Wagner Antonio da Rosa Baratela

Estudo genético-clínico das displasias esqueléticas, com enfoque nas osteocondrodisplasias com acometimento do esqueleto axial, associado ao envolvimento epifisário e/ou metafisário

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Dra. Débora Romeo
Bertola

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Baratela, Wagner Antonio da Rosa
Estudo genético-clínico das displasias
esqueléticas, com enfoque nas osteocondrodisplasias
com acometimento do esqueleto axial, associado ao
envolvimento epifisário e/ou metafisário / Wagner
Antonio da Rosa Baratela. -- São Paulo, 2017.
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.
Orientadora: Débora Romeo Bertola.

Descritores: 1.Doenças do desenvolvimento ósseo
2.Aconselhamento genético 3.Análise de sequência de
DNA 4.Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala
5.Genética 6.Genética médica 7.Doenças genéticas
inatas 8.Doenças ósseas/genética

USP/FM/DBD-513/17

Dedicatória

Dedico esta tese aos pacientes e pessoas que convivem com as displasias esqueléticas. Pois lutam e enfrentam obstáculos para vencer em um mundo, literalmente, de gigantes.

Agradecimentos

À minha esposa Andressa, por me ensinar o significado de amor incondicional. Obrigado por sua preciosa ajuda com ótimas ideias, figuras, formatações e, principalmente, por descomplicar o complicado. Sem você, esta tese não existiria.

Aos meus pais, Wagner e Ivani, pelo amor e dedicação. Nos momentos mais difíceis, sempre estiveram um passo a frente, pavimentando o caminho. Às minhas queridas irmãs, Liliane e Paula, pelo companheirismo e carinho, sempre disponíveis para ajudar. Aos meus sobrinhos, Filipe e Clarissa, alegria de nossas vidas.

Ao meu colega de doutorado, Guilherme Yamamoto, pela grande contribuição com as análises moleculares deste trabalho, além das sempre construtivas discussões e ideias.

À Dra. Chong, pelo longo trabalho dedicado à Unidade de Genética do ICr-HC-FMUSP. Obrigado por seus ensinamentos e por me receber de braços abertos para o desenvolvimento desta tese.

Aos médicos assistentes e residentes da Unidade de Genética pela generosa contribuição com a captação dos dados clínicos e radiológicos, fundamentais neste trabalho.

À Dra. Maria Rita Passos-Bueno e à equipe do serviço de sequenciamento do CEGH-CEL, por disponibilizar os equipamentos e processar a grande maioria das análises moleculares realizadas neste trabalho.

Aos inesquecíveis Dr. Steven E. Kopits (*in memoriam*), Dr. João E. G. Thomazelli e Prof. M. Michael Cohen Jr, grandes incentivadores e professores ao longo da minha jornada nas displasias esqueléticas.

Finalmente, à minha orientadora Dra. Débora Bertola, idealizadora deste projeto. Nestes 6 anos de convivência, foram muitos aprendizados ao seu lado, através dos quais, tornei-me um médico geneticista melhor. Obrigado pela amizade, dedicação e paciência.

Sumário

Lista de Siglas.....	vii
Lista de Abreviações	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Quadros.....	xi
Resumo	xiii
Summary.....	xv
1 Introdução.....	17
1.1 Grupos de Displasias Esqueléticas	23
1.1.1 Colágeno do Tipo II (Grupo 2)	23
1.1.2 Colágeno do Tipo XI (Grupo 3)	24
1.1.3 Defeitos de Sulfatação (Grupo 4)	25
1.1.4 Perlecana (Grupo 5)	26
1.1.5 Agrecana (Grupo 6)	27
1.1.6 Filamina e Doenças Relacionadas (Grupo 7)	28
1.1.7 TRPV4 (Grupo 8)	29
1.1.8 Displasia Epifisária Múltipla e Pseudoacondroplasia (Grupo 10).....	29
1.1.9 Displasias Espôndilo-Metafisárias (Grupo 12).....	30
1.1.10 Displasias Espôndilo-Epi-Metafisárias (Grupo 13).....	31
1.1.11 Displasias Espôndilo-Displásticas Graves (Grupo 14).....	32
1.1.12 Displasias Acro-Mesomélicas (Grupo 16).....	33
1.1.13 Displasia Campomélica e Doenças Relacionadas (Grupo 18).....	33
1.1.14 Displasias com Múltiplas Luxações Articulares (Grupo 20).....	34
1.1.15 Doenças de Depósito Lisossômico com envolvimento esquelético (<i>Disostoses Multiplex</i>) (Grupo 27)	35
1.2 Exame Clínico-Genético.....	37
1.3 Estudo Radiológico	39
1.4 Estudo molecular	40
1.4.1 Técnicas de Sequenciamento	40
1.4.1.1 Sequenciamento Sanger	40
1.4.1.2 Sequenciamento de Nova Geração (NGS).....	41
2 Objetivos.....	45
2.1 Objetivo geral	45
2.2 Objetivos específicos	45
3 Casuística e Métodos	46
3.1 Casuística.....	46
3.2 Aspectos Éticos	48
3.3 Análise Clínica	48
3.4 Técnicas Moleculares empregadas	50
3.4.1 Extração de DNA	51
3.4.2 Sequenciamento Sanger	51

3.4.3	Sequenciamento de nova geração (NGS)	51
3.5	Painéis de genes customizados	52
3.6	Captura do exoma completo (WES).....	52
3.7	Preparo das bibliotecas	52
3.8	Sequenciamento NGS.....	53
3.9	Análise de bioinformática.....	54
3.10	Interpretação das variantes	55
3.11	Análise estatística	57
3.12	Escolha do teste genético.....	58
4	Resultados.....	59
4.2	Resultados dos achados radiológicos.....	65
4.2.1	Imagens de achados radiográficos típicos de diversas DE.....	71
4.3	Resultados dos achados genético-moleculares	76
4.1	Descrição dos casos com DE de etiologia desconhecida e casos atípicos.....	82
4.1.1	PCYT1A	82
4.1.2	FN1	86
4.1.3	INPPL1	89
4.1.4	HSPG2	93
4.1.5	ACAN	97
5	Discussão.....	100
5.1	Aspectos Clínico-Radiológicos	100
5.2	Aspectos genético-moleculares	104
5.3	Tipos de mutação por grupo	105
5.3.1	PCYT1A	108
5.3.2	FN1	110
5.3.3	INPPL1	111
5.3.4	HSPG2	115
5.3.5	ACAN	119
6	Conclusões.....	122
7	Anexos.....	124
8	Referências	132

Lista de Siglas

DE – displasias esqueléticas

DEE – displasia espôndilo-epifisária

DEM – displasia espôndilo-metafisária

DEEM – displasia espôndilo-epi-metafisária

OCD – osteocondrodisplasias

ECLAMC – Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênicas

ACMG – Colégio Americano de Genética Médica e Genômica (American College of Medical Genetics and Genomics)

CEGH-CEL – Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo

CNV - Variação no número de cópias (*Copy Number Variation*)

EUA – Estados Unidos da América

NGS – Sequenciamento de nova geração (Next Generation Sequencing)

OMIM - Banco de dados *Online Mendelian Inheritance in Men*

SNV - Variante de nucleotídeo único ou de ponto (*Single Nucleotide Variant*)

WES – Sequenciamento do exoma completo (Whole-exome sequencing)

WGS – Sequenciamento do genoma completo (Whole-genome sequencing)

Lista de Abreviações

Comp. - Composto

Hemi. – Hemizigoto

Het. – Heterozigoto

Homo. – Homozigoto

Lista de Figuras

Figura 1: Protocolo de atendimento e investigação dos pacientes com DE. 49

Figura 2: Algoritmo de abordagem molecular inicial, de acordo com o sistema de categorização (I-IV). 58

Figura 3: Radiografias de pelve AP: A (paciente F1 aos 3 anos, DEEM tipo Strudwick): Atraso de ossificação no pubis e epífises femurais; B (paciente F18 aos 7 anos, displasia diastrófica): epífises femurais pouco ossificadas e irregulares, em coxa vara, acetábulo irregulares; C (paciente F56 neonato, displasia de Desbuquois): hipercrecimento do trocanter inferior em detrimento do superior na porção proximal dos fêmures, imagem em "chave inglesa"; D (paciente F2 aos 4 anos e 5 meses, DEEC): atraso de ossificação do pubis e cabeças femurais, que são pequenas e multinucleadas; E (paciente F17.2 aos 4 anos e 8 meses, DEE com múltiplas luxações): coxa vara, com epífises femurais achatadas e pequenas; F (paciente F39 aos 10 anos, pseudoacondroplasia): epífises femurais significativamente pequenas e irregulares, com acetábulo irregulares. 71

Figura 4: Radiografias de coluna. A (paciente F1 aos 1 ano e 11m, DEEM do tipo Strudwick): platisspondilia, com corpos vertebrais ovóides, em forma de "pera"; B (paciente F39 aos 11 anos, pseudoacondroplasia): vértebras com irregularidades das PVTs, algumas em "forma de diamante". Protrusões anteriores.; C (paciente F34 aos 4 anos, displasia metatrópica): platisspondilia com cifose importante em transição tóraco-lombar 72

Figura 5: Radiografias de coluna panorâmica AP e P. A (paciente F21 aos 15 anos, com braquiolmia recessiva): Evidencia-se platisspondilia moderada, com irregularidade da PVT; B (paciente F36.1 aos 27 anos, com displasia metatrópica): Observa-se platisspondilia, com largura do corpo vertebral (em AP) maior que a distância entre os pedículos. Platisspondilia com irregularidades da PVT pode ser vista em P; C (paciente F53 aos 3 anos, com displasia acromesomélica tipo Maroteaux): Visualizam-se vértebras ovóides, com platisspondilia e protrusão anterior em transição tóraco-lombar; D (paciente F4 aos 10 anos, com displasia espândilo-periférica): Cifoescoliose com hiperlordose pode ser observado nas duas incidências, respectivamente. Os corpos vertebrais são platisspondílicos com irregularidade da PVT; E (paciente F57 aos 18 anos, com MPS tipo IV): Hiperlordose pode ser observada em P. Os corpos vertebrais lombares apresentam ossificação deficiente na porção súpero-anterior, em formato de "gancho"; F (paciente F46 aos 15 anos, com DEE forma tarda): Observa-se a presença de biconvexidade nos corpos vertebrais lombares. 73

Figura 6: Radiografias de MMII e mãos em AP. A (paciente F39 aos 19 anos, pseudoacondroplasia): geno recurvatum, com irregularidades epifisárias e alargamento metafisário; B (paciente F31 aos 1 ano e 6 meses, DEM tipo Kozlowski): ossos encurtados, com alargamento metafisário e epífises pequenas; C (paciente F6 aos 3 anos e 8 meses, DEEM tipo Strudwick): atraso de ossificação em pubis e epífises femurais proximais, metáfises alargadas e irregulares, e epífises pequenas nos joelhos; D (paciente F16 aos 4 anos, DEE com múltiplas luxações): luxação de joelho E, com epífises achatadas e irregulares; E (paciente F18 aos 7 anos, displasia diastrófica): falanges curtas e alargadas, primeiro metacarpo curto, com polegares subluxados

(polegar "do caroneiro"), alargamento metafisário em ulna e rádio distais; F (paciente F36.1 aos 27 anos, DEM - *TRPV4*): falanges e metacarpos encurtados, com bases alargadas; G (paciente F40 aos 9 anos, pseudoacodroplasia): alargamento e irregularidade metafisária em rádio e ulna distais, metacarpos e falanges. Epífises pequenas e irregulares. Ossos do carpo são pequenos e irregulares..... 74

Figura 7: Radiografias de coluna AP + P, pelve e MMII AP, MMSS e mãos AP. Fileira A (paciente F35.1 aos 11 meses, com DEM tipo Kozlowski): Observa-se cifose tóraco-lombar, platisspondilia com protrusão anterior, pedículos posicionados medialmente. Ossos tubulares encurtados com metáfises alargadas e irregulares. Os ilíacos são hipoplásicos e quadrados, com acetábulos horizontalizados e coxa vara. As mãos apresentam falanges encurtadas com metáfises alargadas; Fileira B (paciente F35.2, pai de F35.1, aos 36 anos, com o mesmo diagnóstico): Nota-se a progressão da cifoescoliose tóraco-lombar, com corpos vertebrais de altura diminuída, associados a alterações osteodegenerativas. Cabeças femurais são achatadas e irregulares, com acetábulo horizontalizado e coxa vara. Ossos tubulares são encurtados, com alargamento metafisário. As falanges e metacarpos são encurtados com bases alargadas. 75

Figura 8: Radiografias de coluna total P + AP, pelve, fêmures, tíbias e fíbulas, antebraço e mãos em AP. A: paciente F44.2 aos 4 meses, B: paciente F43.1 aos 11 anos e C: paciente F44.1 aos 17 anos. Observa-se platisspondilia com vértebras ovóides (F44.2) e protrusão anterior em (F43.1). Cifoescoliose pode ocorrer em indivíduos mais velhos (F44.1). Na pelve, evidencia-se estreitamento do nó isquiático é observado (F44.2), assim como coxa vara (F43.1 e F44.1). Alargamento com irregularidades metafisárias ser observado nos 3 pacientes. Espículas laterais e mediais podem ser vistas nos fêmures distais. Deformidade progressiva dos MMII, em geno varo, pode ser evidenciada ao comparar os indivíduos de idades diferentes. As mãos mostram encurtamento discreto de metacarpos e falanges. 83

Figura 9: Heredograma da família F43 à E, mostrando consanguinidade parental e a segregação da mutação de maneira autossômica recessiva. Cromatograma do sequenciamento mostrando a mutação c.968dupG (Ser323Argfs*38), identificada na família F43 (modificado de Yamamoto et al., 2014). 85

Figura 10: Heredograma da família F44 à E, mostrando consanguinidade parental e a segregação da mutação de maneira autossômica recessiva. Cromatograma do sequenciamento, mostrando a mutação c.385G>A (Glu129Lys), identificada na família F44 (modificado de Yamamoto et al., 2014). 85

Figura 11: Paciente F45, estudo radiográfico aos 3 anos e 9 meses; A e B (coluna total AP + P): Cifoescoliose, corpos vertebrais apresentam discreta platisspondilia, com aparente biconvexidade de PVT; C e D: Epífises preservadas. Alargamento metafisário, com irregularidades marginais (*corner fractures*), mais evidentes nas metáfises proximais das tíbias; E e F: Irregularidades metafisárias marginais em rádio e ulna distais e úmero proximal. 87

Figura 12: Paciente F33.1, estudo radiográfico aos 17 anos e 7 meses; A (pelve AP): Coxa vara grave, com colo femural curto e cabeça femural irregular. Observa-se báscula de bacia; B (mãos AP): falanges e metacarpos discretamente encurtados; C (coluna

tóraco-lombar P): altura dos corpos vertebrais preservada, com irregularidade da PVT; D (joelhos e pernas AP c/carga): Irregularidades metafisárias marginais (residuais) em fêmures distais e tíbias proximais. Ossos longos discretamente encurtados e incongruência discreta do joelho D. 88

Figura 13: Paciente F51 estudo radiográfico aos 7 meses, A tórax e MMSS, AP: Observa-se ossos tubulares encurtados com alargamento metafisário, tórax curto com vértebras torácicas finas e pouco ossificadas. As falanges e metacarpos das mãos são significativamente curtos; B pés, AP: Metatarsos e falanges encurtados e pouco ossificados, com alargamento metafisário; C coluna panorâmica, P: platisspondilia importante, com vértebras pouco ossificadas; D: pelve e MMII, AP: ilíaco, ísquio e pubis pequenos e pouco ossificados. Ossos tubulares são encurtados, sem ossificação de epífises. 90

Figura 14: Paciente F52 estudo radiográfico aos 12 anos e 10 meses, A coluna, AP + P: Observa-se platisspondilia, com protrusão anterior na transição tóraco-lombar; B pelve, AP: Colo femural é curto, com coxa vara e achatamento das epífises femurais proximais; C e E MMII, AP: Discreta irregularidade metafisária, com epífises de tamanho discretamente diminuído; D: MMSS, AP: Úmero, rádio e ulna discretamente encurtados; F mãos e pé D, AP: Metacarpos, metatarsos e falanges encurtados, de maneira mais evidente nas mãos. 91

Figura 15: Resultado do exoma do paciente F52. Imagem do arquivo BAM no IGV da variante patogênica c.2849_2862del (p.Ala950Glyfs*14) no exon 25 do gene *INPPL1*, que promove um novo codon de parada no próximo exon, o 26..... 92

Figura 16: Paciente F27 estudo radiográfico aos 2 anos e 11 meses, A (coluna tóraco-lombar, AP): Observa-se cifoescoliose, com vértebras de tamanhos diferentes e vestígios de fendas sagitais; B (coluna tóraco-lombar P) Corpos vertebrais de diferentes alturas, alguns evidenciando fendas coronais, compatível com anisosspondilia; C (pelve, fêmures e joelhos, AP): Atraso de ossificação em fêmures proximais, com epífises pequenas e multinucleadas. Existe irregularidade acetabular, com espículas súpero-laterais. Os fêmures são encurtados e encurvados, com metáfises alargadas e irregulares, e epífises achatadas e irregulares. O mesmo é observado nas tíbias proximais. 94

Figura 17: Paciente F3 estudo radiográfico com mês de vida (C) e 1 ano (A,B,C), A (coluna tóraco-lombar, P): Corpos vertebrais de diferentes alturas, com uma vértebra ovóide na transição tóraco-lombar, compatível com anisosspondilia; B (pelve e MMII, AP): Atraso de ossificação em fêmures proximais, com epífises pequenas e multinucleadas. Os ossos tubulares são encurtados e encurvados, com metáfises alargadas e epífises pequenas e irregulares; C (mão D, AP): falanges encurtadas com alargamento metafisário; D (MSD, AP): úmero, rádio e ulna encurtados com alargamento metafisário. 95

Figura 18: Paciente F28 estudo radiográfico com 4 anos e 3 meses. A (coluna tóraco-lombar, AP e P): Corpos vertebrais com irregularidade discreta da PVT, com resquícios de fendas coronais em algumas vértebras; B (MMSS, AP): Sem alterações epifisárias ou metafisárias significativas; C (pelve e MMII, AP):colo femural curto com sua epífise discretamente achatada, as metáfises dos fêmures distais e tíbias proximais são discretamente alargadas e irregulares; D (pelve, AP): colos femurais curtos com suas

epífises discretamente achatadas; E e F: (mãos e pés AP): Evidencia-se avanço da idade óssea através da ossificação dos ossos do carpo e epífises. Falanges são encurtadas, com alargamento metafisário. 97

Figura 19: Imagem do arquivo BAM visualizado através do IGV, mostrando a variante intrônica chr15:89.414.577C>A no gene *ACAN*. 99

Figura 20: A. Figura esquemática, representando a enzima CCT A, mostrando os resíduos em que encontram-se as mutações identificadas nas famílias F43 e F44 (em vermelho), assim como as variantes já reportadas em doenças associadas ao *PCYT1A* por Hoover-Fong et al. 2014 (em azul) e Testa et al. 2017 (em verde). B. Tabela com as mesmas variantes e suas posições no cDNA. 109

Figura 21: Esquema representando as mutações já descritas em *INPPL1*, seus respectivos éxons e localização nos resíduos afetados na proteína inositol polifosfato fosfatase-like 1. 113

Figura 22: Diagrama das variantes em *HSPG2*, encontradas em pacientes com síndrome de Schwartz-Jampel tipo 1 (acima da proteína) e com displasias dissegmentares, displasia de Silverman-Handmaker e displasia de Rolland-Desbuquois, (abaixo da proteína). As variantes dos pacientes F3 e F27 estão em caixas vermelhas. Proteína HSPG2, com seus domínios (I-V); cadeia GAG (glicosaminoglicanos); domínio SEA (*Sperm protein*, Enteroquinase, Agrina); domínio LDL, receptor classe A (*low density lipoprotein*); domínio laminina EGF (*Epidermal Growth Factor*)..... 117

Lista de Quadros

Quadro 1: Nosologia das doenças ósseas genéticas (Bonafé et al., 2015) 19

Quadro 2: Protocolo de investigação de pacientes com DE (modificado de Mortier, 2001)..... 38

Quadro 3: Novos genes associados a DEs, com envolvimento espândilo-epi-metafisário, sem etiologia conhecida entre 2014 e 2017..... 44

Quadro 4: Casuística com identificação, gênero e idade à última avaliação ou idade ao óbito..... 47

Quadro 5: Dados clínicos da casuística de pacientes com displasias de acometimento espândilo-epi-metafisário, com sua hipótese clínico-radiológica inicial, categoria clínica proposta, dados de crescimento e envolvimento dos diferentes segmentos corpóreos .. 59

Quadro 6: Descrição dos principais achados radiológicos dos pacientes com DE de acometimento espândilo-epi-metafisário desta casuística, indicando a hipótese clínico-radiológica inicial e os acometimentos dos diversos segmentos ósseos 65

Quadro 7: Achados genético-moleculares dos pacientes com DE de acometimento espândilo-epi-metafisário desta casuística: hipótese diagnóstica inicial e grupo da

Nosologia, sua confirmação, presença de consanguinidade nos genitores dos probandos, técnica molecular empregada, variantes genéticas causativas dos fenótipos analisados 76

Quadro 8: Resultado da reanálise do sequenciamento do exoma de F45..... 86

Quadro 9 – Resultado da reanálise do sequenciamento do exoma de F33.1..... 89

Quadro 10 – Resultado da reanálise do sequenciamento do exoma de F52..... 92

Quadro 11 – Resultado do sequenciamento do exoma de F3..... 96

Quadro12: Resultado da reanálise do sequenciamento do exoma de F28..... 98

Quadro13: Variantes em *FN1* encontradas em pacientes com DEM do tipo *corner fractures*, incluídas as famílias F45 e F33.1 apresentadas neste estudo..... 110

Quadro 14: Quadro clínico e variantes encontradas nos pacientes com opsismodisplasia e sobrevida acima de 2 anos 113

Quadro 15: Mutações encontradas em *HSPG2*, em pacientes com síndrome de Schwartz-Jampel tipo 1. 117

Quadro 16: Mutações encontradas em *HSPG2* em pacientes com Silverman-Handmaker, incluindo os casos do presente estudo. 118

Resumo

Baratela WAR. Estudo genético-clínico das displasias esqueléticas, com enfoque nas osteocondrodisplasias com acometimento do esqueleto axial, associado ao envolvimento epifisário e/ou metafisário [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUÇÃO: As osteocondrodisplasias constituem um grupo heterogêneo de doenças que comprometem a formação, crescimento e desenvolvimento do sistema esquelético. O diagnóstico definitivo, principalmente nas formas com acometimento de coluna, epífise e/ou metáfise, é desafiador, devido à heterogeneidade genética, raridade de algumas formas específicas e da sobreposição de fenótipos clínico-radiológicos. **OBJETIVOS:** avaliar as características clínico-radiológicas e as bases moleculares de um grupo de pacientes com osteocondrodisplasias com envolvimento do esqueleto axial associado a anomalias epifisárias e/ou metafisárias. **MÉTODOS:** Foram avaliados clínica-radiologicamente 65 pacientes de 58 famílias (com mediana de idade de 9 anos e 2 meses) com osteocondrodisplasias de acometimento espôndilo-epi-metafisários pertencentes a 15 diferentes grupos da Nosologia de anomalias ósseas genéticas. Os pacientes foram classificados em cinco categorias (I,IIA,IIB,III,IV), levando-se em consideração a certeza do diagnóstico de uma determinada displasia esquelética pelos aspectos clínico-radiológicos (I,IIA,IIB,IV), o conhecimento (I,IIA,IIB) ou não (III,IV) da base molecular e o tamanho/número de éxons a serem analisados. De acordo com esta classificação, um fluxograma foi estabelecido para a decisão de qual técnica de sequenciamento seria empregada: Sanger (I) ou sequenciamento de nova geração, sob a forma de um painel de genes customizado (IIA,III) ou do exoma (IIB,III,IV). **RESULTADOS:** dentre os 64 pacientes analisados por um teste molecular, variantes consideradas causativas do fenótipo foram encontradas em 61 (95%). De acordo com as categorias estabelecidas, a positividade do teste genético inicial e o número de indivíduos analisados foram: categoria I (13/17), IIA (32/36), IIB (2/2), III (1/3), IV (6/6). Em sete casos

(três na categoria I, dois na categoria IIA e dois na categoria III), nos quais a estratégia molecular inicial não obteve sucesso, testes moleculares adicionais foram realizados como complementação, possibilitando a identificação da base molecular das osteocondrodisplasias em questão. Em um paciente na categoria I e nos dois indivíduos da categoria IIA, nos quais não foi possível identificar uma variante patogênica, nenhum teste genético adicional foi realizado. Dentre os casos com resultados positivos, em um paciente na categoria IIB, o resultado final mudou a hipótese diagnóstica inicial; dois pacientes classificados como IIA e III, o quadro clínico presente era leve, contrastando com o quadro típico descrito nas osteocondrodisplasias causadas por mutações nos genes *INPPL1* e *HSPG2*. No grupo de osteocondrodisplasias sem etiologia conhecida (categoria IV), foram identificadas variantes em três novos genes (*PCYT1A*, *FN1* e *LONP1*). Uma re-análise nos casos negativos permitiu a identificação de mais um paciente com mutação em *FN1*. Mutações novas em genes previamente conhecidos foram encontradas nos genes *COL2A1*, *COL11A1*, *CHST3*, *SLC26A2*, *HSPG2*, *ACAN*, *TRPV4*, *COMP*, *SMARCA1*, *INPPL1*, *NPR2*, *LIFR* e *CANT1*. CONCLUSÕES: o presente estudo mostrou que uma caracterização clínico-radiológica bem elaborada permite uma maior concordância com os testes moleculares. Em algumas situações, a sobreposição fenotípica impediu que o diagnóstico definitivo fosse estabelecido apenas por critérios clínico-radiológicos, exigindo o emprego de testes moleculares adicionais para o correto diagnóstico e, consequentemente, um aconselhamento genético mais preciso. Os achados clínico-radiológicos e moleculares contribuíram para ampliar o espectro fenotípico de algumas osteocondrodisplasias, particularmente aquelas decorrentes de variantes nos genes *HSPG2* e *INPPL1*, além de desvendar as bases genéticas de três osteocondrodisplasias.

Descritores: doenças do desenvolvimento ósseo; aconselhamento genético; análise de sequência de DNA; sequenciamento de nucleotídeos em larga escala; genética; genética médica; doenças genéticas inatas; doenças ósseas/genética;

Summary

Baratela WAR. Genetic-Clinical study of skeletal dysplasias, with a focus on osteochondrodysplasias with the involvement of the axial skeleton, associated with epiphyseal and/or metaphyseal findings [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

INTRODUCTION: Osteochondrodysplasias comprise a heterogeneous group of bone disorders affecting formation, growth, and development of the skeleton. An accurate diagnosis could be challenging due to the genetic heterogeneity, rarity of specific types, and overlapping of clinical and radiographic phenotypes.

OBJECTIVES: to evaluate the clinical and radiographic characteristics, as well as the molecular basis of a group of patients with spondylo-epi and/or metaphyseal osteochondrodysplasias. **METHODS:** Sixty-five patients from 58 families (with a median age of 9 years 2 months) with spondylo-epi-metaphyseal osteochondrodysplasias, from 15 different groups from the Nosology of Genetic Bone Disorders, were enrolled. Patients were classified into five categories (I,IIA,IIB,III,IV), considering the diagnostic certainty of a specific osteochondrodysplasia, based on clinical and radiographic findings (I,IIA,IIB,IV), the previous knowledge (I,IIA,IIB), or not (III,IV) of the molecular basis, as well as, the size/number of exons to be tested.

According to this classification, a flowchart was established to aid on the molecular testing strategy: Sanger sequencing (I), or next generation sequencing, at the form of a custom targeted gene panel (IIA,III), or exome sequencing (IIB,III,IV).

RESULTS: Phenotype causing variants were found in 61 out of 64 patients (95%). Based on the category system described above, the initial molecular testing positivity was: category I (13/17), IIA (32/36), IIB (2/2), III (1/3), and IV (6/6). In seven cases (three in category I, two in category IIA, and two in category III), additional genetic tests applied were able to find the causative mutation, when the initial testing strategy was not successful. For one patient in category I and two in category IIA, in whose no pathogenic mutation was found, no further molecular studies were performed. Among the positive cases, one patient in category IIB had his former clinical diagnosis changed through the molecular testing; two patients from categories IIA and III showed a milder phenotype, in contrast to the expected clinical

findings in *INPPL1* and *HSPG2* osteochondrodysplasias. The molecular basis of three different osteochondrodysplasias (category IV) was unraveled by this study (genes *PCYT1A*, *FN1* e *LONP1*). A re-analysis of the negative cases allowed the identification of another patient harboring mutation in *FN1*. Novel variants were found in previously known genes: *COL2A1*, *COL11A1*, *CHST3*, *SLC26A2*, *HSPG2*, *ACAN*, *TRPV4*, *COMP*, *SMARCAL1*, *INPPL1*, *NPR2*, *LIFR*, and *CANT1*. CONCLUSIONS: The present study showed that a well-elaborated clinical-radiological characterization allows greater correspondence with the molecular testing. In some cases, phenotypic overlap prevented the definitive diagnosis from being established only by clinical-radiological criteria, requiring the use of additional molecular tests for the correct diagnosis, and consequently, a more accurate genetic counseling. The clinical-radiographic, as well as the molecular findings, contributed to expand the clinical phenotype in certain groups, especially the variants found in patients with *HSPG2* and *INPPL1* osteochondrodysplasias, besides unraveling the molecular basis of three osteochondrodysplasias.

Descriptors: bone diseases, developmental; genetic counseling; sequence analysis, DNA; high-throughput nucleotide sequencing; genetics; genetics, medical; genetic diseases, inborn; bone diseases/genetic.

1 Introdução

As displasias esqueléticas (DE) ou osteocondrodismplasias (OCD) constituem um grupo heterogêneo de doenças que comprometem a formação, crescimento e desenvolvimento do sistema esquelético. Registros históricos, alguns do antigo Egito, reportam em pinturas e esculturas a presença de indivíduos com baixa estatura e encurtamento de membros interagindo em atividades sociais (Enderle et al., 1994).

Embora individualmente raras, a incidência conjunta das DE ao nascimento pode chegar a 3,2/10.000, (Barbosa-Buck et al., 2012). Esta prevalência foi obtida a partir da avaliação de recém-nascidos de 132 hospitais de nove países da América Latina, incluindo o Brasil, os quais eram participantes do Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênitas – ECLAMC – entre os anos de 2000 e 2007. Dentre os nascimentos, na ordem de 1.544.496 no período, 492 apresentavam características clínico-radiológicas compatíveis com uma OCD. Entre os natimortos, a prevalência foi de 33,6 para cada 10.000. As OCDs mais frequentes foram a displasia tanatofórica, a acondroplasia e a osteogênese imperfeita. Um estudo realizado no Estado de Utah, Estados Unidos, avaliando as displasias esqueléticas em recém-nascidos, natimortos e fetos decorrentes da interrupção da gestação, entre 1999 e 2008, mostrou uma prevalência de 3 a cada 10.000 nascimentos, semelhante àquela obtida no estudo do ECLAMC (Stevenson et al., 2012).

Por ser um grupo que envolve diversas entidades, o quadro clínico das DE apresenta uma grande variabilidade de expressão, desde displasias esqueléticas graves e letais até quadros leves, sem comprometimento do crescimento. No entanto, na maioria dos casos, há uma baixa estatura desproporcionada, com alteração do desenvolvimento ou deformidades em membros e coluna (Bae et al., 2016).

A nomenclatura utilizada para nomear e descrever os tipos diferentes de DE é confusa e emprega muitas palavras do Grego, como displasia tanatofórica (“traz a morte”, trata-se de condição letal), displasia diastrófica

(“torcido”, referente à cifoesciose progressiva), displasia metatrópica (“que muda”, referente à mudança nas proporções do corpo com a idade), opsismodisplasia (“atraso da maturação”, referente ao atraso da idade óssea), displasia campomélica (“encurvamento”, referente à típica deformidade dos membros). Para outras formas foram usados epônimos como displasia de Kniest e displasia de Ellis-van Creveld. As partes do esqueleto e do osso afetadas também são frequentemente empregadas, como por exemplo: displasia espôndilo-epifisária, displasia espôndilo-metafisária e displasia espôndilo-epi-metafisária. Até mesmo o tipo histológico afetado, herança genética ou referências a características típicas já foram usados para nomear as DE, a saber, acondroplasia, acondrogênese, congênita, tarda, pseudo- e “ligada ao X” (Mortier, 2001).

As DE são causadas, na sua quase totalidade, por variantes em genes, compatíveis com os diversos padrões clássicos de herança mendeliana (Bonafé et al., 2015).

Pela necessidade de padronizar a nomenclatura e a classificação das diversas doenças ósseas genéticas, um grupo de especialistas começou a se reunir na década de 70, com atualização da denominada nosologia em 1977, 1983, 1991, 1997, 2001, 2006, 2010 e 2015 (Bonafé et al., 2015). Na última revisão publicada, em 2015, foram incluídas 436 doenças agrupadas em 42 grupos, de acordo com critérios clínicos, moleculares, bioquímicos e/ou radiográficos (Quadro 1). Os autores relataram que diferente das edições anteriores, houve um acréscimo pequeno de novas doenças, mas, em contrapartida, observou-se um aumento substancial na identificação das bases moleculares de diversas anomalias ósseas. Os critérios de inclusão das diferentes doenças permaneceram os mesmos propostos em 2011 (Warman et al., 2011): envolvimento ósseo significativo, correspondendo a definição de displasia esquelética, doenças metabólicas, disostoses ósseas e malformações esqueléticas e/ou síndromes de redução de membros; entidades publicadas e/ou listadas no catálogo on-line de doenças mendelianas (Online Mendelian Inheritance in Man – OMIM); base genética comprovada por heredograma ou pelo fenótipo ser homogêneo ou aparecer em famílias não-aparentadas; autonomia nosológica confirmada por estudos experimentais.

