple epiphyseal dysplasia (rMED) with homozygosity for C653S mutation in the DTDST gene - Phenotype, molecular diagnosis and surgical treatment of habitual dislocation of multilayered patella: Case report. BMC Musculoskeletal Disorders 2010;3(11):110. https://doi.org/10.1186/1471-2474-11-110

Honório JC, Bruns RF, Gründtner LF, Raskin S, Ferrari LP, Araujo Júnior E, et al. Diastrophic dysplasia: prenatal diagnosis and review of the literature. Sao Paulo Med J 2013;131(2):127-32. https://doi.org/10.1590/S1516-31802013000100024

Huber C, Odent S, Rumeur S, Padovani P, Penet C, Cormier-Daire V, et al. Sulphate transporter gene mutations in apparently isolated club foot. J Med Genet 2001;38(3):191–3. https://doi.org/10.1136/jmg.38.3.191

Jackson GC, Mittaz-Crettol L, Taylor JA, Mortier GR, Spranger J. Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia: a 7-year comprehensive analysis of the known disease genes identify novel and recurrent mutations and provides an accurate assessment of their relative contribution. Hum Mutat 2011;33(1):144-57. https://doi.org/10.1002/humu.21611

Jakkula E, Mäkitie O, Czarny-Ratajczak M, Jackson GC, Damignani R, Briggs MD, et al. Mutations in the known genes are not the major cause of MED; distinctive phenotypic entities among patients with no identified mutations. Eur J Hum Genet 2005;13(3):292–301. https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201314

Hall BD. Diastrophic dysplasia: extreme variability within a sibship. Am J Med Genet. 1996;63(1):28-33. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19960503)63:1<28::AID-AJMG8>3.0.CO;2-O

Horton WA, Rimoin DL, Lachman RS, Skovby F, HollisterDW, Spranger J, Scott CI, Hall JG. 1978. The phenotypic variability of diastrophic dysplasia. J Pediatr 1978;93:609–613. https://doi.org/10.1016/S0022-3476(78)80896-8

Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. Nature. 2020;581(7809):434–43. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2308-7

Karniski LP. Mutations in the diastrophic dysplasia sulfate transporter (DTDST) gene: correlation between sulfate transport activity and chondrodysplasia phenotype. Hum Mol Genet. 2001;10(14):1485-90. doi: 10.1093/hmg/10.14.1485. PMID: 11448940.

Karniski LP. Functional expression and cellular distribution of diastrophic dysplasia sulfate transporter (DTDST) gene mutations in HEK cells. Hum Mol Genet 2004;13(19):2165-71. https://doi.org/10.1093/hmg/ddh242

Kausar M, Mäkitie RE, Toiviainen-Salo S, Ignatius J, Anees M, Mäkitie O. Recessive Multiple Epiphyseal Dysplasia - Clinical Characteristics Caused by Rare Compound Heterozygous SLC26A2 Genotypes. Eur J Med Genet. 2019;62(11):103573. https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2018.11.007

Kim OH, Park H, Seong MW, Cho TJ, Nishimura G, Superti-Furga A, et al. Revisit of multiple epiphyseal dysplasia: ethnic difference in genotypes and comparison of radiographic features linked to the COMP and MATN3 genes. Am J Med Genet A 2011;155A(11):2669–80. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.34246

Kopanos C, Tsiolkas V, E AKC, Monica C, Aguilera A, Meyer R. VarSome: The Human Genomic Variant Search Engine. Bioinformatics. 2018;11(35):1978–80. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty897

Li J, Meng Y, Li M, Liu C, Li-Ling J, Lyu Y. Diagnosis of a fetus with atelosteogenesis type 2 through combined prenatal ultrasonography and whole exome sequencing. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi 2020;37(7):767-70. https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2020.07.016

Macías-Gómez NM, Mégarbané A, Leal-Ugarte E, Rodríguez-Rojas LX, Barros-Núñez P. Diastrophic dysplasia and atelosteogenesis type II as expression of compound heterozygosis: first report of a Mexican patient and genotypephenotype correlation. Am J Med Genet A 2004;129A(2):190-2. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30149

