RAÍSSA MODAFFORE DANDALO GIRARDI

Bases genéticas dos defeitos de segmentação vertebral: estudo genético-clínico focado em pacientes com disostose espondilocostal

Genetic basis of segmentation defects of the vertebrae: genetic and clinical study focused on spondylocostal dysostosis patients

São Paulo

2021

RAÍSSA MODAFFORE DANDALO GIRARDI

EXEMPLAR CORRIGIDO

Bases genéticas dos defeitos de segmentação vertebral: estudo genético-clínico focado em pacientes com disostose espondilocostal

Genetic basis of segmentation defects of the vertebrae: genetic and clinical study focused on spondylocostal dysostosis patients

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Aconselhamento Genético e Genômica Humana, na Área de Genética.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Débora Romeo Bertola

São Paulo

2021

Modaffore Dandalo Girardi, Raíssa
Bases genéticas dos defeitos de segmentação
vertebral : Estudo genético-clínico focado em
pacientes com disostose espondilocostal / Raíssa
Modaffore Dandalo Girardi ; orientadora Débora
Romeo Bertola -- São Paulo, 2021.
88 p. + anexo

Dissertação (Mestrado Profissional) -- Instituto
de Biociências da Universidade de São Paulo.
Programa de Mestrado Profissional em Aconselhamento
Genético e Genômica Humana.

1. defeito de segmentação vertebral. 2. disostose
espondilocostal. 3. sequenciamento de nova geração.
4. aconselhamento genético. I. Romeo Bertola,
Débora, orient. II. Título.

Bibliotecária responsável pela catalogação:
Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228

Profª Drª Débora Romeo Bertola

A todas as mães.
Em especial à minha
e às que fazem parte das famílias deste estudo.

AGRADECIMENTOS

A todas e todos profissionais da saúde e da ciência, que insistem em fazer o seu trabalho e cumprir o seu papel da melhor forma possível, mesmo com todos os obstáculos, em especial no nosso país e em tempos tão difíceis como os que vivemos atualmente.

Aos pacientes e suas famílias, que cederam acesso a muito mais do que seus dados genéticos, mas também e principalmente às suas histórias de vida, para que esse projeto pudesse ser desenvolvido.

Ao Ben, meu filho, que há quase onze meses me convoca a olhar de frente para a vida e encontrar beleza no cotidiano. E ao Rafa, meu marido, que há quase nove anos me convoca ao mesmo. Que sempre caminhou ao meu lado, que se disponibilizou a muito mais do que qualquer outra pessoa para que essa dissertação pudesse ser concluída, e que continua sendo meu porto seguro, especialmente nos tempos em que vivemos.

À minha mãe, Patrícia, meu também porto seguro. O primeiro deles. Mais do que porto: portal. Início de tudo que sou, sempre ao meu lado e a cada dia mais. E ao meu pai, Daniel, meu também início. Também sempre ao meu lado. Aquele que me ensinou a sonhar tão livremente.

Ao meu tio Plínio, minha tia Cris e meus irmãos, Filipe e Mateus, que contribuíram em tanto na minha vida, desde sempre. Ao meu tio avô José, que viveu e vive uma vida dedicada a nós, e agora, em especial, ao Ben, permitindo que eu pudesse me dedicar a essa dissertação em sua reta final.

À minha avó Maria, que viabilizou tudo o que somos como família, e que permaneceu, todos os dias, fazendo tudo o que estava a seu alcance, para que todos nós pudéssemos chegar aonde chegamos.

Ao meu avô Domingos, e a todos os meus antepassados, que cumpriram sua jornada da melhor forma que puderam, sem os quais jamais estaríamos aqui e jamais teríamos alcançado cada uma de nossas conquistas, tanto como família, quanto individualmente.

À família do Rafa, que é minha também. Em especial, à sua mãe, Lourdes, que é, de certa forma, também minha. Avó do meu filho. Sempre doce e tão essencial. E ao seu pai, Pedro, também avô do meu filho, também tão essencial, sempre disponível. Meu agradecimento por todos os dias, desde sempre e para sempre.

A: Thiago, Kaike, Marina, Lucas, Marcela, Julio, Rafael, Tainá, Rebeca. Alice, Giovanna, Mayara, Gabriela, Ana, Isabella. Ní, Juliene, Lissa, Isabela. Vivian. Veridiana. Que são o nome da minha grande sorte e mais importantes, muito mais, do que são capazes de mensurar.

À Nadir, que sabe mais sobre mim do que eu mesma, peça chave no desenvolvimento deste projeto e no meu desenvolvimento como pessoa.

Àquelas e àquele que primeiro me fizeram encantar pela biologia: Soraia, Gisele e Rafael, por acreditarem no poder da Educação e me apresentarem o fundamento de tudo o que veio depois.

A todas e todos da Genera, por tanta parceria e compreensão, por serem força motriz do meu cotidiano e a melhor equipe com a qual já trabalhei. Em especial ao Ricardo que, além de confiar em meu trabalho e me indicar este Programa de Mestrado, me apresentou a melhor Orientadora que seria possível. Ao André, por também além de confiar em meu trabalho, ter sido muito mais importante do que ele pode imaginar durante esta trajetória. Ao Gabriel e ao Caio, que foram sempre muito mais “humanos” do que “recursos”, colegas de trabalho que se tornaram parceiros, e parceiros que se tornaram amigos. Ao Zé, Bea, Amandinha, Pati e Pedro, que ativamente contribuíram para que essa dissertação se concretizasse. À Nath, Kath, Isa, Gi, Tay e Régis que, junto das pessoas acima, coloriram meus dias. Ao Rapha e à Adri, que muito me ensinaram e contribuíram de maneira muito importante para esse projeto. E à Nati, por tudo, por tanto, por muito mais do que seria possível descrever, mas que ela bem sabe.

À Coordenação e todas e todos Professores e Professoras do Programa de Mestrado Profissional em Aconselhamento Genético e Genômica Humana do IB-USP. Pela disposição e disponibilidade em seguirem investindo em um programa desafiador, inovador e cada vez mais necessário. Em especial àquelas e àqueles que se dispõem a receber as alunas e os alunos para estágio em seus ambulatórios, nos proporcionando essa vivência tão fundamental.

Às pessoas queridas que encontrei durante essa jornada, que me acompanharam de perto e foram essenciais para tudo o que aconteceu durante essa trajetória: Nana, Lari, Gabi, Cá, Fran, Nati e Arthur. E ao José Ricardo, que me recebeu por muitas manhãs, foi paciente e engajado, respondeu prontamente a muitas dúvidas de última hora e contribuiu com essa dissertação e com minha formação muito, muito mais do que pode imaginar.

À Márcia e à Ana, que me acolheram por muitas manhãs e tardes, cujo sorriso, prestatividade e carinho se fizeram presentes em tantos momentos, se refletindo em cada palavra dessa dissertação. À Erika, que foi suporte para tantas das minhas questões. E a todas e todos do CEGH-CEL e do HC-FMUSP que cruzaram meu caminho e que de alguma forma contribuíram ao longo desses mais de dois anos de Mestrado.

E à Professora Doutora Débora Bertola, para quem honestamente me faltam palavras. Uma profissional admirável e uma orientadora que faz jus à designação. Paciente, compreensiva, engajada, disponível. Exemplo e inspiração. Para sempre serei imensamente grata.

“A good doctor is not too busy to help,
doesn’t use big words, sits down and listens,
asks how you are doing today and what your problem is.”

Paciente não identificado, *Health literacy and patient safety: Help patients understand*

RESUMO

DANDALO-GIRARDI, R.M. **Bases genéticas dos defeitos de segmentação vertebral: estudo genético-clínico focado em pacientes com disostose espondilocostal.** 2021, Dissertação de Mestrado em Aconselhamento Genético – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Palavras-chave: defeito de segmentação vertebral, disostose espondilocostal, sequenciamento de nova geração, aconselhamento genético

A estrutura e função da coluna vertebral dependem de sua organização segmentar, cuja origem remonta à somitogênese, um processo ritmicamente coordenado no embrião pelas vias Notch, FGF e Wnt. Perturbações em uma ou mais dessas vias podem levar a defeitos de segmentação vertebral (DSVs), que podem ser classificados em simples (S-DSV) e múltiplo (M-DSV), sendo os M-DSVs subdivididos em: regional (M-DSV-R) e generalizado (M-DSV-G), com acometimento de dez ou mais vértebras consecutivas, dentre os quais destaca-se a disostose espondilocostal (DEC). Os DSV podem ocorrer isoladamente, como no caso da DEC, ou estar associado a outras anomalias congênitas, podendo constituir síndromes clinicamente reconhecidas. A DEC é uma doença de etiologia majoritariamente mendeliana, com padrão geralmente autossômico recessivo, e classicamente associada aos genes *DLL3*, *MESP2*, *LFNG*, *HES7* e *TBX6*, todos eles integrantes da via Notch. Outros genes associados a fenótipos sobrepostos à DEC incluem *RIPPLY2* e *DMRT2*. Uma grande heterogeneidade fenotípica de DSVs é associada ao gene *TBX6*, desde uma escoliose congênita até DEC. Diferentes mecanismos de herança também foram demonstrados em *TBX6*, desde um padrão mendeliano clássico, com um padrão autossômico dominante ou recessivo, e uma herança composta, geralmente decorrente de uma microdeleção em 16p11.2 ou uma variante de perda de função, com um haplótipo hipomórfico T-C-A (rs2289292, rs3809624 e rs3809627) em *trans*. Neste trabalho, 18 indivíduos de 17 famílias com DSVs foram avaliadas clinicamente: consanguinidade foi observada em 5 famílias, recorrência em uma e transmissão vertical em uma única família. O estudo molecular, principalmente pela técnica do sequenciamento de nova geração, foi realizado nos probandos e outros parentes de interesse com foco na análise dos 5 principais genes associados à DEC (*DLL3*, *MESP2*, *LFNG*, *HES7* e *TBX6*). Nas famílias com variantes em *TBX6*, um indivíduo afetado em cada uma delas também foi submetido a *microarray* para análise de ancestralidade. A avaliação clínico-radiológica permitiu estabelecer o diagnóstico de DEC em 8 pacientes (7 famílias); 3 síndromes clinicamente reconhecidas em 3 indivíduos (síndromes de Robinow, da sinostose espondilocarpotarsal e cerebrocostomandibular) e escoliose congênita em único indivíduo. Em 6 famílias com M-DSV-R, não foi possível estabelecer um diagnóstico específico. A análise molecular permitiu a identificação de variantes em 6/7 probandos com DEC: 5 com variantes bialélicas em *DLL3*, 3 delas novas, e uma variante em heterozigose em *TBX6*, previamente reportada, na família com transmissão vertical. No paciente com escoliose congênita, também foi encontrada uma variante *nonsense*, em heterozigose em *TBX6*, porém sem o haplótipo T-C-A em *trans*, de modo a não confirmar o mecanismo de herança composta. A ancestralidade estimada revelou um importante componente africano (42%). Um caso típico de DEC sem achados moleculares no painel focado foi encaminhado para sequenciamento do exoma, com resultado não conclusivo. Houve confirmação molecular de todas as síndromes reconhecidas e nenhum indivíduo com M-DSV-R, sem diagnóstico específico, apresentou variantes nos 5 genes estudados. Este estudo mostrou que o sequenciamento focado em indivíduos com DEC apresentou uma alta positividade (6/7), particularmente com variantes bialélicas em *DLL3* (5/7) e ampliou o espectro de variantes descritas na literatura. Este fato, associado à ausência do haplótipo de risco em

trans no gene *TBX6* no indivíduo com ancestralidade africana e escoliose congênita, evidencia a importância de análise de populações miscigenadas e pouco representadas em pesquisas, majoritariamente de origem europeia. Os achados do presente estudo também mostram os desafios envolvidos no aconselhamento genético de DSVs, dada sua heterogeneidade lófica, de padrões de herança, e em alguns casos, importante variabilidade fenotípica.

ABSTRACT

DANDALO-GIRARDI, R.M. **Genetic basis of segmentation defects of the vertebrae: genetic and clinical study focused on spondylocostal dysostosis patients.** 2021, Dissertação de Mestrado em Aconselhamento Genético – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Keywords: segmentation defects of the vertebrae, spondylocostal dysostosis, next-generation sequencing, genetic counseling

The structure and function of the spine depends on its segmental organization, whose origin goes back to somitogenesis, a rhythmically coordinated process in the embryo by the Notch, FGF and Wnt pathways. Disturbances in one or more of these pathways can lead to segmentation defects of the vertebrae (SDV), which can be classified as simple (S-SDV) and multiple (M-SDV), with M-SDV subdivided into: regional (M-SDV-R) and generalized (M-SDV-G), with involvement of ten or more consecutive vertebrae, among which spondylocostal dysostosis (SCD) stands out. SDV can occur in isolation, hence SCD, or be associated with other congenital anomalies, constituting clinically recognized syndromes. SCD is mostly a Mendelian phenotype, generally with an autosomal recessive pattern of inheritance, and classically associated with variants in *DLL3*, *MESP2*, *LFNG*, *HES7* and *TBX6* genes, all of which are members of the Notch pathway. Other genes associated with phenotypes overlapping with SCD include *RIPPLY2* and *DMRT2*. A large phenotypic heterogeneity of SDV is associated with the *TBX6* gene, from congenital scoliosis to SCD. Different mechanisms of inheritance have also been demonstrated in *TBX6*, from a classic Mendelian pattern, with an autosomal dominant or recessive pattern, to compound inheritance, usually showing a microdeletion in 16p11.2 or a loss of function variant, with a hypomorphic haplotype T-C-A (rs2289292, rs3809624 and rs3809627) in trans. In this study, 18 individuals from 17 families with SDV were evaluated clinically: consanguineous mating was observed in 5 families, recurrence in one and vertical transmission in a single family. The molecular study, mainly by the next-generation sequencing technique, was carried out on the probands and other relatives of interest with a focus on the analysis of the 5 main genes associated with SCD (*DLL3*, *MESP2*, *LFNG*, *HES7* and *TBX6*). In families with *TBX6* variants, an individual affected in each of them was also submitted to microarray for ancestry analysis. The clinical and radiological evaluation established a diagnosis of SCD in 8 patients (7 families); 3 clinically recognizable syndromes in 3 individuals (Robinow syndrome, spondylacropotarsal synostosis and cerebrocostomandibular syndrome) and congenital scoliosis in a single individual. In 6 families with M-SDV-R, it was not possible to establish a specific diagnosis. The molecular analysis allowed the identification of variants in 6/7 probands with SCD: 5 with biallelic variants in *DLL3*, 3 of them novel variants, and a variant in heterozygosity in *TBX6*, previously reported, in the family with vertical transmission. In the patient with congenital scoliosis, a nonsense, heterozygous variant was also found in *TBX6*, but without the T-C-A haplotype in trans, not confirming the mechanism of compound inheritance. Ancestry analysis revealed an important African component (42%). A typical case of SCD without pathogenic variants identified by targeted sequencing was tested for exome sequencing, with an inconclusive result. There was molecular confirmation of all recognizable syndromes and no individual with M-SDV-R, without a specific diagnosis, presented variants in the 5 studied genes. This study showed that targeted next-generation sequencing on individuals with SCD yielded high positive results (6/7), particularly with biallelic variants in *DLL3* (5/7) and expanded the spectrum of variants described in the literature. This fact, associated with the absence of the risk haplotype in trans in the *TBX6* gene in the individual with African ancestry and congenital scoliosis, highlights

the importance of analysis of admixed populations and under represented ones in research, as mostly of them are of European descent. The findings of the present study also show the challenges involved in the genetic counseling of SDV, given their locus heterogeneity, inheritance patterns, and in some cases, important phenotypic variability.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Coluna vertebral, somitogênese e defeitos de segmentação	14
1.2	Classificação dos defeitos de segmentação vertebral	15
1.2.1	Classificação radiológica	15
1.2.2	Nosologia das doenças esqueléticas de etiologia genética.....	16
1.3	Disostose espondilocostal	17
1.3.1	Características clínico-radiológicas	17
1.3.2	Bases genéticas.....	18
1.4	<i>TBX6</i> e defeitos de segmentação vertebral: heterogeneidade fenotípica e de padrões de herança.....	21
1.5	Correlação genótipo-fenótipo na disostose espondilocostal	23
1.6	Aconselhamento genético e contribuição de estudos por Sequenciamento de Nova Geração (NGS).....	24
2	OBJETIVOS.....	26
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	27
3.1	Casuística	27
3.2	Aprovação ética	27
3.3	Metodologias	27
3.3.1	Dados clínicos e radiológicos.....	27
3.3.2	Análise molecular.....	28
3.3.3	Levantamento de variantes previamente reportadas	34
3.3.4	Análise estatística.....	35
4	RESULTADOS	36
4.1	Achados demográficos e clínico-radiológicos	36
4.2	Achados moleculares	42
4.2.1	Sequenciamento do exoma completo	49
4.3	Análise de ancestralidade.....	50
4.4	Variantes previamente reportadas em <i>DLL3</i>	52

5	DISCUSSÃO.....	57
5.1	Dados demográficos	57
5.2	Dados genéticos	57
5.3	Paciente com fenótipo típico de DEC sem diagnóstico molecular conclusivo 59	
5.4	Pacientes com variantes em <i>DLL3</i>	60
5.5	Pacientes com variantes em <i>TBX6</i>	63
5.6	Formas sindrômicas	68
5.7	Aconselhamento genético	70
6	CONCLUSÕES.....	74
7	REFERÊNCIAS	76
8	ANEXOS.....	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Coluna vertebral, somitogênese e defeitos de segmentação

Muitas funções essenciais são atribuídas à espinha dorsal, desde proteger nervos e a medula espinhal, até constituir um eixo flexível do corpo humano, que permite os movimentos da cabeça e do tronco. Sua organização em segmentos vertebrais, separados por discos de articulações intervertebrais e apoiados em ligamentos e grupos musculares axiais, proporciona à coluna vertebral liberdade para flexões, extensões e rotações. No entanto, sua estabilidade depende de uma relação anátomo-funcional precisa entre seus elementos ósseos, cartilagosos, ligamentares e musculares (ECKALBAR *et al.*, 2012).

O surgimento e a manutenção dessa importante relação dependem de uma grande diversidade de fatores, que incluem desde aspectos genéticos até fatores ambientais, ligados a acontecimentos em todas as etapas da vida humana (GIAMPIETRO *et al.*, 2013). Dentre essas etapas, um processo crucial para o desenvolvimento da coluna vertebral é a segmentação das vértebras, que ocorre durante o desenvolvimento embrionário, entre 20 e 35 dias após a concepção (TURNPENNY *et al.*, 2007).

As vértebras são uma série de unidades anatômicas similares, organizadas de modo segmentar ao longo do eixo ântero-posterior do corpo (TURNPENNY *et al.*, 2007). Tal organização segmentar está intrinsecamente ligada à existência de estruturas embrionárias denominadas “somitos”. Tais estruturas transitórias, que precedem as vértebras, se formam durante a somitogênese, um processo ritmicamente coordenado, que inicia na extremidade posterior do embrião, direcionando-se para sua extremidade anterior (POURQUIÉ, 2011a).

Em 1976, Cooke e Zeeman propuseram um modelo denominado “relógio e frente de onda” (do inglês, “*clock and wavefront*”) para explicar a ritmicidade dos eventos da somitogênese. De acordo com esta proposta, a oscilação autônoma da composição bioquímica das células embrionárias precursoras dos somitos funcionaria como um relógio molecular. Esta oscilação, associada à formação de um gradiente que se propagaria tal qual uma onda ao longo do eixo ântero-posterior do embrião, resultaria na diferenciação sequencial dos somitos.

Atualmente, sabe-se que o processo da somitogênese está associado a três importantes vias de sinalização: Wnt, FGF e Notch, que interagem entre si através da ação de diversas proteínas sinalizadoras transcritas por diferentes genes (WANG *et al.*, 2015). Tais vias também estão envolvidas em etapas posteriores do desenvolvimento esquelético, como a osteogênese, e alguns de seus componentes já foram associados à etiologia de diferentes processos tumorais

(TU *et al.*, 2007; SU, JIN & CHEN, 2014; LUO *et al.*, 2019; HUGUET *et al.*, 1994; NOWELL & RADTKE, 2017; KORC & FRIESEL, 2009).

Dado seu importante papel no desenvolvimento das vértebras, perturbações em uma ou mais das vias supracitadas durante o período embrionário podem levar a diversas malformações vertebrais congênitas (MVCs), tais como a presença de hemivértebras, vértebras em cunha, em formato de borboleta, podendo constituir defeitos de segmentação vertebral (DSVs), como a formação de blocos vertebrais e barras ósseas (OZBUDAK & POURQUIÉ, 2008; KOMIYA & HABAS, 2008; ECKALBAR *et al.*, 2012; ORNITZ & ITOH, 2015; CHITAYAT *et al.*, 1992; STEIN *et al.*, 2004; BAUMERT *et al.*, 2005).

Tais defeitos possuem grande heterogeneidade etiológica e os fatores ambientais e genéticos que contribuem para seu acontecimento ainda não são compreendidos em sua totalidade. Dentre os fatores ambientais, a ocorrência de DSVs em modelos animais e humanos já foi associada à exposição materna à ingestão de álcool, medicamentos anticonvulsivantes, hipertermia e diabetes (GIAMPIETRO *et al.*, 2013). Porém, com o avanço dos estudos na área molecular, iniciou-se a identificação das bases genéticas dos DSVs e o achado de alterações em genes envolvidos com a via de sinalização Notch nos pacientes estudados corroborou a importância de tais genes para o processo de desenvolvimento das vértebras (TURNPENNY *et al.*, 2007).

1.2 Classificação dos defeitos de segmentação vertebral

1.2.1 Classificação radiológica

Considerando a diversidade e heterogeneidade de classificações radiológicas existentes para os DSVs, membros do *International Consortium for Vertebral Anomalies and Scoliosis* – ICVAS (OFFIAH *et al.*, 2010) propuseram um sistema de classificação mais objetivo e com maior replicabilidade do que os disponíveis até então. Tal sistema categoriza inicialmente os DSVs em simples (S-DSV) e múltiplo (M-DSV), sendo os M-DSVs subdivididos em: regional (M-DSV-R), com acometimento local de regiões específicas (cervical, dorsal, lombar, sacral) e generalizado (M-DSV-G), com acometimento de dez ou mais vértebras consecutivas (Figura 1).

Figura 1: Etapas iniciais do sistema de classificação radiológica proposto pelo *International Consortium for Vertebral Anomalies and Scoliosis - ICVAS*. DSV = Defeito de Segmentação Vertebral. Modificado de Offiah e colaboradores (2010).

Tanto os DSVs simples como os múltiplos podem ocorrer isoladamente ou associados a malformações de outros órgãos/sistemas, podendo compor uma síndrome, como no caso das síndromes de Alagille, Robinow e Goldenhar, e da associação VACTERL (epônimo caracterizando a presença de anomalias Vertebrais, Anais, Cardíacas, fístula Traqueo-Esofágica, Renal e defeitos de membros) (TURNPENNY & ELLARD, 2012; PATTON & AFZAL, 2002; BOGUSIAK, PUCH & ARKUSZEWSKI, 2017; SOLOMAN, 2018).

Já dentre as formas múltiplas generalizadas (M-DSV-G) e não associadas a outras malformações ou síndromes, destacam-se a disostose espondilocostal (DEC) e a disostose espondilotorácica. O termo “espondilotorácica” é utilizado para aquelas situações nas quais se observa profuso encurtamento do tronco e uma aparência das costelas que remete às patas de um caranguejo (aspecto “*crab-like*”). Esta condição foi reportada principalmente em Porto Rico (TURNPENNY *et al.*, 2007).

1.2.2 Nosologia das doenças esqueléticas de etiologia genética

Os DSVs constituem parte do grupo das doenças esqueléticas de etiologia genética cuja nosologia tem sido discutida e revisada há mais de 45 anos. A revisão mais atual desta

classificação, elaborada por Mortier e colaboradores (2019), traz 461 fenótipos em 42 grupos distintos de doenças ósseas esqueléticas. Dentre estas categorias, o grupo 35 engloba as disostoses com envolvimento predominante de vértebras, com ou sem acometimento das costelas, dentre as quais destaca-se a DEC. Diferentemente do algoritmo proposto pelo ICVAS (OFFIAH *et al.*, 2010), tal revisão não define a DEC como uma entidade distinta da disostose espondilotorácica.