Quadro 1: Nosologia das doenças ósseas genéticas (Bonafé et al., 2015)

Grupo (No)	Denominação	Genes envolvidos
1	FGFR3	<i>FGFR3</i>
2	Colágeno tipo 2	<i>COL2A1</i>
3	Colágeno tipo 11	<i>COL11A1, COL11A2</i>
4	Sulfatação	<i>DTDST (SLC26A2), PAPSS2, IMPAD1, CHST3, CHST14</i>
5	Perlecana	<i>PLC (HSPG2)</i>
6	Agrecana	<i>AGC1</i>
7	Filamina e doenças relacionadas	<i>FLNA, FLNB, SH3PXD2B</i>
8	TRPV4	<i>TRPV4</i>
9	Ciliopatias com envolvimento esquelético acentuado	<i>EVC1, EVC2, DYNC2H1, IFT80, WDR34, TTC21B, WDR19, IFT172, IFT140, NEK1, WDR35, TCTN3, IFT122, IFT43</i>
10	Displasia epifisária múltipla e pseudoacondroplasia	<i>COMP, COL9A2, COL9A3, MATN3, COL9A1, locus 4q35</i>
11	Displasias metafisárias	<i>COL10A1, RMRP, POP1, PTHR1, SBDS, MMP13, MMP9, RUNX2</i>
12	Displasias espôndilo-metafisárias	<i>ACP5, PCYT1A</i>
13	Displasias espôndilo-epi-metafisárias	<i>DYM, RAB33B, SMARCAL1, EIF2AK3, MATN3, DDR2, SEDL, SLC39A13, LONP1</i>
14	Displasias espôndilo-displásticas graves	<i>TRIP11, SLC35D1, GPX4, SBDS, INPPL1, MAGMAS</i>
15	Displasias acromélicas	<i>TRPS1, TRPS1 + EXT1, IHH, ADAMTSL2, FBN1, ADAMTS10, ADAMTS17, LTBP2, SMAD4, PDE4D, PRKAR1A, GNAS</i>
16	Displasias acromesomélicas	<i>NPR2, GDF5, BMPR1B</i>

Quadro 1: Nosologia das doenças ósseas genéticas (Bonafé et al., 2015)

Grupo (No)	Denominação	Genes envolvidos
17	Displasias mesomélicas e rizo-mesomélicas	<i>SHOX, GPC6, FZD2, ROR2, WNT5A, DVL1, SULF1, SLC05A1, deleção em 6p22.3</i>
18	Displasia campomélica e doenças relacionadas	<i>SOX9, LIFR</i>
19	Displasias com ossos delgados (<i>slender bones</i>)	<i>CUL7, OBSL1, CCDC8, TBCE, FAM111A, RNU4ATAC, PCNT2, CDKN1C</i>
20	Displasias com múltiplas luxações articulares	<i>CANT1, XYLT1, KIF22, B3GALT6</i>
21	Condrodisplasia punctata	<i>EBP, ARSE, NSDHL, MGP, LBR, PEX7, DHPAT, AGPS</i>
22	Displasias osteoscleróticas neonatais	<i>PTH1R, DHCR24, COL1A1, FAM20C</i>
23	Osteopetrose e doenças relacionadas	<i>TCIRG1, CLCN7, SNX10, OSTM1, RANKL (TNFSF11), PLEKHM1, CA2, LRP5, IKBKG (NEMO), FERMT3 (KIND3), RASGRP2(CaIDAG-GEF1), CTSK, LEMD3, WTX, SLC29A3</i>
24	Outras doenças de esclerose óssea	<i>ANKH, TGFB1, TBXAS1, HPGD, GJA1, OPG, SOST, LRP4, DLX3, PTDSS1</i>
25	Osteogênese imperfeita e doenças de densidade óssea reduzida	<i>COL1A1, COL1A2, CRTAP, LEPRE1, PPIB, SERPINH1, BMP1, FKBP10, PLOD2, SERPINF1, SP7, WNT1, TMEM38B, CREB3L1, SEC24D, IFITM5, PLS3, LRP5, P4HB, XYLT2, B4GALT7, GORAB, PYCR1, ATP6VOA2</i>
26	Mineralização anormal	<i>ALPL, PHEX, FGF23, DMP1, ENPP1, C1CN5, SLC34A3, CASR, ANKH</i>
27	Doenças de depósito lisossômico com envolvimento esquelético (disostose multiplex)	<i>IDA, IDS, HSS, NAGLU, HSGNAT, GNS, GALNS, GLBI, ARSB, GUSB, FUCA, MANA, MANB, AGA, GLB1,</i>

Quadro 1: Nosologia das doenças ósseas genéticas (Bonafé et al., 2015)

Grupo (No)	Denominação	Genes envolvidos
		<i>NEU1, SLC17A5, PPGB, SUMF1, GNPTAB, GNPTG</i>
28	Osteólise	<i>RANK(TNFRSF11A), LMNA, ZMPSTE24, LMNA, MMP2, NOTCH2, MAFB</i>
29	Desenvolvimento desorganizado de componentes esqueléticos	<i>EXT1, EXT2, SH3BP2, GNAS, TMEM16E, PTPN11, FGFR1, ACVR1, NF1, TREM2, TYROBP, IDH1, IDH2</i>
30	Síndromes de hipercrecimento com envolvimento esquelético	<i>EZH2, NSD1, SETD2, NFIX, AKT1, PIK3CA, FBN1, FBN2, TGFB1, TGFB2, SMAD3, TGFB2, NPPC, NPR2</i>
31	Osteoartropatias genéticas inflamatórias/semelhantes à osteoartropatia reumatóide	<i>WISP3, CIAS1, IL1RN, LPIN2, GALNT3, ANTXR2</i>
32	Displasia cleidocraniana e doenças relacionadas	<i>RUNX2, FIG4, ALX4, MSX2</i>
33	Craniossinostoses síndrômicas	<i>FGFR1, FGFR2, FGFR3, POR, MSX2, TWIST1, SKI, RECQL4, RAB23, MEGF8, TCF12, ERF</i>
34	Disostoses com envolvimento predominantemente craniofacial	<i>TCOF1, POLR1D, POLR1C, CXORF5, EVC1, EVC2, ICK, EFN1, ALX3, ALX4, ALX1, DHODH, SF3B4, EFTUD2</i>
35	Disostoses com envolvimento predominantemente vertebral com ou sem acometimento costal	<i>HLXB9, DLL3, MESP2, LFNG, HES7, TBX6, GDF6, GDF3, MEOX1, SNRPB, COG1, BMPER, NKX3-2</i>
36	Disostoses patelar	<i>TBX4, LMX1B, KAT6B, ORC1, ORC4, ORC6, CDT1, CDC6</i>
37	Braquidactilias sem manifestações extraesqueléticas	<i>IHH, BMPR1B, BMP2, GDF5, ROR2, NOG, HOXD13, PTHLH, SOX9</i>
38	Braquidactilias com manifestações	<i>HDAC4, PIGV, PDE3A, MYCN, HOXA13, CREBBP, EP300, CHSY1,</i>

Quadro 1: Nosologia das doenças ósseas genéticas (Bonafé et al., 2015)

Grupo (No)	Denominação	Genes envolvidos
	extraesqueléticas	<i>ARHGAP31, DOCK6, RBPJ, EOGT, TGDS</i>
39	Hipoplasia de membros – defeito de redução	<i>TBX3, NIPBL, SMC1A, SMC3, RAD21, HDAC8, RBM8A, THPO, TBX5, SALL4, TBX15, ESCO2, BHLHA9, SHH-ZRS, LMBR1, WNT3, WNT7A, RECQL4</i>
40	Ectrodactilia com ou sem outras manifestações	<i>P63 (TP63), CDH3, DLX5, DLX6, locus 10q, WNT10B, FGFR1</i>
41	Polidactilia-Sindactilia-Trifalangismo	<i>SHH-ZRS, GLI3, FBLN1, HOXD13, SALL1, FGFR2, FGFR3, FGF10, KIF7, WNT6, LRP4, GREM1, FMN1, BHLHA9, FAM58A, IHH, GJA1, FGF16, CKAP2L, MKS1, TMEM216, TMEM67, CEP290, RPGRIP1L, CC2D2A</i>
42	Defeitos de formação articular e sinostoses	<i>FGF9, NOG, GDF5, HOXA11, PITX1</i>

Além do número extenso de doenças ósseas genéticas que se encontra na nosologia (Quadro 1), outros fatores que dificultam o diagnóstico preciso de uma DE específica são: a falta de experiência clínica da maioria dos médicos frente às doenças raras; a presença de mutações em genes diferentes pode produzir fenótipos semelhantes, ou mesmo, mutações diferentes em um mesmo gene causarem múltiplos fenótipos; algumas manifestações clínicas ou radiográficas desaparecem com o amadurecimento ósseo, ou do contrário, não aparecem precocemente, devido ao dinâmico crescimento e desenvolvimento esquelético; por fim, algumas entidades clínicas ainda não tem seus quadros clínicos bem estabelecidos. (Bae et al., 2016).

As displasias espôndilo-epifisárias (DEE), espôndilo-metafisárias (DEM) e as espôndilo-epi-metafisárias (DEEM), representadas por diversos grupos da já citada classificação (grupos 1-6, 8, 10, 12-14, 18, 20 e 27) (Bonafé et al.

2015), são especialmente desafiadoras, impondo limitações diagnósticas que vão além da análise criteriosa dos quadros clínico-radiográficos. As entidades clínicas classificadas no grupo das DEM (12), por exemplo, apresentam em comum acometimento do esqueleto axial e região da placa fisária, mas também individualmente associações incomuns, como distrofia do epitélio pigmentar retiniano na DEM do tipo cones-bastonetes e dentinogênese imperfeita na odontocondrodisplasia. Novas formas de DEEM continuam sendo descritas, como por exemplo a forma com luxação de patela e deficiência intelectual (Baratela et al., 2012), que embora apresente um quadro clínico-radiológico semelhante à displasia de Desbuquois, nenhuma variante foi encontrada no principal gene associado a esta displasia (*CANT1*) em sete pacientes avaliados.

1.1 Grupos de Displasias Esqueléticas

Neste item estão descritos os grupos de displasias esqueléticas abordados neste estudo, de acordo com a última revisão da Nosologia e Classificação das Doenças Esqueléticas (Bonafé et al., 2015).

1.1.1 Colágeno do Tipo II (Grupo 2)

As collagenopatias do tipo II englobam um grupo diverso de displasias esqueléticas que geralmente apresentam quadro esquelético espândilo-epifisário ou espândilo-epi-metafisário, fenda palatina e alterações extraesqueléticas como surdez e alta miopia. O colágeno do tipo 2 é secretado pelos condrócitos, sendo o principal colágeno da matriz da cartilagem endocondral, além de ser expresso no humor vítreo, orelha interna e núcleo pulposo. É formado por três cadeias de procolágeno alfa com propeptídeos N- e C- terminal, que após serem secretadas, sofrem clivagem, formando a molécula madura de colágeno tipo II (Deng et al., 2016).

O espectro fenotípico inclui 16 doenças, particularmente com um padrão de herança autossômico dominante, desde formas letais como a acondrogênese tipo II (ACG2; OMIM 200610), hipocondrogênese (HPCG;

OMIM 200610) e displasia platispondílica do tipo Torrance (OMIM 151210), até fenótipos não letais, como a síndrome de Stickler do tipo I (OMIM 108300), a displasia espôndilo-epifisária congênita (DEEC; OMIM 183900), a displasia de Kniest (OMIM 156550), a displasia espôndilo-periférica (OMIM 271700), a displasia espôndilo-epifisária com encurtamento dos metatarsos (Síndrome de Czech; OMIM 609162), a displasia espôndilo-epi-metafisária do tipo Strudwick (DEEM tipo Strudwick; OMIM 184250), osteoartrose com condrodisplasia leve (OMIM 604864), necrose avascular da cabeça femural (OMIM 608805), doença de Legg–Calvé–Perthes (OMIM 150600), displasia epifisária múltipla com miopia (OMIM 132450), displasia oto-espôndilo-megaepifisária (OMIM 215150), displasia espôndilo-epifisária tipo Namaqualand e vitrorretinopatia com displasia epifisária falangeana (Deng et al., 2016).

Dentre as diferentes doenças ósseas decorrentes de variantes no gene *COL2A1*, a DEEC é uma das principais e mais bem estudadas DE. Caracteriza-se por uma baixa estatura desproporcionada importante (-7 desvios-padrão – DP), de origem pré-natal, com hipoplasia do processo odontóide e consequente instabilidade atlanto-axial e coxa vara, que subdivide esta DE em dois grupos: DEEC com coxa vara grave e leve. Outros achados frequentes são a face aplainada, alta miopia, fenda palatina e perda auditiva. A hipoplasia do processo odontóide e a gravidade da coxa vara são descritos como fatores de risco para compressão neurológica nesses pacientes (Terhal et al., 2015).

1.1.2 Colágeno do Tipo XI (Grupo 3)

O colágeno do tipo 11A1 está associado a, essencialmente, três tipos de DEs, com graus diferentes de expressão fenotípica, a fibrocondrogênese tipo 1 (OMIM 228520), a síndrome de Marshall (OMIM 154780) e a síndrome de Stickler tipo 2 (OMIM 604841).

A fibrocondrogênese tipo 1 é a forma letal de collagenopatia tipo 11, de herança autossômica recessiva, sendo caracterizada por encurtamento significativo dos membros com mãos e pés relativamente normais, fácies aplainada com nariz pequeno de narinas antevertidas, tórax pequeno e em sino

e abdome protuberante. Os achados esqueléticos ao estudo radiográfico incluem: ossos longos encurtados com extremidades metafisárias alargadas (formato de halteres), corpos vertebrais achatados, com hipoplasia da porção posterior e arredondamento da porção anterior à incidência lateral, costelas curtas e com alargamento metafisário (Tompson et al., 2010).

1.1.3 Defeitos de Sulfatação (Grupo 4)

Este grupo engloba displasias com alterações na função celular, com consequente hipossulfatação e desidratação dos condrócitos. Fazem parte deste grupo as DEs de herança autossômica recessiva, com fenótipos de gravidade variável.

O gene *DTDST – SLC26A2* codifica uma proteína transmembrana, que transporta sulfato para dentro dos condrócitos a fim de manter adequada a sulfatação das proteoglicanas. Mutações nesse gene foram encontradas em condrodisplasias letais no período neonatal, como a acondrogênese tipo IB (OMIM 600972) e a atelosteogênese tipo 2 (OMIM 256050), formas de fenótipo intermediário como a displasia diastrófica (OMIM 222600), e formas de expressividade leve como a displasia epifisária múltipla tipo 4 (OMIM 226900) (Karniski et al., 2001). Pacientes com displasia diastrófica apresentam como principais características clínicas: pé torto congênito bilateral, do tipo equinovaro, polegares aduzidos “do caroneiro”, edema e deformidade da região da pina auricular com calcificação cartilaginosa, cifoescoliose tóraco-lombar progressiva, contraturas de grandes articulações e artrose precoce. Algumas formas são letais, mas a maioria dos indivíduos sobrevive ao período neonatal com limitações físicas e inteligência normal (Bonafé et al., 2013).

PAPSS2 codifica a enzima 3'-fosfo-adenosina-5'-fosfossulfato sintase 2, a qual produz PAPS por sua respectiva sulfotransferase. PAPS é um doador universal de sulfato, que participa da sulfatação de uma variedade de biomoléculas, como glicosaminoglicanas, proteínas, hormônios esteróides (DHEA -deidroepiandrosterona) e vários compostos químicos exógenos, como alguns medicamentos. *PAPSS2* participa do desenvolvimento do sistema esquelético, principalmente na proliferação e diferenciação de condrócitos,

sofrendo forte hiporregulação em condrócitos da fase hipertrófica. Mutações em *PAPSS2* estão associadas à braquiolmia tipo 4 (OMIM 612847), doença autossômica recessiva caracterizada por tronco curto com vértebras com diminuição da sua altura (platispondilia) e irregularidade das placas vertebrais terminais. Os ossos tubulares apresentam alterações epifisárias e metafisárias discretas. Mutações neste gene já foram associadas a dois outros fenótipos, a displasia espôndilo-epi-metafisária tipo Pakistani, com alterações epi-metafisárias mais importantes e cifoescoliose, e também à espôndilo-displasia com pubarca precoce, que cursa com platispondilia leve e sinais de hiperandrogenismo. Mutações de perda de função em ambos os alelos de *PAPSS2* são responsáveis pelos fenótipos descritos acima (Miyake et al., 2012; Iida et al., 2013b).

Mutações no gene *CHST3*, que codifica a enzima condroitina 6-sulfotransferase (C6ST), estão associadas à displasia espôndilo-epifisária com múltiplas luxações congênitas (DEE-ML) (OMIM 143095). O sulfato de condroitina apresenta uma estrutura linear polimérica, com unidades repetitivas de dissacarídeos sulfatados contendo ácido glicurônico (GLcA) e N-acetilgalactosamina (GalNAc). O principal sulfato de condroitina em tecidos de mamíferos é o GalNAc. A enzima C6ST catalisa a transferência de grupos sulfato de PAPS para a posição 6 dos resíduos de GalNAc. A DEE-ML, que já foi reconhecida como a forma recessiva da síndrome de Larsen (OMIM 150250) por conta das luxações congênitas, é caracterizada por luxações de joelho e/ou quadril ao nascimento, pé torto congênito, subluxação de cotovelos, baixa estatura e cifose progressiva. O quadro de luxações articulares pode necessitar de tratamento cirúrgico. Cifoescoliose rígida e artrose precoce dos quadris são achados comuns ao final da infância (Unger et al., 2010).

1.1.4 Perlecana (Grupo 5)

As proteoglicanas heparan sulfato são componentes fundamentais de membranas basais, estão associados com estabilização de moléculas e também apresentam função de adesão célula-célula. A perlecana é um representante desse grupo e tem função angiogênica e de regulação do

crescimento celular, como co-receptor do fator de crescimento de fibroblastos FGF2. Mutações em homozigose ou heterozigose composta no gene que codifica a perlecana, *HSPG2*, produzem fenótipos de gravidade variável, como a síndrome de Schwartz-Jampel tipo 1 (OMIM 255800), caracterizada por baixa estatura, miopatia miotônica, blefarofimose, miopia, pectus carinatum e contraturas articulares (Spranger et al., 2000, Arikawa-Hirasawa et al., 2002); a displasia dissegmentar tipo Silverman-Handmaker (OMIM 224410), um fenótipo mais grave, letal, caracterizado por encurtamento de membros, tronco curto, fenda palatina, encefalocele e restrições articulares importantes (Arikawa-Hirasawa et al., 2001). As displasias dissegmentares, que também englobam uma forma mais leve, compatível com uma sobrevivência além da lactância, denominada síndrome de Rolland-Desbuquois (OMIM 224400), apresentam achados radiográficos típicos como defeitos de segmentação vertebral com fendas coronais irregulares ao longo dos corpos vertebrais em um padrão conhecido como anisosspondilia, com corpos vertebrais apresentando diferentes tamanhos e formas. Os ossos longos são curtos, largos e encurvados (Aleck et al., 1987).

1.1.5 Agrecana (Grupo 6)

A agrecana é a proteoglicana mais abundante do tecido cartilaginoso. Mutações em heterozigose no gene *ACAN* já foram associadas a DEE do tipo Kimberley (OMIM 608361), com quadro de baixa estatura proporcionada, sem dismorfismos e osteoartrose precoce (Gleghorn *et al.*, 2005). Uma mutação em homozigose (p.Asp2267Asn) em *ACAN* foi descrita em uma única família com baixa estatura grave, hipoplasia de face média, prognatismo, braquidactilia, fendas vertebrais coronais e alargamento metafisário (OMIM 612813) (Tompson et al., 2009). Outro fenótipo, este mais heterogêneo, associado a mutações em heterozigose no gene *ACAN*, inclui baixa estatura com avanço de idade óssea, osteoartrose precoce, hipoplasia de face média, braquidactilia, háluces alargados e lordose lombar. Denominado de Baixa estatura, Avanço de idade óssea, com ou sem Osteoartrose precoce e/ou Osteocondrite

dissecante (OMIM 165800), caracteriza-se pela separação da cartilagem articular do osso subcondral (Dateki et al., 2017).

1.1.6 Filamina e Doenças Relacionadas (Grupo 7)

As filaminas, como a FLNB, são proteínas ligadoras de actina, que interagem com múltiplos receptores e proteínas intracelulares, regulando a proliferação, a diferenciação e a migração celular-dependentes do citoesqueleto (Hu et al., 2014). A filamina B é expressa em condrócitos da placa de crescimento em humanos e em corpos vertebrais em desenvolvimento em camundongos apresentando, portanto, função na segmentação vertebral, formação articular e ossificação endocondral. Mutações em heterozigose no gene *FLNB* foram identificados em indivíduos com um espectro fenotípico que envolve pelo menos quatro DEs diferentes, a síndrome de Larsen (OMIM 150250), atelosteogênese tipo 1 (OMIM 108720) e tipo 3 (OMIM 108721) (Krakow et al., 2004). A displasia de Boomerang (OMIM 112310), considerada letal, apresenta ausência completa de ossificação em ossos longos e vértebras, além do típico formato do fêmur hipoplásico em “bumerangue” (Bicknell et al., 2005). Já a síndrome espândilo-carpotarsal (OMIM 272460), única do grupo com herança autossômica recessiva, cursa com baixa estatura desproporcionada, alterações de segmentação vertebral e sinostose de ossos do carpo (Krakow et al., 2004).

A atelosteogênese é uma forma de condrodisplasia letal, com heterogeneidade genética, caracterizada por hipoplasia distal de úmeros e fêmures, hipoplasia da coluna torácica, deficiência de ossificação de ossos da mão e corpos vertebrais e achados histológicos típicos, como condrócitos encapsulados em tecido fibroso (Maroteaux et al., 1982). Pacientes com atelosteogênese tipo 1 apresentam encurtamento significativo de membros, luxação de cotovelo, quadril e joelho. Achados radiográficos incluem: hipoplasia e ossificação incompleta de corpos vertebrais, ossos longos e pelve. O tórax é curto e em forma de sino. Clavículas são alongadas e a coluna vertebral cursa com escoliose e fendas coronais. (Jeon et al., 2014).

1.1.7 TRPV4 (Grupo 8)

TRPV4 é um canal catiônico mediador de influxo celular de Ca^{2+} , que está envolvido com osteocondrodisplasias e doenças neurodegenerativas. Está expresso em osteoblastos, osteoclastos e condrócitos, apresentando um espectro fenotípico desde formas letais como a displasia metatrópica (OMIM 156530) até quadros de acometimento exclusivo e discreto de esqueleto axial, como a braquiolmia tipo 3, autossômica dominante ligada ao *TRPV4* (OMIM 113500). O comprimento geralmente é normal ao nascimento com o tronco alongado (metatrópica) ou encurtado, como na displasia espândilo-metafisária tipo Koslowski (OMIM 184252). Cifoesciose progressiva é um achado comum, podendo estar associada à hipoplasia de odontóide. Os aspectos radiológicos envolvem platispondilia acentuada, com pedículos *overfaced* (corpo vertebral se prolonga além dos pedículos); deformidade em halteres dos ossos longos, com pronunciado alargamento metafisário. A pelve apresenta íliacos curtos e largos, formato em *halberd*, com artropatia do quadril (Krakow et al., 2009). As mutações em heterozigose encontradas associadas aos fenótipos descritos acima estão dispersas ao longo da proteína TRPV4, sem uma clara correlação genótipo-fenótipo. As mutações publicadas produzem um aumento dos níveis intracelulares de cálcio pela estimulação in vitro, sugerindo que se tratem de mutações de ganho de função (Krakow et al., 2010).

1.1.8 Displasia Epifisária Múltipla e

Pseudoacondroplasia (Grupo 10)

Este grupo é formado principalmente pela pseudoacondroplasia (OMIM 177170) e por formas de displasia epifisária múltipla autossômicas dominantes, relacionadas aos genes *COMP* (OMIM 132400), *COL9A2* (OMIM 600204), *COL9A3* (OMIM 600969), *MATN3* (OMIM 607078) e *COL9A1* (OMIM 614135). A pseudoacondroplasia (OMIM 177170) relacionada ao gene da proteína oligomérica da matriz cartilaginosa, *COMP*, cursa com baixa estatura desproporcionada de início por volta do 2o ano de vida, com frouxidão ligamentar e geno varo/valgo/recurvatum. O quadro radiológico é dinâmico,

com vértebras irregulares e protrusão anterior, imagem radiográfica em “diamante”, que desaparece após a primeira infância. Platispondilia com hipoplasia do odontóide permanece na vida adulta, resultando em um tronco curto. Irregularidades metafisárias e epífises fragmentadas são encontradas nos ossos longos. Osteoartrose precoce é um achado comum (Briggs e Chapman et al., 2002). Mutações em heterozigose no gene *COMP*, predominantemente no domínio calmodulina-*like* da proteína, estão relacionadas tanto à pseudocondroplasia, como à displasia epifisária múltipla do tipo 1 (OMIM 132400).

1.1.9 Displasias Espôndilo-Metafisárias (Grupo 12)

As displasias espôndilo-metafisárias (DEM) fazem parte de um grupo heterogêneo e apresentam como características comuns uma baixa estatura, irregularidades da placa de crescimento e alterações vertebrais com consequente escoliose (Lee et al., 2017). Trata-se de um dos grupos mais estudados nos últimos anos, sendo os genes causadores da DEM com distrofia de cones-bastonetes (OMIM 608940) o gene *PCYT1A* (Yamamoto et al., 2014, Hoover-Fong et al., 2014) e da DEM axial com distrofia de retina (OMIM 602271), os genes *C21orf2* e *NEK2* (Wang et al., 2016, Wang et al., 2017) e DEM tipo *corner fractures*/Sutcliffe (OMIM 184255), o gene *FN1*, (Lee et al., 2017) descobertos recentemente.

A DEM com distrofia de cones e bastonetes, de herança autossômica recessiva, é caracterizada por baixa estatura desproporcionada de início pré-natal, encurtamento rizomélico dos membros com irregularidade metafisária progressiva, platispondilia e deficiência visual de início precoce associada à maculopatia e evidências eletrorretinográficas de distrofia de cones-bastonetes (Yamamoto et al., 2014).

Já a DEM tipo *corner fractures*/Sutcliffe apresenta baixa estatura desproporcionada, cifo escoliose e alterações metafisárias típicas, com fraturas marginais *corner fractures*. Um estudo recente comprovou que a introdução das variantes em heterozigose p.Cys87Phe [c.260G>T], p.Tyr240Asp [c.718T>G] e p.Cys260Gly [c.778T>G] no gene *FN1*, em um fragmento

recombinante N-terminal de 70 kDa (rF70K) em um meio de cultura, não secreta da mesma maneira que a proteína selvagem fibronectina (rFN), demonstrando que a secreção inadequada de fibronectina na cartilagem e no osso está associada com o fenótipo (Lee et al., 2017).

1.1.10 Displasias Espôndilo-Epi-Metafisárias (Grupo 13)

O grupo das displasias DEEM é um dos grupos mais heterogêneos da nosologia, incluindo mais de 10 DEs, com modos de herança diferentes, mas que apresentam em comum o envolvimento vertebral, epifisário e metafisário. O acometimento metafisário é variável e muitas DEEMs são caracterizadas principalmente por alterações vertebrais e epifisárias (Cormier-Daire, 2008).

A displasia espôndilo-epifisária tarda (DET-X) (OMIM 313400), é uma doença ligada ao gene *TRAPPC2*, localizado no cromossomo X, caracterizada por baixa estatura e tronco curto. Homens afetados manifestam os sintomas a partir dos 6 anos de vida, com dores crônicas e progressivas na coluna e grandes articulações. Achados radiográficos incluem alterações epifisárias, plastispondilia, diminuição dos espaços discais, escoliose, hipoplasia do processo odontóide, encurtamento do colo femural e coxa vara (Campeau e Schlesinger, 2017).

Uma das formas de DEEM com acometimento extra-esquelético é a displasia imuno-óssea de Schimke (OMIM 242900), de herança autossômica recessiva e associada a mutações no gene *SMARCA1*. Esta displasia pode ser entendida como uma combinação de uma DEE com um fenótipo clínico peculiar, incluindo múltiplas manchas lentiginosas, imunodeficiência insidiosa e nefrite por imuno complexos que leva o paciente à morte em média aos 8 anos (Boerkoel et al., 2002).

Outras DEs presentes neste grupo apresentam evolução progressiva de achados clínicos-radiográficos, como por exemplo, a síndrome de Dyggve-Melchior-Clausen (OMIM 223800), relacionada aos genes *DYM* e *RAB33B*, caracterizada por baixa estatura grave e progressiva, microcefalia e dismorfismos faciais com traços grosseiros e mandíbula proeminente. As mãos e pés são largos e os membros encurtados, com alterações epifisárias e

metafisárias. A coluna vertebral apresenta, ao estudo radiográfico, platisspondilia e biconvexidade da placa vertebral terminal (PVT) (Cormier-Daire, 2008).

A síndrome CODAS (OMIM600373), acrônimo de Cerebral – Ocular – Dentário – Auricular – eSquelético, associada a mutações em homozigose ou heterozigose composta no gene *LONP1*, caracteriza-se por atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, alterações craniofaciais como catarata, ptose, prega nasal mediana, atraso de dentição, perda auditiva, baixa estatura com atraso da ossificação epifisária, alterações metafisárias e fendas vertebrais coronais (Strauss et al., 2015).

Existem ainda formas sem base molecular conhecida, como a displasia SPONASTRIME (OMIM 271510) (Bonafé et al., 2015).

1.1.11 Displasias Espôndilo-Displásticas Graves (Grupo 14)

As DEs incluídas neste grupo apresentam comprometimento grave da coluna vertebral. Fazem parte desse grupo a displasia de Schneckbecken (OMIM 269250), relacionada ao gene *SLC35D1*, acondrogênese tipo 1A (OMIM 200600), relacionada ao gene *TRIP11*, displasia espôndilo-metafisária tipo Sedaghatian (OMIM 250220) relacionada ao gene *GPX4*, opsismodisplasia (OMIM 258480) relacionada ao gene *INPPL1* e a DE relacionada ao gene *MAGMAS* (Furuichi et al., 2008; Bonafé et al., 2015).

Opsismodisplasia é uma forma rara de DE, caracterizada por atraso de idade óssea, membros encurtados com mãos e pés pequenos. Os pacientes apresentam ainda macrocefalia relativa com fontanela anterior alargada, sobrelhas proeminentes, base nasal deprimida, nariz pequeno com narinas antevertidas e filtro nasolabial longo. Achados radiográficos incluem: ossos longos encurtados com atraso significativo de ossificação epifisária, platisspondilia grave, alargamento metafisário e alterações características dos metacarpos e falanges. Morte nos primeiros anos de vida por conta de insuficiência respiratória já foi descrita em diversos pacientes (Below et al., 2013).

1.1.12 Displasias Acro-Mesomélicas (Grupo 16)

Fazem parte deste grupo as displasias com acometimento predominante das porções acro- e mesomélicas, ou seja, segmentos distal e medial dos membros. Ocorrem de maneira isolada ou sindrômica, associada a alterações cardíacas, respiratórias, neurológicas e geniturinárias. As displasias acromesomélicas (DAM) segregam em sua maioria de maneira autossômica recessiva, com exceção da DAM tipo Osebold-Remondini (OMIM 112910). Mutações em três genes já foram associadas às DAM, a saber: DAM tipo Maroteaux (OMIM 602875) relacionada ao gene *NPR2*, displasia de Grebe (OMIM 200700) e hipoplasia fibular de Du Pan (OMIM 228900), relacionadas ao gene *GDF5* e a DAM com alterações geniturinárias (OMIM 609441) relacionada ao gene *BMPR1B* (Khan et al., 2016).

A DAM tipo Maroteaux (DAM-M) é caracterizada por baixa estatura grave com estatura final abaixo de 120 cm e aparecimento dos sintomas nos primeiros 2 anos de vida, com envolvimento axial, além dos achados acromesomélicos. Achados radiográficos incluem encurtamento e alargamento das falanges e ossos longos, principalmente do antebraço. O rádio é encurvado, sendo geralmente maior que a ulna. O crânio é dolicocefálico e o tórax curto, com platisspondilia e diminuição da distância interpedicular nas vértebras lombares (Faivre et al., 2000). Mutações de perda de função no gene *NPR2*, que codifica o receptor de peptídeo natriurético-C transmembrana homodimérico do tipo B (NPR-B), estão associadas com a DAM-M. Estudos funcionais de mutações *missense* demonstraram perda significativa de atividade da guanilil-ciclase (Bartels et al., 2004).

