

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



Ariadne Ramalho de Lima Viana

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DE PACIENTES COM A
SÍNDROME DE ROBINOW**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde, no programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Orientadora: Juliana Forte Mazzeu de Araújo

(Brasília)

2022

ARIADNE RAMALHO DE LIMA VINAA
**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DE PACIENTES COM A
SÍNDROME DE ROBINOW**

Dissertação apresentada como
requisito parcial para a obtenção do
título de Doutor em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Aprovado em 17 de fevereiro de 2022

BANCA EXAMINADORA

Juliana Forte Mazzeu de Araújo
Componente da banca - (presidente)
Universidade de Brasília (UnB)

Raquel Tavares Boy
Componente da banca
Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ)

Eliete Pardono
Componente da banca
Universidade Paulista (UNIP)

Neysa Aparecida Tinoco Regattieri
Componente da banca
Universidade de Brasília (UnB)

Brasília
2022

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por seu amor, sua graça, sabedoria por ter me conduzido durante todo o desenvolvimento desse projeto por me presentear com incomparável oportunidade de conhecer pessoas incríveis, adquirir conhecimento único e permitir com que realizasse um grande sonho de trabalhar com pesquisa científica.

Minha mãe Roselaine Ramalho de Lima por ser fonte de determinação, incentivo, amor, dedicação e apoio de todos os dias desde o início até o final da realização do trabalho. Meu pai José Luis de Lima por ser um exemplo de vida, por todo o amor, atenção, apoio, dedicação, esforço para que sempre pudesse continuar estudando agradeço a vocês meus queridos por tudo por serem meus heróis. Meu irmão Joao Pedro Ramalho de Lima por escutar todas as minhas explicações e treinamento de apresentações de trabalhos.

Meu esposo Filipe V. da S. Viana por estar ao meu lado em todos os momentos pelo grande incentivo, força, determinação, carinho, amor. Pela tradução dos inúmeros artigos científicos, almoços no restaurante universitário com direito ao brigadeiro no final, por aguardar horas no laboratório comigo até os experimentos terminarem. Obrigada por tornar o desenvolvimento desse trabalho mais tranquilo e prazeroso.

Minha irmã Mariana Ramalho e Alison Horst por ser minha melhor amiga, pelo seu amor, carinho, determinação, preocupação, por estar ao meu lado durante um dos momentos da minha vida. Minha prima Rafaela Ramalho Guerra por acompanhar e fazer parte dessa jornada, por realizar auxílio em todo processo de purificação das amostras para sequenciamento, por sua dedicação, atenção e amor.

Minha respeitável orientadora Dra Juliana Forte Mazzeu de Araújo, admirável profissional dedicada, humana, conduziu o desenvolvimento desse trabalho com segurança e perspicácia sempre buscando com calma soluções para os problemas que surgiam além de ter paciência e sabedoria para lidar com momentos difíceis e sempre tirar as dúvidas por mais simples que elas fossem, se mostrando uma grande Mestre, orientadora, professora. A minha colega de pós graduação Barbara Merfort pelo apoio e dedicação na criação das imagens. À equipe do Baylor College of Medicine , especialmente o Dr. James Luspki, a Dra Claudia Carvalho e os estudantes Chaofan Zhang, Angad Jolly e Janson White pela enorme contribuição

com o trabalho. À equipe do laboratório de Genética da Faculdade de Medicina pelo apoio e disposição me ajudar sempre. Ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília por todo suporte acadêmico e administrativo. À CAPES pelo fornecimento da bolsa de aluno mestrando do programa. Aos pacientes que gentilmente concordaram em participar do estudo. À todos vocês meus familiares, amigos, professores queridos dedico a conclusão desse trabalho como reconhecimento da participação de todos na construção desse sonho que se tornou realidade e se conclui com sucesso, meu muito obrigada a todos.

Resumo

A síndrome de Robinow (SR) é uma desordem esquelética rara caracterizada por sinais clínicos que afetam o esqueleto, face e região genital. Foram descritas variantes autossômicas recessivas e dominantes, as últimas classificadas em DRS1, DRS2 e DRS3. A classificação nas diferentes formas clínicas ocorre a partir da correlação dos sinais clínicos apresentados com a identificação de variantes nos genes *DVL1*, *DVL3*, *FZD2*, *ROR2*, *WNT5A* ou *NXN*. Todos codificam proteínas que atuam na via de sinalização não canônica, independente de β -catenina, fundamental para diversos aspectos do desenvolvimento celular controlando várias atividades de especialização e proliferação celular. Em nosso trabalho buscamos variantes nos genes já citados por sequenciamento Sanger ou sequenciamento do exoma em 23 pacientes com diagnóstico clínico da forma autossômica dominante da SR e 22 pacientes com a forma recessiva da síndrome. Identificamos variantes no gene *DVL1* em 10 pacientes, no gene *DVL3* em 6 pacientes, 4 variantes no gene *FZD2*, 3 pacientes com variantes no gene *WNT5A* e 22 no *ROR2*. Como já observado na literatura, a maior frequência de variantes encontradas em nossa amostra foi nos genes *DVL1* e *DVL3*. A avaliação da frequência dos dados clínicos em pacientes com variante patogênica identificada permitiu descrever os achados clínicos relacionados em cada uma das formas da síndrome e ainda realizar um estudo comparativo de frequências não ramificada por gene relacionando as formas da síndrome evidenciando os sinais clínicos mais frequentes em cada uma delas. Na forma recessiva os defeitos esqueléticos como; mesomelia, braquidactilia, fusões de costelas e hemivértebras e sinais faciais como hipertelorismo, mesomelia, ponte nasal larga, narinas antevertidas, hipoplasia do terço médio, anormalidades dentárias estão presentes na maior parte dos pacientes independente da variante gênica que apresentam. Assim, pudemos contribuir para a melhor compreensão da relação genótipo-fenótipo na SR.

Abstract

Robinow syndrome (RS) is a rare skeletal disorder characterized by clinical signs that affect the skeleton, face and genital region. Autosomal recessive and dominant variants have been described, the latter classified as DRS1, DRS2 and DRS3. The classification in the different clinical forms occurs from the correlation of the clinical signs presented with the identification of variants in the *DVL1*, *DVL3*, *FZD2*, *ROR2*, *WNT5A* or *NXN* genes. All of them encode proteins that act in the non-canonical, β -catenin-independent signaling pathway, essential for several aspects of cell development by controlling various activities of cell specialization and proliferation. In our work, we searched for variants in the genes already mentioned by Sanger sequencing or exome sequencing in 23 patients with a clinical diagnosis of the autosomal dominant form of RS and 22 patients with the recessive form of the syndrome. We identified *DVL1* variants in 10 patients, *DVL3* variants in 6 patients, 4 variants in the *FZD2* gene, 3 patients with variants in the *WNT5A* gene and 22 in the *ROR2*. As already observed in the literature, the highest frequency of variants found in our sample was in the *DVL1* and *DVL3* genes. The evaluation of the frequency of clinical data in patients with an identified pathogenic variant allowed us to describe the related clinical findings in each of the forms of the syndrome and also to carry out a comparative study of frequencies not branched by gene relating the forms of the syndrome, showing the most frequent clinical signs in each one of them. In the recessive form, skeletal defects such as; mesomelia, brachydactyly, rib fusions and hemivertebrae and facial signs such as hypertelorism, wide nasal bridge, anteverted nares, midface hypoplasia, dental abnormalities are present in most patients regardless of the gene variant they present. Thus, we were able to contribute to a better understanding of the genotype-phenotype correlation in RS.

Lista de Figuras

Figura 1: Padrão de expressão de Ror2 com ênfase nos sinais envolvidos na SR a partir da análise em camundongos em estágios embrionários. Alterações craniofaciais, esqueleto axial, esqueleto dos membros, e genitais. 2B Malformações vertebrais em Ror2^{-/-}-variante. A–F: coluna vertebral de recém-nascido selvagem (Wt) e Ror2^{-/-}-camundongos corados com vermelho de alizarina/Azul Alciano os marcadores de tamanho referem-se ao comprimento da vértebra alterada. A, B: Coluna torácica, mostrando vértebras fundidas e divididas Wt e Ror2^{-/-}-variante, os discos intervertebrais são comprimidos e ausentes. G. Os somitos do variante são menores, conforme indicado pelos marcadores de tamanho..Retirado de Schwabe et al., 2004.

Figura 2: Representação estrutural da proteína ROR2 com apresentação de seus domínios extracelulares e intracelulares. Retirado de Mazzeu 2007.

Figura 3: Representação esquemática da proteína ROR2 e comparação da conservação de domínios em ortólogos já encontrados. Homologia da sequência primária e similaridade em tamanho, as proteínas Ror de mamíferos têm o mesmo domínio estrutura; contêm Ig extracelular, CRD e kringle domínios e tirosina quinase intracelular, rico em prolina e dois domínios ricos em serina-treonina Retirado de Forrester et al., 2002.

Figura 4: Via de sinalização WNT/ROR2 proteína de ligação extracelular e interação de Dvls que realizam a transdução de sinal até o núcleo para processo de transcrição. Retirada de Zhang et al., 2020

Figura 5: Análise do esqueleto a) Sem modificações em Wnt5a. b) Com Wnt5a ^{-/-} nulo em embriões. C,d) imagem lateral de membros inferiores. Retirado de Yamaguchi et al, 1999

Figura 6: a) Comparação de fenótipos de desenvolvimento em camundongos Ror2 ^{-/-} e Wnt5a ^{-/-} e tipo selvagem (WT). Ambos Ror2 ^{-/-} e Wnt5a ^{-/-} de recém-nascidos exibem nanismo, anormalidades faciais, membros e cauda. b) Visão dorsal dos genitais externos que apresentam hipoplasia ou ausência do tubérculo genital observada em camundongos Ror2 ^{-/-} e Wnt5a ^{-/-}, respectivamente. Retirado de Oishi et al., 2003

Figura 7: (a) WNT5A executa sua função junto com seu receptor ROR2. (b, c) Variantes em heterozigose de perda de função em ROR2 ou WNT5A. (d) variantes de sentido trocado no WNT5A (e, f) variantes em homozigose de perda de função em ROR2 ou WNT5A, retirado de Birgmeier et al em 2018

Figura 8: Modelo de regulação redox das NXN por meio das espécies reativas de oxigênio (EROs) da via Wnt / β -catenina pelo complexo Dvl / NRX. Retirado de Funato 2007.

Figura 9: Apresentação dos ramos de sinalização da via Wnt 1) Wnt/ β -catenina ou via canônica, 2) Wnt não canônica ou β -catenina independente. Essa possui duas ramificações; a via dependente de cálcio Wnt/Cálcio e Wnt/JNK ou polaridade planar celular. Os sinais canônicos são transmitidos através dos receptores da Família

Frizzled e do receptor LRP5 / LRP6 para a sinalização de h-catenina. Os sinais não canônicos são transmitidos através dos receptores da família Frizzled e dos co-receptores ROR2 / RYK para as cascatas de sinalização dependentes de DVL, JNK ou dependentes de Ca²⁺. Retirado de Katoh et al et al., 2007

Figura 10: a) Camundongos *Wnt5a* - / - têm defeitos anatômicos fenotipicamente semelhantes a pacientes com síndrome Robinow autossômica dominante hipertelorismo, boca triangular, hipoplasia de face. B) Bulldog e Bulldog francês braquicefálicos Retirado de Person et al 2010

Figura 11: A) Camundongos *Ror2* -/- têm defeitos da coluna vertebral. B) Vértébras do buldogue francês com cifose pronunciada da coluna vertebral associada a múltiplas anormalidades vertebrais, que incluem vértebras encurtadas, hemivértébras e vértebras da borboleta. C) paciente com variante no gene *ror2* com múltiplas hemivértébras. Retirado de Person et al 2010

Figura 12: Localização das variáveis identificadas nos genes *DVL1* e *DVL3*, em azul (variantes já descritas na literatura), em vermelho (variantes publicadas no trabalho de Zhang et al., 2022). Círculos maiores representam variantes idênticas em indivíduos não aparentados. (A) Variantes dentro da região de codificação de *DVL1* bases afetadas pelas variantes no exon 14. c.2105dupC; p.Pro703Serviços*103. (b) Variantes na região de codificação de *DVL3* visualização no exon 14 e 15. Retirada de Zang et al 2020.

Figura 13: Eletroferograma representativo da variante c.1644G>A no gene *FZD2*, encontrada em heterozigose no paciente A1.

Figura 14: Identificação das três regiões do receptor Frizzled, mostrando a ligação com Wnt em sua região extracelular, ligação e fosforilação das proteínas Dvls em sua região C-terminal. Retirada Türkmen et al 2017

Figura 15: Representação dos domínios funcionais conhecidos de *FZD2* com a ilustração das variantes encontradas (circulo vermelho), resultantes das variantes patogênicas dectadas até o momento no gene *FZD2* representadas pelos (círculos azuis).Retira de Zang et al 2022.

Lista de tabelas

Tabela 1: Distribuição de 28 sinais clínicos de acordo com suas frequências em pacientes com síndrome de Robinow autossômica dominante (SRD) e recessiva (SRR). Todos os sinais clínicos com frequência menor que 50% em pelo menos uma das variantes da síndrome foram retirados da tabela. Adaptado de Mazzeu et al. (2007).

Tabela 2: Apresentação das variantes no gene *ROR2* já descritas na literatura com descrição do exon alterado, variante identificada, efeito na proteína, domínio afetado, país de origem dos portadores de SRR pesquisados e autores.

Tabela 3: Apresentação das variantes nos genes *DVL1*, *DLV3*, *FZD2*, *WNT5A* já descritas na literatura com descrição do exon alterado, alteração no DNA, efeito na proteína, domínio afetado, país de origem dos pacientes e autores.

Tabela 4: Primers utilizados para amplificação da região codificante do gene *DVL1*. Cada par de primer amplifica um exon do gene *DVL1*.

Tabela 5: utilizados para amplificação da região codificante do gene *DVL3*. Cada par de primer amplifica um exon do gene *DVL3*.

Tabela 6: Apresentação de todas as variantes encontradas no trabalho com identificação dos pacientes, gene, exon alterado, tipo de variante de acordo com a provável alteração na proteína, variante identificada, alteração resultante e origem geográfica.

Tabela 7: Apresentação de todas as variantes dos genes *DVL1* e *DVL3* descritas na literatura até o momento com inclusão das variantes encontradas no trabalho atual, exon alterado, tipo de variante, resultante, país e autor.

Tabela 8: Descrição de todas as variantes já descritas na literatura no gene *FZD2* e inclusão de variantes do trabalho atual

Tabela 9: Apresentação das 10 variantes no gene *WNT5A* já descritas na literatura, com seus respectivos autores ano, País de origem dos pacientes, variantes detectadas, tipo de variante e resultante

Tabela 10: Análise dos principais sinais clínicos descritos na SRD em cada um dos pacientes, agrupados de acordo como gene mutado. As frequências totais foram comparadas com os dados de Mazzeu et al., 2007. (X – presente, / ausente, ND- Não determinado, NA- Não se aplica)

Tabela 11: Apresentação da frequência dos sinais clínicos separados de acordo com o gene alterado e comparados com as frequências de Mazzeu et al., 2007. (ND, não determinado)

Lista de Abreviaturas e Siglas

CE - Movimentos de Extensão Convergente
CK1a - Casein Kinase 1 Alpha
COVESDEM - Defeitos de Segmentação Costovertebral com Mesomelia
CRD - Domínio Rico em Cisteína
DAAM1 - Dishevelled Associated Activator Of Morphogenesis 1
Diversin - Ankyrin Repeat Domain 6
Drok - Drosophila Rho-kinase
DRS - Síndrome de Robinow Autossômica Dominante
Dsh - Drosophila Dishevelled Segment Polarity Protein
DVL1 - Dishevelled Segment Polarity Protein 1
DVL2 - Dishevelled Segment Polarity Protein 2
DVL3 - Dishevelled Segment Polarity Protein 3
FLN1 - Proteína Filamin A
FZD - Member of the 'frizzled' Gene Family
FZD2 - Frizzled Class Receptor 2, Seven Transmembrane Spanning Receptor
FZD5 - Frizzled Class Receptor 5, Seven Transmembrane Spanning Receptor
FZD7 - Frizzled Class Receptor 7, Seven Transmembrane Spanning Receptor
GSK3 β - Glycogen synthase kinase 3 Beta
GTP - Trimeric G-protein
JNK - C-Jun N-terminal Kinase
LRP - Low-density Lipoprotein
LRP5/6 - Receptor de Baixa Densidade Relacionado a Lipoproteína 5/6
MKK7 - Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 7
NFAT - Fator Nuclear de Células T Ativadas
PCP - Via de Polaridade Planar Celular
PI3K - Fosfoinositida 3-Kinase
PKC - Proteína Kinase C
PRICKLE - Prickle Planar Cell Polarity Protein
ROCK - Rho-associated protein kinase
ROR2 - Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 2
RRS - Síndrome de Robinow Autossômica Recessiva
RS - Síndrome de Robinow
SPECC1L - Sperm Antigen With Calponin Homology And Coiled-Coil Domains

1 Like

TCF/LEF - T-cell factor/lymphoid enhancer factor
VANGL - VANGL Planar Cell Polarity Protein 1
Wnt/Ca²⁺ - Via Dependente De Cálcio
WNT3A Wingless-type MMTV integration site family, member 3A
WNT5A - Wingless-type MMTV integration site family, member 5^a

SUMÁRIO

I. Introdução	12
I.1 Histórico da Síndrome de Robinow	13
I.2 Aspectos clínicos gerais	14
I.3 Etiologias da Síndrome de Robinow	16
I.3.1 Síndrome de Robinow Recessiva (SRR)	15
I.3.2 Síndrome de Robinow Dominante (SRD)	27
I.4 Via de sinalização Wnt	32
I.5 Estudo em modelos animais	34
II. Objetivo	37
II.1 Objetivos específicos	37
III. Capítulo I	38
III.1 Introdução	39
III.2 Material e Métodos	40
III.2.2 Seleção dos pacientes para estudo	40
III.2.3 Análise clínica	40
III.2.4 Análise molecular	41
III.2.5 Material biológico	41
III.2.6 Extração de DNA	41
III.2.7 Triagem de variantes nos genes <i>DVL1/DVL3</i>	42
III.2.8 PCR- Reação em cadeia da polimerase	42
III.2.9 Sequenciamento Sanger	43
III.2.10 Clonagem	43
III.2.11 Sequenciamento completo exoma (WES)	43
III.3. Resultados e Discussão	45
III.3.1 Análise molecular	45
III.3.2 Genes <i>DVL1/DVL3</i>	45
III.3.3 Gene <i>FZD2</i>	49
III.3.4 Gene <i>WNT5A</i>	55
III.3.5 Estudo de frequência dos sinais clínicos	58
IV. Capítulo 2	65
V. Considerações finais	113
VI. Referências bibliográficas	114

I. Introdução

I.1 Histórico da Síndrome de Robinow

A primeira descrição da síndrome de Robinow (SR), também conhecida como “Síndrome da Face Fetal”, foi relatada por Robinow et al., em 1969, na publicação “*A newly recognized dwarfing syndrome*”, ao observar os filhos de um casal não consanguíneo que apresentavam nanismo mesomélico, genitália hipoplásica e anomalias faciais: hipertelorismo, fissuras palpebrais alargadas, nariz curto e anomalias dentárias. O relato de outros afetados de ambos os sexos em gerações precedentes sugeriu a forma de herança autossômica dominante da síndrome (SRD).

