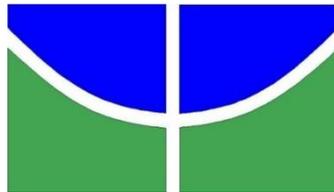


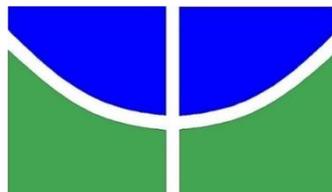
BÁRBARA MERFORT FERREIRA

**ASPECTOS GENÉTICOS E CLÍNICOS DA SÍNDROME DE
ROBINOW AUTOSSÔMICA DOMINANTE**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA (BRASÍLIA), 2017

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



BÁRBARA MERFORT FERREIRA

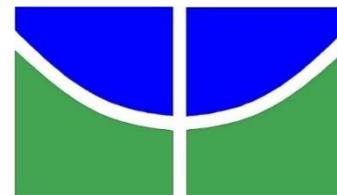
**ASPECTOS GENÉTICOS E CLÍNICOS DA SÍNDROME DE ROBINOW
AUTOSSÔMICA DOMINANTE**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do Título de Mestre em Ciências da
Saúde do Programa de Pós-graduação em Ciências
da Saúde da Universidade de Brasília

Orientadora: Dr^a Juliana Forte Mazzeu de Araújo

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA (BRASÍLIA)

2017



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Dissertação de Mestrado

BÁRBARA MERFORT FERREIRA

Título:

Aspectos genéticos e clínicos da síndrome de Robinow autossômica dominante

Comissão examinadora:

Prof^a Dr^a Juliana Forte Mazzeu de Araújo
Faculdade de Medicina – UnB

Prof^a Dr^a Patrícia Natália da Silva Moretti
Instituto de Biologia - UnB

Prof^a Dr^a Ana Carolina Acevedo Poppe
Faculdade de Ciências da Saúde - UnB

Prof^a Dr^a Érica Carine Campos Caldas Rosa
Faculdade de Ciências da Saúde – UnB
Suplente

Brasília, 14 de dezembro de 2017

Dedico este trabalho ao meu irmão, Marcelo Merfort Ferreira.

Você me ensinou que o amor transcende o tempo e que
nada importa, além daquilo que realizamos hoje.

Carpe diem.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família, que sempre me incentivou incondicionalmente e me deu liberdade para fazer aquilo que gosto. A minha querida mãe, Roseli de Cássia Merfort, uma mulher forte que me ensinou a importância de não desistir de meus sonhos. Agradeço ao meu pai, Fernando César Ferreira, meu amigo, que é simplesmente um exemplo de força e inspiração para mim. Agradeço ao meu companheiro de vida, meu amor, Ravi Coelho Almeida Diniz, por tudo, mas principalmente pela paciência e por estar ao meu lado em todos os momentos, inclusive os mais difíceis.

Agradeço muitíssimo a professora Dr^a. Juliana Forte Mazzeu de Araújo, por tantas horas e dias dedicados a realização deste trabalho, agradeço pela confiança e pelo aprendizado alcançados neste período que estive sob sua orientação. Terminei este trabalho na certeza que és uma excelentíssima educadora, brilhante geneticista e uma pessoa extremamente humana.

Agradeço também a professora Dr^a Íris Ferrari, que desde os dias de estágio vem me dando lições diárias sobre a genética, mas principalmente sobre a vida. Dr^a Íris, lhe admiro e levarei seus ensinamentos para toda a vida, com certeza.

Agradeço a professora Dr^a Lenora Gandolfi e ao professor Dr. Felipe Cardia, coordenadores do projeto Saúde e Educação Integral, do qual participei durante todo o curso de mestrado e que fez mudar minha percepção sobre a importância do amor, da saúde preventiva, da educação e do meio ambiente na promoção de qualidade de vida da população carente.

Agradeço imensamente a toda a equipe do laboratório de Genética Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, por todo apoio, suporte e momentos de descontração. Obrigada Nilza, Aluísio, Dr^a Mara, Dr^a Bia, Dr^a Rosenelle, Dr^a Érica, Polly, Laís, Ana, Amanda, Ariadne, Pedro, Bruno e cada um que contribuiu de alguma forma para a realização deste trabalho. Agradeço especialmente a minha colega Shélida Braz, que se tornou uma amiga. Obrigada por nossas horas de estudo, obrigada por compartilhar comigo suas dúvidas e experiências que contribuíram muito para o meu aprendizado.

Obrigada aos professores e colegas do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, as professoras Dr^a. Aline Pic Taylor, Dr^a. Silviene de Oliveira e Dr^a. Patrícia

Moretti, as alunas Marcela, Gabriela, Vanessa, Yasmin e Harumy, que deram suporte técnico e muito apoio para a realização desse trabalho.

Agradeço todas as oportunidades de que me foram oferecidas pela Universidade de Brasília que contribuíram não só para a conclusão deste trabalho, mas para a minha formação como mestre. Agradeço a Universidade Católica de Brasília e a Baylor College of Medicine nos Estados Unidos pelo suporte técnico na execução dos procedimentos realizados neste trabalho. Agradeço também pelo suporte acadêmico e administrativo fornecido pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, meu obrigada especial para os funcionários da secretaria e do financeiro, Vitória, Luciana, Taynan e Beatriz que foram extremamente eficientes em todas as inúmeras solicitações. Agradeço a Capes pela bolsa concedida que possibilitou a minha dedicação exclusiva na realização desse trabalho.

Sou grata a todos que somaram de alguma forma para a construção e conclusão deste projeto, amigos, familiares, colegas e professores, deixo aqui meu reconhecimento e meu muito obrigada a todos vocês.

Resumo

A síndrome de Robinow é um distúrbio esquelético raro em que as variantes patogênicas conhecidas estão associadas a genes participantes da via de sinalização Wnt, *não-canônica*, incluindo *ROR2*, *WNT5A*, *DVL1* e *DVL3*. No entanto, grande parte dos casos clinicamente diagnosticados com esta síndrome permanecem sem uma solução molecular. No presente estudos realizamos um screening para mutações nos exons 14 e 15 dos genes *DVL1* e *DVL3*, por sequenciamento Sanger, em 11 pacientes diagnosticados com síndrome de Robinow autossômica dominante (DRS), dentre os quais um paciente apresentou mutação em *DVL3* e outros 4 apresentaram mutação em *DVL1*. Nos 6 pacientes em que não foram observadas mutações em *DVL1* ou *DVL3* foi realizado sequenciamento completo de exoma (WES), no intuito de revelar novas variantes envolvidas. Foram então identificadas duas mutações em heterozigose no gene *WNT5A* em outros dois pacientes do nosso estudo. O sequenciamento completo de exoma (WES) também revelou uma variante patogênica no gene *FZD2* em dois membros afetados da mesma família. O gene *FZD2* não havia sido previamente relacionado a síndrome de Robinow na literatura, entretanto já havia sido indicado a estar envolvido em fenótipos Robinow-like. Dois casos permanecem sem uma etiologia molecular definida. Esses dados revelam que parálogos específicos de genes podem sugerir importantes domínios protéicos que estão envolvidos no desenvolvimento embrionário e ainda apoiam a hipótese de que a síndrome de Robinow resulta da perturbação da via Wnt/PCP. Nossos achados demonstram a utilidade de estudos genômicos de doenças raras para esclarecer os eventos envolvidos no desenvolvimento humano complexo e contribuem para a melhor caracterização da síndrome de Robinow.

Abstract

Robinow syndrome is a rare skeletal disorder in which known pathogenic variants reside in genes for noncanonical Wnt signaling including *ROR2*, *WNT5A*, *DVL1* and *DVL3*. However, a large part of clinically diagnosed cases remain molecularly unsolved. In the present study we performed a screening for mutations in *DVL1* and *DVL3*, by Sanger sequencing, in 11 patients diagnosed with autosomal dominant Robinow syndrome. Of this cohort, one patient presented mutation in *DVL3* gene and another 4 patients presented mutation in *DVL1*. In patients in whom no mutations in *DVL1* or *DVL3* were observed, we performed complete exome sequencing (WES) that revealed heterozygous mutations in the *WNT5A* gene in two patients and one pathogenic variant in the *FZD2* gene in two affected members of the same family. *FZD2* had not been previously related to Robinow's syndrome, however it had already been indicated to be involved in Robinow-like phenotypes. These data reveal specific gene paralogs, suggest relevant protein domains involved, and further support the hypothesis that Robinow syndrome results from perturbation of the Wnt/PCP pathway. Our findings demonstrate the utility of rare disease genomic studies to illuminate complex human developmental pathways and contribute to a better characterization of the Robinow syndrome.

Lista de tabelas

Tabela I	-	Frequência de sinais clínicos em DRS e RRS - 2007	16
Tabela II	-	Primers utilizados para amplificação da região codificante do gene <i>DVL1</i> . Cada par de primer amplifica um exon do gene <i>DVL1</i> ou parte dele.	38
Tabela III	-	Primers utilizados para amplificação da região codificante do gene <i>DVL3</i> . Cada par de primer amplifica um exon do gene <i>DVL3</i> ou parte dele.	38

Lista de figuras

Figura I	-	Representação estrutural da proteína ROR2.	21
Figura II	-	Comparação de fenótipos de desenvolvimento em ratos <i>Ror2</i> - / - e <i>Wnt5a</i> - / -.	22
Figura III	-	Camundongos <i>Wnt5a</i> - / - têm defeitos anatômicos fenotipicamente semelhantes a pacientes com síndrome Robinow autossômica dominante	23
Figura IV	-	Visão global da via de sinalização Wnt.	32
Figura V	-	Segmentos de eletroferogramas do sequenciamento Sanger do gene <i>DVL1</i> nos pacientes 01, 02, 03 e 04.	42
Figura VI	-	Segmentos de eletroferogramas do sequenciamento Sanger do gene <i>DVL3</i> no paciente 05.	42
Figura VII	-	Localização uniforme das variantes <i>DVL1</i> e <i>DVL3</i> relacionadas a síndrome de Robinow. Todas as variantes se encontram no último e penúltimo exon e resultam na mudança do quadro de leitura destes genes.	44
Figura VIII	-	Modelo de homologia WNT5A.	50
Figura IX	-	Representação esquemática dos domínios funcionais conhecidos de FZD2 que interagem com DVL.	55
Figura X	-	Modelagem in silico da mutação Gly434Val em FDZ2.	55

Lista de quadros

Quadro I	- Descrição de mutações nos genes DVL1 e DVL3 em pacientes com DRS.	43
Quadro II	- Frequência de sinais clínicos em pacientes com DRS2 e DRS3.	46
Quadro III	- Descrição de mutações nos genes WNT5A em pacientes com DRS.	49
Quadro IV	- Frequência de sinais clínicos em pacientes com DRS1.	52
Quadro V	- Descrição de mutações no gene FZD2 em pacientes com DRS e Omodisplasia.	54
Quadro VI	- Frequência de sinais clínicos em pacientes com DRS e mutação em FZD2.	57
Quadro VII	- Frequência de sinais clínicos dos pacientes de nosso estudo e daqueles descritos para pacientes com DRS e RRS	60

Lista de siglas e abreviaturas

AP-1	-	Activator protein 1
APC	-	Protein Phosphatase 1, Regulatory Subunit 46
Axina/AXIN1	-	Axis Inhibition Protein
CamKII	-	Kinases Dependentes de Cálcio/Calmodulina II
CDC42	-	Cell Division Control Protein 42 Homolog
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 Autosômica 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
Rac	-	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RhoA	-	Ras homolog gene family, member A
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 5A

Sumário

I.	Introdução	15
I.1	HISTÓRICO DA SÍNDROME DE ROBINOW	15
I.2	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA RS	16
I.3	ETIOLOGIA DA RRS	18
I.3.1	<i>O gene ROR2</i>	20
I.4	ETIOLOGIA DA DRS	23
I.4.1	<i>Os genes DVL1 e DVL3</i>	26
I.5	VIA DE SINALIZAÇÃO WNT	30
II.	Objetivo	36
III.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
III.	Materiais e métodos	37
III.1	SELEÇÃO DOS PACIENTES PARA ESTUDO	37
III.1.1	<i>Coleta de Material Biológico</i>	37
III.2	TRIAGEM DE MUTAÇÕES.....	37
III.2.1	<i>Extração de DNA</i>	37
III.2.2	<i>PCR- Reação em cadeia pela polimerase</i>	38
III.2.3	<i>Sequenciamento Sanger</i>	39
III.2.4	<i>Clonagem</i>	39
III.2.5	<i>Sequenciamento Completo de Exoma (WES)</i>	39
IV.	Resultados e discussão	42
IV.2	PESQUISA DE MUTAÇÕES NOS GENES <i>DVL1</i> E <i>DVL3</i> POR SEQUENCIAMENTO SANGER	42
IV.3	CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES COM MUTAÇÃO EM <i>DVL1</i> E <i>DVL3</i>	47
IV.4	PESQUISA DE MUTAÇÕES POR WES.....	49
IV.4.1	<i>Mutações em WNT5A</i>	49
IV.5	CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES COM MUTAÇÃO EM <i>WNT5A</i>	52
IV.4.2	<i>Identificação de novos genes associados a DRS por WES</i>	54

IV.6	CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES COM MUTAÇÃO EM <i>FZD2</i>	57
IV.7	SÍNTESE DE RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
IV.7.1	<i>Análise Molecular</i>	59
IV.7.2	<i>Análise Clínica</i>	60
V.	Conclusão	64
VI.	Referências	66
VII.	Anexos	78

I. Introdução

I.1 HISTÓRICO DA SÍNDROME DE ROBINOW

Em 1969 Robinow *et al.* descreveram pela primeira vez um raro tipo de nanismo sindrômico caracterizado por encurtamento mesomélico de membros, genitália hipoplásica e face fetal típica. A desordem, denominada síndrome de Robinow (RS), ficou conhecida como síndrome da face fetal devido a aparência facial característica apresentada por indivíduos acometidos pelo distúrbio. O trabalho pioneiro de Robinow *et al.* foi realizado a partir observação de filhos de casal não consanguíneo que apresentavam nanismo mesomélico, genitália hipoplásica e anomalias faciais: hipertelorismo, fissuras palpebrais alargadas, nariz curto e anomalias dentárias. Devido ao grande número de afetados de ambos os sexos em gerações precedentes nas famílias observadas, ficou sugerido que o padrão de herança para síndrome era autossômico dominante.

No ano de 1978 uma nova síndrome de herança autossômica recessiva que associava encurtamento mesomélico de membros à um padrão de características faciais, genitália hipoplásica e defeitos de segmentação costovertebral foi sugerida por Wadia *et al.* (1978). Esta síndrome recebeu o acrônimo COVESDEM (costovertebral segmentation defects with mesomelia). No ano seguinte reconheceu-se que a síndrome COVESDEM era uma variante da RS com um modo de herança alternativo, denominada síndrome de Robinow autossômica recessiva (RRS).

A hipótese de mecanismo ligado ao X foi excluída com o relato do primeiro caso da RS onde havia a transmissão de pai para filho. A RS teve, assim, seu padrão de herança delimitado, revelando uma heterogeneidade genética (Shprintzen *et al.*, 1982).

A incidência da síndrome de Robinow permanece desconhecida, no entanto a escassa apresentação de casos descritos na literatura sugere que esta frequência é baixa. Intrigantemente, até o ano de 1997 haviam sido descritos 80 casos da RS, dentre eles 19 eram de indivíduos nascidos na Turquia. Há indícios de que uma maior ocorrência da RRS na Turquia e Oman, regiões que apresentam alto índice de casamentos consanguíneos; cerca de 80% dos afetados pela forma recessiva são fruto de casamentos consanguíneos. É importante salientar que a baixa incidência da

RS pode ser atribuída a um sub diagnóstico, causado pela variabilidade clínica dos pacientes, o que torna o diagnóstico clínico diferencial e complexo, exigindo uma descrição completa do fenótipo dos afetados (Akşit *et al.*, 1997).

A RS também apresenta expressividade altamente variável, tornando necessária a observação de sinais clínicos para a determinação do padrão de herança e para o diagnóstico diferencial com síndromes que apresentam manifestações clínicas semelhantes.

I.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA RS

A RS é uma displasia esquelética associada a características dismórficas faciais e genitália hipoplásica. Dentre os sinais mais marcantes da RS destacam-se o hipertelorismo e a baixa estatura, que são observados em suas duas formas de herança. Como grande parte de casos descritos estão relacionados a eventos esporádicos, determinar a forma de herança para cada paciente torna-se por vezes impossibilitado. Entretanto, observou-se que em relatórios da RRS todos os indivíduos afetados apresentavam defeitos na segmentação costovertebral e fusão de costelas, características estas que não tinham sido observadas em pacientes com a forma de herança dominante da síndrome. A síndrome de Robinow autossômica dominante (DRS) apresenta manifestações clínicas mais moderadas em relação ao acometimento ósseo, podendo apresentar estatura normal além de acometimento cardíaco e renal nos indivíduos afetados (Mazzeu *et al.*, 2007).

Para uma melhor visualização das formas de herança da RS e de suas respectivas manifestações clínicas, Mazzeu *et al.* (2007) relataram a frequência de sinais clínicos considerados importantes para a discriminação das variantes dominantes ou recessivas a partir da observação de 38 pacientes examinados pessoalmente pelos autores e de 50 indivíduos afetados descritos na literatura (*Tabela 1*). Foi utilizada a presença de fusão de costelas como diagnóstico da variante recessiva, além do padrão de herança em casos familiares. Desta forma, 37 pacientes foram classificados como tendo RRS e outros 51 como tendo DRS. Os sinais clínicos presentes em mais de 75% dos acometidos por qualquer forma, e, por conseguinte, os mais importantes para a caracterização da síndrome foram: hipertelorismo, características nasais, hipoplasia do terço médio da face, encurtamento mesomélico de membros, braquidactilia, clinodactilia, micropênis e baixa estatura. Hemivertebra

e escoliose estavam presentes em mais do que 75% dos pacientes com a RRS, mas em menos do que 25% dos pacientes com DRS. Hérnia umbilical (32,3%) e dentes supranumerários (10,3%) foram encontradas exclusivamente em pacientes com a forma dominante. A aparência facial dos indivíduos diagnosticados com a RS muda com o tempo e a semelhança com a face fetal torna-se menos marcada na fase adulta.

Tabela I - Frequência de sinais clínicos em DRS e RRS - 2007

Característica	Prevalência em DRS (%)	Prevalência em RRS (%)
Hipertelorismo (ocular)	100	100
Narinas antevertidas	96	96
Ponte nasal ampla	97	95
Micropênis	84	100
Narinas voltadas para cima	87	97
Encurtamento mesomélico de membros	80	100
Baixa estatura	81	97
Hipoplasia do terço médio da face	81	94
Nariz curto	81	93
Braquidactilia	81	91
Cantos da boca voltado pra baixo	63	95
Clinodactilia	70	88
Testa proeminente	79	77
Boca triangular	65	86
Mãos curtas	62	84
Má oclusão dentária	49	94
Criptorquidismo	72	67
Hipoplasia de pequenos lábios	50	81
Ponte nasal baixa	78	49
Clitóris hipoplásico	46	80
Micrognatia	57	68
Hemivértebra	23	98
Cílios longos	54	59
Hiperplasia de gengiva	36	71
Filtro longo	65	39
Língua bífida	39	59
Escoliose	18	77
Macrocefalia	64	26
Palato alto arqueado	52	14

Tabela I. Distribuição dos 75 sinais clínicos de acordo com suas frequências em pacientes com síndrome de Robinow autossômica dominante (DRS) e recessiva (RRS). A tabela sofreu uma modificação e foram excluídos sinais com frequência menor que 50%. Dados retirados de Mazzeu *et al.* (2007).

Atualmente o diagnóstico diferencial entre a RRS e a DRS está bem consolidado, entretanto há a necessidade de se avaliar um grupo de informações como o histórico familiar e a manifestação de sinais clínicos e seu enquadramento

dentro do grupo de sinais já descritos para cada variante da síndrome. Além de que, o uso de técnicas moleculares de diagnóstico que buscam por alterações genéticas específicas podem ser importantes para explicar os fenótipos encontrados. Tais ferramentas são indispensáveis para confirmação da suspeita clínica da RS (Tufan *et al.*, 2005).

Devido a expressividade variável, pacientes com RS tipicamente têm uma ampla gama de possíveis diagnósticos diferenciais, incluindo outros distúrbios esqueléticos, principalmente a síndrome Aarskog-Scott, (MIM#305400) e síndrome de Opitz G/BBB (MIM#145410).