Maeda K, Miyamoto Y, Sawaki H, Karniski LP, Nakashima E, Nishimura G, et al. A compound heterozygote harboring novel and recurrent DTDST mutations with intermediate phenotype between Atelosteogenesis type II and Diastrophic dysplasia. Am J Med Genet A 2006;140(11):1143–7. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31225

Mäkitie O, Geiberger S, Horemuzova E, Hagenäs L, Moström E, Nordenskjöld M, et al. SLC26A2 disease spectrum in Sweden – high frequency of recessive multiple epiphyseal dysplasia (rMED). Clin Genet 2015;87(3):273–8. https://doi.org/10.1111/cge.12371 Mäkitie O, Savarirayan R, Bonafe L, Robertson S, Susic M, Superti-Furga A, et al. Autosomal Recessive Multiple Epiphyseal Dysplasia With Homozygosity for C653S in the DTDST Gene: Double-Layer Patella as a Reliable Sign. Am J Med Genet 122A 2003(3):187–92. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.20282

Martínez García M, Velez C, Fenollar-Cortés M, Bustamante A, Lorda-Sanchez I, Soriano-Guillén L, et al. Paternal Isodisomy of Chromosome 5 in a Patient With Recessive Multiple Epiphyseal Dysplasia. Am J Med Genet A 2014;164A(4):1075-8. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36378

Mattos EP, Magalhães JAA, Mittaz-Crettol L, Azambuja R, Okada L, Cavalcanti DP, et al. Atelosteogenesis Type 2/Diastrophic Dysplasia Phenotypic Spectrum: From Prenatal to Preimplantation Genetic Diagnosis. Open Journal of Obstetrics and Gynecology 2014;(4):399-404.

Mégarbané A, Haddad FA, Haddad-Zebouni S, Achram M, Eich G, Le Merrer M, et al. Homozygosity for a novel DTDST mutation in a child with a 'broad bone-platyspondylic' variant of diastrophic dysplasia. Clin Genet 1999;56(1):71-6. https://doi.org/10.1034/j.1399-0004.1999.560110.x

Miller E, Blaser S, Miller S, Keating S, Thompson M, Unger S, et al. Fetal MR imaging of atelosteogenesis type II (AO-II). Pediatr Radiol 2009;38(12):1345–9. https://doi.org/10.1007/s00247-008-0974-y

Miyake A, Nishimura G, Futami T, Ohashi H, Chiba K, Toyama Y, et al. A compound heterozygote of novel and recurrent DTDST mutations results in a novel intermediate phenotype of Desbuquois dysplasia, diastrophic dysplasia, and recessive form of multiple epiphyseal dysplasia. J Hum Genet 2008;53(8):764–8. https://doi.org/10.1007/s10038-008-0305-z

Mortier GR, Cohn DH, Cormier-Daire V, Hall C, Krakow D, Mundlos S, et al. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2019 revision. Am J Genet A 2019;179A(12):2393–2419. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61366

Naslavsky MS, Yamamoto GL, de Almeida TF, Ezquina SAM, Sunaga DY, Pho N, et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. Hum Mutat 2017;38(7):751-63. https://doi.org/10.1002/humu.23220

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 Part A 2008;146A:(22):2920–4. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32543

Pineda T, Rossi A, Bonafè L, Superti-Furga A, Velasco HM. Report of a novel mutation in the SLC26A2 gene found in a Colombian adult patient with diastrophic dysplasia. Rev Fac Med 2013;61(3):255-9. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-00112013000300005&Ing=en.

Ramírez-Castro JL, Rada AMC, Henao BEM, Gaviria GCR, Palacio GV, Quiroz AEP. Displasia diastrófica: Caracterización clínica, radiológica, citogenética y molecular de una paciente. latreia 2005;1(18):40-8. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932005000100003&Ing=en.