1.1.13 Displasia Campomélica e Doenças Relacionadas

(Grupo 18)

Este grupo apresenta condições clínicas com ossos longos encurvados (*bent bones*), incluindo a displasia campomélica (DC) (OMIM 114290), de herança autossômica dominante, caracterizada por ossos longos encurvados e delgados, pé torto congênito, escápulas hipoplásicas, tórax curto com

pedículos torácicos não mineralizados, e asa do íliaco estreita. Reversão sexual ocorre em 2/3 dos pacientes 46,XY. A DC, causada por mutações em heterozigose no gene *SOX9* ou variações do número de cópias (CNVs) envolvendo a região adjacente a este gene, é geralmente letal no primeiro ano de vida devido à insuficiência respiratória relacionada ao tórax pequeno e hipoplasia traqueobrônquica (Matsushita et al., 2013).

A outra forma representativa deste grupo é a displasia de Stüve-Wiedemann (OMIM 601559), relacionada a mutações em homozigose ou heterozigose composta no gene *LIFR*, que codifica o receptor do fator inibidor de leucemia. O quadro clínico é caracterizado por membros encurtados e curvos, camptodactilia, contraturas de cotovelos e quirodáctilos, e disautonomia com hipertermia episódica. Os achados radiográficos incluem ossos longos curvos e encurtados com alargamento das metáfises, ísquio e púbis são largos com o íliaco pequeno. A coluna vertebral apresenta cifoescoliose progressiva (Bertola et al., 2016).

1.1.14 Displasias com Múltiplas Luxações Articulares

(Grupo 20)

Luxações de múltiplas articulações são os achados comuns às DES contidas neste grupo, que integra as seguintes displasias com base genética conhecida: displasia de Desbuquois clássica (DDES) (OMIM 251450) e a DDES com encurtamento de metacarpos e falanges alongadas (tipo Kim) (OMIM 251450), ambas relacionadas ao gene *CANT1*, a DDES do tipo 2 (OMIM 615777) ligada ao gene *XYLT1*, a displasia espôndilo-epi-metafisária com frouxidão ligamentar (DEEM-FL) tipo leptodactílica/Hall (OMIM 603546), única forma de herança autossômica dominante do grupo e relacionada ao gene *KIF22*, e a DEEM-FL tipo Beighton (OMIM 271640) ligada ao gene *B3GALT6*. A pseudodisplasia diastrófica (OMIM 264180), sem causa genética conhecida, também faz parte deste grupo (Bonafé et al., 2015).

O gene *CANT1* codifica uma nucleotidase cálcio-ativada tipo 1, que participa do metabolismo de proteoglicanas. A DDES, causada por mutações em homozigose ou heterozigose composta no gene *CANT1*, é caracterizada

por baixa estatura pré e pós-natal (estatura abaixo de -5 desvios padrão), frouxidão ligamentar, luxações de múltiplas articulações (algumas congênitas), face média aplainada, micrognatia, fenda palatina e escoliose progressiva (Furuichi *et al.*, 2011). O principal achado radiográfico é o hipercrecimento do trocanter inferior, que em conjunto com a face inferior do colo femural, assume um formato “em chave inglesa” ou *monkey wrench/Swedish key*. São características típicas o encurtamento dos ossos longos com alargamento metafisário, a hipoplasia de tórax e ílio, o avanço de idade óssea nos ossos do carpo e tarso, e os núcleos de ossificação adicional nas mãos com falange em delta (Huber *et al.*, 2009). A DDES é considerada clinicamente e radiologicamente heterogênea, sendo os tipos 1 (clássico) e tipo 2 definidos pela presença ou não das alterações típicas das mãos, respectivamente. Um estudo realizou a pesquisa molecular de *CANT1* e *CHST3* em 38 pacientes com diagnóstico clínico de DDES (6 do tipo 1, um do tipo Kim e 31 do tipo 2), identificou mutações *missense* e *nonsense* em *CANT1* nos 6 pacientes do tipo 1 e no paciente tipo Kim. Foi encontrada a variante de sítio de *splicing* c.342+1G>A em um dos pacientes considerados do tipo 2, que apresentava luxações nos dedos, alterações epifisárias, mas sem centros de ossificação acessórios nas mãos. Esta variante foi estudada por RT-PCR em RNA extraído de leucócitos do paciente, sendo comprovada a ausência do transcrito *CANT1* pela alteração do sítio de *splicing* da região 5-prime UTR. Um dos pacientes inicialmente diagnosticados como tipo 2 apresentou a mutação p.Leu259Pro em *CHST3*, comprovando a sobreposição fenotípica com a DEE-ML (Nizon *et al.*, 2012).

1.1.15 Doenças de Depósito Lisossômico com envolvimento esquelético (*Disostoses Multiplex*) (Grupo 27)

Este grupo conta com DE secundárias a erros inatos do metabolismo em enzimas lisossomais, que quando ausentes ou hipofuncionantes geram acúmulo lisossomal de substratos em diversos órgãos e tecidos, incluindo o

sistema esquelético. Entre essas doenças estão: as mucopolissacaridoses (MPS) do tipo IH/IS – Hurler/Sheie (OMIM 607014), associada ao gene *IDA*; do tipo II - Hunter (OMIM 309900), gene *IDS*; tipo III - Sanfilipo (OMIM 252900, 252920, 252930, 252940), decorrentes de variantes nos genes *HSS*, *NAGLU*, *HSGNAT* e *GNS*; tipo IV - Mórquio A e B (OMIM 253000, 253010) ligadas ao gene *GALNS* e *GLBI*, respectivamente; tipo VI – Maroteaux-Lamy (OMIM 253200), gene *ARSB* e tipo VII – Sly (OMIM 253220), gene *GUSB*; a fucosidose (OMIM 230000) relacionada ao gene *FUCA*; a alfa-manosidose (OMIM 248500) do gene *MANA* e a beta-manosidose (OMIM 248510) do gene *MANB*; a aspartilglicosaminúria (OMIM 208400) ligada ao gene *AGA*; as gangliosidoses-GM1 (OMIM 230500), gene *GLB1*; as sialidoses (OMIM 256550), gene *NEU1*; a doença de depósito de ácido siálico (OMIM 269920) ligada ao gene *SLC17A5*; as galactosialidoses (OMIM 256540) gene *PPGB*; a deficiência de múltiplas sulfatases (OMIM 272200) relacionada ao gene *SUMF1*; as mucopolidoses II (OMIM 252500) e IIIA (OMIM 252600) ligadas ao gene *GNPTAB*; e finalmente a mucopolidose tipo IIIC (OMIM 252605) relacionada ao gene *GNPTG*.

O gene *GALNS* codifica a enzima lisossomal N-acetilgalactosamina-sulfato sulfatase, envolvida no catabolismo do sulfato de queratano e do sulfato de condroitina. Mutações em homozigose ou heterozigose composta em *GALNS* causam a doença de Mórquio (MPS-IVA), doença de acúmulo lisossômico caracterizada por baixa estatura, tronco curto com pectus carinatum, frouxidão ligamentar com desvio ulnar de quirodáctilos, alterações dentárias, opacidade da córnea e inteligência normal. Embora não existam alterações evidentes de sistema nervoso central, a progressão da doença esquelética pode levar a compressões neurológicas localizadas, pela instabilidade atlanto-axial (Montano et al., 2008). Há uma grande variabilidade fenotípica dos achados, desde fenótipos mais leves e intermediários até o clássico, mais gravemente afetado. As principais características clínicas são decorrentes de defeitos de cartilagem resultantes do acúmulo de sulfato de queratano. Este quadro esquelético se manifesta por uma condrodissplasia eipifisária, com platispondilia, labiação vertebral anterior, hipoplasia do processo odontóide e alterações da epífise femoral proximal. Na forma

clássica, o início dos sintomas ocorre antes dos 3 anos e a estatura final encontra-se abaixo dos 120 cm, com redução da taxa de crescimento aos 18 meses de vida (Caciotti *et al.*, 2015). Existem mais de 275 mutações diferentes relacionadas com a MPS-IVA, sendo portanto, uma explicação plausível para a variabilidade fenotípica da doença. Entretanto, entre 14-15% dos testes moleculares não identificam a mutação causadora do quadro (Tomatsu *et al.*, 2005).

O gene *GNPTAB* codifica a enzima lisossomal N-acetilglicosamina-1-fosfotransferase, que catalisa o passo inicial para a síntese de manose-6-fosfato, necessário para a marcação de hidrolases lisossomais. Mutações em homozigose e heterozigose composta em *GNTAP* estão associadas com a mucopolidose II alfa/beta (doença de I-cell), mais grave, e com a mucopolidose III alfa/beta (pseudo-hurler). Estas doenças são causadas por um defeito de fosforilação e localização de enzimas lisossomais, resultando no acúmulo de substratos no lisossomo. Os pacientes afetados apresentam baixa estatura, alterações esqueléticas, cardiomegalia e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (Paik *et al.*, 2005).

1.2 Exame Clínico-Genético

O diagnóstico das DE é dificultado pela grande heterogeneidade presente neste grupo de doenças ósseas. (Quadro 2). O diagnóstico usualmente requer um exame clínico cuidadoso do paciente e avaliação do esqueleto mediante radiografias. Estudos morfológicos da placa de crescimento da cartilagem e do osso podem ajudar em diagnósticos diferenciais mais restritos. Quando a alteração genética é conhecida, análises bioquímicas e/ou moleculares (DNA) podem ser realizadas para confirmar o diagnóstico. Um diagnóstico preciso não é essencial apenas para o aconselhamento genético, mas também crucial para a própria conduta do indivíduo afetado.

O primeiro passo na investigação de um paciente com DE envolve a obtenção do histórico médico completo, análise da história familiar com heredograma e realização de um exame físico detalhado. Os dados

antropométricos de nascimento e a análise evolutiva com curvas de crescimento são fundamentais, com especial atenção ao perímetro cefálico, peso e comprimento de nascimento. As proporções corporais entre tronco e membros devem ser analisadas através de relações entre as medidas do comprimento sentado pelo comprimento, assim como envergadura pelo comprimento. O exame dismorfológico deve contemplar características e proporções crânio-faciais, como bossa frontal, face média, filtro naso-labial, palato e orelhas. As mãos e pés são frequentemente informativas e auxiliam na distinção entre grupos diferentes de DE, a depender do comprimento e características dos quirodáctilos e pododáctilos. Termos como rizomelia, mesomelia e acromelia, que se referem ao encurtamento preferencial de respectivamente a porção proximal, medial e distal dos membros, são comumente empregados (Panda et al., 2014).

A dinâmica do crescimento e idade de aparecimento dos sintomas devem ser observadas, pois também direcionam o diagnóstico. Crianças com acondroplasia ou DEEC apresentam deficiência de crescimento e características típicas já ao nascimento, enquanto pacientes com hipocondroplasia ou pseudoacondroplasia tem suas estaturas preservadas no período neonatal, evoluindo com diminuição da velocidade de crescimento após 1 ano de idade (Mortier, 2001).

Quadro 2: Protocolo de investigação de pacientes com DE (modificado de Mortier, 2001)

Histórico	História pessoal e familiar, com análise do heredograma
Exame Físico	Medidas Antropométricas: estatura, peso, perímetro cefálico, envergadura, razão segmento superior/inferior Exame focado em dismorfismos e outros achados extra-esqueléticos
Avaliação	Ântero-posterior (AP) e lateral da coluna total e

Quadro 2: Protocolo de investigação de pacientes com DE (modificado de Mortier, 2001)

Radiográfica ^a	crânio AP de tórax AP de pelve AP de mão esquerda (também para idade óssea) AP de todos outros ossos tubulares (pode ser limitado para um membro superior e inferior se não há suspeita de assimetria) Lateral do joelho (patela)
Estudos DNA	5-20 ml EDTA de sangue para mutações

^a Para fetos, recém-nascidos ou bebês, AP e lateral do corpo inteiro podem ser suficientes

1.3 Estudo Radiológico

O estudo radiográfico completo do esqueleto, com incidências ântero-posteriores (AP) e laterais, é primordial para identificar as partes ósseas afetadas e caracterizar o diagnóstico radiológico da DE (Quadro 2).

O atraso na ossificação epifisária, ou irregularidades das epífises, podem ser indicativos de uma displasia epifisária. Alargamento, com irregularidades e "franjeamento" das metáfises sugerem o diagnóstico de uma displasia metafisária. Alterações diafisárias, como alargamento ou espessamento cortical, apontam para o acometimento da "haste" dos ossos tubulares (diáfises). Combinações desses achados radiográficos permitem caracterizar melhor o quadro, como por exemplo, a displasia epi-metáfisária.

O envolvimento da coluna vertebral pode cursar com a diminuição da altura dos corpos vertebrais, denominada platispondilia, ou irregularidade das placas vertebrais terminais (PVT). Alterações da morfologia da vértebra, como protrusão anterior em "forma de gancho", característica da doença de Mórquio

(MPS-IV), ou a hiperconvexidade vertebral posterior, encontrada na DEE forma tarda. Quando presentes, alterações vertebrais adicionam o prefixo "espôndilo-" à nomenclatura do quadro radiológico da DE, como por exemplo, displasia espôndilo-metafisária (Panda et al.;2014).

Alguns achados radiográficos são precoces e desaparecem ao longo do amadurecimento ósseo, como a vértebra "em diamante", achado precoce na pseudoacondroplasia. A soldadura das epífises com a diáfise dos ossos tubulares, com o fechamento das metáfises após a puberdade, prejudica a identificação de achados metafisários e epifisários típicos. Outros achados, por sua vez, são tardios e não estão presentes no início da avaliação, como por exemplo, as alterações epifisárias e vertebrais na doença de Mórquio (MPS-IV) e na pseudoacondroplasia. Portanto, indica-se a realização de radiografias em idade precoce, assim como, seguir com estudos seriados para avaliar a evolução e as complicações ortopédicas das DEs (Giedion,1994).

1.4 Estudo molecular

A grande maioria das DEs decorre de mutações em genes únicos, compatíveis com os padrões clássicos das doenças monogênicas. Desta forma, o estudo molecular empregado para a confirmação do diagnóstico clínico-radiológico é o sequenciamento gênico.

1.4.1 Técnicas de Sequenciamento

1.4.1.1 Sequenciamento Sanger

A técnica de sequenciamento gênico por Sanger é a metodologia clássica utilizada para a identificação de variantes de nucleotídeos únicas (SNV). Baseada em síntese de DNA a partir de primers, pequenos moldes de DNA (oligonucleotídeos) complementares a uma região específica de DNA, é caracterizada pela incorporação seletiva de dideoxinucleotídeos (ddNTPs) que não possuem o grupo 3'-OH e, portanto, não permitem a ligação fosfodiéster de outro dinucleotídeo trifosfato (dNTP), interrompendo a síntese da cadeia de

DNA naquela posição. Estes ddNTPs terminadores recebem marcação fluorescente para cada dNTP respectivo, adenina, citosina, timina e guanina. Por eletroforese das sequências truncadas em gel de poliacrilamida, separam-se as diferentes cadeias simples de DNA (as quais diferem entre si apenas por um nucleotídeo). Existem máquinas que fazem detecção da fluorescência e que podem distinguir os quatro marcadores fluorescentes dos outros tantos ddNTPs. A ordem em que os diferentes fragmentos passam pelo detector de fluorescência indica a sequência da cadeia de DNA complementar à cadeia usada como molde, ou seja, a sequência obtida não é a da cadeia molde, mas sim a da sua cadeia complementar (Sanger et al., 1977).

1.4.1.2 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

A técnica de NGS diferencia-se do sequenciamento por Sanger ao permitir a análise de múltiplos genes, simultaneamente, em menor tempo e custo. Também conhecido como sequenciamento massivo em paralelo, o NGS utiliza-se de computação para o sequenciamento e análise dos dados produzidos. A metodologia é dividida em três etapas fundamentais independente do tipo de sequenciador envolvido e da abrangência do estudo, seja a captura de painel de genes, a do exoma completo (WES), ou mesmo a do genoma completo (WGS). Inicialmente, o DNA é extraído em quantidade e qualidade suficientes para ser processado e sequenciado, o “preparo das bibliotecas”. O sequenciamento, então ocorre, utilizando químicas inovadoras dentro de um robô de pipetagem com sensores e computadores acoplados. Finalmente, procede-se à análise dos dados gerados no sequenciador. A técnica de NGS produz um imenso volume de dados, impossíveis de serem analisados apenas pelos olhos humanos (Heather e Chain, 2016).

A técnica de NGS permitiu o sequenciamento de múltiplos genes em múltiplos pacientes, facilitando os processos de estudo de ligação entre indivíduos da mesma família, comparação de genes mutados entre indivíduos de famílias diferentes e identificação de mutações *de novo* em qualquer gene do exoma, acelerando sobremaneira a descoberta de genes associados a fenótipos. Em 2007, o banco de dados OMIM (*Online Mendelian Inheritance in*

Man) registrava 2048 fenótipos com base molecular conhecida. Em 2017, estão catalogados 5024 fenótipos com etiologia definida (Koboldt et al., 2013, Boycott et al., 2013, Chong et al., 2015, Goodwin et al., 2016, www.omim.org).

As DE são um grupo de doenças ósseas decorrentes de mutações em genes únicos na sua grande maioria, com clara herança mendeliana. O diagnóstico diferencial entre as DE é complexo, com sobreposição de fenótipos, exigindo nestas circunstâncias, que vários genes sejam estudados para se chegar a um diagnóstico definitivo. Portanto, a aplicação da plataforma de NGS tem grande potencial para identificar, de maneira rápida e eficiente, genes causadores neste grupo de doenças (Brandi, 2014). Alguns estudos recentes avaliaram o desempenho do NGS no auxílio diagnóstico das DE. Polla et al. (2015) utilizou um painel customizado de 1,4Mb para a cobertura de 4.800 exons e 309 genes envolvidos com doenças esqueléticas. Foram estudados 69 indivíduos de 66 famílias brasileiras com uma suspeita ou diagnóstico clínico de uma DE. De 36 casos com uma hipótese clínica de base genética já conhecida, foram encontradas mutações em 8 casos (22%). Em 20 casos com suspeita clínica de uma DE, sem um diagnóstico específico, foram identificadas 4 mutações causadoras. Foram incluídos ainda, 11 casos com doenças esqueléticas específicas, para as quais não havia ainda um gene associado. Para estes casos, foi identificada uma mutação para síndrome de Apert, mudando a hipótese de condrodisplasia original. Os resultados indicaram que os painéis por NGS mostraram-se uma ferramenta de diagnóstico molecular rápida, acurada e custo-efetiva, quando aplicada para um grupo geneticamente heterogêneo como o das DEs.

Um estudo retrospectivo realizado durante 5 anos, em um hospital terciário de Ancara na Turquia, classificou 417 pacientes com diagnóstico definitivo (329) ou provável (75) para doenças esqueléticas de origem genética. Os diagnósticos foram baseados, principalmente, nos aspectos clínico-radiológicos, já que somente 71/329 casos (21,6%) foram confirmados por estudos moleculares. O estudo identificou alta taxa de consanguinidade, 53%, significativa até para os padrões locais (22%) (Kurt-Sukur et al., 2015).

Bae et al. (2016) estudaram 185 pacientes coreanos, com suspeita ou diagnóstico de uma DE. Dentre esses, 160 pacientes não tinham diagnóstico

molecular e foram testados por um painel customizado de 255 genes para DE. Foram encontradas variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas em 52,5% (84/160) dos pacientes. O autor destaca a utilidade clínica do painel de genes por NGS como plataforma diagnóstica na identificação de variantes patogênicas em um nucleotídeo único (SNV), pequenos *indels* e, possivelmente, variantes do número de cópia (CNVs), em pacientes com DE. Entretanto, destaca as limitações da técnica, principalmente para genes candidatos que não estejam bem cobertos. Variantes selecionadas, em exons que não apresentem cobertura satisfatória, devem sempre ser confirmadas por metodologia de sequenciamento de Sanger.

O emprego desta nova técnica de sequenciamento a partir de 2010, particularmente o WES permitiu a descoberta de diversos genes responsáveis por diversas doenças monogênicas, acelerando de forma substancial este número quando comparada às técnicas prévias: o número de genes descobertos por ano entre 2005 a 2009 era de aproximadamente 166 e cresceu para 236 entre os anos de 2010 e 2014. O uso crescente de NGS desde 2013, seja o WES ou WGS, permitiu a descoberta de quase três vezes mais genes do que os métodos tradicionais previamente empregados (Chong et al., 2015).

As displasias esqueléticas se beneficiaram substancialmente desta nova tecnologia. Os dados nas nosologias de doenças ósseas genéticas mostram um crescente incremento na descoberta das bases moleculares de diversas doenças ósseas. Em 2006, a etiologia era conhecida em 215 condições e, em 2015, 397 das 436 doenças ósseas listadas apresentavam sua base genética conhecida (Superti-Furga e Unger, 2007; Bonafé et al., 2015). Dentre as DEs com envolvimento epifisário e/ou metafisário no período de 2014 até o presente, destacam-se os seguintes genes com seus fenótipos respectivos (Quadro 3).

A técnica de NGS tem permitido identificar um número grande de variantes em diversos genes já associados a diversas doenças ósseas, assim como variantes em novos genes. O acesso a banco de dados públicos auxilia na classificação de patogenicidade de uma variante encontrada. Um banco de

dados específicos para doenças ósseas foi criado por Chen et al. (2016) para armazenar as diversas variantes descritas neste grupo de doenças.

Quadro 3: Novos genes associados a DEs, com envolvimento espôndilo-epi-metafisário, sem etiologia conhecida entre 2014 e 2017.

Gene	Doença	OMIM	Padrão de herança	Referência
<i>PCYT1A</i>	Displasia espôndilo-metafisária com distrofia de cones e bastonetes	608940	AR	Yamamoto et al., 2014 Hoover-Fong et al., 2014
<i>LTBP3</i>	Platispondilia com amelogênese imperfeita	601216	AR	Huckert et al., 2015
<i>ALG9</i>	Displasia esquelética de Gillesen-Kaesbach-Nishimura	263210	AR	Tham et al., 2016
<i>EXOC6B</i>	Displasia espôndilo-epi-metafisária com múltiplas luxações	-	AR	Girisha et al., 2016
<i>C21orf2</i>	Displasia espôndilo-metafisária axial	602271	AR	Wang et al., 2016
<i>AIFM1</i>	Displasia epsondilo-epi-metafisária com neurodegeneração	-	Mito	Mierzevska et al., 2017
<i>CSGALNACT1</i>	Displasia esquelética leve com hiperextensibilidade articular	-	AR	Vodopiutz et al., 2017
<i>DDRKG1</i>	Displasia espôndilo-epi-metafisária tipo Shohat	602557	AD	Egunsola et al., 2017
<i>EXTL3</i>	Displasia imuno-esquelética com anormalidades de neurodesenvolvimento	617425	AR	Oud et al., 2017
<i>FN1</i>	Displasia espôndilo-metafisária tipo <i>corner-fractures</i>	-	AR	Lee et al., 2017
<i>PLCB3</i>	Displasia espôndilo-metafisária com distrofia corneana	-	AR	Ben-Salem et al., 2017

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar as características clínico-radiológicas e as bases moleculares de um grupo de pacientes com DE com envolvimento do esqueleto axial associado a anomalias epifisárias e/ou metafisárias

2.2 Objetivos específicos

1. Identificar as variantes responsáveis pelos diversos fenótipos das DE avaliadas, incluindo a identificação de novas variantes em genes já conhecidos, assim como a identificação de variantes em novos genes em fenótipos sem base molecular conhecida.

2. Avaliar a variabilidade fenotípica dentro dos grupos nosológicos das DE.

3 Casuística e Métodos

3.1 Casuística

A grande maioria dos pacientes incluídos neste estudo foram avaliados no ambulatório de displasias esqueléticas da Unidade de Genética do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP). Este ambulatório foi criado em 2012 com o objetivo de avaliar e acompanhar as crianças com doenças ósseas genéticas. Três pacientes foram avaliados no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (CEGH-CEL) do Instituto de Biociências da USP pela orientadora deste projeto (F10862-1, F11381-1 e CC5139). Para quatro outros pacientes externos (F9182-1, F9763-1, F10397-1 e NACP-ma), os dados clínico-radiológicos foram discutidos com o médico responsável e o material (sangue e/ou DNA) foi encaminhado para a realização do estudo molecular.

A seleção dos pacientes para inclusão neste estudo requeria a presença de características clínico-radiológicas compatíveis com o diagnóstico de uma DE rara, com envolvimento predominante da coluna (braquiolmia) ou com envolvimento da coluna associado a acometimento epifisário e/ou metafisário (displasias espôndilo-epifisária, espôndilo-metafisária ou espôndilo-epi-metafisária).

Foram excluídos os pacientes diagnosticados com as DE mais frequentes de acordo com os dados epidemiológicos (Barbosa-Buck et al., 2012): as displasias do grupo I da Nosologia das doenças óssea genéticas (Bonafé et al., 2015), associadas ao gene *FGFR3* (displasia tanatofórica, acondroplasia e hipocondroplasia), e o grupo das osteogêneses imperfeitas (grupo 28).

Os pacientes incluídos neste estudo, sua identificação, gênero, idade à última avaliação ou do óbito estão listadas no Quadro 4.

Quadro 4: Casuística com identificação, gênero e idade à última avaliação ou idade ao óbito				
Número	Família	Identificação do indivíduo	Gênero	Idade à última avaliação (anos/meses) e óbito (*)
1	F1	CC5140	F	9a4m
2	F2	CC5383	F	7a7m
3	F3	F8792-1	F	5a9m
4	F4	F8212-1	F	14a11m
5	F5	F8245-1	M	21a3m
6	F6	F8791-1	F	3a4m
7	F7	F9779-1	F	Nascimento (17min)*
8	F8	F9782-1	M	11a5m
9	F9	F11381-1	F	15a
10	F10	F10845-1	F	1a5m
11	F11	F11278-1	F	6a5m
12	F12	F9763-1	F	?*
13	F13.1	DNC	M	20a3m
14	F13.2 (irmão)	JNC	M	35a5m
15	F14	CC5222	F	7a7m
16	F15	LSC	M	20a
17	F16	CC5490	M	8a5m
18	F17.1	CC5386	M	13a
19	F17.2 (irmã)	CC5527	F	5a11m
20	F18	CC5536	F	19a8m
21	F19	CC5557	M	9a2m
22	F20	F8771-1	M	5m*
23	F21	F9182-1	M	15a
24	F22	F9532-1	M	3a4m
25	F23	F9941-1	F	2a
26	F24	NACP-ma	M	6m
27	F25	WADRB	M	37a11m
28	F26	F10751-1	F	2a
29	F27	F8807-1	F	6a8m
30	F28	F10865-1	F	9a6m
31	F29	F10177-1	M	Nascimento*
32	F30	CC5139	M	5a9m
33	F31	CC5143	F	1a11m
34	F32	CC5138	F	-*
35	F33.1	CC5209	F	19a4m
36	F33.2 (mãe)	F8770-1	F	61a
37	F34	CC5387	M	6a
38	F35.1	CC5521	F	11m
39	F35.2 (pai)	CC5562	M	36a
40	F36.1	F9171-1	M	28a7m
41	F36.2	F9171-2	F	51a
42	F37	F9666-1	F	59a2m
43	F38	F10862-1	M	1a3m
44	F39	CC5232	F	18a9m
45	F40	F10998-1	M	12a11m
46	F41	CC5583	F	14a5m
47	F42	F9715-1	F	18a
48	F43.1	F8124-1	F	13a9m
49	F43.2 (prima)	F8123-1	F	13a

Quadro 4: Casuística com identificação, gênero e idade à última avaliação ou idade ao óbito				
Número	Família	Identificação do indivíduo	Gênero	Idade à última avaliação (anos/meses) e óbito (*)
50	F44.1	DHF1	M	17a9m
51	F44.2 (irmã)	DHF2	F	2a7m
52	F45	F8978-1	F	6a8m
53	F46	CC5627	M	15a10m
54	F47	F8413-1	M	8a5m
55	F48	F8980-1	M	3a11m
56	F49	F8477-1	F	7a
57	F50	F11297-1	M	5a11m
58	F51	CC5420	F	1a9m*
59	F52	F10329-1	M	12a10m
60	F53	F9781-1	M	3a2m
61	F54	CC5261	M	9a7m
62	F55	CC5427	M	16a5m
63	F56	F10397-1	F	6m
64	F57	F10254-1	F	18a8m
65	F58	F10576-1	M	22a7m

“*” = idade do paciente quando foi a óbito

3.2 Aspectos Éticos

Os indivíduos com diagnóstico clínico-radiológico de uma DE com envolvimento axial associado a acometimento epifisário e/ou metafisário foram convidados a participar deste estudo, assim como algum parente afetado.

Os pacientes foram incluídos neste estudo após a assinatura, pelo próprio indivíduo ou por seu responsável, do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo I). Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob os números 0558/10, com inclusão do aluno deste estudo em 10/05/2012 (Anexo II).

3.3 Análise Clínica

Para os pacientes já em seguimento e com diagnóstico de uma DE, foram revistos os dados clínicos e radiológicos realizados na Unidade de Genética e de Radiologia do Instituto da Criança do HC/FMUSP.

Para os pacientes novos, as seguintes avaliações foram realizadas, conforme a Figura 1.

Figura 1: Protocolo de atendimento e investigação dos pacientes com DE.

Para o cálculo dos valores de Z-score para dados de crescimento foi utilizado o software WHO Anthro (World Health Organization). Foi considerada baixa estatura os valores de Z-score inferiores a -2.

No caso dos pacientes que não foram avaliados no ambulatório de Displasias Esqueléticas do Instituto da Criança, os dados clínico-radiológicos foram analisados e, após a assinatura do TCLE, os pacientes foram incluídos no estudo.

Para a realização dos testes moleculares, os seguintes procedimentos foram seguidos:

- Foram coletados 4 mililitros (mL) de sangue em tubo contendo ácido etileno diaminotetracético (EDTA), para extração do DNA dos leucócitos do sangue periférico do indivíduo afetado pela DE.

- A coleta de sangue para extração do DNA estendeu-se aos pais no caso de haver necessidade de avaliar a segregação de uma determinada variante na família ou no caso de um parente afetado.

No caso de um dos pais ou de um parente não poder comparecer para a coleta de sangue, enviou-se um kit de coleta de saliva, para extração de DNA, conforme protocolo do fabricante (Oragene – DNA Genotek, subsidiária de OraSure Technologies, Bethlehem, Pensilvânia, EUA).

De acordo com os dados clínicos-radiológicos, os pacientes foram classificados em diferentes categorias diagnósticas, modificado de Bae et al. (2016):

- Categoria I: diagnóstico clínico-radiológico de certeza de uma DE específica, causada por variantes em um único gene com poucos éxons, com *hotspot* mutacional;
- Categoria IIA: diagnóstico clínico-radiológico de certeza de uma DE específica, causada por variantes em um gene com vários éxons ou com heterogeneidade lócica, o qual ou os quais estão contidos no painel NGS;
- Categoria IIB: diagnóstico clínico-radiológico de certeza de uma DE específica, causada por variantes em um gene com vários éxons ou com heterogeneidade lócica, o qual ou os quais não estão contidos no painel NGS;
- Categoria III: diagnóstico clínico-radiológico de uma DE sem o diagnóstico de uma entidade específica;
- Categoria IV: diagnóstico clínico-radiológico de uma DE específica, sem base molecular conhecida.

3.4 Técnicas Moleculares empregadas

Os estudos moleculares foram realizados no Laboratório do CEGH-CEL, o qual possui infraestrutura adequada para a realização das técnicas moleculares incluídas neste estudo. Como exceção, os testes moleculares dos pacientes CC5420, F8477-1 e LSC foram realizados em um serviço externo.

3.4.1 Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir de sangue periférico no robô de extração automático QIA Symphony com o kit de extração de DNA da própria Qiagen (Qiagen, Hilden, Alemanha). Algumas amostras foram extraídas a partir de saliva com o kit de extração de DNA de saliva da Oragene (Oragene – DNA Genotek, subsidiária de OraSure Technologies, Bethlehem, Pensilvânia, EUA).

As quantificações do DNA extraído e avaliação da sua pureza (razão das absorbâncias em comprimentos de onda 260/280nm maior que 1,80) foram analisadas no NanoDrop (Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA).

3.4.2 Sequenciamento Sanger

Foram desenhados e solicitados primers para a região de interesse de um determinado gene para o sequenciamento bidirecional. Seguiram-se amplificação por PCR convencional, purificação com ExoSAP-IT (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA), reação de sequenciamento com BigDye Terminator (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA), purificação final em coluna de sílica e aplicação do produto final no sequenciador ABI3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA) do CEGH-CEL.

3.4.3 Sequenciamento de nova geração (NGS)

O NGS empregou a técnica de captura de regiões específicas, seja pelo uso de um painel customizado para genes de interesse, seja pelo sequenciamento do exoma completo (WES).

3.5Paineis de genes customizados

Um painel customizado foi desenvolvido no início deste projeto no CEGH-CEL em 2012 incluindo 82 genes responsáveis por diferentes doenças ósseas genéticas, baseado na Nosologia de doenças ósseas genéticas vigente na época (Warman et al., 2011) e na população dos pacientes atendidos no ambulatório de Displasias Esqueléticas da Unidade de Genética do Instituto da Criança da FMUSP. Na evolução, três outras versões atualizadas foram empregadas nesta casuísta (P1, P2, P3 e P4). Tanto o P1 como o P2 foram realizados utilizando o kit Illumina *TruSeq custom enrichment*, que necessita de 1µg de DNA inicial e fragmentação via ultrassom com uso de sonicador Covaris (Covaris, Inc., Woburn, Massachusetts, USA). Posteriormente, em 2014 e 2015, o painel de genes foi revisado e a tecnologia de preparo de biblioteca e captura foi atualizada para o kit Illumina *Nextera Rapid Capture Custom Enrichment*, que demanda menor quantidade de DNA inicial (50ng) e possibilita fragmentação direta por método enzimático, prescindindo do sonicador. O painel mais atualizado ('P4') inclui 142 genes para doenças craniofaciais, doenças ósseas genéticas e doenças do tecido conectivo (Anexo III).