Em continuidade às primeiras publicações sobre a Síndrome de Robinow, Wadia et al em 1978, sugerem a forma de herança autossômica recessiva ao descreverem anomalias faciais, genitais, mesomelia e defeitos de segmentação costovertebral em dois pacientes filhos de um casal consanguíneo. Esta síndrome foi chamada inicialmente pelo acrônimo COVESDEM (do inglês *costovertebral segmentation defects with mesomelia*). No ano seguinte reconheceu-se que a síndrome COVESDEM era uma variante da SR com herança autossômica recessiva (SRR), já se reconhecendo assim a heterogeneidade genética da SR.

Em 1982 Shprintzen et al relatam o primeiro caso de transmissão de pai para filho excluindo a hipótese do mecanismo de herança ligada ao X, reafirmando então as formas de herança dominante e recessiva descritas por Robinow e Wadia.

A incidência da síndrome de Robinow não é conhecida, devido ao baixo números de casos reportados na literatura e a dificuldade no diagnóstico baseado apenas em achados clínicos. Uma maior frequência da forma autossômica recessiva da síndrome foi observada em populações da Turquia e Oman, regiões que apresentam alto índice de casamentos consanguíneos; cerca de 80% dos afetados pela forma recessiva são fruto de casamentos consanguíneos. A baixa incidência da síndrome pode ser atribuída também a um subdiagnóstico de muitos casos, gerado pela grande variabilidade clínica entre os pacientes, o que torna o diagnóstico clínico diferencial complexo, e a necessidade de uma descrição completa do fenótipo dos afetados (Aksit et al., 1997).

Em 2000, Afzal et al. e van Bokhoven et al, de forma independente identificaram variantes bialélicas no gene *ROR2* como a causa da forma autossômica recessiva da síndrome. Em 2007 Person et al identificaram o primeiro gene responsável pela forma dominante da síndrome, *WNT5A*, na família originalmente descrita por Robinow em 1969. Os demais genes responsáveis pelas formas dominantes da síndrome só foram identificados após o advento do sequenciamento de exoma (Bunn et al., 2016, White et al., 2015, White et al., 2016, White et al., 2018). Assim, os genes *WNT5A*, *DVL1*, *DVL3* e *FZD2* compõem o grupo de genes causadores das variantes dominantes da SRD. Em 2018, White et al propõem uma segunda forma autossômica recessiva da síndrome com variantes no gene *NXN*.

Os seis genes codificam componentes do complexo de sinalização WNT, que regula eventos morfogênicos, incluindo padrões embrionários, diferenciação celular, crescimento e migração (Oishi et al., 2003; Schleiffarth et al., 2007; Yamaguchi, Bradley, McMahon, & Jones, 1999). Hoje, cerca de 95% dos pacientes com hipótese diagnóstica de SR apresentam variantes patogênicas em um dos genes citados (Zhang et al, 2020).

I.2 Aspectos clínicos gerais da SR

Ao longo dos últimos 20 anos a caracterização clínica das variantes da RS vem sendo trabalhada em busca dos sinais clínicos mais frequentes apresentados pelos portadores. Trata-se de uma síndrome heterogênea com expressividade variável que inclui dismorfias faciais típicas associadas ao encurtamento mesomélico dos membros e genitália hipoplásica. Os achados clínicos mais frequentes na SRR são hipertelorismo, baixa estatura, defeitos de segmentação costovertebral, fusões de costela. Já os pacientes com a SRD podem apresentar além das dismorfias típicas, estatura normal na idade adulta, acometimento cardíaco e renal (Mazzeu et al, 2007).

Baseando-se na frequência de 75 sinais clínicos, Mazzeu et al., avaliaram pacientes novos e da literatura sendo 37 com SRR e 51 com SRD determinando os sinais clínicos que definiam melhor cada uma das formas da síndrome. Os sinais clínicos com maior relevância para a caracterização da síndrome apresentaram frequência de 75%, no grupo de pacientes analisados independentemente de serem acometidos pela forma recessiva ou dominante. Tais características clínicas foram:

hipertelorismo, nariz curto, hipoplasia do terço médio da face, encurtamento mesomélico de membros, braquidactilia, clinodactilia, micropênis e baixa estatura. Alguns sinais se mostraram peculiares na análise da amostra de pacientes como hemivértebra e escoliose presentes em mais de 75% dos pacientes com a SRR e em menos do que 25% dos pacientes com SRD. Dentes supranumerários (10,3%) foram observados apenas em pacientes com a forma dominante descritos na Tabela 1 (Mazzeu et al., 2007). A tabela resume a frequência dos sinais clínicos mais frequentes nas variantes SRR e SRD da síndrome. Ressalta-se que a tabela abaixo foi adaptada e apenas os sinais clínicos com frequência igual ou maior que 50% analisados por Mazzeu et al foram citados nesse trabalho.

Tabela 1: Distribuição de 27 sinais clínicos de acordo com suas frequências em pacientes com síndrome de Robinow autossômica dominante (SRD) e recessiva (SRR). Todos os sinais clínicos com frequência menor que 50% em pelo menos uma das variantes da síndrome foram retirados da tabela. Adaptado de Mazzeu et al. (2007).

Sinais clínicos	SRD (%)	SRR(%)
Craniofaciais		
Hipertelorismo ocular	100	100
Narinas antevertidas	96	96
Ponte Nasal larga	97	95
Narinas antevertidas	87	97
Hipoplasia do terço média da face	81	94
Cantos da boca voltado pra baixo	63	95
Testa proeminente	79	77
Boca triangular	65	86
Braquidactilia	81	91
Ponte nasal baixa	78	49
Cílios longos	54	59
Micrognatia	57	68
Língua bífida	39	59
Má oclusão dentaria	49	94
Hiperplasia de gengiva	36	71
Esqueleto		
Escoliose	18	77
Macrocefalia	64	26
Clinodactilia	79	77
Hemivertebra	23	98
Encurtamento mesomélico de membros	80	100
Baixa estatura	81	97
Mãos curtas	62	84
Genitália		
Clitóris hipoplásico	46	80
Hipoplasia de pequenos lábios	50	81
Micropênis	84	100
Criptorquidia	72	67

I.3 Etiologia da Síndrome de Robinow

I.3.1 Síndrome de Robinow autossômica recessiva (SRR)

Em busca da descrição do gene mutado na SRR Afzal et al em 2000, realizaram o mapeamento por homozigose por meio da análise de marcadores em cinco famílias de casais consanguíneos e descendentes afetados pela SRR. A única região de homozigose comum ocorreu em um segmento de 3-4 CM na região 9q22, entre os marcadores D9S1836 e D9S1803 (Afzal, et al., 2000).

Os mesmos autores deram continuidade ao estudo para localizar o gene no intervalo identificado, a partir da análise de polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) e sequenciamento Sanger e identificaram variantes nos exons 5,7 e 9 do gene *ROR2* em 26 dos 27 pacientes investigados. Simultaneamente, van Bokhoven et al (2000), encontraram variantes nos exons 5, 8 e 9 por sequenciamento em onze famílias com afetados pela SRR (Afzal, et al., 2000). Não foram identificadas variantes no gene *ROR2* em pacientes com SRD (van Bokhoven, comunicação pessoal)

A partir da detecção de variantes patogênicas no gene *ROR2* em pacientes com SRR, estudos em animais corroboraram a relação do gene com o fenótipo apresentado pelos afetados pela SRR. Em 2000, De chiara et al, projetaram um alelo *Ror2* com modificação no domínio tirosina quinase interrompendo a função de *Ror2* em camundongos, revelando que *Ror2* é seletivamente expresso em condrócitos de todos os ossos submetidos à ossificação endocondral, como os da costela e ossos dos membros mas não em regiões precursoras de ossos que se formam por ossificação intramembranosa como ossos parietais do crânio (De Chiara et al., 2000).

Em 2004, Schwabe et al, analisaram camundongos *Ror2* - / - comparando com o quadro clínico de humanos afetados pela síndrome. Análise da expressão de *Ror2* na região craniofacial foi realizada em embriões com diferentes fases de desenvolvimento. Na Figura 1 podemos observar as alterações encontradas.

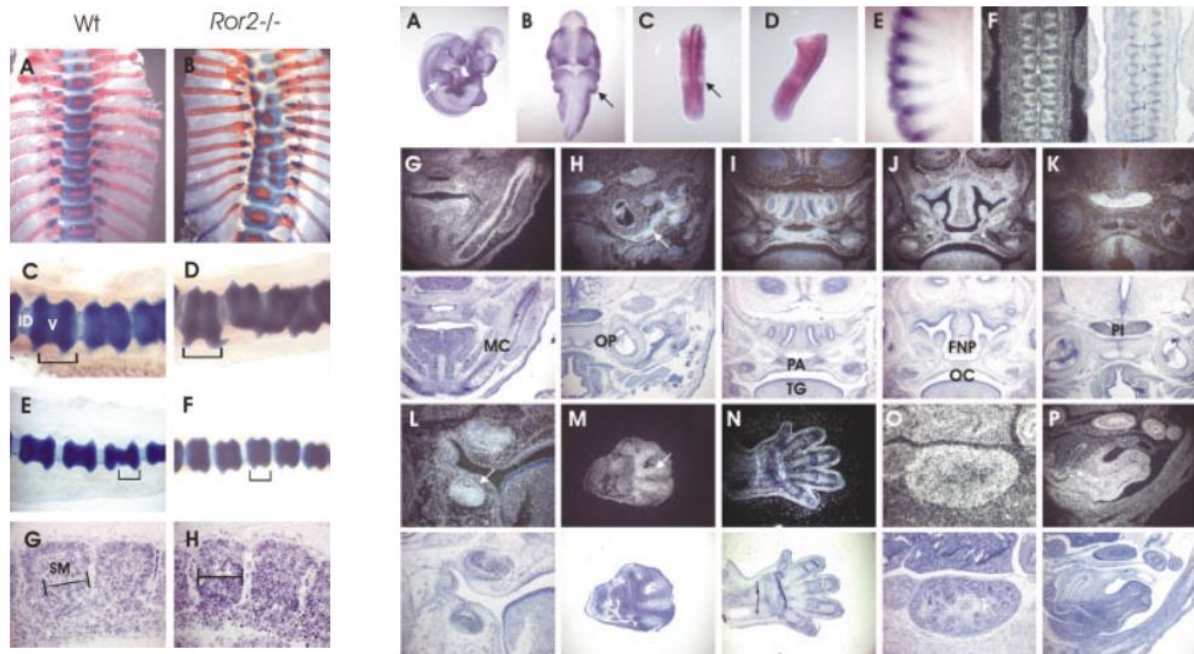


Figura: 1 Padrão de expressão de *Ror2* com ênfase nos sinais envolvidos na SR a partir da análise em camundongos em estágios embrionários. Alterações craniofaciais, esqueleto axial, esqueleto dos membros, e genitais. 2B Malformações vertebrais em *Ror2*^{-/-} variante. A–F: coluna vertebral de recém-nascido selvagem (Wt) e *Ror2*^{-/-} camundongos corados com vermelho de alizarina/Azul Alciano os marcadores de tamanho referem-se ao comprimento da vértebra alterada. A, B: Coluna torácica, mostrando vértebras fundidas e divididas Wt e *Ror2*^{-/-} variante, os discos intervertebrais são comprimidos e ausentes. G. Os somitos do variante são menores, conforme indicado pelos marcadores de tamanho. Retirado de Schwabe et al., 2004.

O estudo em modelo animal ressalta a importância da expressão do gene *Ror2* nas fases iniciais da embriogênese, sua influência na formação óssea e a atividade das proteínas Wnts durante o processo. Esses achados sugerem a possível interação entre Wnts e *Ror2* e sua interferência no desenvolvimento das manifestações clínicas apresentadas por afetados pela SRR, além de fornecerem evidências para a melhor compreensão dos processos intracelulares que desencadeiam a clínica dos afetados (Schwabe et al., 2004).

O gene *ROR2* (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2), está localizado em 9q22.2, possui cerca de 222 kb é constituído de nove exons e transcreve um RNAm de 4092 b. A proteína ROR2 possui 943 aminoácidos e é um membro da família dos receptores órfãos com atividade de tirosina quinase que regulam múltiplas funções celulares e teciduais e desempenham um papel crucial em diversos eventos durante o desenvolvimento embrionário. (Schwabe et al., 2004).

A superfamília de RTKs transmembrana possui em torno de 58 membros conhecidos em mamíferos que se enquadram em 20 subfamílias (Robinson, Wu, & Lin, 2000), dentre essas a família ROR que foi isolada pela primeira vez em 1992 a partir de linhagem celular de neuroblastoma humano (Masiakowski & Carroll, 1992). As RTKs atuam como receptores para fatores de crescimento que controlam a multiplicação e diferenciação celular desempenhando um papel importante na sinalização intracelular.

Sua estrutura (Figura 2) é caracterizada pela presença de domínios intracelulares ricos em prolina, serina e treonina e um domínio tirosina quinase e três domínios extracelulares: um domínio semelhante ao da imunoglobulina (*Ig-like*), um domínio rico em cisteína e um domínio *Kringle*. (Oishi et al., 1999; Forrester et al., 2002).

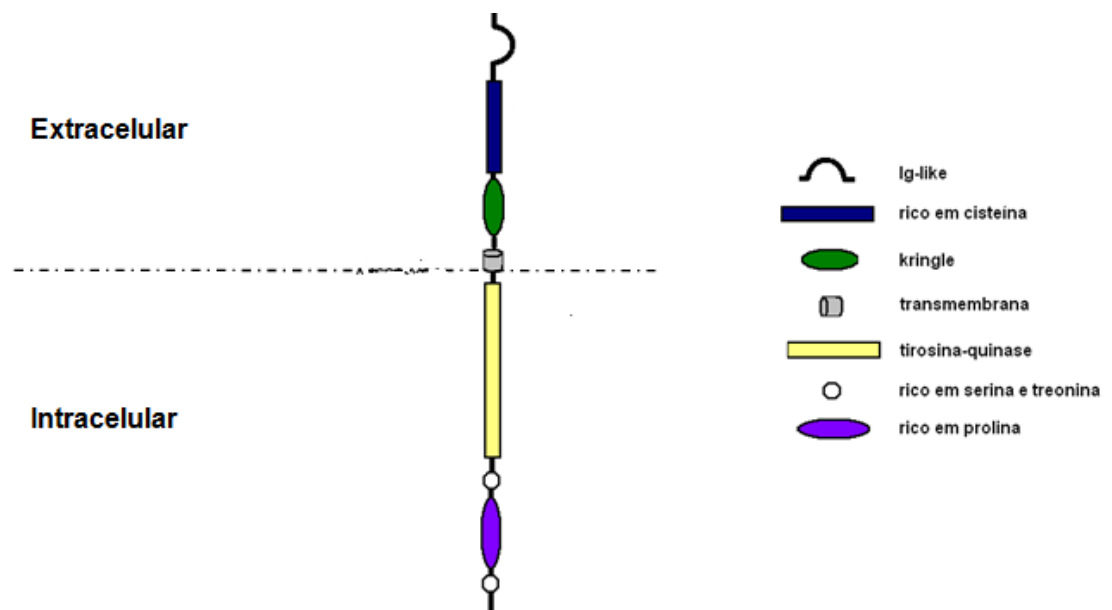


Figura 2: Representação estrutural da proteína ROR2 com apresentação de seus domínios extracelulares e intracelulares. Retirado de Mazzeu 2007

Oishi et al. em 1997 mostraram a presença de ortólogos do gene *ROR2* em outras espécies como *Drosophila melanogaster* Dror (Ror1) e Dnrk (Ror2), sendo que o receptor Dror não possui o domínio Ig-like, rico em serina e o rico em prolina. Em *C. elegans* foi identificado um único ortólogo, *cam-1* (canal-associated neurons abnormal migration), cujo produto não possui os domínios ricos em serina e treonina e o domínio rico em prolina.

Forrester et al., em 2002 analisaram a conservação dos domínios comuns do receptor tirosina quinase Ror2 encontrados em ortólogos, já descritos anteriormente comparando assim a estrutura do receptor em cada ortólogo e realizando uma retrospectiva de informações sobre a conservação dos domínios para cada ortólogo como mostra a Figura 3.

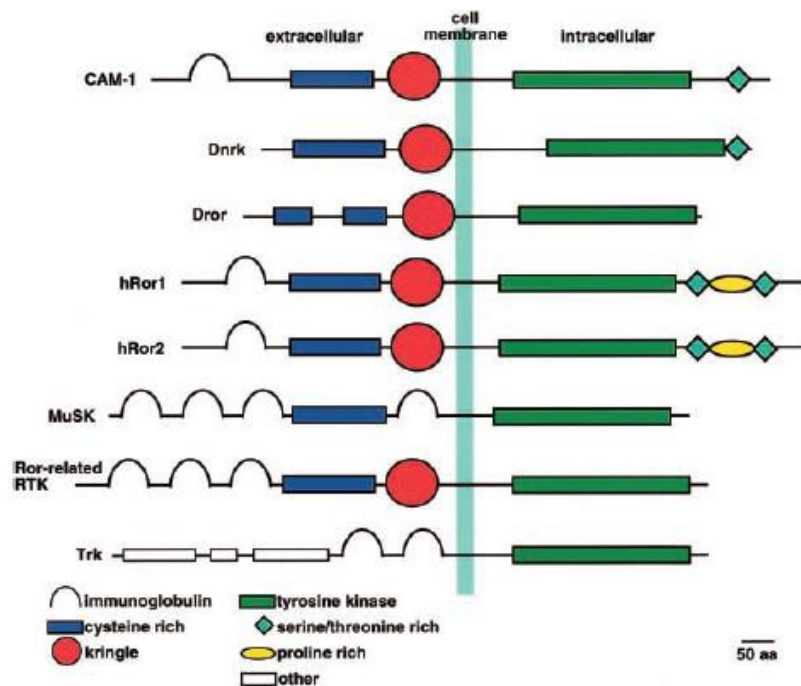


Figura 3: Representação esquemática da proteína ROR2 e comparação da conservação de domínios em ortólogos já encontrados. Homologia da sequência primária e similaridade em tamanho, as proteínas Ror de mamíferos têm o mesmo domínio estrutura; contêm Ig extracelular, CRD e kringle domínios e tirosina quinase intracelular, rico em prolina e dois domínios ricos em serina-treonina Retirado de Forrester et al., 2002.