Rapp C, Bai X, Reithmeier RAF. Molecular analysis of human solute carrier SLC26 anion transporter disease-causing mutations using 3-dimensional homology modeling. Biochim Biophys Acta Biomembr 2017;1859(12):2420-34. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.09.016

Rapp CL, Li J, Badior KE, Williams DB, Casey JR, Reithmeier RAF, et al. Role of N-glycosylation in the expression of human SLC26A2 and A3 anion transport membrane glycoproteins. Biochem Cell Biol 2019;97(3):290–306. https://doi.org/10.1139/bcb-2018-0139

Remes VM, Hästbacka JR, Poussa MS, Peltonen JI. Does genotype predict development of the spinal deformity in patients with diastrophic dysplasia? Eur Spine J 2002;11(4):327-31 https://doi.org/10.1007/s00586-002-0413-y

Rocha CS, Secolin R, Rodrigues MR, Carvalho BS, Lopes-Cendes I. The Brazilian Initiative on Precision Medicine (BIPMed): fostering genomic datasharing of underrepresented populations. NPJ Genom Med. 2020;(5):42. https://doi.org/10.1038/s41525-020-00149-6

Rossi A, Bonaventure J, Delezoide AL, Cetta G, Superti-Furga A. Undersulfation of Proteoglycans Synthesized by Chondrocytes from a Patient with Achondrogenesis Type 1B Homozygous for an L483P Substitution in the Diastrophic Dysplasia Sulfate Transporter. J Biol Chem 1996a;271(31):18456–64. https://doi.org/10.1074/jbc.271.31.18456

Rossi A, Bonaventure J, Delezoide AL, Superti-Furga A, Cetta G. Undersulfation of cartilage proteoglycans ex vivo and increased contribution of amino acid sulfur to sulfation in vitro in McAlister dysplasia/atelosteogenesis type 2. Eur J Biochem 1997;248(3):741–7. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00741.x

Rossi A and 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 Mut 2001;17(3):159-71. https://doi.org/10.1002/humu.1

Rossi A, van der Harten HJ, Beemer FA, Kleijer WJ, Gitzelmann R, Steinmann B, et al. Phenotypic and genotypic overlap between atelosteogenesis type 2 and diastrophic dysplasia. Hum Genet, 1996b;98(6):657-61. https://doi.org/10.1007/s00439005027

Ruault V, Yauy K, Fabre A, Fradin M, Van-Gils J, Angelini C, et al. Clinical and Molecular Spectrum of Nonsyndromic Early-Onset Osteoarthritis. Arthritis Rheumatol 2020;72(10):1689-93. https://doi.org/10.1002/art.41387

Sato T, Kojima T, Samura O, Kawaguchi S, Nakamura A, Nakajima M,et al. Two unrelated pedigrees with achondrogenesis type 1b carrying a Japan-specific pathogenic variant in SLC26A2. Am J Med Genet A 2020;182(4):735-9. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61469

Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. Nat Publ Gr 2014;11(4):361–2. http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2890

Sobreira N, Schiettecatte F, Boehm C, Valle D, Hamosh A. New tools for Mendelian disease gene identification: PhenoDB variant analysis module and GeneMatcher, a web-based tool for linking investigators with an interest in the same gene. Hum Mutat. 2015;36(4):425–31. https://doi.org/10.1002/humu.22769

Superti-Furga A, Hastbacka J, Wilcox WR, Cohn DH, van der Harten HJ, Rossi A, et al. Achondrogenesis type IB is caused by mutations in the diastrophic dysplasia sulphate transporter gene. Nat Genet 1996a;12(1):100–2. https://doi.org/10.1038/ng0196-100

Superti-Furga A, Neumann L, Riebel T, Eich G, Steinmann B, Spranger J, et al. Recessively inherited multiple epiphyseal dysplasia with normal stature, club foot, and double layered patella caused by a DTDST mutation. J Med Genet 1999;36(8):621–4.