3.6Captura do exoma completo (WES)

Diferentes kits de captura para a realização de WES foram utilizados, sendo que para a maioria das amostras o mais empregado foi o kit Illumina *Nextera Rapid Capture Expanded Exome Kit*, que apresenta 62Mb de região alvo, incluindo todos os exons codificantes e UTRs de genes descritos no RefSeq, além de miRNAs.

3.7Preparo das bibliotecas

As bibliotecas foram preparadas seguindo as recomendações do fabricante dos respectivos kits (Illumina e Agilent). As amostras foram quantificadas tanto pelo kit *High Sensitivity DNA Analysys* do Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA), para determinação do

tamanho das bibliotecas, como por qPCR no instrumento LightCycler 480 (Roche - F. Hoffmann–La Roche AG, Basileia, Suíça), utilizando kits da empresa Kapa, KAPA SYBR FAST (Kapa Biosystems, subsidiária da Roche - F. Hoffmann–La Roche AG Basileia, Suíça), específicos para bibliotecas a serem utilizadas em sequenciadores Illumina. Após quantificação, os lotes de bibliotecas foram diluídos para 4nM e injetadas nos sequenciadores Illumina para a etapa de clusterização em quantidades de 17 a 20pMol.

3.8 Sequenciamento NGS

O sequenciamento de nova geração foi realizado nas plataformas MiSeq (painel de genes) e HiSeq (WES) da Illumina (Illumina, San Diego, Califórnia, EUA). As amostras foram preparadas para sequenciamento de acordo com os protocolos dos fabricantes e os kits de sequenciamento foram comprados da empresa Illumina de acordo com a quantidade necessária de sequenciamento por amostra (Illumina – TruSeq library preparation, TruSeq exome enrichment, TruSeq custom enrichment, Nextera Rapid Capture Expanded Exome Kit, Agilent SureSelect Human All Exon V6, MiSeq sequencing by synthesis, HiSeq sequencing by synthesis, Paired-End Cluster Generation). A clusterização das amostras corridas no MiSeq ou HiSeq modo '*Rapid*' foi realizada no próprio sequenciador, enquanto a clusterização das amostras de WES realizadas no HiSeq modo '*High Output*' foi realizada no cBot (robô de clusterização da própria Illumina).

Todas as amostras foram sequenciadas com o intuito de uma cobertura final nas regiões alvo de pelo menos 30x. Para garantir esse valor mínimo, os WES foram sequenciados em quantidade estimada a gerar 60-100x de cobertura média por amostra e os painéis foram sequenciados em quantidade estimada a gerar 100-200x de cobertura média por amostra. Diferentes kits de sequenciamento foram usados para cada amostra e sequenciador, mas todos geram sequências pareadas (*paired-end*) de tamanho 100x100 a 300x300 pares de bases.

3.9 Análise de bioinformática

Os cromatogramas gerados pelos sequenciadores do tipo Sanger (formato .abi) foram analisados visualmente com auxílio do *software* Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan, EUA). As variantes foram anotadas manualmente e informações sobre elas foram conferidas em *websites* de bancos de dados (MutationTaster, HGMD, ClinVar, OMIM).

As sequências geradas por NGS foram transformadas em formato fastq automaticamente pelos próprios sequenciadores ou em servidores com *software* disponibilizado pela empresa fabricante da máquina de sequenciamento (Illumina Bcl2Fastq – HiSeq). O *pipeline* de análise usou as sequências fastq de entrada para primeiramente alinhar com bwa (Burrows-Wheeler-Aligner) ou bwa-mem (Li & Durbin, 2009) em relação à referência humana hg19, gerando arquivos SAM (Sequence Alignment Map). Em seguida, com o programa *picard* (<http://broadinstitute.github.io/picard>), foi realizada a conversão de SAM para BAM (*Binary Alignment Map*) e foram marcadas as sequências provavelmente geradas por duplicatas de PCR (*mark duplicates*). A identificação de variantes de ponto e inserções/deleções (in/del) foi realizada com o programa GATK (Genome Analysis Tool Kit) do instituto Broad (McKenna et al., 2010), mais especificamente com a ferramenta ‘*Unified Genotyper*’. Processos de realinhamento baseado em variações de in/del locais e recalibração da qualidade das bases sequenciadas foram realizados com o próprio GATK, seguindo as recomendações de *Best Practices*. As variantes encontradas, armazenadas em arquivos do tipo VCF (variant call format), foram anotadas com o programa Annovar (Wang et al., 2010), utilizando múltiplos bancos de dados públicos, tanto aqueles criados no exterior (ExAC, gnomAD, 6500 exomes ESP, 1000 genomes, HGMD, NCBI ClinVar, NCBI dbSNP, Sift, PolyPhen2, Mutation Taster, NCBI RefSeq), como o desenvolvido em nosso país, no CEGH-CEL (ABraOM).

A anotação das variantes gerou arquivos em texto separados por tabulação ou vírgulas que foram analisados como planilhas de Excel.

Para a pesquisa de deleções ou duplicações grandes (variações do número de cópias, CNV), foram utilizados a análise visual de regiões candidatas no Integrative Genomic Viewer (IGV) do Broad Institute e o programa de computador NextGene da empresa SoftGenetics (SoftGenetics, State College, Pensilvânia, EUA), que aplica um algoritmo de cadeia oculta de Markov (HMM) para estimar o número de cópias de cada região cromossômica a partir da cobertura local normalizada para cada amostra.

3.10 Interpretação das variantes

Os critérios utilizados para a identificação de variantes causais no grupo de DEs estudadas foram:

1. Pesquisa de variantes raras, com priorização das não-sinônimas:
 - a. Frequência alélica $<0,5\%$ em bancos de dados populacionais públicos para doenças com um padrão monogênico de herança autossômico dominante;
 - b. Frequência alélica $<1\%$ em bancos de dados populacionais públicos para aquelas com um padrão de herança autossômico recessivo;
 - c. Frequência alélica <5 em 48 amostras locais distintas realizadas na mesma corrida de sequenciamento para doenças com um padrão de herança autossômico recessivo;
 - d. Frequência alélica de <3 (em 48 amostras locais) para mutações *de novo* (quando da realização de exoma de trio)
2. Variantes raras em genes já associados a DE
 - a. Na concordância entre a presença de uma variante no gene já associado à DE suspeita, busca desta variante em bancos de dados CLINVAR ou HGMD
 - i. Variante sabidamente patogênica ou provavelmente patogênica nos bancos de dados CLINVAR ou HGMD, considerou-se esta variante causativa do fenótipo

- ii. Variante nova, não descrita previamente, analisar tipo de mutação: se mutação de perda de função (*nonsense*, *frameshift*, *splicing*), desde que compatível com mecanismo de ação da doença, considerou-se esta variante causativa do fenótipo; se mutação *missense*, análise de sites de predição *in silico* de patogenicidade e conservação entre diferentes espécies, que no caso de favorável a dano a proteína em resíduo conservado, considerou-se como possivelmente associada ao fenótipo.
- 3. Variantes raras em genes não previamente associados a DE
 - a. Para uma DE definida com um padrão de herança autossômico recessivo em famílias com consanguinidade, priorização de variantes em homozigose
 - b. Para uma DE definida com um provável padrão de herança autossômico dominante, com um caso *isolado*, priorização das variantes *de novo* em análise de exoma de trio (probando e genitores).
- 4. No caso de pacientes com DE não definida, priorizou-se a busca por variantes raras em genes já associados a doenças ósseas. No encontro de variantes em heterozigose em genes associados a fenótipos com padrão de herança autossômico recessivo, os pais foram analisados para demonstrar que as mutações presentes no probando estavam em *trans*, ou seja, em heterozigose composta, através do seqüenciamento Sanger.
- 5. Nos casos familiares, sempre que possível a segregação da variante com o fenótipo foi realizada.

No caso de variantes com baixo critério de qualidade no NGS, o sequenciamento Sanger foi utilizado para confirmação da variante.

As variantes foram classificadas de acordo com as recomendações do Colégio Americano de Genética Médica (ACMG) de 2015 em patogênicas, provavelmente patogênicas, benignas, provavelmente benignas e de significado incerto (Richards et al., 2015).

Para a classificação de uma variante como já descrita em pacientes prévios com uma DE específica ou como nova, foram utilizados os seguintes bancos de dados públicos:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>

<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>

<http://101.200.211.232/skeletongenetics/>

A frequência populacional das variantes foi aferida no Genome Aggregation Database (gnomAD), do Broad Institute dos Estados Unidos, que conta com dados obtidos de mais de 123.000 exomas e 15.496 genomas de indivíduos que foram sequenciados como parte de vários estudos populacionais e de doenças específicas. Os indivíduos com doenças pediátricas graves, assim como seus parentes de 1º grau, foram excluídos deste banco de dados, permitindo que ele seja utilizado como uma referência das frequências alélicas para doenças graves.

gnomad.broadinstitute.org/

Também foram avaliadas variantes no banco de dados público referente à população brasileira do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

<http://abraom.ib.usp.br/>

3.11 Análise estatística

Os dados obtidos nesta tese foram dispostos sob a forma de uma análise descritiva com os valores de prevalência dos dados nominais em número absoluto e relativo.

3.12 Escolha do teste genético

O algoritmo de seleção de cada uma das técnicas (Sanger e NGS) está representado na Figura 2, de acordo com a classificação das categorias do item 3.3.

Figura 2: Algoritmo de abordagem molecular inicial, de acordo com o sistema de categorização (I-IV).

4 Resultados

Foram avaliados 65 indivíduos com DE pertencentes a 58 famílias. Destes, 35 eram do gênero feminino e 30 do gênero masculino (1,17:1), com média de idade de 14 anos e 5 meses e mediana de 9 anos e 2 meses.

Os dados clínicos estão representados no Quadro 5 e os dados radiográficos no Quadro 6. Imagens radiológicas, exemplificando os achados típicos em diversas DE estão dispostos no item 4.2.1.

Os resultados dos achados genéticos-moleculares estão representados no Quadro 7.

4.1 Resultados dos achados clínicos

Quadro 5: Dados clínicos da casuística de pacientes com displasias de acometimento espôndilo-epi-metafisário, com sua hipótese clinico-radiológica inicial, categoria clínica proposta, dados de crescimento e envolvimento dos diferentes segmentos corpóreos

Nº	Família	Identificação do indivíduo	Hipótese Diagnóstica Clínica (categoria)	Estatura (cm)		Membros Encurtados			Luxações	Pé Torto Cong.	Tronco Curto	Coluna		Face				Alterações				Última avaliação / óbito (idade)
				Nasc (Zesc.)	UA (Zesc.)	Rizo	Meso	Acro				H	C	P A	B F	P N D	F P	Oftal	Aud	Dent	Imuno	
1	F1	CC5140	DEEM tipo Strudwick - COL2A1 (IIA)	40 (-4,79)	88 (-7,48)	X	X				X	X						X				9a4m
2	F2	CC5383	DEEC - COL2A1 (IIA)	41 (-4,15)	92 (-5,68)	X					X	X		X								7a7m
3	F3	F8792-1	DEEC - COL2A1 (IIA)	43 (-2,98)	110 (-0,78)	X	X				X	X		X		X						5a9m
4	F4	F8212-1	Displasia espôndilo-periférica - COL2A1 (IIA)	42,5 (-3,26)	120 (-6,02)	X		X			X	X		X		X		X				14a11m

Quadro 5: Dados clínicos da casuística de pacientes com displasias de acometimento espândilo-epi-metafisário, com sua hipótese clínico-radiológica inicial, categoria clínica proposta, dados de crescimento e envolvimento dos diferentes segmentos corpóreos

Nº	Família	Identificação do indivíduo	Hipótese Diagnóstica Clínica (categoria)	Estatura (cm)		Membros Encurtados			Luxações	Pé Torto Cong.	Tronco Curto	Coluna		Face				Alterações				Última avaliação / óbito (idade)
				Nasc (Zesc.)	UA (Zesc.)	Rizo	Meso	Acro				H	C	P A	B F	P N D	F P	Oftal	Aud	Dent	Imuno	
			(IIA)																			
27	F25	WADRB	Displasia diastrófica (IIA)	45/ IG 33s (-1,85)	105 (-9,66)	X	X	X		X	X		X									37a11m
28	F26	F10751-1	DEE com múltiplas luxações congênitas (IIA)	41/ IG 37s (-4,15)	70,5 (-4,75)	X			X	X	X			X								2a
29	F27	F8807-1	Displasia de Rolland-Desbuquois (IIB)	40 (-4,79)	96,5 (-4,17)	X					X	X		X			X	X				6a8m
30	F28	F10865-1	Displasia de Desbuquois II (IIB)	34/IG 36s (-9,52)	92,5 (-6,88)	X					X	X		X		X						9a6m
31	F29	F10177-1	Atelosteogênese tipo 1 (IIA)	-	-	X	X	X		X	X			X		X						Nascimento*
32	F30	CC5139	Displasia Metatrópica (I)	49 (-0,37)	101,5 (-2,74)						X											5a9m
33	F31	CC5143	DEM tipo Kozlowski (I)		78 (-2,40)						X		X									1a11m
34	F32	CC5138	Displasia Metatrópica (I)	-	-									X		X						-*
35	F33.1	CC5209	DEM (III)	40 (-4,79)	127,3 (-5,44)	X					X	X	X									19a4m
36	F33.2 (mãe)	F8770-1	DEM (III)		124 (-5,96)	X					X	X	X									61a
37	F34	CC5387	Displasia Metatrópica – TRPV4 (I)	-	90 (-5,30)	X					X		X									6a
38	F35.1	CC5521	DEM tipo Kozlowski – TRPV4 (I)	52 (1,03)	76 (-1,47)	X					X	X	X	X		X						11m

Quadro 5: Dados clínicos da casuística de pacientes com displasias de acometimento espândilo-epi-metafisário, com sua hipótese clínico-radiológica inicial, categoria clínica proposta, dados de crescimento e envolvimento dos diferentes segmentos corpóreos

Nº	Família	Identificação do indivíduo	Hipótese Diagnóstica Clínica (categoria)	Estatura (cm)		Membros Encurtados			L u x a ç õ e s	Pé Torto Cong.	Tronco Curto	Coluna		Face				Alterações				Última avaliação / óbito (idade)
				Nasc (Zesc.)	UA (Zesc.)	Rizo	Meso	Acro				H	C	P A	B F	P N D	F P	Oftal	Aud	Dent	Imuno	
39	F35.2 (pai afetado)	CC5562	DEM tipo Kozlowski – TRPV4 (I)	-	121 (-7,38)	X					X	X	X									36a
40	F36.1	F9171-1	DEM - TRPV4 (IIA)	49 (-0,37)	135,5 (-5,56)	X		X			X		X									28a7m
41	F36.2 (mãe)	F9171-2	DEM - TRPV4 (I)	-	113 (-7,64)	X		X			X		X									51a
42	F37	F9666-1	DEM - TRPV4 (IIA)	-	118 (-6,87)	X		X			X	X	X									59a2m
43	F38	F10862-1	Displasia Metatrópica TRPV4 (IIA)		70 (-3,49)	X																1a3m
44	F39	CC5232	Pseudo acondroplasia (IIA)	45 (-1,92)	135 (-4,29)	X		X			X	X										18a9m
45	F40	F10998-1	Pseudo acondroplasia (IIA)	51 (0,38)	125 (-4,11)	X		X			X	X										12a11m
46	F41	CC5583	Pseudo acondroplasia (IIA)	47/ IG 7m (-0,98)	130 (-4,44)	X		X			X	X						X				14a5m
47	F42	F9715-1	Displasia epifisária múltipla (IIA)	-	144,5 (-2,81)	X		X			X	X										18a
48	F43.1	F8124-1	DEM-distrofia de cones e bastonetes (IV)	-	115,5 (-6,25)	X					X	X		X				X				13a9m
49	F43.2 (prima afetada)	F8123-1	DEM-distrofia de cones e bastonetes (IV)	45 (-1,92)	110,5 (6,63)	X					X	X		X				X				13a
50	F44.1	DHF1	DEM-distrofia de cones e bastonetes (IV)	-	112,5 (-8,21)	X					X	X		X				X				17a9m

Quadro 5: Dados clínicos da casuística de pacientes com displasias de acometimento espândilo-epi-metafisário, com sua hipótese clínico-radiológica inicial, categoria clínica proposta, dados de crescimento e envolvimento dos diferentes segmentos corpóreos

Nº	Família	Identificação do indivíduo	Hipótese Diagnóstica Clínica (categoria)	Estatura (cm)		Membros Encurtados			L u x a ç õ e s	Pé Torto Cong.	Tronco Curto	Coluna		Face				Alterações				Última avaliação / óbito (idade)
				Nasc (Zesc.)	UA (Zesc.)	Rizo	Meso	Acro				H	C	P A	B F	P N D	F P	Oftal	Aud	Dent	Imuno	
63	F56	F10397-1	Displasia de Desbuquois (IIA)		40 (-9,17)	X			X		X	X										6m
64	F57	F10254-1	Displasia associada a COL2A1 / MPS tipo 4 (IIA)	51 (0,67)	127,5 (-5,41)						X	X	X			X						18a8m
65	F58	F10576-1	MPS tipo 4 (IIA)	51 (0,38)	159 (-2,36)						X	X	X			X						22a7m
Total de achados clínicos						52	12	20	9	12	62	39	32	25	4	18	6	13	7	7	3	-

UA – última avaliação; Nasc – nascimento; H – hiperlordose; C – cifoescoliose; PA – perfil aplainado; BF – bossa frontal; FP – fenda palatina; PND – ponte nasal deprimida; IG - idade gestacional; * - óbito; a - microdontia com dentes espaçados; b - atraso da erupção dentária ‘-’ – sem dado; DEEC - displasia espândilo-epifisária congênita; DEM - displasia espândilo-metafisária; DEEM: displasia espândilo-epi-metafisária

4.2 Resultados dos achados radiológicos

Quadro 6: Descrição dos principais achados radiológicos dos pacientes com DE de acometimento espândilo-epi-metafisário desta casuística, indicando a hipótese clínico-radiológica inicial e os acometimentos dos diversos segmentos ósseos

Nº	Família	Identificação do indivíduo	Hipótese Diagnóstica Clínica	Epífise	Metáfise	Diáfise	Coluna				Costelas curtas	Ossos tubulares	Quadril (IDO)	Coxa Vara	Mãos (IDO)	Atraso na ossificação
							Hiperl.	Cifoesc.	Altura do corpo vertebral	Morfologia do corpo vertebral						
1	F1	CC5140	DEEM tipo Strudwick - COL2A1 (IIA)	X	X				X	forma de "pera"		encurtados				X
2	F2	CC5383	DEEC - COL2A1 (IIA)	X	X		X		X	forma de "pera"		encurtados	X	X		X

Quadro 6: Descrição dos principais achados radiológicos dos pacientes com DE de acometimento espândilo-epi-metafisário desta casuística, indicando a hipótese clínico-radiológica inicial e os acometimentos dos diversos segmentos ósseos

Nº	Família	Identificação do indivíduo	Hipótese Diagnóstica Clínica	Epífise	Metáfise	Diáfise	Coluna				Costelas curtas	Ossos tubulares	Quadril (IDO)	Coxa Vara	Mãos (IDO)	Atraso na ossificação
							Hiperl.	Cifoesc.	Altura do corpo vertebral	Morfologia do corpo vertebral						
3	F3	F8792-1	DEEC - COL2A1 (IIA)	X	X		X	X	X	anisospodilia		encurtados	X	X	X	X
4	F4	F8212-1	Displasia espândilo-periférica - COL2A1 (IIA)	X	X		X	X	X	protrusão anterior		encurtados	X	X	X	X
5	F5	F8245-1	DEEC - COL2A1 (IIA)	X	X		X	X	X	forma de "pera"		encurtados	X	X		X
6	F6	F8791-1	DEEM tipo Strudwick COL2A1 (IIA)	X	X		X	X	X	forma de "pera"		encurtados	X	X		X
7	F7	F9779-1	Acondrogênese tipo 2 - COL2A1 (IIA)	X	X		X		X	pouco ossificado	X	encurtados + alargamento metafisário	X	X	X	X
8	F8	F9782-1	DEEC - COL2A1 (IIA)	X	X		X	X	X	achatado		encurtados	X	X		X
9	F9	F11381-1	DEEC - COL2A1 (IIA)	X	X		X	X	X	irregularidade PVT		encurtados	X	X		X
10	F10	F10845-1	DEEC - COL2A1 (IIA)	X	X		X		X	ovoíde		encurtados	X	X		X
11	F11	F11278-1	Displasia de Kniest - COL2A1 (IIA)	X	X		X	X	X	fendas coronais		encurtados + alargamento metafisário	X	X	X	X
12	F12	F9763-1	Fibrocondro gênese tipo 1 (IIA)	X	X		X		X	ovoíde	X	encurtados c/ extrem. arredondadas	X			X
13	F13.1	DNC	Braquiolmia - oligodontia (I)	X				X	X	irregularidade PVT			X			
14	F13.2 (irmão)	JNC	Braquiolmia - oligodontia (I)	X				X	X	irregularidade PVT			X			
15	F14	CC5222	DEE com múltiplas luxações congênitas (I)	X			X	X		sinal da cobra/fendas coronais		luxações/ encurtados	X	X		X
16	F15	LSC	Braquiolmia - amelogênese imperfeita (I)					X	X	irregularidade PVT/fendas coronais						X
17	F16	CC5490	DEE com múltiplas luxações congênitas	X				X		sinal da cobra/fendas coronais		luxações/ encurtados	X	X		X

Quadro 6: Descrição dos principais achados radiológicos dos pacientes com DE de acometimento espôndilo-epi-metafisário desta casuística, indicando a hipótese clínico-radiológica inicial e os acometimentos dos diversos segmentos ósseos

Nº	Família	Identificação do indivíduo	Hipótese Diagnóstica Clínica	Epífise	Metáfise	Diáfise	Coluna				Costelas curtas	Ossos tubulares	Quadril (IDO)	Coxa Vara	Mãos (IDO)	Atraso na ossificação
							Hiperl.	Cifoesc.	Altura do corpo vertebral	Morfologia do corpo vertebral						
			(I)													
18	F17.1	CC 5386	DEE com múltiplas luxações congênitas (I)	X				X		sinal da cobra/fendas coronais		luxações/ encurtados	X	X		X
19	F17.2 (irmã)	CC5527	DEE com múltiplas luxações congênitas (I)	X				X		sinal da cobra/fendas coronais		luxações/ encurtados	X	X		X
20	F18	CC5536	Displasia diastrófica (IIA)	X	X			X		quadrado	X	encurtados c/ alargamento metafisário	X	X	X	avanço de IDO
21	F19	CC5557	DEE com múltiplas luxações congênitas (I)	X				X		sinal da cobra/fendas coronais		luxações/ encurtados	X	X		X
22	F20	F8771-1	Displasia diastrófica (IIA)	X	X			X		quadrado	X	encurtados c/ alargamento metafisário	X	X	X	avanço de IDO
23	F21	F9182-1	Braquiolmia (IIA)	X				X	X	irregularidade PVT			X			
24	F22	F9532-1	Displasia diastrófica (IIA)	X	X			X		quadrado	X	encurtados c/ alargamento metafisário	X	X	X	avanço de IDO
25	F23	F9941-1	Displasia diastrófica (IIA)	X	X			X		quadrado	X	encurtados c/ alargamento metafisário	X	X	X	avanço de IDO
26	F24	NACP-ma	Displasia diastrófica (IIA)	X	X			X		quadrado	X	encurtados c/ alargamento metafisário	X	X	X	avanço de IDO
27	F25	WADRB	Displasia diastrófica (IIA)	X	X			X		quadrado	X	encurtados c/ alargamento metafisário	X	X	X	avanço de IDO
28	F26	F10751-1	DEE com múltiplas luxações congênitas (IIA)	X			X	X		sinal da cobra/fendas coronais		luxações/ encurtados	X	X		X
29	F27	F8807-1	Displasia de Rolland-Desbuquois	X	X		X	X	X	anisospodilia		encurtados	X	X	X	X

Quadro 6: Descrição dos principais achados radiológicos dos pacientes com DE de acometimento espândilo-epi-metafisário desta casuística, indicando a hipótese clínico-radiológica inicial e os acometimentos dos diversos segmentos ósseos

Nº	Família	Identificação do indivíduo	Hipótese Diagnóstica Clínica	Epífise	Metáfise	Diáfise	Coluna				Costelas curtas	Ossos tubulares	Quadril (IDO)	Coxa Vara	Mãos (IDO)	Atraso na ossificação
							Hiperl.	Cifoesc.	Altura do corpo vertebral	Morfologia do corpo vertebral						
			(IIB)													
30	F28	F10865-1	Displasia de Desbuquois II (IIB)	X	X		X	X	X			encurtados	X		X	
31	F29	F10177-1	Ateleosteogênese tipo 1 (IIA)	X	X				X		X	encurtados/ hipoplasia umeral distal e fíbulas	X		X	X
32	F30	CC5139	Displasia Metatrópica – TRPV4 (I)	X	X		X	X	X	protrusão anterior	X	encurtados em halteres	X	X	X	X
33	F31	CC5143	DEM tipo Kozlowski – TRPV4 (I)	X	X		X	X	X	protrusão anterior		encurtados c/ alargamento metafisário	X	X	X	X
34	F32	CC5138	Displasia Metatrópica – TRPV4 (I)	X	X		X	X	X	protrusão anterior	X	encurtados em halteres	X	X	NA	X
35	F33.1	CC5209	DEM (III)		X			X		biconvexidade da PVT		irregularidade s metafisárias marginais	X	X		
36	F33.2	F8770-1	DEM (III)					X		Irregularidade da PVT		encurtados	X	X	NA	
37	F34	5387	Displasia Metatrópica – TRPV4 (I)	X	X		X	X	X	protrusão anterior	X	encurtados em halteres	X	X	X	X
38	F35.1	CC5521	DEM tipo Kozlowski – TRPV4 (I)	X	X		X	X	X	protrusão anterior		encurtados c/ alargamento metafisário	X	X	X	X
39	F35.2(pai afetado)	CC5562	DEM tipo Kozlowski – TRPV4 (I)	X	X		X	X	X	protrusão anterior		encurtados c/ alargamento metafisário	X	X	X	X
40	F36.1	F9171-1	DEM - TRPV4 (IIA)	X	X		X	X	X	protrusão anterior		encurtados c/ alargamento metafisário	X	X	X	X
41	F36.2 (mãe)	F9171-2	DEM - TRPV4 (I)	X	X		X	X	X	protrusão anterior		encurtados c/ alargamento metafisário	X	X	X	X
42	F37	F9666-1	DEM - TRPV4	X	X		X	X	X	protrusão		encurtados c/	X	X	X	X

Quadro 6: Descrição dos principais achados radiológicos dos pacientes com DE de acometimento espândilo-epi-metafisário desta casuística, indicando a hipótese clínico-radiológica inicial e os acometimentos dos diversos segmentos ósseos

Nº	Família	Identificação do indivíduo	Hipótese Diagnóstica Clínica	Epífise	Metáfise	Diáfise	Coluna				Costelas curtas	Ossos tubulares	Quadril (IDO)	Coxa Vara	Mãos (IDO)	Atraso na ossificação
							Hiperl.	Cifoesc.	Altura do corpo vertebral	Morfologia do corpo vertebral						
			(IIA)							anterior		alargamento metafisário				
43	F38	F10862-1	Displasia Metatrópica – TRPV4 (IIA)	X	X			X	X	protrusão anterior		encurtados em halteres	X	X		
44	F39	CC5232	Pseudo acondroplasia (IIA)	X	X		X		X	protrusão anterior/irregularidade PVT/ vertebra em diamante		encurtados/irregularidades metafisárias	X	X	X	
45	F40	F10998-1	Pseudo acondroplasia (IIA)	X	X		X		X	protrusão anterior/irregularidade PVT/ vertebra em diamante		encurtados/irregularidades metafisárias	X	X	X	
46	F41	CC5583	Pseudo acondroplasia (IIA)	X	X		X		X	protrusão anterior/irregularidade PVT/ vertebra em diamante		encurtados/irregularidades metafisárias	X	X	X	
47	F42	F9715-1	Displasia epifisária múltipla (IIA)	X			X		X	protrusão anterior		levemente encurtado	X	X	X	
48	F43.1	F8124-1	DEM-distrofia de cones e bastonetes (IV)		X		X		X	protrusão anterior		encurtados c/ alargamento metafisário	X	X	X	
49	F43.2 (prima afetada)	F8123-1	DEM-distrofia de cones e bastonetes (IV)		X		X		X	protrusão anterior		encurtados c/ alargamento metafisário	X	X	X	
50	F44.1	DHF1	DEM-distrofia de cones e bastonetes (IV)		X		X		X	protrusão anterior		encurtados c/ alargamento metafisário	X	X	X	
51	F44.2(ir mã)	DHF2	DEM-distrofia de cones e bastonetes (IV)		X		X		X	protrusão anterior		encurtados c/ alargamento metafisário	X	X	X	
52	F45	F8978-1	DEM tipo Sutcliffe (IV)		X			X		biconvexidade da PVT		irregularidades metafisárias marginais	X	X		
53	F46	CC5627	DEE Tarda (IIA)	X					X	biconvexidade da PVT			X	X		
54	F47	F8413-1	Displasia imuno-	X				X	X	irregularidade			X			X

Quadro 6: Descrição dos principais achados radiológicos dos pacientes com DE de acometimento espândilo-epi-metafisário desta casuística, indicando a hipótese clínico-radiológica inicial e os acometimentos dos diversos segmentos ósseos

Nº	Família	Identificação do indivíduo	Hipótese Diagnóstica Clínica	Epífise	Metáfise	Diáfise	Coluna				Costelas curtas	Ossos tubulares	Quadril (IDO)	Coxa Vara	Mãos (IDO)	Atraso na ossificação
							Hiperl.	Cifoesc.	Altura do corpo vertebral	Morfologia do corpo vertebral						
			óssea de Schimke (IIA)							PVT						
55	F48	F8980-1	Displasia imuno-óssea de Schimke (IIA)	X				X	X	ovoíde			X			X
56	F49	F8477-1	Síndrome CODAS (IV)	X	X			X		fendas coronais		hipoplasia unilateral de tíbia	X	X	X	X
57	F50	F11297-1	Displasia imuno-óssea de Schimke (IIA)	X				X	X	irregularidade PVT			X			X
58	F51	CC5420	Opsismodisplasia (I)	X	X		X		X	finos/forma de "wafer"	X	encurtados c/ alargamento metafisário	X	X	falanges/metacarpos muito curtos	X
59	F52	F10329-1	DEE (III)	X	X				X	protrusão anterior		encurtados c/ alargamento metafisário	X	X	X	X
60	F53	F9781-1	DEE (III)	X	X			X	X	ovoíde/protrusão anterior		encurtados radio/ulna/falanges	X		epífises cônicas	
61	F54	CC5261	Síndrome de Stüve-Wiedemann (I)		X	X		X				encurtados/encurvados	X	X	X	
62	F55	CC5427	Displasia de Desbuquois (I)	X	X				X	ovoíde		colo femural curto			luxação de falange	avanço de IDO
63	F56	F10397-1	Displasia de Desbuquois (IIA)	X	X				X	ovoíde		encurtados/fêmur proximal em chave inglesa	X	X	luxação de falange	avanço de IDO
64	F57	F10254-1	Displasia associada a COL2A1 / MPS tipo IV (IIA)	X			X	X	X	hipoplasia da PVT súpero-anterior			X			
65	F58	F10576-1	MPS tipo IV (IIA)	X				X	X	vértebras em cunha			X			
Total de achados radiológicos				56	47	1	34	46	49	-	13	-	63	50	32	36

IDO – idade óssea; PVT -placa vertebral terminal; Hiperl. - hiperlordose; Cifoesc. - cifoesciose; DEEC: displasia espândilo-epifisária; DEM: displasia espândilo-metafisária; DEEM: displasia espândilo-epi-metafisária

4.2.1 Imagens de achados radiográficos típicos de diversas DE

Figura 3: Radiografias de pelve AP: A (paciente F1 aos 3 anos, DEEM tipo Strudwick): Atraso de ossificação no pubis e epífises femurais; B (paciente F18 aos 7 anos, displasia diastrófica): epífises femurais pouco ossificadas e irregulares, em coxa vara, acetábulos irregulares; C (paciente F56 neonato, displasia de Desbuquois): hipercrecimento do trocanter inferior em detrimento do superior na porção proximal dos fêmures, imagem em "chave inglesa"; D (paciente F2 aos 4 anos e 5 meses, DEEC): atraso de ossificação do pubis e cabeças femurais, que são pequenas e multinucleadas; E (paciente F17.2 aos 4 anos e 8 meses, DEE com múltiplas luxações): coxa vara, com epífises femurais achatadas e pequenas; F (paciente F39 aos 10 anos, pseudoacondroplasia): epífises femurais significativamente pequenas e irregulares, com acetábulos irregulares.