Além da DEC, o grupo 35 também inclui outras doenças, como a síndrome de Currarino, síndrome da deficiência da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), escoliose congênita com penetrância incompleta, síndrome de Klippel-Feil, síndrome cerebrocostomandibular, diáfano-espôndilo-disostose e displasia espôndilo-megaepifisária-metafisária. Outras doenças ósseas menos específicas contempladas na nosologia que também apresentam DSV incluem: displasia espondilocarpotarsal (grupo 7), síndrome das sinostoses múltiplas (grupo 42) e síndrome de Robinow de herança autossômica recessiva (grupo 17) (MORTIER *et al.*, 2019).

Ressalta-se que a revisão de Mortier e colaboradores (2019) da nosologia em questão aponta um padrão de herança mendeliano para todas as doenças supracitadas, assim como para a grande maioria das displasias e disostoses esqueléticas como um todo.

1.3 Disostose espondilocostal

1.3.1 Características clínico-radiológicas

Caracterizada pelo desenvolvimento anormal dos corpos vertebrais, a classificação "disostose espondilocostal" abrange um grupo heterogêneo de anomalias do esqueleto axial, que radiograficamente apresentam múltiplos defeitos de segmentação vertebral, de maneira geral associados a anomalias da costela, sem apresentação de malformações viscerais, atingindo ao menos dez corpos vertebrais adjacentes, representando uma importante forma de M-DSV-G (TURNPENNY, SLOMAN & DUNWOODIE, 2017; LEFEBVRE *et al.*, 2018; OFFIAH *et al.*, 2010).

As vértebras também podem apresentar diferentes pontos de fusão, levando à escoliose em muitos casos, em geral discreta, não progressiva, raramente requerendo tratamento cirúrgico. Adicionalmente, alguns dos ossos das costelas podem estar fundidos ou ausentes. Tais malformações resultam em limitações à movimentação do pescoço e encurtamento do tronco, porém com manutenção do comprimento normal dos membros superiores e inferiores,

o que incorre em baixa estatura desproporcionada. Como as malformações ósseas estão presentes desde o nascimento, apesar da prevalente simetria da caixa torácica ao longo de toda a vida, a função respiratória dos pacientes recém-nascidos pode ficar comprometida devido ao tamanho reduzido do tórax (GUCEV *et al.*, 2010; TURNPENNY, SLOMAN & DUNWOODIE, 2017).

Dado o envolvimento de estruturas como a notocorda e o *floor plate* nas vias de desenvolvimento da coluna vertebral (RICE & DIETRICH, 2006), em alguns casos mais raros, pacientes com DEC também podem apresentar defeitos do tubo neural, tais como espinha bífida e malformação de Chiari (SPARROW *et al.*, 2008; SPARROW *et al.*, 2013a).

Apesar de os pulmões, em geral, atingirem tamanho suficiente para suprir as necessidades do organismo, sua expansão dentro de uma caixa torácica reduzida pressiona o diafragma, o que, por sua vez, gera aumento de pressão no abdome, podendo causar hérnia inguinal, observada particularmente em pacientes do sexo masculino. No entanto, embora os problemas respiratórios possam ser fatais no início da vida, grande parte dos indivíduos afetados vive até a idade adulta (TURNPENNY, SLOMAN & DUNWOODIE, 2017; ALATAS *et al.*, 2015).

1.3.2 Bases genéticas

A descrição do primeiro caso de DEC é atribuída a Jarcho e Levin que, em 1938, estudaram dois irmãos em Baltimore, nos Estados Unidos (MCKUSICK, 1986a). No entanto, os pesquisadores erroneamente se referiram a estes indivíduos como pacientes com síndrome de Klippel-Feil, atualmente classificada como uma condição distinta da DEC (MORTIER *et al.*, 2019). Ressalta-se que o epônimo “síndrome de Jarcho-Levin”, embora prevalentemente associado à disostose espondilotorácica, com aparência radiológica “*crab-like*”, também foi empregado de maneira indiscriminada para formas distintas de DSVs, de modo que, atualmente, sugere-se que tal termo não seja mais utilizado (TURNPENNY *et al.*, 2007).

A partir da década de 60, foram reportados diversos casos de defeitos de segmentação vertebral com características associadas à DEC, tanto com padrão de herança autossômico recessivo, quanto dominante (MCKUSICK, 1986a, 1986b). Porém foi em 1999, que Turnpenny e colaboradores, estudando por análise de ligação uma família árabe-israelense consanguínea com seis casos fortemente sugestivos de padrão autossômico recessivo, encontraram um *LOD*

score de 6,9 na região cromossômica 19q13, que foi posteriormente confirmada em uma família paquistanesa.

Partindo dessa constatação, e com base em dados prévios de que camundongos mutantes para o gene *delta like canonical Notch ligand 3 (Dll3)* apresentavam DSVs semelhantes ao fenótipo da DEC (KUSUMI *et al.*, 1998), Bulman e colaboradores (2000) clonaram e sequenciaram o gene *DLL3* humano, com base na localização proposta por Turnpenny e colaboradores (1999), para avaliá-lo como possível candidato para DEC. O estudo permitiu a identificação das três primeiras variantes descritas no gene *DLL3* em três famílias com DEC, evidenciando a importância da via de sinalização Notch e de seus componentes no desenvolvimento do esqueleto axial de mamíferos.

Adicionalmente, Turnpenny e colaboradores (2003) sequenciaram o gene *DLL3* em pacientes com quadro de DEC em outras 14 famílias, tendo sido encontradas 12 mutações distintas. Todos estes pacientes apresentavam achados radiológicos de extensa segmentação anormal da coluna vertebral. O estudo evidenciou uma relação genótipo-fenótipo aparentemente consistente, levando os autores a sugerirem que variantes no gene *DLL3* estavam associadas à condição de DEC, corroborando o estudo anterior de Bulman e colaboradores (2000). Em um levantamento realizado por Turnpenny e colaboradores (2017), a proporção de casos de disostose espondilocostal autossômica recessiva atribuída a variantes patogênicas em *DLL3* foi indicada como aproximadamente 60%.

Entre 2004 e 2008, Whittock e colaboradores (2004a) e Cornier e colaboradores (2004, 2008) identificaram variantes em um segundo gene, *MESP2*, em famílias com casos de DEC que também apresentavam padrão de herança autossômico recessivo. Assim, o gene *MESP2*, também relacionado à via de sinalização Notch (MORIMOTO *et al.*, 2005), foi associado à DEC, evidenciando a heterogeneidade lófica da condição.

Em 2006, Sparrow e colaboradores relataram o caso de um paciente que apresentava achados radiológicos semelhantes aos reportados previamente para o indivíduo descrito com DEC associada a *MESP2* (WHITTOCK *et al.*, 2004a). No entanto, o estudo molecular do paciente não revelou mutações nos genes *DLL3* ou *MESP2*. A análise de um terceiro gene, *LFNG*, também previamente relacionado à via de sinalização Notch (MOLONEY *et al.*, 2000), revelou a presença de uma variante *missense* em homozigose e permitiu a associação deste terceiro gene à DEC autossômica recessiva.

Estudos subsequentes de Sparrow e colaboradores (2008, 2010 e 2013) identificaram famílias com DEC apresentando padrão de herança autossômico recessivo em que não foram

identificadas variantes patogênicas em nenhum dos genes previamente descritos. Em tais famílias, foram encontradas variantes em um quarto gene, *HES7*, cujo ortólogo é regulado pela via Notch em camundongos (NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (US), 2018), o que levou à identificação de um novo gene associado à DEC.

No entanto, apesar de os casos supracitados apresentarem padrão de herança autossômico recessivo, diferentes estudos, tais como o de Rimoin, Fletcher e McKusick (1968), também já haviam reportado famílias com fenótipo de DEC que sugeriam padrão de herança autossômico dominante. Estes dados foram corroborados por um estudo mais recente de Gucev e colaboradores (2010), cujos pacientes foram posteriormente estudados por Sparrow e colaboradores (2013).

Neste segundo estudo, em que o exoma completo dos pacientes foi sequenciado, foi identificada apenas nos indivíduos afetados uma variante de perda do códon de parada (*stoploss*) em heterozigose em *TBX6*, um gene previamente associado ao desenvolvimento de estruturas do mesoderma paraxial, e localizado no segmento cromossômico 16p11.2 (CHAPMAN & PAPAIOANNOU, 1998; PAPAPETROU *et al.*, 1999). Assim, Sparrow e colaboradores (2013) identificaram pela primeira vez uma variante genética causando DEC associada a um padrão de herança autossômico dominante.

Em 2015, McInerney-Leo e colaboradores realizaram o sequenciamento do exoma de dois irmãos com DSV, previamente testados para os genes *MESP2*, *DLL3*, *LFNG* e *HES7*, e sem alterações patogênicas identificadas. O sequenciamento do exoma também não revelou alterações provavelmente patogênicas em genes previamente associados à DEC ou à síndrome de Klippel-Feil, porém evidenciou heterozigose composta para uma variante *nonsense* e uma mutação no sítio de *splicing* no gene *RIPPLY2* que segregavam junto com o fenótipo estudado. Adicionalmente, ensaios funcionais *in vitro* permitiram a observação de redução significativa da atividade inibidora de transcrição para o alelo com mutação *nonsense* quando comparado ao alelo selvagem do gene *RIPPLY2* (MCINERNEY-LEO *et al.*, 2015).

Considerando tais resultados e sendo este gene responsável por codificar uma proteína nuclear pertencente a uma família de proteínas importantes para o processo de somitogênese (ZHAO *et al.*, 2018), foi sugerida a associação de um sexto gene, *RIPPLY2*, à DEC, também apresentando herança autossômica recessiva. Até o momento, cinco famílias com DSVs e variantes patogênicas em *RIPPLY2* foram descritas. No entanto, diferentemente do padrão generalizado de acometimento vertebral típico da DEC, nestas famílias foi observado comprometimento regional, particularmente da coluna cervical (SEREY-GAUT *et al.*, 2020).

Por fim, uma variante bialélica, com alteração do códon iniciador da tradução, em um novo gene (*DMRT2*) foi recentemente descrita em um recém-nascido com insuficiência respiratória grave e apresentando acentuadas anomalias das costelas e malformações das vértebras torácicas. Os autores propuseram que variantes neste gene estejam associados a um fenótipo com sobreposição à DEC, podendo ser classificado como um subtipo distinto da condição (BOUMAN *et al.*, 2018).

1.4 *TBX6* e defeitos de segmentação vertebral: heterogeneidade fenotípica e de padrões de herança

Em 2015, após Sparrow e colaboradores (2013) terem identificado uma variante em *TBX6* associada à DEC de padrão autossômico dominante, Wu e colaboradores, partindo da premissa que microdeleções proximais de 0,6 Mb no segmento cromossômico 16p11.2, presentes em 0,03% da população mundial, mas mais prevalentes em indivíduos com transtorno do espectro autista (TEA) e obesidade (sendo que uma proporção menor destes indivíduos também apresentavam anomalias vertebrais), buscaram uma possível relação entre tal microdeleção e a presença de um outro tipo de DSV, a escoliose congênita.

A casuística do estudo foi composta por 237 pacientes com diagnóstico de escoliose congênita, em sua maioria de origem chinesa. Dentre 161 indivíduos analisados inicialmente, 12 (7,5%) apresentavam a microdeleção em 16p11.2, uma prevalência consideravelmente superior à observada em TEA (0,4 a 0,8%) e obesidade (0,7%). No entanto, em dois casos nos quais a microdeleção havia sido herdada de um genitor, o DSV estava presente apenas no caso índice.

Dentre os genes localizados na região estudada e que poderiam explicar o fenótipo de DSV, *TBX6* havia sido designado como candidato, uma vez que seu papel na embriogênese foi evidenciado em estudos animais (POURQUIÉ, 2011b; SPARROW *et al.*, 2012). Dessa forma, variantes pontuais em *TBX6* também foram avaliadas, identificando-se tanto variantes de perda de função, como *missense* neste gene. No entanto, todas as variantes se encontravam em heterozigose.

Como o padrão autossômico dominante não seria provável, dada a baixa penetrância da anomalia vertebral nos casos de microdeleção 16q11.2, passou-se à investigação de um fator genético adicional que pudesse explicar o cenário observado. Nesses estudos adicionais, envolvendo tanto pacientes com deleção do gene *TBX6*, quanto pacientes com outras mutações

de perda de função (do tipo *frameshift* ou *nonsense*) no mesmo gene, demonstrou-se que, para a expressão do fenótipo da escoliose congênita, era necessária também a existência em *trans* de um haplótipo comum, composto pelas bases T-C-A, nos SNPs rs2289292, rs3809624 e rs3809627, respectivamente.

Ensaio *in vitro* sugeriram que o haplótipo T-C-A constituía um alelo hipomórfico, e assim Wu e colaboradores (2015) propuseram um modelo de herança composta – semelhante ao sugerido anteriormente por Albers e colaboradores (2012) para a síndrome da trombocitopenia com ausência dos raios (TAR) – em que um alelo nulo de *TBX6* em *trans* com um haplótipo hipomórfico deste mesmo gene resultariam em um DSV, o que ocorria em aproximadamente 10% dos casos de escoliose congênita.

No estudo de Wu e colaboradores (2015), 42 indivíduos de outros centros que apresentavam microdeleção 16p11.2 também foram avaliados, sendo alguns deles provenientes de centros americanos. Dentre os seis indivíduos com escoliose congênita, apenas um deles, de origem africana, não apresentava o haplótipo T-C-A em *trans* com a microdeleção.

Estudos posteriores de Lefebvre e colaboradores (2017) e Takeda e colaboradores (2017) corroboraram o modelo de herança composta como padrão relacionado à manifestação de DSV associada ao gene *TBX6* nas populações de origem francesa e belga, assim como na japonesa, respectivamente. Nos dois estudos, os autores evidenciaram uma variação da expressividade dos DSVs ligada ao *TBX6*, desde a escoliose congênita, até quadros de acometimento vertebral mais extenso, diagnosticados como DEC.

Ainda, Lefebvre e colaboradores (2017) observaram que além da variante *stoploss* reportada por Sparrow e colaboradores (2013b) causando DEC, e da microdeleção 16q11.2 ou uma variante de perda de função em *TBX6* em *trans* com o haplótipo hipomórfico (T-C-A) causando escoliose congênita, variantes *missense* bialélicas em *TBX6* também podem causar DSV, particularmente com um comprometimento mais extenso das vértebras, compatível com DEC (LEFEBVRE *et al.*, 2017; OTOMO *et al.*, 2019). Tais achados ressaltam a heterogeneidade de fenótipos e de padrões de herança dos DSVs associados a *TBX6*.

Mais recentemente, Ren e colaboradores (2020) estudaram indivíduos em que a região 16p11.2 se encontrava duplicada. O estudo permitiu observar que, dentre os sete indivíduos com duplicação da região, quatro apresentavam DSV. O achado foi reproduzido em modelo animal, corroborando dados prévios que indicavam um efeito de dose de *TBX6* na somitogênese.

No entanto, os mecanismos moleculares propostos até então para explicar a escoliose congênita (monogênico e herança composta) respondem por uma parcela pequena dos casos. Considerando este cenário, Yang e colaboradores (2020) avaliaram a presença de variantes em sete genes relacionados ao *TBX6* em 584 indivíduos com escoliose congênita e notaram a coocorrência de variantes em dois desses genes em dois indivíduos, sugerindo que um mecanismo oligogênico pode também explicar uma parcela de casos ainda sem etiologia definida.

1.5 Correlação genótipo-fenótipo na disostose espondilcostal

Devido à raridade da DEC, poucos casos de pacientes com tal condição foram previamente reportados, em sua maioria decorrentes de variantes em *DLL3*. Via de regra, os achados radiológicos dos indivíduos afetados descritos na literatura evidenciam acometimento dos corpos vertebrais generalizado, com exceção de pacientes com variantes em *RIPPLY2*, com acometimento preferencial da coluna cervical e pouca alteração em costelas (SEREY-GAUT *et al.*, 2020).

Embora não tenha sido estabelecida uma correlação genótipo-fenótipo precisa até o momento, alguns achados, além dos já supracitados para *RIPPLY2*, foram considerados mais específicos de determinados genes. Em alguns indivíduos com variantes em *HES7*, por exemplo, houve associação com defeito de lateralidade e falha de fechamento do tubo neural (SPARROW *et al.*, 2013a).

Em indivíduos com variantes em *DLL3*, o aspecto radiológico observado é bastante homogêneo, caracterizado por corpos vertebrais de formato arredondando, com hipoplasia dos pedículos vertebrais, com aparência semelhante a pedras roladas (“*pebble beach*”); as costelas podem apresentar fusões distalmente às articulações costovertebrais e o aspecto da caixa torácica é simétrico.

Nos indivíduos com variantes em *MESP2*, as costelas tendem a ser mais alinhadas, com poucos pontos de fusão. Por outro lado, em indivíduos porto-riquenhos, apresentando uma variante decorrente de efeito fundador, a caixa torácica é consideravelmente encurtada e as costelas se espalham como um leque, de forma semelhante às patas de um caranguejo (“*crab-like*”). Distintamente do observado em *DLL3*, os pedículos vertebrais são proeminentes, assemelhando-se a trilhos de trem (TURNPENNY *et al.*, 2007).

Nos dois indivíduos reportados com variantes em *LFNG*, há um acometimento generalizado, aparentando uma maior desorganização dos corpos vertebrais, comparativamente aos indivíduos com variantes em *DLL3* e *MESP2* (SPARROW *et al.*, 2006; OTOMO *et al.*, 2018). Já variantes em *TBX6*, conforme mencionado na seção anterior, podem causar um amplo espectro de variabilidade clínica: desde um DSV único (escoliose congênita), até DSVs extensos, compatíveis com o fenótipo de DEC (LEFEBVRE *et al.*, 2017).

1.6 Aconselhamento genético e contribuição de estudos por Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

O aconselhamento genético consiste em um processo orientado por um profissional da saúde especializado em genética, com o objetivo de dar suporte a todas as etapas que envolvem a confirmação da existência de uma doença com base genética e/ou o cálculo de risco de sua recorrência (FRASER, 1974; PINA-NETO, 2008).

Nem sempre esse processo está atrelado à realização de testes genéticos, já que outros exames, ou até mesmo a análise do histórico familiar, podem ser elementos suficientes para que o aconselhamento seja realizado. No entanto, em casos como o da disostose espondilocostal e dos DSVs em geral, que constituem condições raras, geneticamente heterogêneas, com expressividade e padrões de herança variáveis, o diagnóstico molecular pode ser uma ferramenta fundamental para o cálculo de risco e o fornecimento de importantes elementos para a tomada de decisão dos consulentes, especialmente caso o paciente analisado seja o único afetado na família (TURNPENNY *et al.*, 2007; TURNPENNY, SLOMAN & DUNWOODIE, 2017; LEFEBVRE *et al.*, 2018).

Sendo assim, a caracterização das bases genéticas dos defeitos de segmentação vertebral é de grande importância para viabilizar o diagnóstico molecular e, consequentemente, o aconselhamento genético das famílias dos indivíduos afetados. A importância de estudos nessa temática fica ainda mais evidente em um cenário em que, apesar de um estudo recente de Lefebvre *et al.* (2018) ter localizado variantes patogênicas em 8 de 10 pacientes com fenótipo clássico de DEC, a maioria dos pacientes com defeitos de segmentação vertebral, em sua definição mais ampla, ainda permanece sem diagnóstico molecular definitivo (TURNPENNY, SLOMAN & DUNWOODIE, 2017; LEFEBVRE *et al.*, 2018).

Em contextos como esse, o sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês “*next generation sequencing*”), uma técnica descrita recentemente e que vem se tornando cada vez

mais acessível, tem permitido a análise conjunta de diferentes genes (painel) ou mesmo de todas as regiões codificadoras do genoma (sequenciamento do exoma – WES, do inglês “*whole-exome sequencing*”), o que se faz especialmente interessante no caso de doenças que apresentam grande heterogeneidade de *loci* (CHONG *et al.*, 2015; WETTERSTRAND, 2018).

Assim, estudos envolvendo NGS apresentam relevante potencial para identificação de novas variantes associadas aos defeitos de segmentação vertebral, viabilizando o aconselhamento genético embasado em um diagnóstico molecular sólido para as famílias dos pacientes, além de possibilitar um maior entendimento do espectro clínico dos DSVs de etiologia genética e dos componentes genéticos associados a importantes vias do desenvolvimento humano.

2 OBJETIVOS

Gerais:

- Identificar as bases moleculares e avaliar os achados clínico-radiológicos em indivíduos com DSV, formas isoladas ou associadas a outras malformações, constituindo ou não síndromes clinicamente reconhecidas.

Específicos:

- Identificar variantes patogênicas nos principais genes já reconhecidos como responsáveis pelos defeitos de segmentação vertebral (*DLL3*, *MESP2*, *LFNG*, *HES7* e *TBX6*) em indivíduos com hipótese diagnóstica de DEC ou apresentando DSV associado a outros achados clínicos, porém não constituindo uma síndrome clinicamente reconhecida;
- Identificar variantes patogênicas em genes específicos associados a síndromes clinicamente reconhecidas nos indivíduos com hipóteses diagnósticas bem estabelecidas;
- Identificar variantes em novo(s) gene(s) das vias de sinalização envolvidas na somitogênese (Notch, Wnt e FGF), que possam explicar as anomalias vertebrais e de costelas em indivíduos sem variantes encontradas em genes já reconhecidamente associados a DSVs;
- Discutir aspectos do aconselhamento genético dos DSVs, especialmente no que diz respeito ao cálculo de risco, levando em consideração sua diversificada arquitetura genética.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

A casuística deste estudo é composta de 18 pacientes pertencentes a 17 famílias com defeitos de segmentação vertebral, presentes de forma isolada ou associados a outras malformações, constituindo ou não síndromes reconhecidas. A maioria dos indivíduos foi avaliada no Ambulatório de Doenças Ósseas da Unidade de Genética do Instituto da Criança (ICr) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), com exceção de um único caso, advindo de serviço externo e avaliado por meio de fotografias e imagens radiográficas.

3.2 Aprovação ética

Este estudo constitui um subprojeto do “Estudo genético-clínico das displasias esqueléticas”, aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC/FMUSP (CAPPesq 0558/10) e contemplado na Plataforma Brasil sob o número CAAE 86055518.1.0000.0068. Pacientes do supracitado Ambulatório de Doenças Ósseas que atendiam aos critérios de interesse para o estudo, apresentando um ou mais defeitos de segmentação vertebral, foram convidados à participação e incluídos após a assinatura, pelo próprio indivíduo ou seu responsável, do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.3 Metodologias

3.3.1 *Dados clínicos e radiológicos*

Durante o seguimento clínico no ambulatório, os pacientes integrantes deste estudo foram avaliados por meio de anamnese, exame físico completo e construção do heredograma. Sempre que possível, parentes de primeiro grau (genitores e irmãos) e, em alguns casos, parentes mais distantes, também foram avaliados para verificar a possível presença de sinais clínicos e radiológicos de defeitos de segmentação vertebral.

Todos os probandos foram submetidos a estudos radiológicos, contemplando o tórax e a coluna vertebral, no Setor de Radiologia do ICr do HC-FMUSP. Quando pertinentes, exames complementares foram solicitados, especialmente nos casos de suspeita de malformações

adicionais. Em um caso cuja doença apresentava padrão de herança monogênico de penetrância incompleta (F17), parentes sem história de anomalias ósseas foram avaliados clínica e radiologicamente.

Os indivíduos avaliados foram categorizados sob a luz do sistema de classificação radiológica sugerido por membros do *International Consortium for Vertebral Anomalies and Scoliosis - ICVAS* (OFFIAH *et al.*, 2010) (Figura 1) e da revisão mais recente da Nosologia e Classificação das Doenças Esqueléticas (MORTIER *et al.*, 2019).