Superti-Furga A, Rossi A, Steinmann B, Gitzelmann R. A Chondrodysplasia Family Produced by Mutations in the Diastrophic Dysplasia Sulfate mansporter Gene: Genotype/Phenotype Correlations. Am J Med Genet 1996b;63(1):144-7. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19960503)63:1<144::AID-AJMG25>3.0.CO;2-N

Syvänen J, Helenius I, Hero M, Mäkitie O, Ignatius J. Recessive MED with auricular swelling due to compound heterozygosity Arg279Tpr/Thr512Lys in the SLC26A2 gene. Am J Med Genet A 2013;161A(6):1491–4. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35872

Unger S, Le Merrer M, Meinecke P, Chitayat D, Rossi A, Superti-Furga A. A New dysplasia or achondrogenesis type 1B? The importance of histology and molecular biology in delineating skeletal dysplasias. Pediatr Radiol 2001;31(12):893-4. https://doi.org/10.1007/s002470100017

Vikraman SK, Balakrishnan B, Chandra V, Batra M, Kuriakose R, Kannoly G. A case of hereditary novel mutation in SLC26A2 gene (c.1796 A > C) identified in a couple with a fetus affected with atelosteogenesis type 2 phenotype in an antecedent pregnancy. Case Rep Perinat Med 2016;5(1): 65–7. https://doi.org/10.1515/crpm-2014-0059

Yang K, Shen M, Yan Y, Tan Y, Zhang J, Wu J, et al. Genetic Analysis in Fetal Skeletal Dysplasias by Trio Whole-Exome Sequencing. Biomed Res Int 2019;14:2492590. https://doi.org/10.1155/2019/2492590

Zechi-Ceide RM, Moura PP, Raskin S, Richieri-Costa A, Guion-Almeida ML. A compound heterozygote SLC26A2 mutation resulting in robin sequence, mild limbs shortness, accelerated carpal ossification, and multiple epiphysial dysplasia in two Brazilian sisters. A new intermediate phenotype between diastrophic dysplasia and recessive multiple epiphyseal dysplasia. Am J Med Genet A 2013;161A(8):2088-94. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36057

Zhou T, Wang Y, Hang Zhou, Liao Z, Gao B, Su D, et al. Dual novel mutations in SLC26A2 in two siblings with multiple epiphyseal dysplasia 4 from a Chinese family: a case report. BMC Medical Genetics 2018;19(1):70. https://doi.org/10.1186/s12881-018-0596-7

Zhou X, Edmonson MN, Wilkinson MR, Patel A, Wu G et al. Exploring genomic alteration in pediatric cancer using ProteinPaint. Nat Genet 2016:48(1):4–6. https://doi.org/10.1038/ng.3466

Figure Legends

Fig. 1. X-rays of P12 (rMED/DBQD). **a** Short long bones, hypoplasia of the head of the radius, and ulnar deviation at the wrist. **b** Acetabular dysplasia, a Swedish-key appearance of the proximal femur, non-ossified femoral head, and the femoral necks are broad. **c** Mild advancement of tarsal ossification with hypoplasia of the epiphysis observed mainly in the 1st metacarpal and the 1st phalanx of the hallux. Deviation of the metatarsal bones. **d** Mild advance of carpal ossification, but with delay in epiphyseal ossification of metacarpal and phalanx bones. **e** The long bones of the lower limbs are asymmetrical, right > than left, there is dislocation of the hip and no ossification of the head of the femur. The distal femur epiphyses are flattened and the distal fibulae are longer than the tibia. Genu varum.

Fig. 2. **a** Pie charts showing the proportions of the different phenotypes and **b** the zygosity of each phenotype in the *SLC26A2/DTDST* spectrum. In **b**, the criterion for differentiating homozygotes, compound heterozygotes, and heterozygotes was color intensity, with the darkest color for homozygotes and the lightest for heterozygotes.