Assim como os sinais clínicos da RS são diversos, sua etiologia também é geneticamente heterogênea. A RRS foi definida por mutações no gene que codifica o receptor órfão de tirosina-kinase 2 (*ROR2*) (van Bokhoven *et al.*, 2000; Afzal e Jeffery, 2003). Mutações no gene *WNT5A* (Wnt Family Member 5A), que codifica um ligante típico de *ROR2*, também são encontradas em alguns indivíduos com DRS, mas estes não estão presentes em todos os casos (Person *et al.*, 2010). Outros genes, que codificam proteínas participantes da via Wnt de sinalização vêm sendo associados a fenótipos de RS dominante. Criticamente, os genes *ROR2*, *WNT5A*, *DLV1* (Dishevelled Segment Polarity Protein 1) e *DVL3* (Dishevelled Segment Polarity Protein 3), genes associados a RS, são mediadores fundamentais da via Wnt de sinalização. Assim, enquanto os achados clínicos para RS mostram uma certa heterogeneidade, as mutações nesses genes demonstram estar ligadas funcionalmente através de uma via comum.

I.3 ETIOLOGIA DA RRS

Posteriormente a descoberta da herança autossômica recessiva ligada a RS vários trabalhos foram publicados descrevendo pacientes ao redor do mundo que apresentavam manifestações clínicas semelhantes. No estudo de Mazzeu *et al.* (2007) foram delineadas detalhadamente essas características, através de uma comparação clínica entre as formas de herança. Tais sinais incluem baixa estatura, encurtamento mesomélico de membros, fusão de costelas, braquidactilia, defeitos cardíacos congênitos, hipoplasia genital e uma aparência facial dismórfica. A aparência facial inclui testa proeminente, hipertelorismo, hipoplasia facial, boca larga

e nariz curto com narinas antevértidas. As anomalias orais incluem hipertrofia da gengiva, anormalidades dentárias e fenda lábio palatina.

Uma outra comparação entre os fenótipos craniofaciais e intra-buciais de 9 pacientes com DRS e três outros com RRS foi apresentada por Beiraghi *et al.*, 2011. Apesar de haver sobreposições, em especial no que diz respeito às características mais prevalentes, como o hipertelorismo, o nariz curto e largo e as narinas antevértidas, a dismorfologia craniofacial foi mais grave em pacientes com a RRS. Em contraste, as características intra-orais foram mais graves em pacientes com a desordem de herança dominante, incluindo ampla cume retromolar, deformação rebordo alveolar, má oclusão, aumento gengival, apinhamento dentário e hipodontia. Em ambos os tipos, as características faciais tornaram-se menos pronunciadas em indivíduos mais velhos. O estudo sugeriu que o diagnóstico diferencial entre DRS e RRS pode ser reforçado a partir da observação de diferenças no padrão de deformação da crista alveolar e da gravidade de outras características intrabuciais (Beiraghi *et al.*, 2011).

A RRS configura-se como uma displasia esquelética grave que promove anomalias esqueléticas acentuadas que levam ao acometimento da estrutura óssea de seus afetados. Tal fato tem instigado pesquisadores a buscarem uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no fenótipo da síndrome. Em busca de uma causa genética van Bokhoven *et al.* (2000) estudaram 11 famílias, 10 das quais foram derivadas de Turquia e uma do Paquistão. Os pais de todos, exceto de uma das famílias, eram consanguíneos, sendo a maioria primos de primeiro grau. Os autores mapearam e sequenciaram um gene para esta desordem na região 9q21-q22 e encontraram mutações nos exons 5, 8 e 9. Tais mutações encontravam-se no gene *ROR2* e resultavam em códons de parada prematuros ocasionando proteínas não funcionais. A morfogênese anormal característica do rosto e genitais externos, juntamente com nanismo, encurtamento de membros e anomalias de segmentação costovertebrais foram enfatizadas como características clínicas da RRS pelos autores.

Simultaneamente e independentemente, Afzal *et al.* (2000), realizaram o mapeamento por homozigose para também identificar o gene envolvido na RRS. O estudo sucedeu-se por meio de uma ampla pesquisa do genoma envolvendo cinco famílias de casais consanguíneos e descendentes afetados. A partir do mapeamento foi localizada uma única região de homozigose ocorrendo também em um segmento

de 3-4 CM na região 9q22, entre os marcadores D9S1836 e D9S1803. (Afzal, *et al.*, 2000). Em um trabalho subsequente os autores desenvolveram um estudo para localizar o gene no intervalo identificado, a partir da análise de polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) e sequenciamento, onde identificaram mutações nos exons 5, 7 e 9 do gene *ROR2* em 26 dos 27 pacientes investigados. Consolidando assim, o gene *ROR2* como principal candidato a causar o fenótipo da RS (Afzal *et al.*, 2003).

No ano de 2004 foi realizado um significativo trabalho em modelo animal a partir de uma detalhada análise de camundongos *Ror2* *-/-* comparado ao desenvolvimento dos sinais clínicos apresentados por afetados pela RRS. Análise da expressão de *Ror2* na região craniofacial foi realizada em embriões em diferentes fases de desenvolvimento. Os resultados demonstraram que as malformações vertebrais em camundongos *Ror2* *-/-* são devidos a reduções no mesoderma pré-somítico e defeitos na somitogênese. O encurtamento mesomélico de membros em camundongos *Ror2* *-/-* é uma consequência da diferenciação alterada de condrócitos. Além disso, mostrou-se que o fenótipo craniofacial é causado por um crescimento excessivo da linha média. A expressão *Ror2* no tubérculo genital e seu tamanho reduzido em camundongos *Ror2* *-/-* sugere que *Ror2* esteja também envolvido no desenvolvimento genital (Schwabe *et al.*, 2004).

Além de demonstrar que *ROR2* é essencial nas fases iniciais da embriogênese e na formação óssea, o estudo apresentado por Schwabe *et al.* (2004) ressaltou o papel da interação do gene *ROR2* na atividade das proteínas Wnt. Tais proteínas exercem uma diversidade de funções como a proliferação e polaridade celular durante todo processo de embriogênese de vertebrados (Komiya e Habas, 2008). Curiosamente, camundongos *Ror2* *-/-* e *Wnt5a* *-/-*, exibem fenótipos semelhantes (Yamaguchi *et al.*, 1999). Este trabalho em modelo animal propõe o gene *ROR2* como principal candidato a causar da RRS e sugere a possível interação de *ROR2* com proteínas da família Wnt. Tais achados fornecem evidências para a melhor compreensão mecanismos que desencadeiam a clínica dos afetados pela RS.

I.3.1 O gene *ROR2*

O gene *ROR2* (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor) codifica uma proteína pertencente a uma superfamília de glicoproteínas transmembrânicas que

funcionam como receptores de fatores de crescimento na superfície celular. As RTKs desempenham um papel no controle da maioria dos processos celulares básicos, incluindo a proliferação celular, diferenciação, migração e metabolismo (Afzal e Jeffery, 2003). O gene *ROR2* está localizado em 9q22.2, possui cerca de 222 kb e é constituído de nove exons (Ali *et al.*, 2007).

A estrutura da proteína ROR2 está bem descrita, seus domínios exercem funções já conhecidas em outros receptores tirosina kinase que participam de vias de transdução de sinal. O que a torna diferente é sua participação na regulação celular envolvida no desenvolvimento ósseo. A atividade normal dessa proteína desencadeia a ativação de uma via de sinalização intracelular, que leva informações até o núcleo controlando, assim, a expressão e produção de proteínas. Alterações em determinados domínios de ROR2 podem levar a perda da função normal da proteína ou ainda uma atividade parcial prejudicando as vias onde ela atua (Liu *et al.*, 2008).

O mecanismo geral de ativação do gene *ROR2* funciona pela interação do ligante ao domínio de ligação extracelular estimulando a dimerização do receptor o que resulta na fosforilação da tirosina alvo o que leva ao recrutamento de proteínas sinalizadoras que ativam a cascata de sinalização intracelular (Schlessinger, 2000). Esses receptores possuem três domínios extracelulares: um domínio semelhante ao da imunoglobulina Ig-like, um domínio rico em cisteína e um domínio Kringle. Os dois domínios intracelulares que tem atividade de tirosina kinase são ricos em serina e treonina e um domínio rico em prolina, como mostrado na *Figura 1*.

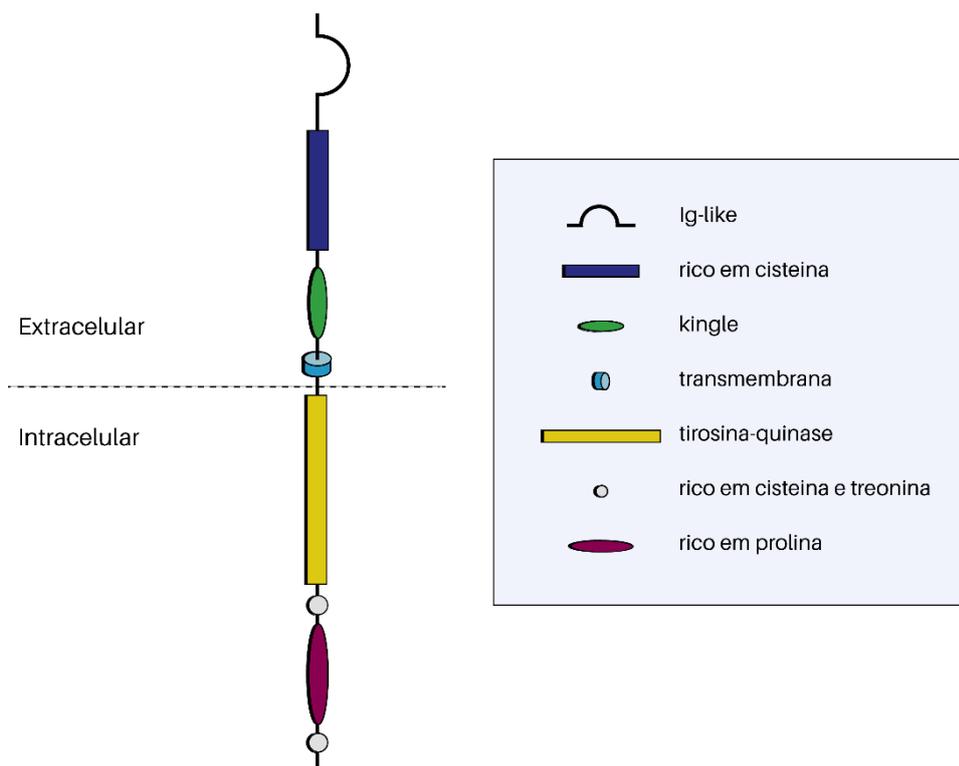


Figura I - Representação estrutural da proteína tirosina quinase ROR2 com apresentação de seus domínios extracelulares e intracelulares. Adaptado de Afzal e Jeffery, 2003.

O domínio rico em cisteína extracelular medeia a ligação de receptores FZD (members of the 'frizzled' gene family) e Wnts além de uma variedade de outras proteínas. As proteínas Wnts são uma família de 19 glicoproteínas que participam de processos biológicos vitais durante a embriogênese, entre eles, a proliferação celular, migração e autodiferenciação celular (Wodarz *et al.*, 1998; Huelsken e al., 2001).

O receptor ROR2 liga-se a várias proteínas Wnts das vias *canônica* e *não-canônica*, incluindo ligantes como WNT3A (Wnt Family Member 3A) e WNT5A (Hikasa *et al.*, 2002; Oishi *et al.*, 2003; Mikels e Nusse, 2006). Funcionalmente, ROR2 potencia ou inibe a sinalização Wnt *canônica*, dependendo do tipo de célula e da especificidade da proteína Wnt examinada (Billiard *et al.*, 2005). No entanto, é a interação entre ROR2 e o ligante WNT5A *não-canônico*, que recebeu a maior atenção nos últimos anos devido a camundongos *Ror2* *-/-* e *Wnt5a* *-/-* exibirem fenótipos semelhantes, incluindo nanismo, membros encurtados, anormalidades faciais, defeitos do septo ventricular do coração e anormalidade no desenvolvimento do pulmão (*Figura II*) (Oishi *et al.*, 2003).

Foi demonstrado que ROR2 é expresso por condrócitos da Anlagen cartilaginosa e da placa de crescimento. Em condrócitos de adultos, ROR2 é expresso na cartilagem da superfície das articulações e nos meniscos fibrocartilágenos do joelho (DeChiara *et al.*, 2000). Billiard *et al.* (2005) também observou que a expressão do RNAm de *ROR2* foi altamente regulada de forma bifásica durante a diferenciação de osteoblastos humanos, sendo praticamente indetectável em células-tronco pluripotentes, aumentando 300 vezes em preosteoblastos comprometidos e desaparecendo novamente em osteócitos. Além disso, a expressão de ROR2 em osteoblastos foi suprimida pelo antagonista Wnt. Tais dados sugerem que ROR2 pode regular a formação óssea.

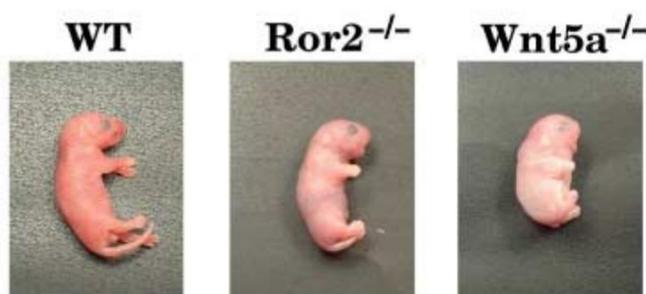


Figura II – Comparação de fenótipos de desenvolvimento em ratos *-/-* e *Wnt5a -/-*. Aparência geral do tipo selvagem (WT), *Ror2 -/-*, e *Wnt5a -/-* recém-nascidos. Tanto *ROR2 -/-* e *WNT5A -/-* recém-nascidos exibem nanismo, anormalidades faciais e membros e cauda encurtados. Adaptado de Oishi *et al.*, 2003.

Nomachi *et al.* (2008) demonstraram que ROR2 também tem papel fundamental na migração celular induzida por WNT5A, este ligante regula a formação de lamelopódios e a reorientação de microtúbulos. Essa resposta é medida pela ativação de JNK e só ocorre quando ROR2 está associado à proteína Filamin A (*FLN1*). Mutações no gene *FLN1* causam diversas doenças genéticas dentre elas a síndrome Oto-palato digital (MIM#311300), que compartilha diversos sinais clínicos com a RS. Tais dados apontam para a possibilidade de outros genes da via *WNT5A-ROR2* estarem envolvidos na etiologia de síndromes malformativas semelhantes a RS e, portanto, mutações nesses genes devem ser investigadas como responsáveis pela desordem.

I.4 ETIOLOGIA DA DRS

Os primeiros estudos em modelo animal mostraram que camundongos knockout para os genes *Wnt5a* e *Ror2* exibiam fenótipos semelhantes aos

encontrados em pacientes com RS, incluindo dimorfismo facial, hipoplasia mandibular, hipoplasia genital, encurtamento de membros e defeitos cardíacos. Estes trabalhos também indicaram que a sinalização não *canônica* de Wnt, que regula a direção de migração celular, era necessária para fusão do palato secundário durante o desenvolvimento embrionário (Oishi *et al.*, 2003; He *et al.*, 2008 e Person *et al.*, 2010).

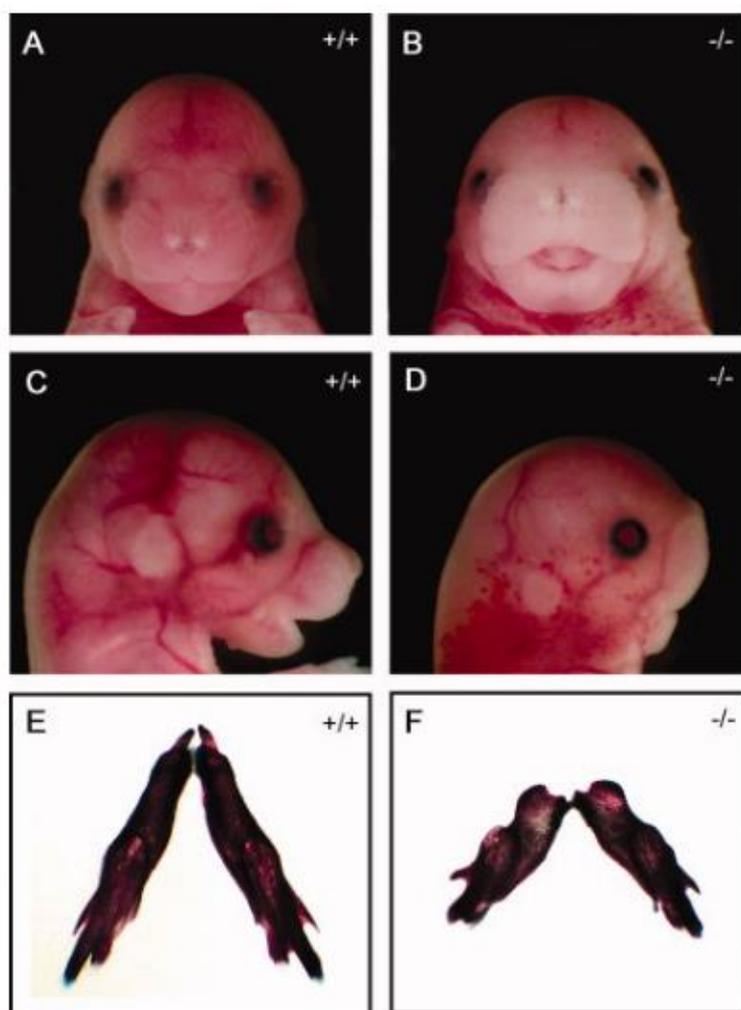


Figura III - Camundongos *Wnt5a*^{-/-} têm defeitos anatômicos fenotipicamente semelhantes a pacientes com síndrome Robinow autossômica dominante. Camundongos *Wnt5a*^{-/-} no estágio E16.5 (**B**) têm olhos amplamente espaçados (hipertelorismo) e uma boca triangular quando comparados aos controles (**A**). **C, D**: Vistas laterais revelam achatamento do perfil facial, micrognatia, e orelhas pequenas e baixas nos *Wnt5a*^{-/-} embriões (**D**) em comparação com irmãos controle (**C**). **E, F**: preparações esqueléticas no nascimento mostram hipoplasia mandibular em *Wnt5a* mutantes (**F**), em comparação com os controles (**E**). **G**: Porcentagem de resultados relatados em pacientes com síndrome Robinow dominante em comparação com fenótipos em camundongos *Wnt5a*^{-/-}. Adaptado de Person *et al.*, 2010.

Notando que os camundongos *Wnt5a*^{-/-} apresentam características semelhantes a RS (*Figura III*) e que o ligante *Wnt5a* interage com *Ror2*, gene este que está mutado na RRS, Person *et al.* (2010) analisaram o gene *WNT5A* em membros

afetados da família com DRS originalmente relatado por Robinow *et al.* (1969). Os pesquisadores identificaram uma mutação em heterozigose e patogênica no gene *WNT5A* além de uma outra mutação, não relacionada com a ocorrência esporádica do distúrbio, em um dos pacientes. Mutações no gene *WNT5A* não foram encontradas em mais 23 pacientes relacionados com um diagnóstico clínico da síndrome DRS, sugerindo heterogeneidade genética. Os ensaios de expressão funcional em embriões de peixe-zebra mostraram que as proteínas mutantes representavam alelos hipomórficos em vez de mutações dominante-negativas. Os resultados relacionam a via de genes *WNT5A/ROR2* com o desenvolvimento craniofacial, esquelético e genital humano.

Em membros afetados de outras 3 famílias com DRS, Roifman *et al.* (2015) identificam duas diferentes mutações missense heterozigóticas no gene *WNT5A*. Embora mutações heterozigóticas no gene *WNT5A* já tivessem sido descritas em todos os membros afetados das duas famílias previamente observadas por Person *et al.* (2010), os casos apontavam mutações herdadas, portanto, faltava a prova de que estas mutações genéticas fossem a causa real da condição nestes indivíduos. As famílias 1 e 2, do trabalho de Roifman *et al.*, são os primeiros relatos de mutações *de novo* no gene *WNT5A* associadas com a DRS na ausência de outros genes candidatos identificados por todo o sequenciamento de exoma. Isto confirma que o gene *WNT5A* é causador da DRS nas famílias estudadas.

Neste mesmo estudo, Roifman *et al.* (2015) observaram que todas as famílias RS com mutações em *WNT5A* teriam um clássico tipo de DRS, enquanto que vários pacientes menos tipicamente afetados testados (com nanismo com encurtamento de membros sem padrão mesomélico, menos dimorfismo facial típico e/ou ausência de hipoplasia genital) não apresentaram tais mutações.

O gene *WNT5A* está localizado no braço curto do cromossomo 3, 3p21-p14, nas posições 55.465.714 - 55.505.260 pares de base (hg 19). Faz parte da família dos genes *Wnt*, que codificam proteínas de sinalização com atividade de regulação dos eventos morfogênicos, padronização (patterning) durante a embriogênese, diferenciação celular, crescimento, migração e oncogênese (Oishi *et al.*, 2003). No modelo de homologia do gene *WNT5A* proposto por Roifman *et al.* (2015), todas as quatro mutações relacionadas a DRS pareciam estar localizadas no mesmo lado da proteína 104, que é palmitolado. É possível que mutações nestes resíduos alterem a

estrutura da superfície e, assim, afetem as interações com outras proteínas na via de Wnt.