Os achados clínico-radiológicos permitiram estabelecer um diagnóstico clínico provável para 11 indivíduos, incluindo a disostose espondilocostal em 7 probandos, escoliose congênita em um probando, e as síndromes da sinostose espondilocarpotarsal, de Robinow e cerebrocostomandibular também em um probando cada.

3.3.2 *Análise molecular*

Como a maioria das doenças ósseas de etiologia genética apresenta padrão de herança mendeliano (MORTIER *et al.*, 2019), os testes genéticos foram direcionados para a realização do sequenciamento gênico, seja pela técnica tradicional de Sanger, seja pelo NGS direcionado (painel de genes de interesse) e/ou WES

O estudo molecular de todos os indivíduos, incluindo o paciente proveniente de serviço externo, foi realizado no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CEGH-CEL/IB-USP). Adicionalmente, a análise de ancestralidade em dois indivíduos pela técnica de *microarray* foi efetuada em laboratório externo. A indicação dos diferentes tipos de teste para cada paciente foi realizada visando à maior otimização possível, de acordo com os recursos disponíveis durante seu seguimento clínico.

3.3.2.1 *Coleta de amostras e extração do DNA*

Os pacientes foram submetidos à coleta de quatro mililitros (mL) de sangue periférico em um tubo contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), para posterior realização dos testes moleculares. Nos casos em que o estudo da segregação das variantes na família era relevante para a interpretação dos dados, quando possível, amostras de sangue dos pais e/ou de outros parentes também foram coletadas.

O DNA das amostras de sangue foi extraído dos leucócitos por robô QIAasympyony (Qiagen, Alemanha), utilizando-se kit do próprio fabricante para esta finalidade. Cada alíquota de DNA utilizada foi quantificada em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fischer Scientific, Estados Unidos), de modo a garantir os padrões necessários para a análise molecular (razão de comprimento de onda 260nm/280nm mínima de 1,80).

3.3.2.2 Testes realizados inicialmente

A maioria dos indivíduos (13 dos 17 probandos) foi submetida a painéis customizados (“P3” e “P4”), cujos genes foram selecionados por grupos de pesquisadores do CEGH-CEL/IB-USP (Anexos I e II). Ao todo, estes painéis incluíam 485 (P3) e 496 genes (P4). Dentre estes, os genes associados a doenças ósseas (85) foram selecionados a partir dos fenótipos mais prevalentes e de interesse científico no ambulatório de Genética Médica do ICr-HC-FMUSP, com base na revisão de 2010 da classificação e nosologia das doenças ósseas genéticas (WARMAN *et al.*, 2011).

Destaca-se em ambos os painéis a presença dos principais genes associados à DEC: *DLL3*, *LFNG*, *MESP2* e *HES7*. Já o gene *TBX6* estava presente apenas no P4. Dessa forma, no caso dos indivíduos avaliados pelo P3, a análise foi complementada pelo sequenciamento do gene *TBX6* pela técnica de Sanger, com exceção de um único caso com variante em homozigose em *DLL3* já reportada na literatura. Em um caso familiar (F6), com transmissão vertical do fenótipo, o estudo do gene *TBX6* por Sanger foi o único a ser realizado.

Nos pacientes incluídos mais recentemente na casuística (04 probandos), o painel utilizado foi o comercial da Illumina (*TruSight One-TSO expanded*), mais amplo, contendo 6700 genes associados a fenótipos mendelianos, incluindo os supracitados cinco principais genes responsáveis pela DEC (*DLL3*, *LFNG*, *TBX6*, *MESP2* e *HES7*). Todos os testes citados acima encontram-se resumidos na Tabela I.

Tabela I: Resumo dos testes genéticos aplicados inicialmente na casuística.

Nº pacientes	Testes realizados	Nº genes
10	Painel NGS (P3) + Sequenciamento Sanger (<i>TBX6</i>)	486
1	Painel NGS (P3)	485
1	Painel NGS (P4)	496
4	Painel NGS (<i>TSO expanded</i>)	6700
2*	Sequenciamento Sanger (<i>TBX6</i>)	1

* Caso familiar.

No caso de formas sindrômicas clinicamente reconhecidas, como a síndrome de Robinow e a síndrome cerebrocostomandibular, assim como na síndrome da sinostose espondilocarpotarsal, com acometimento do esqueleto axial e apendicular, o estudo molecular, através do sequenciamento de nova geração focado, foi direcionado para os genes associados a estes fenótipos, contemplados nos painéis supracitados.

3.3.2.3 Testes adicionais

Um dos pacientes, com fenótipo típico de disostose espondilocostal, mas para o qual não foi possível identificar variante(s) que explicasse(m) seu quadro em nenhum dos 485 genes contemplados no painel P3, nem no gene *TBX6* (sequenciado por Sanger), foi encaminhado para o sequenciamento do exoma completo (WES), incluindo as regiões codificadoras de mais de 20.000 genes.

No paciente F10, com hipótese clínica da síndrome cerebrocostomandibular, uma variante relevante foi identificada por NGS no gene *SNRPB*, mas com baixa cobertura, requerendo a realização do sequenciamento de Sanger da região para comprovação do achado por NGS.

Em duas famílias (F6 e F17) com variantes relevantes identificadas em *TBX6*, a segregação destas variantes e do haplótipo hipomórfico T-C-A (rs2289292, rs3809624 e rs3809627, respectivamente) (WU *et al.*, 2015) foi realizada por sequenciamento de Sanger, incluindo tanto parentes afetados, como parentes sem fenótipo. Adicionalmente, um paciente afetado de cada uma dessas famílias foi submetido a análise de *microarray*, afim de estimar sua ancestralidade e buscar indícios de uma possível relação entre a estimativa obtida e a presença

(ou não) do haplótipo T-C-A em *trans* como premissa para desenvolvimento do fenótipo de DSV.

A segregação também foi realizada no caso de um paciente com duas variantes *missense* em *DLL3*, classificadas inicialmente como *VUS*, com o objetivo de comprovar que tais variantes se apresentavam em *trans* no probando. Nesta situação, o sequenciamento dos pais foi realizado pela técnica de NGS.

3.3.2.4 Sequenciamento de Sanger

Para o sequenciamento de Sanger, foram desenhados pares de *primers* (*forward* e *reverse*) flanqueadores das regiões de interesse dos genes *TBX6* e *SNRPB* (Tabela II). Tais regiões foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR), com utilização do kit *Platinum PCR SuperMix* (Thermo Fischer Scientific, Estados Unidos), seguindo as especificações do fabricante.

Tabela II: *Primers* flanqueadores das regiões de interesse dos genes *TBX6* e *SNRPB*, utilizados para o sequenciamento de Sanger.

Gene	Região	Fita	Sequência do <i>primer</i>
<i>TBX6</i>	IVS1 (contém rs3809624 e rs3809627)	<i>Forward</i>	AGAAGCTGTCGGACTGTGAG
		<i>Reverse</i>	CTTCATTAGCCTCGACCCC
	Exons 2-3	<i>Forward</i>	CCTAAGCAGCGAGACCTGAG
		<i>Reverse</i>	GACTCTGCCTTTCCCAAGAG
	Exon 4	<i>Forward</i>	GTAGCTCCAGGCCTCTCCTG
		<i>Reverse</i>	CCCAACCCTATCCTGGAGTC
	Exons 5-6	<i>Forward</i>	GGGACTCCAGGATAGGGTTG
		<i>Reverse</i>	CCACTGCATTTCTGATGTCC
	Exons 7-8	<i>Forward</i>	CCGGGTAAGTACTGTTACCATC
		<i>Reverse</i>	GAGAGGGATGTCAGAGCAGG
	Exon 9 (contém rs2289292)	<i>Forward</i>	CTCTGCCCTGCTCTGACAT
		<i>Reverse</i>	AGGTTTGTGATGGAGGCAGA
<i>SNRPB</i>	Intron 2	<i>Forward</i>	AGGCAATGAGGCCAGAACTC
		<i>Reverse</i>	GGGGTAAAGGGCTCTCATGTT

Para a etapa de purificação, foi utilizado o reagente de limpeza *ExoSAP-IT* (Thermo Fischer Scientific). A reação de sequenciamento foi realizada com o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Thermo Fischer Scientific), seguida de filtragem em gel *Sephadex* (GE Healthcare Life Sciences, Estados Unidos). O produto resultante foi injetado no sequenciador ABI3730 DNA Analyser (Thermo Fischer Scientific), e os dados obtidos nesta última etapa foram analisados pelo *software Sequencher* (Gene Codes Corporation, Estados Unidos).

3.3.2.5 Sequenciamento de nova geração: painel e WES

O sequenciamento por NGS foi realizado em equipamento Illumina MiSeq (Illumina, Estados Unidos), utilizando-se dois diferentes kits de captura e preparo de biblioteca (Illumina *Nextera Rapid Capture Custom Enrichment* para os painéis P3 e P4, e Illumina *Trusight One Expanded* para o painel *TSO expanded*), de acordo com o protocolo da própria fabricante. Já para o WES, foi utilizado o equipamento Illumina HiSeq2000 (Illumina) e o kit de captura Agilent *SureSelect Human All Exon V6* (Agilent Technologies, Estados Unidos).

As etapas de alinhamento, processamento dos dados, chamada e anotação de variantes foram realizadas utilizando-se os algoritmos e *softwares*: Burrows-Wheeler Aligner (BWA), Picard (Broad Institute), Genome Analysis Toolkit package (GATK) (Broad Institute) e ANNOVAR. Para avaliar o impacto de uma variante em seu produto protéico, foram utilizados os seguintes preditores *in silico*: MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>) para predição de patogenicidade e de degradação do transcrito mediada por mutação nonsense (NMD, do inglês “*nonsense-mediated mRNA decay*”); Human Splicing Finder (<http://umd.bre/Redirect.html>) para predição de alteração de *splicing* em variantes intrônicas; e Rare Exome Variant Ensemble Learner – REVEL (IOANNIDIS *et al.*, 2016; TIAN *et al.*, 2019), para predição de patogenicidade em variantes *missense*. Neste último caso, um *score* >0,7 foi considerado equivalente ao critério de suporte de patogenicidade PP3, e um *score* <0,4 foi considerado equivalente ao critério de suporte de benignidade BP4 das diretrizes do *American College of Medical Genetics and Genomics* (RICHARDS *et al.*, 2015).

Na análise de variantes, foram priorizadas aquelas raras – frequência alélica em controles <0,01 nos bancos populacionais GnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) e ABraOM (<http://abraom.ib.usp.br/>) – e não sinônimas, encontradas nos genes associados aos fenótipos apresentados pelos pacientes. Essas variantes foram classificadas em: patogênica, provavelmente patogênica, benigna, provavelmente benigna e variante de significado incerto

(VUS, do inglês “*variant of uncertain significance*”) de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) de 2015 (RICHARDS *et al.*, 2015) e com as recomendações para interpretação de variantes do *Clinical Genome Resource* – ClinGen (REHM *et al.*, 2015) disponíveis publicamente no endereço <https://www.clinicalgenome.org/working-groups/sequence-variant-interpretation/>.

Para que uma variante fosse considerada responsável ou potencialmente responsável pelo fenótipo, verificou-se também sua apresentação relativamente ao padrão de herança esperado para a doença (em heterozigose para doenças autossômicas dominantes, em hemizigose para indivíduos do sexo masculino em fenótipos com um padrão ligado ao X e bialélicas, em homozigose ou heterozigose composta, para um padrão autossômico recessivo).

As variantes foram consideradas novas, não reportadas anteriormente, caso não estivessem descritas nos bancos de dados: *The Human Gene Mutation Database* (HGMD – <http://www.hgmd.cf.ac.uk>); ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>); ou PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>).

No paciente com hipótese clínica de DEC encaminhado para sequenciamento do exoma completo, a análise priorizou a presença de variantes raras em:

- a) genes previamente associados à DEC (*DLL3*, *MESP2*, *LFNG*, *TBX6*, *HES7*, *RIPPLY2* e *DMRT2*);
- b) genes sugeridos por Lefebvre e colaboradores (2018) como candidatos para M-DSVs (*DTX2*, *MEOX1*, *HDX*, *GNAS*, *EPHA2*, *FLNB*);
- c) genes das vias Notch e Wnt (Anexo III) listados com base no *KEGG PATHWAY Database* (<https://genome.jp/kegg/pathway.html>);
- d) genes da família FGF e seus respectivos receptores (FGFRs), além de outros genes da via FGF (*SPRY2*, *SPRY4*, *DUSP4*, *DUSP6*, *SNAI1*, *SNAI2*, *PTPN11*, *HSPG2*) cujos ortólogos apresentaram padrão de expressão oscilatório durante a somitogênese em modelo animal (DEQUÉANT & POURQUIÉ, 2008; ECKALBAR *et al.*, 2012).

3.3.2.6 Microarray e análise de ancestralidade

A análise de *microarray* foi realizada utilizando-se o kit *Infinium HTS Global Screening Array-24 BeadChip v3.0* (Illumina), seguindo-se as especificações do fabricante. As leituras dos sinais de fluorescência foram feitas utilizando-se o sistema iScan (Illumina).

As estimativas de ancestralidade foram calculadas pelo método de máxima verossimilhança, utilizando *software* de programação em *python*, com base nas frequências alélicas de 60552 SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único, do inglês, “*single nucleotide polymorphism*”) obtidas em bancos de dados públicos, sendo os principais : *1000 Genomes Project phase 3* (<https://www.internationalgenome.org/>), *Human Genome Diversity Project – HGD*P (ftp://ngs.sanger.ac.uk/production/hgdp/hgdp_wgs.20190516/) e <https://www.hagsc.org/hgdp/> e GnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>).

3.3.3 *Levantamento de variantes previamente reportadas*

Dada a alta prevalência de variantes relevantes identificadas em *DLL3* na presente casuística e sua importante representatividade dentre os pacientes com múltiplos defeitos de segmentação vertebral generalizados, em especial dentre os com fenótipo típico de DEC (TURNPENNY, SLOMAN & DUNWOODIE, 2017), foi realizado um levantamento das variantes deste gene associadas à DEC, previamente reportadas no banco de variantes ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) e em artigos do banco PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Tal busca ocorreu tanto com a finalidade de confirmar com maior segurança a presença, nesta casuística, de variantes não reportadas previamente, quanto de levantar dados para uma discussão mais robusta a respeito do gene em questão e suas variantes associadas aos DSVs.

Para tal levantamento, considerando-se as diferentes designações atribuídas à disostose espondilocostal ao longo dos tempos, foram buscadas no PubMed as seguintes expressões: “*DLL3 spondylocostal dysostosis*”; “*DLL3 spondylocostal*”; “*DLL3 dysostosis*”; “*DLL3 Jarcho Levin*”; “*DLL3 dysplasia*” e “*DLL3 spondylothoracic*”. A lista de todas as entradas obtidas para cada uma das referidas expressões foi ordenada por data de publicação, e seu *download* foi realizado no formato .csv. Todos os arquivos obtidos foram unificados e os dados foram tratados de modo a excluir publicações repetidas. Cada um dos artigos presentes na lista obtida por este processo foi então analisado individualmente e seus dados foram catalogados.

Posteriormente, o termo “*DLL3*” foi buscado no ClinVar, de modo a obter a lista de todas as variantes reportadas neste gene no banco em questão. Foi realizado o *download* de tal lista como um arquivo no formato CSV (do inglês, “*comma-separated values*”), através do qual foram filtradas as variantes que atendiam a todas as seguintes condições:

- a) variantes reportadas como patogênicas (“*pathogenic*”) ou provavelmente patogênicas (“*likely pathogenic*”);
- b) associadas a um fenótipo cuja designação contivesse a palavra “*spondylocostal*”;
- c) não originárias de publicações disponíveis na lista obtida através da busca realizada previamente no PubMed.

Ao contrário da busca realizada no PubMed, o levantamento das variantes disponíveis no banco ClinVar não considerou outras possíveis designações para disostose espondilocostal pois, dado que foram filtradas apenas variantes não associadas a publicações, não seria possível verificar se os pacientes atendiam aos critérios de acometimento de ao menos 10 corpos vertebrais subsequentes e ausência de quadro sindrômico para efetivamente caracterizar o fenótipo de DEC (OFFIAH *et al.*, 2010).

À lista obtida neste levantamento, foram adicionados outros dados relevantes para a discussão, como a frequência populacional das variantes obtida nos bancos GnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) e ABraOM (<http://abraom.ib.usp.br/>) e a previsão do domínio da proteína afetado que, quando não disponível na publicação de referência, foi obtida com o auxílio das informações disponíveis nas bases de dados públicas do *Universal Protein Resource* - UniProtKB (<https://www.uniprot.org/>) e da *Simple Modular Architecture Research Tool* - SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>).

3.3.4 *Análise estatística*

Dada a raridade dos defeitos de segmentação vertebral e o restrito n amostral desta casuística, que se reflete em limitações do poder estatístico dos resultados obtidos (VICTOR & PAES, 2010), o presente estudo traz uma análise descritiva, e os dados são expostos, majoritariamente, em números absolutos. Em alguns casos, a disponibilização dos dados em forma de porcentagem ocorreu para permitir seu dimensionamento perante o todo e facilitar sua comparação com outros dados disponíveis na literatura, porém sem o objetivo de extrapolação para além da presente casuística.

4 RESULTADOS

4.1 Achados demográficos e clínico-radiológicos

A casuística foi composta de oito indivíduos do sexo masculino e 10 do sexo feminino (1M/1,25F), pertencentes a 17 famílias, com média de idade dos probandos na 1ª consulta de 02 anos e 07 meses e mediana de 13 meses.

Pela classificação de Offiah *et al.* (2010), nove indivíduos apresentavam M-DSVs generalizados (~50%), oito apresentavam M-DSVs regionalizados (~44%) e um indivíduo, DSV simples (~5,5%).

O diagnóstico mais prevalente foi a DEC, observada em oito indivíduos de sete famílias, representando aproximadamente 44% da casuística e 89% dos casos de M-DSVs generalizados. Ao restante dos pacientes foram atribuídos os seguintes diagnósticos: síndrome de Robinow (M-DSV-G), síndrome da sinostose espondilocarpotarsal (M-DSV-R), síndrome cerebrocostomandibular (M-DSV-R) e escoliose congênita (S-DSV), cada um deles representado por apenas um indivíduo. Dos oito indivíduos com M-DSVs regionalizados, seis (75%) não tiveram um diagnóstico clínico estabelecido.

Dentre todas as famílias estudadas, cinco apresentavam consanguinidade. Em uma das famílias consanguíneas, foi observada recorrência do fenótipo de DEC em dois irmãos do paciente. Uma família não consanguínea também apresentou recorrência do fenótipo de DEC (probando e pai afetados).

Os achados clínico-radiológicos dos pacientes com defeitos generalizados (M-DSV-G) estão descritos na Tabela III, e os dos pacientes com defeitos simples (S-DSV) ou defeitos múltiplos regionalizados (M-DSV-R), na Tabela IV.

Na maioria dos casos, não houve registro ou relato de achados ultrassonográficos fetais durante a gestação, tendo ocorrido nascimento prematuro (IG < 37 semanas) em apenas três pacientes. As médias de peso e comprimento dos nascidos a termo foram de 3155,7 gramas e 45,9 centímetros para o sexo masculino e 2919,3 gramas e 44,3 centímetros para o sexo feminino. Já a mediana de comprimento foi de 45 centímetros para ambos os sexos, enquanto a mediana de peso foi de 3120 gramas para o sexo masculino, e 2975 gramas para o sexo feminino. Apenas 04 dos pacientes nascidos a termo apresentaram comprimento com *Z-score* inferior a -2, e para um paciente não há registro.

Tabela III: Achados clínico-radiológicos em pacientes com M-DSV-G.

Achados clínico-radiológicos (M-DSV-G)									
Indivíduo	F1	F2	F3	F4	F5	F6.1	F6.2	F7	F8
Hipótese diagnóstica	DEC	DEC	DEC	DEC	DEC	DEC	DEC	DEC	Síndrome de Robinow
Dados demográficos									
Sexo	F	F	F	M	M	F	M	M	F
Idade à 1ª avaliação (anos/meses)	1a10m	4a	9a1m	7a3m	13m	8m	NA	1a6m	3m
Consanguinidade	+	+	-	+	-	-	-	-	+
Recorrência na família	2 irmãos	-	-	-	-	Pai (F6.2)	Filha (F6.1)	-	-
Achados ultrassonográficos/complicações pré-natais	-	-	-	-	Cistos renais	-	NA	-	Gemelar; encurtamento dos OL; tórax estreito
Achados neonatais									
Idade gestacional (semanas/dias)	Termo	Termo	Termo	Termo	Termo	Termo	NA	Termo	Pré-termo (36s)
Peso ao nascimento (gramas)	3100	3005	3000	3440	3120	2705	NA	2960	2010
Comprimento em centímetros (Z-score)	45 (-1.03)	41 (-2.63)	NA	44.5 (-2.5)	42 (-3.1)	45 (-1.93)	NA	45 (-1.36)	38 (-3.3)
Crescimento									
Baixa estatura (Z-score < -2)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	97.5 (7a) (-5.02)	114 (8a) (-2.49)	129.5 (9a1m) (-0.66) 144 (14a3m) (-2.6)	105 (7a3m) (-3.47)	100 (6a5m) (-3.52)	54.5 (8m) (-6.23)		121.5 (14a6m) (-4.97)	87.5 (4a6m) (-4.01)
Altura final (centímetros)	130,5 (-5.01)	NA	147 (-2.51)	NA	NA	NA	156 (-2.89)	143 (-4.66)	NA
Achados clínicos									
Dismorfismos craniofaciais	-	-	-	+	-	-	-	-	+
				Leve Epicanto; orelhas displásicas					Bossa frontal; hipertelorismo ocular; sinofre; nariz curto com pota bífida e narinas antevertidas
Pescoço curto	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(continua)

Tronco curto	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Configuração anormal do tórax	Carinatum	Carinatum	Carinatum	Excavatum	Carinatum	Carinatum	Excavatum	Carinatum	-
Escoliose	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Pneumonias recorrentes	+	-	-	-	+	+	-	+	-
Cirurgia para correção da escoliose	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Atraso do desenvolvimento/ deficiência intelectual	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Outros achados clínicos	Hérnia epigástrica	BCE	Arritmia cardíaca	BCE; hérnia inguinal; rim esquerdo displásico	BCE; hérnia inguinal	BCE; órbita com 1a5m (pneumonia)	NA	Acidemia metilmalônica; ictiose vulgar	Mesomelia dos membros superiores; hérnia umbilical; genitália hipoplásica; unhas hipoplásicas; BCE e acidose tubular
Achados radiológicos									
Defeito de segmentação vertebral	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acometimento da região cervical	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Acometimento da região torácica	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acometimento da região lombar	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Agenesia de corpos vertebrais	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anomalias de costelas	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Outros achados radiológicos	-	-	-	-	-	-	-	-	Diástase radio-ulnar com ossos encurtados; encurtamento do 1º metacarpo; hipoplasia das falanges distais em pés

DEC: disostose espondilocostal; OL: ossos longos; BCE: broncoespasmo; NA: não se aplica ou não disponível.

(conclusão)

Tabela IV: Achados clínico-radiológicos em pacientes com M-DSV-R e S-DSV.