A estrutura da proteína ROR2 já é conhecida, seus domínios exercem funções já descritas em outros receptores tirosina quinase que participam das vias de transdução de sinal, através do mecanismo geral de ativação pela ligação do ligante ao domínio extracelular SH2, estimulando a dimerização do receptor, estimulando fosforilação da tirosina alvo levando ao recrutamento de proteínas sinalizadoras que ativam uma cascata de sinal intracelular. Essa ativação e transdução do sinal pela via

do receptor ROR regula atividade de expressão das células envolvidas no desenvolvimento ósseo (Schlessinger et al., 2000).

Alterações causadas ao longo dos domínios podem levar a perda da função normal do receptor ou ainda uma atividade parcial prejudicando as vias onde elas atuam, por isso a relação com a SRR que acomete os afetados com várias malformações ósseas. Os principais ligantes do receptor ROR2 são; componentes da família WNT incluindo WNT1, WNT2, WNT3 e WNT3A, WNT4, WNT5A e WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT8, WNT11. Essas proteínas realizam a ativação da conformação do receptor sendo essenciais nos processos de expressão genica, proliferação e migração celular. Após a conformação do receptor pela ativação do ligante extracelular WNT a família DVL participa da via se ligando aos domínios intracelulares realizando a transdução de sinal até o núcleo (Billiard et al., 2005; Huelsken e al., 2001).

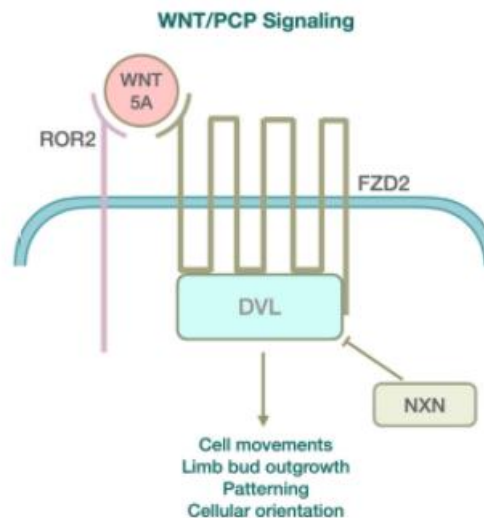


Figura 4: Via de sinalização WNT/ROR2 proteína de ligação extracelular e interação de Dvls que realizam a transdução de sinal até o núcleo para processo de transcrição. Retirada de Zhang et al., 2020

Yamaguchi et al em 1999 descreveram o potencial de interferência de Wnt5a no crescimento de diversas estruturas embrionárias, como resultado detectaram: Wnt5a expresso na extremidade caudal do embrião durante as fases de crescimento e padronização do eixo A-P embrionário e transcrição ao longo do eixo A-P durante todos estágios de gastrulação. Além disso Wnt5a também apresentou associação

com o desenvolvimento craniofacial sendo expresso em regiões que incluem processo de desenvolvimento fronto nasal, maxilares, mandibulares e língua. Em camundongo nocaute para *Wnt5a* foram observadas fusão de costelas alteração semelhante as encontradas em pacientes com SRR.

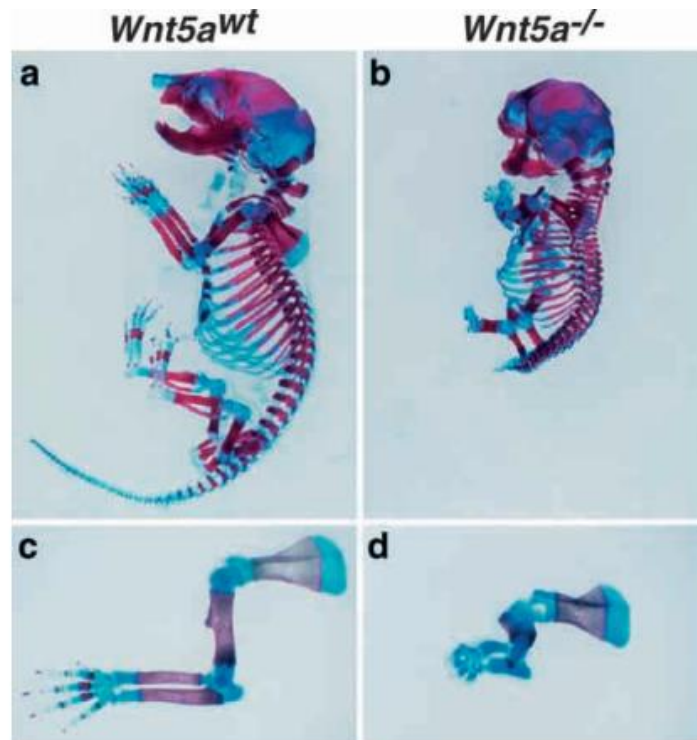


Figura 5: Análise do esqueleto a) Sem modificações em *Wnt5a*. b) Com *Wnt5a* $-/-$ nulo em embriões. C,d) imagem lateral de membros inferiores. Retirado de Yamaguchi et al, 1999

Oishi et al 2003 realizaram a comparação do desenvolvimento fenotípico de camundongos *Ror2* $-/-$ e *Wnt5a* $-/-$ em busca das possíveis interações físicas e funcionais entre *Ror2* e *Wnt5a* na sinalização não canônica.

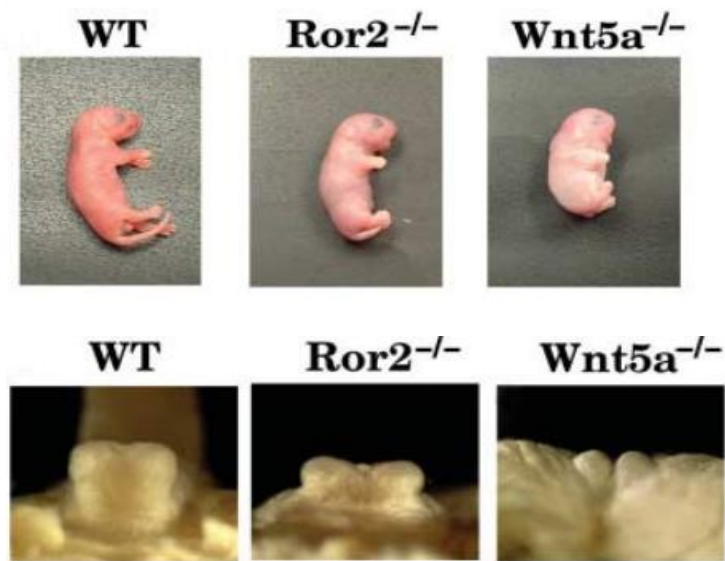


Figura 6: a) Comparação de fenótipos de desenvolvimento em camundongos *Ror2* $-/-$ e *Wnt5a* $-/-$ e tipo selvagem (WT). Ambos *Ror2* $-/-$ e *Wnt5a* $-/-$ de recém-nascidos exibem nanismo, anormalidades faciais, membros e cauda. b) Visão dorsal dos genitais externos que apresentam hipoplasia ou ausência do tubérculo genital observada em camundongos *Ror2* $-/-$ e *Wnt5a* $-/-$, respectivamente. Retirado de Oishi et al., 2003

As alterações encontradas se assemelham as observadas em camundongos *Wnt5a* $-/-$ e *Ror2* $-/-$ no estudo de Yamaguchi et al 1999, sugerindo uma possível interação entre *Ror2* com *Wnt5a* durante o desenvolvimento. A função do receptor *Ror2* e sua interação com as proteínas *Wnt5a* na via não canônica tem grande interferência no desenvolvimento ósseo o que reafirma a sua hipótese de relação com a SR. Birgmeier et al em 2018 esquematizaram os possíveis mecanismos de ação de WNT5A com o receptor ROR2, duas cópias de cada proteína são exibidas em cada painel.

Tabela 2: Apresentação das variantes no gene *ROR2* já descritas na literatura com descrição do exon alterado, variante identificada, efeito na proteína, domínio afetado, país de origem dos portadores de SRR pesquisados e autores.

Ariante	Exon	Alteração na proteína	Domínio	País	Autor
c.355C>T	3	p.(Arg119*)	Ig-like	Turquia	Tufan et al 2005
c.227G > A	3	p.(Gly76Asp)	Ig-like	India	Tamhankar et al 2014
c.323G>A	3	p.Arg108Gln	Ig-like	Brasil	Lima et al 2018/Rai et al 2021
c.496G>C	5	P.(Asp166His)	Rico em cisteína	Turquia	Aglan et al 2015
c.545G>A	5	p.(Cys182)Tyr	Rico em cisteína	Turquia/Índia	Van Bokhoven et al 2000
c.550C>T	5	p.(Arg184Trp)	Rico em cisteína	Turquia	Tufan et al 2005
c.565C>T	5	p.(Arg189Trp)	Rico em cisteína	Paquistão	Afzal et al. 2000
c.574T>G	5	p.(Tyr192Asp)	Rico em cisteína	Egito	Ali et al 2007/ Aglan et al 2015
c.613C>T	5	p.(Arg205*)	Rico em cisteína	Turquia/Índia	Van Bokhoven et al 2000/Yang et al 2020
c.668G > A	5	p.(Cys223Tyr)	Rico em cisteína	India	Tamhankar et al 2014
c.730C > T	5	p.(Arg244Trp)	Rico em cisteína	Egito	Ali et al 2007
c.814C > T	6	p.Arg272Cys)	Rico em cisteína	Libano	Mehawej et al 2011
c.904C>T	6	p.(Arg302Cys)	Rico em cisteína	EUA/China	Zang et al 2020/ Yang et al 2020
c.977G > C	7	p.(Gly326Ala)	Kringle	Egito	Aglan et al 2015
c.990delC	7	p.(Thr331Profs*114)	Kringle	EUA	Zhang et al 2020
c.1096C>T	7	p.(Arg366Trp)	Kringle	Paquistão/EUA	Afzal et al 2000
c.1189C>T	8	p.(Arg397*)	Kringle	Turquia/Índia	Van Bokhoven 2000
c.1324C>T	8	p.(Arg442*)	Tirosina quinase	Oman/ Japão	Schwazer et al.2009
c.1386+1G>A	Intron 8	-	-	Turquia	Kirat et al 2020
c.1504C>T	9	p.(Gln502*)	Tirosina quinase	Oman/ Japão	Afzal et al. 2000
c.1565_1569delinsTGTA	9	p.(Arg522Leufs*2)	Tirosina quinase	India	Rai et al. 2021
c.1583G > A	9	p.(Arg528Gln)	Tirosina quinase	Egito	Aglan et al 2015
c.1740_1774del	9	p.(Thr582Alafs*123)	Tirosina quinase	Paquistao	Van Bokhoven et al 2000
c.1860T>A	9	p.(Ans620Lys)		Turquia	Afzal et al. 2000
c.1937-1943del	9	p.(Tyr646Cysfs*57)	Tirosina quinase	Turquia	Tufan et al 2005
c.2030C > T	9	p.(Ser677Phe)	Tirosina quinase	Egito	Aglan et al 2015
c.2160G>A	9	p.(Trp720*)	Tirosina quinase	Turquia/Índia	Van Bokhoven et al 2000

Outro gene com recente associação à SR é o *NXN* (nucleoredoxin) localizado no cromossomo 17. *NXN* é uma proteína de resposta ao estresse oxidativo que compõem a família das teorredoxinas (*TRX*), participa efetivamente da via PCP ao ligar-se diretamente ao domínio central PDZ de DVL induzindo a fosforilação deste. A alteração do processo de fosforilação em DVL é realizada por várias quinases e fosfatases que podem ser moduladas pelas *NXN*. A inibição da interação de DVL com estas quinases pela presença de *NXN* resultaria na regulação negativa da fosforilação de DVL (Hartzet al., 2009).

NXN age como um regulador negativo da via Wnt / PCP bloqueando a ubiquitinação e degradação de Dvl inibindo a fosforilação induzida pelas Dvls. Indivíduos com variantes bialélicas em *NXN*, apresentam um fenótipo consistente como características faciais típicas, mesomelia, braquidactilia, polegares e hálucos largos, quadro esse que se assemelha mais ao das formas dominantes da síndrome, uma vez que as malformações esqueléticas são leves (White et al 2018).

A via Wnt / β -catenina sofre regulação da sua sinalização pelas *NXN* sensores redox interferindo assim na proliferação e diferenciação celular. As espécies reativas de oxigênio EROs são subprodutos inevitáveis das atividades celulares normais e, por serem altamente reativas, podem modificar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. A produção excessiva de EROs é prejudicial às células que respondem a sua presença ativando as vias de sinalização de estresse e limitando os danos, aumentando os sistemas antioxidantes, que atuam na desintoxicação das EROs (Funato et al., 2007).

As EROs são moléculas que além de conter oxigênio possuem uma reatividade mais forte que o próprio oxigênio, elas podem conter o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot). Assim no seu estado estável, as *NXNs* estão reduzidas isso faz com que elas se liguem fortemente a Dvl bloqueando a sinalização da via Wnt / β -catenina. Quando as espécies reativas de oxigênio oxidam as *NXN*, a *NXN* dissocia-se de Dvl, então Dvl livre ativa a via sinalização Wnt / β -catenina (Funato et al., 2007).

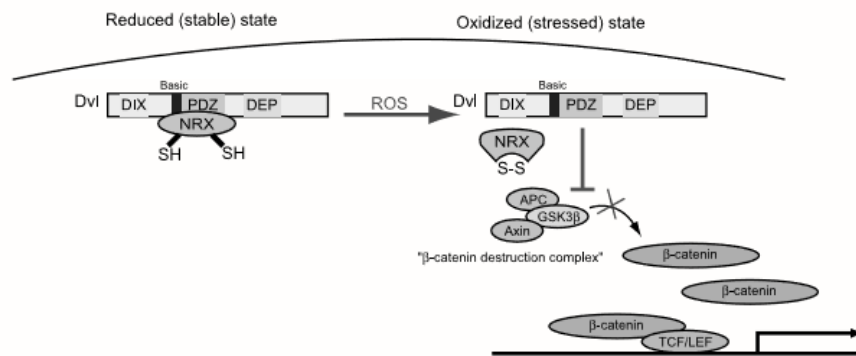


Figura 8: Modelo de regulação redox das NXN por meio das espécies reativas de oxigênio (EROs) da via Wnt / β -catenina pelo complexo Dvl / NRX. Retirado de Funato 2007.

Assim em sua função normal as NXN atuam como um regulador negativo dependente de redox na via Wnt / β -catenina pois impedem a ligação de Dvls no termino do domínio de FZD2 que tem função de ligar-se e estabilizar interação com DVL bloqueando atividade de DVL na via. A via Wnt / β -catenina é regulada positivamente por peróxido de hidrogênio H_2O_2 . Ou seja, na presença de espécies reativas de oxigênio ocorre a oxidação de NXN liberando a ligação com DVL permitindo que o mesmo realize fosforilação no receptor FZD2 desencadeando processo de sinalização e funcionamento da via (Funato 2007)

Funato et al em 2010 em estudo de *Nxn* com modelo animal, ressaltam que o nocaute de *Nrn* é letal, na análise de camundongos portadores de alelos hipomórficos observam; tamanho menor, defeitos craniofaciais, com ossos frontais mais curtos que camundongos da mesma ninhada. A morfologia cardíaca apresentou defeito do septo ventricular, defeito na divisão das artérias aorta e pulmonar em 5 dos 11 camundongos analisados. Defeitos cardíacos não foram observado em camundongos +/+. Os autores ressaltam que Hamblet et al em 2002, descreveram defeitos similares durante a cardiovascularogênese em camundongos com deficiência de Dvl sugerindo que os defeitos têm relação com à redução de atividade na via de sinalização de Wnt / β -catenina.

A primeira relação de variantes no gene *NXN* em pacientes com a SR foi estabelecida por White et al em 2018, com descrição de 2 irmãos afetados que compartilhavam variantes bialélicas em heterozigose composta e um terceiro paciente diagnosticado clinicamente com SR que apresentava uma variante em homozigose herdada de pais consanguíneos.

I.3.2 Síndrome de Robinow autossômica dominante (SRD)

Em busca da etiologia da SRD Mazzeu et al em 2007b, descreveram dois pacientes com microdeleção e duplicação no cromossomo 1 que apresentavam fenótipo Robinow-like. Nos demais pacientes com síndrome de Robinow não foram identificadas alterações cromossômicas (Krepischi et al., 2006).

Os primeiros estudos em modelo animal mostraram que camundongos nulos para *Wnt5a* e *Ror2* exibiam fenótipos semelhantes aos encontrados em pacientes com síndrome de Robinow, incluindo dismorfias faciais, hipoplasia genital, encurtamento de membros e defeitos cardíacos e ainda, que a sinalização não canônica de Wnt que regulava a direção de migração celular era necessária para fusão do palato secundário durante o desenvolvimento embrionário (Heet al., 2008; Oishi et al., 2003).

A partir dos resultados obtidos em modelo animal foi sugerido que as alterações no gene *WNT5A* poderiam estar envolvidas com o fenótipo apresentado pelos pacientes com a síndrome de Robinow. Buscando a confirmação dessa possível relação, em 2010 Person et al, analisaram pacientes diagnosticados com a forma dominante da síndrome e identificaram variantes patogênicas no gene *WNT5A* em 12% dos pacientes investigados, inclusive na família originalmente descrita por Robinow et al. em 1969, confirmando o papel do gene *WNT5A* na etiologia da síndrome. (Heet al., 2008; Oishi et al., 2003).

Outras três famílias com variantes em *WNT5A* foram descritas por Roifmann et al em 2014. Em uma das famílias a variante foi identificada por sequenciamento de exoma e confirmada por sequenciamento Sanger. O gene *WNT5A* está localizado no braço curto do cromossomo 3, 3p21-p14. Faz parte da família dos genes *WNT*, que codificam proteínas de sinalização com atividade de regulação dos eventos morfogênicos, padronização durante a embriogênese, diferenciação celular, crescimento, migração e oncogênese (Oishi et al., 2003).

Sua atividade de sinalização intracelular ocorre a partir do complexo receptor-ligante com os receptores FZD5 (Frizzled-5) e ROR2 a partir da ligação no domínio extracelular rico em cisteína do receptor ROR2. As WNTs promovem a conformação do receptor e ligação das DVLs e NXNs que desencadeiam assim uma de via de transdução de sinal importante no desenvolvimento craniofacial e esquelético (Nusse et al., 2005).

A descrição de variantes no gene *DVL1* em pacientes com SRD foi feita de forma simultânea por Bunn et al e White et al em 2015 a partir do sequenciamento do exoma de indivíduos com a síndrome. No trabalho de Bunn et al (2015) foram descritos três indivíduos com dismorfias faciais características da SR; hipertelorismo acentuado, nariz curto, hipoplasia da face média, camptodactilia e braquidactilia e anomalias dentárias. O sequenciamento detectou nos 3 casos variantes *frameshift* no penúltimo exon de *DVL1*, gerando um produto proteico com redução de 23 resíduos afetando diretamente o funcionamento da região C-terminal de DVL.