Fig. 3. Schematic of *SLC26A2/DTDST* (GRCh37 NM_000112.4/NP_000103) gene showing the 3 exons (including non-coding sequences as gray boxes), separated by the introns (horizontal black line). The transmembrane domains are shown in dark purple, STAS domain in burgundy, N-glycosylation sites are narrow black bars, a light green bar represents a possible extracellular loop disulfide bridge between amino

acids 212 and 216 (EC-DB), Extracellular loop (EC-loop) are mustard bars, Nterminal and C-terminal parts are colored in cream at the extremities. Pathogenic variants related to the SD spectrum are colored by each amino acid consequence as indicated by the below legend. The black triangles represent variants from the literature removed from the analysis due to the insufficient genotype information. The stars above the variants indicate the eight more frequent variants (in orange the Finn mutation and in red other ones). The plot was generated with Protein Paint and the protein domain localizations were taken from Rapp et al. [2017].

Fig. 1 Supplementary Material Identification of a pathogenic variant in *SLC26A2/DTDST* in P12 (rMED/DBQD). **a** - Integrated Genomics Viewer (IGV) screenshot. **b** - SS validation - Codon Code Aligner showing the novel frameshift variant (c.2182delG; p.Ala719GInfs*16) in heterozygous.

	Famil				References
Phenotype	У	Patient	Allele 1	Allele 2	
			c.[1045_1047		
]	unknown	Superti-Furga et al., 1996a
ACG-1B	1	1	p.[V340del]		
			c.[862C>T]	c.[1905del]	Hästbacka et al.,1996;
۸۵-2	2	2	p.[R279W]	p.[T627Lfs*23]	Novel
A0-2			c.[862C>T]	c.[559C>T]	Hästbacka et al.,1996;
	3	3	p.[R279W]	p.[R178*]	Superti-Furga et al., 1996a
			c.[862C>T]	c.[727-1G>C]	Hästbacka et al.,1996;
	4	4	p.[R279W]	p.[?]	Hästbacka et al., 1994
			c.[862C>T]	c.[1751del]	
	5	5	p.[R279W]	p.[L575Sfs*10]	Hästbacka et al.,1996;
			c.[862C>T]	c.[1751del]	Hästbacka et al., 1994
חח	5	6*	p.[R279W]	p.[L575Sfs*10]	
			c.[862C>T]	c.[371G>C]	Hästbacka et al.,1996;
	6	7	p.[R279W]	p.[G115A]	Novel
			c.[862C>T]	c.[559C>T]	Hästbacka et al.,1996;
	7	8	p.[R279W]	p.[R178*]	Superti-Furga et al., 1996a
			c.[862C>T]	c.[559C>T]	Hästbacka et al.,1996;
	8	9	p.[R279W]	p.[R178*]	Superti-Furga et al., 1996a
			c.[862C>T]	c.[862C>T]	Hästbacka et al. 1996
	9	10	p.[R279W]	p.[R279W]	
			c.[862C>T]	c.[862C>T]	Hästbacka et al. 1996
rMED	10	11	p.[R279W]	p.[R279W]	
DD/rMED/			c.[862C>T]	c.[2182del]	Hästbacka et al.,1996;
DBQD	11	12	p.[R279W]	p.[A719Qfs*16]	Novel

Table 1. Phenotype and genotype of the 12 patients in the present cohort, with thereferences of the respective variants in the SLC26A2/DTDST gene.

*P6 is brother of P5. ACG-1B: Achondrogenesis 1B; AO-2: Atelosteogenesis type 2; DD: Diastrophic Dysplasia; rMED: Recessive Multiple Epiphyseal Dysplasia; DBQD: Desbuquois Dysplasia.

Supplemental Table 1. Comparison of clinical and radiological features of previously patients described presenting the typical DBDQ feature with pathogenic variants in *SLC26A2/DTDST* gene and P12 from our cohort.