Achados clínico-radiológicos	M-DSV-R								S-DSV
Indivíduo	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17
Hipótese diagnóstica	Síndrome da sinostose espondilocarpotarsal	Síndrome cerebrocostomandibular	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Esvolto congênita
Dados demográficos									
Sexo	F	F	M	F	M	M	F	F	M
Idade à 1ª avaliação (anos/meses/dias)	7a2m	1ª	1a5m	7m	3m	6a6m	10d	7m	13m
Consanguinidade	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Recorrência na família	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Achados ultrassonográficos/complicações pré-natais	-	Aumento da translucência nugal	-	Gemelar	-	-	Febre alta no 1º mês	ITU	-
Achados neonatais									
Idade gestacional (semanas/dias)	Termo	Pré-termo (36s5d)	Termo	Termo	Termo	Termo	Pré-termo	Termo	Termo
Peso ao nascimento (gramas)	2800	2245	2410	2850	3100	3600	2240	2975	3460
Comprimento em centímetros (Z-score)	42 (-2.23)	42 (-2.09)	44 (-2.25)	45 (-1.03)	47 (-0,53)	48 (-0,11)	46 (-0,18)	48 (-0,66)	51 (0,33)
Crescimento									
Baixa estatura (Z-score < -2)	+ 103.5(7a2m) (-3.82)	+ 71cm(1a10m) (-4.42)	+ 103 (7a) (-3.57)	+ 142 (15a3m) (-3.12)	+ 58 (3m) (-2.01)	- 110 (6a6m) (-1.68)	- 96 (4a3m) (-1.55)	- 4a2m (-0,21)	- 102 (5a2m) (-1.58)
Altura final (centrímetros)	134 (-4.48)	NA	NA	NA	149.3 (-3.8)	NA	142.5 (-3.18)	NA	NA
Achados clínicos									
Dismorfismos craniofaciais	+ Leve Ponta nasal bulbosa	+ Sinofre; nariz curto; sequência de Pierre-Robin; orelhas	-	+ Leve Assimetria facial	-	+ Leve Hipertelorismo ocular e	+ Leve Apêndice pré-	-	-

(continua)

		simplificadas e baixo-implantadas				queixo pontudo	auricular direito		
Pescoço curto	+	-	+	+	-	+	+	+	-
Tronco curto	-	-	+	-	-	-	+	+	-
Configuração anormal do tórax	-	Estreito	-	-	Assimétrico	Excavatum	-	Assimétrico	-
Escoliose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pneumonias recorrentes	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cirurgia para correção da escoliose	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Atraso do desenvolvimento/deficiência intelectual	-	Atraso motor e de fala	-	-	-	-	-	-	Atraso e dificuldade da fala
Outros achados clínicos	Limitação à extensão dos cotovelos, com pterígeo; braquidactilia	Microcefalia; insuficiência respiratória com Traqueostomia e gastrostomia Febres recorrentes de origem indeterminada	BCE; agenesia pulmonar direita; hipoplasia tenar direita; hipotireoidismo	Anomalia cardíaca (CIA/CIV e valva aórtica bicúspide); embriotóxon posterior	BCE; mamilo extranumerário	Otites recorrentes; clinodactilia do 5º dedo	Anomalia cardíaca (CIV); agenesia renal; hérnia abdominal	Mamilo extranumerário	Transtorno do espectro autista
Achados Radiológicos									
Defeito de segmentação vertebral	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acometimento da região cervical	+	?	-	-	-	+	-	+	-
Acometimento da região torácica	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Acometimento da região lombar	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Agenesia de corpos vertebrais	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anomalias de costelas	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Outros achados radiológicos	Sinostoses carpo-tarsal e úmero-rádio/ulnar	Anomalia na articulação costo-transversal e gaps em costelas	Hipoplasia pulmonar D	-	-	-	-	-	-

ITU: infecção do trato urinário; BCE: broncoespasmo; CIA: comunicação interatrial; CIV: comunicação interventricular; NA: não se aplica ou não disponível.

(conclusão)

Todos os pacientes diagnosticados com M-DSV-G (DEC e síndrome de Robinow) e cinco pacientes com M-DSV-R (incluindo os casos de síndromes reconhecidas) apresentaram baixa estatura ao longo da vida (*Z-score* <-2), representando aproximadamente 72% da casuística. Escoliose, tronco e pescoço curtos e deformidade esternal foram observados na maioria dos pacientes, incluindo todos os casos diagnosticados com DEC.

Dismorfismos faciais foram observados particularmente nos casos de síndromes clinicamente reconhecidas e caracterizados como discretos em três casos de M-DSV-R não associados a síndromes reconhecidas.

Outros achados em indivíduos com DEC foram: hérnia inguinal em dois pacientes do sexo masculino, hérnia epigástrica em uma paciente do sexo feminino e pneumonias recorrentes em quatro pacientes. Em decorrência do agravamento do quadro pulmonar, uma paciente veio a óbito com 01 ano e 05 meses. Um indivíduo (F7) foi diagnosticado no seu acompanhamento no Ambulatório com uma doença metabólica autossômica recessiva, a acidemia metilmalônica.

Apenas a paciente com síndrome cerebrocostomandibular e o paciente com escoliose congênita, também diagnosticado com transtorno do espectro autista (TEA), apresentaram atraso do desenvolvimento.

Com relação aos achados radiológicos, nos pacientes com DEC (Figuras 2 e 7), que apresentaram anomalias envolvendo 10 ou mais corpos vertebrais consecutivos, diversos defeitos foram identificados, tais como hemivértebras e fusão de arcos costais e de corpos vertebrais, sendo esta fusão mais extensa em pacientes com idade mais avançada, de modo que, nestes não foi possível observar o aspecto ovalado, classicamente referido como “*pebble beach*” (TURNPENNY *et al.*, 2003) ou “pedras roladas” dos corpos vertebrais, evidente apenas em F6.1 (Figura 2.B1).

Nos casos de M-DSV regionalizados não associados a síndromes reconhecidas (Figura 6), foi observado acometimento vertebral diversificado, envolvendo majoritariamente alterações na coluna torácica alta, com a presença de diferentes defeitos, como hipoplasias, blocos vertebrais, barras ósseas e sinostoses de arcos costais. Em dois pacientes (F13 e F16) com agenesia de arcos costais, foi identificado mamilo supranumerário em região sobreposta à agenesia (Figura 6.A4 e A5).

Nos casos de síndromes clinicamente reconhecidas (Figura 5), apenas a paciente com síndrome de Robinow (F8) apresentou defeito de segmentação generalizado (10 ou mais corpos vertebrais acometidos). Nesta paciente, foi também observado encurtamento dos ossos longos dos membros superiores, particularmente dos antebraços (mesomelia), indicando o envolvimento de outros ossos que não os do esqueleto axial (Figura 5.A2). Outros ossos

acometidos também foram observados no paciente com síndrome da sinostose espondilocartarsal (F7), que, além de M-DSV regional, apresentou sinostoses dos ossos do carpo, tarso e na região dos cotovelos (Figura 5.C2 e C3). Já os achados mais proeminentes da paciente com síndrome cerebrocostomandibular (F9) foram tórax estreito, com falhas ósseas nos arcos costais posteriores (Figura 5.B).

O único paciente com defeito de segmentação simples (S-DSV), diagnosticado com escoliose congênita, apresentou hemivértebra isolada em L4 (Figura 2.B3).

4.2 Achados moleculares

Foram identificadas 11 variantes raras (Tabelas V e VI) em genes associados a DSVs, sendo eles: *DLL3*, *TBX6*, *FLNB*, *ROR2*, *SNRPB* e *LFNG*. De acordo com as diretrizes estabelecidas pelo ACMG (RICHARDS *et al.*, 2015) e com as recomendações para interpretação de variantes do ClinGen (REHM *et al.*, 2015), três destas variantes foram classificadas como patogênicas, seis como provavelmente patogênicas, e outras duas como VUS que potencialmente explicam o quadro clínico dos pacientes.

Os achados moleculares permitiram confirmar o diagnóstico para dez das 17 famílias estudadas (58,8%) e para seis das 07 famílias (85,7%) com fenótipo clássico de DEC.

Tabela V: Descrição das variantes identificadas nos genes *DLL3* e *TBX6*.

GENE	<i>DLL3</i> (NM_016941.4)							<i>TBX6</i> (NM_004608.3)	
Indivíduo	F1	F2	F3		F4	F5		F6.1 e F6.2	F17
Estado	Homozigose	Homozigose	Heterozigose (fase não conhecida)		Homozigose	Heterozigose composta		Heterozigose	Heterozigose
Nucleotídeo	c.1094-2A>T	c.599_603dup	c.599_603dup	c.1096G>A	c.599_603dup	c.517T>C	c.1096G>A	c.1311A>T	c.373C>T
Proteína	p.(?)	p.(Pro202Alafs*41)	p.(Pro202Alafs*41)	p.(Gly366Arg)	p.(Pro202Alafs*41)	p.(Ser173Pro)	p.(Gly366Arg)	p.(*437Cysext*81)	p.(Arg125*)
Posição (hg19)	chr19:g.39997677	chr19:g.39993639	chr19:g.39993639	chr19:g.39997681	chr19:g.39993639	chr19:g.39993562	chr19:g.39997681	chr16:g.30097546	chr16:g.30100512
Região (total de exons)	íntron 6 (8)	exon 4 (8)	exon 4 (8)	exon 7 (8)	exon 4 (8)	exon 4 (8)	exon 7 (8)	exon 9 (9)	exon 4 (9)
rsID	NA	rs786200899	rs786200899	rs774019112	rs786200899	rs962122621	rs774019112	rs587777113	rs994246265
Freq. gnomAD (v2.1.1)	0	0,0000696039535	0,0000696039535	0,000015117615	0,0000696039535	0	0,000015117615	0	0,000004036
Freq. ABraOM (SABE-WGS-1171)	0	0,000854	0,000854	0	0,000854	0,000427	0	0	0
Predição MutationTaster	"Disease causing"	"Disease causing"	"Disease causing"	"Disease causing"	"Disease causing"	"Disease causing"	"Disease causing"	"Disease causing"	"Disease causing" (NMD)
Score REVEL	NA	NA	NA	0,819	NA	0,425	0,819	NA	NA
Predição HSF	"Broken WT Acceptor Site"	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Crítérios atendidos ACMG	PVS1_strong + PM2 + PM3_sup + PP4	PVS1_strong + PM2 + PS4_mod + PM3_strong + PP4	PVS1_strong + PM2 + PS4_mod + PM3_strong + PP4	PS4_sup + PM2 + PM3_sup + PP1 + PP3 + PP4	PVS1_strong + PM2 + PS4_mod + PM3_strong + PP4	PM2 + PP4	PS4_sup + PM2 + PM3_sup + PP1 + PP3 + PP4	PS4_sup + PS3_sup + PM2 + PM4 + PP1	PVS1 + PM2
Classificação ACMG	PP	PAT	PAT	PP	PAT	VUS	PP	PP	PP

NMD: *nonsense mRNA mediated decay*; PP: provavelmente patogênica; PAT: patogênica; VUS: variante de significado incerto; NA: não se aplica ou não disponível.

Tabela VII: Descrição das variantes identificadas nos genes *FNLB*, *ROR2*, *SNRPB* e *LFNG*

GENE	<i>ROR2</i> (NM_004560.4)	<i>FLNB</i> (NM_001164317.2)		<i>SNRPB</i> (NM_003091.4)	<i>LFNG</i> (NM_001166355.1)
Indivíduo	F8	F9		F10	F16
Estado	Homozigose	Heterozigose (fase não conhecida)		Heterozigose	Heterozigose
Nucleotídeo	c.2074C>A	c.1945C>T	c.-128G>A	c.155+301G>C	c.219+1G>A
Proteína	p.(Pro692Thr)	p.(Arg649Ter)	p.(?)	p.(?)	p.(?)
Posição (hg19)	chr9:g.94486702	chr3:g.58094188	chr3:g.57994164	chr20:g.2447952	chr7:g.2552963
Região (total de exons)	exon 9 (9)	exon 13 (47)	5'UTR (47)	íntron 2 (6)	íntron 2 (8)
rsID	0	rs80356517	rs1314848240	rs786201019	rs111645859
Freq. gnomAD (v2.1.1)	0	0,000003983	0	0	0,0004061
Freq. ABraOM (SABE-WGS-1171)	0	0,000427	0	0	0,000427
Predição MutationTaster	"Disease causing"	"Disease causing" (NMD)	"Disease causing"	NA	"Polymorphism"
Score REVEL	0,9589	NA	NA	NA	NA
Predição HSF	NA	NA	NA	"No significant impact on splicing signals"	"Broken WT Donor Site"
Critérios atendidos ACMG	PM2 + PS4_sup + PM3 + PP3 + PP4	PVS1 + PM2 + PS4_sup + PP4	PM2 + PP4 + PM3_sup	PS4_sup + PS3_sup + PM1 + PM2 + PM6_VS	PVS1_strong + PM2
Classificação ACMG	PP	PAT	VUS	PAT	PP

NMD: *nonsense mRNA mediated decay*; PP: provavelmente patogênica; PAT: patogênica; VUS: variante de significado incerto; NA: não se aplica ou não disponível.

Na grande maioria das famílias com DEC (F1-F5), foram identificadas variantes raras no gene *DLL3*, sendo uma intrônica (*splicing*), duas *missense* e uma *frameshift*. Em três casos, as variantes se encontravam em homozigose. Nos outros dois, foram identificadas duas variantes diferentes em cada um dos pacientes. Em um deles (F5), o estudo dos genitores permitiu concluir que as variantes se apresentavam em *trans*, caracterizando heterozigose composta.

Figura 2: Imagens radiológicas de pacientes com disostose espondilocostal, com variantes em *DLL3* (A1-A4) e *TBX6* (B1-B2). B3: F17 com escoliose congênita e variante em *TBX6*. A1-A4: RX de coluna (frente) de pacientes com variantes em *DLL3* (A1: F2 aos 4a8m; A2: F4 aos 6 anos; A3: F1 aos 22 anos) e TC de coluna com reconstrução 3D (A4: F3 aos 19 anos), exibindo múltiplos defeitos de segmentação vertebral generalizados, envolvendo todos os corpos vertebrais torácicos e lombares em todos os pacientes (A1-A4). Evidente fusão dos últimos arcos costais à esquerda (A4). B1 e B2: RX de coluna e tórax (frente) do caso familiar. Probando F6.1 aos 7m (B1) e pai afetado F6.2 (B2) com variante em *TBX6*. Vértex com aspecto de pedras roladas (“pebble beach”) e extensa anomalia dos corpos vertebrais (B1) e escoliose torácica de convexidade direita (B2). B3: hemivértebra isolada em L4.

Já em uma família com DEC que apresentava transmissão vertical do fenótipo (F6), foi identificada uma variante provavelmente patogênica que provoca extensão da proteína em heterozigose em *TBX6* no pai e na filha afetados. O estudo do haplótipo hipomórfico T-C-A (rs2289292, rs3809624 e rs3809627) na família, de modo a se enquadrar no padrão de herança composta, classicamente reportado para o fenótipo (WU *et al.*, 2015), mostrou a presença deste haplótipo em *trans* apenas na probanda, e não em seu pai com DEC (Figura 3).

Figura 3: Estudo de segregação do haplótipo T-C-A (rs2289292, rs3809624 e rs3809627) e da variante NM_004608:c.1311A>T:p.(*437Cysext*81) em uma família (F6) com dois indivíduos afetados por DEC.

No caso do paciente com escoliose congênita (F17), também foi constatada a presença de uma variante, do tipo *nonsense*, em heterozigose, em *TBX6*. O estudo da segregação desta variante, assim como do haplótipo hipomórfico T-C-A (rs2289292, rs3809624 e rs3809627) na

família, permitiu verificar que a variante *nonsense* encontrada no probando havia sido herdada de sua mãe e de seu avô materno, ambos sem escoliose congênita. O haplótipo hipomórfico T-C-A (rs2289292, rs3809624 e rs3809627) estava em *cis* no probando.

Figura 4: Estudo de segregação do haplótipo T-C-A (rs2289292, rs3809624 e rs3809627) e da variante NM_004608:p.Arg125* na família de um paciente (F17) com escoliose congênita.

Todos os três indivíduos com síndromes clinicamente reconhecidas (F9, F8 e F10) também apresentaram variantes que explicaram seu quadro clínico, identificadas em genes classicamente associados às síndromes em questão (VAN BOKHOVEN *et al.*, 2000; MITTER *et al.*, 2008; LYNCH *et al.*, 2014).

Já nos casos de M-DSVs regionalizados não associados a síndromes reconhecidas, a análise dos genes *DLL3*, *LFNG*, *TBX6*, *MESP2* e *HES7* não permitiu obter um diagnóstico molecular conclusivo. Dentro deste grupo, no único paciente (F16) em que foi identificada uma variante provavelmente patogênica em um dos genes supracitados, tal variante se encontrava em heterozigose, e não foi constatada a presença de uma segunda variante potencialmente

associada ao fenótipo no mesmo gene. Dado que o padrão de herança reportado para o gene em questão (*LFNG*) é recessivo (SPARROW *et al.*, 2006), o achado molecular não foi considerado suficiente para explicar o fenótipo de DSV.

Figura 5: Achados radiológicos nas formas sindrômicas clinicamente reconhecidas de DSV: síndrome de Robinow (A1-A3), síndrome cerebrocostomandibular (B) e síndrome da sinostose esodilocarpotarsal (C1-C3). A1-A3: RX coluna, tórax e braços, e TC de coluna torácica de F8. A1: RX de coluna e tórax aos 25 dias de vida evidenciando anomalias de segmentação das vértebras torácicas e presença de 11 arcos costais, com sinostoses. A2: RX de braços com encurtamento acentuado do rádio e ulna. A3: TC de coluna torácica aos 6 anos de idade: defeito de segmentação (hemivértebras, vértebras em borboleta e fusões) de todos os corpos vertebrais torácicos, com escoliose torácica de convexidade à direita. B: RX de coluna (frente) de F10 aos 18 meses: tórax estreito, com falhas ósseas nos arcos costais posteriores. C1-C3: RX de coluna, cotovelos, mãos e pés de F9 aos 17 anos. C1: Bloco vertebral cervical (C4-C5) e torácico (T6-T7 e T8-T9), costela cervical bilateral, com escoliose dorsal de convexidade direita. C2: Sinostose das peças ósseas dos cotovelos. C3: Sinostose interfalangeana distal do 5º dedo da mão direita e sinostose calcâneo-navicular em pé esquerdo.

Figura 6: RX de coluna e tórax de pacientes não sindrômicos com M-DSV regionalizados (A1-A5). Formação de barras ósseas e sinostoses de arcos costais em A1 (F11 aos 07 anos) e A2 (F12 aos 10 anos), com escoliose. A1 tem hipoplasia do hemitórax direito, com ausência do parênquima pulmonar. A3 (F14 aos 12 anos): acentuação da lordose, com afastamento das estruturas do arco posterior de C2-C6, hipoplasia de C3 e fusão do arco posterior de C4-C7 cervical e anomalias das vértebras torácicas altas (T1-T2). A4 (F13 aos 14 anos) e A5 (F16 aos 7m): DSV, com agenesia de arcos costais e presença de mamilo supranumerário na região (seta).

4.2.1 Sequenciamento do exoma completo

Em um paciente com fenótipo típico de DEC (F7), não foram identificadas variantes relevantes em *DLL3*, *LFNG*, *TBX6*, *MESP2*, *HES7*, ou nos outros genes associados a doenças esqueléticas investigados no painel P3, ao qual foi submetido.

A análise do sequenciamento completo do exoma deste paciente, que priorizou genes sugeridos por Lefebvre e colaboradores (2018) como candidatos para M-DSVs, genes da via Notch e Wnt, e genes da família FGF e seus respectivos receptores (FGFRs), além de outros genes da via FGF cujos ortólogos apresentaram padrão de expressão oscilatório durante a somitogênese em modelo animal (DEQUÉANT & POURQUIÉ, 2008; ECKALBAR *et al.*, 2012), também não possibilitou um diagnóstico molecular conclusivo.

Figura 7: Imagens radiológicas de F7 com diagnóstico de DEC e sem variantes em genes associados a esta disostose: extenso envolvimento dos corpos vertebrais cervicais, torácicos e lombares.

No entanto, destaca-se uma variante *missense* (NM_058238.3:c.341G>A), identificada em heterozigose no gene *WNT7B*, que integra a via Wnt de desenvolvimento. Tal variante não foi reportada nos bancos populacionais GnomAD e ABraOM, apresenta alto *score* REVEL (0,878) e predição *in silico* de patogenicidade (“*disease causing*”) pela ferramenta Mutation Taster.

Adicionalmente, como achado secundário, foi identificada em homozigose uma variante *nonsense* classificada como patogênica no gene *MMAA* (NM_172250:exon2:c.397C>T), confirmando o diagnóstico da acidemia metilmalônica do tipo cobalamina A.

4.3 Análise de ancestralidade

As estimativas de ancestralidade global obtidas para os pacientes F6.2 e F17 encontram-se descritas na Tabela VII. O paciente F6.2, diagnosticado com DEC e não portador do haplótipo T-C-A (Figura 3), teve sua ancestralidade majoritariamente estimada como europeia (71,91%), seguida de ancestralidade nativo-americana (11,97%) e africana (8,78%).

Para o paciente F17, diagnosticado com escoliose congênita e portador do haplótipo T-C-A (Figura 4) em *cis* com uma variante *nonsense* em *TBX6*, a maior parcela da ancestralidade também foi calculada como europeia (48,6%), porém seguida logo após por ancestralidade africana (42,23%) e uma menor parcela nativo-americana (4,92%).

Tabela VII: Estimativas de contribuição genética de sete populações e quarenta subpopulações ancestrais para os indivíduos F6.2 e F17.

População	Subpopulações	F6.2	F17
Europa	Europa Ocidental	0,241	0,061
	Basco	0,042	0,025
	Europa Oriental	0,010	0,014
	Cáucaso	0,000	0,000
	Itália	0,149	0,220
	Ibéria	0,236	0,076
	Volga-Ural	0,000	0,000
	Balcãs	0,000	0,000
	Fenoscândia	0,000	0,071
	Sardenha	0,042	0,020
África	Bayaka	0,010	0,000
	Mbuti	0,000	0,013
	Senegâmbia	0,000	0,015
	Costa da Mina	0,064	0,133
	Chifre da África	0,004	0,000
	Nilotas	0,000	0,000
	Oeste da África	0,010	0,151
	Khoisan	0,000	0,000
	Mandê	0,000	0,061
	Leste da África	0,000	0,049
Américas	Amazônia	0,059	0,000
	Tupi	0,015	0,024
	América Central	0,000	0,000
	América do Norte	0,000	0,001
	América Andina	0,023	0,021
	Patagônia	0,023	0,004
Oriente Médio	Levante	0,000	0,000
	Magrebe	0,037	0,004
	Arábia e Egito	0,000	0,021
	Anatólia	0,006	0,005
Judeus	Judeus	0,030	0,012
Ásia	Sudeste Asiático	0,000	0,000
	Japão e Coreia	0,000	0,000
	Mongol	0,000	0,000
	Sul Asiático	0,000	0,000
	Filipinas e Brunei	0,000	0,000
	Sibéria	0,000	0,000
	China Han	0,000	0,000
	Ásia Central	0,000	0,000
Oceania	Melanésia	0,000	0,000

4.4 Variantes previamente reportadas em *DLL3*

O levantamento em artigos do PubMed permitiu localizar 28 variantes no gene *DLL3* previamente associadas à DEC. Foram também localizadas duas variantes em *DLL3* no ClinVar, sendo que uma delas nunca havia sido reportada em publicações. Dessa forma, foi possível catalogar um total de 29 variantes previamente reportadas em *DLL3* associadas ao fenótipo de disostose espondilocostal (Tabela VIII). Dentre as quatro variantes detectadas em *DLL3* na presente casuística, apenas uma foi identificada neste levantamento.

Das 29 variantes previamente reportadas, 12 são *frameshift*, 07 são *missense*, 06 são *nonsense*, uma é inserção *inframe*, uma é de *splicing* e duas delas não foram descritas pelos autores com detalhes suficientes para prever sua consequência. Com exceção de uma única mutação localizada no domínio transmembrana, todas as outras variantes afetam a porção extracelular da proteína (Figura 8).

Tabela VIII: Variantes previamente reportadas em *DLL3* associadas ao fenótipo de DEC e variantes identificadas no mesmo gene em pacientes com DEC da casuística (em negrito).