White et al 2015 identificaram seis variantes distintas do tipo *frameshift* agrupadas no mesmo exon de *DVL1* em oito indivíduos. Em busca da avaliação da contribuição das variantes de *DVL1* no exon 14 na etiologia da doença 62 indivíduos com suspeita clínica de SR foram incluídos no estudo e desses, cinco apresentaram variantes patogênicas.

Quanto à observação das manifestações clínicas, o fenótipo dos indivíduos com variantes *DVL1* é concordante com as descrições clínicas anteriores como características faciais típicas, anomalias dentárias e mesomelia observadas em 100% dos indivíduos. Em contraste com os indivíduos com variantes *WNT5A* 75% dos indivíduos com variantes em *DVL1* apresentam estatura normal (White et al., 2015 e Bunn et al., 2015).

White et al., 2016 descreveram variantes c.1716delC;c.1749delC; c.1585delG; c.17151G>A no gene *DVL3* em cinco indivíduos. Todas as variantes identificadas resultam em um *frameshift* ou parada prematura códon de terminação no último éxon, assim como descrito para o gene *DVL1*.

Em continuidade, White et al 2018 realizaram a análise de 21 famílias não diagnosticadas clinicamente com SR, algumas com mais de um indivíduo afetado. A combinação de técnicas de sequenciamento Sanger e sequenciamento de exoma total (WES) foi utilizada para a coorte em estudo. A inclusão dos pacientes no estudo foi baseada em fenótipos clínicos, que incluíram características faciais; baixa estatura e anormalidades nos membros. O sequenciamento Sanger dos exons 14 e 15 dos genes *DVL1* e *DVL3* foi utilizado como triagem molecular visto que 20% dos casos de SRD resulta de alelos truncados nesses genes. As amostras de DNA de pacientes que não apresentaram variantes em *DVL1* ou *DVL3* por sequenciamento Sanger foram submetidas ao WES. Sete indivíduos (33%) da amostra apresentaram variantes patogênicas em *DVL1* e *DVL3*, as variantes patogênicas identificadas em *DVL1* são

consistentes com relatos anteriores em que as variantes são fortemente agrupadas no penúltimo exon e resultam em um *frameshift*.

A família de genes Dvl foi originalmente descoberta na *Drosophila*, que possui apenas o gene *dsh* que medeia a transdução de sinalização de informações de padrões em múltiplos tecidos durante os processos de desenvolvimento, incluindo padronização de pernas e membros superiores em adultos. No desenvolvimento do embrião da *Drosophila*, a falta de *dsh* resulta em defeitos semelhantes aos observados em pacientes com SR. Os três ortólogos de *DVL1*, *DVL2* e *DVL3*, foram identificados em mamíferos, incluindo humanos, e os papéis individuais específicos para cada uma das respectivas proteínas ainda estão sendo propostos. Genes de *Drosophila* com mais de um homólogo humano são mais associados a síndromes humanas do que os genes de *Drosophila* com um único homólogo

As proteínas DVL trabalham juntas nas vias de sinalização WNT, que controlam e regulam a atividade e interações entre as células durante o desenvolvimento embrionário. A sinalização envolvendo as proteínas DVL desempenha papel fundamental no controle da proliferação, diferenciação, polaridade celular planar (PCP), subdivididas em Wnt / β Catenina e vias independentes da β -catenina, incluindo Wnt / PCP, Wnt / Ca^{2+} (revisado em White et al., 2015. Zhang et al., 2020).

Em 2018 White et al descreveram cinco indivíduos de três famílias distintas com alterações no gene *FZD2*, portadores da variante c.301G>T; p.Gly434Val. Essa mesma alteração já havia sido descrita por (Türkmen et al., 2017), em paciente afetada pela Omodisplasia tipo 2 (MIM#164745). O gene *FZD2* (*Member of the 'frizzled' Gene Family*) está localizado no cromossomo 17 na posição p21.31. Codifica proteínas que desempenham papel crítico no desenvolvimento antes do nascimento. A proteína *FZD2* (*Frizzled Class Receptor 2, Seven Transmembrane Spanning Receptor*), interagem na via de sinalização Wnt em momentos específicos durante o desenvolvimento do esqueleto.

A Tabela 3 demonstra as variantes detectadas nos genes *DVL1*, *DVL3*, *WNT5A*, *FZD2* em pacientes afetados pela SRD. A importância da correlação funcional entre os genes envolvidos no diagnóstico molecular dos pacientes portadores das três variantes dominantes da RS, é essencial para a melhor compreensão dos mecanismos de interação da via em que atuam e a heterogeneidade fenotípica observada nos pacientes.

Tabela 3: Apresentação das variantes nos genes *DVL1*, *DLV3*, *FZD2*, *WNT5A* já descritas na literatura com descrição do exon alterado, alteração no DNA, efeito na proteína, domínio afetado, país de origem dos pacientes e autores.

Gene	Exon	Variante	Tipo de variante	Efeito na proteína	País	Autor
WNT5A						
	4	c.544–545 CT>TC	Troca de sentido	p.Cys182Arg	EUA	Person et al. 2010
	3	c.248G>C	Troca de sentido	p.Cys83Ser	Holanda	Person et al. 2010
	3	c.257A>G	Troca de sentido	p.Tyr86Cys	/	Roifman et al. 2015
	3	c.257A>G	Troca de sentido	p.Tyr86Cys	/	Roifman et al. 2015
	3	c.206G>A	Troca de sentido	p.Cys69Tyr	/	Roifman et al. 2015
	3	c.249C > G	Troca de sentido	p.Cys83Trp	EUA	Xiong et al. 2016
	3	c.561delC	Troca de sentido	p.Tyr188Metfs*31	EUA	Birgmeier et al 2018
	4	c.487_492dupGGCTG C	Troca de sentido	p.Gly163_Cys164dup	EUA	White et al. 2018
	4	c.479C>G	Troca de sentido	p.Ser160Cys	EUA	White et al. 2018
DVL1						
	14	c.1562delC	<i>Frameshift</i>	p.Pro521Hisfs*128	Nova Zelândia	Bunn et al. 2015
	14	c.1576_1583delG	<i>Frameshift</i>	p.Pro526Alafs*121	Holanda	Bunn et al. 2015
	14	c.1519delT	<i>Frameshift</i>	p.Trp507Glyfs*142	EUA	Bunn et al. 2015
	14	c.1570_1571delC	<i>Frameshift</i>	p.Phe524Profs*125	EUA	White et al. 2015
	14	c.1505_1517delACCC GGTGCCCC	<i>Frameshift</i>	p.His502Profs*143	Dinamarca	White et al. 2015
	14	c.1529delG	<i>Frameshift</i>	p.Gly510Valfs*139	EUA	White et al. 2015
	14	c.1505_1517delACCC GGTGCCCC	<i>Frameshift</i>	p.His502Profs*143	EUA	White et al. 2015
	14	c.1508delC	<i>Frameshift</i>	p.Pro503Argfs*146	Portugal	White et al. 2015
	14	c.1508delC	<i>Frameshift</i>	p.Pro503Argfs*146	Portugal	White et al. 2015
	14	c.1519delT	<i>Frameshift</i>	p.Trp507Glyfs*142	/	White et al. 2015
	14	c.1615delA	<i>Frameshift</i>	p.Ser539Alafs*110	/	White et al. 2015
	14	c.1522delC	<i>Frameshift</i>	p.Pro508Leufs*141	/	White et al. 2016

14	c.1496_1508delICGCT GCCCCACCC	<i>Frameshift</i>	p.Pro499Argfs*146	Inglaterra	White et al. 2018
14	c.1505_1517delIACCC GGTGCCCC	<i>Frameshift</i>	p.His502Profs*143	Argentina	White et al. 2018
14	c.1608_1623delICAGC GGCAGCACCGGG	<i>Frameshift</i>	p.Ser537Valfs*107	EUA	White et al. 2018
14	c.1612_1616dupGGCA G	<i>Frameshift</i>	p.Ser539Argfs*112	EUA	White et al. 2018
14	c.1556delG	<i>Frameshift</i>	p.Gly519Aspfs*130	/	Zang et al., 2020
14	c.1619_1631delICCGG GAGTCAGCA	<i>Frameshift</i>	p.Thr540ArgfsTer105	/	Mishra et al., 2020
14	c.1518delC	<i>Frameshift</i>	p.Trp507Glyfs*142	/	Rai et al., 2021
DVL3					
14	c.1617delG	<i>Frameshift</i>	p.Gln539Hisfs*129	EUA	White et al. 2018
14	c.1715-2A> C	<i>Frameshift</i>	-	/	White et al.2016
14	c.1585delG	<i>Frameshift</i>	p.Ala529Profs*139	/	White et al. 2016
14	c.1592delC	<i>Frameshift</i>	p.Pro531Leufs*137	/	Murali et al., 2018
15	c.1715-2A> C	<i>Frameshift</i>	-	/	Danyel et al. 2016
15	c.1715-1G>A	<i>Frameshift</i>	-	/	White et al. 2016
15	c.1716delC	<i>Frameshift</i>	p.Ser573Valfs*95	/	White et al. 2016
15	c.1749delC	<i>Frameshift</i>	p.Ser583Argfs*85	/	White et al. 2016
FZD2					
1	c.1644G>A	Sem sentido	p.Trp548*	/	Saal et al. 2015
1	c.1301G>T	Troca de sentido	p.Gly434Val	Turquia	Türkmen et al. 2017
1	c.1301G>T	Troca de sentido	p.Gly434Val	EUA	Warren et al. 2018
1	c.1640C> A,	sem sentido	p.Ser547*	/	Nagasaki et al. 2018
1	c.1644G>A	Sem sentido	p.Trp548*	/	Warren et al. 2018
1	c.1301G>T	Troca de sentido	p.Gly434Val	EUA	White et al. 2018
1	c.1301G>T	Troca de sentido	p.Gly434Val	EUA	White et al. 2018
1	c.1130G>A	Troca de sentido	p.Trp377*	EUA	White et al. 2018

I.4 Via de sinalização Wnt

A via de sinalização Wnt atua em diversos aspectos do desenvolvimento controlando várias atividades como especialização, proliferação, polaridade e migração celulares, que ocorrem desde embriogênese até a manutenção do tecido adulto. Qualquer interferência na atividade da via pode resultar em alterações esqueléticas e câncer. A via é dividida em pelo menos três segmentos de sinalização celular: Wnt/ β -catenina ou via canônica, Wnt/Cálcio e Wnt/JNK ou de polaridade celular planar. Os receptores que realizam interações com as proteínas wnts são Frizzled9, receptor de lipoproteína 6 (LRP6), ROR2, proteína Tyr quinase 7 (PTK7), receptor de quinase Tyr (RYK), cada receptor atuando em uma via de sinalização diferente (Yasuhiro et al., 2010).

Existem 19 genes que codificam Wnts que ativam duas vias de sinalização que são classificadas em canônica (β -catenina-dependente) ou não-canônica (β -catenina independente), a atividade de Wnts depende do contexto celular e da combinação do conjunto receptor e Wnt que realizam interação naquele momento por isso a variedade de combinações gera a complexidade das vias de sinalização. Não há, entretanto, consenso na literatura quanto à participação de outras proteínas nessa via (Ben et al., 2009).

O receptor ROR2 funciona como um co-receptor de Frizzled na via de sinalização independente de catenina, através da ligação das proteínas wnts ao seu domínio extracelular, ele pode trabalhar como regulador da via interferindo no seu funcionamento normal. A capacidade de induzir o processo de transcrição em células osteoblasticas pode indicar que ROR2 influencie na osteoblastogênese e osteoclastogênese (Katoh et al et al., 2007).

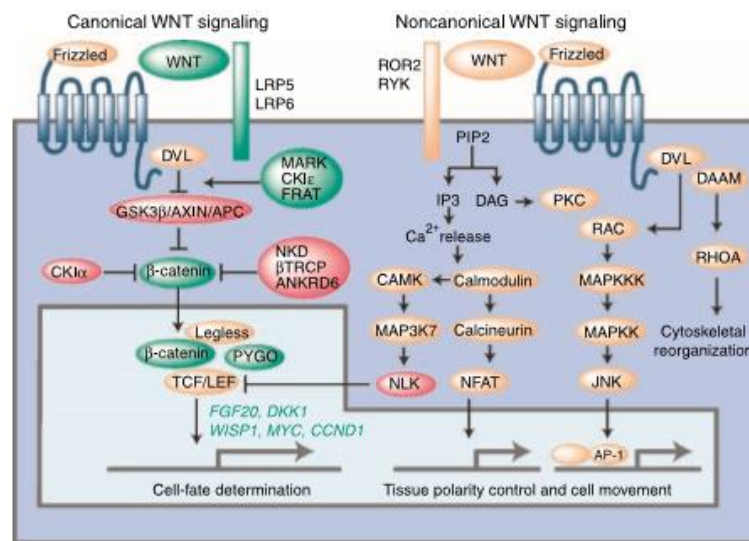


Figura 9: Apresentação dos ramos de sinalização da via Wnt 1) Wnt/ β -catenina ou via canônica, 2) Wnt não canônica ou β -catenina independente. Essa possui duas ramificações; a via dependente de cálcio Wnt/Cálcio e Wnt/JNK ou polaridade planar celular. Os sinais canônicos são transmitidos através dos receptores da Família Frizzled e do receptor LRP5 / LRP6 para a sinalização de h-catenina. Os sinais não canônicos são transmitidos através dos receptores da família Frizzled e dos co-receptores ROR2 / RYK para as cascatas de sinalização dependentes de DVL, JNK ou dependentes de Ca^{2+} . Retirado de Kato et al et al., 2007.

Kazuhiro et al., (2013) ressaltaram que o efeito de Wnt5a na osteoclastogênese foi abolido em culturas de células Ror2 - / - , o que indica que os sinais mediados por Ror2 são cruciais para o efeito de Wnt5a na osteoclastogênese. Sugere-se então que a interação da proteína Wnt com o receptor Ror2 possa desencadear a ativação da via PCP. A atuação do receptor Ror2 na osteogênese e osteoclastogênese, mostra sua grande interferência no desenvolvimento do esqueleto. Falhas na sua atividade podem afetar a formação normal das estruturas ósseas, como encontrado nos pacientes com SRR.

O processo de divisão celular e alinhamento planar da proliferação dos condrócitos na placa de crescimento, é dependente da ativação Wnt / PCP e os defeitos resultam na localização anormal de condrócitos na placa de crescimento, além disso há evidências na literatura de que a interrupção da sinalização Wnt Frizzled e não-canônica leva ao atraso ou bloqueio maturação dos condrócitos e encurtamento do esqueleto que podem ser a base da baixa estatura e mesomelia em indivíduos com RS.

Já os Frizzleds são receptores de membrana com três regiões básicas. O domínio n-terminal participa da ligação com Wnt, e o domínio c-terminal é o local de ligação com proteínas Dvls que após a fosforilação darão continuidade a via de sinalização wnt até o núcleo da célula

1.5 Estudo em modelos animais

O papel das proteínas que atuam na via WNT tem sido elucidado em grande parte pelos estudos em modelos animais. Camundongos nocaute para o gene *WNT5A* apresentam mesomelia em membros, hipertelorismo, olhos proeminentes, nariz pequeno, boca triangular, orelhas de baixa implantação,, achados comuns aos pacientes com SRD. (Yamaguchi et al 1999, Oishi et al., 2003 e Person et al., 2010) (Figura 10A, Figura 10 B).

A especificidade das variantes identificadas de ganho de função alterando o segmento C-terminal nos genes *DVL1* e *DVL3* dificulta o desenvolvimento de animais modelo com essa variante. No entanto, Mansour et al 2018 identificaram variantes muito semelhantes no gene *Dvl2* em cães da raça bulldog. A variante leva a um truncamento de 23 aminoácidos da proteína Dvl2 no último exon no domínio C-terminal de forma semelhante ao que ocorre nas proteínas humanas DVL1 e DVL3 em pacientes portadores da síndrome de Robinow. Os três homólogos de DVL de mamíferos exibem uma identidade de sequência significativa entre si, bem como entre as espécies.

Os Bulldogs ingleses, Bulldogs franceses e Boston Terriers são as únicas raças de cães caracterizadas por possuir uma cauda em parafuso. A cauda em parafuso é causada por uma variedade de vértebras malformadas e fundidas e falta de aproximadamente 8 a 15 vértebras caudais, que normalmente formam a cauda canina. Além das deformidades das vértebras caudais, estas raças podem também apresentar deformidades morfológicas variáveis de vértebras ao longo da coluna vertebral, incluindo hemivértebra, vértebras em borboleta e vértebras fundidas. As três raças compartilham características físicas como; baixa estatura, hipertelorismo e braquicefalia or apresentar encurtamento do focinho. O grau de braquicefalia nas três raças é mais proeminente do que em outras raças braquicéfalas porque seu maxilar é mais curto e alargado.

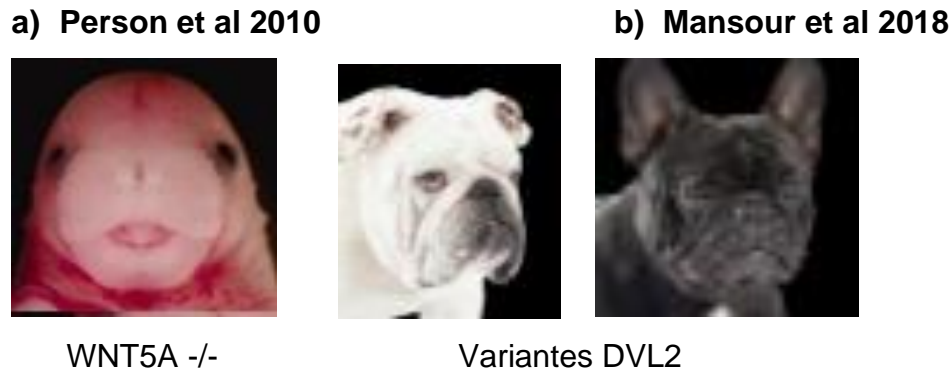


Figura 10: a) Camundongos *Wnt5a* - / - têm defeitos anatômicos fenotipicamente semelhantes a pacientes com síndrome Robinow autossômica dominante hipertelorismo, boca triangular, hipoplasia de face. B) Bulldog e Bulldog francês braquicefalicos. Retirado de Peron et al 2010.

Alguns dos achados são facilmente comparáveis em todos os estudos como baixa estatura, hipertelorismo, hipoplasia de face média. Nos modelos animais foram observadas alterações na coluna vertebral como hemivértebra, vértebras encurtadas e vértebras em borboleta.