A atividade de sinalização intracelular do ligante WNT5A ocorre a partir do complexo receptor-ligante com os receptores FZD e ROR2. O receptor ROR2 está envolvido com o fenótipo encontrado em pacientes na forma recessiva, as proteínas Wnt ligam-se diretamente ao seu domínio rico em cisteína extracelular. Essa interação entre o receptor e as proteínas Wnt desencadeia uma de via de transdução de sinal, que tem atividade no desenvolvimento craniofacial e esquelético, da qual participam muitas outras proteínas (Nusse *et al.*, 2005).

Os relatos que relacionam as mutações *de novo* em *WNT5A* com a DRS confirmam que as mutações neste gene são uma importante causa para a DRS. Porém, a maioria dos indivíduos clinicamente diagnosticado com DRS não têm ainda mutações em genes com uma conhecida associação com esta desordem, como o *ROR2* e o *WNT5A*. Diante deste cenário, uma grande parcela de pacientes com RS permanecem sem um diagnóstico molecular definido. Entretanto, é possível que a maioria dos indivíduos afetados tenham mutações em genes distintos potencialmente envolvidos na mesma via de sinalização Wnt (White *et al.*, 2015).

A forma da RS causada por mutações no gene *WNT5A* foi recentemente classificada como síndrome de Robinow autossômica dominante do tipo 1 (DRS1 MIM#180700) (OMIM). Estudos mais recentes sugerem que, além das mutações já conhecidas, alterações nos genes *DVL1* (DRS2 MIM#616331) e *DVL3* (DRS3 MIM#616894), codificantes das proteínas Dishevelled, localizadas à *downstream* da via de sinalização *WNT5A-ROR2*, também podem estar relacionadas a fenótipos semelhantes à de pacientes com DRS (White e cols., 2015; Bunn *et al.*, 2015 e White *et al.*, 2016). Tais achados reforçam a hipótese de que mutações nesta via podem levar a fenótipos semelhantes.

I.4.1 Os genes *DVL1* e *DVL3*

Os sinais clínicos observados entre os pacientes diagnosticados com RRS e suas alterações genéticas relacionadas à RS apresentam uma maior homogeneidade quando comparados aos pacientes com DRS. Em busca de novos genes candidatos para a DRS White e cols., 2015 sequenciaram o exoma de quatro pacientes, e de seus progenitores, com diagnóstico clínico de DRS. O sequenciamento revelou

mutações no gene *DVL1* em três dos pacientes estudados. Na segunda fase do estudo mais 62 indivíduos com fenótipo similar à DRS tiveram seu genoma investigado para mutações no gene *DVL1*. Ao todo, seis mutações diferentes no *DVL1* foram identificadas em 11 dos pacientes pesquisados.

O *DVL1* (dishevelled segment polarity protein 1) é um gene que codifica um dos três ortólogos humanos da proteína Dishevelled em drosophila (*dsh*). Esta proteína tem seu nome derivado da interrupção na polaridade de cerdas de cabelo causada por sua mutação. A dishevelled de drosophila tem uma isoforma, ao passo que os mamíferos têm três (*DVL1*, 2, e 3 em seres humanos), no entanto, a estrutura básica de cada *DVL* é fortemente conservada entre seus parálogos (Yokoyama *et al.*, 2010 e Schwarz-Romond *et al.*, 2007).

A proteína *dsh* é componente importante das vias de sinalização Wnt e desempenha papel tanto na via *canônica* quanto *não-canônica*. Muitas vezes, as *DVLS* são descritas como proteínas "scaffold-like", que atuam diretamente downstream do receptor Wnt transmembrânico (geralmente um FZD, mas às vezes um LRP ou ROR2) (Lee *et al.*, 2008).

A ligante solúvel extracelular *WNT5A* é reconhecida pelo ROR2, e, juntos, eles empregam a família *DVL* para transdução de sinal que ativa a via Wnt *não-canônica* (Komiya e Habas, 2008). O gene *DVL1* está localizado no braço curto do cromossomo 1, 1p36.33, e codifica uma fosfoproteína citoplasmática reguladora da proliferação celular, atuando em processos do desenvolvimento, incluindo a segmentação e a especificação de neuroblastos. A estrutura do gene *DVL1* compreende 15 exons, entretanto, todas as variantes patogênicas relatadas têm sido encontradas no exon 14. Estudos funcionais das variantes encontradas não foram realizados, mas uma pesquisa em células de dois pacientes com mutações nesse exon mostraram que proteínas truncadas foram expressas (White *et al.*, 2015).

Bunn *et al.* 2014 identificou três mutações heterozigóticas diferentes no gene *DVL1* em outros três pacientes que apresentavam um tipo esporádico de RS com osteoesclerose atípica (RS-OS). Tais indivíduos apresentavam manifestações clínicas de RS dominante com dismorfismo facial característico (hipertelorismo marcado, nariz curto, boca larga e hipoplasia do terço médio da face), camptodactilia e braquidactilia, fenda palatina e anomalias dentárias. Mesomelia, outro achado comum da RS, variou de leve a ausente nestes indivíduos. As radiografias revelaram osteoesclerose do

crânio, que foi particularmente proeminente na base do crânio. Os pais de todos os três indivíduos eram clinicamente normais. Os resultados deste estudo mostraram que as mutações no gene *DVL1* resultaram na terminação prematura da proteína e na adição de uma sequência C-terminal anormal, altamente básica. A análise das células de um dos doentes mostrou que a mutação (c.1519del; 601365,0004) foi traduzida para uma proteína estável e não degradada pelo decaimento do RNAm mediado por mutações *nonsense*. Os estudos *in vitro* mostraram que a expressão celular da co-transfecção com a mutação *DVL1* de tipo selvagem resultou num aumento da atividade *Wnt canônica*. Assim, a RS parece ser resultado da desregulação da via que envolve os genes *WNT5A*, *ROR2*, *DVL* (White *et al.*, 2015).

Quanto à observação das manifestações clínicas, o fenótipo dos indivíduos com mutações *DVL1* é concordante com as descrições clínicas anteriores relacionadas a DRS. Entre elas, características faciais típicas, anomalias dentárias e mesomelia que foram observadas em 100% dos indivíduos relatados. Em contraste com os indivíduos portadores de mutações no gene *WNT5A*, que possuíam estatura normal, apenas 75% dos indivíduos com mutações em *DVL1* apresentaram essa característica. Outro diferencial possível entre os dois tipos de DRS é macrocefalia observada em 100% dos indivíduos com mutações no *DVL1*. Além de que, em alguns pacientes com mutação no gene *DVL1* foi observada osteoesclerose (White *et al.*, 2015; Bunn *et al.*, 2015).

Devido à natureza uniforme das variantes encontradas em *DVL1*, relacionadas a RS, e à redundância funcional de seus homólogos *DVL2* e *DVL3*, White *et al.* (2016) elegeram tais genes para dar prosseguimento ao sequenciamento de seus penúltimos exons, procurando por potenciais variantes relacionadas à síndrome. O estudo, realizado em 34 indivíduos com possível diagnóstico clínico de RS, foi executado a partir do sequenciamento direto de Sanger dos penúltimo e último exons dos genes *DVL1*, *DVL2* e *DVL3* onde foi identificado um paciente com uma deleção de 1pb dentro do exon final do gene *DVL3*. Curiosamente, estudos mostram que o C-terminal de *DVL3* e suas repetições de único aminoácido 637,638 e 647,648 são essenciais para a ativação *WNT5A* da via *não-canônica* (Li Ma *et al.*, 2010).

Subsequentemente, o sequenciamento dos penúltimo e último exons destes genes foi realizado em mais 17 casos de RS a partir de um banco de dados próprio. Novamente, identificou-se quatro pacientes com mutações no gene *DVL3*, incluindo

duas deleções de 1 pb, duas mutações no sítio de splicing e uma mutação em *DVL1* em mais um dos pacientes (White *et al.*, 2016).

Dentre os pacientes testados que correspondiam ao quadro clínico de RS, cinco possuíam variações no penúltimo exon do gene *DVL3* e um indivíduo possuía variação no gene *DVL1* (White *et al.* 2016).

A investigação a cerca dos transcritos mutantes e os do tipo selvagem do gene *DVL3* revelou que ambos foram expressos em uma linhagem celular de linfoblastóides, assim como observado anteriormente em *DVL1*. O gene *DVL3* que também estava mutado não mostrou alterações na expressão de mRNA. Em conjunto, estes dados suportam a previsão de que as mutações em *DVL3* escapam à NMD (White *et al.*, 2016).

Em camundongos, *Dvl1* e *Dvl3* se co-localizam dentro do tubo neural em desenvolvimento, ademais todas as três proteínas *Dvl* possuem padrão de localização semelhante. Enquanto o camundongos *Dvl1* *-/-* possuem um fenótipo leve incluindo anomalias sociais, camundongos *Dvl2* *-/-* e *Dvl3* *-/-* demonstram, de forma independente, letalidade parcial e defeitos conotrunciais. Duplo knockout de *Dvl1* e *Dvl2* ou *Dvl2* e *Dvl3* resultam em defeitos no tubo neural, sugerindo papéis redundantes entre estes homólogos. No entanto, camundongos *Dvl1* *-/-* e *Dvl3* *-/-* não apresentam defeitos no tubo neural, indicando divergência funcional entre os homólogos *Dvl* (Etheridge *et al.*, 2008; Lijam *et al.*, 1997 e Hamblet *et al.*, 2002).

O fenótipo clínico de indivíduos portadores de mutações no gene *DVL3* é semelhante ao de indivíduos com mutações em *DVL1* e concordante com as descrições clínicas de DRS previamente identificadas. A macrocefalia foi observada em dois dos quatro indivíduos com mutações em *DVL3*, portanto, essa característica não pode ser usada para distinguir pacientes com RS mediados por *DVL1* e *DVL3*. Vale ressaltar que todos os indivíduos com mutações em *DVL3* possuem baixa estatura, enquanto indivíduos com mutações em *DVL1* apresentam uma estatura final normal (White *et al.*, 2016).

Considerando que grande parte dos pacientes com diagnóstico clínico de RS, principalmente da DRS, permanecem sem uma etiologia molecular definida, a elucidação e a confirmação de mutações gênicas relacionadas a esta desordem são imprescindíveis para a melhor compreensão da síndrome e para o estabelecimento

de uma correlação entre o fenotipo e o genótipo dos afetados. Como já elencado, as mutações até o momento encontradas estão todas relacionadas à via de sinalização WNT5A/ROR2/DVL. Desta forma, a investigação de mutações em genes que codificam proteínas atuantes nessa via, contribuem para a compreensão do papel desta sinalização nos processos biológicos que estão alterados em indivíduos acometidos pela RS.

I.5 VIA DE SINALIZAÇÃO WNT

Na medicina molecular moderna, muito esforço tem sido feito para se desvendar das vias de sinalização e os mecanismos moleculares que controlam o desenvolvimento de um organismo. Este esforço é enraizado na ideia de que a compreensão dos mecanismos que controlam desenvolvimento normal pode aumentar exponencialmente nossas possibilidades de evitar e tratar as patologias pleiotrópicas que surgem quando esses mecanismos estão desregulados. Uma via chave que tem recebido muita atenção pela sua diversificada função no desenvolvimento e sua alta complexidade é a via de transdução de sinal Wnt (Komiya e Habas, 2008).

A via de sinalização Wnt é uma via conservada em animais metazoários. As proteínas Wnt regulam uma variedade de processos celulares, incluindo especificação autônoma, motilidade, polaridade, formação do axis primário e organogênese (Komiya e Habas, 2008). A desregulação da via Wnt tem consequências catastróficas para o desenvolvimento do embrião, além de ser um fator causal de uma série de patologias pleiotrópicas humanas. Estas patologias incluem câncer de mama, cólon e pele, defeitos do esqueleto e distúrbios de defeitos no nascimento, além de espinha bífida (Nusse, 2005). Estudos sugerem que vários membros da via Wnt são expressos durante o desenvolvimento craniofacial e de membros em múltiplos sistemas modelo (Sisson e Topczewski, 2009; Geetha-Loganathan *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010; Nohno *et al.*, 1999; Visel *et al.*, 2007).

O sinal *Wnt* extra-celular estimula várias cascatas de transdução de sinal intracelular, o que inclui a *via canônica*, ou dependente de β -catenina, e a *via não-canônica*, ou β -catenina-independente que possui dois ramos, a *via de Polaridade Planar Celular* (PCP) e a *via dependente de cálcio* (Wnt/Ca²⁺) (Niehrs, 2012).

A *via canônica* de sinalização Wnt tem como papel principal ativar a proliferação e mudar o destino celular (Heisenberg *et al.*, 2000). Já os produtos das cascatas *não-canônicas* regulam, principalmente, rearranjos do citoesqueleto e a migração celular durante o desenvolvimento (Niehrs, 2012).

No metabolismo ósseo, a via Wnt é bem conhecida. Em termos gerais, a *via canônica* está associada a regulação da massa óssea e as *vias não canônicas* PCP e Wnt/Ca²⁺ estão relacionadas com a padronização esquelética e com alguns aspectos de “mechanosensing”, respectivamente. O funcionamento dessa via é fundamental na osteoblastogênese e osteoclastogênese, interferências na atuação do receptor ROR2, localizado no ramo PCP da via Wnt *não-canônica*, podem influenciar no desenvolvimento do esqueleto durante a embriogênese, como relatado nos diagnósticos dos pacientes com a RRS (Bunn *et al.*, 2015). Assim, o estabelecimento de polaridade celular planar é vital para o desenvolvimento de vertebrados com mutações humanas ligadas a defeitos de esqueleto.

A embriogênese é um processo complexo, em que uma única célula prolifera e dá origem a células altamente especializadas que se desenvolvem em tecidos específicos e órgãos de um organismo vivo. Isto é possível através de vários eventos de sinalização, diferenciação celular e movimentos celulares combinados. No processo de gastrulação, que ocorre durante o desenvolvimento embrionário, verifica-se quatro tipos de movimentos celulares de regiões específicas: invaginação, involução, epibolia e movimentos de extensão convergente (CE) (Brinkmann, 2015).

Os movimentos CE, ocorridos durante a gastrulação, demonstraram estar alterados em pacientes com a RS. Ademais, a via Wnt β -catenina independente (*não-canônica*), particularmente a via PCP, é uma importante reguladora desses movimentos. (Schambony and Wedlich, 2007; Seitz *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 1996; Veeman *et al.*, 2003; Wallingford *et al.*, 2002).

Proteínas Wnts como as Frizzleds (FZDs), as Dishevelleds (DVLs) e outras proteínas PCP têm sido diretamente relacionadas a regulação de movimentos CE em anfíbios, peixes e mamíferos. (Djiane *et al.*, 2000; Heisenberg *et al.*, 2000; Carreira-Barbosa *et al.*, 2003; Kilian *et al.*, 2003; Torban *et al.*, 2000; Moeller *et al.* 2006; Wang *et al.*, 2006a; Kim *et al.*, 2008). Além de que, relatórios recentes confirmam o envolvimento na via PCP de proteínas FZD e DVL regulando o direcionamento do axis mediado por Wnt (Shafer *et al.*, 2011; Shimizu *et al.*, 2011).

Aparentemente, os componentes participantes da via Wnt que, até o momento, demonstraram estar associados ao desencadeamento de fenótipos semelhantes a RS, participam de ambas as *vias canônica e não-canônica*. No entanto, é justamente a interação alterada entre o receptor ROR2 e o ligante WNT5A *não-canônico* que demonstrou, a partir do modelo animal, ter participação na etiologia da desordem (Schwabe *et al.*, 2004). Ainda, estudos apontam o ramo PCP, como componente importante na cascata de sinalização que envolve o receptor *não-canônico Wnt5a* no desenvolvimento esquelético de membros (Wang *et al.*, 2010).

As proteínas Wnt geralmente ligam-se a um receptor de membrana FZD e à um co-receptor de baixa densidade relacionado a lipoproteína 5/6 (LRP5/6), o que resulta em alterações na transcrição de genes alvo. As proteínas FZD e LRP5/6 são as proteínas receptoras ligantes de Wnts mais amplamente descritas, mas não são as únicas (Hsieh *et al.*, 2004). O receptor ROR2, que demonstrou ser um receptor Wnt alternativo (Nusse, 2005), contém um homólogo CRD para encontrar o domínio Wnt de ligação, também observado em receptores FZD (Saldanha *et al.*, 1998). Pesquisas bioquímicas *in vitro* indicam o receptor ROR2 liga-se a WNT5A diretamente através do seu domínio CRD FZD-like, servindo como um co-receptor na que induz a cascata de sinalização (Oishi *et al.*, 2003).

O ligante WNT5A atua como um ligante solúvel extracelular que é reconhecido pelo ROR2, e, juntos, eles empregam os homólogos DVL para transduzir a via independente de β -catenina. A via PCP de sinalização inicia-se com uma interação entre WNT5A e ROR2, que agem isoladamente ou como um co-receptor, associado a uma FZD apropriada. Esta interação inicial conduz à polarização de uma extremidade proximal FZD-DVL-Diversin para o sinal e PRICKLE-VANGL distalmente, estabelecendo assim uma polaridade ao longo do eixo da célula (Gao e Chen, 2010). As Dishevelleds 1, 2, e 3 são unicamente essenciais para a ativação da via Wnt *não canônica* (Li Ma *et al.*, 2010). Assim, cada DVL, subsequente a sua polarização, interage com uma proteína de ligação GTP, RhoA, via DAAM1. Um estudo em *Drosophila* mostrou que DVL-RhoA ativados vão interagir com Drok (ROCK em seres humanos) que afeta a polimerização de actina (Winter *et al.*, 2001). DVLs também podem ativar uma outra pequena proteína de ligação GTP, Rac, a qual vai, por sua vez, ativar c-Jun kinase N-terminal (JNK), o que influencia na formação no

citoesqueleto de actina e na transcrição de genes. O mecanismo desta interação DVL-Rac ainda é desconhecido (Figura IV) (Rosso *et al.*, 2005).

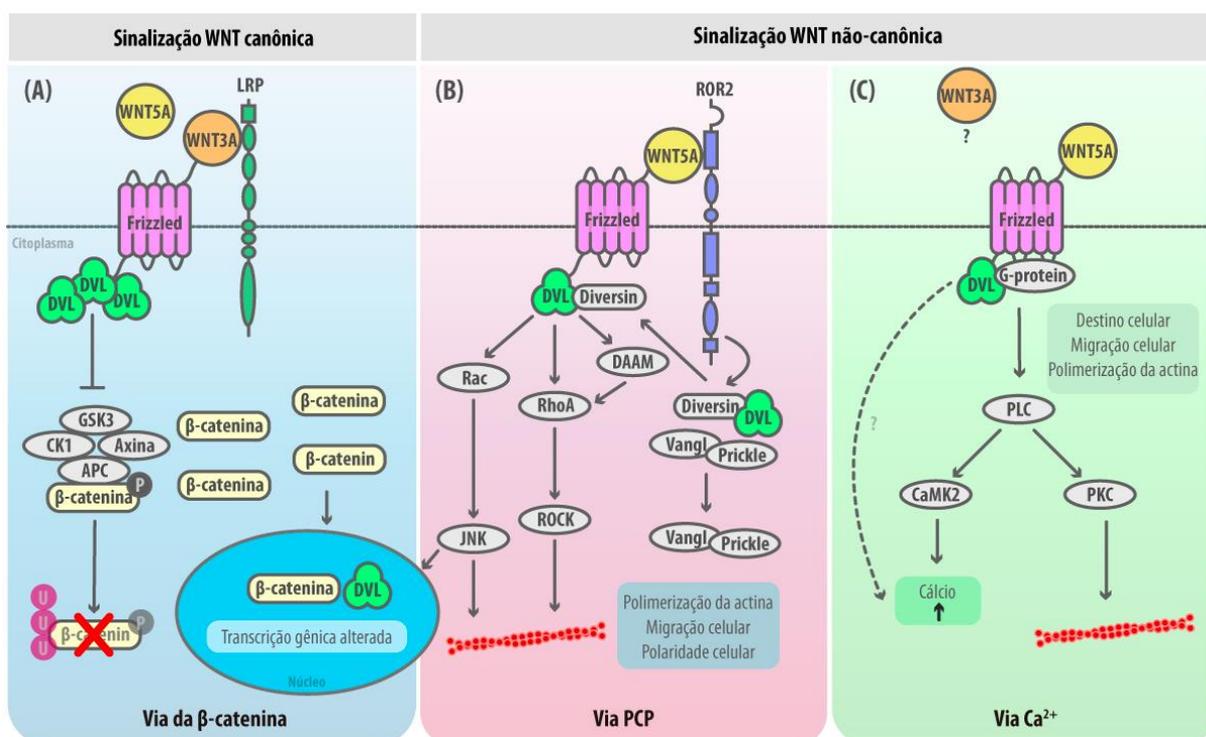


Figura IV - Visão global da via de sinalização Wnt. **(A) Via da β -catenina.** Na ausência de sinalização de Wnt, a β -catenina solúvel é fosforilada por um complexo de degradação constituído pelas kinases GSK3 β e CK1a e as proteínas de andaimos APC e Axina. A β -catenina fosforilada é alvo de degradação proteasomal após ubiquitação pelo complexo da proteína SCF. No núcleo e na ausência de β -catenina, a atividade do fator de transcrição TCF/LEF é reprimida; A indicação da sinalização *canônica* Wnt /FZD leva à fosforilação de DVL/Dsh, que por sua vez recruta Axin1 e GSK3 β adjacente à membrana plasmática, evitando assim a formação do complexo de degradação. Como resultado, a β -catenina se acumula no citoplasma e transloca para o núcleo, onde promove a expressão de genes alvo através da interação com fatores de transcrição TCF/LEF. **(B) Via PCP** (independente de β -catenina). Sua ativação ocorre através da ligação de Wnt a FZD e seu co-receptor. O receptor então recruta DVL, que usa seus domínios PDZ e DIX para formar um complexo DAAM1 (Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1). DAAM1 então ativa o pequeno Rho da proteína G através de um fator de troca de guanina. Rho ativa a kinase associada a Rho (ROCK), que é um dos principais reguladores do citoesqueleto. DVL também forma um complexo com Rac1 e medeia a adesão de profilina à actina. Rac1 ativa o JNK e também pode levar à polimerização da actina. A ligação de profilina à actina pode resultar na reestruturação do citoesqueleto e da gastrulação. Esta interação inicial também conduz à polarização de uma extremidade proximal FZD-DVL-DIVERSIN e PRICKLE-VANGL distalmente, estabelecendo assim uma polaridade ao longo do eixo da célula. **(C) Via Ca²⁺** (independente de β -catenina): A ativação dos receptores FZD desencadeia a liberação de cálcio que afeta múltiplos efetores a jusante, incluindo kinases dependentes de cálcio/calmodulina II (CamKII), proteína kinase C (PKC) e transcrição por fator nuclear de células T ativadas (NFAT). Adaptado de Bunn, 2015.