Variantes em <i>DLL3</i> (NM_016941.4) associadas à DEC								
Consequência no transcrito	Consequência na proteína	Domínio/re-gião	Freq. pop. (ABraOM SABE-WGS-1171)	Freq. pop. (gnomAD v2.1.1)	Pop. com a variante (gnomAD v2.1.1)	Nº família(s)	Etnia família(s) reportada(s)	Referência
c.215_242del	p.(Ala72Glyfs*3)	N-terminal	0	0	0	-	-	Turnpenny <i>et al.</i> , 2007
c.395delG	p.(Gly132Glufs*109)	N-terminal	0	0,00003976206381	JASK; EUR(NF)	1	Sul-africana (europeia miscigenada)	Turnpenny <i>et al.</i> , 2003
c.517T>C	p.(Ser173Pro)	N-terminal	0,000427	0	0	1	Brasileira	Casuística atual
c.534C>A	p.(Cys178*)	DSL	0	0	0	1	-	ClinVar
c.599_603dupGCGGT	p.(Pro202Alafs*41)	DSL	0,000854	0,0000696039535	LAM; JASK; EUR(NF)	1	Árabe-israelense	Bulman <i>et al.</i> , 2000
						1	Sul europeia	Turnpenny <i>et al.</i> , 2003
						2	Brasileira	Casuística atual
						1	-	ClinVar
c.616_617insGCGGT [a]	p.(Pro202Alafs*41) [a]	DSL	0 [a]	0 [a]	0 [a]	1	Europeia ocidental	Lefebvre <i>et al.</i> , 2018
c.602delG	p.(Gly201Valfs*40)	DSL	0	0,00003222272346	AFAM	1	Norte europeia	Turnpenny <i>et al.</i> , 2003
c.614ins13 [b]	--- [b]	DSL	0	0	0	2	Turca; Árabe libanesa	Turnpenny <i>et al.</i> , 2003
c.618delC	p.(Cys207Alafs*34)	DSL	0	0,00001893544905	LAM; EUR(NF)	1	Pequena vila do leste da Suíça	Bonafé <i>et al.</i> , 2003
c.621C>A	p.(Cys207*)	DSL	0	0,000008855199773	SAS	1	Norte-americana (europeia miscigenada)	Turnpenny <i>et al.</i> , 2003
c.712C>T	p.(Arg238*)	EGF-like 1	0	0,00003195577321	AFAM; LAM; LAS; EUR(NF)	1	Sul da Alemanha	Bonafé <i>et al.</i> , 2003

(continua)

c.868_878del	p.(?)	EGF-like 2	0	0	0	1	Paquistanesa	Turnpenny <i>et al.</i> , 2003
c.925T>C	p.(Cys309Arg)	EGF-like 2	0	0	0	-	-	Turnpenny <i>et al.</i> , 2007
c.926G>A	p.(Cys309Tyr)	EGF-like 2	0	0	0	1	Australiana	Sparrow <i>et al.</i> , 2002
c.945_946delAT	p.(Ala317Argfs*17)	EGF-like 3	0	0,00002121250689	AFAM;LAS; EURF; SAS	1	Paquistanesa (Caxemira)	Bulman <i>et al.</i> , 2000
						1	Paquistanesa (Caxemira)	Turnpenny <i>et al.</i> , 2003
c.948_949delTG	p.(Ala317Argfs*17)	EGF-like 3	0	0	0	1	Sul-africana (europeia miscigenada)	Turnpenny <i>et al.</i> , 2003
c.973G>A	p.(Gly325Ser)	EGF-like 3	0	0,00000397680726	EURF	-	-	Turnpenny <i>et al.</i> , 2007
c.1078C>T	p.(Gln360*)	EGF-like 4	0	0	0	-	-	Turnpenny <i>et al.</i> , 2007
c.1086C>A	p.(Cys362*)	EGF-like 4	0	0	0	1	Turca	Turnpenny <i>et al.</i> , 2003
c.1094-2A>T	p.(?)	---	0	0	0	1	Brasileira	Casuística atual
c.1096G>A	p.(Gly366Arg)	EGF-like 4	0	0,00001511761505	LAM; SAS	2	Brasileira	Casuística atual
c.1138C>T	p.(Arg380Cys)	EGF-like 4	0	0,00001395576024	EUR(NF)	1	Europeia ocidental	Lefebvre <i>et al.</i> , 2018
c.1154G>A	p.(Gly385Asp)	EGF-like 4	0	0,000006994083006	EUR(NF)	1	Paquistanesa (Rawalpindi)	Bulman <i>et al.</i> , 2000
c.1164C>A	p.(Cys388*)	EGF-like 4	0	0	0	1	Europeia ocidental	Lefebvre <i>et al.</i> , 2018
c.1183_1184insCGCTGC	p.(Cys395delinsSerLeuArg)	EGF-like 5	0	0	0	1	Europeia ocidental	Lefebvre <i>et al.</i> , 2018
c.1210G>T	p.(Gly404Cys)	EGF-like 5	0	0,00003308191081	EUR(NF)	-	-	Turnpenny <i>et al.</i> , 2007
c.1256ins18 [b]	--- [b]	EGF-like 5	0	0	0	1	Sul europeia	Turnpenny <i>et al.</i> , 2003
c.1291_1307dupGACCCG TGCGCCGCGCG	p.(Pro437Thrfs*117)	EGF-like 6	0	0	0	4	Pequena vila do leste da Suíça	Bonafé <i>et al.</i> , 2003

(continuação)

c.1365_1381del	p.(Cys455Trpfs*5)	EGF-like 6	0	0,00001253902772	SAS	1	Paquistanesa	Turnpenny <i>et al.</i> , 2003
c.1418delC	p.(Ala473Glufs*75)	LCR	0	0	0	1	Norte-americana (europeia miscigenada)	Turnpenny <i>et al.</i> , 2003
c.1440delG	p.(Pro481Argfs*67)	LCR	0	0	0	1	Caucasiana holandesa	Whitlock <i>et al.</i> , 2004b
c.1511G>A	p.(Gly504Asp)	TM	0	0,00001993660161	EUR(NF)	1	Caucasiana holandesa	Whitlock <i>et al.</i> , 2004b

DSL - Delta-serrate-lag; EGF - Epidermal growth factor; TM - Transmembrane; LCR - Low complexity region; JASK - Judeus Ashkenazi; EUR(NF) - Europeus (não finlandeses); LAM - Latinos/Americanos miscigenados; AFAM - Africanos/Afro-americanos; SAS - Sul asiáticos; LAS - Leste asiáticos; EURF - Europeus finlandeses . [a] Consequências indicadas na publicação de Lefebvre *et al.* (2018). No entanto, para c.616_617insGCGGT, a consequência predita na proteína pela ferramenta de checagem de nomenclatura Mutalyzer seria p.(Pro206Argfs*37). Os dados de frequência são referentes à variante c.616_617insGCGGT. [b] Não é possível prever a consequência na proteína, pois a sequência de bases inserida não está descrita em Turnpenny (2003).

(conclusão)

Figura 8: Ilustração esquemática dos domínios e regiões de menor complexidade da proteína *DLL3* e as respectivas mutações/variantes associadas à DEC identificadas até o momento. Em negrito, variantes identificadas na casuística, dentre as quais três não foram reportadas previamente (sinalizadas com estrela vermelha). DSL - *Delta-serrate-lag*; EGF - *Epidermal growth factor*; TM - *Transmembrane*; LCR - *Low complexity region*. [a] Alteração da proteína indicada na publicação de Lefebvre *et al.* (2018). No entanto, para a variante c.616_617insGCGGT, reportada na referida publicação, a consequência no produto proteico predita pela ferramenta de checagem de nomenclatura *Mutalyzer* seria p.(Pro206Argfs*37). [b] Não é possível prever a consequência na proteína pois a sequência de bases inserida não está descrita em Turnpenny *et al.* (2003). [c] Variante no limite íntron-exon. [d] Variante intrônica.

5 DISCUSSÃO

5.1 Dados demográficos

Este estudo avaliou indivíduos com defeitos de segmentação vertebral (DSVs), formas isoladas e sindrômicas. Os DSVs abrangem um amplo espectro radiológico, que pode incluir desde defeitos de segmentação simples (S-DSV) até defeitos múltiplos e generalizados (M-DSV-G), com acometimento de dez ou mais corpos vertebrais consecutivos (OFFIAH *et al.*, 2010). A maior parte das famílias desta casuística (~41%) foi diagnosticada clinicamente com disostose espondilocostal, um M-DSV-G monogênico bastante raro nas populações em geral.

Embora não haja dados epidemiológicos precisos publicados na literatura médica quanto à sua prevalência, um cálculo realizado com base em casos previamente reportados de DEC autossômica recessiva ligada a *DLL3* e na taxa de nascimentos da população europeia do Reino Unido, estimou uma frequência de portador de aproximadamente 1:350 (TURNPENNY, SLOMAN & DUNWOODIE, 2017).

Já em casos de acometimento menos extenso, a frequência relatada é maior, como na escoliose congênita, cuja prevalência de afetados é estimada em um a cada 2000 nascimentos (WU *et al.*, 2015). O fato dos indivíduos incluídos no presente estudo terem sido avaliados em um Hospital Terciário pode explicar o predomínio de casos com defeitos mais generalizados.

5.2 Dados genéticos

Os achados moleculares permitiram confirmar o diagnóstico para aproximadamente 59% das famílias estudadas, sendo que tal confirmação ocorreu em todos os três casos de síndromes clinicamente reconhecidas, e em ~86% das famílias com fenótipo clássico de DEC. Este último dado vai de encontro ao reportado por Lefebvre e colaboradores (2018) que, em um estudo com 73 indivíduos com DSVs, obtiveram confirmação molecular em oito dos dez pacientes (80%) que atendiam aos critérios para diagnóstico clínico de DEC.

Assim como no presente estudo, para estes pacientes, Lefebvre e colaboradores (2018) priorizaram o sequenciamento dos cinco principais genes associados à DEC (*DLL3*, *LFNG*, *MESP2*, *HES7* e *TBX6*), sendo que os resultados obtidos os levaram a sugerir uma estratégia diagnóstica para DSVs em que, nos casos de fenótipo típico de DEC, seja realizada uma análise focada em tais genes. Já para pacientes com defeitos regionalizados, Lefebvre e colaboradores (2018) obtiveram uma baixa taxa de diagnóstico molecular através do painel focado de genes

(2%), que aumentou nos casos de sequenciamento de exoma completo (7%), porém permanecendo sem diagnóstico molecular na grande maioria dos casos, o que também é congruente com os resultados para presente casuística, em que nenhum paciente com M-DSV-R obteve diagnóstico molecular conclusivo através do painel de genes focado.

Neste mesmo estudo, os achados obtidos por Lefebvre e colaboradores (2018) para os oito pacientes em que houve confirmação molecular do diagnóstico de DEC foram: dois pacientes com variantes bialélicas em *DLL3*, dois com variantes em *LFNG*, dois em *TBX6*, um em *MESP2* e um em *HES7*, representando uma prevalência de 20% de *DLL3* nos casos típicos de DEC, sendo 25% dentre aqueles em que ocorreu confirmação molecular. No entanto, na última revisão de um levantamento realizado por Turnpenny e colaboradores (2017), a proporção de casos de DEC autossômica recessiva atribuída a variantes patogênicas em *DLL3* foi indicada em aproximadamente 60%.

Considerando o cenário encontrado em sua casuística, Lefebvre e colaboradores (2018) discutiram se variantes em *DLL3* seriam reportadas na literatura como a causa mais frequente de DEC por serem realmente as variantes mais prevalentes, ou se o fato de o gene *DLL3* ter sido historicamente o primeiro associado à DEC (BULMAN *et al.*, 2000; TURNPENNY *et al.*, 2003), somado a uma facilidade de identificação do fenótipo de DEC em pacientes com variantes patogênicas neste gene, poderia explicar a alta frequência dessas variantes na literatura. No entanto, no presente trabalho, composto de indivíduos brasileiros, a identificação de variantes em *DLL3* em 05 das 07 famílias de pacientes com fenótipo típico de DEC no presente estudo vem corroborar a maioria dos achados prévios reportados na literatura, em que variantes em *DLL3* explicariam a maior parte dos casos de DEC.

No presente estudo, nas famílias com fenótipo típico de DEC, além das variantes encontradas em *DLL3*, foi identificada uma variante previamente associada a *TBX6* no único caso reportado na literatura de DEC com padrão autossômico dominante (SPARROW *et al.*, 2013b). Esta variante estava presente em uma família com pai e filha afetados, apresentando transmissão vertical do fenótipo (Figura 3).

Sendo esta a maior casuística brasileira de pacientes com disostose espondilocostal em que foram realizados estudos moleculares de que se tem registro até o momento, apesar de sua restrita amostra, o presente estudo traz dados que permitem sugerir, nas famílias com DEC, na ausência da possibilidade de realização de um painel de genes:

- a) nos casos com recorrência em irmãos de pais não afetados, com ou sem consanguinidade (sugestivos de um padrão de herança autossômico recessivo) ou em casos isolados, sequenciamento preferencial do gene *DLL3*;
- b) nos casos em que se observa transmissão vertical, sequenciamento preferencial do gene *TBX6*.

5.3 Paciente com fenótipo típico de DEC sem diagnóstico molecular conclusivo

A via de sinalização Wnt está associada a diversos eventos durante o desenvolvimento embrionário, sendo, ao lado de Notch e FGF, uma das principais vias envolvidas na somitogênese (WANG *et al.*, 2015). As proteínas Wnt são glicoproteínas que se ligam a receptores da família *Frizzled*, resultando em uma transdução de sinal através de fosfoproteínas *Dishevelled* (Dsh/Dvl), desencadeando ao menos três cascatas: canônica, “polaridade de célula planar” e Wnt/Ca²⁺ (WODARZ & NUSSE, 1998; WALLINGFORD & HABAS, 2005; KOMIYA & HABAS, 2008).

Na somitogênese, gradientes de Wnt e FGF parecem demarcar o início e o fim do relógio de segmentação (WANG *et al.*, 2015). Outra etapa importante para a formação das vértebras, que ocorre posteriormente à somitogênese, e na qual também há envolvimento da via Wnt, é a osteogênese (RICE & DIETRICH, 2006).

O gene *WNT7B* foi clonado em 1990 por Gavin e colaboradores, e seu produto consiste em uma das glicoproteínas sinalizadoras da via Wnt, cuja expressão aumentada em células tumorais foi reportada inicialmente por Huguet e colaboradores (1994), sendo posteriormente associado ao desenvolvimento dos dendritos e ao processo de vascularização, e mais recentemente a outros eventos, como a dentinogênese (ROSSO *et al.*, 2005; STENMAN *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2019). Com relação à sua contribuição para o desenvolvimento vertebral, apesar de não haver dados que indiquem seu envolvimento na somitogênese, estudos em modelo animal indicam seu papel osteogênico (TU *et al.*, 2007).

Até o momento, nenhuma doença mendeliana associada a *WNT7B* foi reportada em publicações disponíveis no banco PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). No entanto, outros genes envolvidos na osteogênese já foram associados a doenças em que malformações vertebrais podem estar presentes, como no caso da displasia cleidocranial, associada ao gene

RUNX2 e cujo padrão de herança é autossômico recessivo (CHITAYAT *et al.*, 1992; STEIN *et al.*, 2004; BAUMERT *et al.*, 2005).

No paciente F7, em que há extenso acometimento dos corpos vertebrais, caracterizando fenótipo típico de DEC e no qual outras variantes dentre as candidatas priorizadas neste estudo não foram identificadas no sequenciamento do exoma completo, foi detectada uma variante *missense* (NM_058238.3:c.341G>A:p.Gly114Asp) em heterozigose no gene *WNT7B*, classificada como VUS, não reportada nos bancos populacionais GnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) e ABraOM (<http://abraom.ib.usp.br/>), com alto *score* REVEL (0,878) e predição *in silico* de patogenicidade (“*disease causing*”) pelo Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>).

Apesar da presença de uma variante de significado incerto em heterozigose em *WNT7B* não permitir um diagnóstico molecular conclusivo para F7, o estudo dos pais do probando poderia contribuir no entendimento de um potencial papel da variante no desenvolvimento do fenótipo de DSV, de modo a confirmar sua condição *de novo* no paciente, aumentando a probabilidade de sua patogenicidade, ou permitir verificar que consiste em uma variante herdada – o que, nesse caso, reduziria drasticamente suas chances de contribuição para o quadro de DSV, dado que os pais do probando não são afetados.

5.4 Pacientes com variantes em *DLL3*

O fenótipo de DSV associado a variantes bialélicas em *DLL3* reportado na literatura é bastante homogêneo, com extenso acometimento vertebral e anomalias nas costelas. Embora dois indivíduos com variantes em *DLL3* em heterozigose e fenótipo de escoliose congênita tenham sido reportados na literatura – um deles pertencente a uma família com histórico de DEC (BULMAN *et al.*, 2000) e outro representado por um único indivíduo em uma casuística com escoliose congênita, portando variante *missense*, classificada como VUS (MAISENBACHER *et al.*, 2005) – na ampla maioria dos casos não há descrição de DSV em heterozigotos para variantes patogênicas em *DLL3*. Dessa forma, alterações bialélicas em *DLL3* são classicamente associadas a um fenótipo de DEC, em que há 10 ou mais corpos vertebrais acometidos, tipicamente com apresentação “*pebble beach*”, simetria da caixa torácia e eventualmente pontos de fusão nas costelas (TURNPENNY *et al.*, 2007).

Os achados radiológicos nos pacientes da presente casuística com variantes em *DLL3* vão de encontro à apresentação homogênea de fenótipo reportada para este gene, todos eles

com fenótipo clássico de DEC, exibindo múltiplos defeitos de segmentação vertebral generalizados, envolvendo todos os corpos vertebrais torácicos e lombares em todos os pacientes, além de alguns corpos vertebrais cervicais. O aspecto mais típico, com corpos vertebrais arredondados, particularmente na região torácica, denominado como “sinal de *pebble beach*” por Turnpenny e colaboradores (2007), é observado na criança jovem, antes que a ossificação esteja completa. No entanto, os registros radiológicos dos pacientes do presente estudo disponíveis são referentes a idades mais avançadas, indicando uma fusão dos corpos vertebrais mais extensa, de modo que não foi possível identificar o aspecto “*pebble beach*” característico (Figura 2).

Dada a raridade da DEC, grande parte das famílias reportadas na literatura apresenta consanguinidade ou é proveniente de pequenos vilarejos, como o caso descrito por Bonafé e colaboradores (2003) de famílias de uma vila no leste da Suíça. De forma semelhante, na presente casuística, três dos cinco pacientes (F1, F2 e F4) com variantes em *DLL3* apresentavam história de consanguinidade na família, o que se refletiu na presença de variantes em homozigose, provenientes de um ancestral comum.

Já em cada um dos outros dois pacientes sem história de consanguinidade, foram encontradas duas variantes distintas em *DLL3*. No paciente F5, duas variantes *missense* foram detectadas. O estudo da segregação dessas variantes permitiu identificar a presença de apenas uma delas em cada um dos genitores, confirmando seu *status* de heterozigose composta no probando. Uma dessas variantes (p.Gly366Arg) também estava presente em F3, juntamente com a variante (p.Pro202Alafs*41), recorrente na casuística, apesar de a ausência de material dos pais para estudo molecular não ter permitido verificar sua disposição em *trans* na probanda. Ainda assim, o cenário apresentado nesta casuística está de acordo com o padrão de herança autossômico recessivo já bem estabelecido para *DLL3*.

Até o presente, 29 variantes de *DLL3* já foram reportadas na literatura ou no ClinVar associadas à DEC (Tabela VIII). O levantamento dessas variantes permitiu identificar uma grande diversidade de tipos de mutação em *DLL3* associadas à DEC, incluindo 12 *frameshift*, 07 *missense*, 06 *nonsense*, uma de *splicing* e uma deleção *inframe*; espalhadas ao longo do gene, mas com uma concentração maior entre os éxons 4 e 8. Com exceção de uma única mutação localizada no domínio transmembrana, todas as outras variantes afetam a porção extracelular da proteína (Figura 8).

A presente casuística também refletiu a diversidade de variantes em *DLL3* que podem estar associadas à DEC, apresentando duas variantes *missense*, uma *frameshift* e uma de

splicing. Com exceção da variante *frameshift* [p.(Pro202Alafs*41)], já descrita na literatura por Bulman e colaboradores (2000), Turnpenny e colaboradores (2003) e também reportada no ClinVar, todas as outras variantes encontradas neste estudo são novas.

Vale ressaltar que dos 10 alelos identificados nos pacientes que apresentam variantes em *DLL3*, cinco (50%) são referentes à mesma variante [p.(Pro202Alafs*41)] em três indivíduos (F2, F3 e F4), estando em homozigose em dois deles (F3 e F4). Esta variante foi previamente reportada em duas famílias: uma árabe-israelense (BULMAN *et al.*, 2000) e uma sul europeia (TURNPENNY *et al.*, 2003). De todas as variantes previamente reportadas, p.(Pro202Alafs*41) é a que apresenta maior frequência no banco de dados GnomAD ($f=0,0000696039535$), presente em populações distintas (judeus, latinos e europeus). É também evidente a maior prevalência ($f=0,000854$) desta variante no banco de dados da população brasileira (ABRAOM) relativamente à sua frequência global no GnomAD, o que pode explicar sua alta prevalência nesta casuística.

Apesar da análise de variantes *missense* configurar um maior desafio no que diz respeito à predição de patogenicidade (TIAN *et al.*, 2019), no levantamento realizado das variantes já reportadas em *DLL3* associados à DEC, elas representam uma parcela considerável (24%) de todas as variantes já descritas.

No presente estudo, duas variantes *missense* novas foram identificadas, uma classificada como provavelmente patogênica [p.(Gly366Arg)] e outra como VUS [p.(Ser173Pro)]. A primeira delas estava presente em dois indivíduos não aparentados em heterozigose. Tal variante localiza-se em um domínio EGF-like, indo de encontro ao previamente reportado para as variantes *missense* no caso de DEC associada a *DLL3*, todas localizadas nesses domínios (Figura 8). Apesar de não estar presente no ABRAOM, essa variante apresenta frequência de 0,00001511761505 no GnomAD, com apenas 2 alelos encontrados, um em sul asiáticos ($f=0,00004425$) e um em latinos ($f=0,00003350$).

Já a outra variante *missense* [p.(Ser173Pro)], presente em *trans* com a variante p.(Gly366Arg), se encontra em uma posição que não configura nenhum domínio ou região de maior complexidade da proteína *DLL3*, está ausente no GnomAD e presente no ABRAOM com uma frequência 0,000427, e sem predição *in silico* de dano à proteína de acordo com os parâmetros de *score* REVEL aqui adotados (*score* de 0,42). De acordo com as diretrizes do ACMG (RICHARDS *et al.*, 2015) e as recomendações do ClinGen (REHM *et al.*, 2015), esta última variante foi classificada como VUS.

A interpretação das variantes, particularmente do tipo *missense*, é um importante desafio na área de genética humana, especialmente em populações não europeias. Isso porque, além da alta taxa de predições discordantes entre as ferramentas *in silico* disponíveis (TIAN *et al.*, 2019), há baixa representatividade de tais populações nos bancos de dados de frequências alélicas (SIRUGO *et al.*, 2019). Dessa forma, uma variante classificada como VUS, como no caso de p.(Ser173Pro), não deve ser desconsiderada. Descrições futuras de novos indivíduos com a mesma variante podem modificar esta classificação, elevando seu *status* para provavelmente patogênica, bem como seu registro atual pode auxiliar na interpretação da patogenicidade em tais indivíduos no futuro.

5.5 Pacientes com variantes em *TBX6*

Duas variantes raras em *TBX6* [p.(*437Cys^{ext}*81) e p.(Arg125*)], em heterozigose e classificadas como provavelmente patogênicas, foram encontradas nas famílias F6 e F17, respectivamente.

Os achados clínico-radiológicos nessas famílias (Tabela III e Figura 2) vão de encontro à heterogeneidade fenotípica associada a *TBX6* previamente reportada na literatura (WU *et al.*, 2015; LEFEVBRE *et al.*, 2017), representando desde um caso esporádico de escoliose congênita com defeito de segmentação vertebral simples em F17, até um caso familiar de extenso acometimento da coluna vertebral em F6, caracterizando o fenótipo de DEC. Neste último caso, ressalta-se que, apesar da ausência de dados radiológicos dos primeiros anos de vida de F6.2, as imagens radiográficas de F6.1 (Figura 2) aos 07 meses evidenciam corpos vertebrais arredondados com hipoplasia dos pedículos, remetendo ao aspecto “*pebble beach*”, constituindo um caso de apresentação radiológica de pacientes com variantes em *TBX6* que se sobrepõe ao classicamente reportado nos casos de DEC com variantes bialélicas em *DLL3* (TURNPENNY *et al.*, 2007).