Schwabe et al 2004

Mansour et al 2018

Lima et al 2018



Ror2 -/-



Variante *Dvl2*



Variante ROR2

Figuras 11: A) Camundongos *Ror2* -/- têm defeitos da coluna vertebral. B) Vértebras do buldogue francês com cifose pronunciada da coluna vertebral associada a múltiplas anormalidades vertebrais, que incluem vértebras encurtadas, hemivértebras e vértebras da borboleta. C) paciente com variante no gene *ror2* com múltiplas hemivértebras. Retirado de Person et al 2010.

Apesar da variante em *Dvl2* descrita nos bulldogs estar em homozigose, pitbulls podem apresentar variantes em heterozigose ou mesmo serem homozigotos sem variante (Mansour et al., 2018). Uma vez que as variantes em *DVL1* e *DVL3* identificadas nos pacientes estão em heterozigose seria interessante entender de que modo essas variantes modificam o fenótipo em pitbulls.

Em resumo, o diagnóstico molecular em pacientes com SR é fundamental para a melhor compreensão da fisiopatologia de cada uma das formas da síndrome, correlação entre o genótipo e o fenótipo dos indivíduos, bem como para a melhor compreensão dos mecanismos intracelulares e como as alterações nas proteínas podem interferir na regulação de sinalização WNT.

II. Objetivo geral

Esse trabalho tem como objetivo realizar a caracterização clínica e molecular de pacientes com síndrome de Robinow.

II.1 Objetivos Específicos

1. Buscar variantes patogênicas nos genes *DVL1*, *DVL3*, *FZD2*, *WNT5A*, *NXN* e *ROR2*
2. Identificar possíveis novos genes relacionados ao fenótipo SRD
3. Realizar a comparação da frequência de sinais clínicos observados na pesquisa com os já descritos na literatura.
4. Correlacionar as variantes identificadas ao fenótipo dos pacientes

Esta tese está estruturada em dois capítulos em forma de artigo. O Capítulo I refere-se ao estudo das formas dominantes da síndrome e que compôs parte dos dados publicados no artigo “*Novel pathogenic variants and quantitative phenotypic analyses of Robinow syndrome: WNT signaling perturbation and phenotypic variability*” publicado na revista *Human Genetics and Genomics Advances* (Apêndice 1). O Capítulo II se refere ao estudo da forma recessiva da síndrome. Esse segundo capítulo inclui dados produzidos durante o Mestrado cuja análise foi complementada durante o trabalho de Doutorado. O artigo resultante intitulado “*Phenotypic and mutational spectrum of ROR2-related Robinow syndrome*” está em fase de revisão na revista *Human Mutation*.

Capítulo 1

Estudo genético-clínico das formas dominantes da Síndrome de Robinow

III.1. Introdução

A síndrome de Robinow (SR) é uma síndrome caracterizada pela presença de dismorfias faciais típicas associadas ao encurtamento mesomérico dos membros e genitália hipoplásica (Robinow et al., 1969). Foram descritas formas autossômicas recessivas, causadas por variantes nos genes *ROR2* (Afzal et al., 2000, van Bokhoven et al., 2000) e *NXN* (White et al., 2018) e formas autossômicas dominantes causadas por variantes nos genes *WNT5A* (Person et al., 2010), *DVL1* (White et al., 2015, Bunn et al., 2015), *DVL3* (White et al., 2016) e *FZD2* (White et al., 2018).

Todos esses genes codificam proteínas que participam da via Wnt não canônica indicando que apesar da heterogeneidade genética da síndrome o quadro clínico se deve a desregulação de uma mesma via. A via de sinalização Wnt atua em diversos aspectos do desenvolvimento controlando várias atividades como especialização, proliferação, polaridade e migração celulares, que ocorrem desde embriogênese até a manutenção do tecido adulto. Qualquer interferência na atividade da via pode resultar em alterações esqueléticas e câncer (Yasuhiro et al., 2010).

Clinicamente a SR se caracteriza pela presença de frontal proeminente, hipertelorismo, ponte nasal larga, narinas antevertidas e hipoplasia de face média, sinais esses compartilhados entre as formas dominantes e recessivas da síndrome. No entanto, algumas características clínicas são variáveis e diferenças fenotípicas foram propostas nas diferentes formas da síndrome de acordo com o gene mutado. Hemivertebral e escoliose foram relatadas principalmente na forma autossômica recessiva enquanto hérnia umbilical foi descrita exclusivamente na forma dominante. Não existe até então nenhum estudo de correlação genótipo-fenótipo em pacientes com a forma dominante da síndrome. O único estudo clínico em larga escala realizado por Mazzeu et al (2007) não incluiu nenhum estudo molecular e os pacientes com a forma dominante e forma recessiva foram separados apenas com base na presença/ausência de fusão de costelas.

Nesse contexto, esse trabalho deve como objetivo investigar a causa da SR em 23 pacientes com hipótese diagnóstica de SR autossômica dominante e estabelecer possíveis correlações entre o genótipo e fenótipo nas diferentes formas da síndrome.

III.2 Materiais e Métodos

III.2.1 Seleção dos pacientes para estudo

Foram selecionados 23 pacientes com características clínicas da Síndrome de Robinow autossômica dominante que aceitaram participar da pesquisa.

Os pacientes foram atendidos no Serviço de Genética Clínica do Hospital Universitário da Universidade de Brasília, no Centro de Estudos do Genoma Humano na Universidade de São Paulo ou encaminhados pela *Robinow Syndrome Foundation*, EUA.

Os pacientes ou genitores preencheram termo de consentimento livre e esclarecido.

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (CEP FM: 079/2009; 25/11/2009) e pelo Comitê de Ética do *Baylor College of Medicine* sob os números H-43246 e H-29697.

III.2.2 Análise clínica

Os pacientes selecionados foram examinados por médico Geneticista ou por aconselhador genético com experiência na caracterização clínica da SR. Foi preenchida uma ficha (Anexo 1) elaborada de acordo com os principais sinais clínicos descritos por Mazzeu et al., 2007. Os 39 sinais mais importantes para o diagnóstico da SR foram tabulados para comparação entre os pacientes com variantes nos diferentes genes responsáveis pela SRD.

III.2.3 Análise molecular

A pesquisa de variantes patogênicas foi realizada em parceria com o *Baylor College of Medicine* (BCM), Houston, TX, EUA, como parte de colaboração

estabelecida com a Dra. Claudia Carvalho e o Dr. James Lupski. A triagem de variantes nos genes *DVL1* e *DVL3* foi iniciada em nosso laboratório para os pacientes brasileiros e as demais etapas foram realizadas nos Estados Unidos. Parte das amostras foi também utilizada na Dissertação de Mestrado da aluna Bárbara Merfort Ferreira (UnB) e na Tese de Doutorado da aluna Chaofan Zhang (BCM).

III.2.4 Material biológico

As amostras de sangue foram obtidas por punção venosa, em tubos de coleta com sistema a vácuo e EDTA como anticoagulante. Os voluntários maiores de 18 anos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Os pacientes menores de idade tiveram o consentimento livre e esclarecido assinado pelos responsáveis.

III.2.5 Extração de DNA

A extração de DNA foi feita a partir do sangue periférico pelo método Puregene “Salting out”. Este método é dividido em etapas, sendo a primeira de lise celular, onde foi utilizado 5mM MgCl₂, 1mM EDTA pH 8,0 em uma reação, e 10mM Tris pH 7,5, 1mM EDTA pH 8,0 e 1% SDS em outra. Para cada reação a solução foi centrifugada a 3400 rpm por 10 minutos. Para a segunda etapa utilizou-se 1 ml da solução de precipitação de proteína ao lisado celular. Esta solução contém 7,5M de NH₄ Ac. Centrifugou-se a 3400 rpm por 10 minutos. As proteínas precipitadas formam um pellet marrom escuro e compacto.

Na etapa de precipitação de DNA, o sobrenadante foi transferido para um tubo Falcon contendo 3ml de isopropanol. O tubo foi invertido lentamente até que se formasse um novelo de DNA. A reação foi centrifugada a 3400 rpm por 3 minutos. Retirou-se o sobrenadante, e adicionou-se 3ml de etanol absoluto. A reação foi novamente centrifugada. Depois disso, drenou-se o tubo e deixou-se o DNA secar a temperatura ambiente por 15 minutos. Na última etapa, acrescentou-se ao tubo com o DNA 200-250 µl de TE 1x ou água milliQ, que resultou em uma concentração aproximada de 400 ng/µl. O DNA foi armazenado a 2-8°C. O DNA obtido foi quantificado no espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific).

III.2.6 Triagem de variantes nos genes *DVL1* e *DVL3*

A pesquisa de variantes nos exons 14 e 15 dos genes *DVL1* e *DVL3* foi realizada por sequenciamento Sanger direto em 16 pacientes. A análise do exoma para detecção de novas alterações foi realizada em sete pacientes sem variante patogênica identificada nesses genes.

III.2.7 Triagem de variantes nos genes *DVL1* e *DVL3*

Para as reações de PCR, num volume total de 25µl, foram utilizados 80-200ng de DNA genômico, 2,5µl de dNTP (200µM de dCTP, dTTP, dGTP e dATP); 2,5U da enzima Taq polimerase (Invitrogen, Carlsbad, USA) e 2,5µl de tampão específico dessa enzima; MgCl₂ em concentração otimizada para cada par de primer, 1µl (1,5µM), de pares de primers específicos na tabela 1 e quantidade complementar de água. As condições de amplificação foram as seguintes: cinco minutos de desnaturação inicial a 94°C, 35 ciclos de um minuto a 94°C, um minuto à temperatura de annealing calculada para cada par de primer e um minuto a 72°C, seguidos de uma etapa de extensão de 10 minutos a 72°C. O resultado da amplificação por PCR foi verificado por meio de eletroforese em gel de agarose a 2,0%, coloração com brometo de etídio (0,5µg/ml) e visualização sob luz ultra-violeta.

Tabela 4: Primers utilizados para amplificação da região codificante do gene *DVL1*. Cada par de primer amplifica um exon do gene *DVL1*.

Exon	Sequência
14F	5'-CAAGATCACCTTCTCCGAGC- 3'
14R	5'-GCCCAAGTACACAGCAGGAC- 3'
15F	5'-CTCAAGCATCGGGGTGAG- 3'
15R	5'-GACACAGGTGCTGTCAGGAG- 3'

Tabela 5 Primers utilizados para amplificação da região codificante do gene *DVL3*. Cada par de primer amplifica um exon do gene *DVL3*.

Exon	Sequência
14F	5'-ACCAGGGTCTCTCATCCA- 3'
14R	5'-AAGACGGACGGATGGAGAGA 3'
15F	5'-ACCAGGGTCTCTCATCCA- 3'
15R	5'-AAGACGGACGGATGGAGAGA- 3'

III.2.8 Sequenciamento Sanger

A purificação das amostras para sequenciamento foi realizada com kit Illustra™ ExoProStar™.

O sequenciamento Sanger foi realizado em todos os participantes da pesquisa. Para o sequenciamento Sanger foi utilizado o sequenciador ABI 3130XL da Applied Biosystems, seguindo o protocolo de sequenciamento de rotina do laboratório.

III.2.9 Clonagem

Os fragmentos de PCR foram clonados utilizando o TOPO TA cloning kit (Thermo Fisher, Carlsbad, EUA) e posteriormente sequenciados por sequenciamento Sanger.

III.2.10 Sequenciamento completo de Exoma (WES)

Os pacientes que não apresentavam variantes patogênicas nos genes *DVL1* e *DVL3* por sequenciamento Sanger foram submetidos ao WES, que foi realizado pela equipe do Baylor College of Medicine como parte da iniciativa Baylor-Hopkins Mendelian Genomics em Houston, Texas, Estados Unidos.

As bibliotecas pré-capturadas foram reunidas e, em seguida, hibridado em solução usando o projeto VCRome 2.1 interno da BCM-HGSC (Bainbridge, et al., 2011) de acordo com o protocolo do fabricante NimbleGen SeqCap EZ Exome Library SR com pequenas revisões. Todas as amostras alcançaram 96% das bases do exoma alvo cobertas a uma profundidade de 20 x ou maior com uma profundidade média de cobertura de 95X.

A escolha do software de anotação de variantes tem uma forte influência para a identificação de variantes relevantes para a doença. As ferramentas de software de anotações diferentes fornecem frequentemente interpretações distintas e níveis variáveis de falso-positivos e achados falso-negativos, isso parece particularmente verdadeiro para indels (McCarthy et al., 2014). Para maximizar a descoberta de variantes a partir dos dados de seqüenciamento de Illumina, foi utilizado dois métodos de descoberta de variantes em paralelo a partir do pipeline de análise BCM-HGSC Mercury (Reid, J. G. et al., 2014), que move os dados da geração da sequência inicial no instrumento para as chamadas variantes anotadas através de várias ferramentas de análise. Além disso, foi usado o Genome Analysis Toolkit (GATK) HaplotypeCaller para gerar arquivos chamados conjuntos com realinhamento de indel e recalibração de base em todas as famílias que foram submetidas ao WES.

Foram identificadas variantes de novo usando informações de profundidade de leitura extraídas dos arquivos BAM de ambos os pais e probandos usando o software interno da Baylor DNM-Finder (Eldomery, et al., 2017). As variantes de candidatos foram filtradas contra dados de exoma em bancos de dados disponíveis publicamente, incluindo o 1000 Genomes Project, o Servidor Exome Variant da NHLBI Exome, o banco de dados do ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities Study) e o banco de dados interno da Baylor-Hopkins Centers para Mendelian Genomics, analisador de variantes de mais de 6.400 exomas. Além disso, todos os pacientes foram rastreados para as variantes do número de cópias (CNV) com dados do exoma utilizandoXHMM (Fromer, M. et al., 2012) e um algoritmo desenvolvido internamente na Baylor para detectar deleções homólogas exônicas, HMZDeIFinder (Gambin, T. et al., 2016). Foram avaliadas as possíveis variantes associadas à doença identificadas via WES para co-segregação com o fenótipo usando amplificação de PCR padrão. Os produtos de PCR foram purificados 41 com ExoSAP-IT (Affymetrix) e sequenciados com sequenciamento Sanger de didesoxi-nucleótido no Seqüenciamento de DNA e Núcleo de vetor de genes na Faculdade de medicina de Baylor.

Os resultados obtidos pela técnica de WES foram discutidos em parceria com nosso grupo de pesquisa.

III. 3 Resultados e Discussão

Este trabalho teve como objetivo caracterizar as formas dominantes da Síndrome de Robinow, através da análise genômica por sequenciamento Sanger e exoma, descrição clínica e correlação fenótipo-genótipo. Foram analisados 23 pacientes sendo 9 mulheres e 14 homens com idades entre 10 e 40 anos.

III.3.1 Análise molecular

Foram identificadas dez variantes no gene *DVL1*, seis variantes no gene *DVL3*, três variantes no gene *WNT5A* e quatro variantes no gene *FZD2* nos 23 pacientes estudados. Na Tabela 7 estão representadas as variantes identificadas nos 23 pacientes da pesquisa.

III.3.2 Genes *DVL1/DVL3*

Identificamos 10/23 pacientes, representando 43% da nossa amostra, com variantes patogênicas no gene *DVL1*. Nove variantes eram do tipo *Frameshift* no exon 14 do gene *DVL1*. A mudança no quadro de leitura causada pela variante altera a extremidade C-terminal da proteína *DVL1*, levando a adição de uma cauda de GCTGCCC como já descrito por White et al. 2018

Em uma paciente foi identificada uma variante que altera o sítio de *splicing*, c.1640-1C>T, sendo a primeira variante desse tipo descrita no gene *DVL1*. A Tabela 6 e a Figura 10 detalham as variantes do gene *DVL1* já descritas e as variantes identificadas no presente trabalho.

Tabela 6: Apresentação de todas as variantes encontradas no trabalho com identificação dos pacientes, gene mutado, exon alterado, tipo de variante de acordo com a provável alteração na proteína, variante identificada, alteração resultante e origem geográfica

	Gene	Exon	Variante	Tipo de variante	Efeito na proteína	Origem Geográfica
A1	<i>FZD2</i>	1	c.1644G>A	Sem Sentido	p.Trp548*	Brasil
A2	<i>FZD2</i>	1	c.1644G>A	Sem Sentido	p.Trp548*	Brasil
A3	<i>FZD2</i>	1	c.1301G>T	Troca de sentido	p.Gly434Val	EUA
A4	<i>FZD2</i>	1	c.1644G>A	Sem Sentido	p.Trp548*	Brasil
A5	<i>DVL1</i>	14	c.1609_1623del	<i>Frameshift</i>	p.Gly537_Gln541del	EUA
A6	<i>DVL1</i>	14	c.1556delG	<i>Frameshift</i>	p.Gly519Aspfs*130	Brasil
A7	<i>DVL1</i>	14	c.1519delT	<i>Frameshift</i>	p.Trp507Glyfs*142	EUA
A8	<i>DVL1</i>	14	c.1519delT	<i>Frameshift</i>	p.Trp507Glyfs*142	Brasil
A9	<i>DVL1</i>	14	c.1592delC	<i>Frameshift</i>	p.Pro531Argfs*118	Brasil
A10	<i>DVL1</i>	14	c.1496_1508del	<i>Frameshift</i>	p.Pro499Argfs*146	Inglaterra
A11	<i>DVL1</i>	14	c.1570_1571delinsC	<i>Frameshift</i>	p.Phe524Profss*125	EUA
A12	<i>DVL1</i>	14	c.1612_1616dup	<i>Frameshift</i>	p.Ser539Argfs*112	EUA
A13	<i>DVL1</i>	14	c.1612_1616dup	<i>Frameshift</i>	p.Ser539Argfs*112	Brasil
A14	<i>DVL1</i>	14	c.1640-1C>T	<i>Splicing</i>	-	EUA
A15	<i>DVL3</i>	14	c.1585delG	<i>Frameshift</i>	p.Ala529Profss*139	EUA
A16	<i>DVL3</i>	15	c.1716delC	<i>Frameshift</i>	p.Ser573Valfs*95	EUA
A17	<i>DVL3</i>	14	c.1585delG	<i>Frameshift</i>	p.Ala529fs Profss*139	EUA
A18	<i>DVL3</i>	14	c.1585delG	<i>Frameshift</i>	p.Ala529fs Profss*139	EUA
A19	<i>DVL3</i>	15	c.1617delG	<i>Frameshift</i>	p.Gln539Hisfs*129	EUA
A20	<i>DVL3</i>	15	c.1749del	<i>Frameshift</i>	p.Ala529fs Profss*85	EUA
A21	<i>WNT5A</i>	3	c.257A>G	Troca de sentido	p.Ser160Cys	Etiópia
A22	<i>WNT5A</i>	4	c.487_492dup	Troca de sentido	p.Cys164_Ser165insGlyCys	EUA
A23	<i>WNT5A</i>	3	c.257A>G	Troca de sentido	p.Tyr86Cys	Brasil