Em um estudo desenvolvido por Nishita *et al.* revelou-se que o receptor ROR2 também regula a polimerização induzida por WNT5A de DVL. Nesta regulação, ocorre a associação com FZD7, através do seu domínio extracelular rico em cisteína, para

formar um complexo receptor necessário para a regulação de DVL após a estimulação de WNT5A. A expressão suprimida da FZD7 resulta na inibição de polimerização induzida por WNT5A de DVL.

É importante ressaltar que tanto domínio DIX quanto o DEP de DVL são necessários para a polimerização DVL e subsequente ativação de AP-1 após a estimulação WNT5A, porém os diferentes conjuntos de DVL também parecem usar diferentes cascatas para ativar os diferentes ramos da via Wnt. Mutações deletérias no domínio DEP de DVL causam a disrupção em movimentos CE (Wallingford *et al.* 2002). A sobre-expressão de FZD7 também demonstrou inibir movimentos CE através de DVL. Além de FZD7, o receptor ROR2 pode associar-se com os receptores FZD não *canônicos* FZD2 e FZD5, para atuar como um co-receptor (Djiane *et al.*, 2000).

A proteína FZD2 tem sido associada a ambas as vias *canônica* e *não-canônica* de sinalização Wnt em células de mamíferos (Liu *et al.*, 1999; Ma e Wang, 2007; Verkaar *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2010). Estudos prévios reportaram que FZD2 é amplamente expressa no desenvolvimento da cabeça e membros em modelo animal (Sisson e Topczewski, 2009; Geetha-Loganathan *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010; Nohno *et al.*, 1999; Visel *et al.*, 2007). Isso mostra que, como outras proteínas Wnts, FZDs individuais podem sinalizar através de ramos independentes, dos quais alguns podem exigir DVL. Sendo assim, tanto FZDs quanto DVLs são componentes requeridos para a estabilização da via PCP em colaboração com a participação de sinalizadores completamente distintos (Vinson *et al.*, 1989).

A via WNT5A-ROR2 foi sugerida como constituinte de um ramo adicional não *canônico* da rede de sinalização Wnt, exigindo provavelmente fosfoinositida 3-kinase (PI3K), CDC42, MKK7 e JNK, para ativar sua sinalização, no lugar de RhoA e Rac1, que são ativadas por FZD7 (Schambony e Wedlich, 2007).

Mutações heterozigóticas em *SPECC1L*, gene que codifica uma proteína chave da via Wnt *não canônica*, foram descritas em pacientes com síndrome de Opitz G/BBB autossômica dominante. Esta síndrome possui diagnóstico diferencial com a RS, e apresenta sinais clínicos como dismorfias faciais, incluindo hipertelorismo, fissuras orais, anomalias cardíacas e geniturinárias (Kruszka *et al.*, 2015). Na síndrome de Hipertelorismo de Teebi, foram encontradas mais mutações em *SPECC1L*, está síndrome também apresenta algumas sobreposições fenotípicas com a RS, entre elas hipertelorismo, fissuras palpebrais elevadas, testa proeminente, ponte nasal larga e

deprimida e nariz curto (Bhoj *et al.*, 2015). Em um ensaio de reparação de feridas, o knockdown de *Specc1l* levou à adesão e migração defeituosa das células e à incapacidade das células de reorganizar seu citoesqueleto de actina em resposta a estímulos como Ca^{2+} e WNT5A (Nathan *et al.*, 2016).

Diferentemente da via Wnt *canônica*, que está largamente descrita, os ramos da via b-independente ainda não estão bem delimitados. A principal razão para isso é o fato de que a sinalização de β -catenina independente permanece relativamente pouco caracterizada a nível molecular. Como resultado, nos falta informações robustas na literatura para investigar a via Wnt não *canônica*. Felizmente, estamos ganhando cada vez mais compreensão dos componentes moleculares envolvidos e no desenvolvimento de eventos controlados pela sinalização Wnt alternativa.

Sabe-se que a via Wnt de sinalização *não-canônica* está envolvida em orquestrar a migração celular e morfogênese de tecidos, incluindo movimentos CE na gastrulação de vertebrados. Coletivamente, a RS parece ser um resultado da desregulação na via de genes *WNT5A-ROR2-DVLS*. Esse desajuste envolve diferentes proteínas que, certamente, alteram o desenvolvimento embrionário. Uma vez que a maioria dos afetados pela RS permanece sem um diagnóstico molecular definido, mutações em genes distintos que codificam proteínas constituintes deste ramo da via Wnt, tornam-se fortes candidatos a causarem esta desordem.

II. Objetivo

Este estudo teve como objetivo identificar mutações em genes envolvidos com o fenótipo de pacientes com DRS e contribuir com a integração de suas características fenotípicas em uma caracterização clínica mais ampla da RS.

III.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. A partir do sequenciamento Sanger, investigar mutações nos genes *DVL1* e *DVL3* em pacientes com DRS.
2. Identificar novos genes que possam estar envolvidos no fenótipo DRS através do sequenciamento de exoma (WES).
3. Caracterizar clinicamente os pacientes em estudo e comparar a frequência de seus sinais clínicos.
4. Identificar características clínicas consistentes entre os casos em estudo e relaciona-las aos genes alterados.
5. Determinar características clínicas que possam discriminar os genes envolvidos na DRS para contribuir com um diagnóstico específico.

III. Materiais e Métodos

III.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES PARA ESTUDO

Foram selecionados 11 pacientes com características clínicas de DRS 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). Parte dos pacientes deste estudo também fizeram parte do trabalho do aluno Pedro Guilherme Alves Rodrigues.

III.1.1 Coleta de Material Biológico

As amostras de sangue foram obtidas por punção venosa, em tubos de coleta com sistema a vácuo e EDTA como anticoagulante. Apenas um paciente teve amostra de saliva coletada.

III.2 TRIAGEM DE MUTAÇÕES

A pesquisa de mutações foi realizada por sequenciamento Sanger direto em todos os pacientes com a forma dominante da síndrome no nosso laboratório de Genética Clínica da FM-UnB. O sequenciamento das regiões codificantes do gene *DVL1* e *DVL3* foi realizado utilizando sequenciamento Sanger. Os pacientes que não obtiveram resultados positivos para alterações nos genes já conhecidos foram submetidos à análise de exoma para identificação de novos genes candidatos.

III.2.1 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.2.2 PCR- Reação em cadeia pela polimerase

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 II - Primers utilizados para amplificação da região codificante do gene *DVL1*. Cada par de primer amplifica um exon do gene *DVL1* ou parte dele.

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

Tabela III - Primers utilizados para amplificação da região codificante do gene *DVL3*. Cada par de primer amplifica um exon do gene *DVL3* ou parte dele.

Exon	Sequência
14F	5' - ACCAGGGTCTCTCTCATCCA – 3'
14R	5' - AAGACGGACGGATGGAGAGA – 3'
15F	5' - ACCAGGGTCTCTCTCATCCA – 3'
15R	5' - AAGACGGACGGATGGAGAGA – 3'

III.2.3 Sequenciamento Sanger

A purificação das amostras para sequenciamento foi realizada com kit Illustra™ ExoProStar™. O sequenciamento Sanger foi realizado todos os pacientes participantes da pesquisa. Para o sequenciamento Sanger foi utilizado o sequenciador ABI 3130XL da Applied Biosystems, no Laboratório de Biotecnologia do Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, seguindo o protocolo de sequenciamento de rotina do laboratório.

III.2.4 Clonagem

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

III.2.5 Sequenciamento completo de Exoma (WES)

As amostras de DNA remanescentes de indivíduos "não resolvidos" que não possuíam variantes patogênicas em *DVL1* ou *DVL3* foram submetidas ao WES. Todo o sequenciamento de exoma foi realizado pela equipe do Centro Baylor-Hopkins pela iniciativa Mendelian Genomics em Houtoun-Estados Unidos, os resultados obtidos pela técnica de WES foram discutidos em parceria com nosso grupo de pesquisa do laboratório de Genética Clínica da FM-UnB.

O WES foi realizado no BCG-HGSC, 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 95 x. A escolha do software de anotação variante 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 mutações *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 utilizando XHMM (Fromer, M. *et al.*, 2012) e um algoritmo desenvolvido internamente na Baylor para detectar deleções homólogas exônicas, HMZDeFinder (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

com ExoSAP-IT (Affymetrix) e sequenciados com sequenciamento Sanger de di-desoxi-nucleótido no Seqüenciamento de DNA e Núcleo de vetor de genes na Faculdade de medicina de Baylor.

IV. Resultados e discussão

O presente estudo teve como um de seus objetivos detectar mutações relacionadas ao fenótipo de pacientes com DRS. Como resultado, identificamos variantes herdadas e *de novo* em quatro diferentes genes diretamente relacionados a via de sinalização *Wnt não-canônica*.

IV.2 PESQUISA DE MUTAÇÕES NOS GENES *DVL1* E *DVL3* POR SEQUENCIAMENTO SANGER

A partir da análise de sequenciamento Sanger, foram identificadas mutações em *DVL1* em quatro dos pacientes estudados e, em um paciente, foi observada uma mutação no gene *DVL3*. A descrição clínica destes pacientes se encontra em sessão subsequente.

Os pacientes com mutação no gene *DVL1* (caso 01, 02, 03 e 04) apresentam variantes que afetam o exon 14 de *DVL1*, causando uma mudança no quadro de leitura deste gene, isto é, preditando a alteração da estrutura de leitura de tradução da extremidade C-terminal da proteína *DVL1*. Estas mutações não estão presentes em nenhum banco de dados público disponível e foram classificadas como patogênicas. Na *Figura V* estão representados segmentos dos eletroferogramas dos pacientes com mutação em *DVL1*.

O primeiro resultado positivo para mutações no gene *DVL1* foi observado no paciente 01, que teve sua mutação identificada pela mudança de fase no eletroferograma como mostra a *Figura V (A)*. A clonagem dos fragmentos ainda não foi concluída, portanto a posição exata da mutação não pôde ser confirmada. A análise *in silico* sugere uma deleção de 13pb. Na paciente 02 também identificamos uma deleção de 13 pares de bases, a clonagem de fragmentos revelou a posição c.1496_1508; (p.Pro499_Argfs*146).

O terceiro resultado positivo para mutações no gene *DVL1* foi observado no paciente 03 onde foi identificada mais uma deleção de 13 pares de bases na posição c.1505_1517 (p.His502_Profs*143), confirmada pela clonagem do fragmento.

O paciente 04 também teve resultado positivo para mutações no gene *DVL1*, porém a alteração no quadro de leitura neste paciente se deu por uma inserção de 5 pares de bases na posição c.1612_1616 (p.Ser539_Argfs*112).

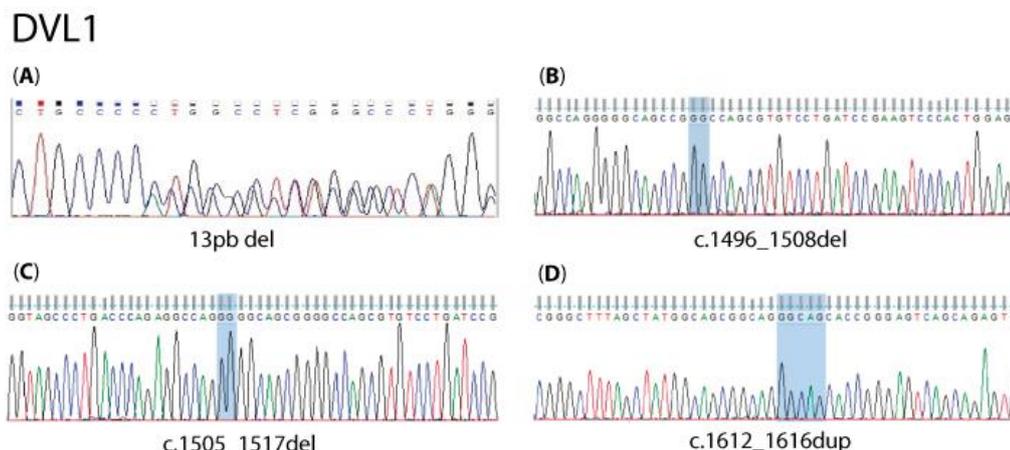


Figura V – Segmentos de eletroferogramas do sequenciamento Sanger do gene *DVL1* nos pacientes 01, 02, 03 e 04. **A:** Deleção de 13 pares de base no exon 14 no paciente 01 causando mudança no quadro de leitura. **B:** Deleção de 13 pares de bases no exon 14, posição c.1496_1508 no paciente 02, causando mudança no quadro de leitura. **C:** Deleção de 13 pares de bases na posição c.1505_1517 no exon 14 causando mudança no quadro de leitura, paciente 03. **D:** Inserção de 5 pares de bases na posição c.1612_1616 do exon 14 do paciente 04 causando mudança no quadro de leitura.

A análise de sequenciamento Sanger do DNA do paciente do caso 05 identificou uma variante patogênica no gene *DVL3*. A deleção de 1 par de base na posição c.1617 (p.Gin539_Hisfs*129) afeta o exon 14 do gene *DVL3*. Esta variante causa uma mudança no quadro de leitura durante a transcrição do C-terminal na proteína DVL3, resultando em possíveis consequências patogênicas.

Para confirmar a mudança no quadro de leitura, a deleção de 1pb no paciente 1 foi clonada e ambos os alelos foram sequenciados independentemente. O resultado pode ser conferido na *Figura VI*.

DVL3

Aaron Hayes

NM_004423.3:c.1617delG
Chr3:g.183887912delG

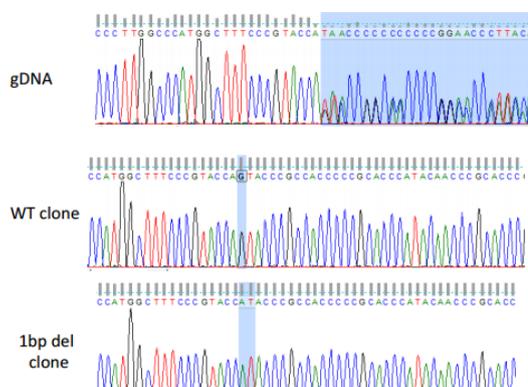


Figura VI – Segmentos de eletroferogramas do sequenciamento Sanger do gene *DVL3* no paciente 05. Deleção de 1 par de base na posição c.1617 afetando o exon 14 e causando mudança no quadro de leitura.

Em conformidade com estudos anteriores da DRS mediada por *DVL3* (DRS3), esta variante, localizada no penúltimo exon, está prevista a mudar o quadro de leitura e gerar um códon de terminação prematuro no último exon.

Os alelos truncados altamente uniformes em dois dos homólogos humanos do gene Dishevelled de *Drosophila*, codificados por *DVL1* e *DVL3*, são talvez a principal causa da DRS. Até o momento haviam sido descritas, de acordo com o GenBank, 12 mutações no gene *DVL1* e cinco mutações no gene *DVL3* relacionadas com a síndrome, como mostra o *Quadro I*. Comparando os nossos resultados com os anteriormente descritos, observamos que nenhuma das mutações encontradas em nosso trabalho havia sido reportada na literatura.

Quadro I – Descrição de mutações nos genes *DVL1* e *DVL3* em pacientes com DRS.

Paciente	Gene	Exon alterado	Tipo de mutação	Variação de bases	Origem geográfica
Caso 01	DVL1	14	Frameshift	?	EUA
Caso 02	DVL1	14	Frameshift	c.1496_1508del	Inglaterra
Caso 03	DVL1	14	Frameshift	c.1505_1517del	Argentina
Caso 04	DVL1	14	Frameshift	c.1612_1616dup	EUA
White <i>et al.</i> 2015	DVL1	14	Frameshift	c.1505_1517delACCC GGCTGCCC	Dinamarca
White <i>et al.</i> 2015	DVL1	14	Frameshift	c.1505_1517delACCC GGCTGCCC	EUA
White <i>et al.</i> 2015	DVL1	14	Frameshift	c.1508delC	Portugal
White <i>et al.</i> 2015	DVL1	14	Frameshift	c.1508delC	Portugal
White <i>et al.</i> 2015	DVL1	14	Frameshift	c.1519delT	-
Bunn <i>et al.</i> 2015	DVL1	14	Frameshift	c.1519delT	EUA
White <i>et al.</i> 2016	DVL1	14	Frameshift	c.1522delC	-
White <i>et al.</i> 2015	DVL1	14	Frameshift	c.1529delG	EUA
Bunn <i>et al.</i> 2015	DVL1	14	Frameshift	c.1562delC	Nova Zelândia
White <i>et al.</i> 2015	DVL1	14	Frameshift	c.1570_1571delC	EUA
Bunn <i>et al.</i> 2015	DVL1	14	Frameshift	c.1576_1583delG	-
Caso 05	DVL3	14	Frameshift	c.1617delG	EUA
White <i>et al.</i> 2016	DVL3	14	Frameshift	c.1585delG	-
White <i>et al.</i> 2016	DVL3	15	Frameshift	c.17152A>G	-
White <i>et al.</i> 2016	DVL3	15	Frameshift	c.17151G>A	-

Quadro I - Continua

Paciente	Gene	Exon alterado	Tipo de mutação	Varição de bases	Origem geográfica
White <i>et al.</i> 2016	DVL3	15	Frameshift	c.1716delC	-
White <i>et al.</i> 2016	DVL3	15	Frameshift	c.1749delC	-

Quadro I – Nas linhas em cinza estão representadas as mutações encontradas no presente trabalho e nas linhas brancas aquelas reportadas na literatura em pacientes com a forma autossômica dominante da síndrome de Robinow. Dados obtidos de White *et al.*, 2015 e 2016 e Bunn *et al.*, 2015.

A *Figura VII* demonstra a distribuição uniforme de todas as variantes de *DVL1* e *DVL3* já relatadas. A tradução do alelo mutante no paciente 05 prevê que a variante irá escapar a NMD e gerar um C-terminal truncado a partir da mudança de -1 no quadro de leitura. Todas as variantes estão localizadas dentro de uma faixa de aproximadamente 110 nucleotídeos no penúltimo exon. O alelo mutante está previsto para encontrar um codon de parada e gerar um C-terminal mutante altamente básico, rico em prolina.

Devido a redundância funcional e a localização uniforme das variantes encontradas em *DVL1* e *DVL3*, a mesmas consequências geradas pelas mutações na proteína de *DVL1* podem acontecer em *DVL3* (White *et al.*, 2016).