Phenotype	DD/rMED/DBQD Miyake <i>et al.</i> , 2008	DD/DBQD Panzer et al., 2008	DD/rMED/DBQD P12 – present cohort
SLC26A2/DTDST genotype	p.[T266I];[V340del]	p.[A133V];[R178*]	p.[R279W];[A719Qfs*16]
Consanguinity	-	-	-
At birth			
Weight	na	3.310 g (p25-50)	2,755 g (p75)
Length	49.5 cm (p25-50)	47 cm (p3-10)	41 cm (p3)
Occipitofrontal Circumference	na	35.5 cm (p75-90)	33 cm (p75)
Gestational Age	40 weeks	40 and 3/7 weeks	35 weeks
Clinical features			
Unusual facies	+	+	-
Small Stature	+	+	+
Short Limbs	+	+	+
Rhizomelia	na	+	+
Cleft palate	na	+	-
Intrauterine growth retardation	-	-	+
Cognitive disability	na	-	-
Stiff Joints	+	+	+
Laryngomalacia	na	+	-
Cystic ear	na	+	-
Extension camptodactyly	-	-	-
Bilateral clubfoot	+	unilateral	-
Height	-3SD at 4 yo	na	-3SD 4 yo
Hyperextension of bilateral knees	+	-	+
Contracture of the MP joints	+	-	-
Radiologic features			
Swedish key appearance of the			
Rilatoral hip subluxation/Coxa vara?	т 	т	_
Bracecious carnal essification	+	-	_
Brachydactyly	+ +	_	T
Aberrant ossification centers of	т	Т	-
wrists at birth	-	+	-
Flat acetabular roof	?	+	+
Scoliosis	+ mild at 4 yo	+ (congenital)	-
proximal phalanx of 2nd finger	-	-	-
Ulnar deviation	na	+	-
Cervical kyphosis		+	-
Hypoplastic cervical vertebrae	mild flattening vertebrae	+	+
Others	-	mild macrocephaly	-

na: not available; TD: Transmembrane domain; STAS: Sulphate Transporter and Anti-Sigma factor antagonist. EC-loop: Extracellular loop; AO-2: atelosteogenesis type 2; DD: diastrophic dysplasia; rMED: recessive multiple epiphyseal dysplasia; DBQD: desbuquois dysplasia. MP: Metacarpophalangeal





Figure 2



Figure 3



Fig. 1 Supp mat



9. ANEXOS

9.1. Lista dos 85 genes presentes no painel Target-NGS , em destaque os 17 genes de interesse para o estudo.

ADAMTS10	CLCN7	DYNC2LI1	IFT52	PCNT	TNFRSF11A
ADAMTS17	COL10A1	EBP	IFT80	PDE4D	TNFSF11
ADAMTSL2	COL11A1	EIF2AK3	IFT81	PEX5	TRPV4
ARSE	COL11A2	EVC	IMPAD1	PEX7	TTC21B
B3GALT6	COL1A1	EVC2	KIAA0586	PLEKHM1	WDR19
B3GAT3	COL1A2	EXOC6B	KIF22	PRKAR1A	WDR34
B4GALT7	COL2A1	FBN1	LBR	RUNX2	WDR35
CA2	COL9A1	FLNB	LIFR	SLC26A2	WDR60
CANT1	COL9A2	GNAS	LMX1B	SLC35D1	XRCC4
CCDC8	COL9A3	HSPG2	LTBP2	SNX10	XYLT1
CEP120	COMP	ICK	LTBP3	TBX4	
CHST11	CSGALNACT1	IFT122	NEK1	TCIRG1	
CHST14	CUL7	IFT140	NIN	TCTEX1D2	2
CHST3	DYM	IFT172	OBSL1	TCTN3	
CHSY1	DYNC2H1	IFT43	OSTM1	TGDS	