Figura 4: Radiografias de coluna. A (paciente F1 aos 1 ano e 11m, DEEM do tipo Strudwick): platispondilia, com corpos vertebrais ovóides, em forma de "pera"; B (paciente F39 aos 11 anos, pseudoacondroplasia): vértebras com irregularidades das PVTs, algumas em "forma de diamante". Protrusões anteriores.; C (paciente F34 aos 4 anos, displasia metatrópica): platispondilia com cifose importante em transição tóraco-lombar

Figura 5: Radiografias de coluna panorâmica AP e P. A (paciente F21 aos 15 anos, com braquiolmia recessiva): Evidencia-se platisspondilia moderada, com irregularidade da PVT; B (paciente F36.1 aos 27 anos, com displasia metatrópica): Observa-se platisspondilia, com largura do corpo vertebral (em AP) maior que a distância entre os pedículos. Platisspondilia com irregularidades da PVT pode ser vista em P; C (paciente F53 aos 3 anos, com displasia acromesomélica tipo Maroteaux): Visualizam-se vértebras ovóides, com platisspondilia e protrusão anterior em transição tóraco-lombar; D (paciente F4 aos 10 anos, com displasia espândilo-periférica): Cifoescoliose com hiperlordose pode ser observado nas duas incidências, respectivamente. Os corpos vertebrais são platisspondílicos com irregularidade da PVT; E (paciente F57 aos 18 anos, com MPS tipo IV): Hiperlordose pode ser observada em P. Os corpos vertebrais lombares apresentam ossificação deficiente na porção súpero-anterior, em formato de "gancho"; F (paciente F46 aos 15 anos, com DEE forma tarda): Observa-se a presença de biconvexidade nos corpos vertebrais lombares.

Figura 6: Radiografias de MMII e mãos em AP. A (paciente F39 aos 19 anos, pseudoacondroplasia): geno recurvatum, com irregularidades epifisárias e alargamento metafisário; B (paciente F31 aos 1 ano e 6 meses, DEM tipo Kozlowski): ossos encurtados, com alargamento metafisário e epífises pequenas; C (paciente F6 aos 3 anos e 8 meses, DEEM tipo Strudwick): atraso de ossificação em pubis e epífises femurais proximais, metáfises alargadas e irregulares, e epífises pequenas nos joelhos; D (paciente F16 aos 4 anos, DEE com múltiplas luxações): luxação de joelho E, com epífises achatadas e irregulares; E (paciente F18 aos 7 anos, displasia diastrófica): falanges curtas e alargadas, primeiro metacarpo curto, com polegares subluxados (polegar "do caroneiro"), alargamento metafisário em ulna e rádio distais; F (paciente F36.1 aos 27 anos, DEM - *TRPV4*): falanges e metacarpós encurtados, com bases alargadas; G (paciente F40 aos 9 anos, pseudoacondroplasia): alargamento e irregularidade metafisária em rádio e ulna distais, metacarpós e falanges. Epífises pequenas e irregulares. Ossos do carpo são pequenos e irregulares.

Figura 7: Radiografias de coluna AP + P, pelve e MMII AP, MMSS e mãos AP. Fileira A (paciente F35.1 aos 11 meses, com DEM tipo Kozlowski): Observa-se cifose tóraco-lombar, platispondilia com protrusão anterior, pedículos posicionados medialmente. Ossos tubulares encurtados com metáfises alargadas e irregulares. Os íliacos são hipoplásicos e quadrados, com acetábulos horizontalizados e coxa vara. As mãos apresentam falanges encurtadas com metáfises alargadas; Fileira B (paciente F35.2, pai de F35.1, aos 36 anos, com o mesmo diagnóstico): Nota-se a progressão da cifoescoliose tóraco-lombar, com corpos vertebrais de altura diminuída, associados a alterações osteodegenerativas. Cabeças femurais são achatadas e irregulares, com acetábulo horizontalizado e coxa vara. Ossos tubulares são encurtados, com alargamento metafisário. As falanges e metacarpos são encurtados com bases alargadas.

4.3. Resultados dos achados genético-moleculares

Testes moleculares foram realizados em 64/65 indivíduos analisados. A paciente F33.2 (mãe de F33.1) não realizou a confirmação do encontro da variante presente em sua filha.

Os testes genéticos iniciais empregados foram: sequenciamento tipo Sanger em 16 pacientes (25%), sequenciamento de nova geração sob a forma de um painel customizado em 40 (62,5%) e sob a forma de WES em 8 (12,5%).

Em sete pacientes (11%) houve necessidade de um teste molecular adicional para definição do diagnóstico: em quatro pacientes que realizaram o painel customizado, WES foi empregado na sequência e em três pacientes que fizeram sequenciamento de Sanger, dois necessitaram de um novo sequenciamento para um gene distinto e, em um paciente, além de um novo sequenciamento tipo Sanger, foi realizado WES.

Recorrência entre irmãos e primos foi observada nas famílias F13, F17, F43 e F44, todas com consanguinidade de 1º grau entre seus genitores. Transmissão vertical do fenótipo foi encontrada nas famílias F33, F35 e F36.

Os resultados das análises moleculares realizadas encontram-se no Quadro 7.

Quadro 7: Achados genético-moleculares dos pacientes com DE de acometimento espôndilo-epi-metafisário desta casuística: hipótese diagnóstica inicial e grupo da Nosologia, sua confirmação, presença de consanguinidade nos genitores dos probandos, técnica molecular empregada, variantes genéticas causativas dos fenótipos analisados

Nº	Família	Identificação do indivíduo	Hipótese Diagnóstica Confirmadas/ (Grupo da nosologia)	Cons	Técnica Utilizada	Gene	NM	Variante com cDNA	Proteína	Estado	Variante não descrita na literatura
1	F1	CC5140	DEEM tipo Strudwick (2)*		Painel	COL2A1	001844	c.3364G>A	p.(Gly1122Arg)	het	Mesmo resíduo

Quadro 7: Achados genético-moleculares dos pacientes com DE de acometimento espôndilo-epi-metafisário desta casuística: hipótese diagnóstica inicial e grupo da Nosologia, sua confirmação, presença de consanguinidade nos genitores dos probandos, técnica molecular empregada, variantes genéticas causativas dos fenótipos analisados

Nº	Família	Identificação do indivíduo	Hipótese Diagnóstica Confirmadas/ (Grupo da nosologia)	Cons	Técnica Utilizada	Gene	NM	Variante com cDNA	Proteína	Estado	Variante não descrita na literatura
2	F2	CC5383	DEEC (2)		Painel	COL2A1	001844	c.2965C>T	p.(Arg989Cys)	het	Não
3	F3	F8792-1	DEEC → ** Rolland-Desbuquois		Painel/ WES	COL2A1 HSPG2	005529	c.12982G>A/c.5860G>A	p.(Ala4328Thr)/ p.(Gly1954Ser)	het comp	Não
4	F4	F8212-1	Displasia associada a COL2A1 (2)		Painel	COL2A1	001844	c.4139del	p.(Leu1380Argfs*55)	het	Não
5	F5	F8245-1	DEEC (2)		Painel	COL2A1	001844	c.2965C>T	p.(Arg989Cys)	het	Não
6	F6	F8791-1	DEEM tipo Strudwick (2)		Painel	COL2A1	001844	c.1718G>A	p.(Gly573Asp)	het	Sim
7	F7	F9779-1	Acondrogênese tipo 2 (2)		Painel	COL2A1	001844	c.3221G>A	p.(Gly1074Asp)	het	Não
8	F8	F9782-1	Displasia associada a COL2A1 (2)		Painel	COL2A1	001844	c.1043G>T	p.(Gly348Val)	het	Não
9	F9	F11381-1	DEEC (2)		Painel	COL2A1	001844	c.3589G>A	p.(Gly1197Ser)	het	Sim
10	F10	F10845-1	Displasia associada a COL2A1		Painel	COL2A1	Não identificadas variantes patogênicas				
11	F11	F11278-1	Displasia de Kniest		Painel	COL2A1	001844	c.905C>T	p.(Ala302Val)	het	Sim
12	F12	F9763-1	Fibrocondrogênese tipo 1 (3)		Painel	COL11A1	001854	c.75_76del	p.(Phe26Profs*5)	homo	Não
13	F13.1	DNC	Braquiolmia-oligodontia	X	Sanger/ Sanger	TRPV4 PAPSS2	004670	c.809G>A	p.Gly270Asp	homo	Sim
14	F13.2 (irmão)	JNC	Braquiolmia-oligodontia	X	Sanger/ Sanger	TRPV4 PAPSS2	004670	c.809G>A	p.Gly270Asp	homo	Sim
15	F14	CC5222	DEE com múltiplas luxações congênitas (4)		Painel	CHST3	004273	c.673A>G/ c.1148G>C	p.(Ser225Gly)/ p.(Arg383Pro)	het comp	Mesmo resíduo/ Sim
16	F15	LSC	Braquiolmia - amelogênese imperfeita	X	Sanger Sanger WES	TRPV4 PAPSS2 LTBP3	001130144.2	c.2216_2217del	p.(Gly739Alafs*7)	homo	Sim
17	F16	CC5490	DEE com múltiplas luxações congênitas	X	Sanger	CHST3	004273	c.718A>T	p.(Lys240*)	homo	Sim

Quadro 7: Achados genético-moleculares dos pacientes com DE de acometimento espôndilo-epi-metafisário desta casuística: hipótese diagnóstica inicial e grupo da Nosologia, sua confirmação, presença de consanguinidade nos genitores dos probandos, técnica molecular empregada, variantes genéticas causativas dos fenótipos analisados

Nº	Família	Identificação do indivíduo	Hipótese Diagnóstica Confirmadas/ (Grupo da nosologia)	Cons	Técnica Utilizada	Gene	NM	Variante com cDNA	Proteína	Estado	Variante não descrita na literatura
			(4)								
18	F17.1	CC5386	DEE com múltiplas luxações congênitas (4)	X	Sanger	CHST3	004273	c.142G>C	p.(Arg47Ser)	homo	Sim
19	F17.2 (irmã)	CC5527	DEE com múltiplas luxações congênitas (4)	X	Sanger	CHST3	004273	c.142G>C	p.(Arg47Ser)	homo	Sim
20	F18	CC5536	Displasia diastrófica (4)	X	Painel	SLC26A2	000112	c.835C>T/ c.2124_2125dup	p.(Arg279Trp)/ p.(Phe709Serfs*27)	het comp	Sim/Não
21	F19	CC5557	DEE com múltiplas luxações congênitas (4)		Sanger	CHST3	Não identificadas variantes patogênicas				
22	F20	F8771-1	Displasia Diastrófica (4)		Painel	SLC26A2	000112	c.835C>T/ c.1724del	p.(Arg279Trp)/ p.(Lys575Serfs*10)	het comp	Sim/Sim
23	F21	F9182-1	Braquiolmia – TRPV4 (4)		Painel	PAPSS2	004670	c.145+1G>C/c.809G>A	p.(?)/p.(Gly270Asp)	het comp	
24	F22	F9532-1	Displasia Diastrófica (4)		Painel	SLC26A2	000112	c.532C>T/ c.835C>T	p.(Arg178*)/ p.(Arg279Trp)	het comp	Sim/Sim
25	F23	F9941-1	Displasia Diastrófica (4)		Painel	SLC26A2	000112	c.835C>T/ c.2124_2125dup	p.(Arg279Trp)/ p.(Phe709Serfs*27)	het comp	Sim/Sim
26	F24	NACP-ma	Displasia diastrófica (4)		Painel	SLC26A2	000112	c.532C>T/ c.835C>T	p.(Arg178*)/ p.(Arg279Trp)	het comp	Sim/Sim
27	F25	WADRB	Displasia diastrófica (4)		Painel	SLC26A2	000112	c.532C>T/ c.835C>T	p.(Arg178*)/ p.(Arg279Trp)	het comp	Sim/Sim
28	F26	F10751-1	SED com múltiplas luxações (4)		Painel	CHST3	004273	c.141-1G>C/ c.660C>A	p.(?)/p.(Phe220Leu)	het comp	Sim/Res íduo vizinho
29	F27	F8807-1	Displasia de Rolland-Desbuquois (5)		WES	HSPG2	005529	c.9970G>A/ c.1429_1430insGGCCGTGGCACACTGATC ATCCGTGATGTGAAGGAGTCAGACCAGG GTGCCTT	p.(Gly3324Arg)/ p.(Tyr477Trpfs*9)	het comp	Não/ Não
30	F28	F10865-1	Desbuquois II → DEEM tipo Acan (6)		WES	ACAN	001135	c.6923G>A/ Intrônica: chr15:89414577C>A	p.(Arg2308His)/p.(?)	het comp	Não/?
31	F29	F10177-1	Ateleosteogênese tipo 1 (7)		Painel	FLNB	001457	c.605T>C	p.(Met202Thr)	het	Sim

Quadro 7: Achados genético-moleculares dos pacientes com DE de acometimento espôndilo-epi-metafisário desta casuística: hipótese diagnóstica inicial e grupo da Nosologia, sua confirmação, presença de consanguinidade nos genitores dos probandos, técnica molecular empregada, variantes genéticas causativas dos fenótipos analisados

Nº	Família	Identificação do indivíduo	Hipótese Diagnóstica Confirmadas/ (Grupo da nosologia)	Cons	Técnica Utilizada	Gene	NM	Variante com cDNA	Proteína	Estado	Variante não descrita na literatura
32	F30	CC5139	Displasia Metatrópica – TRPV4 (8)		Sanger	TRPV4	021625	c.2396C>T	p.(Pro799Leu)	het	Sim
33	F31	CC5143	DEM tipo Kozlowski – TRPV4 (8)		Sanger	TRPV4	021625	c.1781G>A	p.(Arg594His)	het	Sim
34	F32	CC5138	Displasia Metatrópica – TRPV4 (8)		Sanger	TRPV4	021625	c.2197T>G	p.(Trp733Gly)	het	Não
35	F33.1	CC5209	DEM → DEM tipo Sutcliffe (8)		Painel/ WES	FN1	00212482	c.506G>A	p.(Cys169Tyr)	het	Não
36	F33.2	F8770-1	DEM → DEM tipo Sutcliffe (8)								
37	F34	CC5387	Displasia Metatrópica – TRPV4 (8)		Sanger	TRPV4	001177428	c.1078A>G	p.(Lys360Glu)	het	Não
38	F35.1	CC5521	DEM tipo Kozlowski TRPV4 (8)		Sanger	TRPV4	021625	c.2389G>C	p.(Glu797Gln)	het	Mesmo resíduo
39	F35.2 (pai afetado)	CC5562	DEM tipo Kozlowski – TRPV4 (8)		Sanger	TRPV4	021625	c.2389G>C	p.(Glu797Gln)	het	Mesmo resíduo
40	F36.1	F9171-1	TRPV4 (8)		Painel	TRPV4	021625	c.2389G>A	p.(Glu797Lys)	het	Sim
41	F36.2 (mãe afetada)	F9171-2	TRPV4 (8)		Sanger	TRPV4	021625	c.2389G>A	p.(Glu797Lys)	het	Sim
42	F37	F9666-1	DEM Kozlowski - Metatrópica		Painel	TRPV4	Não identificadas variantes patogênicas				?
43	F38	F10862-1	DEM Kozlowski – Metatrópica (8)		Painel	TRPV4	021625	c.2396C>T	p.(Pro799Leu)	het	Sim
44	F39	CC5232	Pseudo acondroplasia (10)		Painel	COMP	000095	c.1417_1419del	p.(Asp473del)	het	Sim

Quadro 7: Achados genético-moleculares dos pacientes com DE de acometimento espôndilo-epi-metafisário desta casuística: hipótese diagnóstica inicial e grupo da Nosologia, sua confirmação, presença de consanguinidade nos genitores dos probandos, técnica molecular empregada, variantes genéticas causativas dos fenótipos analisados

Nº	Família	Identificação do indivíduo	Hipótese Diagnóstica Confirmadas/ (Grupo da nosologia)	Cons	Técnica Utilizada	Gene	NM	Variante com cDNA	Proteína	Estado	Variante não descrita na literatura
45	F40	F10998-1	Pseudo acondroplasia (10)		Painel	COMP	000095	c.1318G>C	p.(Gly440Arg)	het	Sim
46	F41	CC5583	Pseudo acondroplasia (10)		Painel	COMP	000095	c.1450T>G	p.(Cys484Gly)	het	Sim
47	F42	F9715-1	Displasia epifisária múltipla (10)		Painel	COMP	000095	c.887C>T	p.(Pro296Leu)	het	Mesmo resíduo
48	F43.1	F8124-1	DEM-distrofia de cones e bastonetes	X	WES	PCYT1A	005017	c.968dup	p.(Ser323Argfs*38)	homo	Sim
49	F43.2 (prima afetada)	F8123-1	DEM-distrofia de cones e bastonetes	X	WES	PCYT1A	05017	c.968dup	p.(Ser323Argfs*38)	homo	Sim
50	F44.1	DHF1	DM-distrofia de cones e bastonetes (12)	X	WES	PCYT1A	005017	c.385G>A	p.(Glu129Lys)	homo	Sim
51	F44.2 (irmã)	DHF12	DM-distrofia de cones e bastonetes (12)	X	WES	PCYT1A	005017	c.385G>A	p.(Glu129Lys)	homo	Sim
52	F45	F8978-1	DEM tipo Sutcliffe (12)		WES	FN1	212482	c.778T>G	p.(Cys260Gly)	het	Não
53	F46	CC5627	DEE Tarda (13)		Painel	TRAPPC2	014563	IVS2 + 5C>A	p.(?)	hemi	Sim
54	F47	F8413-1	Displasia imuno-óssea de Schimke (13)		Painel	SMARCAL1	014140	c.428T>G/ c.2291del	p.(Leu143*)/ p.(Glu765Argfs*47)	het comp	Não/ Não?
55	F48	F8980-1	Displasia imuno-óssea de Schimke (13)		Painel	SMARCAL1	014140	c.1191del/ c.2291del	p.(Thr399Argfs*38)/ p.(Glu765Argfs*47)	het comp	Sim/Não
56	F49	F8477-1	Síndrome CODAS		WES	LONP1	004793	c.2009C>T	p.(Ala670Val)	homo	Não
57	F50	F11297-1	Displasia imuno-óssea de Schimke (13)		Painel	SMARCAL1	014140	c.863-2A>G/ c.2321C>A	p.(?)/p.(Ser774*)	het comp	Sim/Sim
58	F51	CC5420	Opsismodisplasia		Sanger	INPL1	001567	c.2122G>A/ c.94_121del	p.(Gly708Ser)/p.(Glu32Metfs*77)	het comp	Não/Sim

Quadro 7: Achados genético-moleculares dos pacientes com DE de acometimento espôndilo-epi-metafisário desta casuística: hipótese diagnóstica inicial e grupo da Nosologia, sua confirmação, presença de consanguinidade nos genitores dos probandos, técnica molecular empregada, variantes genéticas causativas dos fenótipos analisados

Nº	Família	Identificação do indivíduo	Hipótese Diagnóstica Confirmadas/ (Grupo da nosologia)	Cons	Técnica Utilizada	Gene	NM	Variante com cDNA	Proteína	Estado	Variante não descrita na literatura
59	F52	F10329-1	DEE→ opsismodisplasia		Painel/ WES	<i>INPPL1</i>	001567	c.94_121del/ c.2849_2862del	p.(Glu32Metfs*77)/ p.(Ala950Glyfs*14)	het comp	Sim/ Mesmo resíduo
60	F53	F9781-1	<i>COL2A1</i> → Acromesomélia tipo Maroteaux (16)	X	Painel	<i>NPR2</i>	003995	c.131G>A	p.(Arg44Gln)	homo	Não
61	F54	CC5261	Síndrome de Stüve-Wiedemann (18)	X	Painel	<i>LIFR</i>	DELEÇÃO	exons 15-20	p.(?)	homo	Não
62	F55	CC5427	Displasia de Desbuquois (20)	X	Sanger	<i>CANT1</i>	138793	c.734C>T	p.(Pro245Leu)	homo	Não
63	F56	F10397-1	Displasia de Desbuquois (20)		Painel	<i>CANT1</i>	138793	c.344_345del	p.(Thr115Argfs*67)	homo	Não
64	F57	F10254-1	Displasia associada a <i>COL2A1</i> / MPS tipo 4 (27)	X	Painel	<i>GALNS</i>	000512	c.181C>T	p.(Arg61Trp)	homo	Sim
65	F58	F10576-1	DEE / MPS tipo 4 → Mucopolidose 3	X	Painel/ WES	<i>GNPTAB</i>	024312	c.1514G>A	p.(Cys505Tyr)	homo	Sim

*Em negrito estão representados os diagnósticos que foram confirmados pelo teste molecular inicial empregado.

** → = diagnóstico final após testes moleculares

Cons. = consanguinidade;

DEE = displasia espondiloepifisária; DEEM = displasia espondiloepimetafisária; DEM = displasia espondilometafisária;

het = Heterozigose; het comp = Heterozigose composta; homo = Homozigose; hemi = Hemizigose

4.1 Descrição dos casos com DE de etiologia desconhecida e casos atípicos

4.1.1 PCYT1A

Foram avaliados quatro indivíduos de duas famílias com DEM com distrofia de cones e bastonetes. A família F44 é formada por dois irmãos (F44.1, masculino de 17 anos e F44.2, feminino de 2 anos), filhos de primos em primeiro grau (Figura 9). F44.2 nasceu a termo, com 2.645 g e 44 cm (z-score: -2,44) de comprimento. O comprimento de nascimento do irmão é desconhecido. Ambos apresentaram sintomas precoces de baixa visão e evoluíram com baixa estatura significativa desproporcionada, com geno varo. O estudo radiográfico do esqueleto dos irmãos evidenciou platispondilia com cifoescoliose no mais velho, encurtamento de ossos longos, alargamento metafisário e presença de espículas laterais e mediais na porção distal dos fêmures, e falanges e metacarpos discretamente encurtados (Figura 8-A e 8-C). À avaliação oftalmológica de F44.1 revelou anomalias oftalmológicas estruturais, além de atrofia de retina e coróide, com eletrorretinograma (ERG) de campo total com ausência de atividade elétrica. Sua irmã (F44.2) apresentava achados oftalmológicos similares. O desenvolvimento cognitivo de ambos foi normal e não apresentavam dismorfismos faciais. Foi realizada a pesquisa do perfil lipídico da família F44, que mostrou redução discreta dos níveis lipídicos em F44.1: triglicerídeos (TG) de 70 e 149 mg/dl e colesterol total de 107 mg/dl (HDL 36 mg/dl) e 156 mg/dl (HDL 27 mg/dl) em F44.1 e F44.2, respectivamente. As ultrassonografias abdominais foram normais.

Figura 8: Radiografias de coluna total P + AP, pelve, fêmures, tíbias e fíbulas, antebraço e mãos em AP. A: paciente F44.2 aos 4 meses, B: paciente F43.1 aos 11 anos e C: paciente F44.1 aos 17 anos. Observa-se platispondilia com vértebras ovóides (F44.2) e protrusão anterior em (F43.1). Cifoescoliose pode ocorrer em indivíduos mais velhos (F44.1). Na pelve, evidencia-se estreitamento do nó isquiático é observado (F44.2), assim como coxa vara (F43.1 e F44.1). Alargamento com irregularidades metafisárias ser observado nos 3 pacientes. Espículas laterais e mediais podem ser vistas nos fêmures distais. Deformidade progressiva dos MMII, em geno varo, pode ser evidenciada ao comparar os indivíduos de idades diferentes. As mãos mostram encurtamento discreto de metacarpos e falanges.

A família (F43) é composta por duas primas distantes afetadas, ambas, produtos de casamentos consanguíneos (Figura 9). A paciente F43.1, uma menina de 13 anos, nascida a termo com peso de 2.800g e comprimento desconhecido e sua prima F43.2 de 17 anos, também nascida a termo, com 2.250g de peso e 45 cm (z-score: -2,44) de comprimento. As pacientes evoluíram com geno varo progressivo a partir de 1 ano de idade, baixa estatura grave, desenvolvimento cognitivo normal, sem dismorfismos faciais e miopia leve, sem queixas de visão. Ambas apresentaram fundoscopia inicial normal. O exame radiográfico realizado aos 11 e 14 anos, evidenciou alterações semelhantes às encontradas na família F44 (Figura 8-B). Como a família F43 não apresentava sintomas oftalmológicos, foi realizada nova avaliação oftalmológica com os seguintes achados: F43.1: mácula com brilho foveal diminuído, sem sinais de atrofia, e acuidade visual de 20/20 em ambos os olhos; F43.2: adelgaçamento da região macular retiniana em AO, acuidade visual de 20/30 no OD e 20/40 no OE. Ambas apresentavam adelgaçamento da retina. O ERG, realizado apenas em F43.2, mostrou a resposta escotópica no limite inferior da normalidade e as ondas da fase fotópica significativamente diminuídas, sugerindo disfunção de cones. O perfil lipídico realizado mostrou níveis discretamente reduzidos: triglicerídeos de 80 e 33 mg/dl, em F43.1 e F43.2 respectivamente, além de colesterol total de 141 mg/dl (HDL 21 mg/dl) e 121 mg/dl (HDL 31 mg/dl), em F43.1 e F43.2 respectivamente.

Foi realizado o sequenciamento completo do exoma dos quatro indivíduos, priorizando as variantes encontradas em homozigose, já que a suspeita diagnóstica de DEM-distrofia de cones e bastonetes tem herança autossômica recessiva e as duas famílias reportavam consanguinidade. O único gene em comum entre as duas famílias, que apresentou variantes com essas condições, foi o *PCYT1A* (OMIM 123695), até o momento não envolvido com doenças genéticas em humanos. As pacientes F43.1 e F43.2 apresentaram a variante c.968dupG (p.Ser323Argfs*38), em homozigose, enquanto os irmãos F44.1 e F44.2 apresentaram a variante c.385G>A (p.Glu129Lys), também em homozigose. As duas mutações foram confirmadas por Sanger nos quatro indivíduos afetados, assim como em heterozigose em seus pais. (Figuras 7 e 8).

Figura 9: Heredograma da família F43 à E, mostrando consanguinidade parental e a segregação da mutação de maneira autossômica recessiva. Cromatograma do sequenciamento mostrando a mutação *c.968dupG* (Ser323Argfs*38), identificada na família F43 (modificado de Yamamoto et al., 2014).

Figura 10: Heredograma da família F44 à E, mostrando consanguinidade parental e a segregação da mutação de maneira autossômica recessiva. Cromatograma do sequenciamento, mostrando a mutação *c.385G>A* (Glu129Lys), identificada na família F44 (modificado de Yamamoto et al., 2014).

4.1.2 FN1

Foi avaliada uma paciente do sexo feminino (F45), filha de pais não consanguíneos, nascida de parto pré-termo (idade gestacional – IG: 36 semanas), com peso de nascimento de 2060g, estatura 43,5cm (z-score:-2,70) e PC de 43,5cm, sem intercorrências. A criança evoluiu com bom DNPM, baixa estatura, geno varo e cifoescoliose. O estudo radiográfico do esqueleto evidenciou cifoescoliose com platispondilia discreta, tíbias varas de Blount e lesões metafisárias com áreas escleróticas radiolucientes de permeio de localização distais em tíbias, fíbulas, rádio E e ulna, além de proximais mediais em tíbias e úmero E (Figura 11). Consta em seu histórico médico, uma fratura espontânea do tornozelo E aos 4 anos, cirurgia de correção de geno varo aos 5 anos e cirurgias para correção de cifoescoliose com colocação de hastes telescópicas. Em sua última avaliação, mediu 101 cm (z-score: -3,41). Baseado nos achados clínico-radiográficos, a paciente foi diagnosticada com DEM, com possíveis lesões metafisárias sugestiva do tipo Sutcliffe ou *corner fractures*, condição para a qual não se conhecia a etiologia molecular ao início do estudo. A estratégia empregada para identificar o gene responsável por essa DE foi o sequenciamento completo do exoma do trio (paciente e genitores), uma vez que os casos descritos na literatura sugeriam um padrão de herança autossômico dominante. Foram encontradas duas variantes *de novo* (Quadro 8).

Quadro 8: Resultado da reanálise do sequenciamento do exoma de F45.

Posição Cromossômica	Gene (NM)	Função do gene	Éxon	cDNA	Proteína	gnomAD	ABraOM	PolyPhen-2	SIFT	MT
chr2: 216.292.969	<i>FN1</i> (212482)	Codifica uma proteína da matriz extracelular	6	c.778T>G	p.(Cys260Gly)	Ausente	Ausente	0.999 (D)	D	DC
chr7: 100.331.835	<i>ZAN</i>	Codifica uma proteína de membrana nos espermatozoides.			-	Ausente	Ausente	NI	NI	NI

gnomAD: *Genome Aggregation Database*; ABraOM: *Brazilian genomic variants*; MT: *Mutation taster*; B: benign (benigno); D: *damaging* (deletério); DC: *disease causing* (patogênico); NI: não informado; PD *probably damaging* (provavelmente patogênico); P: patogênica; Poli (polimorfismo).

O gene *FN1* (OMIM135600) codifica a fibronectina, uma glicoproteína que está presente nos fluidos extracelulares, tecidos conectivos e membranas basais. Já o gene *ZAN* (OMIM 602372) codifica uma proteína de membrana do

espermatozóide. Desta forma, o gene *FN1* foi considerado como gene candidato responsável pelo fenótipo da DE presente em F45.

Figura 11: Paciente F45, estudo radiográfico aos 3 anos e 9 meses; A e B (coluna total AP + P): Cifoescoliose, corpos vertebrais apresentam discreta platispondilia, com aparente biconvexidade de PVT; C e D: Epífises preservadas. Alargamento metafisário, com irregularidades marginais (*corner fractures*), mais evidentes nas metáfises proximais das tíbias; E e F: Irregularidades metafisárias marginais em rádio e ulna distais e úmero proximal.

A família F33, filha F33.1 e sua mãe F33.2, apresentava características semelhantes, com quadro de baixa estatura, cifoesciose e acometimento espôndilo-metafisário ao exame radiológico (Figura 10). F33.1, filha de casal não consanguíneo, nasceu de parto cesariana pré-termo (IG: 7 meses), estatura de nascimento de 40 cm (z-score: -4,79). Durante a última avaliação, aos 19 anos e 4 meses, sua estatura foi de 127,3 cm (z-score: -5,44). A estatura final da paciente F33.2 foi 124 cm (z-score: -5,95). A hipótese diagnóstica inicial, baseada nos achados clínicos-radiológicos (Figura 12) foi de DEM sem uma forma específica definida, sendo classificadas na categoria III. O teste de escolha foi o painel de genes, que não identificou variantes patogênicas relacionadas às DEM conhecidas. Como complementação da investigação, foi realizado o sequenciamento do exoma de F33.1, mais uma vez sem identificação de variantes patogênicas em genes associados a DE.

Figura 12: Paciente F33.1, estudo radiográfico aos 17 anos e 7 meses; A (pelve AP): Coxa vara grave, com colo femoral curto e cabeça femoral irregular. Observa-se báscula de bacia; B (mãos AP): falanges e metacarpos discretamente encurtados; C (coluna tóraco-lombar P): altura dos corpos vertebrais preservada, com irregularidade da PVT; D (joelhos e pernas AP c/carga): Irregularidades metafisárias marginais (residuais) em fêmures distais e tíbias proximais. Ossos longos discretamente encurtados e incongruência discreta do joelho D.

Na reanálise do WES realizado em F33.1, após a identificação da variante em *FN1* na paciente F45, foi encontrada uma variante c.506G>A

(p.Cys169Tyr) em heterozigose, no gene *FN1* em F33.1 (Quadro 9). A mãe (F33.2) ainda não realizou confirmação molecular.

Quadro 9 – Resultado da reanálise do sequenciamento do exoma de F33.1.

Posição Cromossômica	Gene (NM)	Função do gene	Éxon	cDNA	Proteína	gnomAD	ABraOM	PolyPhen-2	SIFT	MT
Ch2: 216.296.597	<i>FN1</i> (212482)	Codifica uma proteína da matriz extracelular	4	c.506G>A	p.(Cys169Tyr)	Ausente	Ausente	1,0 (D)	D	DC

gnomAD: *Genome Aggregation Database*; ABraOM: *Brazilian genomic variants*; MT: *Mutation taster*; B: benign (benigno); D: *damaging* (deletério); DC: *disease causing* (patogênico); NI: não informado; PD *probably damaging* (provavelmente patogênico); P: patogênica; Poli (polimorfismo).

4.1.3 INPPL1

Uma criança do gênero feminino (F51), nascida de parto cesariana, com 37 semanas de IG, 2330 g de peso de nascimento, 38 cm (z-score: -6,17) de comprimento e PC: 36,5cm foi avaliada em nosso serviço. Ao exame clínico apresentava baixa estatura desproporcionada, com encurtamento rizomélico, tronco curto, com mãos e pés significativamente encurtados. Os achados radiográficos incluíam: atraso global da ossificação, ossos tubulares encurtados, com alargamento metafisário, vértebras finas e pouco ossificadas, em forma de "wafer". As falanges, metacarpos e metatarsos eram muito curtos com alargamento metafisário (Figura 13). A criança apresentou episódios recorrentes de pneumonia e insuficiência respiratória, evoluindo para óbito com 1a 9m.

Figura 13: Paciente F51 estudo radiográfico aos 7 meses, A tórax e MMSS, AP: Observa-se ossos tubulares encurtados com alargamento metafisário, tórax curto com vértebras torácicas finas e pouco ossificadas. As falanges e metacarpos das mãos são significativamente curtos; B pés, AP: Metatarsos e falanges encurtados e pouco ossificados, com alargamento metafisário; C coluna panorâmica, P: platisspondilia importante, com vértebras pouco ossificadas; D: pelve e MMII, AP: ilíaco, ísquio e pubis pequenos e pouco ossificados. Ossos tubulares são encurtados, sem ossificação de epífises.