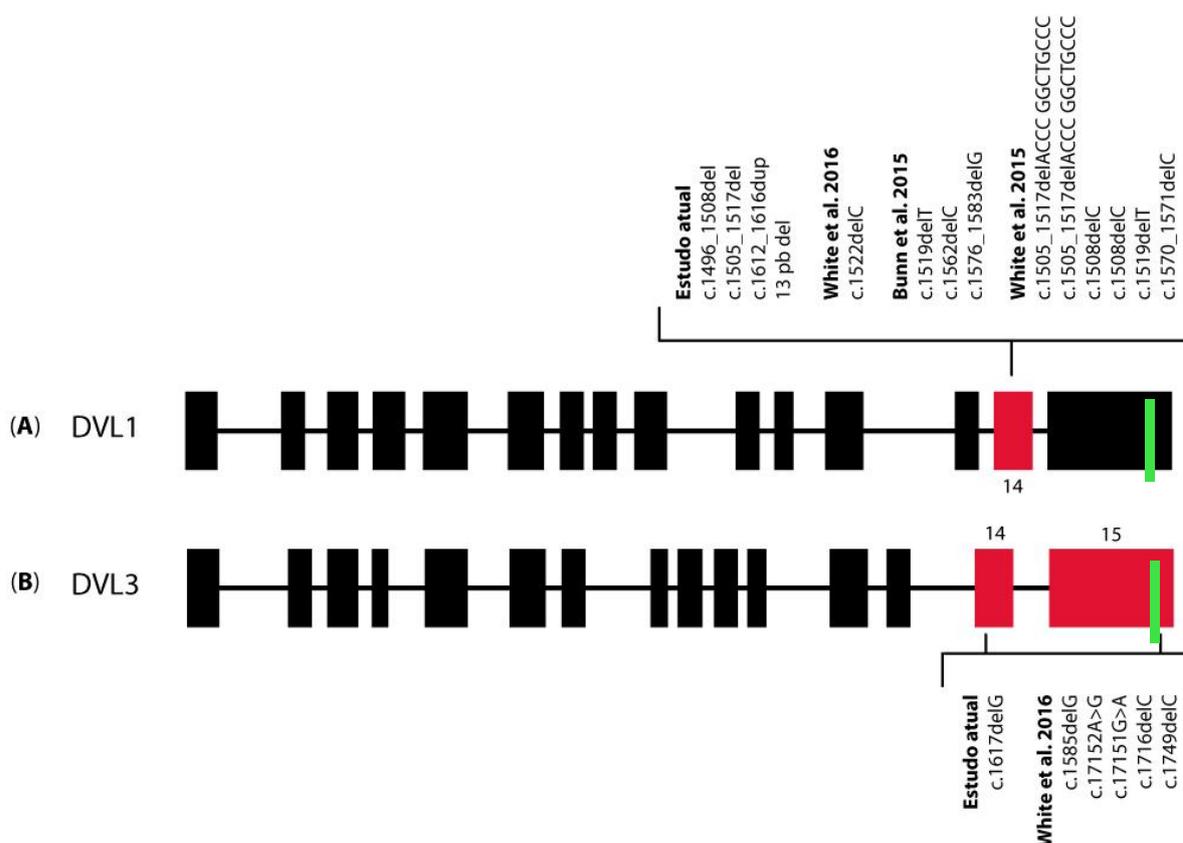


Figura VII – Localização uniforme das variantes *DVL1* e *DVL3* relacionadas a síndrome de Robinow. Todas as variantes se encontram no último e penúltimo exon e resultam na mudança do quadro de leitura destes genes. Em preto os exons que não estão descritos para estarem alterados na RS, em

vermelho os exons mutantes e em verde a indicação aproximada da região C-terminal altamente conservada prevista para estar truncada em pacientes com mutação nestes genes. **A**: Localização aproximada das variantes encontradas em nosso estudo e daquelas descritas na literatura para o gene *DVL1*. Dados obtidos de White *et al.*, 2015 e 2016 e Bunn *et al.*, 2015. **B**: A localização aproximada das variantes encontradas em nosso estudo e daquelas descritas na literatura para o gene *DVL3*. Dados obtidos de White *et al.*, 2016.

O C-terminal de DVL é uma das partes mais variáveis das proteínas DVL, sendo que o DVL3, em particular, mostra uma série de resíduos únicos. No entanto, a maioria da sequência ainda é conservada entre seus parálogos. O DVL-C-terminal (em alguns dos trabalhos agrupados com o domínio DEP) contém: locais críticos para regular a fosforilação da DVL, locais que regulam a estabilidade através de interações com ubiquitina ligase e uma enzima degradante, ligação sites para as tirosina quinases; um domínio de ligação FZD, sequências envolvidas na localização nuclear, um local de ligação de uma enzima desubicitante e uma região que interage com ROR2 (Bunn *et al.*, 2015).

A família de proteínas Dishevelled, originalmente descoberta em *Drosophila melanogaster*, é essencial para padronização tecidual. *Drosophila Dsh* evoluiu três ortólogos em mamíferos: os genes homólogos *DVL1*, *DVL2*, e *DVL3*, que compartilham de 59% - 67% de homologia de aminoácidos, e tem uma localização uniforme de variantes associadas a doenças na RS. No modelo animal, *DVL1* e *DVL3* são localizados no interior do tubo neural em desenvolvimento, e todas as três proteínas DVL têm padrões de localização semelhantes (Gray *et al.*, 2009).

A patogenicidade dessas proteínas truncadas pode resultar em ganho de função ou função dominante negativa, e essas possibilidades devem ser ativamente investigadas, mas dados experimentais preliminares sugerem que ela não é conduzida pela perda do C-terminal sozinha (White *et al.*, 2015).

O fato das mutações em *DVL1* (DRSII) serem similares as variantes encontradas no gene *DVL3* e resultarem na mudança de -1 no quadro de leitura durante a transcrição gênica, indica que estas mutações específicas podem ser uma causa comum da DRS.

No total, as variantes patogênicas identificadas em *DVL1* e *DVL3* são consistentes com todos os relatos anteriores, em que as variantes estão agrupadas no penúltimo exon e resultam em -1 frameshift, suportando a hipótese de que a mudança do quadro de leitura é necessária para o efeito patogênico, devido a um ganho de função ou mecanismo dominante-negativo.

É possível ainda que os C-terminais das proteínas DVL tenham uma habilidade para suprimir a sinalização Wnt *canônica* e promover a transdução *não-canônica* de Wnt. Assim, a DRS mediada por DVL pode ser o resultado de mutações que afetam a fosforilação das regiões C-terminais de DVL1 e DVL3. Evidências deste fato são observadas pela interação entre proteínas DVL3 fosforiladas e o receptor Wnt *não-canônico* ROR2: estimulado pela hiperfosforilação de DVL3 por CK1 ϵ , ROR2 mostrou interagir com esta proteína (Nishita et al, 2010; Witte et al., 2010). Curiosamente, a interação DVL3-ROR2 depende do C- terminal de DVL, que está alterado em todos os mutantes DVL observados.

É necessário continuar as investigações para a melhor elucidação do mecanismo pelo qual essas mutações específicas em *DVL1* e *DVL3* resultam na DRS e suas interações dentro da via Wnt *não-canônica*.

IV.3 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES COM MUTAÇÃO EM *DVL1* e *DVL3*

De forma geral, os achados clínicos dos pacientes aqui estudados, que possuem mutações no gene *DVL1* ou *DVL3*, estão em concordância com as descrições previamente relatadas na literatura para DRS (*Quadro II*).

Nos pacientes portadores de mutações em *DVL1*, sinais como macrocefalia, dismorfias faciais, língua bífida, anomalias dentárias e hipoplasia genital tiveram prevalência de 100%, concordante com a literatura. Também concordante com sinais previamente descritos, os pacientes apresentaram estatura normal, que se contrapõe a forma recessiva da síndrome, e outras anomalias congênitas como defeitos cardíacos, hérnia umbilical ou inguinal, escoliose e infecções respiratórias recorrentes.

Quadro II – Frequência de sinais clínicos em pacientes com DRS2 e DRS3.

Paciente	Caso 05	Caso 01	Caso 02	Caso 03	Caso 04	Est. atual	Mazzeu
Gênero	M	M	F	M	M	%	%
Gene	DVL3	DVL1	DVL1	DVL1	DVL1	DVL1	DRS
Mutação	c.1617delG	-	c.1496_1508del p.Pro499Argfs*146	c.1505_1517del p.His502Profs*143	c.1612_1616dup p.Ser539Argfs*112		
Consequência	*129 Mudança no quadro de leitura	-	Mudança no quadro de leitura	Mudança no quadro de leitura	Mudança no quadro de leitura		
Zigosidade	Heterozigoto	Heterozigoto	Heterozigoto	Heterozigoto	Heterozigoto		
Crescimento							
Baixa estatura	+	-	-	-	-	0	81

Quadro II - Continua

Paciente	Caso 05	Caso 01	Caso 02	Caso 03	Caso 04	Est. atual*	Mazzeu
Gene	DVL3	DVL1	DVL1	DVL1	DVL1	DVL1	DRS
Características faciais							
Macrocefalia	-	+	+	+	+	100	64
Testa proeminente	#	#	#	+	#	100	79
Testa ampla	#	#	#	+	#	100	-
Hipoplasia do terço médio da face	+	+	+	+	+	100	81
Hipertelorismo	+	+	+	+	+	100	100
Cílios longos	+	-	-	-	-	0	54
Olhos proeminentes	+	+	+	-	+	75	36
Narinas antevertidas	-	+	+	-	+	75	96
Ponte nasal ampla	+	+	+	+	+	100	97
Lábio superior fino	-	+	-	-	+	50	50
Hiperplasia de gengiva	+	+	+	+	+	100	36
Língua bífida	-	+	+	+	+	100	39
Anomalias dentárias	+	+	+	+	+	100	50
Baixa implantação de orelhas	+	+	+	#	#	100	28
Esqueleto							
Mãos curtas	+	+	+	-	-	50	62
Membros	Encurtamento o proporciona do	Mesomelia	Mesomelia	Encurtamento o proporciona do	Mesomelia	-	80% Meso melia
Braquidactília	+	+	+	+	+	100	81
Clinodactília	+	+	+	+	+	100	70
Camptodactília	-	-	-	-	-	0	-
Sindactília	+	-	-	-	-	0	15
Fusão de costelas	-	-	-	-	-	0	0
Genitália							
Micropênis	#	+	NA	+	+	100	84
Criptorquidia	#	+	NA	+	+	100	72
Hipoplasia de pequenos lábios	NA	NA	#	NA	NA	#	50
Hipoplasia de grandes lábios	NA	NA	#	NA	NA	#	35
Clitórís hipoplásico	NA	NA	#	NA	NA	#	46
Outros achados	Hérnia umbilical, pectus carinatum, onfalocele e anomalias renais	Hérnia umbilical e inguinal, infecções respiratórias e pulmões colapsados	Hérnia umbilical e defeitos cardíacos	Escoliose, infecções respiratórias e de ouvido recorrentes	H. umbilical, infecções respiratórias , def. cardíacos, espi. bífida, tórax estreito e surdez		

Quadro II - Características clínicas dos pacientes investigados no presente estudo e frequência desses sinais na forma autossômica dominante da síndrome segundo Mazzeu *et al.*, 2007.+ presente / - ausente / NA não se aplica / # não avaliado / *Est. atual - Estudo atual

Entretanto, cílios longos, que está descrito para uma prevalência acima de 50%, não foi observada em nossa amostra. Mesomelia de membros superiores e inferiores foi observada em todos os pacientes diagnosticados com DRS2 descritos na literatura, entretanto em nossa amostra de quatro pacientes, um apresentava

encurtamento proporcionado de membros. Fusão de costelas esteve ausente em nossa amostra, reforçando este sinal como importante diferencial entre a RRS e a DRS.

O paciente portador de mutação em *DVL3* apresentou baixa estatura, assim como descrito para outros pacientes diagnosticados com a DRS3, o que pode ser um sinal importante para diferenciar fenotipicamente pacientes portadores de mutações em *DVL1* e em *DVL3*. Além da baixa estatura sinais típicos da RS como características faciais e anomalias dentárias foram observadas. A macrocefalia, sinal significativo para a DRS, esteve ausente em nosso paciente, entretanto trabalhos anteriores observaram macrocefalia em dois pacientes com esta forma da síndrome, assim, esta característica não pode ser usada para distinguir clinicamente a DRS3 da DRS2. Outros sinais importantes observados em nosso paciente foram sindactilia, hérnia umbilical, anomalias renais, pectus carinatum e onfalocele. Este paciente, apresentou encurtamento proporcionado de membros, em contraste com descrições prévias para a DRS3, que observaram apenas o encurtamento mesomélico. Características consideradas de maior importância para DRS3 como a fissura labial e/ou palatina e defeitos cardíacos estavam ausentes neste paciente.

IV.4 PESQUISA DE MUTAÇÕES POR WES

IV.4.1 Mutações em *WNT5A*

Após a busca por mutações em *DVL1* e *DVL3*, através do sequenciamento Sanger, aqueles pacientes que obtiveram resultado negativo para mutações nesses genes foram estudados através da técnica de WES.

Foram então identificadas mutações em *WNT5A* em dois dos pacientes estudados. O primeiro paciente (caso 5) apresentou uma troca de base com perda de sentido (c.479C>G; p.Ser160Cys;) em heterozigose e localizada no exon 4 de *WNT5A*.

Na segunda paciente (caso 6) foi encontrada, também em heterozigose, uma inserção *de novo* de seis pares de base (c.487_492dup; p.G163_C164dup) no exon 4 do gene *WNT5A*, sem alteração no quadro de leitura. Esta variante foi observada em 16/70 (23%) das leituras, o que é condizente com um quadro de mosaicismo do alelo mutante.

Mutações em heterozigose no gene *WNT5A* foram a primeira causa descrita para a DRS (Person *et al.*, 2010). Na literatura, até o presente momento, haviam sido descritas seis mutações neste gene, todas relacionadas a DRS1 (Person *et al.*, 2010; Roifman *et al.*, 2015). Comparando nossos dados com os previamente descritos observamos que nenhuma das duas mutações aqui encontradas haviam sido reportadas anteriormente. A descrição das mutações encontradas em nosso estudo e daquelas reportadas na literatura se encontra no *Quadro III*.

Quadro III - Descrição de mutações nos genes *WNT5A* em pacientes com DRS.

Paciente	Gene	Exon alterado	Tipo de mutação	Varição de bases	Origem geográfica
Caso 06	<i>WNT5A</i>	4	Troca de sentido	c.479C>G	Etiópia
Caso 07	<i>WNT5A</i>	4	Troca de sentido	c.487_492dup	EUA
Roifman <i>et al.</i> (2015)	<i>WNT5A</i>	3	Troca de sentido	c.206G>A	-
Person <i>et al.</i> (2010)	<i>WNT5A</i>	3	Troca de sentido	c.248G>C	-
Xiong <i>et al.</i> (2016)	<i>WNT5A</i>	3	Troca de sentido	c.249C > G	China
Roifman <i>et al.</i> (2015)	<i>WNT5A</i>	3	Troca de sentido	c.257A>G	-
Roifman <i>et al.</i> (2015)	<i>WNT5A</i>	3	Troca de sentido	c.257A>G	-
Robinow <i>et al.</i> (1969) e Person <i>et al.</i> (2010)	<i>WNT5A</i>	4	Troca de sentido	c.544–545 CT>TC	-

Quadro III - Nas linhas em cinza estão representadas as mutações encontradas no presente trabalho e nas linhas brancas aquelas reportadas na literatura em pacientes com a forma autossômica dominante da síndrome de Robinow. Dados obtidos de Robinow *et al.*, 1969, Roifman *et al.* 2015, Person *et al.*, 2010 e Xiong *et al.*, 2016.

Entretanto, todas as mutações descritas para *WNT5A* afetam os exons 3 e 4 e causam uma troca de sentido durante a tradução de aminoácidos. No trabalho de Roifman *et al.* (2015) foi estudado um modelo de homologia *WNT5A*, observou-se que todas as mutações, até o momento descritas, parecem afetar o mesmo lado da cisteína 104, que é palmitolado (*Figura VIII*). Este local coincide com a região das mutações encontradas em nosso estudo. Ainda segundo Roifman *et al.*, é possível que mutações nesses resíduos alterem estruturas da superfície da proteína e afetem interações com outras proteínas da via Wnt.

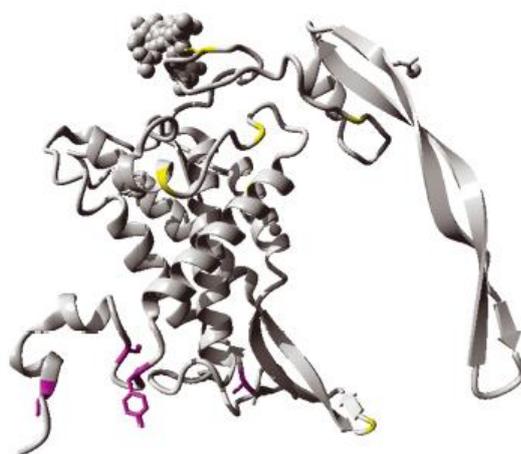


Figura VIII - Modelo de homologia WNT5A. Mutações encontradas em todos os WNT5A associadas aos casos DRS parecem estar localizados de um lado da proteína e podem afetar as interações com outras proteínas na via Wnt. Adaptado de Roifman *et al.*, 2015.

Resíduos C69 e C83 são modelados como cisteínas livres e sua função específica na multimerização e/ou estabilização deste complexo é desconhecido. No entanto, a mutação destes resíduos em tirosina e serina, respectivamente, poderiam afetar essa atividade putativa. O resíduo Y86 também está localizado na superfície proteica, sua cadeia lateral é grande e aromática e poderia desempenhar um papel na formação do complexo. A mutação converte esse resíduo em cisteína, que é menor e não pode realizar as mesmas interações. Além da perda da cadeia lateral da tirosina, esta mutação também pode introduzir uma nova ligação de cisteína com a cisteína livre na posição 83. No modelo utilizado neste trabalho, o resíduo C182 faz uma ligação dissulfeto com o resíduo C164, isso irá estabilizar o local do domínio e a superfície de interação da proteína. A mutação C182R irá perturbar essa ligação dissulfeto. Além disso, um lado maior da cadeia é introduzido nesta posição, que também mudará a superfície da proteína (Roifman *et al.*, 2015).

O WNT5A é um sinalizador da via Wnt *não-canônica*, responsável por modular a migração celular independente da β -catenina (Slusarski *et al.*, 1997; Heisenberg *et al.*, 2000). A sinalização Wnt *não-canônica* é necessária para migração direcional de células originárias das ilhotas pancreáticas durante a formação de pâncreas em peixe-zebra e camundongos (Kim *et al.*, 2005). Além disso, a sinalização *não-canônica* Wnt5a regula o direcionamento da migração celular necessária para a fusão do palato secundário fusão o desenvolvimento do rato (He *et al.*, 2008).

Recentemente foi realizado um trabalho com embriões de galinha que possuem uma homologia de 91% de *Wnt5a* com a sequência humana. Foram expressos o tipo selvagem e outras duas versões mutantes de *WNT5A* humana na mandíbula destas aves. Posteriormente foram examinados os efeitos morfológicos, celulares e moleculares destas alterações: os vírus mutantes *wtWNT5A*, *WNT5AC83S* e *WNT5AC182R* causaram o encurtamento da mandíbula no lado em que foram injetados quando comparados aos controles GFP (Green fluorescent protein). Embora os fenótipos dos pacientes estudados tenham, inicialmente, parecido semelhantes, foi descoberta uma interrupção específica da polaridade e forma de condrócitos, inibição da migração celular, diferenças na expressão do gene alvo e ausência de sinalização JNK, quando presente *WNT5A* mutante. Além disso, as mutações com troca de sentido não parecem bloquear a ligação ao receptor, pois em experiências parácrinas, a proteína mutante inibe a migração celular. Neste estudo, foi descartado o ganho direto ou perda de função causada pelas mutações em *WNT5A*. Em vez disso, as mutações provavelmente redirecionam a sinalização Wnt para longe de JNK-PCP, para outras vias *não-canônicas*. Assim, as mutações com troca de sentido, em *WNT5A*, que estão relacionadas a RS, apresentam efeitos neomórficos dominantes que interferem na função da proteína do tipo selvagem (Hosseini-Farahabadi *et al.*, 2017).

Embora outros modelos animais em galinha (Baranski *et al.*, 2000; Geetha-Loganathan *et al.*, 2009; Hosseini-Farahabadi *et al.*, 2013) e em rato (Yamaguchi *et al.* 1999), também tenham demonstrado a importância do ligante *WNT5A* e da via Wnt *não-canônica* no desenvolvimento craniofacial e de membros, mais estudos a nível de proteína são necessários para determinar quais componentes estão envolvidos e qual caminho de transdução do sinal resultam no fenótipo da RS.

IV.5 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES COM MUTAÇÃO EM *WNT5A*

Assim como em *DVL1* e em *DVL3*, as mutações em *WNT5A* relatadas em nosso trabalho resultaram em fenótipos semelhantes àqueles descritos na literatura para DRS. Os achados mais frequentes encontrados em nosso estudo para esses pacientes foram as dismorfias faciais características, que incluem o hipertelorismo marcado, o encurtamento mesomélico de membros associado a baixa estatura e

anomalias dentárias. Descrições anteriores para a DRS1 já haviam revelado que todos os pacientes acometidos por mutações em *WNT5A* apresentaram mesomelia de membros e baixa estatura, achados esses que se diferenciam daqueles observados para DRS2 e DRS3. Outro achado concordante com a literatura e que aponta diferenças entre a DRS1 com as demais formas dominantes da RS foi a macrocefalia, que esteve ausente em nossa amostra de pacientes. As frequências de sinais clínicos observados em nossos pacientes com mutação em *WNT5A*, assim como aqueles descritos na literatura se encontram no *Quadro IV*.