9.2. Parecer do Comitê de Ética



Página 01 de 04







Continuação do Parecer: 3.589.357

completo e em anuais de eventos científicos. De acordo com os comentários do pesquisador responsável: "Essa pesquisa, introduzindo o estudo das bases moleculares das displasias esqueléticas e disostoses, se iniciou em 2016 e deve continuar pelo menos até 2022. Em 2018 o que se encerrou foi o projeto financiado pela Fapesp que tivemos que prestar conta dentro do prazo. Atualmente ainda estamos finalizando as análises referentes à casuística incluída nos experimentos até 2018 com os recursos daquele projeto Fapesp. Temos ainda vários pacientes a serem estudados, alguns deles cuja investigação começou com as verbas daquele antigo projeto e que seguirão com verbas novas em projeto que está atualmente em fase de elaboração para solicitação de novo financiamento. ".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Para avaliação desta notificação foi analisado o relatório parcial anexado no documento intitulado "RelatorioParcialDISESQ30052019.doc 22/07/2019 16:32:42". O documento anexado "Prod20162019.docx 22/07/2019 16:32:54" não foi analisado, pois refere-se relatório com detalhamento dos resultados técnicos. Foi avaliado o relatório no modelo preconizado pelo CEP, que visa detalhar possíveis intercorrências éticas durante o estudo.

Recomendações:

Solicitamos que seja submetida uma emenda ampliando o tamanha amostral, pois o número contemplado na folha de rosto e no projeto era de 40 participantes e não 250.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Relatório parcial do estudo aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

 O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

 O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126					
Bairro: Ba	arão Geraldo		CEP:	13.083-887	
UF: SP	Município:	CAMPI	NAS		
Telefone:	(19)3521-8936	Fax:	(19)3521-7187	E-mail:	cep@fcm.unicamp.br

Na



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 3.589.357

pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

 Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

 Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

-Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

-O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo rela	cionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório	RelatorioParcialDISESQ30052019.doc	22/07/2019	CYNTHIA SILVEIRA	Postado

Endereço:	idereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126						
Bairro: B	arão Geraldo	CEP:	13.083-887				
UF: SP	Município:	CAMPINAS					
Telefone:	(19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187	E-mail:	cep@fcm.unicamp.br			

Página 03 de 04



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 3.589.357

Parcial	RelatorioParcialDISESQ30052019.doc	16:32:42	CYNTHIA SILVEIRA	Postado
Envio de Relatório Parcial	Prod20162019.docx	22/07/2019 16:32:54	CYNTHIA SILVEIRA	Postado

Situação do Parecer: Aprovado Necessita Apreciação da CONEP: Não

CAMPINAS, 20 de Setembro de 2019

Assinado por: Renata Maria dos Santos Celeghini (Coordenador(a))

 Endereço:
 Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

 Bairro:
 Barão Geraldo
 CEP: 13.083-887

 UF:
 SP
 Município:
 CAMPINAS

 Telefone:
 (19)3521-8936
 Fax:
 (19)3521-7187
 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Página 04 de 04

9.3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: Contribuição ao estudo clínico-etiológico das displasias esqueléticas e disostoses no Brasil Pesquisadora responsável: Dra. Denise Pontes Cavalcanti Número do CAAE: (inserir após aprovação pelo CEP)

Você está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se você não aceitar participar ou retirar sua autorização em qualquer momento.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS:

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.

PROCEDIMENTOS:

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 uma única vez, de 4 a 10 ml de sangue (quantidade equivalente a uma ou duas colheres de sopa).

DESCONFORTOS E 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 raio 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 poucos segundos.

BENEFÍCIOS:

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). 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.

ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA:

Não haverá nenhum tipo de acompanhamento especial após o encerramento da pesquisa. Não se espera detectar situações que indiquem intervenção. A participação nesta pesquisa não deverá acarretar

Rubrica do pesquisador:

Rubrica do participante:

mudanças no atendimento médico nem no aconselhamento genético imediato. A assistência dada ao participante consiste, quando for o caso, no aconselhamento genético.

SIGILO E PRIVACIDADE:

Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado. 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.

RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO:

Não haverá ressarcimento aos participantes, uma vez que o estudo será feito durante a rotina do participante, durante consulta médica no hospital. Ainda que não sejam previstos danos decorrentes desta pesquisa, indenizações estão previstas e asseguradas nos termos da Lei.