O diagnóstico clínico-radiológico proposto foi de opsismodisplasia e o sequenciamento por Sanger do gene *INPPL1* foi realizado em parceria com um laboratório externo. Foram identificadas duas mutações: c.2122G>A (p.Gly708Ser) e c.94_121del (p.Glu32Metfs*77), em heterozigose no gene *INPPL1*, confirmando o diagnóstico.

O paciente F52, filho de casal jovem e não consanguíneo, nascido a termo (40 semanas de IG), de parto cesariana com 2695 g de peso, 47 cm (z-score: -1,11) de comprimento e com PC: 33cm, evoluiu com baixa estatura e desproporção de membros, mais evidente a partir dos 3 anos. O estudo radiográfico evidenciou encurtamento discreto de ossos longos com alargamento metafisário e epífises discretamente diminuídas, mais evidentes nas mãos, e platisspondilia com protrusão anterior (Figura 14).

Figura 14: Paciente F52 estudo radiográfico aos 12 anos e 10 meses, A coluna, AP + P: Observa-se platisspondilia, com protrusão anterior na transição tóraco-lombar; B pelve, AP: Colo femural é curto, com coxa vara e achatamento das epífises femurais proximais; C e E MMII, AP: Discreta irregularidade metafisária, com epífises de tamanho discretamente diminuído; D: MMSS, AP: Úmero, rádio e ulna discretamente encurtados; F mãos e pé D, AP: Metacarpos, metatarsos e falanges encurtados, de maneira mais evidente nas mãos.

O diagnóstico clínico-radiológico apontou para uma DEE não específica. Estes achados, associados a presença de características faciais com traços ligeiramente grosseiros, com nariz curto e filtro alongado, indicavam uma possível doença metabólica de depósito lisossomal, sendo inicialmente realizados exames bioquímicos e enzimáticos que se mostraram normais.

Foi optado por iniciar a investigação molecular pelo painel customizado de genes, que não encontrou variantes patogênicas em genes relacionados com DEs. Complementou-se o estudo molecular com o sequenciamento do exoma, que identificou as mutações c.94_121del (p.Glu32Metfs*77) e c.2849_2862del (p.Ala950Glyfs*14) (Figura 15) no gene *INPPL1*. A mutação c.94_121del (p.Glu32Metfs*77) havia sido identificada no caso anterior, com quadro típico de opsismodisplasia. O estudo por Sanger do paciente e da sua mãe (seu pai é falecido) confirmou a presença das duas mutações no paciente,

enquanto sua mãe apresentava apenas uma (c.94_121del (p.Glu32Metfs*77), indincado que as duas variantes estão em heterozigose composta em F52. Desta forma, F52 possui um quadro leve de opsismodisplasia (Quadro 10, Figura 14).

Quadro 10 – Resultado da reanálise do sequenciamento do exoma de F52.

Posição Cromossômica	Gene (NM)	Função do gene	Éxon	cDNA	Proteína	gnomAD	ABraOM	PolyPhen-2	SIFT	MT
Chr11:71.936.115	INPL1 (01567)	Via de sinalização iniciada por insulina, EGF, IGF-1 e PDGF	1	c.94_121del	p.(Glu32Metfs*77)	Ausente	Ausente	NI	NI	DC
Chr11:71.946.997	INPL1 (01567)	Via de sinalização iniciada por insulina, EGF, IGF-1 e PDGF	25	c.2849_2862del	p.(Ala950Glyfs*14)	Ausente	Ausente	NI	NI	DC

gnomAD: *Genome Aggregation Database*; ABraOM: *Brazilian genomic variants*; MT: *Mutation taster*; B: benign (benigno); D: *damaging* (deletério); DC: *disease causing* (patogênico); NI: não informado; PD *probably damaging* (provavelmente patogênico); P: patogênica; Poli (polimorfismo).

Figura 15: Resultado do exoma do paciente F52. Imagem do arquivo BAM no IGV da variante patogênica c.2849_2862del (p.Ala950Glyfs*14) no exon 25 do gene *INPL1*, que promove um novo codon de parada no próximo exon, o 26.

4.1.4 HSPG2

Em nossa casuística, a paciente (F27), filha de pais não consanguíneos, nasceu de parto cesariana, com IG: 38 semanas, peso de nascimento de 2770g e 40cm de comprimento (z-score:-4,79). A criança apresentou dificuldade na sucção devido à fenda palatina submucosa, corrigida com 1 ano e 6 meses. Ao exame físico apresentou baixa estatura com membros encurtados, face arredondada, perfil facial plano, micro/retrognatia e pé torto congênito bilateral. Realizou tenotomia do aquileu e quadril com 1 ano e 3 meses e 2 anos e 3 meses, respectivamente. O exame oftalmológico evidenciou nistagmo e alta miopia acima de 10 graus bilateralmente, com 1 ano de vida. Durante a última visita, F27 apresentava estatura de 96,5 cm (z-score: -4,17) com 6 anos e 8 meses. O estudo radiográfico mostrou ossos tubulares encurtados com alargamento e irregularidade metafisária. As epífises são pouco ossificadas (no quadril) e irregulares. Os corpos vertebrais apresentaram fendas coronais e defeitos de segmentação, irregularmente ao longo da coluna, com vértebras de tamanhos diferentes (anisospondilia) (Figura 16).

O diagnóstico clínico-radiológico apontava para uma forma de displasia dissegmentar relacionada ao gene *HSPG2*, a displasia de Rolland-Debuquois, alélica à condição de Silverman-Handmaker. Como o gene não constava no painel naquela ocasião, foi realizado o sequenciamento do exoma, que identificou a variante c.9970G>A (p.Gly3324Arg) em heterozigose no gene *HSPG2*. Como ainda restava encontrar uma variante para confirmar o diagnóstico molecular, compatível com a herança recessiva da displasia dissegmentar, os dados do exoma foram reanalisados em busca de rearranjos gênicos maiores. Para isso, utilizou-se um protocolo para busca de variantes de número de cópias, nos dados gerados pelo sequenciamento NGS, além da análise visual do arquivo BAM do gene *HSPG2* inteiro. Esta reanálise identificou a variante

c.1429_1430insGGCCGTGGCACACTGATCATCCGTGATGTGAAGGAGTCAG ACCAGGGTGCCTT (p.Tyr477Trpfs*9) em heterozigose, no gene *HSPG2*. As duas variantes foram confirmadas, em heterozigose, uma em cada genitor.

Figura 16: Paciente F27 estudo radiográfico aos 2 anos e 11 meses, A (coluna tóraco-lombar, AP): Observa-se cifoescoliose, com vértebras de tamanhos diferentes e vestígios de fendas sagitais; B (coluna tóraco-lombar P) Corpos vertebrais de diferentes alturas, alguns evidenciando fendas coronais, compatível com anisosspondilia; C (pelve, fêmures e joelhos, AP): Atraso de ossificação em fêmures proximais, com epífises pequenas e multinucleadas. Existe irregularidade acetabular, com espículas súpero-laterais. Os fêmures são encurtados e encurvados, com metáfises alargadas e irregulares, e epífises achatadas e irregulares. O mesmo é observado nas tíbias proximais.

A paciente F3 é filha de pais não consanguíneos, nascida de parto cesariana, a termo, com peso de 2940 g e 43 cm (z-score: -2,98). Ao exame físico apresentava baixa estatura com encurtamento rizomélico de membros, cifoescoliose, geno valgo, frouxidão ligamentar e perfil facial plano. O estudo radiográfico mostrava: ossos tubulares curtos com alargamento metafisário, e epífises pequenas e irregulares. Foi observado atraso de ossificação da epífise femural proximal, em contraste com a ossificação precoce de epífises dos pés. A coluna vertebral apresentava corpos vertebrais de tamanhos diferentes, alguns com vestígios de fendas coronais (Figura 17).

Figura 17: Paciente F3 estudo radiográfico com mês de vida (C) e 1 ano (A,B,C), A (coluna tóraco-lombar, P): Corpos vertebrais de diferentes alturas, com uma vértebra ovóide na transição tóraco-lombar, compatível com anisosspondilia; B (pelve e MMII, AP): Atraso de ossificação em fêmures proximais, com epífises pequenas e multinucleadas. Os ossos tubulares são encurtados e encurvados, com metáfises alargadas e epífises pequenas e irregulares; C (mão D, AP): falanges encurtadas com alargamento metafisário; D (MSD, AP): úmero, rádio e ulna encurtados com alargamento metafisário.

A hipótese inicial, baseada nos achados clínico-radiográficos, foi de uma DEE congênita, possivelmente ligada ao *COL2A1*. Portanto, a abordagem molecular inicial foi o painel customizado de genes, que não encontrou variantes patogênicas ou possivelmente patogênicas em genes relacionados às DEs. Foi realizado então, o sequenciamento do exoma do trio, que identificou duas variantes em heterozigose composta no gene *HSPG2*, c.12982G>A (p.Ala4328Thr) e c.5860G>A (p.Gly1954Ser). As demais variantes encontradas, em heterozigose composta, estão listadas no Quadro 11.

Quadro 11 – Resultado do sequenciamento do exoma de F3.

Posição Cromossômica	Gene (NM)	Função do gene	Éxon	cDNA	Proteína	gnomAD	ABraOM	PolyPhen-2	SIFT	MT
Chr1:22.150.130	<i>HSPG2</i> (005529)	Perlecano - proteoglicana de membranas basais	96	c.12982 G>A	p.(Ala4328 Thr)	0,0023	0,001642	0	B	Poli
Chr1:22.181.934	<i>HSPG2</i> (005529)	Perlecano - proteoglicana de membranas basais	47	c.5860G >A	p.(Gly1954 Ser)	0,00004	0,00082	0,001B	B	Poli
Chr4:37.848.703	<i>PGM2</i> (018290)	Fosfoglicomutase-2 - proteína citossólica	9	c.1159A>C	p.(Ile387Leu)	Ausente	Ausente	0,282B	D	DC
Chr4:37.857.299	<i>PGM2</i> (018290)	Fosfoglicomutase-2 - proteína citossólica	13	c.1673G >A	p.(Arg558His)	0,0004	0,00164	1,00PD	D	DC
Chr8:142.483.007	<i>MROH5</i>	-	-	-	-	Ausente	Ausente			
Chr8:142.506.546	<i>MROH5</i>	-	-	-	-	0,0294	0,00328			
Chr11:119.216.137	<i>MFRP</i> (031433)	Regulador da via de sinalização WNT	5	c.634delC	p.(Leu212fs)	0,0041	Ausente	-	-	DC
Chr11:119.216.619	<i>MFRP</i> (031433)	Regulador da via de sinalização WNT	4	c.291A>G	p.Pro97Pro		Ausente	0,0B	B	B
Chr12:57.922.323	<i>MBD6</i> (052897)	-	10	c.2800C >T	p.Pro934Ser	0,0082	Ausente	0,057B	D	Poli
Chr12:57.922.962	<i>MBD6</i> (052897)	-	13	c.2957C >T	p.Pro986Leu	0,0243	Ausente	0,991D	D	DC

gnomAD: *Genome Aggregation Database*; ABraOM: *Brazilian genomic variants*; MT: *Mutation taster*; B: benign (benigno); D: *damaging* (deletério); DC: *disease causing* (patogênico); NI: não informado; PD *probably damaging* (provavelmente patogênico); P: patogênica; Poli (polimorfismo).

Dos genes listados, apenas *HSPG2*, *PGM2* e *MFRP* estão listados no OMIM. O gene *PGM2* (OMIM 172000) codifica uma fosfoglicomutase, sem associação com doenças em humanos. Mutações bialélicas com perda de função no gene *MFRP* (OMIM 606227) estão associadas à microftalmia/nanofthalmia. As variantes em *HSPG2* foram consideradas responsáveis pelo fenótipo de F3, bem mais leve do que os descritos nas displasias dissegmentares.

4.1.5 ACAN

A paciente F28, filha de pais não consanguíneos, nasceu de parto cesariana, pré-termo (36 semanas de IG), com 2110 g de peso, 34 cm (z-score: -9,52) de comprimento e PC: 32 cm. Ao exame físico apresentava baixa estatura desproporcionada, tórax curto, encurtamento rizomélico, com assimetria de MMII (MID > MIE em 2 cm), mãos e pés pequenos e bossa frontal com raiz nasal deprimida. A criança evoluiu com displasia coxo-femural bilateral, fazendo uso de órtese até o 8º mês. Realizou hemi-epifisiodesse em fêmur distal e tibia proximal no joelho D aos 7 anos, para correção progressiva do valgismo. O estudo radiográfico do esqueleto evidenciou: avanço da idade óssea, falanges curtas e alargadas e maior proeminência do trocanter inferior (Figura 18).

Figura 18: Paciente F28 estudo radiográfico com 4 anos e 3 meses. A (coluna tóraco-lombar, AP e P): Corpos vertebrais com irregularidade discreta da PVT, com resquícios de fendas coronais em algumas vértebras; B (MMSS, AP): Sem alterações epifisárias ou metafisárias significativas; C (pelve e MMII, AP): colo femoral curto com sua epífise discretamente achatada, as metáfises dos fêmures distais e tíbias proximais são discretamente alargadas e irregulares; D (pelve, AP): colos femurais curtos com suas epífises discretamente achatadas; E e F: (mãos e pés AP): Evidencia-se avanço da idade óssea através da ossificação dos ossos do carpo e epífises. Falanges são encurtadas, com alargamento metafisário.

Baseado nos achados clínicos-radiográficos, foi feita a hipótese de displasia de Desbuquois, mas a pesquisa dos genes *CANT1* e *XYLT1* não identificou mutações patogênicas ou possivelmente patogênicas pelo painel e pelo exoma, respectivamente. Este último exame, no entanto, identificou uma mutação *missense*, c.6923G>A (p.Arg230His), em heterozigose no gene *ACAN* (Quadro 12). A análise do arquivo BAM do sequenciamento pelo IGV (*Integrative Genome Viewer*) permitiu a identificação de uma outra variante, intrônica nesse gene, chr15:89.414.577C>A (Figura 19). O seqüenciamento de Sanger permitiu cofirmar as duas variantes na probanda e mostrar que cada uma delas estava presente em um genitor, indicando heterozigose composta em F28. A variante rara estava presente no pai da paciente com estatura de 163,5 cm (z-score de -1,99).

Quadro12: Resultado da reanálise do sequenciamento do exoma de F28.

Posição Cromossômica	Gene (NM)	Função do gene	Éxon	cDNA	Proteína	gnomAD	ABraOM	PolyPhen-2	SIFT	MT
Chr15:89.414.703	<i>ACAN</i> (001135)	Componente importante da matriz extracelular cartilaginosa	13	c.6923G>A	p.(Arg230His)	0,00034	0,00082	0,694 (P)	D	Poli

gnomAD: *Genome Aggregation Database*; ABraOM: *Brazilian genomic variants*; MT: *Mutation taster*; B: benign (benigno); D: *damaging* (deletério); DC: *disease causing* (patogênico); NI: não informado; PD *probably damaging* (provavelmente patogênico); P: patogênica; Poli (polimorfismo).

Figura 19: Imagem do arquivo BAM visualizado através do IGV, mostrando a variante intrônica chr15:89.414.577C>A no gene *ACAN*.

5 Discussão

Foram avaliados clínica e radiologicamente 65 pacientes de 58 famílias com diversas ostocondrodisplasias de acometimento espôndilo-epi-metafisários (Quadros 5 e 6). Os pacientes apresentavam idades entre neo-óbito e 61 anos, com mediana de idade de 9 anos e 2 meses. Por tratar-se de um hospital infantil, a maioria dos pacientes encontrava-se na faixa etária pediátrica. Não foi observado um predomínio significativo de gênero, com 30 indivíduos do sexo masculino e 35 do feminino, sendo compatível com os diferentes padrões de herança mendeliana encontrados na maioria das DE, cujos genes localizam-se em cromossomos autossômicos.

5.1 Aspectos Clínico-Radiológicos

Na avaliação geral dos dados clínicos (Quadro 5), o achado mais comum foi a baixa estatura, presente em 63/65 (97%) pacientes com *Z-score* variando de -2,36 a -11,30. Os indivíduos F3 e F38 foram os únicos com o *Z-score* entre 0 e -2. Este déficit de crescimento já estava presente ao nascimento em 27/49 (55%). Comparando o déficit de crescimento ao nascimento com aquele da data da última avaliação, observou-se uma acentuação da baixa estatura em praticamente todos os pacientes, com exceção de um caso com luxações congênicas (F17.2), no qual a presença destas anomalias articulares pode comprometer a correta aferição do comprimento, e na paciente F3, a qual apresentou recuperação na sua curva de crescimento, com pouco desvio da normalidade na última avaliação, aos 5 anos e 9 meses.

Dentre as anomalias osteoarticulares, por tratar-se de um grupo selecionado a partir do envolvimento axial do esqueleto, 62/65 (95%) dos pacientes apresentavam tronco curto com hiperlordose (37/65 – 57%) e cifoescoliose (31/65 – 48%). O acometimento apendicular traduziu-se por um encurtamento preferencialmente rizomélico em (37/65 – 57%) pacientes. Como esperado para os grupos que envolvem defeitos de sulfatação (*SLC26A2* e

CHST3) e displasias esqueléticas com múltiplas luxações (*CANT1*), luxações congêntas foram encontradas em todos os pacientes com diagnóstico de DEE com múltiplas luxações, displasia diastrófica e displasia de Desbuquois. A presença de pé torto congênito apresentou uma alta prevalência nos pacientes com displasia diastrófica e DEE com múltiplas luxações (Lamy e Maroteaux, 1960; Unger et al., 2010).

Em relação às anomalias extra-esqueléticas, alterações oftalmológicas foram as mais comuns 13/65 (20%) nos indivíduos, um sinal cardinal nas DEs associadas ao *COL2A1*, *HSPG2*, *PCYT1A* e *LONP1*. Também em *COL2A1* déficit de audição mostrou-se prevalente (4/9 – 44%). Alterações dentárias foram encontradas em 7/65 (11%), incluindo anomalias de número (oligodontia) na braquiolmia ligada ao *PAPSS2*, estrutura (amelogênese imperfeita e microdontia) na braquiolmia ligada ao gene *LTBP3* e DEE com múltiplas luxações relacionada ao *CHST3*, respectivamente, e finalmente atraso na erupção dentária na síndrome CODAS. Dentre as anomalias extra-esqueléticas associadas a uma DE, destaca-se a displasia imuno-óssea de Schimke pela gravidade dos achados, como a imunodeficiência celular, com infecções recorrentes, observadas em nossos pacientes, além de síndrome nefrótica, hipotireoidismo, cefaleia enxaqueca-like, fenômenos isquêmicos cerebrais, enteropatia e manchas lentiginosas (Hunter et al., 2010).

Nesta casuística, seis pacientes evoluíram para óbito, incluindo os pacientes F7 (acondrogênese tipo II), F12 (fibrocondrogênese tipo 1) e F29 (atelosteogênese tipo I), os quais apresentavam diagnóstico de DE consideradas letais, e os pacientes F20 (displasia diastrófica), F32 (displasia metatrópica) e F51 (opsismodisplasia), durante a lactância. As últimas três DE podem apresentar um tronco estreito, com restrição da capacidade respiratória levando a um comprometimento da sobrevida (Hall, 1996, Genevieve et al., 2005, Below et al., 2013).

Os achados radiográficos mostraram envolvimento da coluna em todos os casos, com expressividade variável (Quadro 6). Foram observadas alterações características nos corpos vertebrais descritas em diversas DE, como anomalia da altura do corpo vertebral (platispondilia) no grupo das braquiolmias, *TRPV4*, opsismodisplasia; anomalia de morfologia, como em

formato de pêra (*COL2A1*), em diamante (*COMP*), corpos ovóides (*COL11A1*), corpos quadrados (*SLC26A2*), fendas coronais (*LONP1*, *CANT1* e *CHST3*), biconvexidade da placa vertebral terminal (*TRAPPC2*) e hipoplasia da placa vertebral terminal súpero-anterior “em gancho” (*GALNS*) (Figura 5). Uma anomalia patognomônica das displasias dissegmentares, a anisosspondilia, foi encontrada na paciente F27, caracterizada por alteração do tamanho e forma dos corpos vertebrais (Figura 16). Anomalias epi-metafisárias foram encontradas na grande maioria dos casos. As anomalias metafisárias basicamente caracterizavam-se por um alargamento e, algumas vezes, com irregularidades e até um aspecto específico, como a presença de *corner fracture*. Já as alterações epifisárias mostravam epífises, pequenas, achatadas e irregulares, com diferentes graus de maturação (Figuras 3 e 6).

Algumas DE clássicas foram encontradas de forma recorrente na nossa casuística, particularmente as collagenopatias (*COL2A1*), aquelas decorrentes de defeitos de sulfatação (*CHST3*, *SLC26A2*, *PAPSS2*), as DE associadas ao *TRPV4*, a pseudoacondroplasia (*COMP*), a displasia imuno-óssea de Schimke (*SMARCA1*) e a displasia de Desbuquois (*CANT1*) (Quadro 5 e 6).

O grupo do *COL2A1* apresenta uma ampla variabilidade fenotípica, incluindo desde formas letais até formas leves, com pouco comprometimento ósseo e estatural (Terhal et al., 2015). Na nossa casuística, pelo fato dos pacientes estarem sendo avaliados em um hospital terciário, é provável que sejam encaminhados os casos mais graves e, desta forma, não foi possível encontrar uma variabilidade tão acentuada quanto à descrita na literatura. A maioria dos nossos pacientes avaliados apresentava o diagnóstico de DEEC (8/10), um paciente com um quadro letal, a acondrogênese tipo II e outro com a displasia de Kniest. Os aspectos radiológicos nos casos de DEEC foram os classicamente descritos na literatura, com anomalia acentuada da epífise proximal do fêmur, quadril com ilíacos curtos e corpos vertebrais ovóides (Figura 3 e 4).

Dentre o grupo dos defeitos de sulfatação, vale ressaltar a braquiolmia, neste caso causada por mutações nos dois alelos do gene *PAPSS2*. A braquiolmia é uma DE com acometimento basicamente do esqueleto axial, com platispondilia de graus variáveis. Mutações em três diferentes genes já foram

reconhecidas como responsáveis pelo fenótipo e assim, além do *PAPSS2*, variantes em heterozigose em *TRPV4* e nos dois alelos de *LTBP3* já foram encontrados em pacientes com esta DE. Na nossa casuística, quatro pacientes com braquiolmia foram avaliados, três em nosso serviço (F13.1, F13.2 e F15) e um externo (F21). O paciente F15 apresentava também amelogênese imperfeita. A associação desta última anomalia dentária com braquiolmia está relacionada ao gene *LTBP3* e o paciente F15 foi um dos indivíduos incluídos na identificação deste gene (Huckert et al., 2015). Nos dois primeiros pacientes (F13.1 e F13.2), além da braquiolmia, esses irmãos apresentavam outra anomalia dentária, a oligodontia. Nesses dois pacientes analisados, e também em F21 mutações no gene *PAPSS2* foram encontradas. Variantes de perda de função em *PAPSS2* foram descritas na literatura em mais de 10 pacientes, cujos achados radiológicos incluem principalmente a platisspondilia e um colo femoral encurtado (Miyake et al., 2012, Iida et al., 2013b). Um único indivíduo de origem turca foi descrito com anomalia dentária, a agenesia de um dente incisivo (Iida et al., 2013b). O fato de os dois irmãos aqui estudados apresentarem oligodontia, sugere que alterações neste gene também possam contribuir para a formação dentária. Por último, mutações em heterozigose em *TRPV4* também levam a um quadro de braquiolmia, cujos aspectos radiológicos não permitem a distinção entre alterações neste gene e no *PAPSS2* (Figura 5).

Nos outros casos com mutações em *TRPV4*, levando às denominadas DEEM tipo Kozlowski, displasia metatrópica e DEE tipo Maroteaux, um dos dois grupos mais prevalentes da nossa casuística (9 casos confirmados), observou-se a transmissão vertical em duas famílias (F35 e F36), o que permitiu avaliar a evolução em diferentes idades, incluindo adultos com 36 e 51 anos (F35.2 e F36.2), com acentuação da cifoescoliose e do genu valgo, comprometendo de forma significativa a deambulação dos indivíduos (Figura 7).

5.2 Aspectos genético-moleculares

Presença de consanguinidade foi relatada em nove famílias, sendo que a presença de mutações em homozigose foram encontradas em oito delas. O fato destas DEs com um padrão de herança autossômico recessivo serem muito raras, explica a alta taxa de consanguinidade (15,5%) observadas entre os genitores da nossa casuística. A paciente F18, embora seus genitores apresentem uma consanguinidade de 2o grau e ela seja afetada por uma DE com um padrão de herança autossômico recessivo – displasia diastrófica –, seu estudo molecular revelou a presença de duas mutações distintas no gene *SLC26A2*, compatíveis com uma heterozigose composta. Uma delas, a mutação p.Arg279Trp, é a variante mais frequente na displasia diastrófica na população caucasiana, responsável por quase 1/3 dos alelos. No banco de dados públicos de frequência alélica populacional (GnomAD), a prevalência é de 0,09%. Quando presente em associação com uma mutação que leva a formação de uma proteína truncada, a mutação com menor dano a proteína (p.Arg279Trp) tende a levar a um quadro mais brando, compatível com a displasia diastrófica ou epifisária múltipla recessiva e não ao quadro mais grave, como a acondrogênese tipo IB (Rossi & Superti-Furga, 2001).

Entre o grupo de DEs mais prevalentes neste estudo, as ligadas ao *COL2A1*, foram diagnosticadas em nove pacientes com oito mutações diferentes. Destas, cinco (5/8) envolveram a substituição de um resíduo de glicina, sendo todas elas do tipo *missense*. Este resultado está de acordo com a literatura, que descreve as mutações *missense*, muitas envolvendo resíduos de glicina, como as mais comumente encontradas em *COL2A1* (Deng et al., 2016). Um paciente (F7) com acondrogênese tipo 2, forma letal de collagenopatia tipo II, apresentou a mutação p.Gly1074Asp situada no domínio tripla-hélice da proteína. As mutações em resíduos de glicina na cadeia pró-alfa 1 de colágeno II, comprometem a montagem homotrimérica e a estabilidade da molécula, um efeito dominante negativo, frequentemente encontrado nos pacientes com fenótipos mais graves (Barat-Houari et al., 2016). Outra forma de fenótipo mais severo, a displasia de Kniest, foi diagnosticada em uma paciente (F11). A mutação encontrada p.(Ala302Val) introduz um dinucleotídeo

GT, que promove um sitio de splicing alternativo com 21 nucleotídeos a menos, resultando em uma proteína truncada (Chen et al., 1996).

As DEs ligadas ao gene *TRPV4* também foram prevalentes, com nove pacientes diagnosticados com formas de gravidade variável. Foram identificadas seis mutações diferentes, entre elas o conhecido hotspot mutacional Pro799, encontrado nos pacientes F30 e F38, cuja variante encontrada (p.Pro799Leu) está associada com displasia metatrópica clássica (Andreucci et al., 2011). As famílias F35 e F36 apresentaram mutações no mesmo resíduo, as variantes p.Glu797Gln e p.Glu797Lys, respectivamente.

Entre os defeitos de sulfatação, a DEE com múltiplas luxações congênitas foi diagnosticada em cinco pacientes de quatro famílias. Foram identificadas seis mutações diferentes em *CHST3*. A variante p.Arg47Ser, que promove um sitio putativo de splicing, assim como a variante Lys240*, foram encontradas em homozigose nas duas famílias que apresentavam consanguinidade, os irmãos F17.1/2 e o paciente F16, respectivamente. A maioria das variantes descritas até o presente são do tipo *missense* e a correlação genótipo-fenótipo não está bem estabelecida (Unger et al., 2010).

Diversos tipos de mutação foram encontrados na nossa casuística: 17 mutações *nonsense*, 38 mutações *missense*, 14 *frameshift*, 3 de *splicing*, 11 deleções e 2 intrônicas.

Das variantes encontradas, 37 foram consideradas novas, não descritas previamente em pacientes com as DE decorrentes de alterações nesses genes (Quadro 7). No estudo de DE sem base molecular conhecida (DEEM com distrofia de cones e bastonetes, DEM tipo *corner fractures*, e braquiolmia com amelogênese imperfeita), três genes foram identificados (*PCYT1A*, *FN1*, *LTBP3*), contribuindo para a caracterização das bases moleculares dessas doenças.

5.3 Tipos de mutação por grupo

No grupo como um todo, o encontro de variantes consideradas causativas da DE em questão, ocorreu, após o emprego de um teste molecular único ou com testes complementares em 61/64 (95,3%) pacientes. Esta

positividade está bem acima da descrita em outros trabalhos que utilizaram NGS, variando entre 22,2% (Polla et al., 2015) e 52,50% (Bae et al., 2016). Nesses trabalhos, o emprego do NGS foi através de um painel de genes customizado. Quando analisamos apenas os indivíduos que foram avaliados pelo painel na nossa casuística, houve confirmação da hipótese clínica em 36/40 (90%).

Quando as DE são separadas pelas categorias utilizadas neste estudo, as mais frequentes (83%) foram aquelas das categorias I (grupos da Nosologia 4, 8, 14, 18, 20) e IIA (grupos da Nosologia 2, 3, 4, 7, 8, 10, 13, 20, 27), cujos aspectos clínico-radiológicos indicavam um diagnóstico específico com alto grau de assertividade. Os resultados moleculares iniciais (seja por Sanger, seja por um painel customizado de genes) mostraram uma positividade de 13/17 (76,4%) para a categoria I e 32/36 (89%) para a categoria IIA. Ressalta-se aqui que dentre os oito pacientes nos quais os testes iniciais não foram efetivos, realizou-se um teste molecular complementar em quatro indivíduos (F3, F13.1, F13.2, F58) e, em um paciente, dois exames adicionais, Sanger e WES (F15), obtendo sucesso com essas estratégias. Desta forma, a positividade final para as categorias I e IIA é de 50/53 (94%), valor superior ao obtido por Bae e colaboradores (2016) nos pacientes com hipóteses de alta qualidade (74%). Vale ressaltar que para os pacientes (F13.1, F13.2, F15), a consanguinidade em ambos os casos e a recorrência em irmãos na família 13, sugeriam um padrão de herança autossômico recessivo da braquiolmia. Como no início do estudo o gene *PAPSS2* não havia sido descrito, o primeiro teste realizado visava avaliar o gene *TRPV4*, responsável pela forma dominante de braquiolmia, com resultados negativos. Posteriormente à descoberta do gene *PAPSS2*, o sequenciamento de Sanger deste gene revelou variantes patogênicas na família 13. Além disso, no paciente F21, caso isolado na família e sem história de consanguinidade, a expectativa era de encontrar uma variante em heterozigose no gene *TRPV4*, mas o painel realizado permitiu a análise conjunta do *TRPV4* e do *PAPSS2*, com identificação de duas variantes neste último gene. O quadro radiológico deste paciente é indistinguível daquele decorrente de variantes em *TRPV4*, mostrando a importância da utilização de um painel de múltiplos genes que permite a análise conjunta de fenótipos

semelhantes. Neste caso, o risco de recorrência para os genitores deste indivíduo é consideravelmente maior (25%). O paciente F3 da categoria II, assim como os dois pacientes da categoria IIB e III e os pacientes da categoria IV (todos realizaram WES), serão discutidos em maiores detalhes posteriormente.

Na categoria IIB, dois pacientes com hipótese inicial de displasia de Rolland-Desbuquois (F27) e displasia de Desbuquois tipo II (F28), foram submetidos a WES e variantes compatíveis com o diagnóstico inicial foram encontradas apenas na paciente F27. Na paciente F28 o resultado molecular apontou para um novo diagnóstico.

Três pacientes foram classificados na categoria III, sem um diagnóstico específico, sendo que em apenas um deles (F53), o painel permitiu estabelecer um diagnóstico definitivo para a sua DE. Uma variante em homozigose foi encontrada no gene *NPR2*, compatível com o diagnóstico de displasia acromesomélica tipo Maroteaux, que embora leve esta denominação, o envolvimento axial pode ser acentuado (Faivre et al., 2000). Desta forma, a positividade da abordagem molecular inicial foi de 1/3 (33%), bem abaixo das categorias anteriores. Os dois pacientes restantes tiveram seus diagnósticos fechados a partir do WES.

Na categoria IV, condições sem etiologia definida, o estudo de quatro pacientes com DEM com distrofia de cones e bastonetes, e um com diagnóstico de DEM tipo *corner fractures*, permitiu a identificação de dois genes novos responsáveis por essas condições, com uma positividade de 100%. O sucesso obtido nesta categoria pode decorrer de uma seleção criteriosa dos casos nos quais o WES foi a técnica inicial empregada. Em uma das doenças, com padrão de herança autossômica recessiva (DEM com distrofia de cones e bastonetes), havia duas famílias com recorrência e consanguinidade, direcionando para mutações em homozigose em um gene único. No caso da paciente com DEM tipo *corner fractures*, como na literatura os casos descritos eram isolados, sugerindo um evento *de novo*, a estratégia empregada foi a realização de WES no trio (probando e genitores), limitando de forma drástica o número de variantes raras a ser analisado. O outro gene novo (*LTBP3*)

identificado foi encontrado no paciente F15 da categoria I, com braquiolmia e amelogênese imperfeita.

5.3.1 PCYT1A

A DEM com distrofia de cones e bastonetes (OMIM 608940), autossômica recessiva, caracterizada por baixa estatura significativa, geno varo progressivo, platispondilia, irregularidades metafisárias e distrofia retiniana tipo cones e bastonetes, não tinha sua base genética conhecida até o início deste estudo.