Quadro IV – Frequência de sinais clínicos em pacientes com DRS1.

Paciente	Caso 06	Caso 07	Est. atual*	Mazzeu
Gênero	M	F	%	%
Gene	<i>WNT5A</i>	<i>WNT5A</i>	<i>WNT5A</i>	DRS
Mutação	c.479C>G	c.487_492dup		
Consequência	p.S160C	p.G163_C164dup		
Zigosidade	Heterozigoto	Heterozigoto		
Crescimento				
Baixa estatura	+	+	100	81
Características faciais				
Macrocefalia	-	-	0	64
Testa proeminente	+	+	100	79
Testa ampla	+	+	100	-
Hipoplasia do terço médio da face	+	+	100	81
Hipertelorismo	+	+	100	100
Cílios longos	+	+	100	54
Olhos proeminentes	+	-	50	36
Narinas antevertidas	+	+	100	96
Ponte nasal larga	+	-	50	97
Lábio superior fino	-	-	0	50
Hiperplasia de gengiva	+	-	50	36
Língua bífida	+	+	100	39
Anomalias dentárias	+	+	50	50
Baixa implantação de orelhas	+	#	100	28
Genitália				
Micropênis	+	NA	100	84
Criptorquidia	+	NA	100	72
Hipoplasia de pequenos lábios	NA	#	#	50
Hipoplasia de grandes lábios	NA	#	#	35
Clitóris hipoplásico	NA	#	#	46
Esqueleto				
Mãos curtas	+	+	100	62
Membros	Mesomelia	Mesomelia	Mesomelia	80% Mesomelia
Braquidactília	+	+	100	81
Clinodactília	+	+	100	70
Sindactília	+	-	50	15
Fusão de costelas	-	-	0	0
Outros achados	Hemivertebras, pectus excavatum, e hérnia inguinal bilateral	Estrabismo, escoliose, microrretrognatia		

Quadro I – Características clínicas dos pacientes investigados no presente estudo e frequência desses sinais na forma autossômica dominante da síndrome segundo Mazzeu *et al.*, 2007. + presente / - ausente / NA não se aplica / # não avaliado / *Est. atual – Estudo atual

Além desses sinais, nossos pacientes apresentaram outras alterações de membros como a braquidactilia e a clinodactilia. Um dos pacientes apresentou também sindactilia dos dedos da mão. A fusão de costelas não foi observada, mas um de nossos pacientes revelou hemivertebra. Outros achados foram estrabismo, hiperplasia gengival, hérnia inguinal bilateral, pectus excavatum e escoliose. Um sinal não descrito previamente para a DRS1, a microrretrognatia, esteve presente em nossos dois pacientes com mutação nesse gene.

Apesar da nossa amostra ter apresentado um fenótipo um pouco mais grave em relação ao comprometimento craniofacial, quando comparado com outros casos de mutação em *WNT5A*, os pacientes aqui relatados não apresentaram fissuras orais, problemas respiratórios e anomalias renais e ou/cardíacas, como observados em pacientes com mutações em *DVL1* e *DVL3*.

IV.4.2 Identificação de novos genes associados a DRS por WES

Após analisar nossa amostra para genes conhecidos, com alguma associação a DRS, mais de um terço de nossa amostra (4/11, 36%) permaneceu sem um diagnóstico molecular. Em seguida, a partir dos dados gerados pela técnica de WES, realizamos uma análise do genoma para identificar variantes raras e potencialmente prejudiciais que poderiam representar novos genes subjacentes a DRS. Observamos que dois indivíduos afetados de uma mesma família (Caso 08 e 09), apresentaram variantes que afetam *FZD2*, gene este, nunca antes descrito como causativo da RS.

Nas duas pacientes que possuem mutação no gene *FZD2* foi observada a variante (c.301g>T;p.Gly434Val). Esta alteração foi encontrada em heterozigose e afeta o único exon de *FZD2*, gerando, provavelmente, uma proteína truncada e não descrita em nenhum banco de dados controle. É importante ressaltar que *FZD2* exerce papel importante na Via Wnt e que interage diretamente com outras proteínas relacionadas ao fenótipo de DRS.

O gene *FZD2* codifica uma proteína transmembranar altamente conservada e faz parte da família Frizzled de receptores de membrana. Frizzled foi originalmente identificada por Vinson e Adler em *Drosophila melanogaster* onde foi observada uma

desorientação das cutículas capilares, sendo assim foi denominada "frizzled" (Vinson e Adler, 1987). FZD2 está envolvida tanto na via Wnt / β -catenina quanto na via Wnt / PCP, independente de β -catenina. Estudos demonstram que as proteínas Frizzled funcionam como receptores e co-receptores Wnt (Mikels *et al.*, 2006; Bhanot *et al.*, 1996).

Mutações nesta proteína não foram, até o momento, relacionadas diretamente a nenhuma forma de RS. Entretanto, mutações no gene *FZD2* já haviam sido descritas como candidatas para a Omodisplasia tipo 2¹ (MIM#164745) por Saal *et al.*, 2015. Esta displasia esquelética tem diagnóstico diferencial com a RS e possui sobreposição de vários sinais clínicos como dismorfias faciais, anomalias de membros e genitourinárias. Além disto, a mesma variante (c.301g>T; p.Gly434Val) encontrada em nosso estudo foi descrita em uma paciente também com Omodisplasia tipo 2 (Türkmen *et al.*, 2017), curiosamente, esta paciente havia recebido diagnóstico anterior de RS, devido a suas características fenotípicas muito semelhantes aquelas encontradas na DRS. Detalhes nas mutações encontradas em nosso trabalho se encontram no Quadro V. É necessário destacar que um grupo de pacientes com diagnóstico de DRS e mutações em *FZD2* também está descrito por White *et al.* em um trabalho que está em processo de publicação.

Quadro V - Descrição de mutações no gene *FZD2* em pacientes com DRS e Omodisplasia tipo 2.

Paciente	DC	Gene	Exon alterado	Tipo de mutação	Varição de bases	Origem geográfica
Caso 08	DRS	<i>FZD2</i>	1	Troca de sentido	c.301G>T	EUA
Caso 09	DRS	<i>FZD2</i>	1	Troca de sentido	c.301G>T	EUA
Türkmen <i>et al.</i> (2017)	Omodisplasia tipo 2	<i>FZD2</i>	1	Troca de sentido	c.301G>T	Turquia
Saal <i>et al.</i> (2015)	Omodisplasia tipo 2	<i>FZD2</i>	1	Sem sentido	c.1644G>A	-

Quadro V - Nas linhas em cinza estão representadas as mutações encontradas no presente trabalho e nas linhas brancas aquelas reportadas na literatura em pacientes com a forma autossômica dominante da síndrome de Robinow. Dados obtidos de Türkmen *et al.*, 2017¹⁹ e Saal *et al.*, 2015.

¹ A Omodisplasia tipo 2, autossômica dominante, foi recentemente extinta pela Sociedade Internacional de Displasias Esqueléticas em sua 13^a reunião que ocorreu em 20 de setembro de 2017 em Bruges-Bélgica. Os pacientes classificados com esta forma de Omodisplasia serão agora classificados como portadores da síndrome de Robinow autossômica dominante.

O resíduo Gly434, encontrado alterado nos pacientes do nosso estudo, é conservado em todos os vertebrados e está localizado na borda de um domínio transmembranar; o loop intracelular adjacente é um dos três pontos que se mostraram necessários para a ligação e estabilização da interação com DVL1 (Tauriello *et al.*, 2012). Portanto, as alterações no Gly434 podem interferir na afinidade ou na estabilidade da interação FZD2-DVL (Punchihewa *et al.*, 2009), sendo, o último, previsto para ocorrer através do C-terminal de DVL1, incluindo o domínio DEP. Curiosamente, semelhante a todas as outras proteínas associadas a RS, FZD2 desempenha um papel vital na ativação dependente de WNT5A dos efeitos do downstream do RAC e Wnt/PCP e é necessário para o recrutamento mediado pela WNT5A de DVL2 para a membrana. Além disso, o FZD2 interage diretamente com o ligante WNT5A através do seu domínio rico em cisteína. A ligação de WNT5A, na presença de ROR1, ROR2 e DVL2 induz internalização de FZD2 através de clatrina, o que é necessário para a ativação de RAC1 em células HEK293 (Sato *et al.*, 2010).

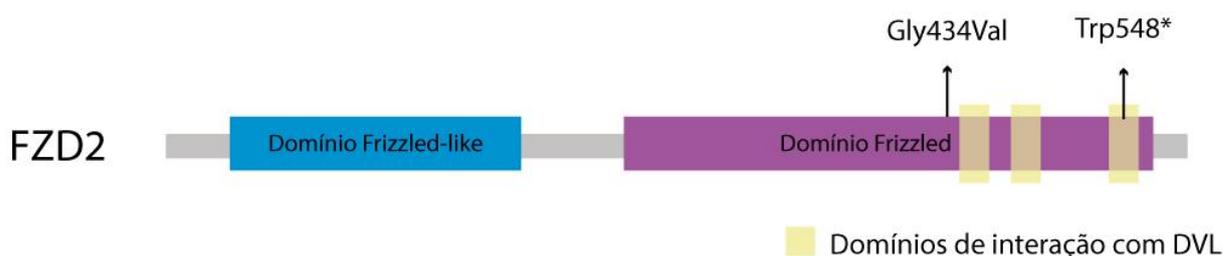


Figura IX – Representação esquemática dos domínios funcionais conhecidos de FZD2 que interagem com DVL. A primeira seta indica uma variante da Glycina 434, encontrada alterada no nosso estudo em duas pacientes com DRS, esta variante também está descrita para Omodisplasia tipo 2. Uma variante adicional (p.Trp548 *) da literatura, relatada em associação com Omodisplasia tipo 2 também está incluída. Dados obtidos de Türkmen *et al.*, 2017 e Saal *et al.* 2015.

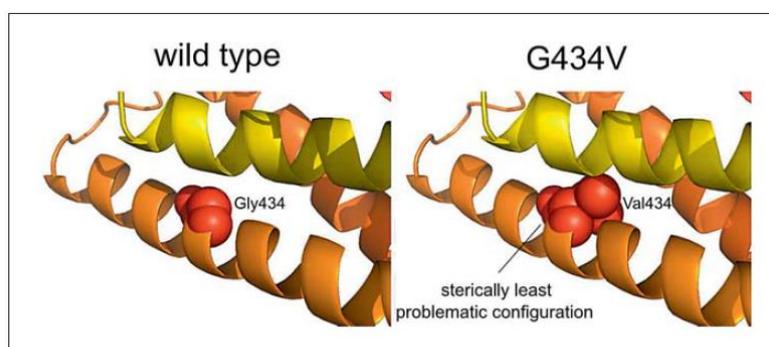


Figura X - Modelagem *in silico* da mutação Gly434Val em FZD2. No tipo selvagem, o Gly434 é representado como esferas vermelhas na hélice TM5 (laranja). A problemática estérica desta configuração mostra obstáculos estéricos de Val434 com a hélice vizinha (amarelo). Adaptado de Türkmen *et al.*, 2017.

Türkmen *et al.* (2017) também identificou uma mutação patogênica compartilhada por um probando e sua filha afetada, com diagnóstico clínico de Omodisplasia tipo 2 (*Figura X*). Foi identificada uma única mudança de par base (c.1644G> A) dentro do quadro de leitura do gene *FZD2*. Esta mutação sem sentido muda um resíduo de triptofano no aminoácido 548 para uma parada prematura. A mutação causal p.Trp548* identificada nestes pacientes prevê o truncamento da proteína *FZD2* na periferia do domínio de interação *canônico* DVL (*Figura IX*) o que pode ter consequências significativas para a sinalização *canônica*. Este estudo mostrou que a interação *FZD-DVL* é modulada por um motivo descontínuo em *Frizzled*, que está localizado ao longo de três loops intracelulares do receptor *FZD*. A mutação p.Trp548* evitaria a tradução de alguns dos resíduos neste modelo de ligação com *DVL* também.

Estudos relataram que *FZD2* é amplamente expressa em todo o desenvolvimento de cabeças e membros em vários modelos animais (Sisson e Topczewski, 2009; Geetha-Loganathan *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010; Nohno *et al.*, 1999; Visel *et al.*, 2007). No trabalho de Saal *et al.*, foi confirmado esse achado realizando hibridização *in situ* para *FZD2* em um modelo experimental de ave. *FZD2* foi expresso em toda a cabeça em desenvolvimento e dentro do mesênquima do membro proximal que contribui para os elementos esqueléticos em desenvolvimento. Além disso, a proteína *FZD2* foi detectada tanto no desenvolvimento da cabeça como nos membros.

Coletivamente, há ampla evidência na literatura de que a interrupção da sinalização *Wnt/Frizzled não-canônica* leva a um atraso ou bloqueio na maturação de condrócitos e encurtamento de elementos esqueléticos (Hartmann e Tabin, 2000; Li e Dudley, 2009). Esses fundamentos biológicos são susceptíveis a serem responsáveis pela baixa estatura observada e mesomelia em pacientes com *RS*.

IV.6 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES COM MUTAÇÃO EM *FZD2*

As informações clínicas pertinentes a todos os pacientes com variantes em *FZD2* são mostradas no *Quadro VI*. A apresentação clínica dos indivíduos afetados pode ser considerada um conjunto de características que representam uma desordem distinta que inclui baixa estatura, defeitos dos membros e características faciais

dismórficas compartilhadas: testa alta e larga, face plana, baixa implantação de orelhas, ponte nasal ampla e narinas antevertidas. Além disso, os dois indivíduos afetados apresentam encurtamento mesomélico de membros e braquidactilia. A baixa estatura significativa esteve presente nas duas pacientes também, apontando uma diferença com a DRS2 (*Quadro VI*).

Quadro VI – Frequência de sinais clínicos em pacientes com DRS e mutação em *FZD2*.

Paciente	Caso 08	Caso 09	Est. Atual*	Mazzeu
Sexo	F	F	%	%
Gene	<i>FZD2</i>	<i>FZD2</i>	<i>FZD2</i>	DRS
Mutação	c.1301G>T	c.1301G>T		
Consequência	p.Gly434Val	p.Gly434Val		
Zigosidade	Heterozigoto	Heterozigoto		
Crescimento				
Baixa estatura	+	+	100	81
Características faciais				
Macrocefalia	-	+	50	64
Testa proeminente	+	+	100	79
Testa ampla	-	-	0	-
Hipoplasia do terço médio da face	+	+	100	81
Hipertelorismo	+	+	100	100
Cílios longos	+	+	100	54
Olhos proeminentes	+	+	100	36
Narinas antevertidas	+	+	100	96
Ponte nasal larga	-	+	50	97
Lábio superior fino	+	+	100	50
Hiperplasia de gengiva	+	+	100	36
Língua bífida	+	+	100	39
Anomalias dentárias	+	+	100	50
Baixa implantação de orelhas	+	+	100	28
Esqueleto				
Mãos curtas	+	+	100	62
Membros	Mesomelia	Mesomelia	Mesomelia	80% Mesomelia
Braquidaquítia	+	+	100	81
Clinodactília	+	+	100	70
Camptodactília	-	-	0	-
Sindactília	-	-	0	15
Fusão de costelas	-	-	0	0
Genitália				
Micropênis	NA	NA	NA	84
Criptorquidia	NA	NA	NA	72
Hipoplasia de pequenos lábios	+	+	100	50
Hipoplasia de grandes lábios	+	+	100	35
Clitóris hipoplásico	+	+	100	46
Outros achados	Recorrente UTI	pectus excavatum, hérnia inguinal.		

Quadro VI – Características clínicas dos pacientes investigados no presente estudo e frequência desses sinais na forma autossômica dominante da síndrome segundo Mazzeu *et al.*, 2007. + presente / - ausente / NA não se aplica / # não avaliado / *Est. atual – Estudo atual

Outros achados que também estiveram presentes em 100% de nossa amostra foram as anomalias dentárias e a hipoplasia genital. Macrocefalia, sinal importante para a DRS está presente em uma das pacientes com mutações em *FZD2*. Entretanto,

assim como no nosso coorte de pacientes com mutação em *WNT5A*, não foi observado nesses pacientes anomalias renais e cardíacas e infecções respiratórias recorrentes, diferenciando assim o fenótipo de pacientes com mutações em *FZD2* daqueles com mutações em *DVL1* e *DVL3* (DRS2 e DRS3).

Alternativamente, como resultado da ampla expressividade variável de características associadas à RS, indivíduos com variantes em *FZD2* podem ser considerados casos de RS atípicos. Na realidade, *FZD2* foi proposto como um gene candidato para Omodisplasia tipo 2, que se sobrepõe significativamente com a RS. A característica "face fetal" está presente em todos os indivíduos afetados com defeitos esqueléticos e de membros atendendo ao critério de diagnóstico para DRS. A identificação de outros pacientes com mutação em *FZD2* permitirá uma melhor caracterização dessa forma da síndrome.

IV.7 SÍNTESE DE RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.7.1 Análise Molecular

A partir dos 11 pacientes (6 homens e 5 mulheres) estudados foram detectadas 9 mutações potencialmente patogênicas em quatro diferentes genes para a DRS, os conhecidos *WNT5A*, *DVL1* e *DVL3* e o gene candidato *FZD2*, todos participantes da via *Wnt não canônica* de sinalização. Tais dados confirmam a heterogeneidade genética que compõe essa desordem e contribuem para a compreensão desta via na embriogênese humana.

Em nosso estudo foram detectadas cinco mutações de ponto nos genes *DVL1* e *DVL3* gerando um C-terminal truncado a partir da mudança de -1 no quadro de leitura. Outros dois pacientes apresentaram mutações no gene *WNT5A* afetando a proteína no lado da cisteína 104, mutações nesses resíduos podem alterar estruturas da superfície da proteína e afetar interações com outras proteínas da via *Wnt*. Mais um gene participante desta via foi encontrado alterado em nosso coorte de pacientes, *FZD2* já havia sido indicado a estar envolvido em fenótipos Robinow-like.

Na literatura, o rastreio genético em *Drosophila* identificou muitos dos componentes da via *Wnt PCP*, incluindo os dois *frizzled* (Vinson e Adler, 1987) e *disheveled* (Brunner e van Driel, 2004). A sinalização *não-canônica Wnt* regula, através da via *PCP*, movimentos de extensão convergentes, um processo de

migração celular essencial durante a gastrulação de vertebrados. Os movimentos de extensão convergente desregulados em vertebrados controlados por proteínas de sinalização PCP do núcleo, são um fenômeno evolutivamente conservado com os mecanismos moleculares básicos conservados desde *Drosophila* até mamíferos (Qian *et al.*, 2007).

Os processos de desenvolvimento em diferentes organismos acima mencionados são em grande parte controlados pelo mesmo conjunto de proteínas PCP do núcleo, que foram originalmente identificadas em *Drosophila*. No entanto, em comparação com a *Drosophila*, a via PCP de vertebrados é mais evoluída e diversificada por especificação e emergência de vários homólogos, muitas vezes de um único gene de mosca, em quase todos os componentes essenciais desta via. Não surpreendentemente, estudos recentes demonstraram que os genes de mosca com mais de um homólogo humano são mais propensos a estar associados a síndromes humanas do que os genes de mosca com um único homólogo, potencialmente indicando duplicação e uma maior especialização de genes parálogos durante a evolução. Isso indica que os genes com múltiplos homólogos humanos que normalmente possuem algumas funções sobrepostas, ainda podem manifestar um fenótipo humano, embora a patogenicidade não seja devida à falta de eficiência (Yamamoto *et al.*, 2014).

Estamos começando a notar a relevância desses alelos raros, observados em genes da via Wnt/PCP que causam a RS, isto inclui alelos truncados agrupados em *DVL1* e *DLV3*, variantes recorrentes em *FZD2* e alelos hipomórficos em *WNT5A*. Mais estudos acerca dessa via são necessários para a melhor compreensão dos mecanismos que desencadeiam essas desordens de desenvolvimento.

IV.7.2 Análise Clínica

A descrição clínica dos 11 participantes da pesquisa está esquematizada no *Quadro VII*. Detalhes da caracterização clínica de cada caso se encontram na sessão de *anexos* ao final deste trabalho. Ao todo foram discriminadas 27 das características clínicas mais importantes sugeridas por Mazzeu *et al.* em 2007, no trabalho que reuniu os principais sinais e sintomas clínicos em pacientes com DRS e RRS. A frequência relativa de cada característica foi calculada e comparada ao resultado obtido no trabalho de Mazzeu de 2007.

De forma geral o fenótipo dos pacientes aqui estudados demonstra ter consonância com sinais clínicos relatados anteriormente para DRS (figura. 1). Dentre eles podemos destacar as dismorfias faciais características como hipertelorismo, hipoplasia do terço médio da face e narinas antevertidas. Outros achados clínicos concordantes com as descrições anteriores para DRS foram as alterações de membros como clinodactilia, braquidactilia e encurtamento de membros. O trabalho de Mazzeu observou uma frequência de 80% para encurtamento mesomélico de membros, em nossa amostra encontramos 73% para encurtamento mesomélico e 27% para encurtamento proporcionado.