Tabela 7: Apresentação de todas as variantes dos genes *DVL1*, *DVL3* descritas na literatura até o momento com inclusão das variantes encontradas no trabalho atual, exon alterado, tipo de variante, efeito na proteína, país e autor. (/ Não informado)

Paciente	Exon	Variante	Tipo de variante	Efeito na proteína	País	Autor
DVL1						
	14	c.1562delC	<i>Frameshift</i>	p.Pro521Hisfs*128	Nova Zelândia	Bunn et al. 2015
	14	c.1576_1583delG	<i>Frameshift</i>	p.Pro526Alafs*121	/	Bunn et al. 2015
	14	c.1519delT	<i>Frameshift</i>	p.Trp507Glyfs*142	EUA	Bunn et al. 2015
	14	c.1570_1571delC	<i>Frameshift</i>	p.Phe524Profs*125	EUA	White et al. 2015
	14	c.1505_1517delACCCGGTGCCCC	<i>Frameshift</i>	p.His502Profs*143	Dinamarca	White et al. 2015
	14	c.1529delG	<i>Frameshift</i>	p.Gly510Valfs*139	EUA	White et al. 2015
	14	c.1505_1517delACCCGGTGCCCC	<i>Frameshift</i>	p.His502Profs*143	EUA	White et al. 2015
	14	c.1508delC	<i>Frameshift</i>	p.Pro503Argfs*146	Portugal	White et al. 2015
	14	c.1508delC	<i>Frameshift</i>	p.Pro503Argfs*146	Portugal	White et al. 2015
	14	c.1519delT	<i>Frameshift</i>	p.Trp507Glyfs*142	/	White et al. 2015
	14	c.1615delA	<i>Frameshift</i>	p.Ser539Alafs*110	/	White et al. 2015
	14	c.1522delC	<i>Frameshift</i>	p.Pro508Leufs*141	/	White et al. 2016
	14	c.1496_1508delCGCTGCCCCACCC	<i>Frameshift</i>	p.Pro499Argfs*146	Inglaterra	White et al. 2018
	14	c.1505_1517delACCCGGTGCCCC	<i>Frameshift</i>	p.His502Profs*143	Argentina	White et al. 2018
	14	c.1608_1623delCAGCGGCAGCACCGGG	<i>Frameshift</i>	p.Ser537Valfs*107	EUA	White et al. 2018
	14	c.1612_1616dupGGCAG	<i>Frameshift</i>	p.Ser539Argfs*112	EUA	White et al. 2018
	14	c.1556delG	<i>Frameshift</i>	p.Gly519Aspfs*130	/	Zang et al., 2020
	14	c.1619_1631delCCGGGAGTCAGCA	<i>Frameshift</i>	p.Thr540ArgfsTer105	/	Mishra et al., 2020
	14	c.1518delC	<i>Frameshift</i>	p.Trp507Glyfs*142	/	Rai et al., 2021
	14	c.1496_1508del	<i>Frameshift</i>	p.Pro499Argfs*146		Atual/White 2018
A5	14	c.1608_1623del	<i>Frameshift</i>	p.Gly537_Gln541del		Atual
A6	14	C.1556delG	<i>Frameshift</i>	p.Gly519Aspfs*130	Brasil	Atual
A7	14	c.1519del	<i>Frameshift</i>	p.Trp507Glyfs*142	EUA	Atual
A8	14	c.1519delT	<i>Frameshift</i>	p.Trp507Glyfs*142	Brasil	Atual
A9	14	c.1592del	<i>Frameshift</i>	p.Pro531Argfs*118	Brasil	Atual
A10	14	c.1496_1508del	<i>Frameshift</i>	p.Pro499Argfs*146		Atual

A11	14	c.1570_1571delinsC	<i>Frameshift</i>	p.Phe524Profs*125	EUA	Atual
A12	14	c.1612_1616dupGGCAG	<i>Frameshift</i>	p.Ser539Argfs*112	Brasil	Atual
A13	14	c.1612_1616dupGGCAG	<i>Frameshift</i>	p.Ser539Argfs*112	EUA	Atual
A14	14	c.1640-1C>T	<i>Splicing</i>	-	EUA	Atual
DVL3						
	14	c.1617delG	<i>Frameshift</i>	p.Gln539Hisfs*129	EUA	White et al. 2018
	14	c.1715-2A> C	<i>Frameshift</i>	-	/	White et al.2016
	14	c.1585delG	<i>Frameshift</i>	p.Ala529Profs*139	/	White et al. 2016
	14	c.1592delC	<i>Frameshift</i>	p.Pro531Leufs*137	/	Murali et al., 2018
	15	c.1715-2A> C	<i>Frameshift</i>	-	/	Danyel et al. 2016
	15	c.1715-1G>A	<i>Frameshift</i>	-	/	White et al. 2016
	15	c.1716delC	<i>Frameshift</i>	p.Ser573Valfs*95	/	White et al. 2016
	15	c.1749delC	<i>Frameshift</i>	p.Ser583Argfs*85	/	White et al. 2016
A15	14	c.1585delG	<i>Frameshift</i>	p.Ala529Profs*139	EUA	Atual
A16	15	c.1716delC	<i>Frameshift</i>	p.Ser573Valfs*95	EUA	Atual
A17	14	c.1585delG	<i>Frameshift</i>	p.Ala529fs Profs*139	EUA	Atual
A18	14	c.1585delG	<i>Frameshift</i>	p.Ala529fs Profs*139	EUA	Atual
A19	15	c.1617delG	<i>Frameshift</i>	p.Gln539Hisfs*129	EUA	Atual
A20	15	c.1749del	<i>Frameshift</i>	p.Ala529fs Profs*85	EUA	Atual

pacientes com Omodisplasia. O outro paciente apresentava variante missense c.1301G>T (p.Gly434Val) no gene *FDZ2* também já descrita na literatura por Türkmen et al. 2017, White et al., 2018 e Warren et.al 2018 em pacientes com Omodisplasia ou com SR.

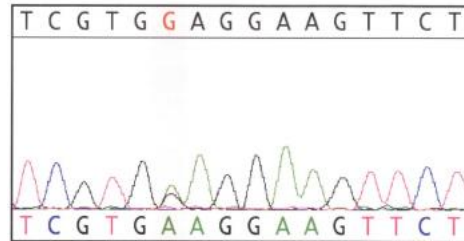


Figura 13: Eletroferograma representativo da variante c.1644G>A no gene *FZD2*, encontrada em heterozigose no paciente A1

Reunimos todos os trabalhos já publicados que apresentam 13 variantes no gene *FZD2*, tanto com diagnóstico de SR como de Omodisplasia como mostra a Tabela 9.

Tabela 8: Descrição de todas as variantes já descritas na literatura no gene *FZD2* e inclusão de variantes do trabalho atual

Gene	Exon	Variante	tipo de variante	Resultante	País	Autor
FZD2	1	c.1644G>A	Sem sentido	p.Trp548*	/	Saal et al. 2015
	1	c.1301G>T	Troca de sentido	p.Gly434Val	Turquia	Türkmen et al. 2017
	1	c.1301G>T	Troca de sentido	p.Gly434Val	EUA	Warren et al. 2018
	1	c.1640C> A,	Sem sentido	p.Ser547*	/	Nagasaki et al. 2018
	1	c.1644G>A	Sem sentido	p.Trp548*	/	Warren et al. 2018
	1	c.1301G>T	Troca de sentido	p.Gly434Val	EUA	White et al. 2018
	1	c.1301G>T	Troca de sentido	p.Gly434Val	EUA	White et al. 2018
	1	c.1130G>A	Troca de sentido	p.Trp377*	EUA	White et al. 2018
A1	1	c.1644G>A	Troca de sentido	p.Trp548*	Brasil	Atual
A2	1	c.1644G>A	Troca de sentido	p.Trp548*	Brasil	Atual
A3	1	c.1301G>T	Troca de sentido	p.Gly434Val	EUA	Atual
A4	1	c.1644G>A	Troca de sentido	p.Trp548*	Brasil	Atual

Variantes no gene *FZD2* foram originalmente classificadas como causa de omodisplasia A, descritas inicialmente por Maroteaux (1989), que relatou de três pacientes com distúrbio ósseo congênito associados a anomalias faciais; ponte nasal deprimida, base ampla do nariz. As anomalias esqueléticas complexas consistem em um defeito de crescimento da extremidade distal do úmero daí o nome omodisplasia.

Vendittiet al 2002 descreveram uma segunda família com transmissão de mãe para filho, classificada como uma displasia esquelética rara caracterizada por úmeros encurtados, primeiros metacarpos encurtados e dismorfismo craniofacial. Ressalta que a mãe havia sido diagnosticada previamente com síndrome de Robinow e na época foi reclassificada como Omodisplasia. O autor confirma a existência de uma variante dominante da omodisplasia, ressalta que a hipoplasia genital é uma característica importante dessa síndrome e destaca a necessidade de diferenciá-la da síndrome de Robinow.

No estudo realizado por Gordonet al 2013, os autores relatam uma paciente do sexo feminino com; baixa estatura, testa proeminente, hipoplasia do terço médio da face, orelhas de baixa implantação, encurtamento rizomélico e mesomélico acentuado das extremidades superiores e encurtamento mesomélico e rizomélico leve nas extremidades inferiores e útero bicornio. Não foram encontradas variantes que causam omodisplasia autossômica recessiva.

Saal et al em 2015, foi um dos primeiros estudos a identificar variantes no gene *FZD2* em pacientes com a Omodisplasia tipo A. Inicialmente buscavam-se alterações no gene *GPC6* (glypican 6), que causa a forma autossômica recessiva de Omodisplasia e codifica uma proteína da família co-receptores de superfície celular que atuam no controle do crescimento celular e divisão celular, envolvidas na via de *WNT5A*.

Warren et al 2018 identificaram duas variantes, uma já citada na literatura por Saal et al. 2015, que resulta em uma proteína alterada impactando diretamente na via de sinalização WNT. Outra variante com alteração nucleotídica c.1301G> T, que resulta na substituição de uma glicina por um valina p.Gly434Val, foi detectada também por White et al 2018 e Türkmen et al 2017.

A omodisplasia autossômica dominante é uma displasia esquelética rara, caracterizada por úmero curto (encurtamento rizomélico), alterações faciais como; face arredondada, nariz curto e filtro longo e graus variáveis de anomalias

geniturinárias. Assim, há sobreposição do quadro clínico com a SRD principalmente nos casos em que há também encurtamento mesomérico

As variantes no gene *FZD2* em pacientes com SRD começaram a ser descritas recentemente (White et al., 2018). A partir do relato de quatro famílias e um total de seis indivíduos afetados com variantes de novo no gene *FZD2*, White et al 2018, demonstraram que em três delas a alteração alterava um mesmo resíduo de aminoácido, glicina 434., alteração que já havia sido descrita na literatura por Türkmen et al 2017. Foi também detectada uma variante de novo c.1300G> A, que altera o mesmo códon consequentemente gera um resíduo alterado Gly434. O resíduo Gly434 é conservado em todos os vertebrados e está localizado no termino do domínio de *FZD2* que tem função de ligar-se e estabilizar interação com *DVL1*. Portanto, alterações em Gly434 podem potencialmente interferir a estabilidade da interação *FZD2- DVL*. Apesar desta ser a variante mais frequente, outras variantes patogênicas foram descritas em paciente com SRD como mostra a tabela 9

A superfamília de receptores acoplados a proteína G (GPCR) expressos na membrana plasmática que servem de receptores para Wnt podem são denominados *Frizzleds*. Os *Frizzleds* são receptores de membrana com três regiões básicas; (1) os domínios n-terminal que participam da ligação com Wnt, (2) um núcleo central transmembranico composto por sete hélices alfa hidrofóbicas que abrangem as bicamadas lipídicas; e (3) três alças intracelulares (iLoop1, iLoop2 e iLoop3) e uma "cauda" C-terminal que se liga com os elementos de sinalização encontrados no citoplasma celular, os Dvls. A Figura 14 detalha as três regiões que compõem o receptor Frizzled, sua ligação com as proteínas wnt no domínio extracelular, a cauda C-terminal local de ligação com proteínas Dvls que após a fosforilação darão continuidade a via de sinalização wnt até o núcleo da célula.

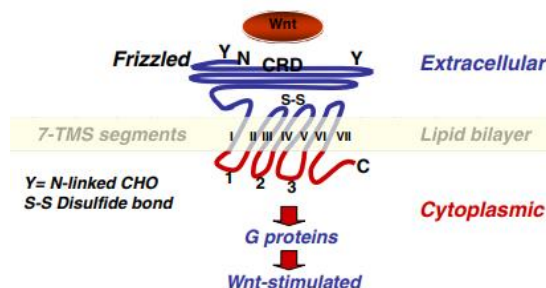


Figura 14: Identificação das três regiões do receptor Frizzled, mostrando a ligação com Wnt em sua região extracelular, ligação e fosforilação das proteínas Dvls em sua região C-terminal. Retirada de Türkmen et al 2017

A cauda C-terminal do receptor Frizzled é o local responsável pela interação com as Dvls desencadeando assim a cascata de sinalização Wnt. Curiosamente as variantes detectadas estão localizadas no fim da região C-terminal gerando então um receptor com cauda truncada impossibilitando assim sua função de interação normal na via wnt. A Figura 13 representa o receptor Frizzled com as resultantes das variantes patogênicas descritas por Saal et al 2015, Türkmen et al 2017, Nagasaki et al. 2018, White et al 2018 e Warren et. al 2018 e as variantes descritas no presente trabalho. A variante (c.1644G> A) é mais comum relatada no gene *FZD2*, causa uma única mudança de par base dentro do quadro de leitura do gene, alterando um resíduo de triptofano no aminoácido p.Trp548* essa resultante gera o truncamento da proteína *FZD2* na região C-terminal, produzindo consequências significativas na sinalização wnt devido a interação *FZD-DVL* que está localizada ao longo de três loops intracelulares do receptor *FZD2*, demonstrado também na Figura 13

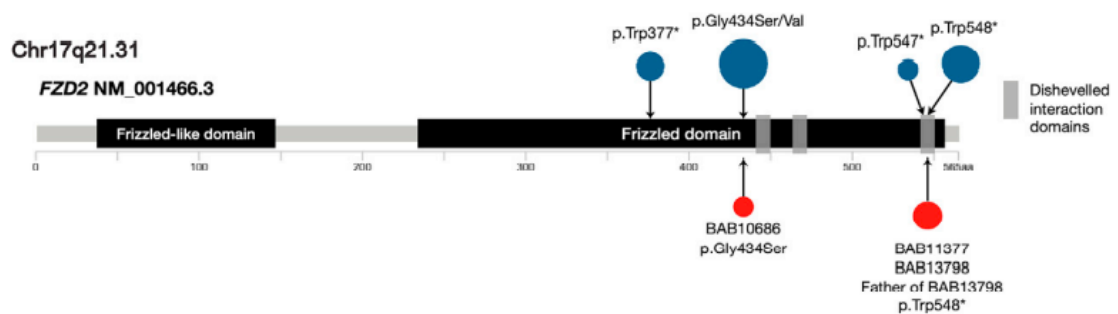


Figura 15: Representação dos domínios funcionais conhecidos de *FZD2* com a ilustração das variantes encontradas (círculo vermelho), resultantes das variantes patogênicas detectadas até o momento no gene *FZD2* representadas pelos (círculos azuis). Retira de Zang et al 2022.

Hoje acredita-se que a omodisplasia tipo A seja apenas uma forma variante da SRD (Zhang et al., 2020). Os sinais clínicos comparados na tabela abaixo incluem pacientes com ambos diagnósticos, portadores de variantes patogênicas no gene *FZD2*. Na Tabela 10 comparamos a frequência dos principais sinais clínicos entre os pacientes do presente trabalho, relatos prévios da literatura e a frequência de sinais clínicos na Síndrome de Robinow segundo Mazzeu et al., 2007. Apenas sinais clínicos relatados em trabalhos anteriores foram incluídos na análise.

Tabela 8: Apresentação e correlação da frequência de sinais clínicos observados no trabalho atual e em trabalhos publicados na literatura com pacientes com variantes no gene *FZD2* e diagnóstico de SRD ou Omodisplasia (OMO). (X)- Sinal presente, (-) Sinal Ausente, ND- Sinal não avaliado, NA – Não se aplica.

	A1	A2	A3	A4	%	Maroteaux 1989 (n=2)	Venditti 2002 (n=2)	Gordon 2013 (n=1)	Saal 2015 (n=2)	Nagaski 2018 (n=1)	Mazzeu 2007
Hipótese diagnóstica	SRD	SRD	SRD	SRD		OMO	OMO	OMO	OMO	OMO	SRD
Hipertelorismo	X	-	X	-	75	100	100	100	ND	100	100
Narinas antevertidas	X	X	X	X	100	33	ND	0	ND	100	96
Filtro longo	X	X	-	X	75	33	100	100	100	100	64
Anomalias dentarias	X	-	X	-	50	50	ND	0	ND	ND	50
Encurtamento de membros (rizomelia e/ou mesomelia)	X	X	X	X	100	100	100	100	100	100	80
Braquidactilia	X	-	X	-	50	ND	ND	100	50	ND	81
Clinodactilia	X	-	-	-	25	NR	NR	100	50	ND	70
Hipoplasia de grandes lábios	X	NA	NA	-	50	100	100	100	50	NA	35
Clitoris hipoplásico	X	NA	NA	-	50	100	100	100	50	NA	46
Outros sinais					Útero Bicorno	Útero Bicorno	Útero Bicorno	Útero Bicórnio	Anormalidades Uterinas	Micro-pênis	

Na tabela clinica comparativa observamos os sinais clínicos descritos em pacientes com variantes no gene *FZD2* tanto com diagnóstico de SRD quanto de omodisplasia. Observamos grande semelhança entre os quadros clínicos de todos os pacientes e que os sinais incluem os principais grupos de sinais clínicos da SRD que são as dismorfias faciais com hipertelorismo, alterações ósseas e alterações genitais. Nos pacientes com diagnóstico de omodisplasia o encurtamento era em geral predominantemente rizomélico. Chama atenção o registro de útero bicorno em um grande numero de pacientes, característica não reportada anteriormente no trabalho de Mazzeu et al. 2007.

III.3.4 Gene *WNT5A*

A partir do sequenciamento completo do exoma detectamos alteração no gene *WNT5A* em três pacientes: A21, A22, A23 (13%) da nossa amostra. No paciente A10 foi identificada uma troca de base com troca de sentido c.479C>G (p.Ser160Cys) no

exon 4. Pacientes A21 e A23 apresentaram uma troca de base com troca de sentido na posição c.257A>G (p.Tyr86Cys) no exon 4 variante já descrita por Roifman et al. 2015. No paciente A22 identificamos a duplicação c.487_492dup localizada no exon 4, descrita no trabalho de White et al 2018.