Ainda com relação aos achados clínicos, é interessante também ressaltar que F17 foi diagnosticado com transtorno do espectro autista (TEA), uma condição de etiologia complexa (MOREIRA *et al.*, 2014). A microdeleção de 0,6 Mb em 16p11.2, que inclui o gene *TBX6*, é reconhecidamente associada a este quadro (WU *et al.*, 2015). No entanto, em F17, as variantes encontradas nas regiões codificadoras em *TBX6* estão em heterozigose, afastando a possibilidade de uma deleção envolvendo o gene *TBX6* estar associada à etiologia de TEA neste

indivíduo, apesar de não ser possível descartar a variante *nonsense* como um potencial fator que contribua para a manifestação do transtorno.

Ao longo da última década, diferentes mecanismos foram propostos para explicar os DSVs associados a variantes em *TBX6* (SPARROW *et al.*, 2013b; WU *et al.*, 2015; LEFEBVRE *et al.*, 2017; REN *et al.*, 2020). A variante NM_004608:c.1311A>T:p.(*437Cysext*81), identificada em heterozigose em F6.1 e F6.2 foi previamente descrita por Sparrow e colaboradores em 2013, quando estudavam uma família da Macedônia em que a transmissão vertical do fenótipo de DEC havia sido previamente observada por Gucev e colaboradores (2010). Análises *in vitro* indicaram que a variante, cuja consequência predita seria uma extensão de 81 aminoácidos na proteína, resultava em uma redução da atividade do produto proteico mutante, mas sem interferir na atividade do produto do alelo selvagem de *TBX6*, sugerindo um mecanismo de haploinsuficiência para uma doença com padrão de herança autossômico dominante.

Este mecanismo foi questionado a partir de evidências de que os DSV decorrentes de variantes em *TBX6* requeriam a presença de um alelo nulo (uma microdeleção na região cromossômica 16p11.2 ou uma variante de ponto de perda de função), associado a um alelo hipomórfico em *trans*, comumente o haplótipo T-C-A (rs2289292, rs3809624 e rs3809627), mecanismo este denominado “herança composta” e replicado em diferentes populações: chinesa, japonesa e de origem europeia (francesa e belga) (WU *et al.*, 2015; TAKEDA *et al.*, 2017; LEFEBVRE *et al.*, 2017). Este mecanismo se mostrou responsável por aproximadamente 10% dos casos de escoliose congênita e, mais raramente, defeitos mais extensos compatíveis com DEC.

No entanto, Wu e colaboradores (2015) demonstraram que o haplótipo de risco T-C-A não se encontrava em *trans* com a variante *stoploss* na família da Macedônia com transmissão vertical de DEC, configurando um caso em que o proposto mecanismo de herança composta não foi confirmado. Além disso, estudos funcionais mais sensíveis da variante p.(*437Cysext*81) encontrada nesta família foram realizados por Takeda e colaboradores (2017), evidenciando um efeito dominante negativo, e não um mecanismo de haploinsuficiência, como sugerido inicialmente (SPARROW *et al.*, 2013b). Apesar deste achado, os autores ressaltaram não ser possível descartar o mecanismo de herança composta, podendo haver outro alelo de risco, que não o haplótipo T-C-A, em *trans* com a variante *stoploss* nesta família.

O estudo de segregação na família F6 do presente estudo permitiu identificar que, na probanda com DEC, a variante *stoploss* p.(^{*}437Cys^{ext}*81) se encontrava em *trans* com o haplótipo T-C-A (rs2289292, rs3809624 e rs3809627) classicamente associado ao modelo de herança composta para escoliose congênita (WU *et al.*, 2015; LEFEBVRE *et al.*, 2017; TAKEDA *et al.*, 2017). No entanto, tal haplótipo não foi identificado em seu pai (Figura 3), também com quadro extenso de DSV, compatível com DEC. O estudo da variante *stoploss* e do haplótipo de risco em vários indivíduos desta família sugerem que a variante seja um evento *de novo* em F6.2, apesar de não ter sido possível comprovar este fato, uma vez que o genitor de F6.2 já era falecido na ocasião desta pesquisa.

Com base no cenário exposto acima, nos diversos estudos realizados até o momento dentro da temática dos DSVs associados ao gene *TBX6* e no fato de que, em F6, assim como na família de origem macedônica (SPARROW *et al.*, 2013b), não foi possível identificar um alelo hipomórfico em *trans* com a variante *stoploss*, é possível especular que a presença desta variante específica, exercendo um efeito dominante negativo, seja suficiente para causar o fenótipo de DEC, não requerendo um fator adicional em *trans* em *TBX6*, demonstrando aqui um padrão de herança autossômico dominante.

Já na família F17, a variante *nonsense* p.(Arg125^{*}) foi identificada tanto no probando, com escoliose congênita, como em sua genitora e em seu avô materno, ambos sem anomalias congênitas da coluna vertebral. O estudo do haplótipo T-C-A na família permitiu constatar a presença deste alelo em *cis* com a variante *nonsense* nos três indivíduos supracitados (Figura 4). Nesse caso, diferentemente do proposto para a família F6 (Figura 3), a variante *nonsense* está presente tanto em um indivíduo com o DSV (escoliose congênita), como em parentes não afetados, indicando que sua presença por si só não é suficiente para explicar o fenótipo do DSV, em um cenário de aparente penetrância incompleta. No entanto, o estudo da segregação do haplótipo de risco T-C-A não permitiu estabelecer sua relação causal com o fenótipo de escoliose do indivíduo afetado.

O haplótipo hipomórfico T-C-A é uma variante comum em diversos grupos populacionais, com frequências estimadas de 44% na população asiática e 33% na população europeia. No entanto, este haplótipo é raro entre indivíduos de origem africana (<1%) (WU *et al.*, 2015). Em etapas iniciais de seus estudos, por ocasião da inclusão de outras etnias que não apenas a chinesa, Wu e colaboradores (2015) observaram que nos indivíduos com escoliose congênita com variantes de perda de função em *TBX6*, apenas um deles, de origem africana, não possuía o alelo de risco T-C-A em *trans* com alelos de perda de função de *TBX6*, sugerindo

o potencial envolvimento de outro(s) polimorfismo(s), ainda não descrito(s), para explicar a expressão fenotípica. Partindo dessa premissa e considerando a notória miscigenação étnica da população brasileira (MOURA *et al.*, 2015), foi realizada a análise de ancestralidade do paciente F17, que apesar de estimar uma contribuição majoritariamente europeia (46%), revelou um importante componente africano (42%).

Como investigação adicional, por ocasião da disponibilidade do teste, o indivíduo F6.2, com a variante *stoploss* em *TBX6*, também foi submetido à análise de ancestralidade. Em seu caso, os resultados obtidos, apesar de plurais, evidenciaram uma preponderância absoluta da ancestralidade europeia (aproximadamente 72%), o que, portanto, não se opõe à hipótese de que a variante *stoploss* p.(*437Cysext*81) seja, por si só, suficiente para expressão do fenótipo de DEC.

Especialmente no caso de F17, supracitado, em que há importante contribuição africana e os achados moleculares não explicam por completo o padrão de herança observado na família, vale ressaltar que a análise de *TBX6* priorizou as regiões codificadoras do gene, não sendo possível avaliar a maioria das variantes em regiões regulatórias, que poderiam contribuir para a identificação de um ou mais fatores genéticos adicionais para explicar completamente a expressão do DSV. Dessa forma, estudos futuros mais amplos, como o sequenciamento do genoma, podem contribuir para elucidar qual ou quais fatores genéticos adicionais são requeridos em grupos de indivíduos com etnias diversas ainda pouco representadas nos estudos disponíveis na literatura até o presente.

Vale também citar que o mecanismo de herança composta, inicialmente proposto para a escoliose congênita associada a *TBX6* e posteriormente incluindo DEC, já havia sido demonstrado em outra doença óssea com deficiência congênita de membros, a síndrome da trombocitopenia com ausência dos raios (TAR). Esta síndrome decorre da presença de uma microdeleção de tamanho variável em 1q21.1 incluindo o gene *RBM8A*, ou mais raramente uma variante pontual de perda de função neste mesmo gene, associada a um polimorfismo em um segundo alelo, localizado em regiões regulatórias. Dois polimorfismos foram descritos na maioria dos indivíduos de origem europeia: rs139428292, localizado na região 5'UTR, e rs201779890, localizado no íntron 1, com MAFs (ou frequências do alelo menor, do inglês, *minor allele frequency*) de 3,05% e 0,42%, respectivamente. Estudos *in vitro* observaram que tais variantes resultavam na diminuição da transcrição e da expressão da proteína nas plaquetas dos pacientes (ALBERS *et al.*, 2012).

Em um trabalho recente realizado na França, dos 26 indivíduos avaliados com TAR, apenas 11 (42%) apresentavam o alelo menor do rs139428292, o mais comum associado à TAR dentre os reportados até então. A busca por um novo polimorfismo que pudesse explicar o mecanismo de herança composta encontrou o rs12079762 na região 3'UTR (c.*6C>G), e estudos funcionais demonstraram a condição hipomórfica de seu alelo G. Este polimorfismo apresenta uma MAF maior em populações de origem africana (14,8% no banco populacional GnomAD). Dentre os 11 pacientes do estudo, sete eram provenientes do Norte e Oeste da África e das Antilhas (BOUSSION *et al.*, 2020).

O estudo supracitado exemplifica a importância da interpretação das variantes tendo em consideração a origem étnica do indivíduo e evidencia a necessidade de bancos populacionais englobando populações de diferentes origens. De fato, conforme já mencionado, estudos amplos, seja para avaliações de variantes associadas a doenças complexas, seja para variantes raras, associadas a fenótipos mendelianos, são majoritariamente compostos de indivíduos de ancestralidade europeia. Assim, a inclusão de outras etnias é fator essencial para se obter um conhecimento global da arquitetura genética responsável por esses fenótipos (SIRUGO *et al.*, 2019).

O estudo das famílias F.6 e F.10, que carregam variantes em *TBX6* na presente casuística, também ilustra a complexidade e os desafios da análise das variantes e dos mecanismos relacionados aos DSVs. Até o presente, o mecanismo de herança composta em *TBX6* é o que melhor explica o fenótipo da escoliose congênita, abrangendo uma fração de aproximadamente 10% dos casos (WU *et al.*, 2015; TAKEDA *et al.*, 2017). No entanto, outras sete famílias com variantes em *TBX6* foram reportadas com um DSV mais amplo. Com exceção da variante *stoploss* p.(*437Cysext*81), presente na família da Macedônia e também em F6 desta casuística, em heterozigose e sem o haplótipo de risco em *trans* (a única recorrente), diversas combinações de variantes bialélicas foram reportadas, incluindo as classicamente envolvidas no mecanismo da herança composta, uma variante com alongamento da proteína [p.(Asp312Glufs*187)] em bialelia com o haplótipo de risco T-C-A (um único caso) e outras combinações mais próximas de um padrão clássico de herança autossômico recessivo, como uma microdeleção 16p11.2 associada a uma variante *missense* [p.(His221Asn)]; variantes *missense* em heterozigose composta [p.(Leu141Pro)/p.(Trp233Cys), p.(Arg119His)/p.(Arg150His) e p.(Leu140Phe)/p.(Leu140Phe)] e variante *nonsense* em homozigose [p.(Ser383*)/p.(Ser383*)] (SPARROW *et al.*, 2013b; TAKEDA *et al.*, 2017;

LEFEBVRE *et al.*, 2017; OTOMO *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2020; ERRICHELLO *et al.*, 2020).

Evidências mais atuais indicam que a variabilidade de expressão dos DSVs, desde a escoliose congênita até quadros compatíveis com DEC, está associada ao grau de função residual do produto proteico de *TBX6*, sendo que a depleção completa de sua atividade seria incompatível com a vida, evento demonstrado em modelos animais (ERRICHELLO *et al.*, 2020). Ren e colaboradores (2020) também demonstraram o efeito de dose por excesso de *TBX6* sobre anormalidades da segmentação vertebral, particularmente da coluna cervical, tanto em modelos animais como em humanos com microduplicação em 16p11.2, o que torna as evidências a respeito da contribuição do efeito de dose na heterogeneidade fenotípica de *TBX6* ainda mais robustas.

5.6 Formas sindrômicas

Uma avaliação clínica detalhada, com auxílio de exames complementares, permite identificar achados associados aos DSV que podem direcionar para o diagnóstico de uma forma sindrômica, em que o DSV compõe um quadro clínico mais amplo. Neste estudo, três crianças apresentavam sinais clínicos e radiológicos característicos que direcionaram fortemente para uma síndrome clinicamente reconhecida e com etiologia definida: F8, com M-DSV generalizado, apresentava dismorfismos faciais, mesomelia e hipoplasia de genitália, achados cardinais da síndrome de Robinow (MIM #268310); F9, com M-DSV regional, apresentava sinostose úmero-radio-ulnar e, na evolução, foram observadas sinostoses entre os ossos do carpo e tarso, compatível com a síndrome da sinostose espondilocarpotarsal (MIM #272460); e F10, com um quadro respiratório grave, sequência de Pierre Robin, tórax estreito e anomalias das costelas, característico da síndrome cerebrocostomandibular (MIM #117650). Destaca-se que os achados radiológicos, com extenso acometimento da coluna vertebral associado a anomalias das costelas na paciente F8, com síndrome de Robinow, são semelhantes aos observados na DEC.

Por outro lado, em indivíduos com M-DSV regional com outros achados associados, particularmente anomalias cardíacas, renais, pulmonares e de membros, não foi possível estabelecer um diagnóstico clínico preciso. Vale ressaltar que algumas dessas características podem fazer parte do espectro da associação VACTERL, acrônimo para os seguintes achados: anomalias Vertebrais, atresia ou estenose Anal, anomalias Cardíacas, fístula Traqueo-

Esofágica, anomalias Radiais e Renais e anomalia de membros, do inglês “*Limb*” (TURNPENNY *et al.*, 2007; SOLOMON, 2018). Embora não haja critérios mínimos estabelecidos para o diagnóstico desta associação, este é normalmente realizado quando observada a presença de pelo menos três dos achados, incluindo aqueles menos comuns, como malformações anorretais e atresia de esôfago com fístula traqueo-esofágica. Até o presente, embora algumas anomalias cromossômicas microscópicas e submicroscópicas tenham sido descritas em alguns casos, não existe uma etiologia definida, recorrente, que possa explicar uma proporção substancial dos indivíduos diagnosticados com essa associação (SOLOMON, 2018).

Nos três pacientes com diagnósticos clínicos fortemente estabelecidos, variantes raras foram encontradas na análise direcionada para um dos genes responsáveis pelas síndromes (*FLNB* para a síndrome espondilocarpotarsal; *ROR2* para a síndrome de Robinow, forma autossômica recessiva; e *SNRPB*, para a síndrome cerebrocostomandibular), de acordo com o padrão de herança estabelecido, confirmando a hipótese clínica. Com exceção de uma variante encontrada em *FLNB* (c.-128G>A), localizada na região 5’UTR, classificada como VUS, todas as outras foram consideradas patogênicas ou provavelmente patogênicas. Esta variante e a variante *missense* em homozigose no gene *ROR2* são variantes novas, não reportadas anteriormente.

No grupo de indivíduos sem uma hipótese clínica estabelecida, em um único paciente F16, foi identificada uma variante rara, com predição *in silico* de quebra de sítio doador de *splicing*, em heterozigose em *LFNG* (c.219+1G>A), classificada como provavelmente patogênica. A DEC associada a este gene apresenta um padrão de herança autossômico recessivo, com apenas dois casos reportados na literatura (SPARROW *et al.*, 2006; OTOMO *et al.*, 2018). Nesses dois casos, os genitores, heterozigotos para as variantes encontradas, não apresentavam DSV. Dessa forma, uma única variante de perda de função em *LFNG*, como aparenta ser o caso da variante de *splicing* no probando F16, não parece ser suficiente para causar fenótipo de DSV.

Vale citar que o quadro clínico dos dois indivíduos reportados na literatura era caracterizado por um acometimento extenso, apresentando uma desorganização da coluna vertebral mais acentuada do que a observada nos casos associados a variantes nos genes *DLL3* e *MESP2*. Na descrição radiológica do paciente avaliado por Otomo e colaboradores (2018), o aspecto dos corpos vertebrais foi descrito com o sinal de “*pebble beach*”, semelhante ao observado em indivíduos com variantes em *DLL3*. No paciente avaliado no presente estudo, os

achados radiológicos são regionais, particularmente da coluna torácica alta, com agenesia de costelas e presença de mamilo supranumerário nesta região.

Dessa forma, os achados clínico-radiológicos em F16 diferem do quadro clínico reportado até o presente em indivíduos com variantes bialélicas em *LFNG*. O estudo molecular realizado (NGS focado) apresenta limitações, uma vez que não contempla a maioria das regiões regulatórias dos genes, nem deleções intragênicas grandes, não sendo possível afastar que outra variante em *trans* esteja presente neste indivíduo, não tendo sido identificada devido a limitações técnicas. Embora o quadro clínico do probando seja muito leve comparado com os indivíduos reportados até então, não se pode descartar que, na presença de outra variante não identificada em *trans*, o DSV possa ocorrer por um efeito de dose gênica semelhante ao espectro amplo de variabilidade clínica associado a *TBX6* (LEFEBVRE *et al.*, 2017).

Assim como em F16, o paciente F13 apresentou mamilo supranumerário em região sobreposta à agenesia de costelas. A presença de mamilo extra, denominada “politelia”, associada a defeitos de segmentação vertebral, já foi relatada previamente por Duru e colaboradores (1999) e Akin e colaboradores (2012). Assim como em F16 e F13, em ambos os casos reportados na literatura, o mamilo supranumerário estava localizado sobre a região de acometimento mais importante das costelas. Embora não haja uma correlação bem estabelecida entre politelia e DSVs, relatos futuros de pacientes com a mesma condição podem contribuir para o entendimento de uma possível associação e eventualmente caracterização de uma síndrome ainda não descrita.

5.7 Aconselhamento genético

A DEC foi o fenótipo de DSV avaliado no presente estudo com acometimento mais extenso dos corpos vertebrais. Apesar de raros, os DSVs de etiologia genética, em especial a DEC, estão associados a uma grande heterogeneidade lóica. Até o momento, sete diferentes genes já foram associados a fenótipos com DSV extenso (*DLL3*, *MESP2*, *LFNG*, *HES7*), com defeitos mais localizados (*RIPPLY2* e *DMRT2*) ou ambos (*TBX6*).

Até o presente, todos os casos de DEC associados a *DLL3* reportados na literatura apresentam padrão de herança mendeliano autossômico recessivo. Um padrão de herança clássico, mendeliano, frequentemente autossômico recessivo, também pode ser observado na grande maioria dos casos de DEC não associada a *DLL3*, e em parte significativa dos DSVs em geral. Dessa forma, considerando a raridade do fenótipo e seu padrão de herança mais comum,

frequentemente há consanguinidade entre os genitores de pacientes com fenótipo de DSV, especialmente de DEC, o que se refletiu no cenário observado na presente casuística. No caso dos DSVs de herança autossômica recessiva, o risco de recorrência estimado para esses casais é de 25%.

Por outro lado, variantes associadas a *TBX6*, previamente descritas na literatura e observadas neste estudo, podem apresentar um padrão de herança mendeliano autossômico dominante (SPARROW *et al.*, 2013b), com risco de recorrência para um indivíduo afetado de 50%, ou um padrão de herança não clássico, denominado “herança composta”, em que um dos genitores pode ser portador de uma variante rara em *TBX6* e o outro, de uma variante comum, sendo esta última classicamente representada pelo haplótipo hipomórfico T-C-A (rs2289292, rs3809624 e rs3809627) (WU *et al.*, 2015). Nesta última situação, portanto, para um casal com um ou mais filhos afetados, o risco de recorrência de DSV seria de 25%, assim como ocorre, por exemplo, nos casos de DEC ligada ao *DLL3*.

No entanto, para um indivíduo sabidamente portador de uma variante patogênica em *DLL3* que venha a ter filhos, em uma união não consanguínea, o risco de ocorrência de DSV na prole seria desprezível, dado o padrão de herança autossômico recessivo associado ao gene e a baixa frequência de portadores de variantes patogênicas na população em geral. Levando-se em consideração a frequência de heterozigotos estimada por Turnpenny, Sloman e Dunwoodie (2017), por exemplo, este risco seria de 1/1400 (0,07%).

Já para um portador de uma variante de perda de função em *TBX6*, considerando-se o modelo de herança composta, a chance de um relacionamento não consanguíneo resultar em filho(s) com fenótipo de DSV dependerá da frequência do haplótipo de risco na população de origem do(a) outro(a) genitor(a). Dado que a frequência alélica do haplótipo de risco clássico T-C-A varia entre as populações, podendo chegar a aproximadamente 44% entre indivíduos de origem asiática, por exemplo (WU *et al.*, 2015), o risco de ocorrência de DSV para a prole do portador exemplificado acima pode atingir valores de até cerca de 22%, o que se aproxima do risco de recorrência estimado para casais que já possuem filhos afetados.

Ainda com relação aos mecanismos de herança dos DSVs associados a *TBX6*, há um caso de origem africana reportado por Wu e colaboradores (2015) em que um segundo alelo de risco não foi identificado para explicar um aparente padrão de herança composta. O mesmo ocorreu na família F17 do presente estudo, cuja estimativa de ancestralidade do probando também revelou um importante componente africano. Ambos os casos vão de encontro à possibilidade já discutida previamente de que, dada a baixa frequência do haplótipo de risco

clássico T-C-A na população africana (<1%) (WU *et al.*, 2015), outro(s) fator(es) genético(s) ainda não elucidado(s) integrem a etiologia dos DSVs associados a *TBX6* nessa e até mesmo em outras populações.

Os cenários expostos acima ilustram as nuances de complexidade que podem estar envolvidas no aconselhamento genético dos defeitos de segmentação vertebral e evidenciam a importância de considerar a ancestralidade dos consulentes em contextos como esse.

Com relação à detecção gestacional dos DSVs, em especial nos casos de acometimento mais extenso, pode ser realizada de maneira não invasiva, com base em achados ultrassonográficos como espinha encurtada, desorganização de múltiplos corpos vertebrais, fusão posterior das costelas, diâmetro torácico reduzido, abdômen protuberante e, especialmente nos casos de DEC, manutenção das medidas normais de ossos longos (WHITTOCK *et al.*, 2003). No presente estudo, falha no registro dos dados ou não realização de exames ultrassonográficos fetais morfológicos podem explicar a ausência de achados detectáveis nesse tipo de exames na grande maioria dos casos.

O diagnóstico molecular pré-natal também é possível, com base na análise de material coletado por amniocentese ou biópsia vilocorial. Nesses casos, preferencialmente, a análise deve ser baseada nas variantes previamente detectadas no indivíduo já diagnosticado na família. Apesar de ser uma alternativa mais invasiva, Whittock e colaboradores (2003) relataram procura por testes moleculares pré-natais em casos com histórico de DEC, mesmo em situações em que os achados ultrassonográficos poderiam ser suficientes, sugerindo uma maior confiança das famílias nos testes genéticos em relação à ultrassonografia fetal, mesmo que o procedimento de coleta de material para os testes represente um baixo, porém existente, risco de indução de aborto. Como alternativa, há a possibilidade de diagnóstico pré-implantacional, em casais que optem por fertilização *in vitro*.

Seja no período pré-natal, seja após o nascimento, os benefícios da confirmação molecular do diagnóstico clínico variam de acordo com a própria natureza da doença. Em alguns casos, a confirmação pode alterar seu seguimento clínico. Em outros, nas chamadas condições “acionáveis”, um diagnóstico prévio ao aparecimento dos sintomas pode viabilizar ações que alterem significativamente o prognóstico, como no caso da acidemia metilmalônica, cuja confirmação molecular foi obtida no sequenciamento do exoma de F7 (KALIA *et al.*, 2016).