Mutações de perda de função em *PCYT1A* foram encontradas em duas famílias (F43 e F44) da nossa casuística com DEM com distrofia de cones e bastonetes. Ao mesmo tempo, oito outros indivíduos de 6 famílias diferentes com o mesmo quadro clínico foram descritos por Hoover-Fong et al, 2014, fortalecendo a associação de variantes neste gene com o fenótipo desta DE. O gene *PCYT1A* não havia sido anteriormente descrito em associação com doenças genéticas em humanos.

Alguns meses depois da publicação dos artigos pelo nosso grupo e por Hoover-Fong et al. (2014), variantes bialélicas neste gene foram associadas a um quadro de lipodistrofia em duas pacientes, sem acometimento ocular e esquelético (Payne et al., 2014).

Este ano, mutações em heterozigose composta em *PCYT1A* foram identificadas em três pacientes italianos de duas famílias distintas e sem consanguinidade, com distrofia de retina, mas sem alterações esqueléticas documentadas (Testa et al., 2017) (Figura 20).

Neste curto espaço de tempo, mutações em *PCYT1A* foram associadas a fenótipos distintos ou com sobreposição parcial. As mutações descritas, *missense* ou *frameshift*, estão distribuídas pelos diversos domínios da proteína nas diferentes condições clínicas, não permitindo estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo precisa (Fig. 18).

O gene *PCYT1A* codifica a enzima colina-fosfato citidiltransferase A (CCT A), responsável por transformar a fosfato-colina (P-choline) em citidina-difosfato-colina (CDP-colina), no metabolismo de glicerofosfolípides,

participando de maneira importante no metabolismo da fosfatidilcolina (PC). Fosfolípeidos estão envolvidos em incontáveis processos celulares, como por exemplo, presentes em componentes de membranas, participando na fusão e fissão entre vesículas e mitocôndrias, além de transdução de sinais intracelulares. O mecanismo pelo qual as variantes encontradas interferem nos condrócitos e/ou células da retina ainda é desconhecido. No trabalho de Payne et al. (2014), os autores mostraram redução dos níveis de fosfatidilcolina. No entanto, o mecanismo exato pelo qual a alteração da via da fosfatidilcolina leva a fenótipos distintos ainda é desconhecido.

Figura 20: A. Figura esquemática, representando a enzima CCT A, mostrando os resíduos em que encontram-se as mutações identificadas nas famílias F43 e F44 (em vermelho), assim como as variantes já reportadas em doenças associadas ao *PCYT1A* por Hoover-Fong et al. 2014 (em azul) e Testa et al. 2017 (em verde). B. Tabela com as mesmas variantes e suas posições no cDNA.

5.3.2 FN1

Outra DEM presente neste heterogêneo grupo, é a forma do tipo Sutcliffe (OMIM 184255), ou *corner fractures*. Descrita em 1966, existem menos de 25 casos reportados, marcados por heterogeneidade fenotípica. Alguns indivíduos com esta suspeita diagnóstica, tiveram mutações em *COL2A1* posteriormente identificadas (Walter et al., 2007). O achado típico de irregularidade metafisária com fragmentos ósseos em forma de flocos, encontrados às margens da placa fisária, simula uma imagem de fratura (*corner fracture*), tende a crescer e desaparecer ao final do crescimento do indivíduo (Currarino et al., 2000).

Duas pacientes (F33.1 e F45) na nossa casuística foram identificadas com mutações em heterozigose em *FN1*, um novo gene associado a essa DE. Através de colaboração externa com outros serviços especializados em DE, a paciente F45 foi incluída em uma coorte de 14 pacientes com DEM do tipo Sutcliffe. Variantes nunca descritas em *FN1* foram identificadas em outros quatro pacientes, compatível com um padrão de herança autossômico dominante (Quadro 13). Mutações em *COL2A1* foram identificadas em 3/15 pacientes (Lee et al., 2017).

Quadro13: Variantes em *FN1* encontradas em pacientes com DEM do tipo *corner fractures*, incluídas as famílias F45 e F33.1 apresentadas neste estudo.

Família	Posição genômica (hg19)	cDNA (NM_212482.2)	Proteína (NP_997647.1)	Recorrência	ExAC MAF
1	chr2:g.216299436C>A	c.260G>T	p.Cys87Phe	Transmissão vertical	Ausente
2	chr2:g.216298095A>G	c.367T>C	p.Cys123Arg	<i>De novo</i>	Ausente
3	chr2:g.216295448G>C	c.675C>G	p.Cys225Trp	-	Ausente
4	chr2:g.216293029A>C	c.718T>G	p.Tyr240Asp	Transmissão vertical	Ausente
5	chr2:g.216273022_216273024del	c.2425_2427del	p.Thr809del	<i>De novo</i>	Ausente
F45	chr2:g.216292969A>C	c.778T>G	p.Cys260Gly	<i>De novo</i>	Ausente
F33.1	chr2:g.216296597G>A	c.506G>A	p.(Cys169Tyr)	Transmissão vertical	Ausente

A fibronectina, codificada pelo gene *FN1*, é um dos principais componentes da matriz extracelular fibrilar e membranas basais de todos os tecidos (Singh et al., 2010, Mosher, 2016). Experimentos com camundongos transgênicos evidenciaram que a fibronectina expressa em osteoblastos e no fígado, interfere em sua proliferação, função e afeta proteínas da matriz óssea (Bentmann et al., 2010). A fibronectina também é expressa em células mesenquimais, desde a diferenciação dos condrócitos, até a matriz cartilaginosa madura. A sua interação com o colágeno do tipo 10, componente importante da cartilagem articular, já foi documentada (Parsons et al., 2011).

Todas as variantes descritas em *FN1* afetam resíduos altamente conservados, sendo que, em sua maioria (4/6), envolvem resíduos de cisteína. Estes resíduos formam ligações dissulfeto, que são imprescindíveis para a estrutura tridimensional dos domínios tipo I da fibronectina. Cinco mutações estão no domínio N-terminal, importante para a montagem da proteína na superfície celular e as duas últimas variantes encontram-se no domínio III-2, que tem um sítio de ligação, responsável por alterações de conformação no processamento da proteína. Desta forma, foi estabelecida a associação entre mutações em heterozigose em *FN1* e indivíduos com DEM do tipo *corner fractures*, anteriormente sem base molecular conhecida, já que essas variantes afetam a secreção de fragmentos proteicos e, possivelmente o processamento, da fibronectina (Lee et al., 2017).

Vale ressaltar a dificuldade em se estabelecer o diagnóstico em F33.1, uma vez que a paciente já é adulta e não foi possível avaliar radiografias anteriores, impossibilitando observar o achado típico desta displasia, as anomalias denominadas *corner fractures* nas regiões metafisárias. O emprego do NGS foi fundamental para definir o diagnóstico deste caso, o que só ocorreu após a identificação da variante em *FN1* numa paciente com achados típicos (F45).

5.3.3 INPPL1

A opsismodisplasia (OMIM 258480) é uma DE rara, com um padrão de herança autossômico recessivo, caracterizada por baixa estatura

desproporcionada, com mãos e pés pequenos, dismorfismos craniofaciais (fontanela ampla, crista supraorbitária proeminente, bossa frontal, ponte nasal deprimida, narinas antevertidas e filtro longo). Os achados radiológicos incluem um encurtamento dos ossos longos, atraso da ossificação epifisária, alargamento metafisário, metacarpos e falanges curtas e platispondilia acentuada.

Mutações bialélicas no gene *INPPL1* (inositol polyphosphate phosphatase-like 1) estão associadas a esta DE. Este gene, composto por 28 éxons, codifica a proteína SHIP2 (src homology 2 domain-containing inositol phosphatase 2), a qual possui diversos motivos que são importantes nas interações proteína-proteína, além de funcionar como uma proteína de acoplagem para moléculas intracelulares. A SHIP2 atua na formação óssea através da via de sinalização AKT. Até o presente, 25 diferentes variantes (3 *nonsense*, 1 *in-frame*, 7 *missense*, 9 *frameshift* e 5 de *splicing*) espalhadas ao longo do gene foram descritas em 20 famílias (Fradet & Fitzgerald, 2017). As diferentes classes de mutação, incluindo as mutações *missense*, as quais 6 dentre as 7 encontradas estão localizadas no domínio catalítico, levam a uma perda de função (Figura 21).

Embora nos primeiros relatos os pacientes mostrassem uma sobrevida curta, com óbito nos primeiros anos de vida em decorrência de insuficiência pulmonar, diversos pacientes com sobrevida prolongada, o mais velho com 24 anos, foram descritos ao longo dos anos, indicando haver uma expressividade variável nesta DE. Observa-se, nos pacientes com sobrevida acima de 2 anos, grande prevalência de complicações respiratórias, como doença pulmonar restritiva/obstrutiva em níveis variados de gravidade, desde apnéia obstrutiva do sono com necessidade de C-PAP, até dependência de suporte ventilatório (Quadro 14). Até o presente, não foi possível estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo precisa.

Figura 21: Esquema representando as mutações já descritas em *INPPL1*, seus respectivos éxons e localização nos resíduos afetados na proteína inositol polifosfato fosfatase-*like* 1.

Quadro 14: Quadro clínico e variantes encontradas nos pacientes com opsismodisplasia e sobrevida acima de 2 anos

Famílias	Idade à última avaliação (anos/meses)	Origem	Altura (SD)	Insuficiência respiratória	Variantes em <i>INPPL1</i> (domínio)	Referência
F1.1	24	Afro-Americano/ Europeu Americano	-3.5	Insuficiência respiratória, traqueostomia temporária e suporte ventilatório por pneumonia grave aos 3 anos	p.Gly9Trpfs*13 (SH2) p.Gln251His	Below et al., 2013
F1.2	18	Afro-Americano/ Europeu Americano	NA	doença pulmonar leve, apnéia obstrutiva do sono, necessitando de CPAP	p.Gly9Trpfs*13 p.Gln251His	Below et al., 2013
F2.1	8/8	Hispânico/ Nativo-Americano	-9.5	+ dependente de ventilação	p.Pro659Leu p.Pro659Leu (catalítico)	Below et al., 2013
F2.2	2/9	Hispânico/ Nativo-Americano	-4.8	+ (leve à moderada)	p.Pro659Leu p.Pro659Leu (catalítico)	Below et al., 2013

F3	3	Oriente Médio	NA	+	p.Ser182* p.Ser182*	Below et al., 2013
F4	4	Somali	-5	Infecções pulmonares	p.Gln93Profs*3 (SH2) p.Pro659Ser (catalítico)	Huber et al., 2013
F5	19	Franco/Argelino	140 cm	-	p.Arg401Trp (catalítico) p.Phe722Ile (catalítico)	Huber et al., 2013
F6	19	Português	NA	+	p.Arg907* p.Arg907*	Huber et al., 2013
F7	3/6	Árabe	NA	Doença pulmonar crônica	c.519-3A>G c.519-3A>G	Huber et al., 2013
F8	9	Argelino	-4	-	c.1951+1G>A c.1951+1G>A	Huber et al., 2013
F9.1	9	Japonês	-6	+	c.1960_1962delGAG; p.Glu654del c.1960_1962delGAG; p.Glu654del (catalítico)	Iida et al., 2013a
F10	21	Turco	101 cm	NA	c.183-8G>A c.183-8G>A	Li et al., 2014
F11.1	10		64.2 cm (16m)	Insuficiência respiratória progressiva, melhorada com uso de bisfosfonatos	c.1976C > T p.Pro659Leu (catalítico)	Khwaja et al., 2015
F11.2	4		62cm (9m)	Doença pulmonar restritiva	c.1976C > T p.Pro659Leu (catalítico)	Khwaja et al., 2015
F52	13	Brasileiro	127cm (12a10m)	-	p.Glu32Metfs*77 (SH2) p.Ala950Glyfs*14 (rico em PR)	Este estudo

Neste estudo, dois indivíduos foram diagnosticados com opsismodisplasia: uma criança com quadro grave e óbito na infância (F51) e um adolescente com quadro leve, diagnosticado apenas após o estudo molecular (F52). Os pacientes eram não aparentados e sem história de consanguinidade entre seus pais. Ambos compartilhavam uma mutação em heterozigose (p.Glu32Metfs*77), a qual já foi descrita previamente em outros três indivíduos de duas outras famílias brasileiras, um natimorto, caso isolado, e dois irmãos com óbito no período neonatal, todos filhos de pais consanguíneos (Huber et al., 2013). Esta variante não foi encontrada em bancos de dados populacionais (gnomAD e ABraOM) e também não foi descrita em indivíduos com opsismodisplasia de outras etnias, sugerindo um efeito fundador para esta mutação na população brasileira. O paciente com óbito precoce (F51) apresentava uma variante em *trans*, *missense* no sítio catalítico (p.Gly708Ser), com efeito deletério para este alelo. Já no paciente

adolescente, outra mutação *frameshift* foi identificada no final do exon 25 (p.Ala950Glyfs*14). Embora até o presente uma correlação genótipo-fenótipo precisa não tenha sido estabelecida, ressalta-se que o paciente (F52) aqui descrito é aquele que apresenta um quadro clínico-radiológico muito leve e apresenta uma das variantes na região mais C-terminal da proteína (domínio rico em prolina), com códon de parada prematura apenas no éxon 26, antepenúltimo éxon do gene. Desta forma, é possível especular que o produto protéico desta variante não sofra o decaimento do RNA em decorrência de um códon de parada prematura (*Nonsense-mediated mRNA decay*) e parte da função da proteína seja mantida pela manutenção de diversos domínios, como o SH2, o catalítico e o SH3 do domínio rico em prolina. Este mecanismo, *nonsense-mediated mRNA decay*, visa corrigir o RNA processado incorretamente, com prejuízo para as células. Normalmente, a degradação de um RNA que contém um códon de parada prematura requer que a alteração esteja localizada 50 a 55 nucleotídeos antes da última junção éxon-éxon (Hug et al., 2016).

5.3.4 HSPG2

O gene *HSPG2* codifica a proteína perlecana, que se liga a diversas proteínas de membrana basal celular, como colágeno IV e laminina-1, e também a receptores de superfície celular, como a beta-1 integrina e o alfa-distroglicano (Nicole et al., 2000). A perlecana é uma das proteoglicanas encontradas na matriz extracelular do tecido cartilaginoso. Variantes bialélicas com perda de função no gene heparan-sulfato perlecana gene 2, *HSPG2*, mapeado no cromossomo 1p36.1-35, composto por 97 éxons, estão associadas à síndrome de Schwartz-Jampel do tipo 1 (OMIM 255800), doença caracterizada por quadro progressivo de baixa estatura, miopatia, contraturas articulares, alterações epifisárias, blefarofimose e miopia, e também à displasia dissegmentar tipo Silverman-Handmaker, caracterizada pelo achado típico de vértebras com tamanhos e formatos diferentes (anisospondilia) ao longo da coluna vertebral. Esta forma, Silverman-Handmaker (OMIM 224410), apresenta um padrão de herança autossômico recessivo, com um quadro grave, com

envolvimento ósseo acentuado e com óbito intra-útero ou nos primeiros dias de vida. Uma segunda forma, considerada alélica a displasia tipo Silverman-Handmaker, mais leve e compatível com uma sobrevivência na infância, é o tipo Rolland-Desbuquois (OMIM 224400). A presença de encefalocele foi descrita na forma grave (Aleck et al., 1987).

Até o presente, apenas pacientes com a síndrome de Schwartz-Jampel tipo 1 e a forma grave da displasia dissegmentar foram descritos com mutações em *HSPG2*.

As famílias já descritas com a forma de Schwartz-Jampel tipo 1 apresentavam, preferencialmente, mutações de perda de função nos domínios III e IV da proteína (Nicole et al.; 2000, Arikawa-Hirasawa et al., 2002, Stum et al., 2006), Iwata et al., 2015, Dai et al., 2015, Das Bhowmik et al., 2016) (Figura 22, Quadro 15). Stum et al. (2006) estudou 35 pacientes de 23 famílias com essa síndrome e identificou 25 mutações diferentes em *HSPG2*, distribuídas ao longo do gene. Estudos de expressão em fibroblastos dos pacientes mostraram um possível efeito de perda de função.

Figura 22: Diagrama das variantes em *HSPG2*, encontradas em pacientes com síndrome de Schwartz-Jampel tipo 1 (acima da proteína) e com displasias dissegmentares, displasia de Silverman-Handmaker e displasia de Rolland-Desbuquois, (abaixo da proteína). As variantes dos pacientes F3 e F27 estão em caixas vermelhas. Proteína *HSPG2*, com seus domínios (I-V); cadeia GAG (glicosaminoglicanos); domínio SEA (*Sperm protein*, Enteroquinase, Agrina); domínio LDL, receptor classe A (*low density lipoprotein*); domínio laminina EGF (*Epidermal Growth Factor*).

Quadro 15: Mutações encontradas em *HSPG2*, em pacientes com síndrome de Schwartz-Jampel tipo 1.

Família/ Paciente	Localização	Variante cDNA	Proteína (Domínio)	Referência
F1	Intron 64	IVS64+4A>G	(IV)	Nicole et al., 2000
F2	Éxon 37	c.4740G>A	(III)	
F3			p.(Cys1532Tyr) (III)	
P1	Intron 56	c.7374+4 A>G/ fusão dos éxons 60 e 61	(VI)	Arikawa-Hirasawa et al. 2002
P2	Éxon 64	c.8544G>A/ deleção de 9pb na junção da região aceptor do 66 e éxon 67	(V)	
P3	Éxon 96	deleção em homozigose iniciando na porção 5 do éxon 96 (n21 del7108), extendendo-se além da região 3' da sequência flanqueadora de <i>HSPG2</i> .	(V)	
F1	Intron 64	c.8464+4A>G	p.(Thr2773Profs*25) (IV)	Stum et al., 2006
F2	Éxon37	c.4740G>A	(III)	
F3	Intron 37	c.4741-10T>G	(III)	
F4	Intron 81	c.11208-7G>A	(V)	
F5	Intron 6	c.574+481C>T	p.(Val192Afs*25) (II)	
F6	Intron 95	c.12899+1G>A	(V)	
F7	Éxon 8-Intron 13	c.720-1654del	(II)	
F8	Éxon 36	c.4595G>A	p.(Cys1532Tyr) (III)	
F9	Éxon 36/ Éxon 88	c.4432C>T / c.12191delC	p.(Arg1478Cys) (III) p.(Pro4065Argfs*5) (V)	
F10	Éxon37	c.4648C>T	p.(Arg1550Cys) (III)	
F11	Intron 54	c.7006+1G>A	(IV)	
F12	Éxon 80/ Éxon 81	c.10982G>A/ c.11192delG	p.(Arg3661Gln) (IV)/ p.(Gly3731Glu fs*30)	
F13	Éxon 36/ Éxon75	c.4432C>T/ c.10354C>T	p.(Arg1478Cys) (III)/ p.(Arg3452*) (IV)	
F14	Intron 81	c.11208-7G>A	(V)	
F15	Éxon 36	c.4432C>T	p.(Arg1478Cys) (III)	
F16	Éxon 36/ Éxon75	c.4473-4475del/ c.10355G>A	p.(Leu1491del) (III) / p.(Arg3452Gln) (IV)	
F17	Intron 60	c.7874-2A>G	p.(His2624-Val2625ins39 GESREGRGYRQVAQRV AERSPVPSLLSHSGCVV HTRLSP) (IV), p.(Val2625fs)	
F18	Éxon72/ Éxon 49	c.9642delC/ c.6179delC	p.(Gln3215Lysfs*7) (IV)/ p.(Pro2060Leufs*3) (IV)	
F19	Éxon87	c.11792-11793insC	p.(Leu3932Alafs*32) (V)	

F20	Éxon 7	c.665–675del	p.(Arg222Glnfs*5) (II)	
F21	Éxon70	c.9326delA	p.(His3109Profs*16) (IV)/ p.(Thr3088–His3109del), p.(Asp3065–His3109del)	
F22	Éxon 24/ Éxon75	c.3055C>T/ c.10355G>A	p.(Pro1019Leu) (III) p.(Arg3452Gln) (IV)	
F23	Éxon 66/ Éxon 80	c.8680C4T/ c.10982G4A	p.(Gln2894*) (IV) p.(Arg3661Gln)(IV) p.(Glu3660Glyfs*114)	
P1			p.(Leu1088Pro) (III)/ p.(Gln3061Ter) (IV)	Iwata et al., 2015
P1	Éxon 78/ Intron 45	c.10776delT/ c.5702-5G>A	p.(Ala3592fs*6)/ p.(?)	Dai et al., 2015
P1		c.4740 + 5G>A	(III)	Das Bhowmik et al., 2016

Já os pacientes descritos com a forma grave de Silverman-Handmaker, tem suas variantes mais distribuídas ao longo do gene, mantendo o padrão de variantes com perda da função (Quadro 16).

Nesta casuística, uma paciente com quadro clínico típico de displasia dissegmentar tipo Rolland-Desbuquois (F27) apresentava duas mutações não descritas anteriormente no gene *HSPG2*, cada uma herdada de um genitor normal, confirmando que esta forma de displasia dissegmentar é realmente alélica à forma mais grave, tipo Silverman-Handmaker.

Por outro lado, a paciente F3 com hipótese diagnóstica inicial de uma DEE decorrente de mutações em *COL2A1*, também apresentava duas mutações neste gene em heterozigose composta. O quadro clínico desta paciente é leve, com recuperação da baixa estatura de origem pré-natal (Z-score na última consulta de -0,78). Numa reavaliação das radiografias, pode-se observar alterações discretas na forma e tamanho dos corpos vertebrais, assim como uma falha de ossificação nas vértebras lombares, achados remissivos de uma displasia dissegmentar (Fig 17).

As mutações encontradas no presente estudo envolvem duas variantes *missense* (uma no domínio IV e outra no domínio V da proteína) na paciente com o quadro mais leve (F3), e uma combinação de uma *missense* (no domínio IV) com um *frameshift* (no domínio II), sem que fosse possível estabelecer uma clara correlação genótipo-fenótipo (Figura 22, Quadro 16).

Quadro 16: Mutações encontradas em *HSPG2* em pacientes com Silverman-Handmaker, incluindo os casos do presente estudo.

Família	Indivíduo	Origem	Óbito/TG (sem)	Variante cDNA em <i>HSPG2</i>	Proteína (Domínio)	Ref.
---------	-----------	--------	----------------	-------------------------------	--------------------	------

F1	F1.1	Sirilanka	natimorto	c.4603_4604ins89 (homozigose)	(III)	Arikawa-Hirasawa et al., 2001
	F1.2	Sirilanka	TG (21)	c.4603_4604ins89 (homozigose)	(III)	
F2	F2		TG (22)	c.7006+5A>G /c.10248C>T*	(VI)	
F3	F3	Macedonia	TG (15)	c.3876-3879delGTGC (homozigose)	p.(Gln1292Hisfs*22) (II)	Rieubland et al., 2010
F4	F4.1	Afeganistão	TG (23)	c.646G >T/ c.5788C>T	p. (Glu216*) (II)/ p. (Gln1930*) (IV)	Ladhani et al., 2013
	F4.2		TG (13)	c.646G >T/ c.5788C>T	p. (Glu216*) (II)/ p. (Gln1930*) (IV)	
F5	F5	Sul da Ásia	natimorto	c.[1356-27_1507+59del]	p. (Val453Profs*4) (II)	
F27	F27	Brasileira	-	c.9970G>A /c.1428_1429ins 52pb	(p.Gly3324Arg) (IV) / p.(Tyr477Trpfs*9) (II)	Presente estudo
F3	F3	Brasileira	-	c.5863G>A / c.12985G>A	(p.Gly1955Ser) (IV)/ (p.Ala4329Thr) (V)	Presente estudo

TG: interrupção da gestação.

5.3.5 ACAN

A agrecana é uma proteoglicana componente da matrix extracelular, a qual desempenha um papel fundamental na cartilagem de crescimento e nos tecidos cartilaginosos. Sua estrutura consiste de uma região central, flanqueada por domínios glubulares (G1 a G3) nas regiões C e N-terminais. O domínio G3, na região C-terminal, contém uma estrutura importante (*C-type lectin-binding domain* - *CLD*), a qual interage com outras proteoglicanas, como tenascinas e fibulinas.

Variantes em *ACAN* foram associadas a fenótipos variáveis, envolvendo crescimento, osteoartrose precoce e/ou osteocondrite dissecante. Variantes bialélicas foram encontradas em uma família com três irmãos mexicanos afetados por uma DEEM (OMIM 612813) com grave comprometimento da estatura (*Z-score* de -14 a -15) (Tompson et al., 2009). Já mutações em heterozigose neste gene foram associadas a quadros mais leves, como a DEE tipo Kimberley (MIM 608361), em uma família com 13 afetados em três gerações (Gleghorn et al., 2005), mas, mais comumente, a casos com transmissão vertical de uma baixa estatura leve, frequentemente com idade óssea avançada, história familiar com parada de crescimento precoce e/ou osteoartrose precoce, além de uma ostecondrose intervertebral (Gkourogianni et al., 2017). Estes autores encontraram mais de 19 mutações diferentes (*missense*, *frameshift*, e de *splicing*) em 20 famílias em um estudo colaborativo

internacional, as quais encontravam-se localizadas em diversos domínios da proteína, particularmente nos domínios globulares, incluindo o *C-type lectin-binding domain* no domínio G3, na região C-terminal da proteína. A variante em homozigose (p.Asp2343Asn) encontrada na família mexicana com uma DEEM grave, também está localizada neste domínio na região C-terminal. No presente, uma correlação genótipo-fenótipo precisa não foi estabelecida. Vale ressaltar que na grande maioria dos casos associados a variantes em *ACAN*, a idade óssea é avançada. Poucas DE cursam com avanço da idade óssea, podendo-se destacar, entre elas, a displasia de Desbuquois. Na nossa casuística, a paciente (F28) apresentava um diagnóstico inicial de displasia de Desbuquois exatamente pela presença deste achado. No entanto, nenhuma variante foi encontrada em *CANT1* ou *XYLT1*, os dois genes associados à displasia de Desbuquois. Por outro lado, na realização do exoma, uma mutação em heterozigose foi encontrada no éxon 14 (p.Arg2346His) no *C-type lectin-binding domain* do domínio G3 do gene *ACAN*, região muito próxima à variante encontrada na família mexicana com DEEM tipo agrecana. O fato de nossa paciente apresentar um comprometimento da estatura intermediário (*Z-score* de -6,88) entre os indivíduos com a DEEM tipo agrecana e aqueles com baixa estatura com idade óssea avançada, com ou sem osteoartrose precoce e/ou osteocondrite dissecante, o gene *ACAN* foi analisado em maiores detalhes pelo programa IGV, revelando a presença de uma segunda variante em região intrônica na paciente, com frequência populacional (gnomAD) de 0,8%. O sequenciamento por Sanger da paciente e seus pais revelou que esta variante estava em *trans* na probanda. Pode-se especular que a variante intrônica possa acarretar um efeito deletério leve na agrecana, que associado a uma variante no domínio globular G3, contribua para um fenótipo mais acentuado, intermediário entre a DEEM tipo agrecana e aqueles com baixa estatura com idade óssea avançada, com ou sem osteoartrose precoce e/ou osteocondrite dissecante. O estudo e a publicação de novos pacientes com variantes em *ACAN* podem auxiliar na elucidação do espectro fenotípico total das doenças associadas a este gene e confirmar a impressão aqui descrita que variantes mais frequentes na população possam, associadas a variantes raras, exercer um efeito aditivo, contribuindo para a caracterização do fenótipo. Os

indivíduos com mutação em heterozigose em *ACAN*, incluindo os genitores do caso do México podem apresentar um comprometimento da estatura. De modo semelhante, o pai da paciente F28, com a mutação rara encontrada em sua filha, apresenta um Z-score de -1,99 na sua estatura.

O estudo de sequenciamento por NGS permitiu a identificação de pacientes com casos atípicos e leves de algumas DE, como as relacionadas aos genes *INPPL1* e *HSPG2*, expandido o espectro fenotípico dessas condições.

6 Conclusões

- A divisão da casuística em categorias com um diagnóstico mais assertivo (I, IIA e IIB) e outras sem um diagnóstico preciso (III) mostrou que uma caracterização clínico-radiológica bem elaborada permite uma maior concordância com os testes moleculares. Nas categorias I e IIA houve uma alta positividade 45/53 (85%) com a aplicação de um único teste genético, diferindo da categoria III, na qual o resultado confirmatório foi obtido em 1/3 (33%).
- A sobreposição fenotípica entre diferentes DEs, em algumas situações, impediu que o diagnóstico definitivo fosse estabelecido apenas por critérios clínico-radiológicos, exigindo o emprego de testes moleculares adicionais para o correto diagnóstico e, conseqüentemente, um aconselhamento genético mais preciso.
- O emprego de NGS sob a forma de painel de genes customizado foi muito efetivo em confirmar a hipótese clínica de DE clássicas, particularmente naquelas com heterogeneidade genética lócica. Em contrapartida, para alguns pacientes, a ausência do gene no painel necessitou de um estudo molecular adicional (WES) para o correto diagnóstico.
- As diferentes técnicas empregadas permitiram a identificação de 37 novas mutações em genes previamente associados a DEs: *COL2A1*, *COL11A1*, *CHST3*, *SLC26A2*, *HSPG2*, *ACAN*, *TRPV4*, *COMP*, *SMARCA1*, *INPPL1*, *NPR2*, *LIFR* e *CANT1*.
- Nos pacientes da categoria IV, com osteocondrodisplasias estabelecidas e sem base molecular conhecida, o estudo de quatro pacientes com DEM com distrofia de cones e bastonetes, e um com diagnóstico de DEM do tipo *corner fractures*, permitiu a identificação de dois genes responsáveis por essas condições, o *PCYT1A* e o *FN1*, respectivamente. O emprego, no WES, de estratégias baseadas no padrão de herança monogênico das doenças em questão, é fundamental para a obtenção de resultados positivos. A braquiolmia com amelogenese imperfeita, também teve seu gene causativo, o *LTBP3*, descoberto.

- O estudo de NGS permitiu a identificação de casos atípicos ou leves, contribuindo para a ampliação do espectro fenotípico de DE específicas, particularmente aquelas decorrentes de mutações nos genes *INPPL1*, *HSPG2* e *ACAN*.

7 Anexos

Anexo I: Termo de Consentimento

Anexo II: Comitê de pesquisa

Anexo III: Lista de 496 genes do painel NGS

Anexo I: Termo de Consentimento

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO.:
...../...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
.....
BAIRRO: CIDADE:
.....
CEP: TELEFONE: DDD
(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA
“Estudo genético-clínico das displasias esqueléticas”
PESQUISADORA: Débora Romeo Bertola
CARGO/FUNÇÃO: Médica Assistente da Unidade de Genética do Instituto da Criança do HC-FMUSP.
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 70.062
UNIDADE DO HCFMUSP: Genética do Instituto da Criança do HC-FMUSP
2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐
3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Este projeto de pesquisa é importante para ajudar a definir o diagnóstico da doença do seu filho(a) que possui alguma alteração nos ossos do corpo. Seu filho(a) está sendo convidado a participar deste estudo. Em algumas doenças genéticas com problemas nos ossos o diagnóstico é feito apenas pela consulta médica e exames de raio-X, já, em outras, precisamos fazer exames que procuram erros no material genético obtido do sangue da criança.

2 – Será realizada uma entrevista com os pais, incluindo a história da família, um exame físico no filho(a) e nos pais e serão tiradas fotografias dos pacientes para podermos guardar com mais precisão as características do rosto, do corpo, das mãos e pés que podem mudar com os anos e são muito úteis para a discussão entre os médicos que estão tentando fazer o diagnóstico da doença. Caso os pais também autorizem que as fotografias sejam usadas para aulas ou publicações científicas deverão assinar um termo de consentimento separado e específico para isso. Serão pedidos exames de raio-X do esqueleto e exames de sangue. Esses exames procurarão os defeitos nos ossos e nas substâncias do sangue relacionadas aos ossos. Com a mesma coleta de sangue, guardaremos uma amostra para sempre que possível detectar se há uma alteração no material genético responsável pela doença (mutação no DNA que causou a doença). Além dos exames de raio-X e sangue, avaliações com oftalmologista e otorrinolaringologista para avaliar os olhos e nariz / ouvido / garganta podem ser necessárias.

3 – Será colhida em torno de 4mL de sangue da veia do braço. No caso do exame genético apresentar um resultado alterado, solicitaremos aos pais que retornem para explicação do resultado e discussão da possibilidade de se estudar o material genético dos pais.

4 – O desconforto associado ao exame de sangue consiste apenas daquele relacionado à coleta. Punção Venosa: após punção venosa (“tirar sangue”) o local pode ficar um pouco dolorido. Também pode ocorrer a formação de um pequeno hematoma (“roxo”) que pode persistir por alguns dias; porém o mesmo se desfaz sem a necessidade de medicamentos.

5 – O estudo trará como benefício para o seu filho(a) a certeza do diagnóstico. Além disso, permite também saber se a doença vem da família ou não e, portanto, se esta doença pode repetir em outros filhos(as) do casal.

6 – Não existem outros exames alternativos disponíveis no SUS para a pesquisa dos erros no material genético relacionados à doença do seu filho.

7 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Dra. Débora Romeo Bertola que pode ser encontrada na Unidade de Genética do Instituto da Criança, endereço Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 647, 7º andar. Telefone(11) 3069-8671. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de tratamento do seu filho(a) na Instituição.

9 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

10 – É garantido o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas.

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

12 – A pesquisadora (Dra. Débora R. Bertola) se compromete a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Estudo genético-clínico das displasias esqueléticas”.