ACONSELHAMENTO GENÉTICO:

Todos os pacientes, uma vez finalizado o diagnóstico, serão submetidos à aconselhamento genético da mesma forma que todos os pacientes atendidos rotineiramente nos ambulatórios envolvidos nessa pesquisa (Ambulatório de Genética Perinatal e Ambulatório de Displasias Esqueléticas) e realizados por ou sob a supervisão da coordenadora desses ambulatórios.

ARMAZENAMENTO DE MATERIAL:

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) e armazenado(s) seguindo regulamento da Resolução 441/2011 CNM/MS 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. Em qualquer caso, seu nome será conhecido apenas pelo investigador do estudo e ninguém mais.

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 Departamento 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. O material biológico será armazenado *in natura* ou na forma de RNA, DNA ou proteína. As amostras serão armazenas em equipamentos de congelação (Freezers -20°C) específicos e utilizados somente para este fim. As amostras serão codificadas apenas por números e a chave de ligação entre números e nomes de pacientes será armazenada em programa de computador protegido por senha.

I. Assim, solicitamos que preencha uma das opções a seguir:

□ concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

□ concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

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.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a:______.

Rubrica do pesquisador:

Rubrica do participante:

Página 2 de 3

CONTATO:

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a Dra. Denise P. Cavalcanti, na Faculdade de Ciências Médicas/Departamento de Genética Médica – Rua Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas - SP, Telefone (19) 3521-0385, E-mail: <u>denisepcavalcanti@gmail.com</u>.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:30hs às 11:30hs e das 13:00hs as 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br.

O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP).

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos nas pesquisas. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar:

Nome do(a) participante: _

Da	ita: /	1
(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu RESPONSÁVE	EL LEGAL)	

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

(Assinatura do pesquisador)

Data: /	' /	· .

Rubrica do pesquisador:_____

Rubrica	do	partici	ipante:
---------	----	---------	---------

Página 3 de 3

9.4. Equipe do Projeto de Pesquisa Cadastrada na Plataforma Brasil



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Projeto de Pesquisa:

Contribuição ao estudo clínico-etiológico das displasias esqueléticas e disostoses no Brasil

Informações Preliminares

Responsável Principal			
CPF/Documento: 323.464.414-49	No	me: Denis	e Pontes Cavalcanti
Telefone: 1935210385	E-r	mail: denis	epcavalcanti@gmail.com
Instituição Proponente			
CNP.I:	Nome da l	nstituição:	Faculdade de Ciências Medicas - UNICAMP

Essa submissão de emenda é exclusiva do seu Centro Coordenador?

A emenda é exclusiva de seu Centro Coordenador, então as alterações realizadas em seu projeto, em virtude da emenda, NÃO serão replicadas nos Centros Participantes vinculados e nos Comitês de Ética das Instituições Coparticipantes, quando da sua aprovação.

É um estudo internacional? Não

Assistentes

CPF/Documento	Nome
384.260.618-42	Thatiane Yoshie Kanazawa
368.452.888-95	CYNTHIA SILVEIRA
23714825878	Maria Dora Jazmin Lacarrubba Flores

Equipe de Pesquisa

CPF/Documento	Nome
368.452.888-95	CYNTHIA SILVEIRA
23714825878	Maria Dora Jazmin Lacarrubba Flores

Área de Estudo

Área Temática Especial

Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;)

Grandes Áreas do Conhecimento (CNPq)

Grande Área 2. Ciências Biológicas

Grande Área 4. Ciências da Saúde

Propósito Principal do Estudo (OMS)

Clínico

Título Público da Pesquisa: Contribuição ao estudo clínico-etiológico das displasias esqueléticas e disostoses no Brasil

Contato Público

CPF/Documento	Nome	Telefone	E-mail
323.464.414-49	Denise Pontes Cavalcanti	1935210385	denisepcavalcanti@gmail.com

Contato Científico: Denise Pontes Cavalcanti