Em certas situações, no entanto, um diagnóstico molecular não altera a estratégia clínica previamente traçada para o paciente, o que ocorre para grande parte dos DSVs, em especial na

DEC e em outros DSVs associados a síndromes clinicamente não reconhecidas. Mesmo nestes casos, o resultado de um teste genético pode evitar a submissão desnecessária a outros exames e avaliações adicionais, além de facilitar o entendimento e aceitação da doença no contexto familiar, permitindo a dissolução do sentimento de culpa que pode decorrer da ausência de uma confirmação do diagnóstico (JAMUAR & TAN, 2015).

Adicionalmente, os testes genéticos podem ser uma importante ferramenta para o cálculo de risco de recorrência de fenótipos de DEC ou outros DSVs, fornecendo importantes elementos para a tomada de decisão dos consulentes, especialmente caso o paciente analisado seja o único afetado na família, dado que estes fenótipos constituem condições raras, geneticamente heterogêneas, com expressividade e padrões de herança variáveis (TURNPENNY *et al.*, 2007; TURNPENNY, SLOMAN & DUNWOODIE, 2017; LEFEBVRE *et al.*, 2018).

Além de técnicas clássicas como o sequenciamento de Sanger, em contextos como esse, especialmente quando há grande heterogeneidade lófica, o sequenciamento de nova geração (NGS), uma técnica cada vez mais acessível, tem se tornado uma importante ferramenta ao permitir a análise conjunta de diferentes genes ou até mesmo de todas as regiões exônicas do genoma (CHONG *et al.*, 2015; WETTERSTRAND, 2018).

Utilizando tais ferramentas, no presente estudo, foi obtida confirmação molecular do diagnóstico que permitiu um cálculo de risco de recorrência mais robusto para nove famílias. Todas as dezessete famílias da casuística, no entanto, receberam aconselhamento genético, dado que, mesmo na ausência de confirmação molecular, é importante proporcionar um espaço seguro de acolhimento, elucidação das dúvidas e fornecimento de orientações e informações adicionais que possam ser pertinentes aos pacientes e seus familiares, de modo a atender os princípios do aconselhamento genético instituídos pela Organização Mundial da Saúde (FLETCHER *et al.*, 1998), viabilizando a autonomia nas decisões inerentes a cada contexto familiar.

6 CONCLUSÕES

- O DSV mais prevalente na casuística foi a DEC, observada em aproximadamente 41% das famílias estudadas.
- A detecção de variantes raras em genes já associados a DSVs apresentou positividade elevada apenas nos casos com defeitos de segmentação vertebral extensos, com um quadro clínico compatível com DEC (~86% de confirmação molecular do diagnóstico), cenário semelhante ao já reportado na literatura, ou em síndromes clinicamente reconhecidas (100% de confirmação molecular do diagnóstico).
- Variantes raras bialélicas em *DLL3* foram as mais prevalentes neste estudo, tendo sido observadas na maior parte das famílias com DEC (~71%), sendo representadas por diferentes tipos de mutação (*missense*, *frameshift* e de *splicing*), corroborando achados prévios da maioria dos estudos publicados até o momento.
- O fenótipo clínico-radiológico de DEC decorrente de variantes em *DLL3* observado na casuística é bastante homogêneo, conforme previamente reportado na literatura.
- O fenótipo clínico-radiológico de DEC decorrente de uma variante *stoploss* em *TBX6* observado em uma das famílias da casuística é semelhante ao fenótipo tipicamente observado em indivíduos com variantes em *DLL3*.
- O estudo da variante *stoploss* e do haplótipo de risco T-C-A em F6 corroboram o padrão de herança autossômico dominante para DEC ligada a *TBX6*.
- Com base nos dados obtidos, em famílias brasileiras com caso(s) típico(s) de DEC, na ausência da possibilidade de realização de um painel de genes mais amplo, sugere-se:
 - a) sequenciamento preferencial do gene *DLL3* em casos isolados ou sugestivos de um padrão de herança autossômico recessivo;
 - b) sequenciamento preferencial do gene *TBX6* quando observada transmissão vertical.
- Das quatro variantes distintas encontradas em *DLL3*, a mais prevalente foi c.599_603dup, uma variante já reportada em diferentes populações.
- Variantes raras, não reportadas previamente, foram encontradas nos genes *DLL3* (três variantes distintas), *ROR2* e *FLNB*, demonstrando o potencial do estudo de indivíduos com DSV em uma população miscigenada como a brasileira para ampliar o conhecimento da arquitetura genética das doenças monogênicas.

- No indivíduo com DEC, mas sem achados moleculares nos genes classicamente associados ao fenótipo, foi encontrada uma variante *missense* rara, com predição *in silico* de patogenicidade, em heterozigose em *WNT7B*, um gene integrante da via Wnt com papel osteogênico. Tal variante, no entanto, foi classificada como VUS e não permite explicar o fenótipo do paciente. O estudo de seus genitores poderia contribuir para a interpretação de tal variante.
- Em um indivíduo com escoliose congênita e uma variante *nonsense* em *TBX6*, o haplótipo de risco T-C-A não foi encontrado em *trans* conforme esperado para o mecanismo clássico de herança composta, indicando que outro(s) fator(es) genético(s), ainda não elucidados, podem compor a etiologia da escoliose congênita, e corroborando o fato de que diferenças étnicas – nesse caso, potencialmente o componente de ancestralidade Africana do probando – podem resultar em contribuições genéticas distintas na composição de um dado fenótipo.
- Os achados do presente estudo ilustram a diversidade e complexidade da arquitetura genética dos DSVs e os desafios envolvidos no aconselhamento genético das famílias dos pacientes afetados.

7 REFERÊNCIAS

- AKIN, Leyla, *et al.* The association of polythelia with segmentation defects of the vertebrae. **Clinical dysmorphology**, v.21, n. 3, p. 181-182, 2012.
- ALATAS, Ibrahim, *et al.* Neural tube defects in Jarcho-Levin syndrome: study of twenty-eight cases. **Pediatric Neurosurgery**, v. 50, n. 2, p. 57-62, 2015.
- ALBERS, Cornelis A., *et al.* Compound inheritance of a low-frequency regulatory SNP and a rare null mutation in exon-junction complex subunit RBM8A causes TAR syndrome. **Nature genetics**, v. 44, n. 4, p. 435-439, 2012.
- BAUMERT, Uwe, *et al.* Cleidocranial dysplasia: molecular genetic analysis and phenotypic-based description of a Middle European patient group. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 139, n. 2, p. 78-85, 2005.
- BOGUSIAK, Katarzyna; PUCH, Aleksandra; ARKUSZEWSKI, Piotr. Goldenhar syndrome: current perspectives. **World Journal of Pediatrics**, v. 13, n. 5, p. 405-415, 2017.
- BONAFÉ, Luisa, *et al.* A cluster of autosomal recessive spondylocostal dysostosis caused by three newly identified *DLL3* mutations segregating in a small village. **Clinical genetics**, 2003, v. 64, n. 1, p. 28-35, 2003.
- BOUMAN, Arjan, *et al.* Homozygous *DMRT2* variant associates with severe rib malformations in a newborn. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 176, n. 5, p. 1216-1221, 2018.
- BOUSSION, Simon, *et al.* TAR syndrome: Clinical and molecular characterization of a cohort of 26 patients and description of novel noncoding variants of RBM8A. **Human Mutation**, 2020.
- BULMAN, Michael P., *et al.* Mutations in the human delta homologue, *DLL3*, cause axial skeletal defects in spondylocostal dysostosis. **Nature genetics**, v. 24, n. 4, p. 438-441, 2000.
- CHAPMAN, Deborah L.; PAPAIOANNOU, Virginia E. Three neural tubes in mouse embryos with mutations in the T-box gene *Tbx6*. **Nature**, v. 391, n. 6668, p. 695-697, 1998.
- CHEN, Dian, *et al.* The role of Wnt7B in the mediation of dentinogenesis via the ERK1/2 pathway. **Archives of oral biology**, v. 104, p. 123-132, 2019.
- CHEN, Weisheng, *et al.* *TBX6* missense variants expand the mutational spectrum in a non-Mendelian inheritance disease. **Human Mutation**, v. 41, n. 1, p. 182-195, 2020.
- CHITAYAT, David; HODGKINSON, Kathy A.; AZOUZ, Michel E. Intrafamilial variability in cleidocranial dysplasia: a three generation family. **American journal of medical genetics**, v. 42, n. 3, p. 298-303, 1992.
- CHONG, Jessica X., *et al.* The genetic basis of Mendelian phenotypes: discoveries, challenges, and opportunities. **The American Journal of Human Genetics**, v. 97, n. 2, p. 199-215, 2015.

COOKE, John; ZEEMAN, Erik C. A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis. **Journal of theoretical biology**, v. 58, n. 2, p. 455-476, 1976.

CORNIER, Alberto S., *et al.* Phenotype characterization and natural history of spondylothoracic dysplasia syndrome: a series of 27 new cases. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 128, n. 2, p. 120-126, 2004.

CORNIER, Alberto S., *et al.* Mutations in the *MESP2* gene cause spondylothoracic dysostosis/Jarcho-Levin syndrome. **The American Journal of Human Genetics**, v. 82, n. 6, p. 1334-1341, 2008.

DEQUÉANT, Mary-Lee; POURQUIÉ, Olivier. Segmental patterning of the vertebrate embryonic axis. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 5, p. 370-382, 2008.

DURU, Soner, *et al.* Segmental costovertebral malformations: association with neural tube defects. **Pediatric neurosurgery**, v. 30, n. 5, p. 272-277, 1999.

ECKALBAR, Walter L., *et al.* Scoliosis and segmentation defects of the vertebrae. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 1, n. 3, p. 401-423, 2012.

ERRICHIELLO, Edoardo, *et al.* An additional piece in the *TBX6* gene dosage model: A novel nonsense variant in a fetus with severe spondylocostal dysostosis. **Clinical Genetics**, v. 98, n. 6, p. 628-629, 2020.

FLETCHER, John C., *et al.* Proposed International Guidelines on Ethical Issues in Medical Genetics and Genetic Services. Report of a WHO Meeting on Ethical Issues in Medical Genetics, Geneva, 15-16 December 1997. 1998.

FRASER, F. Clarke. Genetic counseling. **American journal of human genetics**, v. 26, n. 5, p. 636, 1974.

GAVIN, Brian J.; MCMAHON, Jill A.; MCMAHON, Andrew P. Expression of multiple novel Wnt-1/int-1-related genes during fetal and adult mouse development. **Genes & development**, v. 4, n. 12b, p. 2319-2332, 1990.

GIAMPIETRO, Philip. F., *et al.* Clinical, genetic and environmental factors associated with congenital vertebral malformations. **Molecular syndromology**, v. 4, n. 1-2, p. 94-105, 2013.

GUCEV, Zoran S., *et al.* Autosomal dominant spondylocostal dysostosis in three generations of a Macedonian family: Negative mutation analysis of *DLL3*, *MESP2*, *HES7*, and *LFNG*. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 152, n. 6, p. 1378-1382, 2010.

HUGUET, Emmanuel L., *et al.* Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. **Cancer research**, v. 54, n. 10, p. 2615-2621, 1994.

IOANNIDIS, Nilah M., *et al.* REVEL: an ensemble method for predicting the pathogenicity of rare missense variants. **The American Journal of Human Genetics**, v. 99, n. 4, p. 877-885, 2016.

JAMUAR, Saumya S.; TAN, Ene-Choo. Clinical application of next-generation sequencing for Mendelian diseases. **Human genomics**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2015.

KALIA, Sarah S., *et al.* Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2. 0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. **Genetics in medicine**, v. 19, n. 2, p. 249-255, 2017.

KOMIYA, Yuko; HABAS, Raymond. Wnt signal transduction pathways. **Organogenesis**, v. 4, n. 2, p. 68-75, 2008.

KORC, Murray; FRIESEL, Robert E. The role of fibroblast growth factors in tumor growth. **Current cancer drug targets**, v. 9, n. 5, p. 639-651, 2009.

KUSUMI, Kenro, *et al.* The mouse pudgy mutation disrupts Delta homologue *Dll3* and initiation of early somite boundaries. **Nature genetics**, v. 19, n. 3, p. 274-278, 1998.

LEFEBVRE, Mathilde, *et al.* Autosomal recessive variations of *TBX6*, from congenital scoliosis to spondylocostal dysostosis. **Clinical genetics**, v. 91, n. 6, p. 908-912, 2017.

LEFEBVRE, Mathilde, *et al.* Diagnostic strategy in segmentation defect of the vertebrae: a retrospective study of 73 patients. **Journal of medical genetics**, v. 55, n. 6, p. 422-429, 2018.

LUO, Zhengliang, *et al.* Notch signaling in osteogenesis, osteoclastogenesis, and angiogenesis. **The American Journal of Pathology**, v. 189, n. 8, p. 1495-1500, 2019.

LYNCH, Danielle C., *et al.* Disrupted auto-regulation of the spliceosomal gene *SNRNPB* causes cerebro-costo-mandibular syndrome. **Nature communications**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2014.

MAISENBACHER, Melissa K., *et al.* Molecular analysis of congenital scoliosis: a candidate gene approach. **Human genetics**, v. 116, n. 5, p. 416-419, 2005.

MCINERNEY-LEO, Aideen M., *et al.* Compound heterozygous mutations in *RIPPLY2* associated with vertebral segmentation defects. **Human molecular genetics**, v. 24 n. 5, p. 1234-1242, 2015.

MCKUSICK, Victor A. Spondylocostal dysostosis 1, autosomal recessive; SCDO1. **Online Mendelian Inheritance in Man**, abr, 1986a. Disponível em: <<http://omim.org/entry/277300?search=dll3&highlight=dll3>>. Acesso em: 06 set. 2020.

MCKUSICK, Victor A. Spondylocostal dysostosis 5; SCDO5. **Online Mendelian Inheritance in Man**, jun, 1986b. Disponível em: <<http://omim.org/entry/122600?search=%22spondylocostal%20dysostosis%22&highlight=%22spondylocostal%20dysostosi%22#12>>. Acesso em: 07 set. 2020.

MITTER, Diana, *et al.* Expanded clinical spectrum of spondylcarpotarsal synostosis syndrome and possible manifestation in a heterozygous father. **American journal of medical genetics Part A**, v. 146, n. 6, p. 779-783, 2008.

MOLONEY, Daniel J., *et al.* Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. **Nature**, v. 406, n. 6794, p. 369-375, 2000.

MOREIRA, Danielle P., *et al.* Investigation of 15q11-q13, 16p11. 2 and 22q13 CNVs in autism spectrum disorder Brazilian individuals with and without epilepsy. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e107705, 2014.

MORIMOTO, Mitsuru, *et al.* The Mesp2 transcription factor establishes segmental borders by suppressing Notch activity. **Nature**, v. 435, n. 7040, p. 354-359, 2005.

MORTIER, Geert R., *et al.* Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2019 revision. **American journal of medical genetics Part A**, v. 179, n. 12, p. 2393-2419, 2019.

MOURA, Ronald R., *et al.* Meta-analysis of Brazilian genetic admixture and comparison with other Latin America countries. **American Journal of Human Biology**, v. 27, n. 5, p. 674-680, 2015.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (US). *HES7* hes family bHLH transcription factor 7 [Homo sapiens (human)]. **National Center for Biotechnology Information Search Database**, out, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/84667>>. Acesso em: 03 out. 2020.

NOWELL, Craig S.; RADTKE, Freddy. Notch as a tumour suppressor. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 3, p. 145, 2017.

OFFIAH, Amaka, *et al.* Pilot assessment of a radiologic classification system for segmentation defects of the vertebrae. **American journal of medical genetics Part A**, v. 152, n. 6, p. 1357-1371, 2010.

ORNITZ, David M.; ITOH, Nobuyuki. The fibroblast growth factor signaling pathway. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 4, n. 3, p. 215-266, 2015.

OTOMO, Nao, *et al.* Identification of novel *LFNG* mutations in spondylocostal dysostosis. **Journal of human genetics**, v. 64, n. 3, p. 261-264, 2018.

OTOMO, Nao, *et al.* Bi-allelic loss of function variants of *TBX6* causes a spectrum of malformation of spine and rib including congenital scoliosis and spondylocostal dysostosis. **Journal of medical genetics**, v. 56, n. 9, p. 622-628, 2019.

ÖZBUDAK, Ertuğrul M.; POURQUIÉ, Olivier. The vertebrate segmentation clock: the tip of the iceberg. **Current opinion in genetics & development**, v. 18, n. 4, p. 317-323, 2008.

PAPAPETROU, Charalambos, *et al.* The Human *TBX6* Gene: Cloning and Assignment to Chromosome 16p11. 2. **Genomics**, v. 55 n. 2, p. 238-241, 1999.

- PATTON, Michael A.; AFZAL, A. R. Robinow syndrome. **Journal of medical genetics**, v. 39, n. 5, p. 305-310, 2002.
- PINA-NETO, João M. Aconselhamento genético. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 4, p. S20-S26, 2008.
- POURQUIÉ, Olivier. Segmentation of the vertebrate spine: from clock to scoliosis. **Cell**, v. 145, n. 5, p. 650, 2011a.
- POURQUIÉ, Olivier. Vertebrate segmentation: from cyclic gene networks to scoliosis. **Cell**, v. 145, n. 5, p. 650-663, 2011b.
- REHM, Heidi L., *et al.* ClinGen – the clinical genome resource. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 23, p. 2235-2242, 2015.
- REN, Xiaojun, *et al.* Increased *TBX6* gene dosages induce congenital cervical vertebral malformations in humans and mice. **Journal of Medical Genetics**, v. 57, n. 6, p. 371-379, 2020.
- RICE, David; DIETRICH, Susanne. The vertebral column. In: **Embryos, genes and birth defects**. John Wiley and Sons Ltd Chichester, p. 411-462, 2006.
- RICHARDS, Sue, *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. **Genetics in medicine**, v. 17, n. 5, p. 405-423, 2015.
- RIMOIN, David L.; FLETCHER, Barry D.; MCKUSICK, Victor A. Spondylocostal dysplasia: a dominantly inherited form of short-trunked dwarfism. **The American journal of medicine**, v. 45 n. 6, p. 948-953, 1968.
- ROSSO, Silvana B., *et al.* Wnt signaling through Dishevelled, Rac and JNK regulates dendritic development. **Nature neuroscience**, v. 8, n. 1, p. 34-42, 2005.
- SEREY-GAUT, Margaux, *et al.* Congenital posterior cervical spine malformation due to biallelic c. 240-4T> G *RIPPLY2* variant: A discrete entity. **American Journal of Medical Genetics Part A**, 2020.
- SIRUGO, Giorgio; WILLIAMS, Scott M.; TISHKOFF, Sarah A. The missing diversity in human genetic studies. **Cell**, v. 177, n. 1, p. 26-31, 2019.
- SOLOMON, Benjamin D. The etiology of VACTERL association: Current knowledge and hypotheses. In: **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**. Hoboken, USA: John Wiley & Sons, Inc., p. 440-446, 2018.
- SPARROW, Duncan B., *et al.* Diverse requirements for Notch signalling in mammals. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 46, p. 365-374, 2002.

SPARROW, Duncan B., *et al.* Mutation of the LUNATIC FRINGE gene in humans causes spondylocostal dysostosis with a severe vertebral phenotype. **The American Journal of Human Genetics**, v. 78, n. 1, p. 28-37, 2006.

SPARROW, Duncan B., *et al.* Mutation of Hairy-and-Enhancer-of-Split-7 in humans causes spondylocostal dysostosis. **Human molecular genetics**, v. 17, n. 23, p. 3761-3766, 2008.

SPARROW, Duncan B., *et al.* Two novel missense mutations in HAIRY-AND-ENHANCER-OF-SPLIT-7 in a family with spondylocostal dysostosis. **European journal of human genetics**, v. 18, n. 6, p. 674-679, 2010.

SPARROW, Duncan B., *et al.* A mechanism for gene-environment interaction in the etiology of congenital scoliosis. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 295-306, 2012.

SPARROW, Duncan B., *et al.* Mutation of *HES7* in a large extended family with spondylocostal dysostosis and dextrocardia with situs inversus. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 161, n. 9, p. 2244-2249, 2013a.

SPARROW, Duncan B., *et al.* Autosomal dominant spondylocostal dysostosis is caused by mutation in *TBX6*. **Human molecular genetics**, v. 22, n. 8, p. 1625-1631, 2013b.

STEIN, Gary S., *et al.* Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. **Oncogene**, v. 23, n. 24, p. 4315-4329, 2004.

STENMAN, Jan M., *et al.* Canonical Wnt signaling regulates organ-specific assembly and differentiation of CNS vasculature. **Science**, v. 322, n. 5905, p. 1247-1250, 2008.

SU, Nan; JIN, Min; CHEN, Lin. Role of FGF/FGFR signaling in skeletal development and homeostasis: learning from mouse models. **Bone research**, v. 2, p. 14003, 2014.

TAKEDA, Kazuki, *et al.* Compound heterozygosity for null mutations and a common hypomorphic risk haplotype in *TBX6* causes congenital scoliosis. **Human mutation**, v. 38, n. 3, p. 317-323, 2017.

TIAN, Yuan, *et al.* REVEL and BayesDel outperform other in silico meta-predictors for clinical variant classification. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2019.

TU, Xiaolin, *et al.* Noncanonical Wnt signaling through G protein-linked PKC δ activation promotes bone formation. **Developmental cell**, v. 12, n. 1, p. 113-127, 2007.

TURNPENNY, Peter D., *et al.* A gene for autosomal recessive spondylocostal dysostosis maps to 19q13.1-q13.3. **The American Journal of Human Genetics**, v. 65, n. 1, p. 175-182, 1999.

TURNPENNY, Peter D., *et al.* Novel mutations in *DLL3*, a somitogenesis gene encoding a ligand for the Notch signalling pathway, cause a consistent pattern of abnormal vertebral segmentation in spondylocostal dysostosis. **Journal of medical genetics**, v. 40, n. 5, p. 333-339, 2003.

TURNPENNY, Peter D., *et al.* Abnormal vertebral segmentation and the notch signaling pathway in man. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 236, n. 6, p. 1456-1474, 2007.

TURNPENNY, Peter D.; ELLARD, Sian. Alagille syndrome: pathogenesis, diagnosis and management. **European Journal of Human Genetics**, v. 20, n. 3, p. 251-257, 2012.

TURNPENNY, Peter D.; SLOMAN, Melissa; DUNWOODIE, Sally. Spondylocostal dysostosis, autosomal recessive. In: **GeneReviews®[Internet]**. University of Washington, Seattle, 2017.

VAN BOKHOVEN, Hans, *et al.* Mutation of the gene encoding the ROR2 tyrosine kinase causes autosomal recessive Robinow syndrome. **Nature genetics**, v. 25, n. 4, p. 423-426, 2000.

VICTOR, Elivane S.; PAES, Ângela, T. Reflexões sobre a importância do valor p – parte 1. **Educação Continuada em Saúde**, v. 8, p. 109-1010, 2010.

WALLINGFORD, John B.; HABAS, Raymond. The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. **Development**, v. 132, n. 20, p. 4421-4436, 2005.

WANG, Hong-yan, *et al.* Modelling coupled oscillations in the Notch, Wnt, and FGF signaling pathways during somitogenesis: a comprehensive mathematical model. **Computational intelligence and neuroscience**, 2015.

WARMAN, Matthew L., *et al.* Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision. **American journal of medical genetics Part A**, v. 155, n. 5, p. 943-968, 2011.

WETTERSTRAND, Kris A. DNA sequencing costs 2017: Data from the Nhgri Genome Sequencing Program (GSP). **National Human Genome Research Institute**, 2018.

WHITTOCK, Neil V., *et al.* Molecular genetic prenatal diagnosis for a case of autosomal recessive spondylocostal dysostosis. **Prenatal diagnosis**, v. 23, n. 7, p. 575-579, 2003.

WHITTOCK, Neil V., *et al.* Mutated *MESP2* causes spondylocostal dysostosis in humans. **The American Journal of Human Genetics**, v. 74, n. 6, p. 1249-1254, 2004a.

WHITTOCK, Neil V., *et al.* Pseudodominant inheritance of spondylocostal dysostosis type 1 caused by two familial delta-like 3 mutations. **Clinical Genetics**, v. 66, p. 67-72, 2004b.

WODARZ, Andreas; NUSSE, Roel. Mechanisms of Wnt signaling in development. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 14, n. 1, p. 59-88, 1998.