No quadro de variantes já descritas no gene é possível observar que as variantes se localizam apenas nos exons 3 e 4, e afetam principalmente o domínio rico em cisteína. É possível que variantes nesses resíduos alterem as estruturas da superfície da proteína interferindo na interação com outras proteínas da via Wnt. Roifman et al., 2015 relataram três famílias com novas variantes no gene *WNT5A* e Xiong et al em 2016 descreveram o primeiro relato da síndrome de Robinow na China. A Tabela 9 inclui as cinco variantes já descritas na literatura e as três variantes identificadas em nosso estudo.

Tabela 9: Apresentação das 10 variantes no gene *WNT5A* já descritas na literatura, com seus respectivos autores ano, País de origem dos pacientes, variantes detectadas, tipo de variante e resultante.

Gene	Exon	Variante	Tipo de variante	Efeito na proteína	País	Autor
WNT5A	4	c.544–545 CT>TC	Troca de sentido	p.Cys182Arg	/	Person et al. 2010
	3	c.248G>C	Troca de sentido	p.Cys83Ser	/	Person et al. 2010
	3	c.257A>G	Troca de sentido	p.Tyr86Cys	/	Roifman et al. 2015
	3	c.257A>G	Troca de sentido	p.Tyr86Cys	/	Roifman et al. 2015
	3	c.206G>A	Troca de sentido	p.Cys69Tyr	/	Roifman et al. 2015
	3	c.249C > G	Troca de sentido	p.Cys83Trp	EUA	Xiong et al. 2016
	3	c.561delC	Troca de sentido	p.Tyr188Metfs*31	EUA	Birgmeier et al 2018
	4	c.487_492dupGGCTGC	Troca de sentido	p.Gly163_Cys164dup	EUA	White et al. 2018
	4	c.479C>G	Troca de sentido	p.Ser160Cys	EUA	White et al. 2018
A21	3	c.257A>G	Troca de sentido	p.Tyr86Cys	Etiópia	Atual
A22	4	c.487_492dup	Troca de sentido	p.Cys164_Ser165insGlyCys	EUA	Atual
A23	3	c.257A>G	Troca de sentido	p.Tyr86Cys	Brasil	Atual

II.3.V. Estudo de frequência dos sinais clínicos

Para caracterização clínica dos pacientes com SRD utilizamos como referência comparativa a análise clínica realizada por Mazzeu et al 2007. Selecionamos os 39 sinais clínicos mais frequentes da SR, observamos a presença/ausência de cada um dos sinais nos pacientes (Tabela XX) e calculamos a frequência de cada um dos sinais nos pacientes com variante identificada em cada um dos genes (Tabela 8).

Os 39 sinais clínicos observados são os mais recorrentes na literatura desde 2007 por Mazzeu et al: Hipoplasia do terço médio da face, hipertelorismo, narinas antevertidas, ponte nasal ampla e mesomelia foram as características clínicas com frequência de 80% a 100% em nosso grupo se mantendo bem próximas as frequências de Mazzeu et al sendo essas as mais importantes para a caracterização da síndrome, esse grupo de características é a mais frequente na síndrome de Robinow. Macrocefalia, testa proeminente, fendas palpebrais oblíquas para cima, cílios longos, olhos proeminentes, lábio superior fino, clinodactilia, polegar alargado, hipoplasia de pequenos lábios, anormalidades renais e defeitos cardíacos encontram-se com frequência de 21% a 79% foram agrupadas e citadas juntas porque se mantiveram semelhantes as frequências analisadas por Mazzeu 2007.

Tabela 10: Análise dos principais sinais clínicos descritos na SRD em cada um dos pacientes, agrupados de acordo como gene mutado. As frequências totais foram comparadas com os dados de Mazzeu et al., 2007. (X – presente, / ausente, ND- Não determinado, NA- Não se aplica)

Pacientes	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	A21	A22	A23	%	MAZZEU 2007	
Gene	FZD2	FZD2	FZD2	FZD2	DVL1	DVL1	DVL1	DVL1	DVL1	DVL1	DVL1	DVL1	DVL1	DVL1	DVL3	DVL3	DVL3	DVL3	DVL3	DVL3	DVL3	WNT5A	WNT5A	WNT5A		
Clinica																										
Macrocefalia	ND	x	x	X	ND	x	X	x	x	/	x	/	X	/	/	ND	/	ND	ND	ND	/	ND	/	9*16	56	64
Testa proeminente	/	x	/	X	X	x	X	x	x	/	x	x	X	x	/	/	/	x	/	/	X	x	x	15*23	65	79
Testa ampla	/	x	x	X	/	x	X	x	x	/	x	x	X	x	/	/	/	x	x	/	X	/	/	14*23	60	14
Hipoplasia do terço medio da face	x	x	x	X	X	x	X	x	x	X	x	x	X	x	x	x	x	x	x	x	X	x	x	23*23	100	81
Hipertelorismo	x	/	x	/	X	x	X	x	x	X	x	x	X	x	x	x	x	x	x	x	X	x	x	21*23	91	100
Fissuras palpebrais	x	/	/	/	X	/	ND	/	/	/	x	/	/	/	x	/	x	/	x	/	X	x	x	9*22	40	49
Cílios longos	x	/	x	/	/	x	X	/	/	/	x	x	/	/	x	/	x	/	x	/	X	x	x	12*23	52	54
Olhos proeminentes	x	x	x	X	X	x	X	/	/	X	x	x	X	x	x	x	x	/	x	/	X	/	x	18*23	78	79
Escleras azuladas	ND	ND	x	ND	/	x	X	ND	ND	/	x	/	X	x	/	x	x	/	x	/	X	/	x	11*18	61	17
Epicanto	x	/	/	/	X	/	ND	/	/	/	x	/	/	/	x	/	x	/	x	/	X	x	x			
Narinas antevertidas	x	x	x	X	X	x	X	x	x	X	x	x	X	ND	x	x	x	x	/	/	X	x	x	21*22	95	96
Ponte nasal larga	x	x	/	X	ND	ND	X	x	x	x	x	x	/	x	x	x	x	x	/	/	X	x	x	17*21	80	97
Nariz pequeno	/	x	/	X	X	x	X	/	x	/	x	x	X	x	/	/	x	x	/	/	X	/	/	13*23	56	81
Filtro Longo	x	x	/	X	X	x	X	x	x	x	x	x	X	x	x	x	x	x	x	/	X	x	x	21*23	91	64
Boca triangular	x	ND	x	X	X	x	X	ND	ND	x	x	x	X	x	/	x	/	x	x	/	X	/	x	17*20	80	65
Labio superior fino	x	ND	/	/	X	x	/	ND	ND	/	x	x	X	x	/	/	x	/	x	x	/	/	/	10*20	50	49
Hiperplasia de gengiva	x	/	ND	X	/	x	/	x	x	x	x	x	/	/	/	x	x	/	/	x	X	/	/	12*22	54	36
Fenda Palatina	/	x	/	/	/	ND	ND	/	x	/	x	/	X	x	x	x	x	/	x	/	/	/	/	9*21	52	34
Língua bifida	x	/	ND	/	/	x	X	/	x	/	x	x	/	x	x	ND	x	x	/	/	X	x	/	12*21	57	39
Anomalias dentárias	x	/	x	/	X	x	X	x	/	x	x	x	X	x	x	x	x	x	x	x	X	x	x	20*23	86	49
Pescoço curto	/	/	/	X	X	/	/	/	x	/	x	x	X	/	/	/	/	/	/	/	/	/	x	7*23	30	81
Micrognathia	ND	/	x	/	X	x	/	x	x	x	x	/	X	x	x	x	ND	/	x	/	X	x	x	15*21	71	57

Mesomelia	x	x	x	X	X	x	X	x	/	x	x	x	X	x	x	x	x	x	x	X	x	x	20*23	86	80	
Braquidactília	x	/	x	/	X	x	X	x	x	/	x	x	X	x	/	/	x	x	x	/	X	x	/	7*23	30	81
Clinodactília	x	/	/	/	X	x	X	x	/	/	x	x	/	/	/	/	x	x	x	x	X	/	/	15*21	71	79
Campodactília	/	/	/	/	ND	/	ND	/	x	/	x	/	/	/	/	/	x	/	/	/	/	/	/	8*24		ND
Polegares alargados	/	/	/	/	ND	/	/	/	/	/	x	x	X	/	x	/	x	x	/	/	X	/	/	5*21	23,8	35
Displasia de unhas	/	ND	ND	/	/	/	/	ND	ND	/	x	/	/	ND	/	/	/	/	x	/	X	x	ND	7*17	41,17	21
Háluces alargados	x	x	/	X	ND	/	X	/	x	/	ND	ND	ND	/	/	/	x	x	ND	ND	ND	/	/	1*18	5,55	33
Escoliose /cifose	/	ND	/	/	ND	ND	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	ND	/	/	/	X	/	/	1*18	5,55	18
Dimple sacral	/	/	/	X	ND	ND	ND	ND	ND	/	/	/	/	x	NA	/	/	/	/	/	X	/	x	2*12	16	14
Criptorquidia	NA	/	x	/	X	/	NA	NA	NA	x	x	x	X	x	x	NA	NA	x	x	NA	X	NA	NA	2*6	33	72
Hipospadia	NA	/	x	/	/	/	NA	NA	NA	x	x	x	X	x	x	NA	NA	x	x	NA	X	NA	NA	1*6	16	ND
Micropenis	NA	/	x	X	X	x	NA	NA	NA	x	x	x	X	x	x	NA	NA	x	x	NA	X	NA	NA	4*6	66	84
Hipoplasia de pequenos lábios	x	NA	NA	NA	NA	NA	ND	/	/	NA	NA	NA	NA	NA	NA	X	x	NA	NA	x	NA	x	x	7*12	58,33	50
Hipoplasia de clitóris	x	NA	NA	NA	NA	NA	ND	/	x	NA	NA	NA	NA	NA	NA	X	x	NA	NA	x	NA	x	x	9*12	75	46
Anormalidades renais	ND	/	/	/	/	/	/	/	/	x	/	/	X	/	/	/	x	/	x	/	/	/	x	6*25	24	26
Hernia inguinal	ND	/	/	/	/	/	ND	/	/	x	/	/	X	x	x	/	/	x	x	x	X	/	/	10*24	41,66	16
Defeitos cardíacos	ND	/	/	/	/	ND	X	/	/	x	x	x	ND	ND	/	/	/	/	x	/	/	/	/	5*21	23,8	28

Tabela 11: Apresentação da frequência dos sinais clínicos separados de acordo com o gene alterado e comparados com as frequências de Mazzeu et al., 2007. (ND, não determinado)

Sinais clínicos	FZD2	DVL1	DVL3	WNT5A	MAZZEU
	%	%	%	%	%
Macrocefalia	100	66	0	0	64
Testa proeminente	50	90	16	100	79
Testa ampla	75	80	33	33	14
Hipoplasia do terço médio da face	100	100	100	100	80
Hipertelorismo	50	100	100	100	100
Fissuras palpebrais oblíquas para cima	25	22	50	100	48
Cílios longos	50	40	50	100	54
Olhos proeminentes	100	80	66	66	79
Escleras azuladas	100	62	50	66	17
Epicanto	25	11	50	100	49
Narinas antevertidas	100	100	66	100	97
Ponte nasal larga	75	87	66	100	97
Nariz pequeno	50	80	33	33	84
Filtro Longo	75	100	100	100	64
Boca triangular	100	100	50	66	65
Lábio superior fino	33	75	50	0	49
Hiperplasia de gengiva	66	60	50	33	36
Fenda Palatina	25	50	66	0	34
Língua bífida	33	60	60	66	39
Anomalias dentarias	50	90	100	100	49
Pescoço curto	25	50	0	33	84
Micrognatia	33	80	60	100	56
Mesomelia	100	90	100	100	80
Braquidactilia	50	90	50	66	81
Clinodactilia	25	60	66	33	79
Camptodactilia	0	25	16	0	ND
Polegares alargado	0	33	50	33	35
Displasia de unhas	0	14	16	100	35
Primeiro dedo do pé largo	66	33	50	0	33
Escoliose cifose	0	0	0	0	18
Dimple sacral	25	20	0	66	14
Criptorquidia	33	85	100	100	71
Hipospadia	33	71	100	100	ND
Micropênis	66	100	100	100	84
Hipoplasia de pequenos lábios	100	0	100	100	50
Hipoplasia de clitóris	100	50	100	100	46
Anormalidades renais	0	20	40	33	26
Hérnia inguinal	0	33	66	33	16
Defeitos cardíacos	0	57	16	0	28

Como esperado as características clínicas hipertelorismo, hipoplasia do terço médio da face, mesomelia, olhos proeminentes, narinas antevertidas, ponte nasal ampla, filtro longo e micropênis mantiveram-se com porcentagem mais altas para todos os genes.

Sinais clínicos como; anomalias dentárias, boca triangular, epicanto, hiperplasia gengival, fenda palatina, escleras azuladas e braquidactilia apresentaram frequências semelhantes independente do gene mutado. No entanto, mesmo entre os sinais clínicos mais comuns na síndrome podemos observar diferenças significativas entre os grupos. O hipertelorismo por exemplo, estava presente em todos os pacientes com variantes nos genes *DVL1*, *DVL3* e *WNT5A* mas apenas metade dos indivíduos com variante no gene *FZD2*. Apenas um sinal, hipoplasia do terço médio da face estava presente em todos os 23 pacientes estudados e a mesomelia estava ausente em apenas um paciente com variante em *DVL1*. Narinas antevetidas também eram um achado comum, ausente em apenas 2 pacientes com variante em *DVL3*.

A macrocefalia é outro sinal importante que estava presente em 66% dos pacientes com variante em *DVL1*, 100% dos pacientes com variante em *FZD2* mas ausente nos pacientes com variantes em *DVL3* ou *WNT5A*.

Os defeitos cardíacos estavam presentes em alguns pacientes com variantes em *DVL1* e *DVL3* mas ausentes nos demais grupos. Esses valores são semelhantes a frequência descrita por Mazzeu et al 2007 que identificou defeitos cardíacos em 28% dos pacientes.

Hipoplasia de pequenos lábios e clitóris apresentaram frequência de 100% nos pacientes com variantes nos genes *DVL3*, *FZD2* e *WNT5A*, frequência mais elevada do que relatada por Mazzeu 2007. O grupo de pacientes com variantes no gene *WNT5A* apresentou alguns sinais clínicos com frequência distinta dos demais grupos como displasia de unhas 100%, háluces alargados e dimple sacral com frequência mais alta do que os outros genes.

Cabe ainda comparar a com a frequência de sinais clínicos na forma recessiva da síndrome, como mostra a Tabela 11. As frequências de sinais na SRR são resultantes do nosso trabalho de caracterização da forma recessiva descrito no Capítulo 2.

Tabela 11. Comparação dos principais sinais clínicos entre pacientes com SRD e SRR.

Características clínicas	SRR %	SRD %	Mazzeu %
Testa proeminente	100	65	77,8
Hipertelorismo	100	91	100
Olhos proeminentes	60,87	78	13,5
Fissura palpebral oblíqua para cima	69,57	40	33,9
Cílios longos	73,91	52	58,8
Hipoplasia de terço médio	95,65	100	94,2
Ponte nasal larga	95,65	80	94,8
Nariz pequeno	100	56	93,2
Narinas antevertidas	95,65	95	96,2
Filtro longo	47,83	91	38,9
Boca triangular	73,91	80	86,2
Lábio superior fino	60,87	50	29
Hiperplasia gengival	78,26	54	71
Língua bífida	78,26	57	58,8
Micrognatia	69,57	71	68,2
Anormalidades dentárias	81,25	86	93,6
Pescoço curto	65,22	30	30,7
Braquidactilia	100	30	91,4
Clinodactilia	81,82	71	87,80%
Displasia de unhas	36,36	41	35
Micropenis	100	66	100
Hipoplasia de pequenos lábios	41,67	75	80,8
Dimple sacral	5	16	13,7
Defeitos cardíacos	17,39	23	13,5
Anormalidades renais	13,64	24	10
Hernia inguinal	15	41	21,3
Mesomelia de membros	100	100	100

Diferente da Síndrome de Robinow dominante a forma recessiva considera importante para seu diagnóstico a caracterização dos defeitos esqueléticos, principalmente a fusão de costelas que, apesar de poder estar ausente em alguns pacientes com SRR é ainda uma das principais características que diferencia as duas formas principais da síndrome,

A cada análise de recorrência das características clínicas chegamos mais próximo do grupo de sinais clínicos clássicos que envolvem e auxiliam no diagnóstico diferencial das SR. Mesmo apresentando variantes em um grupo de genes envolvidos na mesma via de atuação conseguimos nos basear na análise clínica diferencial na

SRD verificamos que alterações ósseas não são critério diagnóstico como para forma recessiva.

Correlação de análise entre as frequências de sinais das diferentes formas da síndrome é essencial para conseguirmos adequar de forma mais concisa o grupo de sinais mais recorrentes e conseguirmos diagnóstico diferencial da SR, já que possuímos uma sobreposição fenotípica entre as formas o conjunto da análise genótipo-fenótipo é indispensável para entendimento da classificação clínica.

Capítulo 2

Estudo genético-clínico da forma recessiva da Síndrome de Robinow

O trabalho está publicado na íntegra na revista *Human Mutation* e protegido por direitos autorais

Lima AR, Ferreira BM, Zhang C, Jolly A, Du H, White JJ, Dawood M, Lins TC, Chiabai MA, van Beusekom E, Cordoba MS, Caldas Rosa ECC, Kayserili H, Kimonis V, Wu E, Mellado C, Aggarwal V, Richieri-Costa A, Brunoni D, Canó TM, Jorge AAL, Kim CA, Honjo R, Bertola DR, Dandolo-Girardi RM, Bayram Y, Gezdirici A, Yilmaz-Gulec E, Gumus E, Yilmaz GC, Okamoto N, Ohashi H, Coban-Akdemir Z, Mitani T, Jhangiani SN, Muzny DM, Regattieri NAP, Pogue R, Pereira RW, Otto PA, Gibbs RA, Ali BR, van Bokhoven H, Brunner HG, Sutton VR, Lupski JR, Vianna-Morgante AM, Carvalho CMB, Mazzeu JF. **Phenotypic and mutational spectrum of ROR2-related Robinow syndrome.** *Hum Mutat.* 2022 Jul;43(7):900-918. doi: 10.1002/humu.24375. Epub 2022 May 10. PMID: 35344616; PMCID: PMC9177636.