A hipoplasia genital, característica importante tanto para a RRS quanto para a DRS, não pode ser avaliada em todos os nossos pacientes, entretanto para aqueles cujo exame físico foi realizado constatamos uma frequência alta de micropênis, criptorquidia em homens e hipoplasia de pequenos lábios em mulheres, concordantes com a literatura. Metade das pacientes do sexo feminino de nossa amostra, que foram examinadas, apresentaram também hipoplasia de grandes lábios e clitóris.

Quadro VII – Frequência de sinais clínicos dos pacientes de nosso estudo e daqueles descritos para pacientes com DRS e RRS.

Gene	DVL1	DVL3	WNT5A	FZD2	S/ etiologia molecular definida	DRS Estudo atual	DRS Mazzeu et al. (2007)	RRS Mazzeu et al. (2007)
Frequência dos sinais	%	%	%	%	%	%	%	%
Crescimento								
Baixa estatura	0	100	100	100	100	63	81	97
Características faciais								
Macrocefalia	100	0	0	50	100	77	64	25
Testa proeminente	100	#	100	100	50	90	79	78
Testa ampla	100	#	100	0	100	66	-	-
Hipoplasia do terço médio da face	100	100	100	100	50	90	81	94
Hipertelorismo	100	100	100	100	100	100	100	100
Cílios longos	0	100	100	100	0	54	54	59
Olhos proeminentes	75	100	50	100	0	63	36	13
Narinas antevertidas	75	0	100	100	50	73	96	96
Ponte nasal larga	100	100	50	0	100	80	97	95
Lábio superior fino	50	0	0	100	50	45	50	29
Hiperplasia de gengiva	100	100	50	100	50	81	36	71
Língua bífida	100	0	100	100	0	72	39	59
Anomalias dentárias	100	100	50	100	100	91	50	94
Baixa implantação de orelhas	100	100	100	100	100	100	28	50

Quadro VII - Continua

Gene	DVL1	DVL3	WNT5A	FZD2	S/ etiologia molecular definida	DRS Trabalho atual	DRS Mazzeu et al. (2007)	RRS Mazzeu et al. (2007)
Frequência dos sinais	%	%	%	%	%	%	%	%
Esqueleto								
Mãos curtas	50	100	100	100	100	81	62	84
Membros	60% Mesomelia 40% Encurtamento proporcional	Encurtamento proporcional	Mesomelia	Mesomelia	Proporcional e Mesomelia	73% Mesomelia 27% Encurtamento proporcional	80% Mesomelia	100% Mesomelia
Braquidactilia	100	100	100	100	100	100	81	91
Clinodactilia	100	100	100	100	100	100	70	88
Camptodactilia	0	0	50	0	0	14	-	18
Sindactilia	0	100	0	0	0	11	15	18
Fusão de costelas	0	0	0	0	100	9	0	100
Genitália								
Micropênis	100	#	100	NA	100	100	84	100
Criptorquidia	100	#	100	NA	100	100	72	67
Hipoplasia de pequenos lábios	#	NA	#	100	#	75	50	81
Hipoplasia de grandes lábios	#	NA	#	100	#	50	35	40
Clitóris hipoplásico	#	NA	#	100	#	50	46	80

Quadro VII – Frequência de sinais clínicos dos pacientes investigados no presente estudo e frequência desses sinais em DRS e RRS segundo Mazzeu *et al.*, 2007. Foram adicionadas apenas as características com frequência > 25% de acordo com o trabalho de realizado por Mazzeu *et al.*, 2007. NA não se aplica / # não avaliado

A macrocefalia, sinal importante para distinguir as duas formas de RS foi encontrada presente em 77% de nossa amostra, mas não foi observada em pacientes com mutação em *WNT5A* (DRS1). A baixa implantação de orelhas que havia sido descrita na literatura com uma frequência baixa esteve presente em 100% de nosso coorte em que esta característica foi avaliada. Outro achado que também havia sido relatado com uma baixa frequência e que em nossa amostra teve uma prevalência de 81% foi a hiperplasia de gengiva.

Os pacientes com DRS2 e DRS3 (mutações em *DVL1* e *DVL3*) apresentaram uma recorrência maior para anomalias renais e cardíacas, infecções pulmonares de repetição e hérnia umbilical, e um paciente, portador de mutação em *DVL1*, apresentou surdez. Sinais como hérnia inguinal, pectus excavatum e escoliose e foram observadas frequentemente em pacientes com mutações em todos os genes aqui identificados.

A baixa estatura esteve presente em 63% de nossa amostra contra 81% da literatura, tal fato se deve ao grande número de pacientes portadores de mutação no

gene *DVL1* (DRS2), única forma da síndrome que não apresenta baixa estatura. Por outro lado, anomalias dentárias, sinal mais prevalente na forma recessiva da síndrome, esteve presente em 91% de nossa amostra contra 50% da literatura. A fusão de costelas é outra característica importante e é usada para diferenciar a DRS da RRS, e esteve presente em uma de nossas pacientes sem etiologia molecular definida.

V. Conclusão

Nossa pesquisa contou com uma amostra de 11 pacientes clinicamente diagnosticados com DRS. Destes 9 possuíam mutações em genes participantes da via Wnt não *canônica* de sinalização.

Nenhuma das mutações encontradas no presente trabalho, em genes já relacionados a DRS, *DVL1*, *DVL3* e *WNT5A* havia sido previamente descrita, o que contribui para composição do quadro de mutações patogênicas associadas à síndrome.

Nosso estudo também identificou, através da técnica de WES, um novo gene candidato para a DRS. O gene *FZD2* esteve mutado em mãe e filha afetadas pela síndrome. Tal achado reforça a heterogeneidade genética que compõe a DRS e nos fornece evidências de que o sequenciamento completo de exoma pode ser uma ferramenta chave na busca por genes envolvidos em fenótipos Robinow.

Nossos dados corroboram com a ideia de que mutação em genes distintos pode levar a fenótipos semelhantes. Distúrbios geneticamente heterogêneos, como a RS, proporcionam uma oportunidade para uma visão mais ampla das vias e bases biológicas de doenças, fornecendo pistas para o intercomunicador aberrante ou para a cascata de sinalização alterada.

Nossos dados reforçam a ideia de que o fenótipo da RS é resultado da via Wnt/PCP desregulada e também apoiam a hipótese de que proteínas adicionais subjacentes à RS estejam envolvidas na causa dos demais casos.

O fato de dois pacientes de uma amostra de 11 não apresentarem uma etiologia molecular definida sugere que há a possibilidade de outros genes estarem relacionados à síndrome. Portanto, é necessário que a busca pela causa genética da DRS continue.

A caracterização clínica detalhada de nossos pacientes mostrou que a frequência de alguns sinais foi discordante da literatura, elencando a importância de uma caracterização precisa de um grupo maior de pacientes principalmente para se estabelecer um melhor entendimento da relação genótipo/fenótipo desta desordem.

De forma geral os pacientes aqui estudados apresentaram consonância de sinais clínicos, entretanto, os pacientes com mutação em *DVL1* não apresentam baixa

estatura na idade adulta, como já sugerido na literatura. Pacientes com mutação em *DVL1* e *DVL3* apresentaram uma frequência maior de anomalias renais e cardíacas. A macrocefalia, que esteve presente em mais de 70% de nossa amostra, esteve ausente em pacientes com mutação em *WNT5A*.

Finalmente, o presente trabalho contribui para uma melhor caracterização da DRS, que, até pouco tempo, permanecia elusiva. Nossos dados reforçam a necessidade de se fazer uma caracterização fenotípica individual e completa para afastar outras síndromes com diagnóstico diferencial, afastando assim o sub diagnóstico.

VI. Referências

1. 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.
2. 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.
3. Akşit S, Aydinlioglu H, Dizdärer 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.
4. 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.
5. Baranski M., Berdougou E., Sandler J. S., Darnell D. K., Burrus L. W. (2000). The dynamic expression pattern of frzb-1 suggests multiple roles in chick development. *Dev. Biol.* 2000 Jan 1;**217**(1):25-41.
6. Bainbridge MN, Wang M, Wu Y, Newsham I, Muzny DM, Jefferies JL, Albert TJ, Burgess DL, Gibbs RA. Targeted enrichment beyond the consensus coding DNA sequence exome reveals exons with higher variant densities. *Genome Biol.* 2011 Jul 25;**12**(7):R68.
7. Beiraghi S, Leon-Salazar V, Larson BE, John MT, Cunningham ML, Petryk A, Lohr JL. Craniofacial and intraoral phenotype of Robinow syndrome forms. *Clin Genet.* 2011 Jul;**80**(1):15-24.
8. Bernatík O, Šedová K, Schille C, Ganji RS, Červenka I, Trantírek L, Schambony A, Zdráhal Z, Bryja V. Functional analysis of dishevelled-3 phosphorylation

- identifies distinct mechanisms driven by casein kinase 1 ϵ and frizzled5. *J Biol Chem*. 2014 Aug 22;**289**(34):23520-33.
9. Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature*. 1996 Jul 18;**382**(6588):225-30.
 10. Bhoj EJ, Li D, Harr MH, Tian L, Wang T, Zhao Y, Qiu H, Kim C, Hoffman JD, Hakonarson H, Zackai EH. Expanding the SPECC1L mutation phenotypic spectrum to include Teebi hypertelorism syndrome. *Am J Med Genet A*. 2015 Nov;**167A**(11):2497-502.
 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. Brunner HG e van Driel MA. From syndrome families to functional genomics. *Nat Rev Genet*. 2004 Jul;**5**(7):545-51.
 13. 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.
 14. Carreira-Barbosa F, Concha ML, Takeuchi M, Ueno N, Wilson SW, Tada M. Prickle 1 regulates cell movements during gastrulation and neuronal migration in zebrafish. *Development*. 2003 Sep; **130**:4037–4046.
 15. 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.

16. Djiane A1, Riou J, Umbhauer M, Boucaut J, Shi D. Role of frizzled 7 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Development*. 2000 Jul; **127**(14):3091-100.
17. Eldomery MK, Coban-Akdemir Z, Harel T, Rosenfeld JA, Gambin T, Stray-Pedersen A, Küry S, Mercier S, Lessel D, Denecke J, Wiszniewski W, Penney S, Liu P, Bi W, Lalani SR, Schaaf CP1, Wangler MF, Bacino CA, Lewis RA, Potocki L, Graham BH, Belmont JW, Scaglia F, Orange JS, Jhangiani SN, Chiang T, Doddapaneni H, Hu J, Muzny DM, Xia F, Beaudet AL, Boerwinkle E, Eng CM, Plon SE, Sutton VR, Gibbs RA, Posey JE, Yang Y, Lupski JR. Lessons learned from additional research analyses of unsolved clinical exome cases. *Genome Med*. 2017 Mar 21; **9**(1):26.
18. Etheridge SL, Ray S, Li S, Hamblet NS, Lijam N, Tsang M, Greer J, Kardos N, Wang J, Sussman DJ, Chen P, Wynshaw-Boris A. Murine dishevelled 3 functions in redundant pathways with dishevelled 1 and 2 in normal cardiac outflow tract, cochlea, and neural tube development. *PLoS Genet*. 2008 Nov; **4**(11):e1000259.
19. Eva-Maria Brinkmann. Secreted frizzled-related protein 2 (sFRP2) redirects non-canonical Wnt signaling from Fz7 to Ror2 during vertebrate gastrulation. Thesis [Doctor of Natural Sciences] - *University of Heidelberg*; 2015.
20. Fromer M, Moran JL, Chambert K, Banks E, Bergen SE, Ruderfer DM, Handsaker RE, McCarroll SA, O'Donovan MC, Owen MJ, Kirov G, Sullivan PF, Hultman CM, Sklar P, Purcell SM. Discovery and statistical genotyping of copy-number variation from whole-exome sequencing depth. *Am J Hum Genet*. 2012 Oct 5; **91**(4):597-607.
21. Gambin T, Akdemir ZC, Yuan B, Gu S, Chiang T, Carvalho CMB, Shaw C, Jhangiani S, Boone PM, Eldomery MK, Karaca E, Bayram Y, Stray-Pedersen A, Muzny D, Charng WL, Bahrambeigi V, Belmont JW, Boerwinkle E, Beaudet AL, Gibbs RA, Lupski JR. Homozygous and hemizygous CNV detection from

- exome sequencing data in a Mendelian disease cohort. *Nucleic Acids Res.* 2017 Feb 28;**45**(4):1633-1648.
22. Gao C e Chen YG. Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cell Signal.* 2010 May;**22**(5):717-27.
23. Geetha-Loganathan P, Nimmagadda S, Antoni L, Fu K, Whiting CJ, Francis-West P, Richman JM. Expression of WNT signalling pathway genes during chicken craniofacial development. *Dev Dyn.* 2009 Mai;**238**(5):1150-65.
24. Geetha-Loganathan P1, Nimmagadda S, Antoni L, Fu K, Whiting CJ, Francis-West P, Richman JM. Expression of WNT signalling pathway genes during chicken craniofacial development. *Dev Dyn.* 2009 Mai;**238**(5):1150-65
25. Gray RS , Bayly RD , Green SA , Agarwala S , Lowe CJ , Wallingford JB. Diversification of the expression patterns and developmental functions of the dishevelled gene family during chordate evolution. *Dev Dyn.* 2009 Aug; **238** (8): 2044-57.
26. Hamblet NS, Lijam N, Ruiz-Lozano P, Wang J, Yang Y, Luo Z, Mei L, Chien KR, Sussman DJ, Wynshaw-Boris A. Dishevelled 2 is essential for cardiac outflow tract development, somite segmentation and neural tube closure. *Development.* 2002 Dec;**129**(24):5827-38.
27. Hartmann C e Tabin CJ. Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb. *Development.* 2000 Jul;**127**(14):3141-59.
28. 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.

29. Heisenberg CP, Tada M, Rauch GJ, Saúde L, Concha ML, Geisler R, Stemple DL, Smith JC, Wilson SW. Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature*. 2000 May 4;405(6782):76-81.
30. Hikasa H, Shibata M, Hiratani I, Taira M. The *Xenopus* receptor tyrosine kinase Xror2 modulates morphogenetic movements of the axial mesoderm and neuroectoderm via Wnt signaling. *Development*. 2002 Nov;129(22):5227-39.
31. Ho HY, Susman MW, Bikoff JB, Ryu YK, Jonas AM, Hu L, Kuruvilla R, Greenberg ME. Wnt5a-Ror-Dishevelled signaling constitutes a core developmental pathway that controls tissue morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Mar 13;109(11):4044-51.
32. Hosseini-Farahabadi S, Geetha-Loganathan P, Fu K, Nimmagadda S, Yang HJ, Richman JM. Dual functions for WNT5A during cartilage development and in disease. *Matrix Biol*. 2013 Jun 24;32(5):252-64.
33. Hosseini-Farahabadi S, Gignac SJ, Danescu A, Fu K, Richman JM. Abnormal WNT5A Signaling Causes Mandibular Hypoplasia in Robinow Syndrome. *J Dent Res*. 2017 Oct;96(11):1265-1272.
34. Hsieh JC, Lee L, Zhang L, Wefer S, Brown K, DeRossi C, Wines ME, Rosenquist T, Holdener BC. Mesd encodes an LRP5/6 chaperone essential for specification of mouse embryonic polarity. *Cell*. 2003 Feb 7;112(3):355-67.
35. Huelsken J, Birchmeier W. New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr Opin Genet Dev*. 2001 Oct;11(5):547-53.
36. Kilian B, Mansukoski H, Barbosa FC, Ulrich F, Tada M, Heisenberg CP. The role of Ppt/Wnt5 in regulating cell shape and movement during zebrafish gastrulation. *Mech. Dev*. 2003 Apr; 120:467–476.

37. Kim GH, Her JH, Han JK 2008. Ryk cooperates with Frizzled 7 to promote Wnt11-mediated endocytosis and is essential for *Xenopus laevis* convergent extension movements. *J Cell Biol.* 2008 Sep 22;**182**(6):1073-82.
38. Kim KA, Kakitani M, Zhao J, Oshima T, Tang T, Binnerts M, Liu Y, Boyle B, Park E, Emtage P, *et al.* Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science.* 2005 Aug 19;**309**(5738):1256-9.
39. Komiya Y e Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis.* 2008 Abr;**4**(2):68-75.
40. Kruszka P, Dong Li, Harr MH, Wilson NR, Swarr D, McCormick EM, Chiavacci RM, Li M, Martinez AF, Hart RA, McDonald-McGinn DM, Deardorff MA, Falk MJ, Allanson JE, Hudson C, Johnson JP, Saadi I, Hakonarson H, Muenke M, Zackai EH. Mutations in SPECC1L, encoding sperm antigen with calponin homology and coiled-coil domains 1-like, are found in some cases of autosomal dominant Opitz G/BBB syndrome. *J Med Genet.* 2015 Feb;**52**(2): 104–110.
41. Lee YN, Gao Y, Wang HY. Differential mediation of the Wnt canonical pathway by mammalian Dishevelleds-1, -2, and -3. *Cell Signal.* 2008 Feb;**20**(2):443-52.
42. Li Ma, Ying Wang, Craig C Malbon,³ and Hsien-yu Wang. Dishevelled-3 C-terminal His single amino acid repeats are obligate for Wnt5a activation of non-canonical signaling. *J Mol Signal.* 2010 Nov 5:**19**.
43. Li Y e Dudley AT. Noncanonical frizzled signaling regulates cell polarity of growth plate chondrocytes. *Development.* 2009 Apr;**136**(7):1083-92.
44. Lijam N, Paylor R, McDonald MP, Crawley JN, Deng CX, Herrup K, Stevens KE, Maccaferri G, McBain CJ, Sussman DJ, Wynshaw-Boris A. Social interaction and sensorimotor gating abnormalities in mice lacking Dvl1. *Cell.* 1997 Sep 5;**90**(5):895-905.

45. Liu X, Liu T, Slusarski DC, Yang-Snyder J, Malbon CC, Moon RT, Wang H 1999. Activation of a Frizzled-2/ β -adrenergic receptor chimera promotes Wnt signaling and differentiation of mouse F9 teratocarcinoma cells via G α and G α t. *Proc Natl Acad Sci*. 1999 Dec 7;**96**(25):14383-8.
46. 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.
47. Ma L e Wang HY 2007. Mitogen-activated protein kinase p38 regulates the Wnt/cyclic GMP/Ca²⁺ non-canonical pathway. *J Biol Chem*. 2007 Sep 28;**282**(39):28980-90.
48. 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 Feb;**143**(4):320-5.
49. McCarthy DJ, Humburg P, Kanapin A, Rivas MA, Gaulton K, Cazier JB, Donnelly P. Choice of transcripts and software has a large effect on variant annotation. *Genome Med*. 2014 Mar 31;**6**(3):26.
50. Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol*. 2006 Apr;**4**(4):e115.
51. Mikels, A. J. & Nusse, R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits B-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol*. 2006 Apr;**4**(4):e115. Epub 2006 Apr 4.
52. Moeller H, Jenny A, Schaeffer HJ, Schwarz-Romond T, Mlodzik M, Hammerschmidt M, Birchmeier W 2006. Diversin regulates heart formation and gastrulation movements in development. *Proc Natl Acad Sci*. Oct ;(**43**):15900-5.

53. Nathan R, Wilson, Adam J, Olm-Shipman, Diana S, Acevedo, Kanagaraj Palaniyandi, Everett G, Hall, Edina Kosa, Kelly M, Stumpff, Guerin J, Smith, Lenore Pitstick, Eric C, Liao, Bryan C, Bjork, Andras Czirok, e Irfan Saadia. SPECC1L deficiency results in increased adherens junction stability and reduced cranial neural crest cell delamination. *Sci Rep.* 2016 Jan;**6**:17735.
54. Niehrs C. The complex world of WNT receptor signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Dec;**13**(12):767-79.
55. 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.
56. Nohno T, Kawakami Y, Wada N, Komaguchi C, Nishimatsu S. Differential expression of the frizzled family involved in Wnt signaling during chick limb development. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1999 Jul;**45**(5):653-9.
57. Nomachi A, Nishita M, Inaba D, Enomoto M, Hamasaki M, Minami Y. Receptor tyrosine kinase Ror2 mediates Wnt5a-induced polarized cell migration by activating c-Jun N-terminal kinase via actin-binding protein filamin A. *J Biol Chem.* 2008 Oct **10**;283(41):27973-81.
58. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res.* 2005 Jan;**15**(1):28-32.
59. 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.
60. 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.
61. PUNCHIHEWA, C, FERREIRA, AM., CASSELL, R, RODRIGUES, P e FUJII N. Sequence requirement and subtype specificity in the high-affinity interaction between human frizzled and dishevelled proteins. *Protein Sci.* 2009 May;**18**(5):994-1002.
62. QIAN D, JONES C, RZADZINSKA A, MARK S, ZHANG X, STEEL KP, DAI X, CHEN P. Wnt5a functions in planar cell polarity regulation in mice. *Dev Biol.* 2007 Jun 1;**306**(1):121-33.
63. REID JG, CARROLL A, VEERARAGHAVAN N, DAHDOLI M, SUNDSQUIST A, ENGLISH A, BAINBRIDGE M, WHITE S, SALERNO W, BUHAY C, YU F, MUZNY D, DALY R, DUYK G, GIBBS RA, BOERWINKLE E. Launching genomics into the cloud: deployment of Mercury, a next generation sequence analysis pipeline. *BMC Bioinformatics.* 2014 Jan 29;**15**:30.
64. ROBINOW MD. The Robinow (fetal face) syndrome: a continuing puzzle. *Clin Dysmorphol.* 1993;**2**(3):189-98.
65. 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.
66. 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.
67. ROSSO SB, SUSSMAN D, WYNshaw-BORIS A, SALINAS PC. Wnt signaling through Dishevelled, Rac and JNK regulates dendritic development. *Nat Neurosci.* 2005 Jan;**8**(1):34-42.