Eu discuti com a Dra Débora Romeo Bertola sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

AUTORIZAÇÃO PARA O USO DE FOTOGRAFIAS

Eu, abaixo assinado, responsável legal pelo
paciente _____
_____, R.G. nº _____
_____, residente e domiciliado à _____
_____, conforme reza a Lei nº 5.988/73 dos Direitos Autorais,
concedo permissão à Unidade de Genética do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP, para utilizar as minhas fotografias e/ou de meus parentes para:

a) Fins de ensino Sim () Não ()

b) Publicação em revistas científicas e/ou livros Sim () Não ()

Nome completo do responsável

Assinatura _____

Data ____ / ____ / ____

Testemunhas

Anexo II: Comitê de pesquisa

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0558/10

Título: ESTUDO GENÉTICO-CLÍNICO DAS DISPLASIAS ESQUELÉTICAS

Pesquisador Responsável: Débora Romeo Bertola

Pesquisador Executante: Guilherme Lopes Yamamoto

Departamento: PEDIATRIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 09/05/2012, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

- Carta datada de 26/03/2012 - Relatório parcial e inclusão do Dr. Wagner Antonio da Rosa Baratela como pesquisador executante

CAPPesq, 10 de Maio de 2012

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo III: Lista de 496 genes do painel NGS

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
ACP5	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	FOXP1	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
ANO5	608662	CDH7	605806	CRYAB	123590	FAF1	604460	GCDH	608801	KBTD13	613727
APC	611731	CDH8	603008	CTDP1	604927	FAH	613871	GCH1	600225	KCNE1	176261
APTX	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

Anexo III: Lista de 496 genes do painel NGS, continuação

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	SMARCAL1	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	PPIB	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
MOCS1	603707	NTSC3A	606224	PRPS1	311850	SCO2	604272	SUMO1	601912	USH1C	605242
MOCS2	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		

8 Referências

Aleck KA, Grix A, Clericuzio C, Kaplan P, Adomian GE, Lachman R, Rimoin DL. Dyssegmental dysplasias: clinical, radiographic, and morphologic evidence of heterogeneity. *Am J Med Genet.* 1987;27:295–312.

Andreucci E, Aftimos S, Alcausin M, Haan E, Hunter W, Kannu P, Kerr B, McGillivray G, McKinlay Gardner RJ, Patricelli MG, Sillence D, Thompson E, Zacharin M, Zankl A, Lamandé SR, Savarirayan R. TRPV4 related skeletal dysplasias: a phenotypic spectrum highlighted by clinical, radiographic, and molecular studies in 21 new families. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6:37.

Arikawa-Hirasawa E, Le AH, Nishino I, Nonaka I, Ho NC, Francomano CA et al. Structural and functional mutations of the perlecan gene cause Schwartz-Jampel syndrome, with myotonic myopathy and chondrodysplasia. *Am J Hum Genet.* 2002;70:1368 –1375.

Arikawa-Hirasawa E, Wilcox WR, Le AH, et al. Dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type, is caused by functional null mutations of the perlecan gene. *Nat Genet* 2001;27:431– 434.

Bae JS, Kim NK, Lee C, Kim SC, Lee HR, Song HR, Park KB, Kim HW, Lee S H, Kim HY, Lee SC, Jeong C, Park MS, Yoo WJ, Chung CY, Choi IH, Kim O H, Park WY, Cho TJ. Comprehensive genetic exploration of skeletal dysplasia using targeted exome sequencing. *Genet Med.* 2016;18:563-9.

Baratela WAR, Bober MB, Tiller G, Okenfuss E, Ditro C, Duker A, Krakow D, Stabley D, Sol-Church K, Mackenzie W, Lachman R, Scott Jr, Cl. A Newly Recognized Syndrome With Characteristic Facial Features, Skeletal Dysplasia, and Developmental Delay. *Am J Med Genet A.* 2012;158A:1815-22.

Barat-Houari M, Sarabay G, Gatinois V, Fabre A, Dumont B, Genevieve D, Touitou L. Mutation Update for COL2A1 Gene Variants Associated with Type II Collagenopathy. *Hum Mutat.* 2016;37:7-15.

Barbosa-Buck CO, Orioli IM, da Graça Dutra M, Lopez-Camelo J, Castilla EE, Cavalcanti DP. Clinical epidemiology of skeletal dysplasias in South America. *Am J Med Genet A.* 2012;158A:1038-45.

Bartels C, Bükülmez H, Padayatti P, Rhee DK, van Ravenswaaij-Arts C, Pauli RM, Mundlos S, Chitayat D, Shih L, Al-Gazali LI, Kant S, Cole T, Morton J, Cormier-Daire V, Faivre L, Lees M, Kirk J, Mortier GR, Leroy J, Zabel B, Kim CA, Crow Y, Braverman NE, van den Akker F, Warman ML. Mutations in the Transmembrane Natriuretic Peptide Receptor NPR-B Impair Skeletal Growth and Cause Acromesomelic Dysplasia, Type Maroteaux. *Am J Hum Genet.* 2004; 75:27–34.

Below JE, Earl DL, Shively KM, McMillin MJ, Smith JD, Turner EH, Stephan MJ, Al-Gazali LI, Hertecant JL, Chitayat D, Unger S, Cohn DH, Krakow D, Swanson JM, Faustman EM, Shendure J, Nickerson DA, Bamshad MJ; University of Washington Center for Mendelian Genomics. Whole-genome analysis reveals that mutations in inositol polyphosphate phosphatase-like 1 cause opsismodysplasia. *Am J Hum Genet.* 2013;92:137-43.

Ben-Salem S, Robbins SM, Lm Sobreira N, Lyon A, Al-Shamsi AM, Islam BK, Akawi NA, John A, Thachillath P, Al Hamed S, Valle D, Ali BR, Al-Gazali L. Defect in phosphoinositide signalling through a homozygous variant in PLCB3 causes a new form of spondylometaphyseal dysplasia with corneal dystrophy. *J Med Genet.* 2017;0:1-9.

Bentmann A, Kawelke N, Moss D, Zentgraf H, Bala Y, Berger I, Gasser JA, Nakchbandi IA. Circulating fibronectin affects bone matrix, whereas osteoblast fibronectin modulates osteoblast function. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2010;25:706-715.

Bertola DR, Honjo RS, Baratela WAR. Stüve-Wiedemann Syndrome: Update on Clinical and Genetic Aspects. *Mol Syndromol* 2016;7:12-18.

Bicknell LS, Morgan T, Bonafé L, Wessels MW, Bialer MG, Willems PJ, et al. Mutations in FLNB cause boomerang dysplasia. *J Med Genet* 2005;42:e43.

Boerkoel CF, Takashima H, John J, Yan J, Stankiewicz P, Rosenbarker L, Andre JL, Bogdanovic R, Burguet A, Cockfield S, Cordeiro I, Frund S, et al. Mutant chromatin remodeling protein SMARCAL1 causes Schimke immunosseous dysplasia. *Nature Genet.* 2002;30:215-220.

Bonafé L, Cormier-Daire V, Hall C, Lachman R, Mortier G, Mundlos S, Nishimura G, Sangiorgi L, Savarirayan R, Sillence D, Spranger J, Superti-Furga A, Warman M, Unger S. 2015. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2015 revision. *Am J Med Genet Part A* 2015;167A:2869–2892.

Bonafé L, Mittaz-Crettol L, Ballhausen D, et al. Diastrophic Dysplasia. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington [Internet]. 2004 Nov 15 (Updated 2013 Jul 18) [cited 2017 Nov 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1350/?report=reader>.

Boycott KM, Vanstone MR, Bulman DE, MacKenzie AE. Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. *Nat Rev Genet.* 2013;14:681-91.

Brandi ML. Lessons from next-generation sequencing in genetic skeletal disorders. *BoneKEy Reports* 3, 2014;528.

Briggs MD, Chapman KL. Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia: mutation review, molecular interactions, and genotype to phenotype correlations. *Hum. Mutat.* 2002;19:465-478.

Caciotti A, Tonin R, Rigoldi M, Ferri L, Catarzi S, Cavicchi C, et al. Optimizing the molecular diagnosis of GALNS: novel methods to define and characterize Morquio--A syndrome-associated mutations. *Hum. Mutat.* 2015;36:357-368.

Campeau P, Schlesinger AE. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, Koch C, Korbonits M, McLachlan R, New M, Purnell J, Rebar R, Singer F, Vinik A, editors. *Skeletal Dysplasias*. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDTText.com, Inc.; 2000-2017

Chen C, Jiang Y, Xu C, Liu X, Hu L, Xiang Y, et al. Skeleton genetics: A comprehensive database for genes and mutations related to genetic skeletal disorders. *Database (Oxford)* 2016;2016:1-8.

Chen L, Yang W, Cole WG. 1996. Alternative splicing of exon 12 of the COL2A1 gene interrupts the triple helix of type-II collagen in the Kniest form of spondyloepi- physeal dysplasia. *J Orthop Res* 14:712–721.

Chong JX, Buckingham KJ, Jhangiani SN, Boehm C, Sobreira N, Smith JD, Harrell TM, McMillin MJ, Wiszniewski W, Gambin T, Coban Akdemir ZH, Doheny K, Scott AF, Avramopoulos D, Chakravarti A, Hoover-Fong J, Mathews D, Witmer PD, Ling H, Hetrick K, Watkins L, Patterson KE, Reinier F, Blue E, Muzny D, Kircher M, Bilguvar K, López-Giráldez F, Sutton VR, Tabor HK, Leal SM, Gunel M, Mane S, Gibbs RA, Boerwinkle E, Hamosh A, Shendure J, Lupski JR, Lifton RP, Valle D, Nickerson DA; Centers for Mendelian Genomics, Bamshad MJ. The Genetic Basis of Mendelian Phenotypes: Discoveries, Challenges, and Opportunities. *Am J Hum Genet.* 2015;97:199-215.

Cormier-Daire V. Spondylo-epi-metaphyseal dysplasia. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2008;22:33-44.

Currarino, G., Birch, J.G., and Herring, J.A. Developmental coxa vara associated with spondylometaphyseal dysplasia (DCV/SMD): "SMD-corner fracture type" (DCV/SMD-CF) demonstrated in most reported cases. *Pediatric radiology* 2000;30:14-24.

Dai L, Fang F, Huang Y, Cheng H, Ren C. Clinical and genetic features of Schwartz-Jampel syndrome in a Chinese child: case report and literature review. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2015;53:855-9.

Das Bhowmik A, Dalal A, Matta D, Kandadai RM, Kanikannan MA, Aggarwal S. Identification of a novel splice site HSPG2 mutation and prenatal diagnosis in Schwartz Jampel Syndrome type 1 using whole exome sequencing. *Neuromuscul Disord*. 2016;26:809-814.

Dateki S, Nakatomi A, Watanabe S, Shimizu H, Inoue Y, Baba H, Yoshiura K, Moriuchi H. Identification of a novel heterozygous mutation of the aggrecan gene in a family with idiopathic short stature and multiple intervertebral disc herniation. *J. Hum. Genet*. 2017;62: 717-721.

Deng H, Huang X, Yuan L. Molecular genetics of the COL2A1-related disorders. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2016;768:1-13.

Egunsola AT, Bae Y, Jiang MM, Liu DS, Chen-Evenson Y, Bertin T, Chen S, Lu JT, Nevarez L, Magal N, Raas-Rothschild A, Swindell EC, Cohn DH, Gibbs RA, Campeau PM, Shohat M, Lee BH. Loss of DDRGK1 modulates SOX9 ubiquitination in spondyloepimetaphyseal dysplasia. *J Clin Invest*. 2017;127:1475-1484.

Enderle A, Meyerhofer D, Unverfehrt G. Small People-Great Art: Restricted Growth from an Artistic and Medical Viewpoint. Hamm: *Artcolor Verlag*, 1994:13-25, 65-317.

Faivre L, Le Merrer M, Megarbane A, Gilbert B, Mortier G, Cusin V, Munnich A, Maroteaux P, Cormier-Daire V. Exclusion of chromosome 9 helps to identify mild variants of acromesomelic dysplasia Maroteaux type. *J Med Genet*. 2000; 37: 52–54.

Fradet A, Fitzgerald J. INPPL1 gene mutations in opsismodysplasia. *J Hum Genet*. 2017;62:135-140.

Furuichi T, Dai J, Cho TJ, Sakazume S, Ikema M, Matsui Y, Baynam G, Nagai T, Miyake N, Matsumoto N, Ohashi H, Unger S, Superti-Furga A, Kim OH, Nishimura G, Ikegawa S. CANT1 mutation is also responsible for Desbuquois dysplasia, type 2 and Kim variant. *J. Med. Genet.* 2011;48:32-37.

Genevieve D, Le Merrer M, Munnich A, Maroteaux P, Cormier-Daire V. Long-term follow-up in a patient with metatropic dysplasia. (Letter) *Am. J. Med. Genet.* 135A: 2005;342-343.

Giedion A. The weight of the fourth dimension for the diagnosis of genetic bone disease. *Pediatr Radiol* 1994;24:387–91.

Girisha KM, Kortüm F, Shah H, Alawi M, Dalal A, Bhavani GS, Kutsche K. A novel multiple joint dislocation syndrome associated with a homozygous nonsense variant in the EXOC6B gene. *Eur J Hum Genet.* 2016;24(8):1206-10.

Gkourogianni, A., Andrew, M., Tyzinski, L., Crocker, M., Douglas, J., Dunbar, N., Fairchild, J., Funari, M. F. A., Heath, K. E., Jorge, A. A. L., Kurtzman, T., and 25 others. Clinical characterization of patients with autosomal dominant short stature due to aggrecan mutations. *J. Clin. Endocr. Metab.* 20017;102: 460-469.

Gleghorn L, Ramesar R, Beighton P, Wallis G. A mutation in the variable repeat region of the aggrecan gene (AGC1) causes a form of spondyloepiphyseal dysplasia associated with severe, premature osteoarthritis. *Am J Hum Genet.* 2005;77:484-90.

Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016;17:333-51.

Hall, B. D. Diastrophic dysplasia: extreme variability within a sibship. *Am. J. Med. Genet.* 1996;63:28-33.

Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 2016;107:1-8.

Hoover-Fong J, Sobreira N, Jurgens J, Modaff P, Blout C, Moser A, Kim OH, Cho TJ, Cho SY, Kim SJ, Jin DK, Kitoh H, Park WY, Ling H, Hetrick KN, Doheny KF, Valle D, Pauli RM. Mutations in PCYT1A, encoding a key regulator of phosphatidylcholine metabolism, cause spondylometaphyseal dysplasia with cone-rod dystrophy. *Am J Hum Genet*. 2014;94:105-12.

Hu J, Lu J, Lian G, Ferland RJ, Dettenhofer M, Sheen VL. Formin 1 and filamin B physically interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation in the growth plate. *Hum. Molec. Genet*. 2014;23:4663-4673.

Huber C, Oules B, Bertoli M, Chami M, Fradin M, Alanay Y, Al-Gazali LI, Ausems MGEM, Bitoun P, Cavalcanti D P, Krebs A, Le Merrer M, et al. Identification of CANT1 mutations in Desbuquois dysplasia. *Am. J. Hum. Genet*. 2009;85:706-710.

Huber C, Fageih EA, Bartholdi D, Bole-Feysot C, Borochowitz Z, Cavalcanti DP, Frigo A, Nitschke P, Roume J, Santos HG, Shalev SA, Superti-Furga A, Delezoide AL, Le Merrer M, Munnich A, Cormier-Daire V. Exome sequencing identifies INPPL1 mutations as a cause of opsismodysplasia. *Am J Hum Genet*. 2013;92:144-9.

Huckert M, Stoetzel C, Morkmued S, Laugel-Haushalter V, Geoffroy V, Muller J, Clauss F, Prasad MK, Obry F, Raymond JL, Switala M, Alembik Y, Soskin S, Mathieu E, Hemmerlé J, Weickert JL, Dabovic BB, Rifkin DB, Dheedene A, Boudin E, Caluseriu O, Cholette MC, Mcleod R, Antequera R, Gellé MP, Coeuriot JL, Jacquelin LF, Bailleul-Forestier I, Manière MC, Van Hul W, Bertola D, Dollé P, Verloes A, Mortier G, Dollfus H, Bloch-Zupan A. Mutations in the latent TGF-beta binding protein 3 (LTBP3) gene cause brachyolmia with amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet*. 2015;24:3038-49.

Hug N, Longman D, Cáceres JF. Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. *Nucleic Acids Res.* 2016 Feb 29;44(4):1483-95.

Hunter KB, Lücke T, Spranger J, Smithson SF, Alpay H, André JL, Asakura Y, Bogdanovic R, Bonneau D, Cairns R, Cransberg K, Fründ S, Fryssira H, Goodman D, Helmke K, Hinkelmann B, Lama G, Lamfers P, Loirat C, Majore S, Mayfield C, Pontz BF, Rusu C, Saraiva JM, Schmidt B, Shoemaker L, Sigaudy S, Stajic N, Taha D, Boerkoel CF. Schimke immunoosseous dysplasia: defining skeletal features. *Eur J Pediatr.* 2010;169:801-11.

Iida A, Okamoto N, Miyake N, Nishimura G, Minami S, Sugimoto T, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Shiina M, Ogata K, Watanabe S, Ohashi H, Matsumoto N, Ikegawa S. Exome sequencing identifies a novel INPPL1 mutation in opsismodysplasia. *J Hum Genet.* 2013a Jun;58:391-4.

Iida A, Simsek-Kiper PÖ, Mizumoto S, Hoshino T, Elcioglu N, Horemuzova E, Geiberger S, Yesil G, Kayserili H, Utine GE, Boduroglu K, Watanabe S, Ohashi H, Alanay Y, Sugahara K, Nishimura G, Ikegawa S. Clinical and Radiographic Features of the Autosomal Recessive form of Brachyolmia Caused by PAPSS2 Mutations. *Hum Mutat.* 2013b;34:1381-6.

Iwata S, Ito M, Nakata T, Noguchi Y, Okuno T, Ohkawara B, Masuda A, Goto T, Adachi M, Osaka H, Nonaka R, Arikawa-Hirasawa E, Ohno K. A missense mutation in domain III in HSPG2 in Schwartz-Jampel syndrome compromises secretion of perlecan into the extracellular space. *Neuromuscul Disord.* 2015;25:667-71.

Jeon GW, Lee MN, Jung JM, Hong SY, Kim YN, Sin JB, Ki CS. Identification of a de novo heterozygous missense FLNB mutation in lethal atelosteogenesis type I by exome sequencing. *Ann Lab Med.* 2014;34:134-8.

Karniski L P. Mutation in the diastrophic dysplasia sulfate transporter (DTDST) gene: correlation between sulfate transport activity and chondrodysplasia phenotype. *Hum Mol Genet.* 2001;10:1485-90.

Khan S, Basit S, Khan MA, Muhammad N, Ahmad W. Genetics of human isolated acromesomelic dysplasia. *Eur J Med Genet.* 2016;59:198-203.

Khawaja A, Parnell SE, Ness K, Bompadre V, White KK. Opsismodysplasia: Phosphate Wasting Osteodystrophy Responds to Bisphosphonate Therapy. *Front Pediatr.* 2015;3:48.

Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis ER. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell.* 2013;155:27-38.

Krakow D, Robertson SP, King LM, Morgan T, Sebald ET, Bertolotto C, Wachsmann-Hogiu S, Acuna D, Shapiro SS, Takafuta T, Aftimos S, Kim CA, Firth H, Steiner CE, Cormier-Daire V, Superti-Furga A, Bonafe L, Graham JM Jr, Grix A, Bacino CA, Allanson J, Bialer MG, Lachman RS, Rimoin DL, Cohn DH. Mutations in the gene encoding filamin B disrupt vertebral segmentation, joint formation and skeletogenesis. *Nat Genet.* 2004;36:405-10.

Krakow D, Vriens J, Camacho N, Luong P, Deixler H, Funari TL, Bacino CA, Irons MB, Holm IA, Sadler L, Okenfuss EB, Janssens A, Voets T, Rimoin DL, Lachman RS, Nilius B, Cohn DH. Mutations in the gene encoding the calcium-permeable ion channel TRPV4 produce spondylometaphyseal dysplasia, kozlowski type and metatropic dysplasia. *Am J Hum Genet.* 2009;84:307-15.

Kurt-Sukur ED, Simsek-Kiper PO, Utine GE, Boduroglu K, Alanay Y. Experience of a skeletal dysplasia registry in Turkey: a five-years retrospective analysis. *Am J Med Genet A.* 2015;167A:2065-74.

Ladhani NN, Chitayat D, Nezarati MM, Laureane MC, Keating S, Silver RJ, Unger S, Velsher L, Sirkin W, Toi A, Glanc P. Dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type: prenatal ultrasound findings and molecular analysis. *Prenat Diagn.* 2013;33:1039-43.

Lamy M, Maroteaux P. Le nanisme diastrophique. *Presse Med.* 1960;68:1977-1980.

Lee CS, Baratang HFN, Rousseau J, Kumra H, Sutton R, Niceta M, Ciolfi A, Yamamoto G, Bertola D, Marcelis CL, Lugtenberg D, Bartuli A, Kim C, Hoover-Fong J, Sobreira N, Pauli R, Bacino C, Krakow D, Parboosingh J, Yap P, Kariminejad A, McDonald MT, Aracena MI, Lausch E, Unger S, Superti-Furga A, Lu J T, Baylor-Hopkins Center for Mendelian Genomics, Cohn DH, Tartaglia M, Lee BH, Reinhardt DP, Campeau PM. Mutations in Fibronectin Cause a Subtype of Spondylometaphyseal Dysplasia with “Corner Fractures”. *Am J Hum Genet.* 2017;101:815-23.

Li B, Krakow D, Nickerson DA, Bamshad MJ, University of Washington Center for Mendelian Genomics, Chang Y, Lachman RS, Yilmaz A, Kayserili H, Cohn DH. Opsismodysplasia resulting from an insertion mutation in the SH2 domain, which destabilizes INPPL1. *Am J Med Genet A.* 2014;164A:2407-11.

Maroteaux P, Spranger J, Stanescu V, Le Marec B, Pfeiffer RA, Beighton P, Mattei JF. Atelosteogenesis. *Am. J. Med. Genet.* 1982;13:15-25.

Matsushita M, Kitoh H, Kaneko H, Mishima K, Kadono I, Ishiguro N, Nishimura G. A novel SOX9 H169Q mutation in a family with overlapping phenotype of mild campomelic dysplasia and small patella syndrome. *Am J Med Genet A.* 2013;161A:2528-34.

Mierzewska H, Rydzanicz M, Biegański T, Kosinska J, Mierzewska-Schmidt M, Ługowska A, Pollak A, Stawiński P, Walczak A, Kędra A, Obersztyn E, Szczepanik E, Płoski R. Spondyloepimetaphyseal dysplasia with neurodegeneration associated with AIFM1 mutation - a novel phenotype of the mitochondrial disease. *Clin Genet.* 2017;91(1):30-37.

Miyake N, Elcioglu NH, Iida A, Isguven P, Dai J, Murakami N, Takamura K, Cho TJ, Kim OH, Hasegawa T, Nagai T, Ohashi H, Nishimura G, Matsumoto N,

Ikegawa S. PAPSS2 mutations cause autosomal recessive brachyolmia. *J Med Genet.* 2012;49:533-8.

Montano AM, Tomatsu S, Brusius A, Smith M, Orii T. Growth charts for patients affected with Morquio A disease. *Am. J. Med. Genet.* 2008;146A:1286-95.

Mortier GR. The diagnosis of skeletal dysplasias: A multidisciplinary approach. *Eur J Radiol.* 2001;40:161-7.

Mosher, D.F. (2006). Plasma Fibronectin Concentration: A Risk Factor for Arterial Thrombosis, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 26, 1193-1195.

Nicole S, Davoine C-S, Topaloglu H, Cattolico L, Barral D, Beighton P, Ben Hamida C, Hammouda H, Cruaud C, White PS, Samson D, Urtizberea JA, Lehmann-Horn F, Weissenbach J, Hentati F, Fontaine B. Perlecan, the major proteoglycan of basement membranes, is altered in patients with Schwartz-Jampel syndrome (chondrodystrophic myotonia). *Nature Genet.* 2000;26:480-3.

Nizon M, Huber C, De Leonardis F, Merrina R, Forlino A, Fradin M, Tuysuz B, Abu-Libdeh BY, Alanay Y, Albrecht B, Al-Gazali L, Basaran SY, et al. Further delineation of CANT1 phenotypic spectrum and demonstration of its role in proteoglycan synthesis. *Hum. Mutat.* 2012;33:1261-66.

Oud MM, Tuijnenburg P, Hempel M, van Vlies N, Ren Z, Ferdinandusse S, Jansen MH, Santer R, Johannsen J, Bacchelli C, Alders M, Li R, Davies R, Dupuis L, Cale CM, Wanders RJA, Pals ST, Ocaka L, James C, Müller I, Lehmberg K, Strom T, Engels H, Williams HJ, Beales P, Roepman R, Dias P, Brunner HG, Cobben JM, Hall C, Hartley T, Le Quesne Stabej P, Mendoza-Londono R, Davies EG, de Sousa SB, Lessel D, Arts HH, Kuijpers TW. Mutations in EXTL3 Cause Neuro-immuno-skeletal Dysplasia Syndrome. *Am J Hum Genet.* 2017;100(2):281-296.

Paik KH, Song SM, Ki CS, Yu HW, Kim JS, Min KH, Chang SH, Yoo EJ, Lee IJ, Kwan EK, Han SJ, Jin DK. Identification of mutations in the GNPTA (MGC4170) gene coding for GlcNAc-phosphotransferase alpha/beta subunits in Korean patients with mucopolidosis type II or type IIIA. *Hum. Mutat.* 2005;26:308-14.

Panda A, Gamanagatti S, Jana M, Gupta AK. Skeletal dysplasias: A radiographic approach and review of common non-lethal skeletal dysplasias. *World J Radiol.* 2014;6:808-25.

Parsons P, Gilbert SJ, Vaughan-Thomas A, Sorrell DA, Notman R, Bishop M, Hayes AJ, Mason DJ, Duance VC. Type IX collagen interacts with fibronectin providing an important molecular bridge in articular cartilage. *The Journal of biological chemistry* 2011;286:34986-97.

Payne F, Lim K, Girusse A, Brown RJ, Kory N, Robbins A, Xue Y, Sleight A, Cochran E, Adams C, Dev Borman A, Russel-Jones D, Gorden P, Semple RK, Saudek V, O'Rahilly S, Walther TC, Barroso I, Savage DB. Mutations disrupting the Kennedy phosphatidylcholine pathway in humans with congenital lipodystrophy and fatty liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:8901-6.

Polla DL, Cardoso MT, Silva MC, Cardoso IC, Medina CT, Araujo R, Fernandes CC, Reis AM, de Andrade RV, Pereira RW, Pogue R. Use of Targeted Exome Sequencing for Molecular Diagnosis of Skeletal Disorders. *PLoS One.* 2015 Sep 18;10:e0138314.

Rieubland C, Jacquemont S, Mittaz L, Osterheld MC, Vial Y, Superti-Furga A, Unger S, Bonafé L. Phenotypic and molecular characterization of a novel case of dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type. *Eur J Med Genet.* 2010;53:294-8.

Rossi A, Superti-Furga A. Mutations in the diastrophic dysplasia sulfate transporter (DTDST) gene (SLC26A2): 22 novel mutations, mutation review,

associated skeletal phenotypes, and diagnostic relevance. *Hum Mutat.* 2001 Mar;17:159-71.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-7.

Singh, P., Carraher, C., and Schwarzbauer, J.E. (2010). Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annual review of cell and developmental biology.* 2010;26: 397-419.

Spranger J, Hall BD, Hane B, Srivastava A, Stevenson RE. Spectrum of Schwartz-Jampel syndrome includes micromelic chondrodysplasia, kyphomelic dysplasia, and Burton disease. *Am J Med Genet* 2000;94:287–295.

Stevenson DA, Carey JC, Byrne JLB, Srisukhumbowornchai S, Feldkamp ML. Analysis of skeletal dysplasias in the Utah population. *Am J Med Genet Part A* 2012;158:1046-54.

Strauss KA, Jinks RN, Puffenberger EG, Venkatesh S, Singh K, Cheng I, Mikita N, Thilagavathi J, Lee J, Sarafianos S, Benkert A, Koehler A, et al. CODAS syndrome is associated with mutations of LONP1, encoding mitochondrial AAA+ Lon protease. *Am J Hum Genet* 2015;96:121-135.

Stum M, Davoine C-P, Vicart S, Guillot-Noël L, Topaloglu H, Carod-Artal FJ, Kayserili H, Hentati F, Merlini L, Urtizberea JA, Hammouda E-H, Quan PC, Fontaine B, Nicole S. Spectrum of HSPG2 (Perlecan) Mutations in Patients With Schwartz-Jampel Syndrome. *Human Mutation* 2006; 27;1082-91.

Superti-Furga A, Unger S. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2006 revision. *Am J Med Genet Part A.* 2007;143:1-18.

Terhal PA, Nievelstein RJ, Verver EJ, Topsakal V, van Dommelen P, Hoornaert K, et al. A study of the clinical and radiological features in a cohort of 93

patients with a COL2A1 mutation causing spondyloepiphyseal dysplasia congenita or a related phenotype. *Am J Med Genet A*. 2015;167A:461-75.

Testa F, Filippelli M, Brunetti-Pierri R, Di Fruscio G, Di Iorio V, Pizzo M, Torella A, Barillari MR, Nigro V, Brunetti-Pierri N, Simonelli F, Banfi S. Mutations in the PCYT1A gene are responsible for isolated forms of retinal dystrophy. *Eur J Hum Genet*. 2017;25:651-655.

Tham E, Eklund EA, Hammarsjö A, Bengtson P, Geiberger S, Lagerstedt-Robinson K, Malmgren H, Nilsson D, Grigelionis G, Conner P, Lindgren P, Lindstrand A, Wedell A, Albåge M, Zielinska K, Nordgren A, Papadogiannakis N, Nishimura G, Grigelioniene G. A novel phenotype in N-glycosylation disorders: Gillessen-Kaesbach-Nishimura skeletal dysplasia due to pathogenic variants in ALG9. *Eur J Hum Genet*. 2016 Feb;24(2):198-207.

Tomatsu S1, Montañó AM, Nishioka T, Gutierrez MA, Peña OM, Tranda Firescu GG, Lopez P, Yamaguchi S, Noguchi A, Orii T. Mutation and polymorphism spectrum of the GALNS gene in mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A). *Hum Mutat*. 2005;26:500-12.

Tompson SW, Bacino CA, Safina NP, Bober MB, Proud VK, Funari T, Wangler MF, Nevarez L, Ala-Kokko L, Wilcox WR, Eyre DR, Krakow D, Cohn DH. Fibrochondrogenesis results from mutations in the COL11A1 type XI collagen gene. *Am J Hum Genet* 2010;87:708-12.

Tompson SW, Merriman B, Funari VA, et al. A recessive skeletal dysplasia, SEMD aggrecan type, results from a missense mutation affecting the C-type lectin domain of aggrecan. *Am J Hum Genet* 2009;84:72–9.

Unger S, Lausch E, Rossi A, Megarbane A, Sillence D, Alcausin, M., Aytes, A., Mendoza-Londono, R., Nampoothiri, S., Afroze, B., Hall, B., Lo, I. F. M., and 17 others. Phenotypic features of carbohydrate sulfotransferase 3 (CHST3)

deficiency in 24 patients: congenital dislocations and vertebral changes as principal diagnostic features. *Am. J. Med. Genet* 2010;152A: 2543-49.

Vodopiutz J, Mizumoto S, Lausch E, Rossi A, Unger S, Janocha N, Costantini R, Seidl R, Greber-Platzer S, Yamada S, Müller T, Jilma B, Ganger R, Superti-Furga A, Ikegawa S, Sugahara K, Janecke AR. Chondroitin Sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase-1 (CSGαNAcT-1) Deficiency Results in a Mild Skeletal Dysplasia and Joint Laxity. *Hum Mutat.* 2017;38:34-38.

Walter K, Tansek M, Tobias ES, Ikegawa S, Coucke P, Hyland J, Mortier G, Iwaya T, Nishimura G, Superti-Furga A, et al. COL2A1-related skeletal dysplasias with predominant metaphyseal involvement. *Am J Med Genet Part A.* 2007;143:161-167.

Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(16):e164.

Wang Z, Horemuzova E, Iida A, Guo L, Liu Y, Matsumoto N, Nishimura G, Nordgren A, Miyake N, Tham E, Grigelioniene G, Ikegawa S. Axial spondylometaphyseal dysplasia is also caused by NEK1 mutations. *J Hum Genet* 2017;62:503-6.

Wang Z, Iida A, Miyake N, Nishiguchi KM, Fujita K, Nakazawa T, et al. Axial Spondylometaphyseal Dysplasia Is Caused by C21orf2 Mutations. *PLoS ONE* 2016;11: 1-16.

Warman ML, Cormier-Daire V, Hall C, Krakow D, Lachman R, LeMerrer M, Mortier G, Mundlos S, Nishimura G, Rimo DL, Robertson S, Savarirayan R, Sillence D, Spranger J, Unger S, Zabel B, Superti-Furga A. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision. *Am J Med Genet Part A* 2011;155:943-68.

Yamamoto GL, Baratela WA, Almeida TF, Lazar M, Afonso CL, Oyamada MK, Suzuki L, Oliveira LA, Ramos ES, Kim CA, Passos-Bueno MR, Bertola DR. Mutations in PCYT1A cause spondylometaphyseal dysplasia with cone-rod dystrophy. *Am J Hum Genet* 2014;94:113-9.