WU, Nan, *et al.* *TBX6* null variants and a common hypomorphic allele in congenital scoliosis. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 4, p. 341-350, 2015.

YANG, Yang, *et al.* Mutational burden and potential oligogenic model of *TBX6*-mediated genes in congenital scoliosis. **Molecular Genetics & Genomic Medicine**, v. 8, n. 10, e1453, 2020.

ZHAO, Wei, *et al.* Ripply2 recruits proteasome complex for Tbx6 degradation to define segment border during murine somitogenesis. **Elife**, v. 7, e33068, 2018.

8 ANEXOS

Anexo I: Lista de 485 genes do painel NGS ‘P3’

Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM
AARS	601065	BCKDHB	248611	COL2A1	120140	DUOX2	606759	FKRP	606596	HADHB	143450
ABCD1	300371	BIN1	601248	COL3A1	120180	DYM	607461	FKTN	607440	HBB	141900
ACADM	607008	BMP4	112262	COL5A1	120215	DYNC2H1	603297	FLNA	300017	HERC2	605837
ACADVL	609575	BMPR1A	601299	COL5A2	120190	DYRK1A	600855	FLNB	603381	HES7	608059
ACAT1	607809	BRAF	164757	COL6A1	120220	DYSF	603009	FLNC	102565	HLCS	609018
ACP5	171640	BRCA1	113705	COL6A2	120240	EDN1	131240	FMR1	309550	HMGCL	613898
ACTA1	102610	BRCA2	600185	COL6A3	120250	EFNB1	300035	FOLR1	136430	HNRNPDL	607137
ACTB	102630	BRIP1	605882	COL9A1	120210	EGR2	129010	FOXE1	602617	HRAS	190020
ACTG1	102560	BTD	609019	COL9A2	120260	EIF2AK3	604032	FOXG1	164874	HSPB1	602195
ADA	608958	CACNA1S	114208	COL9A3	120270	EIF4A3	608546	FOXP2	605317	HSPB8	608014
ADAMTS18	607512	CANT1	613165	COMP	600310	ELN	130160	FTCD	606806	IDUA	252800
ADAMTS2	612277	CAPN3	114240	COQ2	609825	EMD	300384	FUS	137070	IFT80	611177
ADCK3	.	CAV3	601253	COQ9	612837	EPCAM	185535	FXN	606829	IL11RA	600939
AFG3L2	604581	CBS	613381	CP	117700	EPHA3	179611	GADD45G	604949	IL2RG	308380
ALDH3A2	609523	CD3D	186790	CPS1	608307	ERF	611888	GALNS	612222	IL7R	146661
ALDH7A1	107323	CD3E	186830	CREBBP	600140	ERG	165080	GALNT1	602273	IRF6	607199
ALPL	171760	CDH1	192090	CRISPLD2	612434	ETHE1	608451	GALNT12	610290	ITGA7	600536
ALX1	601527	CDH2	114020	CRTAP	605497	EVC	604831	GALT	606999	IVD	607036
ALX3	606014	CDH23	605516	CRYAA	123580	EVC2	607261	GAMT	601240	JAG1	601920
ALX4	605420	CDH7	605806	CRYAB	123590	EXT1	608177	GARS	600287	JAK3	600173
AMN	605799	CDH8	603008	CTDP1	604927	FAF1	604460	GATM	602360	JAM2	606870
ANO5	608662	CDK4	123829	CTNNB1	116806	FAH	613871	GCDH	608801	KATNAL2	614697
APC	611731	CDKL5	300203	CTSK	601105	FANCA	607139	GCH1	600225	KBTD13	613727
APTX	606350	CDKN2A	600160	CUBN	602997	FANCC	613899	GDAP1	606598	KCNE1	176261
ARG1	608313	CFL1	601442	CUL7	609577	FANCD2	613984	GDF5	601146	KIF22	603213
ARHGAP29	610496	CFTR	602421	CYP21A2	613815	FANCE	613976	GDF6	601147	KIF5A	602821
ARX	300382	CHEK2	604373	CYP27A1	606530	FANCF	613897	GIF	609342	KRAS	190070
ASL	608310	CHST14	608429	CYP7B1	603711	FANCG	602956	GJA1	121014	L1CAM	308840
ASPA	608034	CHST3	603799	DAG1	128239	FBLN5	604580	GJB1	304040	LAMA2	156225
ASS1	603470	CLCN1	118425	DBT	248610	FBN1	134797	GJB2	121011	LAMP2	309060
ATL1	606439	CLDN14	605608	DCI1RE1C	605988	FECH	612386	GJB3	603324	LARGE1	603590
ATM	607585	CLPTM1L	612585	DDR2	191311	FGD4	611104	GJB6	604418	LEMD3	607844
ATP7A	300011	CLRN1	606397	DES	125660	FGF8	600483	GLB1	611458	LFNG	602576
ATP7B	606882	CNTNAP2	604569	DHCR24	606418	FGFR1	136350	GLI2	165230	LIFR	151443
ATR	601215	COL10A1	120110	DHCR7	602858	FGFR2	176943	GLI3	165240	LIPI	609252
AXIN2	604025	COL11A1	120280	DLAT	608770	FGFR3	134934	GNAI3	139370	LITAF	603795
B4GALT6	604017	COL11A2	120290	DLL3	602768	FHL1	300163	GNAS	139320	LMAN1	601567
BAP1	603089	COL18A1	120328	DMD	300377	FIG4	609390	GRHL3	608317	LMBRD1	612625
BARD1	601593	COL1A1	120150	DNAJB6	611332	FKBP10	607063	GRIK1	138245	LMNA	150330
BCKDHA	608348	COL1A2	120160	DNM2	602378	FKBP14	614505	HADHA	600890	LRP5	603506

(continua)

Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM
LRSAM1	610933	MTMR2	603557	PAX8	167415	QDPR	612676	SHANK3	606230	TGFBR1	190181
LZTR1	600574	MTR	156570	PCBD1	126090	RAB23	606144	SHH	600725	TGFBR2	190182
MAP2K1	176872	MTRR	602568	PCCA	232000	RAB7A	602298	SHOC2	602775	TGIF1	602630
MATN3	602109	MUT	609058	PCCB	232050	RABEP2	611869	SHOX	312865	TH	191290
MBD2	603547	MUTYH	604933	PCDH15	605514	RAD50	604040	SIX3	603714	TMC1	606706
MBD5	611472	MYC	190080	PDGFRA	173490	RAD51	179617	SLC17A6	607563	TMIE	607237
MC2R	607397	MYO6	600970	PDHA1	300502	RAD51C	602774	SLC19A3	606152	TMPRSS15	606635
MCCC1	609010	MYO7A	276903	PDHX	608769	RAD51D	602954	SLC22A5	603377	TMPRSS3	605511
MCCC2	609014	MYOT	604103	PDSS1	607429	RAF1	164760	SLC25A13	603859	TNFRSF11A	603499
MECP2	300005	NAGS	608300	PDSS2	610564	RAG1	179615	SLC25A15	603861	TP53	191170
MED25	610197	NBN	602667	PFKL	171860	RAG2	179616	SLC26A2	606718	TP63	603273
MEGF10	612453	NDN	602117	PHF8	300560	RAI1	607642	SLC26A4	605646	TPM2	190990
MEN1	613733	NDRG1	605262	PHGDH	606879	RARA	180240	SLC2A1	138140	TPM3	191030
MESPP2	605195	NDUFV2	600532	PLCB4	600810	RBBP8	604124	SLC5A5	601843	TPO	606765
MFN2	608507	NECTIN1	600644	PLEC	601282	RECQL4	603780	SMAD4	600993	TRAPPC2	300202
MID1	300552	NEFL	162280	PLOD1	153454	REEP1	609139	SMARCA1	606622	TRIM32	602290
MIR1206	.	NF1	613113	PMP22	601097	RET	164761	SNAP29	604202	TRIP11	604505
MIR1207	.	NIPA1	608145	PMS2	600259	RGMA	607362	SNRPN	182279	TRPC6	603652
MIR1208	.	NIPBL	608667	POGZ	614787	RIT1	609591	SOD1	147450	TRPS1	604386
MIR140	611894	NKX3-2	602183	POLR1C	610060	RMRP	157660	SOS1	182530	TRPV4	605427
MIR200B	612091	NOG	602991	POLR1D	613715	ROR2	602337	SOS2	601247	TSC1	605284
MLH1	120436	NOL8	611534	POMGNT1	606822	RPS27L	612055	SOST	605740	TSC2	191092
MMAA	607481	NOTCH3	600276	POMT1	607423	RITN	610436	SOX9	608160	TSHB	188540
MMAB	607568	NPC1	607623	POMT2	607439	RUNX1	151385	SP7	606633	TSHR	603372
MMACHC	609831	NPC2	601015	POR	124015	RUNX2	600211	SPAST	604277	TSHZ1	614427
MMADHC	611935	NPR2	108961	POTED	607549	RYR1	180901	SPG11	610844	TSPEAR	612920
MMP13	600108	NRAS	164790	PPIB	123841	SALL1	602218	SPG7	602783	TWIST1	601622
MMP9	120361	NSD1	606681	PQBP1	300463	SATB2	608148	SPR	182125	UBE3A	601623
MOC51	603707	NT5C3A	606224	PRKAR1A	188830	SBD5	607444	SRY	480000	USH1C	605242
MOC52	603708	NTNG1	608818	PRPS1	311850	SBF2	607697	STK11	602216	USH1G	607696
MPZ	159440	OFD1	300170	PRSS1	276000	SCN4A	603967	SUMO1	601912	USH2A	608400
MRAP	609196	OGN	602383	PRX	605725	SCO2	604272	TARDBP	605078	USHBP1	611810
MRE11	600814	OTC	300461	PSAT1	610936	SELENON	606210	TBX1	602054	USP25	.
MSH2	609309	OTOF	603681	PSPH	172480	SERPINH1	600943	TBX22	300307	VAPB	605704
MSH3	600887	OXC1	601424	PTCH1	601309	SETBP1	611060	TCAP	604488	VHL	608537
MSH6	600678	P3H1	610339	PTEN	601728	SETX	608465	TCF12	600480	WHRN	607928
MSTN	601788	PABPN1	602279	PTH1R	168468	SGCA	600119	TCF4	602272	WNT3	165330
MSX1	142983	PAFAH1B1	601545	PTPN11	176876	SGCB	600900	TCOF1	606847	XRCC3	600675
MSX2	123101	PAH	612349	PTS	612719	SGCD	601411	TERT	187270	ZAP70	176947
MTHFR	607093	PALB2	610355	PVT1	165140	SGCG	608896	TFAP2A	107580	ZIC2	603073
MTM1	300415	PAPSS2	603005	PYGM	608455	SH3BP2	602104	TG	188450		

(conclusão)

Anexo II: Lista de 496 genes do painel NGS ‘P4’

Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM
AARS	601065	BIN1	601248	COL1A2	120160	DNM2	602378	FKRP	606596	HBB	141900
ABCD1	300371	BMP1	112264	COL2A1	120140	DUOX2	606759	FKTN	607440	HES7	608059
ACADM	607008	BMP4	112262	COL3A1	120180	DYM	607461	FLNA	300017	HLCS	609018
ACADVL	609575	BMPRI1A	601299	COL5A1	120215	DYNC2H1	603297	FLNB	603381	HMGCL	613898
ACAT1	607809	BRAF	164757	COL5A2	120190	DYRK1A	600855	FLNC	102565	HNRNPDL	607137
ACPF5	171640	BRCA1	113705	COL6A1	120220	DYSF	603009	FMR1	309550	HRAS	190020
ACTA1	102610	BRCA2	600185	COL6A2	120240	EDN1	131240	FOLR1	136430	HSPB1	602195
ACTB	102630	BRIP1	605882	COL6A3	120250	EFNB1	300035	FOXE1	602617	HSPB8	608014
ACTG1	102560	BTBD	609019	COL9A1	120210	EGR2	129010	FOXG1	164874	IDUA	252800
ADA	608958	CACNA1S	114208	COL9A2	120260	EIF2AK3	604032	FOXP2	605317	IFITM5	614757
ADAMTS18	607512	CANT1	613165	COL9A3	120270	EIF4A3	608546	FTCD	606806	IFT80	611177
ADAMTSL2	612277	CAPN3	114240	COMP	600310	ELN	130160	FUS	137070	IL11RA	600939
ADCK3	.	CAV3	601253	COQ2	609825	EMD	300384	FXN	606829	IL2RG	308380
AFG3L2	604581	CBL	165360	COQ9	612837	EPCAM	185535	GADD45G	604949	IL7R	146661
ALDH3A2	609523	CBS	613381	CP	117700	EPHA3	179611	GALNS	612222	IRF6	607199
ALDH7A1	107323	CD3D	186790	CPS1	608307	ERF	611888	GALNT1	602273	ITGA7	600536
ALPL	171760	CD3E	186830	CREB3L1	616215	ERG	165080	GALNT12	610290	IVD	607036
ALX1	601527	CDC45	603465	CREBBP	600140	ETHE1	608451	GALT	606999	JAG1	601920
ALX3	606014	CDH1	192090	CRISPLD2	612434	EVC	604831	GAMT	601240	JAK3	600173
ALX4	605420	CDH2	114020	CRTAP	605497	EVC2	607261	GARS	600287	JAM2	606870
AMN	605799	CDH23	605516	CRYAA	123580	EXT1	608177	GATM	602360	JMJD1C	604503
ANOS	608662	CDH7	605806	CRYAB	123590	FAF1	604460	GCDH	608801	KBTBD13	613727
APC	611731	CDH8	603008	CTDP1	604927	FAH	613871	GCH1	600225	KCNE1	176261
APTIX	606350	CDK4	123829	CTNNB1	116806	FANCA	607139	GDAP1	606598	KIF22	603213
ARG1	608313	CDKL5	300203	CTSK	601105	FANCC	613899	GDF5	601146	KIF5A	602821
ARHGAP29	610496	CDKN2A	600160	CUBN	602997	FANCD2	613984	GDF6	601147	KRAS	190070
ARX	300382	CFL1	601442	CUL7	609577	FANCE	613976	GIF	609342	L1CAM	308840
ASL	608310	CFTR	602421	CYP21A2	613815	FANCF	613897	GJA1	121014	LAMA2	156225
ASPA	608034	CHD8	610528	CYP27A1	606530	FANCG	602956	GJB1	304040	LAMP2	309060
ASS1	603470	CHEK2	604373	CYP7B1	603711	FBLN5	604580	GJB2	121011	LARGE1	603590
ATL1	606439	CHST14	608429	DAG1	128239	FBN1	134797	GJB3	603324	LEMD3	607844
ATM	607585	CHST3	603799	DBT	248610	FECH	612386	GJB6	604418	LFNG	602576
ATP7A	300011	CLCN1	118425	DCLRE1C	605988	FGD4	611104	GLB1	611458	LIFR	151443
ATP7B	606882	CLDN14	605608	DDR2	191311	FGF8	600483	GLI2	165230	LIPI	609252
ATR	601215	CLPTM1L	612585	DES	125660	FGFR1	136350	GLI3	165240	LITAF	603795
AXIN2	604025	CLRN1	606397	DHCR24	606418	FGFR2	176943	GNAI3	139370	LMAN1	601567
B4GALT6	604017	COL10A1	120110	DHCR7	602858	FGFR3	134934	GNAS	139320	LMBRD1	612625
BAP1	603089	COL11A1	120280	DLAT	608770	FHL1	300163	GRHL3	608317	LMNA	150330
BARD1	601593	COL11A2	120290	DLL3	602768	FIG4	609390	GRIK1	138245	LRP5	603506
BCKDHA	608348	COL18A1	120328	DMD	300377	FKBP10	607063	HADHA	600890	LRSAM1	610933
BCKDHB	248611	COL1A1	120150	DNAJB6	611332	FKBP14	614505	HADHB	143450	LZTR1	600574

(continua)

Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM
MAP2K1	176872	MTRR	602568	PCCA	232000	RABEP2	611869	SIX3	603714		
MAP2K2	601263	MUT	609058	PCCB	232050	RAD50	604040	SLC19A3	606152	TH	191290
MATN3	602109	MUTYH	604933	PCDH15	605514	RAD51	179617	SLC22A5	603377	TMC1	606706
MBD2	603547	MYC	190080	PDGFRA	173490	RAD51C	602774	SLC25A13	603859	TMEM38B	611236
MBD5	611472	MYO6	600970	PDHA1	300502	RAD51D	602954	SLC25A15	603861	TMIE	607237
MC2R	607397	MYO7A	276903	PDHX	608769	RAF1	164760	SLC26A2	606718	TMPRSS15	606635
MCCC1	609010	MYOT	604103	PDSS1	607429	RAG1	179615	SLC26A4	605646	TMPRSS3	605511
MCCC2	609014	NAGS	608300	PDSS2	610564	RAG2	179616	SLC2A1	138140	TNFRSF11A	603499
MECP2	300005	NBN	602667	PFKL	171860	RAI1	607642	SLC5A5	601843	TP53	191170
MED25	610197	NDN	602117	PHF8	300560	RARA	180240	SMAD4	600993	TP63	603273
MEGF10	612453	NDRG1	605262	PHGDH	606879	RBBP8	604124	SMARCA11	606622	TPM2	190990
MEN1	613733	NDUFV2	600532	PLCB4	600810	RECQL4	603780	SNAP29	604202	TPM3	191030
MESP2	605195	NECTIN1	600644	PLEC	601282	REEP1	609139	SNRPN	182279	TPO	606765
MFN2	608507	NEFL	162280	PLOD1	153454	RET	164761	SOD1	147450	TRAPPC2	300202
MID1	300552	NF1	613113	PLOD2	601865	RIT1	609591	SOS1	182530	TRIM32	602290
MIR1206	.	NF2	607379	PLS3	300131	RMRP	157660	SOS2	601247	TRIP11	604505
MIR1207	.	NIPA1	608145	PMP22	601097	ROR2	602337	SOST	605740	TRPC6	603652
MIR1208	.	NIPBL	608667	PMS2	600259	RPS27L	612055	SOX9	608160	TRPS1	604386
MIR140	611894	NKX3-2	602183	POLR1C	610060	RTTN	610436	SP7	606633	TRPV4	605427
MIR200B	612091	NOG	602991	POLR1D	613715	RUNX1	151385	SPARC	182120	TSC1	605284
MLH1	120436	NOL8	611534	POMGNT1	606822	RUNX2	600211	SPAST	604277	TSC2	191092
MMAA	607481	NOTCH3	600276	POMT1	607423	RYR1	180901	SPG11	610844	TSHB	188540
MMAB	607568	NPC1	607623	POMT2	607439	SALL1	602218	SPG7	602783	TSHR	603372
MMACHC	609831	NPC2	601015	POR	124015	SATB2	608148	SPR	182125	TSHZ1	614427
MMADHC	611935	NPR2	108961	PIIB	123841	SBD5	607444	SPRED1	609291	TSPEAR	612920
MMP13	600108	NRAS	164790	PQBP1	300463	SBF2	607697	SRY	480000	TWIST1	601622
MMP9	120361	NSD1	606681	PRKAR1A	188830	SCN4A	603967	STK11	602216	UBE3A	601623
MOC51	603707	NT5C3A	606224	PRPS1	311850	SCO2	604272	SUMO1	601912	USH1C	605242
MOC52	603708	NTNG1	608818	PRSS1	276000	SELENON	606210	TARDBP	605078	USH1G	607696
MPZ	159440	OFD1	300170	PRX	605725	SERPINF1	172860	TBX1	602054	USH2A	608400
MRAP	609196	OGN	602383	PSAT1	610936	SERPINH1	600943	TBX22	300307	USHBP1	611810
MRE11A	.	OTC	300461	PSPH	172480	SETBP1	611060	TBX6	602427	USP25	.
MSH2	609309	OTOF	603681	PTCH1	601309	SETX	608465	TCAP	604488	VAPB	605704
MSH3	600887	OXCT1	601424	PTEN	601728	SGCA	600119	TCF12	600480	VHL	608537
MSH6	600678	P3H1	610339	PTH1R	168468	SGCB	600900	TCF4	602272	WHRN	607928
MSTN	601788	PABPN1	602279	PTPN11	176876	SGCD	601411	TCOF1	606847	WNT1	164820
MSX1	142983	PAFAH1B1	601545	PTS	612719	SGCG	608896	TERT	187270	WNT3	165330
MSX2	123101	PAH	612349	PVT1	165140	SH3BP2	602104	TFAP2A	107580	XRCC3	600675
MTHFR	607093	PALB2	610355	PYGM	608455	SHANK3	606230	TG	188450	ZAP70	176947
MTM1	300415	PAPSS2	603005	QDPR	612676	SHH	600725	TGFBR1	190181	ZIC1	600470
MTMR2	603557	PAX8	167415	RAB23	606144	SHOC2	602775	TGFBR2	190182	ZIC2	603073
MTR	156570	PCBD1	126090	RAB7A	602298	SHOX	312865	TGIF1	602630		

(conclusão)

Anexo III: Lista de genes das vias Notch e Wnt obtida na base KeggPathway.

Genes da via Notch		Genes da via Wnt				
DLL3	MAML1	PORCN	RNF43	TCF7L1	RBX1	NFATC2
DLL1	CREBBP	WNT1	ZNRF3	TCF7L2	GPC4	NFATC3
DLL4	EP300	WNT2	FZD1	LEF1	ROR1	NFATC4
JAG1	KAT2B	WNT2B	FZD7	CTNNBIP1	ROR2	SMAD3
JAG2	KAT2A	WNT3	FZD2	CBY1	RYK	
MFNG	SNW1	WNT3A	FZD3	CHD8	VANGL2	
LFNG	CTBP1	WNT4	FZD4	SOX17	VANGL1	
RFNG	CTBP2	WNT5A	FZD5	CTBP1	PRICKLE1	
NOTCH1	NCOR2	WNT5B	FZD8	CTBP2	PRICKLE2	
NOTCH2	CIR1	WNT6	FZD6	CTNND2	PRICKLE4	
NOTCH3	HDAC1	WNT7A	FZD10	CREBBP	PRICKLE3	
NOTCH4	HDAC2	WNT7B	FZD9	EP300	INVS	
RBPJL	ATXN1L	WNT8A	LRP5	RUVBL1	DAAM1	
RBPJ	ATXN1	WNT8B	LRP6	SMAD4	DAAM2	
HES1		WNT9A	BAMBI	MAP3K7	RHOA	
HES5		WNT9B	CSNK1E	NLK	ROCK2	
HEYL		WNT10B	TPTEP2- CSNK1E	MYC	RAC1	
HEY1		WNT10A	DVL3	JUN	RAC2	
HEY2		WNT11	DVL2	FOSL1	RAC3	
PTCRA		WNT16	DVL1	CCND1	MAPK8	
DVL3		CER1	FRAT1	CCND2	MAPK10	
DVL2		NOTUM	FRAT2	CCND3	MAPK9	
DVL1		WIF1	CSNK2A1	CCN4	PLCB1	
NUMB		SERPINF1	CSNK2A2	PPARD	PLCB2	
NUMBL		SOST	CSNK2A3	MMP7	PLCB3	
DTX2		DKK1	CSNK2B	PSEN1	PLCB4	
DTX3L		DKK2	NKD1	PRKACA	CAMK2A	
DTX1		DKK4	NKD2	PRKACB	CAMK2D	
DTX3		SFRP1	CXXC4	PRKACG	CAMK2B	
DTX4		SFRP2	SEN2	TP53	CAMK2G	
ADAM17		SFRP4	GSK3B	SIAH1	PPP3CA	
PSEN1		SFRP5	CTNNB1	CACYBP	PPP3CB	
PSEN2		RSP01	AXIN1	SKP1	PPP3CC	
PSENE1		RSP02	AXIN2	TBL1X	PPP3R1	
NCSTN		RSP03	APC	TBL1Y	PPP3R2	
APH1A		RSP04	APC2	TBL1XR1	PRKCA	
APH1B		LGR4	CSNK1A1L	BTRC	PRKCB	
MAML3		LGR5	CSNK1A1	FBXW11	PRKCG	
MAML2		LGR6	TCF7	CUL1	NFATC1	