68. 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.
69. Saldanha J, Singh J, Mahadevan D. Identification of a Frizzled-like cysteine rich domain in the extracellular region of developmental receptor tyrosine kinases. *Protein Sci.* 1998 Aug;**7**(8):1632-5.
70. Sato A, Yamamoto H, Sakane H, Koyama H, Kikuchi A 2010. Wnt5a regulates distinct signalling pathways by binding to Frizzled2. *EMBO J.* 2010 Jan 6;**29**(1):41-54.
71. Sato A, Yamamoto H, Sakane H, Koyama H, Kikuchi A. Wnt5a regulates distinct signalling pathways by binding to Frizzled2. *EMBO J.* 2010 Jan 6;**29**(1):41-54.
72. Schambony A e Wedlich D. Wnt-5A/Ror2 regulate expression of XPAPC through an alternative noncanonical signaling pathway. *Dev Cell.* 2007 Mai;**12**(5):779-92.
73. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2000 Out 13;**103**(2):211-25.
74. Schwabe GC, Trepczik 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.
75. Schwarz-Romond T, Fiedler M, Shibata N, Butler PJ, Kikuchi A, Higuchi Y, Bienz M. The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization. *Nat Struct Mol Biol.* 2007 Jun;**14**(6):484-92.
76. Seitz K, Dürsch V, Harnoš J, Bryja V, Gentzel M e Schambony A. β -Arrestin interacts with the beta/gamma subunits of trimeric G-proteins and dishevelled in the Wnt/Ca(2+) pathway in xenopus gastrulation. *PLoS One.* 2014 Jan 29;**9**(1):e87132.

77. Shafer B, Onishi K, Lo C, Colakoglu G, Zou Y. Vangl2 promotes Wnt/planar cell polarity-like signaling by antagonizing Dvl1-mediated feedback inhibition in growth cone guidance. *Dev Cell*. 2011 Feb 15;**20**(2):177–91.
78. Shimizu K, Sato M, Tabata T. The Wnt5/planar cell polarity pathway regulates axonal development of the Drosophila mushroom body neuron. *J Neurosci*. 2011 Mar 30;**31**(13):4944-54.
79. 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.
80. Sisson BE, Topczewski J. Expression of five frizzleds during zebrafish craniofacial development. *Gene Expr Patterns*. 2009 Oct;**9**(7):520-7
81. Tauriello DV, Jordens I, Kirchner K, Sloats JW, Kruitwagen T, Bouwman BA, Noutsou M, Rüdiger SG, Schwamborn K, Schambony A, Maurice MM. Wnt/ β -catenin signaling requires interaction of the Dishevelled DEP domain and C terminus with a discontinuous motif in Frizzled. *Proc Natl Aca Sci USA*. 2012 Apr **3**;109(14):E812-20.
82. Torban E, Kor C, Gros P. Van Gogh-like2 (Strabismus) and its role in planar cell polarity and convergent extension in vertebrates. *Trends Genet*. 2004 Nov; **20**:570–577.
83. Torres MA, Yang-Snyder JA, Purcell SM, DeMarais AA, McGrew LL, Moon RT. Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J Cell Biol*. 1996 Jun;**133**(5):1123-37.
84. 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.

85. 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.
86. 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.
87. Veeman MT, Slusarski DC, Kaykas A, Louie SH, Moon RT. Zebrafish prickles, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. *Curr Biol*. 2003 Apr 15;13(8):680-5.
88. Verkaar F, van Rosmalen JW, Smits JF, Blankesteyn WM, Zaman GJ 2009. Stably overexpressed human Frizzled-2 signals through the β -catenin pathway and does not activate Ca^{2+} -mobilization in Human Embryonic Kidney 293 cells. *Cell Signal*. 2009 Jan;21(1):22-33.
89. Vinson CR e Adler PN. Directional non-cell autonomy and the transmission of polarity information by the frizzled gene of *Drosophila*. *Nature*. 1987 Oct 8;14;329(6139):549-51.
90. Vinson CR, Sigler PB, McKnight SL. Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science*. 1989 Nov 17;246(4932):911-6.
91. Visel A, Carson J, Oldekamp J, Warnecke M, Jakubcaková V, Zhou X, Shaw CA, Alvarez-Bolado G, Eichele G. Regulatory pathway analysis by high-throughput in situ hybridization. *PLoS Genet*. 2007 Oct;3(10):1867-83.
92. 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.

93. Wallingford JB, Fraser SE, Harland RM. Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development. *Dev Cell*. 2002 Jun;**2**(6):695-706.
94. Wang B, Sinha T, Jiao K, Serra R, Wang J. Disruption of PCP signaling causes limb morphogenesis and skeletal defects and may underlie Robinow syndrome and brachydactyly type B. *Hum Mol Genet*. 2011 Jan 15; **20**(2): 271–285.
95. Wang J, Hamblet NS, Mark S, Dickinson ME, Brinkman BC, Segil N, Fraser SE, Chen P, Wallingford JB, Wynshaw-Boris A 2006a. Dishevelled genes mediate a conserved mammalian PCP pathway to regulate convergent extension during neurulation. *Development*. 2006 May;**133**(9):1767-78.
96. Wang X, He L, Wu YI, Hahn KM, Montell DJ. Light-mediated activation reveals a key role for Rac in collective guidance of cell movement in vivo. *Nat Cell Biol*. 2010 Jun;**12**(6):591-7
97. White J, Mazzeu JF, Hoischen A, Jhangiani SN, Gambin T, Alcino MC, Penney S1, Saraiva JM, Hove H, Skovby F, Kayserili H, Estrella E, Vulto-van 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.
98. 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.
99. White JJ, Mazzeu JF, Coban-Akdemir Z, Bayram Y, Bahrambeigi V, Hoischen A4, van Bon BW5, Gezdirici A, Gulec EY, Ramond F, Touraine R, Thevenon J, Shinawi M, Beaver E, Heeley J, Hoover-Fong J, Durmaz CD, Karabulut HG,

- 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.* 2017 Dec 16. pii: S0002-9297(17)30422-6.
100. Winter CG, Wang B, Ballew A, Royou A, Karess R, Axelrod JD, Luo L. Drosophila Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton. *Cell.* 2001 Apr 6;**105**(1):81-91.
101. Witte, F., Bernatik, O., Kirchner, K., Masek, J., Mahl, A., Krejci, P., Mundlos, S., Schambony, A., Bryja, V., and Stricker, S. Negative regulation of Wnt signaling mediated by CK1-phosphorylated Dishevelled via Ror2. *FASEB J.* 2010 Jul;**24**(7):2417-26.
102. Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998;**14**:59-88.
103. 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 May 24;**139**(2):183-7.
104. 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.
105. Yamamoto S, Jaiswal M, Charng WL, Gambin T, Karaca E, Mirzaa G, Wiszniewski W, Sandoval H, Haelterman NA, Xiong B, Zhang K, Bayat V, David G, Li T, Chen K, Gala U, Harel T, Pehlivan D, Penney S, Vissers LELM, de Ligt J, Jhangiani SN, Xie Y, Tsang SH, Parman Y, Sivaci M, Battaloglu E, Muzny D, Wan YW, Liu Z, Lin-Moore AT, Clark RD, Curry CJ, Link N, Schulze KL, Boerwinkle E, Dobyns WB, Allikmets R, Gibbs RA, Chen R, Lupski JR, Wangler MF, Bellen HJ. A drosophila genetic resource of mutants to study

- mechanisms underlying human genetic diseases. *Cell*. 2014 Sep 25;**159**(1):200-214.
106. Yokoyama N, Golebiewska U, Wang HY, Malbon CC. Wnt-dependent assembly of supermolecular Dishevelled-3-based complexes. *J Cell Sci*. 2010 Nov 1;**123**(Pt 21):3693-702.
107. Yu H, Smallwood PM, Wang Y, Vidaltamayo R, Reed R, Nathans J. Frizzled 1 and frizzled 2 genes function in palate, ventricular septum and neural tube closure: general implications for tissue fusion processes. *Development*. 2010 Nov;**137**(21):3707-17.
108. Yuko Komiya and Raymond Habas. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*. 2008 Apr-Jun; **4**(2): 68–75.

ANEXO II – APROVAÇÃO DO PROJETO DE ESTUDO PELO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de Projeto: CEP-FM 082/2009.

Título: "Pesquisa de genes candidatos para a síndrome de Robinow".

Pesquisador Responsável: Juliana Forte Mazzeu de Araújo.

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).

Data de entrega: 13/10/2009.

Proposição do (a) relato (a)

Aprovação

Não aprovação.

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB: 19/10/2009.

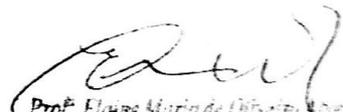
Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB: 25/11/2009.

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** "ad referendum", conforme parecer do (a) relator (a) o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 26 de Novembro de 2009.


Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina UNB

ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO UTILIZADO PARA PESQUISA EM DNA**Termo de consentimento livre e esclarecido**

A pesquisa intitulada “Pesquisa de genes candidatos para a Síndrome de Robinow” pretende buscar as causas genéticas da síndrome de Robinow.

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto acima citado. O presente convite contém informações sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de grande importância.

Para a realização da pesquisa será necessária a retirada de 4-8 mL de sangue de uma das veias do antebraço para exame feito rotineiramente no laboratório. Este procedimento de coleta de sangue é de risco mínimo para a saúde podendo, entretanto, provocar pequeno desconforto, será realizado por pessoa qualificada.

Resultando o teste positivo, será garantido um relatório explicativo sobre esta condição.

A Doutora Juliana Forte Mazzeu de Araújo é a pesquisadora responsável pelos procedimentos envolvidos, bem como da utilização dos dados produzidos durante a realização desta pesquisa. A identidade do paciente será mantida em segredo absoluto no caso de qualquer forma de divulgação desta pesquisa.

A recusa em participar da presente pesquisa não resultará em qualquer prejuízo presente ou futuro na prestação de assistência profissional pela equipe do Serviço de Genética Clínica do HUB, ficando também ressaltado que, mesmo após a assinatura do presente termo de consentimento, poderá abandonar a pesquisa a qualquer momento.

Os exames e coleta de sangue para análise só serão realizados se houver concordância do paciente em participar deste estudo. Para tal, pedimos gentilmente

que o paciente ou seu responsável assine o presente documento que será entregue em duas vias, uma para o paciente e outra que será mantida no Laboratório de Genética Clínica da Faculdade de Medicina - UNB.

Participando desta pesquisa, estará ajudando no diagnóstico, aconselhamento genético e melhor delineamento da síndrome.

Eu, _____,
profissão _____ residente e
domiciliado na rua
_____, portador da
Cédula de Identidade, RG _____, e inscrito no
CPF/MF _____ nascido(a) em ___/___/____, abaixo
assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar do estudo
“Pesquisa de genes candidatos para a Síndrome de Robinow”, e afirmo que obtive
todas as informações que considero necessárias.

Caso tenham sido tiradas fotografias:

- Concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário.
- Concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde.
- Não concordo que sejam incluídas em qualquer tipo de publicação ou apresentação.

Brasília, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do participante

Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo

Pesquisadora responsável

Telefone para contato: (61) 3307 2505

Declaração de Responsabilidade

Declaro que na pesquisa intitulada “Pesquisa de genes candidatos para a Síndrome de Robinow”, sob minha responsabilidade, a coleta de dados somente será iniciada após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FM/UnB, estando ainda o seu início condicionado à aprovação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) caso se trate de projeto de Área Temática Especial, Grupo I.

Brasília, ____ de _____ de 20__.

Juliana Forte Mazzeu de Araújo

Responsável pela pesquisa

Dra. Íris Ferrari

Colaboradora

ANEXO III – CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES

Caso 01 (Mutação de 13 pb no exon 14 de *DVL1*)

Paciente do sexo masculino com 50 anos de idade, nascido nos Estados Unidos, filho de pais não consanguíneos. Nasceu de parto normal, medindo 46 cm (< 3º percentil) e pesando 2,5 kg (< 3º percentil). Foi diagnosticado com a síndrome aos sete anos de idade. Fez cirurgia para aproximar os olhos e corrigir fissura palatina. Ao exame clínico observou-se macrocefalia, cabelo esparsos, calvície frontal, frontal proeminente, hipertelorismo, fissuras palpebrais alargadas, fâcies achatada, nariz curto, narinas antevertidas, boca triangular, lábio superior fino, má implantação dentária, hipodontia, orelhas simplificadas e longas, encurtamento mesomélico de membros, hiperextensibilidade articular, clinodactilia de 5^{os} dedos, braquidactilia, genitália hipoplásica e encurtamento de pododáctilos. Refere múltiplas infecções renais.

Caso 02 (c.1496_1508del em *DVL1*)

Paciente do sexo feminino, nascida na Inglaterra, filha de pais não consanguíneos. Ao exame clínico observou-se macrocefalia, olhos proeminentes, nariz bulboso, narinas antevertidas, ponte nasal larga, filtro longo, boca triangular, língua bífida, micrognatia, hiperplasia gengival, displasia mesomélica, braquidactilia e hérnia umbilical.

Caso 03 (c.1505_1517del em *DVL1*)

Paciente do sexo masculino com 46 anos de idade, nascido na Argentina, filho de pais não consanguíneos. Ao exame clínico observou-se estatura normal, porém abaixo do canal familiar, macrocefalia, hipertelorismo, testa larga e proeminente, nariz curto, ponte nasal larga, língua encurtada, hipertrofia de gengiva, apinhamento dentário, micrognatia, encurtamento mesomélico discreto, braquidactilia, genitália hipoplásica, criptorquidia, escoliose discreta. Relata infecções de ouvido frequentes na infância, perda de audição, problemas respiratórios e refluxo gastroesofágico.

Caso 04 (c.1612_1616dup em *DVL1*)

Paciente do sexo masculino com 20 anos de idade, nascido nos Estados Unidos, filho de pais não consanguíneos. Ao exame clínico observou-se macrocefalia, bossa frontal, olhos proeminentes, nariz bulboso, narinas antevertidas, ponte nasal larga, filtro longo, boca triangular, cantos da boca voltados para baixo, lábio superior fino, palato alto, hiperplasia gengival, língua bífida, anormalidades dentárias, genitália hipoplásica e ambígua, fosseta sacral e hérnia umbilical.

Caso 05 (c.1617delG em *DVL3*)

Paciente do sexo masculino, nascido nos Estados Unidos, filho de pais não consanguíneos e não afetados. Apresentou ao exame físico hipertelorismo, epicanto, olhos proeminentes, esclera azulada, fissuras palpebrais voltadas para cima e cílios longos. Observou-se também hipoplasia do terço médio da face, nariz bulboso, ponte nasal larga, boca triangular e com cantos voltados para baixo, fenda palatina, língua curta, hiperplasia gengival, micrognatia e anomalias dentárias. Em relação aos membros superiores o paciente apresentou mãos pequenas, clinodactilia (2, 5 D / 2, 4, 5 E), braquidactilia, sindactilia, displasia de unhas e membros proporcionalmente encurtados. O exame físico de membros inferiores do paciente também mostrou displasia de unhas e sindactilia. Além disso o paciente apresentou hérnia umbilical, anomalias cardíacas e renais, escoliose e pectus carinatum.

Caso 06 (c.479C>G em *WNT5A*)

Paciente do sexo masculino nascido de pais não consanguíneos, origem geográfica Etiópia. Ao exame clínico apresentou baixa estatura (<3º percentil), dismorfias faciais (bossa frontal, calvície frontal, hipertelorismo, dobras epicânticas, olhos proeminentes, esclera azulada, fissuras palpebrais voltadas para cima, cílios longos, nariz curto, narinas antevertidas, ponte nasal baixa e ampla, filtro longo, boca triangular com cantos voltados para baixo, língua bífida, hiperplasia gengival, palato ogival, microrretrognatia e hipoplasia de face média e orelhas de baixa implantação. O exame dos membros revelou displasia mesomélica, as mãos mostraram clinodactilia, sindactilia, prega palmar única, polegares grandes e duplicados. Os pés também apresentaram clinodactilia, sindactilia, grandes e háluces duplicados e pregas plantares profundas. O paciente apresenta genitália ambígua, micropênis, criptorquidismo e fosseta sacral. Outros achados importantes foram pectus excavatum

e hérnia inguinal bilateral. Testes complementares também revelaram hemivertebbras (T6, T7, T13).

Caso 07 (c.487_492dup em *WNT5A*)

Paciente do sexo feminino, filha de pais não-consanguíneos e sem casos familiares. Ao exame clínico apresentou baixa estatura (<3º percentil), dismorfias faciais como hipertelorismo, bossa frontal, dobras epicânticas, estrabismo, cílios longos, narinas antevertidas, filtro longo e microrretrognatia. A paciente também apresentou língua bífida e palato alto arqueado. A avaliação de membros revelou encurtamento mesomélico, clinodactilia de 5º dedo nas mãos e displasia de unhas com polegar alargados nos pés. A paciente também apresentou escoliose.

Caso 08 (c.301G>T em *FZD2*)

Paciente do sexo feminino com 47 anos de idade, nascida nos Estados Unidos, filha de pais presumidamente consanguíneos de comunidade menonita. Ao exame clínico observou-se baixa estatura, macrocefalia, bossa frontal, hipertelorismo, olhos proeminentes, estrabismo, cílios longos, boca em forma de triângulo, lábio superior fino, língua bífida, hiperplasia gengival, fissura do palato mole, anomalias dentárias, encurtamento mesomélico de membros, limitação da supinação dos cotovelos, braquidactilia, clinodactilia, polegares alargados, displasia das unhas, pectus excavatum, hérnia inguinal, genitália hipoplásica com clitóris pequeno e agenesia dos pequenos lábios, fosseta sacral. Refere anomalias renais. Fez cirurgia plástica facial. Possui um filho normal e uma filha afetada (Paciente 10). Refere que seu pai é também afetado, mas como ele vive em comunidade menonita não tivemos acesso a ele, nem mesmo fotos.

Caso 09 (c.301G>T em *FZD2*)

Paciente do sexo feminino atualmente com 15 anos de idade, nascida nos Estados Unidos, filha de pais não consanguíneos, sendo a mãe também afetada (caso 08). Ao exame físico observou-se baixa estatura, bossa frontal, hipertelorismo, olhos proeminentes, cílios longos, nariz curto, narinas antevertidas, ponte nasal larga, hiperplasia gengival, boca triangular e em forma de cupido, lábio superior fino, língua bífida, anomalias dentárias, micrognatia, encurtamento mesomélico de membros, clinodactilia, primeiro dedo largo, braquidactilia, clitóris pequeno e agenesia dos pequenos lábios.

Caso 10

Paciente do sexo masculino com 30 anos de idade, nascido nos Estados Unidos, adotado, pais biológicos desconhecidos. Nasceu com múltiplas malformações e dismorfias dentre elas: macrocefalia, testa alta, hipoplasia de face média, hipertelorismo, fendas palpebrais amplas, narinas antevertidas, hiperplasia gengival, língua curta e bífida, anomalias dentárias, encurtamento mesomélico de membros, braquidactilia, clinodactilia, criptorquidia bilateral micropênis, hérnia inguinal, defeitos cardíacos e onfalocele. Foi submetido a um total de 23 cirurgias e foi examinado por nós após as correções cirúrgicas.

Caso 11

A paciente do sexo feminino, nascida de pais não consanguíneos. Não foram relatados casos familiares. Ao exame clínico apresentou baixa estatura (1,46 m, <3º percentil), hipertelorismo marcado, dobras epicânticas, narinas voltadas para cima, ponte nasal larga, palato alto arqueado e má oclusão dentária. A paciente também mostrou pregas palmares desorganizadas, braquidactilia, unhas hiperconvexas e clinodactilia do quinto dedo nas mãos. O exame dos membros inferiores revelou pés curtos com braquidactilia. Outros achados importantes foram costelas fundidas, hérnia umbilical, incontinência urinária, problemas pulmonares, dor cardíaca e arritmia, problemas nas articulações e ataques de pânico.