Abstract

Robinow syndrome is characterized by a triad of craniofacial dysmorphisms, disproportionate-limb short stature, and genital hypoplasia. A significant degree of phenotypic variability seems to correlate with different genes/loci. Disturbances of the noncanonical WNT-pathway have been identified as the main cause of the syndrome. Biallelic variants in ROR2 cause an autosomal recessive form of the syndrome with

distinctive skeletal findings. Twenty-two patients with a clinical diagnosis of autosomal recessive Robinow syndrome were screened for variants in *ROR2* using multiple molecular approaches. We identified 25 putatively pathogenic *ROR2* variants, 16 novel, including single nucleotide variants and exonic deletions. Detailed phenotypic analyses revealed that all subjects presented with a prominent forehead, hypertelorism, short nose, abnormality of the nasal tip, brachydactyly, mesomelic limb shortening, short stature, and genital hypoplasia in male patients. A total of 19 clinical features were present in more than 75% of the subjects, thus pointing to an overall uniformity of the phenotype. Disease-causing variants in *ROR2*, contribute to a clinically recognizable autosomal recessive trait phenotype with multiple skeletal defects. A comprehensive quantitative clinical evaluation of this cohort delineated the phenotypic spectrum of *ROR2*-related Robinow syndrome. The identification of exonic deletion variant alleles further supports the contention of a loss-of-function mechanism in the etiology of the syndrome.

Keywords: HPO terms; WNT pathway; chromosome microarray analysis; craniofacial morphology; exonic deletion; next-generation sequencing; quantitative phenotyping cluster heatmap; skeletal dysplasia.

V. Considerações finais

Nesse trabalho realizamos a caracterização clínica e molecular de pacientes com síndrome de Robinow, a partir da busca por variantes patogênicas nos genes *DVL1*, *DVL3*, *FZD2*, *WNT5A* e *ROR2*, a fim de comparar a frequência de sinais clínicos nas formas clínicas causadas por variantes em cada um dos genes já descritos. Apesar da SR ser uma síndrome genética rara, pudemos analisar um grande número de pacientes (45) com as diferentes formas da síndrome iniciando assim uma proposta de correlação genótipo-fenótipo.

Para que essa correlação fosse ainda mais completa colaboramos com o grupo de pesquisadores do Baylor College of Medicine o que resultou na publicação do artigo “*Novel pathogenic variants and quantitative phenotypic analyses of Robinow syndrome: WNT signaling perturbation and phenotypic variability*” publicado na revista *Human Genetics and Genomics Advances* (Apêndice 1). Assim pudemos analisar um número muito maior de pacientes e com isso realizar análises estatísticas que permitiram uma melhor definição dos quadros clínicos associados aos diferentes genes. Nesse trabalho foi possível identificar ainda um novo gene responsável pela síndrome *DVL2*.

No Capítulo II nosso estudo da forma recessiva da síndrome inclui dados produzidos durante o Mestrado e complementados durante o Doutorado com a inclusão de novos pacientes e análise fenotípica detalhada. Esse trabalho resultou no artigo “*Phenotypic and mutational spectrum of ROR2-related Robinow syndrome*” está em fase de revisão na revista *Human Mutation*.

Com esses dados é possível hoje, em grande parte dos casos, chegarmos a um diagnóstico confiável apenas com base nos achados clínicos, podendo até mesmo prever qual gene está provavelmente alterado. Isso é particularmente importante para os casos com possível variante em *DVL1*, *DVL2* e *DVL3* uma vez que a maior parte das variantes é do tipo *frameshift* que podem não ser detectadas por sequenciamento de exoma, ou para pacientes que não tem acesso a exames moleculares.

Assim, pudemos contribuir para uma caracterização mais precisa dos achados clínicos na SR com um todo, definição dos aspectos clínicos associados aos diferentes genes e descrição de um grande número de novas variantes patogênicas que causam a síndrome, mostrando a importância da associação dos estudos moleculares e clínico

VI. Referências bibliográficas

1. Robinow, MD; Frederischc N. Silverman, MD; Hugo D. Smith, MD. A Newly Recognized Dwarfing Syndrome. *Am J Dis Child* 1969 Jun;117(6):645-651.
2. Robinow MD. The Robinow (fetal face) syndrome: a continuing puzzle. *Clin Dysmorphol*. 1993;2(3):189-98.
3. Wadia RS, Shirole DB, Dikshit MS. Recessively inherited costovertebral segmentation defect with mesomelia and peculiar facies (Covesdem syndrome): A new genetic entity? *J Med Genet* 1978 Abr;15(2):123-7
4. Shprintzen RJ, Goldberg RB, Saenger P, Sidoti EJ. Male-to-male transmission of Robinow's syndrome. Its occurrence in association with cleft lip and cleft palate. *Am J Dis Child*. 1982 Jul;136(7):594-7.
5. Akşit S, Aydinlioglu H, Dizdarer G, Caglayan S, Bektaşlar D, Cin A. Is the frequency of Robinow syndrome relatively high in Turkey? Four more case reports. *Clin Genet*. 1997 Out;52(4):226-30
6. Afzal AR, Rajab A, Fenske C, Crosby A, Lahiri N, Ternes-pereira E, Murday VA, Houlston R, Patton MA, Jeffery S. Linkage of recessive Robinow syndrome to a 4 cM interval on chromosome 9q22. *Hum Genet*. 2000 Mar;106(3):351-4.
7. Afzal AR, Jeffery S. One gene, two phenotypes: ROR2 mutations in autosomal recessive Robinow syndrome and autosomal dominant brachydactyly type B. *Hum Mutat*. 2003 Jul;22(1):1-11.
8. Van Bokhoven H, Celli J, Kayserili H, van Beusekom E, Balci S, Brussel W, Skovby F, Kerr B, Percin EF, Akarsu N, Brunner HG. Mutation of the gene encoding the ROR2 tyrosine kinase causes autosomal recessive Robinow syndrome. *Nat Genet*. 2000 Ago;25(4):423-6.
9. Bunn KJ, Daniel P, Rösken HS, O'Neill AC, Cameron-Christie RS, Morgan T, Brunner HG, Lai A, Kunst HP, Markie DM, Robertson SP. Mutations in DVL1 cause an osteosclerotic form of Robinow syndrome. *Am J Hum Genet*. 2015 Apr 2;96(4):623-30.
10. Ali BR, Jeffery S, Patel N, Tinworth LE, Meguid N, Patton MA, Afzal AR. Novel Robinow syndrome causing mutations in the proximal region of the

- frizzled-like domain of ROR2 are retained in the endoplasmic reticulum. *Hum Genet.* 2007 Nov;122(3-4):389-95.
11. Billiard J, Way DS, Seestaller-Wehr LM, Moran RA, Mangine A, Bodine PV. The orphan receptor tyrosine kinase Ror2 modulates canonical Wnt signaling in osteoblastic cells. *Mol Endocrinol.* 2005 Jan;19(1):90-101.
 12. Birgmeier J, Esplin ED, Jagadeesh KA, Guturu H, Wenger AM, Chaib H, Buckingham JA, Bejerano G, Bernstein JA. Biallelic loss-of-function *wnt5a* mutations in an infant with severe and atypical manifestations of robinow syndrome. *Am J Med Genet A.* 2018 Apr;176(4):1030-1036.
 13. White J, Mazzeu JF, Hoischen A, Jhangiani SN, Gambin T, Alcino MC, Penney S1, Saraiva JM, Hove H, Skovby F, Kayserili H, Estrella E, Vultovan Silfhout AT, Steehouwer M, Muzny DM, Sutton VR, Gibbs RA; Baylor-Hopkins Center for Mendelian Genomics, Lupski JR, Brunner HG, van Bon BW, Carvalho CM. DVL1 frameshift mutations clustering in the penultimate exon cause autosomal dominant Robinow syndrome. *Am J Hum Genet.* 2015 Apr 2;96(4):612-22.
 14. Chaofan Zhang, Juliana F. Mazzeu, Jesper Einfeldt, Christopher M. Grochowski, Janson White, Zeynep C. Akdemir, Shalini N. Jhangiani, Donna M. Muzny Richard A. Gibbs, Anna Lindstrand, James R. Lupski1, V. Reid Sutton1 Claudia M. B. Carvalho. Novel pathogenic genomic variants leading to autosomal dominant and recessive Robinow syndrome *Am J Hum Genet* 2020
 15. White JJ, Mazzeu JF, Coban-Akdemir Z, Bayram Y, Bahrambeigi V, Hoischen A4, van Bon BWM5, Gezdirici A, Gulec EY, Ramond F, Touraine R, Thevenon J, Shinawi M, Beaver E, Heeley J, Hoover-Fong J, Durmaz CD, Karabulut HG, 79 Marzioglu-Ozdemir E, Cayir A, Duz MB, Seven M, Price S, Ferreira BM, Vianna Morgante AM, Ellard S, Parrish A, Stals K, Flores-Daboub J, Jhangiani SN, Gibbs RA; Baylor-Hopkins Center for Mendelian Genomics, Brunner HG, Sutton VR, Lupski JR, Carvalho CMB. WNT Signaling Perturbations Underlie the Genetic Heterogeneity of Robinow Syndrome. *Am J Hum Genet.* 2018 Dec 16. pii: S0002-297(17)30422-6.
 16. White JJ, Mazzeu JF, Hoischen A, Bayram Y, Withers M, Gezdirici A, Kimonis V, Steehouwer M, Jhangiani SN, Muzny DM, Gibbs RA; Baylor-

- Hopkins Center for Mendelian Genomics, van Bon BW, Sutton VR, Lupski JR, Brunner HG, Carvalho CM. DVL3 Alleles Resulting in a -1 Frameshift of the Last Exon Mediate Autosomal-Dominant Robinow Syndrome. *Am J Hum Genet.* 2016 Mar 3;98(3):553-61.
17. Cybel m, eliane c, diane m, geneviève b, martine l. m, valérie cormier d. Identification of a novel causative mutation in the *ror2* gene in a lebanese family with a mild form of recessive robinow syndrome. *European journal of medical genetics* 2012, 103 e 108.
 18. Oishi I, Suzuki H, Onishi N, Takada R, Kani S, Ohkawara B, Koshida I, Suzuki K, Yamada G, Schwabe GC, Mundlos S, Shibuya H, Takada S, Minami Y. The receptor tyrosine kinase *Ror2* is involved in non-canonical *Wnt5a/JNK* signalling pathway. *Genes Cells.* 2003 Jul;8(7):645-54.
 19. Yamaguchi K, Okami K, Hibi K, Wehage SL, Jen J, Sidransky D. Mutation analysis of *hBUB1* in aneuploid HNSCC and lung cancer cell lines. *Cancer Lett.* 1999 Mai 24;139(2):183-7.
 20. Mazzeu JF, Pardono E, Vianna-Morgante AM, Richieri-Costa A, Ae Kim C, Brunoni D, Martelli L, Andrade CE, Colin G, Otto PA. Clinical characterization of autosomal dominant and recessive variants of Robinow syndrome. *Am J Med Genet A.* 2007 Fev;143(4):320-5.
 21. Schwabe GC, Trepzik B, Süring K, Brieske N, Tucker AS, Sharpe PT, Minami Y, Mundlos S. *Ror2* Knockout Mouse as a Model for the Developmental Pathology of Autosomal Recessive Robinow Syndrome. *Dev Dyn.* 2004 Fev;229(2):400-10.
 22. Roifman M, Marcelis CL, Paton T, Marshall C, Silver R, Lohr JL, Yntema HG, Venselaar H, Kayserili H, van Bon B, Seaward G; FORGE Canada Consortium, Brunner HG, Chitayat D. De novo *WNT5A*-associated autosomal dominant Robinow syndrome suggests specificity of genotype and phenotype. *Clin Genet.* 2015;87(1):34-41.
 23. Forrester w. c. review the *ror* receptor tyrosine kinase family cell. *mol. life sci.* 2002 83–96

24. Billiard J, Way DS, Seestaller-Wehr LM, Moran RA, Mangine A, Bodine PV. The orphan receptor tyrosine kinase Ror2 modulates canonical Wnt signaling in osteoblastic cells. *Mol Endocrinol*. 2005 Jan;19(1):90-101.
25. Huelsken J, Birchmeier W. New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr Opin Genet Dev*. 2001 Oct;11(5):547-53.
26. Krepischi-Santos AC, Vianna-Morgante AM, Jehee FS, Passos-Bueno MR, Knijnenburg J, Szuhai K, Sloos W, Mazzeu JF, Kok F, Cheroki C, Otto PA, Mingroni-Netto RC, Varela M, Koiffmann C, Kim CA, Bertola DR, Pearson PL, Rosenberg C. Whole-genome array-CGH screening in undiagnosed syndromic patients: old syndromes revisited and new alterations. *Cytogenet Genome Res*. 2006;115(3-4):254-61.
27. He F, Xiong W, Yu X, Espinoza-Lewis R, Liu C, Gu S, Nishita M, Suzuki K, Yamada G, Minami Y, Chen Y. Wnt5a regulates directional cell migration and cell proliferation via Ror2-mediated noncanonical pathway in mammalian palate development. *Development*. 2008 Dec;135(23):3871-9.
28. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res*. 2005 Jan;15(1):28-32.
29. Yamaguchi TP, Bradley A, McMahon AP, Jones S. A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development*. 1999 Mar;126(6):1211-23.
30. Person AD, Beiraghi S, Sieben CM, Hermanson S, Neumann AN, Robu ME, Schleiffarth JR, Billington CJ Jr, van Bokhoven H, Hoogeboom JM, Mazzeu JF, Petryk A, Schimmenti LA, Brunner HG, Ekker SC, Lohr JL. WNT5A mutations in patients with autosomal dominant Robinow syndrome. *Dev Dyn*. 2010 Jan;239(1):327-37
31. Türkmen S, Spielmann M, Güneş N, Knaus A, Flöttmann R, Mundlos S, Tüysüz B. A Novel de novo FZD2 Mutation in a Patient with Autosomal Dominant Omodysplasia. *Mol Syndromol*. 2017;8:318–324.
32. Danyel M, Kortüm F, Dathe K, Kutsche K, Horn D¹. Autosomal dominant Robinow syndrome associated with a novel DVL3 splice mutation. *Am J Med Genet A*. 2018 Apr;176(4):992-996.
33. DeChiara TM, Kimble RB, Poueymirou WT, Rojas J, Masiakowski P, Valenzuela DM, Yancopoulos GD. Ror2, encoding a receptor-like tyrosine

- kinase, is required for cartilage and growth plate development. *Nat Genet.* 2000 Mar;24(3):271-4.
34. Funato, Y., Michiue, T., Terabayashi, T., Yukita, A., Danno, H., Asashima, M., and Miki, H. Nucleoredoxin regulates the Wnt/planar cell polarity pathway in *Xenopus*. *Genes Cells* 2008. 13, 965–975. 20.
 35. Liu Y, Rubin B, Bodine PV, Billiard J. Wnt5a induces homodimerization and activation of Ror2 receptor tyrosine kinase. *J Cell Biochem.* 2008 Oct 1;105(2):497-502.
 36. Maroteaux p, sauvegrain j, chrispin a, farriaux jp. *am j med genet. Omodysplasia.* 1989 mar;32(3):371-5.
 37. Minami, y., oishi, i., endo, m. & nishita, m. ror-family receptor tyrosine kinases in noncanonical wnt signaling: their implications in developmental morphogenesis and human diseases. *dev. dyn.* 2010 239, 1–15.
 38. Niehrs C. The complex world of WNT receptor signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Dec;13(12):767-79.
 39. Nishita M, Itsukushima S, Nomachi A, Endo M, Wang Z, Inaba D, Qiao S, Takada S, Kikuchi A, Minami Y. Ror2/Frizzled complex mediates Wnt5a-induced AP-1 activation by regulating Dishevelled polymerization. *Mol Cell Biol.* 2010 Jul;30(14):3610-9.
 40. Oishi i, suzuki h, onishi n et al. the receptor tyrosine kinase ror2 is involved in non-canonical wnt5a/jnk signalling pathway. *genes cells* 2003; 8 (7): 645–654.
 41. Venditti CP, Farmer J, Russell KL, Friedrich CA, Alter C, Canning D, Whitaker L, Mennuti MT, Driscoll DA, Zackai EH. Omodysplasia: an affected mother and son.. *Am J Med Genet.* 2002 Aug 1;111(2):169-77. Review.
 42. Polakis, p. wnt signaling in cancer. *cold spring harb. perspect. biol.* 2012 1;4(5).
 43. Saal HM, Prows CA, Guerreiro I, Donlin M, Knudson L, Sund KL, Chang CF, Brugmann SA3, Stottmann RW. A mutation in FRIZZLED2 impairs Wnt signaling and causes autosomal dominant omodysplasia. *Hum Mol Genet.* 2015 Jun 15;24(12):3399-409.
 44. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2000 Oct 13;103(2):211-25.

45. Tufan F, Cefle K, Türkmen S, Türkmen A, Zorba U, Dursun M, Oztürk S, Palandüz S, Ecdar T, Mundlos S, Horn D. Clinical and molecular characterization of two adults with autosomal recessive Robinow syndrome. *Am J Med Genet A*. 2005 Jul;136(2):185-9.

Anexo I**Ficha de anamnese**

DATA .../ .../

REGISTRO LGH Nº.

RESPONSÁVEL PELO CASO

PACIENTE DATA DE NASC. .../ .../

SEXOGRUPO RACIAL LOC. DE NASC.

ENDEREÇO CIDADE

ESTADO CEP-..... TELEFONE (.....).....

OBS:.....

MÉDICO TELEFONE (.....).....

MÃE PROFISSÃO IDADE

ESCOLARIDADE

PAI..... PROFISSÃO IDADE

ESCOLARIDADE

MOTIVO DA CONSULTA

CONSANGUINIDADE ESTÁ GRÁVIDA? OUTROS CASOS?

1) ANAMNESE GERAL

- 1.1) Antecedentes pré-natais (gestação) pré-natal (s/n)....
 duração medicamentos.....

- 1.2) antibiótico.....
 intoxicações.....
- 1.3) exposição a radiações..... outras
 intercorrências
- 1.2) Antecedentes perinatais parto índ.de
 Apgar(s/n)... choro(s/n)... cianose(s/n).... pesokg
 comprimentocm per.cefálicocm icterícia(s/n)
 intercorrências.....
- 1.3) Evolução neuro-psico-motora sustentou a cabeça
sentou sem apoio.....engatinhou
 ficou em pé andou sem apoio
 falou primeiras palavras..... formou
 frases..... controle
 vesical (diurno) (noturno) controle anal
 (diurno) (noturno)
- 1.4) Escolaridade escola especial(s/n) tipo
 nível atingido anos
 de escolaridade 1.5) História patológica progressiva
 doenças
 internações cirurgias

3) EXAME FÍSICO

Data do exame / /

3.1) Geral

pesokg alturacm perímetro cefálicocm
 bossa frontal (s/n)calvície frontal (s/n).....
 hipoplasia de face média(s/n)..... Nevo
 facial(s/n)..... pescoço curto.....

3.2) Região orbitária Epicanto(s/n).....olhos
 proeminentes(s/n)..... Escleróticas azuladas
 (s/n)..... Fissuras palpebrais
estrabismo(s/n)..... Cílios
 longos(s/n).....ptose(s/n).....
 distância intercantal interna.....mm distância
 intercantal externamm distância bipupilar
mm

Apêndice I.
Arquivo anexo